

# 培养基对尖孢镰刀菌非致病力菌株 281 产孢量的影响

蓝江林<sup>1</sup>, 朱育菁<sup>1</sup>, 肖荣凤<sup>1</sup>, 杨淑佳<sup>2</sup>, 葛慈斌<sup>1</sup>, 刘波<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>福建省农业科学院生物技术研究所, 福州 350003; <sup>2</sup>厦门大学生命科学院, 厦门 361005)

**摘要:** 选择 8 种培养基, 采用液体培养法, 研究培养基对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* Schl.)281 菌株小孢子产生量的影响, 结果表明, 在 PDA 培养基上培养 144h 得到最大小孢子产量  $1.283 \times 10^9$  cfu/ml, 与其它培养基产孢量差异显著 ( $P=0.05$ )。培养至 192h 时, ATCC 培养基的小孢子数量达到  $1.325 \times 10^9$  cfu/ml, 与 PDA 培养基之间无显著差异 ( $P=0.05$ ), 与其它 6 种培养基之间差异显著 ( $P=0.05$ )。综合比较 8 种培养基, PDA 培养基培养时间短, 配制简单, 是较为理想的产小孢子培养基。

**关键词:** 培养基; 尖孢镰刀菌; 非致病力菌株; 产孢量

中图分类号: S432.1 文献标识码: A

Effects of Medium on Sporification of *Fusarium oxysporum* Schl.

Lan Jianglin<sup>1</sup>, Zhu Yujing<sup>1</sup>, Xiao Rongfeng<sup>1</sup>, Yang Shujia<sup>2</sup>, Ge Cibi<sup>1</sup>, Liu Bo<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Biotechnology Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003;

<sup>2</sup>School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005)

**Abstract:** The results of eight mediums effect on sporification of *Fusarium oxysporum* 281 showed that the number of sporification is  $1.283 \times 10^9$  cfu/ml in PDA medium after 144h, Significant difference were observed between PDA medium and other ( $P=0.05$ ). The number of sporification is  $1.325 \times 10^9$  cfu/ml in ATCC medium after 192h, there are no significant difference between ATCC and PDA medium ( $P=0.05$ ). PDA medium is suitable for sporification.

**Key words:** Medium, *Fusarium oxysporum* Schl., Nonpathogenic, Sporification

尖孢镰刀菌可以引起农作物枯萎病, 是世界范围内毁灭性的土传病害, 造成损失平均高达 20%~80%, 镰刀菌所有的菌株都能在土壤有机质以及多种植物组织中生长并存活多年, 极难彻底根除。目前主要采用以抗病品种为主的综合防治措施, 但抗病品种选育的周期较长, 费用较高, 而且, 新的病原菌小种能够迅速克服品种的抗性。因而, 近年来, 内生菌诱导植物抗性 (ISR) 受到越来越多植物研究者的重视, 内生菌寄生于植株体内, 与寄主互惠共生, 生长环境稳定, 更利于发挥作用。经过对镰刀菌多种微生物防治作用的比较研究发现, 镰刀菌非致病力菌株是防效最好、最稳定的生防因子之一<sup>[1]</sup>。非致病力镰刀菌应用了弱株系交互

保护作用, 特别是与病原菌同型的非致病力菌株, 在根际与致病菌进行营养和侵染位点的竞争, 诱导植株产生抗性, 阻止或延迟致病菌的进入和繁殖, 从而达到防病的效果。

镰刀菌以分生孢子进行侵染循环, 分生孢子的数量在一定程度上是影响侵染竞争效果的因子之一, 所以在镰刀菌无致病力菌株的应用中, 提高分生孢子的数量有助于其生防保护作用的发挥。尖孢镰刀菌 281 菌株分离自发病植株根部土壤, 经致病性测定为非致病力菌株, 试验选择 8 种不同的培养基, 研究其对尖孢镰刀菌 281 菌株小孢子数量产生情况的影响, 为以后进一步的生防保护作用研究奠定基础。

基金项目: 福建省自然科学基金“内生菌诱导植物抗性(GFP 标记及其对黄瓜枯萎病生防机理的研究)”(2006J0068), 福建省发改委重点项目“生物农药高毒力菌株筛选利用与菌种基因资源库的建立”(闽发改投资[2006]781号)。

第一作者简介: 蓝江林, 女, 1972 年出生, 副研究员, 从事植物病害生物防治研究。通信地址: 350003 福建福州五四路 247 号省农科院生物技术研究所。Tel: 0591-87848933, 87308112。E-mail: lanjianglin2002@yahoo.com.cn。

通讯作者: 刘波, 男, 研究员。长期从事生物农药、生物防治、生物技术、害虫综合治理、微机测报网络的研究。主持中德国际合作项目、国家 863 项目、国家自然科学基金、省科技重大攻关项目等科研课题 40 多个, 在国内外学报上发表论文 100 多篇, 出版专著 4 本。E-mail: liubofz@163.com。

收稿日期: 2007-03-14, 修回日期: 2007-07-01。

## 1 材料与方法

## 1.1 试验材料

菌株:尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* Schl.)281号菌株<sup>[2]</sup>,由浙江大学生物技术学院提供。

培养基:选择真菌培养基8种:(1)CYM培养基;

(2)PDA培养基;(3)VBC培养基;(4)马铃薯牛肉膏培养基;(5)ATCC 5培养基;(6)BPY培养基;(7)TYG培养基;(8)燕麦片培养基。

1.2 试验方法<sup>[3]</sup>

1.2.1 培养基配制 培养基配方见表1。

表1 尖孢镰刀菌培养基设计

培养基	配方(体积为1000ml)
(1)CYM培养基	蛋白胨2g,酵母膏2g,葡萄糖20g,硫酸镁0.5g,磷酸二氢钾0.46g,磷酸氢二钾1.0g。
(2)PDA培养基	马铃薯汁1000ml,葡萄糖20g。
(3)VBC培养基	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1g, KNO <sub>3</sub> 1g,蔗糖0.5g,维生素复B <sub>1</sub> 片,维生素C <sub>1</sub> 片。
(4)马铃薯牛肉膏	麦芽糖20.0g,牛肉膏5.0g,蛋白胨3.0g,马铃薯200.0g, pH7.0-7.2。
(5)ATCC培养基	酵母膏1.0g,牛肉膏1.0g,胰蛋白胨2.0g,葡萄糖10.0g, FeSO <sub>4</sub> 微量,琼脂15.0g pH7.2。
(6)BPY培养基	牛肉膏5.0g,酵母膏5.0g,葡萄糖5.0g,蛋白胨10.0g, NaCl5.0g, pH7.2。
(7)TYG培养基	胰蛋白胨3.0g,酵母膏3.0g,葡萄糖3.0g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.0g, pH7.4。
(8)燕麦片培养基	燕麦片60.0g,蒸馏水1000ml。将燕麦片加600ml水中,制成匀浆,加热至45-50℃,然后加入400ml水,121℃灭菌90min。

1.2.2 尖孢镰刀菌281菌株的培养 采用液体培养法,250ml三角瓶,装瓶量为100ml,每种培养基接种3瓶,接种量为 $6.01 \times 10^7$ cfu/ml菌液1ml 25、150rpm、黑暗条件下培养。每48h取样,采用血球计数板统计小孢子数量,共培养10天,取样5次。在 $10 \times 40$ 倍显微镜下用血球计数板测定小孢子浓度,作为产孢量评价指标。

1.3 数据处理<sup>[4]</sup>

所有数据的整理和分析均用微软的Excel2000软件以及DPS数据处理软件进行。

## 2 结果与分析

## 2.1 培养基对小孢子数量的影响

实验结果见表2、图1。不同的培养基培养尖孢镰刀菌,其不同时间内产生小型分生孢子的数量差异较大。用方差分析方法分析培养基对尖孢镰刀菌小孢子数量的影响,培养至96h时,各培养基小孢子产量增长不大,且彼此间没有显著差异。培养至144h,不同培养

基产生小孢子的数量出现明显差异。其中PDA产生的小孢子数量最多,达到 $128.30 \times 10^7$ cfu/ml,是培养起始浓度的21.35倍,与其它培养基之间差异显著( $P=0.05$ );其次是CYM、马铃薯牛肉膏培养基、ATCC、BPY、TYG和燕麦培养基,产生的小孢子数量较少;VBC培养基产生小孢子数量最少,仅为 $0.85 \times 10^7$ cfu/ml,与其它培养基之间差异显著( $P=0.05$ )。培养至192h时,ATCC培养基的小孢子数量达到 $1325 \times 10^7$ cfu/ml,与PDA培养基之间无显著差异( $P=0.05$ ),与CYM培养基、VBC培养基、马铃薯牛肉膏培养基、BPY培养基、TYG培养基和燕麦培养基产孢量差异显著( $P=0.05$ )。培养至240h时,PDA培养基培养小孢子数量平均值为 $62.494 \times 10^7$ cfu/ml,与其它7种培养基培养的小孢子数量差异显著( $P=0.05$ )。

以培养基类型为样本,以菌株培养天数为指标,构建矩阵,用欧氏距离为相关尺度,以类平均法进行系统聚类。聚类过程见表3,培养基类型对产孢量影响聚类

表2 尖孢镰刀菌281号菌株在不同培养基上的产孢数量

编号	培养基	小孢子数量 $\times 10^7$ cfu/ml)								
		48h	96h	144h	192h	240h	均值	标准差	P=0.05	P=0.01
1	CYM	9.74	3.83	30.32	47.67	31.50	24.6116	17.7822	abc	AB
2	PDA	21.92	29.75	128.30	87.50	45.00	62.494	44.666	a	A
3	VBC	0.23	0.61	0.85	0.71	0.87	0.6536	0.2602	c	B
4	马铃薯牛肉膏	30.75	43.75	19.39	29.33	67.50	38.143	18.5571	abc	AB
5	ATCC	2.08	50.08	23.83	132.5	17.17	45.1326	51.8327	ab	AB
6	BPY	6.00	15.25	34.67	26.83	13.00	19.15	11.4652	bc	AB
7	TYG	3.50	43.58	19.00	35.50	24.67	25.25	15.4395	abc	AB
8	燕麦	2.92	6.08	4.98	7.83	20.30	8.422	6.8746	bc	B

植物保护科学

分析见图2。当  $\lambda=97.6$  时,可将培养基类型分为2类, PDA 培养基单独为一类,小孢子数量最多,与其它7种培养基小孢子数量间差异显著 ( $P=0.05$ );其余7种培养基为一类。

2.2 培养时间对小孢子数量的影响

实验结果见表4、图3。在选择培养时间内,培养第4时段(192h)的小孢子数量最大,平均为

$45.98 \times 10^7$ cfu/ml,显著的高于培养96h ( $24.12 \times 10^7$ cfu/ml)、144h ( $32.67 \times 10^7$ cfu/ml)和240h ( $27.503 \times 10^7$ cfu/ml),培养48h时小孢子产量最低,为  $9.64 \times 10^7$ cfu/ml。

以培养基时间为样本,以培养基类型为指标,构建矩阵,用欧氏距离为相关尺度,以类平均法进行系统聚类。聚类过程见表5,培养时间对产孢量影响聚类分析见图4。当  $\lambda=100.1805$  时,可将小孢子数量水平分为

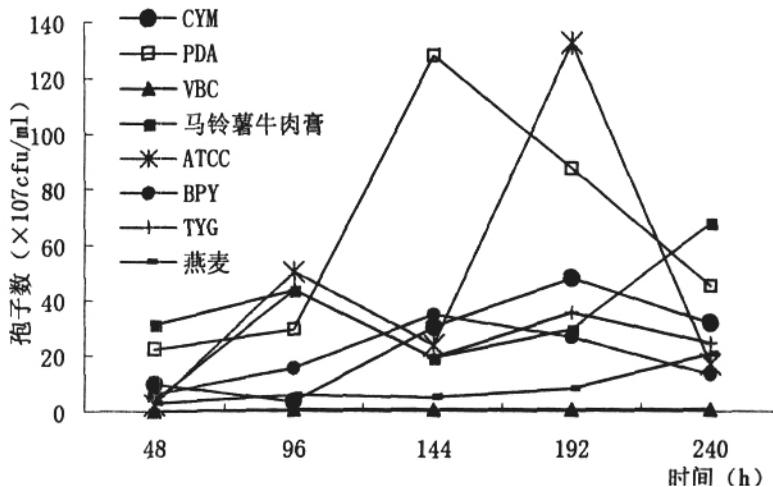


图1 尖孢镰刀菌 281 号菌株在不同培养基上的产孢量变化

表3 聚类过程

T	I	J	距离
1	8	3	21.96464
2	6	1	30.65725
3	7	1	35.57732
4	3	1	37.27414
5	4	1	51.1392
6	5	1	97.63625
7	2	1	110.4038

表4 培养时间对小孢子数量的影响

培养时间 (h)	小孢子数量 $\times 10^7$ cfu/ml)	P=0.05	P=0.01
48	9.64	b	A
96	24.12	ab	A
144	32.67	ab	A
192	45.98	a	A
240	27.50	ab	A

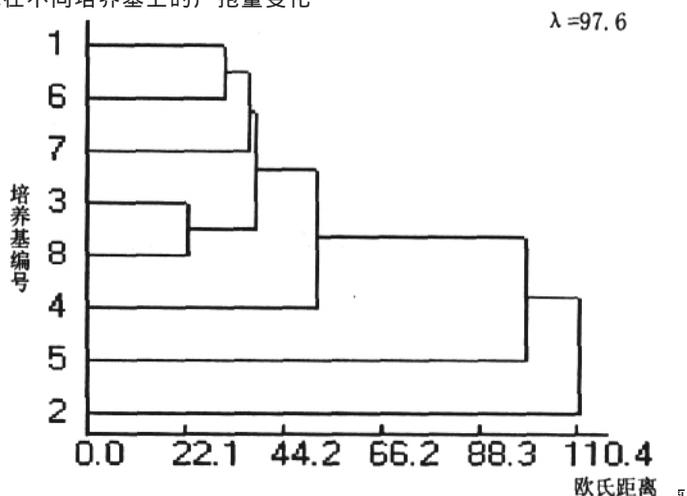


图2 培养基对小孢子产量的影响

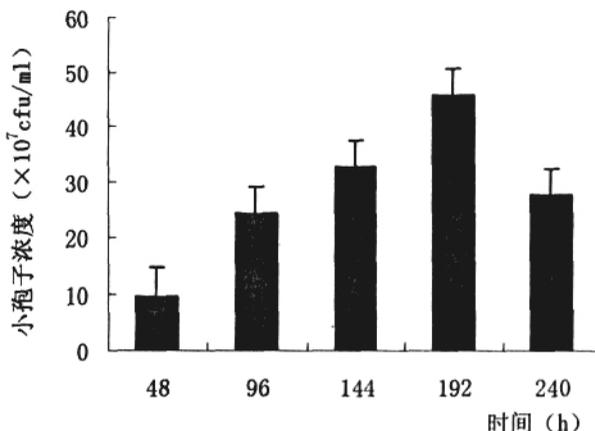


图3 培养时间对小孢子数量的影响

表 5 聚类过程

T	I	J	距离
1	5	2	56.65908
2	2	1	58.17297
3	3	1	100.1805
4	4	1	111.6264

2 个类型。培养至第 4 时段 (192h) 为 1 个水平, 小孢子数量最多, 与其它时段的数量差异显著 ( $P=0.05$ )。其余 4 个时段小孢子的数量为 1 个水平。

### 3 结论与讨论

在选择的 8 种培养基中, VBC 液体培养基培养尖孢镰刀菌产生的小孢子数量较其它 7 种培养基少, 王拱辰<sup>[9]</sup>等研究表明, VBC 固体培养基能促进多数镰刀菌产生大孢子, 产孢量可达  $3 \times 10^5$  cfu/ml。试验采用的 VBC 液体培养基, 培养至 144h, 小孢子数量达  $0.85 \times 10^7$  cfu/ml, 培养至 240h, 小孢子数量达到最高  $0.87 \times 10^7$  cfu/ml, 整个观察过程少见大孢子和菌丝出现, 说明 VBC 液体培养基虽然产生小孢子的数量较其它几种培养基少, 但较 VBC 固体培养基更适合于小孢子的产生。

综合试验结果, PDA 培养基和 ATCC 培养基的小孢子数量最多, 与其它培养基之间差异显著 ( $P=0.05$ )。PDA 培养基 144h 达到最大小孢子量  $128.30 \times 10^7$  cfu/ml, ATCC 培养基在 192h 达到最大小

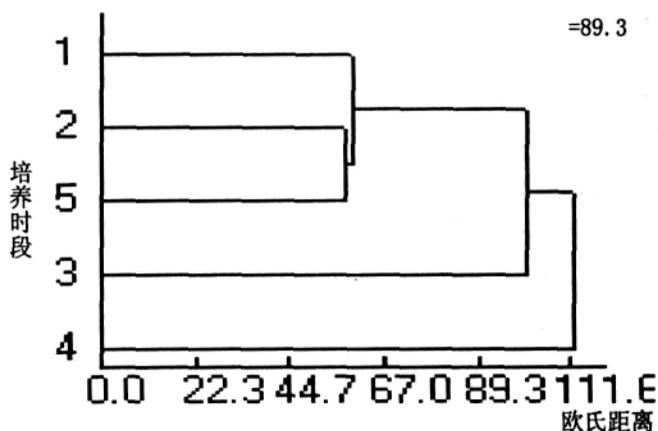


图 4 培养时间对小孢子数量的影响

孢子量  $132.5 \times 10^7$  cfu/ml, 均远高于其它 6 种培养基。虽然 PDA 培养基的小孢子数量略低于 ATCC 培养基的小孢子数量, 但完全可以满足试验要求, 且培养的时间较 ATCC 要少 48h, 原材料易得, 配制方法简单, 是真菌培养使用的传统培养基, 应该是试验研究理想的选择。

### 参考文献

- [1] Fuchs, L. G., Moenne Locozy, Y., Delagu. G. Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to *Fusarium wilt* in tomato[J]. *Plant Disease*, 1997, 81: 492-496.
- [2] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 581.
- [3] 方中达. 植病研究方法(第三版)[M]. 北京: 农业出版社, 1998: 37-155.
- [4] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 174-184.
- [5] 王拱辰, 陈辉珍. 促进镰刀菌产孢的培养基. *植物病理学报*[J], 1995, 25(2): 165-166.

(责任编辑 李碧鹰)