

土壤中尖镰孢分离和鉴别方法的改进*

顾希贤 郝文英

(中国科学院南京土壤研究所)

棉花枯萎病菌是尖镰孢的一个专化型。该菌可在土壤中以腐生方式长期存活,其数量消长受土壤条件和耕作等农业措施的影响,与发病程度密切相关。因此,测定该菌在土壤中的数量,可为棉花枯萎病的防治措施提供依据。土壤中真菌种类繁多,在琼脂平板上出现的菌落多半来源于真菌孢子^[1]。因此,常因产孢多的真菌占优势而难以计数土中尖镰孢的数量,而且镰孢属中的种也不少。为了从土壤中有选择地分离尖镰孢,我们对分离和鉴别方法做了比较和改进,试验结果如下。

一、尖镰孢分离培养基的选择和改进

初步试验表明,在蛋白胨五氯硝基苯培养基和镰孢培养滤液培养基上^[2,3],镰孢的气生菌丝极为稀薄,菌落特征不显著,很难从菌落特征区分种;马丁氏培养基上^[4]出现的真菌种类多,镰孢占的比例很小,不足以反映镰孢在土壤中的真实数量;改良马铃薯蔗糖(或葡萄糖)琼脂培养基上^[5],真菌菌落扩展,种类多,往往不易计数;唯Park氏培养基上^[6]出现的其他真菌种类少,以镰孢占优势,而且生长良好,尖镰孢的菌落特征比较明显,但有时或因木霉扩展的影响而得不到尖镰孢的计数结果,或因有的菌落形态难以与腐皮镰孢区别而需通过镜检加以鉴别,花费时间较多。

为了抑制木霉等土壤真菌的生长,我们以Park氏原配方^①为基础,分别以阿拉伯糖、山梨糖、菊糖、乳糖、鼠李糖和甘油代替原配方中的半乳糖,在配制的平板上分别点接尖镰孢萎蔫专化型(棉枯病菌)和木霉。结果表明,以原半乳糖为碳源的对照配方上,木霉比尖镰孢生长好,而且扩展很快,而以山梨糖为碳源的培养基上,木霉的生长受抑制,菌落缩小,而尖镰孢生长良好;其他各种碳源都不如山梨糖理想。用上述7种配方分离棉枯病(盆栽试验)病土中尖镰孢的结果,也证明山梨糖优于半乳糖。以山梨糖为碳源的培养基上生长的真菌种类减少,菌落缩小,尖镰孢则发育良好,气生菌丝丰茂,易于计数;以甘油为碳源者从计数结果看虽接近于半乳糖,但木霉的生长比尖镰孢快,计数较为困难;用阿拉伯糖和菊糖为碳源虽能计数,但因木霉的铺展,影响计数结果;鼠李糖上木霉比尖镰孢长得好,尖镰孢的数量少;乳糖上木霉的铺展,以致对尖镰孢无法计数(表1)。

在山梨糖代替Park原配方中半乳糖的培养基(以下简称改进Park培养基)上,仍然有相当数量其他真菌生长,有时还因串珠、腐皮镰孢等镰孢属中其他种的生长,而影响尖镰孢的分离和计数(表2)。因此,有必要进一步抑制尖镰孢以外的其他真菌,以提高改进Park培养基的选择性。

二、以改进Park培养基为基础添加抑菌剂

为排除曲霉、青霉及其他镰孢的干扰。试验了抑菌剂的种类和浓度,结果如下:

*先后参加此项工作的还有应淑琴,施亚琴,戴丽莉和林先贵等同志。

① Park培养基配方:NaNO₃ 2克, KH₂PO₄ 1克, MgSO₄·7H₂O 0.5克, K₂S₂O₈ 0.3克, 半乳糖10克, 琼脂15克, 蒸馏水1000毫升。

表 1 不同碳源 Park 培养基分离尖镰孢的比较*

碳 源	尖 镰 孢 数 (千 / 克 土)		生 长 情 况
	43号 土 样	44号 土 样	
山梨糖	2.65	4.45	杂菌少, 未见木霉, 菌落缩小
半乳糖	2.30	4.45	杂菌多, 木霉生长好, 菌落大
甘 油	2.00	4.20	木霉铺展, 计数困难
L-阿拉伯糖	1.45	3.35	有木霉生长
菊 糖	0.60	3.00	木霉生长良好,
鼠李糖	0	0.30	木霉生长良好, 尖镰孢生长差
乳 糖	0	0	木霉铺展, 无法计数

* 土样均为加不同作物残体后盆栽试验的棉枯病土。

表 2 改进Park培养基上出现的各种镰孢菌落*

菌 名	新洋试验站		常熟何市公社		常熟何市公社		常熟何市公社	
	菌落	%	菌落	%	菌落	%	菌落	%
真菌总数	47	100	111	100	110	100	197	100
尖 镰 孢	4	8.5	2	1.8	3	2.7	6	3.1
腐皮镰孢	7	14.9	15	13.5	28	25.5	17	8.6
串珠镰孢	0	0	5	4.5	0	0	160	81.2
木贼镰孢	0	0	0	0	0	0	2	1.0
拟分枝孢镰孢	0	0	13	11.7	0	0	2	1.0
半裸镰孢	0	0	0	0	0	0	0	0

* 为四个培养皿内出现的菌落总数, 百分数为镰孢占真菌菌落总数的百分数。

经高压蒸汽灭菌并冷至45—50℃的改进Park培养基中, 分别加五氯酚钠、水杨酸、苯酚及福美双作为抑菌剂, 混匀后分别倒入培养皿中, 在室温下正放3天, 待培养基表面水分蒸发后点接各种试验菌, 于27℃按常规培养7—10天, 量菌落直径(毫米), 结果列于表3。

表 3 抑菌剂对各种真菌的抑制作用(菌落直径, 毫米)

试 验 菌	未 加	抑 菌 剂 (ppm)								
		五 氯 酚 钠			水 杨 酸			苯 酚		
		5	10	30	100	300	500	300	400	500
棉枯病菌(盐城)	26	10	+	0				14	10	0
棉枯病菌(启东)	28	13	+	+	20	0	0	35	20	+
尖 镰 孢	24	0	—	0	26	0	0	22	15	0
芳香镰孢	34	21	+	0	20	0	0	27	20	0
串珠镰孢	30	8	0	0	29	0	0	32	25	+
半裸镰孢	11	7	0	0	24	0	0	+	5	0
禾谷镰孢	90	+	0	0	5	0	0	+	0	0
曲 霉 5	19	0	0	0	19	10	0	13	10	+
曲 霉 6	15	0	0	0	14	0	0	+	0	0
木 霉	10	0	0	0	18	31	0	0	0	0
木贼镰孢	6	0	0	0						
接骨木镰孢	18	0	0	0						
拟分枝孢镰孢	20	0	0	0						
黄色镰孢	12	0	0	0						

由表 3 可见,加500ppm水杨酸的培养基上,所有试验菌均受到抑制,加300ppm 者仅一种曲霉和木霉能生长,加100ppm者无抑制作用;加500ppm苯酚对所有试验菌都有抑制作用,400ppm排除了曲霉、木霉及禾谷镰孢等,300ppm仅排除了木霉;100ppm福美双无明显的抑制作用;在含10,30ppm五氯酚钠的培养基上,大部分试验菌受到抑制,只有在含 5 ppm 时尖镰孢萎蔫专化型生长正常,除串珠镰孢、半裸镰孢和芳香镰孢外,其他试验菌均被排除。由此看来,几种抑菌剂中,以五氯酚钠的选择性较好。

用稀释平板法分离计数自然病土中尖镰孢时,对五氯酚钠的最适浓度,进行了试验,结果列于表 4。

由表 4 可以看出,从土壤中分离尖镰孢时,培养基中含 2.5ppm 五氯酚钠的,真菌全部受抑制,2 ppm时所得尖镰孢数比对照少 2—3 倍,1 ppm时与对照近似,0.5ppm时比对照高半倍左右。从杂菌生长情况看,0.5ppm时尚有曲霉和木霉的极小菌落,但不致影响尖镰孢的计数,尖镰孢生长得较为丰茂。看来,加入五氯酚钠的浓度以0.5或1.0ppm为好。我们用此法先后分析了数百个采自江苏和山东的棉枯病田土样,一般都得到较好的结果。但是,对有机质(特别是新鲜有机质)含量高、真菌数量多的土样,五氯酚钠的抑制效果仍不理想,此时可在每升改进Park培养基中加五氯硝基苯(PCNB)1克(75%可湿粉)能显著减少杂菌生长,获得良好效果。

表 4 五氯酚钠的浓度试验*

五氯酚钠浓度 (ppm)	0	0.5	1.0	2.0	2.5
尖镰孢数(%)	100	163	96	37.4	0
标准差		66	23	21	
样品重复(次)	5	4	5	2	4
生长情况	有木霉、曲霉、散小菌落及其他菌落	曲霉、木霉、菌落极小	计数时未见木霉,以后出现木霉、青霉、极小菌落	同前	全部受抑制

* 土壤含菌数最少的每克土约600个,最多达85000个故以百分数比较,

三、尖镰孢的鉴别

为了从改进Park培养基上鉴别镰孢的种,将土壤中常见的7种镰孢接种于平板上,27℃培养 5—7天,取出见光2—3天后,观察菌落形态。

观察结果表明,尖镰孢菌落的特征是:气生菌丝白色—淡(红)色、致密,背面淡橙色,串珠镰孢的气生菌丝较稀薄,半裸镰孢气生菌丝上有粉状物(分生孢子),木贼镰孢气生菌丝蓬松,中央常隆起,均易与尖镰孢相区别。唯有腐皮镰孢中有些菌落与尖镰孢中某些过渡类型难以区别。为此,我们试验并选用了柠檬酸铁铵琼脂*作为鉴别培养基,在此培养基上,尖镰孢的营养菌丝呈紫色,而腐皮镰孢呈深红色由此即可将尖镰孢与腐皮镰孢区别开来。

用改进Park培养基加五氯酚钠或五氯硝基苯作抑菌剂,采用稀释平板法可以直接鉴别尖镰孢,计数土壤中尖镰孢数量。由于稀释平板上每皿平均菌落数少于10或大于50个,其变异系数较大,而在10—40个之间,其变异系数较小(表 5),因此,分离时必须掌握适当的稀释倍数,以尽量减少误差。

表 5 分离平板上出现的菌落数与变异系数

标 本	每皿菌落数	平 均	变异系数
1	2, 3, 4, 4	3.3	29
2	5, 5, 6, 9	6.3	30
3	5, 6, 7, 7	6.3	15
4	7, 8, 8, 14	9.3	35
5	9, 11, 11, 13	11	15
6	13, 14, 17, 17	15	14
7	30, 30, 32, 33	31	5
8	39, 42, 52, 53	47	15
9	38, 51, 55, 76	55	29

* 柠檬酸铁铵琼脂配方: NH_4Cl 2克, KH_2PO_4 1克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5克, 半乳糖10克, 琼脂12克, 蒸馏水1000毫升。

摘 要

1. 从分离土壤中尖镰孢的数种培养基的比较试验看来, 在Park培养基上出现的其他真菌种类较少, 镰孢的菌落特征较为明显, 便于计数。用山梨糖代替原配方中半乳糖的改进 Park 培养基对木霉等的铺展有所抑制, 若再加0.5—1.0ppm五氯酚钠或每升中加入1克五氯硝基苯。则对其他产孢多的真菌, 如青霉、曲霉等的抑制效果更好, 对含产孢多的真菌的土样分离时可以获得较好的结果。但是, 由于受稀释平板法灵敏度的限制, 该法的应用仍有一定的局限性。

2. 在改进Park培养基上尖镰孢的气生菌丝呈白—淡紫色, 致密, 营养菌丝淡橙色, 其菌落特征可以和其他镰孢相区别。但是, 有些菌落特征不典型, 尤其易与腐皮镰孢相混淆, 在这种情况下, 可移接于柠檬酸铁铵琼脂平板上, 根据菌落颜色与腐皮镰孢加以区别。

参 考 文 献

- [1] Warcup, J.H., Nature, 166:117, 1950.
- [2] Smith, S.N. and Snyder, W.C., Photopathology 64: 190—196, 1975.
- [3] Parmeter, J.R. and Hood, J.R., Photopathology, 51: 164—168, 1961.
- [4] Martin, J.P., Soil Sci., 69: 215—232, 1950.
- [5] Komada, H., Soil and Fertilizers, 36(5):171, 1973.
- [6] Park, D., Trans. Brit. Mycol. Soc., 46:444—448, 1963.

(上接第207页)

表 5 春玉米磷肥残效产量差异

1983年

三、小 结

前茬处理	亩 产 (斤)	增 产		亩利润
		斤/亩	%	
P ₀	562	—	—	—
P ₁	646	84	15	10.1
P ₂	602	40	7	4.8
P ₃	692	130	23	15.6
P ₄	633	71	13	8.5

注: 玉米价格按每斤0.12元计算。

1. 在耕层速效磷(P)含量为8—14.5 ppm、水解氮含量中等的中度盐渍化壤质潮土上, 过磷酸钙对红小豆的增产效果达到极显著水平。

2. 1983年磷肥最佳处理为亩施P₂O₅13.2斤, 增产幅度在40%以上, 亩利润20—50元。

3. 合理的施肥(P₂O₅)区间为4.4—13.2斤/亩。随着土壤有效磷含量的增加, 施肥量应

靠近低限, 否则应靠近高限。具体用量可视磷肥供应的多少而定。

4. 红小豆施用磷肥的后茬残效也十分显著, 并仍以P₃为最高, 1983年春玉米亩增产20%以上, 亩利润15元以上。