

大豆疫霉根腐病菌分离方法及发病地区初步调查^{*}

许修宏¹ 吕慧颖² 曲娟娟¹ 杨庆凯²

(1. 东北农业大学资环学院; 2. 东北农业大学大豆所, 哈尔滨 150030)

摘要 病组织分离法是分离大豆疫霉根腐病菌的有效方法, 在选择性培养基上, 采用此方法分离到病原菌的成功率达86.7%。1997年—1998年调查结果表明, 在黑龙江省哈尔滨市、宾县、呼兰县、牡丹江市、东宁县、密山市、穆棱市、佳木斯市、集贤县、吉林省舒兰市的大豆田中存在大豆疫霉根腐病菌。

关键词 大豆疫霉根腐病菌; 分离方法; 发病地区

中图分类号 S 435.651 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2002)02-0147-04

大豆疫霉根腐病(*Phytophthora sojae*)是一种毁灭性的大豆土传病害, 在世界上各大豆主产区都有发病报道。1991年在我国黑龙江省首次发现该病害, 此后发病面积逐年增大, 对本省大豆生产构成严重威胁。

国际上美国、澳大利亚等国家在病原菌生物学特性、生理小种、病害流行发生规律、抗病育种、综合防治等方面进行了深入研究。我国对大豆疫霉根腐病的研究起步较晚, 在病原菌生物学特性、病原菌快速检测及抗原筛选等方面进行了初步研究。但由于缺乏一种简单实用的病原菌分离方法, 制约了对该病害的研究进展。本研究在探索大豆疫霉根腐病菌分离方法的基础上, 1997—1998年在黑龙江省、吉林省调查采样, 调查病原菌的地区分布, 为进一步深入研究该病害提供方法和数据上的依据。

1 材料与方法

1.1 选择性培养基制备

培养基配方:

Hymexazol(99.4%恶霉灵) 0.05g, Carbendazim(50%多菌灵) 0.01g, Terrachlor(75%五氯硝基苯) 0.05g, Iprodione(50%扑海因) 0.04g, Neomycin

Sulfate(硫酸新霉素) 0.10g, Chloramphenicol(氯霉素) 0.01g, 胡萝卜 200.0g, 琼脂 20.0g, H₂O 1000mL。

将新鲜胡萝卜 200.0g 洗净、搅成匀浆, 加水煮沸 10 分钟, 滤去残渣, 将琼脂放入滤液, 装入科氏瓶, 一个大气压下灭菌 20 分钟。冷却到 95℃后倒入事先加入恶霉灵、多菌灵、五氯硝基苯、扑海因、硫酸新霉素、氯霉素的培养皿中, 冷凝后 4℃冰箱保存备用。

1.2 病原菌的分离

带病土壤直接分离法

将 50g 病土样加入到 100mL 无菌水中, 搅拌均匀后沉淀 10 分钟, 取 1 mL 上清液加到上述事先配制好的固体选择培养基表面, 用刮铲刮平, 放在 25℃温箱中培养。

感病叶片诱饵法

将约 60mL 无菌水加入盛有 50g 病土样的塑料杯中, 加水使土壤充分浸湿, 并在 25℃下遮光放置 3 天后换杯, 再次用蒸馏水淹没土样, 用打孔器将新鲜感病大豆(Williams)叶片打成直径为 6mm 的圆盘放于液面(每杯放 10 个圆盘), 24 小时后, 取出叶片用 0.05%的 NaOCl 表面消毒 30 秒, 无菌水冲洗后置于选择性培养基上 25℃温箱培养。

* 收稿日期: 2001-09-05

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(C9912)。

作者简介: 许修宏(1968—), 男, 博士, 副教授, 研究方向农业微生物。

病组织分离法

将病株的病茎放在自来水龙头下流水冲洗 1 小时后, 75%酒精浸泡 30 秒, 无菌水冲洗 3 次, 用灭菌的滤纸吸干表面水分, 在酒精灯外焰上通过 2 次, 取病健交界处组织置于选择性培养基上, 25℃温箱培养。

以上 3 种分离方法中, 培养时间均为 3 天, 取培养菌落的前端移入 Ca 试管斜面培养基上纯化, 取同一菌落的菌丝体置于土壤滤液中 25℃温箱培养 24 小时, 镜检观察是否产生梨形孢子囊, 同时观察菌丝形态、卵孢子及其他有性器官的形态, 对分离物进行鉴定。

1.3 病害地区分布初步调查

1997—1998 年 6 月中旬至 9 月下旬在黑龙江省哈尔滨市、五常市、阿城市、双城市、宾县、肇东市、方正县、依兰县、勃力县、鹤岗市、尚志市、牡丹江市、东宁县、绥芬河市、密山市、鸡东县、穆棱市、呼兰县、巴彦县、绥棱县、绥化市、大庆市、齐齐哈尔市、佳木斯市、黑河市、吉林省舒兰市进行调查采样。采集具有典型发病症状的病株带回试验室进行分离。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离方法对比

在 Ca 培养基上病原菌菌丝体白色、绒毡状。菌丝无隔多核, 多呈直角分枝, 基部缢缩, 菌丝宽 3—9μm, 多弯曲。菌丝在水浸条件下可产生无色侧梨状孢子囊, 大小为 42—65×32—53μm, 泡囊很

薄, 内含大量游动孢子, 很快伸长开裂, 释放游动孢子。易形成大量的直径约为 23μm 的厚垣孢子。藏卵器球形, 直径 35—42μm, 雄器近似球形, 高 11—14μm, 宽 10—12μm。卵孢子球形, 直径 30—35μm。

采用带病土壤直接分离法未分离到病原菌, 45 个处理中, 18 个只被细菌污染, 占 40.0%; 27 个同时被细菌和真菌(主要是腐霉菌还有少量木霉、曲霉等)污染, 占 60.0%(表 1)。采用感病叶片诱饵法, 45 个处理中, 3 个分离到了病原菌, 分离频率占 6.7%; 10 个处理只被细菌污染, 占 22.2%; 6 个处理只被真菌污染, 占 13.3%; 11 个处理同时被细菌和真菌污染, 占 24.4%; 16 个处理培养基上没有任何菌落, 占 35.6%。采用病组织分离法, 45 个处理中, 39 个处理分离到病原菌, 占 86.7%; 8 个处理只被细菌污染, 占 17.8%; 3 个处理同时被细菌和真菌污染, 占 6.7%。

从以上结果可以看出, 带病土壤直接分离法的杂菌污染率太高, 无法分离到病原菌。感病叶片诱饵法虽然可以分离到病原菌, 但杂菌污染率仍然很高, 且分离频率太低, 只有 6.7%, 不能满足大规模调查病原菌的需要。病组织分离法杂菌污染率低, 采用此方法分离到病原菌的频率很高, 可以用于下一步大规模分离病原菌。

在出现的杂菌中以细菌为主, 而真菌则以腐霉为主。因此在配制分离大豆疫霉根腐病菌选择性培养基和病原菌分离操作时, 重点应放在对细菌和腐霉菌的控制上。

表 1 大豆疫霉根腐病菌分离方法对比

Table 1 Comparision of isolation methods for *Phytophthora sojae*

	带病土壤直接分离法 Isolation directly from soil	感病叶片诱饵法 Isolation from soil by leaf bait	病组织分离法 Isolation from infected plant
病原菌分离频率(%)Percentage of isolation	0	6.7	86.7
细菌污染率(%)Percentage of bacteria contamination	40.0	22.2	17.8
真菌污染率(%)Percentage of fungi contamination	0	13.3	0
细菌真菌同时污染频率(%)Percentage of both fungi and bacteria contamination	60.0	24.4	6.7
无菌落频率(%)Percentage of no colony	0	35.6	0

2.2 大豆疫霉根腐病地区分布情况

采样中发现, 病害只在地势低洼或有积水的地块才有发生, 发病植株成片死亡, 但面积不大, 成星点状排列。

在黑龙江省哈尔滨市、宾县、呼兰县、牡丹江市、

东宁县、密山市、穆棱市、佳木斯市、集贤县、吉林省舒兰市分离到大豆疫霉根腐病菌 42 株(表 2), 这些市县基本分布在哈尔滨市、牡丹江市、佳木斯市三个地区, 另外, 病害在黑龙江省的分布范围是比较广的。

表 2 大豆疫霉根腐病菌株来源
Table 2 Sources of the *Phytophthora sojae* isolates

地区 Region	哈尔滨市 Harbin	宾县 Binxian	呼兰县 Hulan	牡丹江市 Mudanjiang	东宁县 Dongning	密山市 Mishan	穆稜县 Muling	佳木斯市 Jiamusi	集贤县 Jixian	吉林省舒兰市 Shulan
菌株数量 Number of isolates	8	5	5	2	2	3	2	5	2	8

3 讨论

3.1 病原菌分离方法

自从大豆疫霉根腐病出现后, 人们尝试着各种分离病原菌的方法, 试图找到简便有效的分离方法, 这些方法可以分为病组织分离法和土壤分离法两类。国外分离大豆疫霉根腐病菌方法的侧重点在于使用选择性培养基^[4], 利用病原菌耐营养贫乏的原理, 在满足病原菌生长的基础上尽量简化培养基的营养成分, 以造成一种营养贫乏的环境, 在这种环境下杂菌的生长受到了一定的抑制, 而对大豆疫霉根腐病菌生长的影响不大。选择性培养基内还加入了抑制杂菌生长的化学药剂, 如抑制细菌生长的各种抗生素(氯霉素、硫酸庆大霉素、利福平等)和抑制真菌生长的各种杀菌剂(五氯硝基苯、恶霉灵等)。使用的真菌抑制剂应具有较强的选择性, Masago 等^[5]认为恶霉灵是一种很好的选择性真菌抑制剂, 对大豆疫霉菌抑制作用微弱, 而对其他真菌尤其是腐霉菌有很强的抑制或杀伤作用。

本研究使用的选择性培养基的各组分比较容易获得, 在抑菌药剂的选择上, 满足对细菌、真菌有选择性抑制的前提下, 尽量使用较为常用的杀菌剂, 使配方具有实用性。另外, 本研究强调通过分离操作技术来控制杂菌污染, 由于在病组织分离法中, 细菌是主要的污染菌, 能否控制住细菌是决定分离成功与否的重要因素, 因此, 本研究的技术操作要点是针对控制细菌而设计的。自来水冲洗可以降低细菌的基数, 酒精浸泡杀死大多数细菌, 无菌水冲洗、无菌滤纸吸干进一步降低了组织表面细菌的数量, 快速经过火焰后剩余的少量细菌基本被杀死, 即使还有残存细菌, 病组织表面被烤干了, 缺水的表面不利于细菌的迅速繁殖。由于病原菌菌丝可以寄生在病组织的深处, 瞬间经过火焰不能将其完全杀死, 因此对分离没有影响。

大豆疫霉根腐病的典型症状是叶片退绿、萎蔫下垂, 但不落下。主茎一般保持坚挺, 上有褐色条状病斑, 茎的内部变褐色。采用病组织分离法分离病

原菌时选择具有典型症状的植株对分离是至关重要的, 在绝大多数具有以上典型症状的植株上可以分离到病原菌, 而在非典型的、摸棱两可的症状的植株上则极少分离到病原菌。

采用病组织分离法分离病原菌也存在不足之处。大豆疫霉根腐病苗期发病较重, 在出苗前使种子腐烂, 导致不出苗, 在这种情况下, 依赖于发病植株进行分离的病组织分离法显得无能为力。另外, 在不利于病害发生的条件下, 如在干旱少雨、种植抗病大豆或非寄主植物的情况下, 即使土壤中存在病原菌, 也不能通过这种方法分离出来。因此, 国外在进行大规模病原菌地区分布情况调查时, 主要依赖感病叶片诱饵法。采用病土分离法和感病叶片诱饵法效果不佳主要原因是, 一、在国内无法购买到某些化学药品, 导致培养基选择性不强。二、没有完全彻底掌握感病叶片诱饵法的技术环节, 技术方面的研究今后需要加强。

3.2 病原菌地区分布

大豆疫霉根腐病在黑龙江省的大豆产区是广泛存在的^[1,2,3], 根据本研究和前人研究的结果分析, 该病害在黑龙江省基本形成围绕哈尔滨市、佳木斯市和牡丹江市的三个发病区域, 发病地块多半靠近水源、地势平坦、积水较多。

由于本研究采样地区范围、采样量有限, 对病情的调查只是初步的, 结果有待完善。

参考文献

1 马书君. 黑龙江省大豆疫霉根腐病发生情况调查[J]. 大豆科学 . 1997, 16(1): 88-89.
2 王晓鸣, Schmittenne A. F., 马书君. 黑龙江省大豆疫霉调查与病原分离[J]. 植物保护. 1998, (3).
3 许修宏, 吕慧颖, 杨庆凯. 大豆疫霉根腐病抗源筛选[J]. 大豆科学, 1999, 18(2): 147-150.
4 Yang, X. B., Mansur, L. . Races of *Phytophthora sojae* in Iowa soybean fields[J]. Plant Disease . 1996, 80: 1418-1420.
5 Masago H. , Insende, G. . Selective inhibition of *Pythium spp.* on a medium for direct isolation of *Phytophthora spp.* from soil and plants [J]. Phytopathology. 1977, 67: 425-428.

ISOLATION METHOD FOR *PHYTOPHTHORA SOJAE* AND INVESTIGATION FOR THE INFECTED REGIONS

Xu Xiuhong Liu Huiying Qiu Juanjuan Yang Qingkai

(*Northeast Agricultural University, Harbin, 150030*)

Abstract The pathogen could be successfully isolated from the diseased tissue of soybean plants on selective media and the percentage of isolation reached 86.7%. The results of investigation showed that the pathogen existed in the fields of Harbin City, Binxian County, Hulan County, Mudanjiang City, Dongning County, Mishan City, Muling City, Jiamusi City and Jixian County of Heilongjiang Province, and Shulan City of Jilin Province.

Key words *Phytophthora sojae* ; Isolation method; Infected regions