

大豆疫霉根腐病传播途径研究^{*}

文景芝¹ 李兆林² 周艳玲¹

(1.东北农业大学农学院植保系, 哈尔滨 150030;
2.中科院黑龙江农业现代化研究所, 哈尔滨 150040)

摘要 对带菌土壤、病残体进行传病试验,研究了人工接种条件下种子带菌条件及带菌种子传病情况,结果表明,带菌土壤和病残体无论是在当年还是越冬后都可有效地传播大豆疫霉根腐病,是大豆疫霉根腐病的主要初侵染源和传播途径。人工接种可以导致大豆种子带菌,但只有在病菌直接接触到豆荚才有这种结果。幼荚期接种豆荚可以使荚内的豆粒严重发病,豆粒被一层菌丝包裹,这些豆粒虽然本身不能萌发,但能作为接种体导致邻近的健康植株发病。作者通过大量的播种试验,到目前为止还未能证实来自自然发病田的种子常规越冬后能够传病,相关工作正在进行中。

关键词 大豆疫霉根腐病;传播途径;土壤;病残体;种子

0 前言

大豆疫霉根腐病(Phytophthora root rot of soybean)是一种毁灭性病害,世界各大豆产区均有发生,有些地区甚至造成绝产,对大豆生产构成巨大威胁。近年来我国某些地区陆续发现大豆疫霉根腐病,引起高度重视,并积极开展研究工作。大豆疫霉根腐病是一种土传病害,但种子是否带菌并传病,国内同行各持己见。周肇慧等(1998)研究证明人工接种可以产生感病的种子,自然条件下也发现感病豆荚,但种子带菌的机率较低。作者通过人工接种和从自然发病田直接采样,用最接近自然发病的方法研究大豆疫霉根腐病的传播方式和途径,以明确土壤、病残体和种子在大豆疫霉根腐病传播中的重要性,为今后的研究奠定理论基础。

1 材料与方法

供试菌种: 597-3,从大豆疫霉根腐病发病田采集分离获得的菌株

供试大豆品种: 合丰 25

基础培养基: 胡萝卜琼脂 分离用含抗生素的胡萝卜琼脂。

1.1 土壤传病试验

^{*} 收稿日期 1999-07-12
Received on July 12, 1999

1.1.1 自然发病田带菌土壤传病试验

于发病盛期(8月下旬)采集自然发病田病株附近土壤,分三份,一份装入无底孔的花盆中,播种感病品种合丰 25 真叶期浇灌盆土并使土壤表面水层保持至少 24 小时,然后排掉水分,移入 25℃ 生长箱内正常管理,两周后调查发病率。取病株分离培养并鉴定病原菌种类。第二份用纸袋装好置 4℃ 冰箱一个月,然后取出做传病试验。第三份装入牛皮纸信封中,用布袋装好埋于田间,第二年大豆播种期取出直接做传病试验或经预处理后再做传病试验,预处理参照 Schmitthenner, A. F. et al 1994 的方法

于秋收后采集同一田块病土,直接做传病试验和越冬试验。

1.1.2 病原菌土壤接种诱发病害

将病菌移植于灭菌胡萝卜渣(制作胡萝卜培养基时滤出的残渣)上,定期摇动三角瓶使病菌在培养基上均匀生长,长满后取出以 1:3 的比例均匀拌在表层土中(土壤已经过高压蒸汽消毒),其中播种合丰 25,保持土壤湿润至出苗。真叶期浇灌盆土至土壤表面有水层保持至少 24 小时,然后排掉水分,移入 25℃ 生长箱内正常管理,两周后调查发病率。取病株分离培养并鉴定病原菌种类

1.2 病残体传病试验

于发病盛期采集田间病株,分三份,一份剪碎后以 1:3 的比例混于表层土中,(土壤未经过消毒处理)以下各步骤同土壤传病试验。第二份也剪碎并以 1:3 的比例混于土壤中,装入布袋埋于田间,第二年大豆播种期取出做传病试验。第三份装入纸袋室温下放置 5 个月,然后同上做传病试验

1.3 种子传病试验

1.3.1 自然发病田种子传病试验

1996 年 - 1998 年连续三年秋天从自然发病田收集大豆种子,随机取样,次年春天(5 月左右)播于灭菌土壤中,在充分保证发病条件的前提下,定期观察出苗及发病情况,随时对可疑病株进行分离培养及病原鉴定。

1.3.2 人工接种诱发种子带菌的条件及其所获得种子(或病粒)传病试验

采用两种接种方法,接种不同生育期的盆栽大豆植株的不同部位,接种保湿 24 小时后移栽至室外田间,正常管理,观察发病情况,秋天分别检查各处理种子带菌情况并做传病试验。

1.3.2.1 喷雾接种

孢悬液制备:将适量的无菌水加入 25℃ 恒温箱中培养 7-10 天的已长满病菌菌丝的平皿内,25℃ 恒温箱中培养过夜,显微镜下观察,若有大量孢子囊产生,则将平皿移至室温下,待游动孢子形成并大量释放时,双层纱布过滤制成孢悬液。此过程可反复多次以保证接种用菌量。接种浓度为每 10×10 视野下 10-15 个游动孢子。

接种:分别于大豆幼苗期、花期和荚期用孢子喷雾器将孢悬液均匀地喷到大豆植株上,幼苗期和花期整株接种,荚期只接种豆荚,注意不要漏喷或重喷。接种后保湿 24 小时。

1.3.2.2 菌丝块贴接

用直径 4mm 打孔器将长满平皿的病菌菌丝打成圆片,分别于大豆幼苗期、花期和荚期接种盆栽大豆,接种时将菌丝圆片直接贴在所要接种的部位(茎部、叶片上和荚上),有

菌丝的一面与植株接触。接种后保湿 24小时。

2 结果与分析

2.1 带菌土壤传病试验

于发病盛期采集的田间病土在保存良好的情况下平均可诱发 86%的发病株率,用选择性培养基对 15株病株进行分离,检出 9株。在保存条件对病菌存活不利的情况下(如 4℃冰箱中长期湿润保存)诱病率为 0。

表 1 带菌土壤传病试验结果

Table 1 Soil- transmission of *Phytophthora* root rot of soybean

病土来源 Soures soil	采样时期 Time of sampling	预处理 Pretreatment	播种量* (粒) Total plants	出苗* (株) Emerg ent plants	发病* (株) Diseased plants	发病率* (%) Incidence (%)	病株检出比例* Pmg infected plants /total plants isolated
自然发病田 Natural diseased field	发病盛期 During prevalence	无 No	60	51	44	86	9 /15
		4℃ 1个月 4℃ for 1 month	60	49	0	0	
		田间越冬 Overwinter in field	60	54	4	7. 4	2/4
		田间越冬** Overwinter in field	60	53	16	30	5/8
自然发病田 Natural dis- eased field	秋收后 After harvest	无 No	60	53	25	47	9 /15
		田间越冬 Overwinter in field	60	50	2	4	2/2
		田间越冬** Overwinter in field	60	51	21	41	6 /10
人工接种 loculation		无 No	60	54	37	69	10/15

* 三次重复平均数。 Average of three repeats

** 越冬后的带菌土壤播种前经两周左右的预处理,具体方法见参考文献^[1]。

Pre- treat the over- wintered soil before planting with the method that Schmitthenner- A- D- et al- described in their paper^[1]。

发病盛期采集的病土经过田间自然越冬处理后,诱病率大大降低,其中越冬后播种前对病土样进行预处理,诱病率提高 22. 6%。

秋收后采集的病土经过不同处理后得出同样的结果。

2.2 病残体传病试验

于发病盛期从田间采集的新鲜病株诱病率高达 90%,越冬处理后诱病率为 43%,室温放置 5个月后有 10%的诱病率。

2.3 人工接种诱发种子带菌的条件

2.3.1 喷雾接种

幼苗期接种后 2—3 天开始发病,茎部出现褐色坏死点,后逐渐连成褐色坏死斑块,叶片首先表现沿叶脉出现褐色坏死点,叶肉出现淡黄色褪绿斑,后整个叶片迅速失水萎蔫干枯。发病后期茎部病斑向上下蔓延,导致整株死亡。

花期接种症状与上述相同,但是个别植株只是在茎上形成局部褐色坏死斑块,并不导致整株死亡。

英期接种主要在结荚初期(未鼓粒)、中期(鼓粒但未成熟)和后期(荚开始变黄)以孢悬液喷雾接种豆荚,保湿后移栽至室外田间。结果结荚初期(未鼓粒)接种的豆荚一般首先自荚柄基部出现褐色病斑,后向荚尖蔓延,最后整个豆荚变褐枯死,一般不能正常结实。中期(鼓粒但未成熟)接种的豆荚大多也从英基部开始发病,然后向荚尖蔓延。同一叶位上的豆荚,首先在长势弱的荚上发病,然后通过叶腋向其它未发病的荚蔓延。豆荚上的病菌一般不能通过叶腋向茎上和叶柄上蔓延,但是如果遇上连雨天,病菌则很快蔓延,整个植株变褐枯萎死亡。发病重的荚一般停止发育,不能结出成熟的种子,发病轻的荚,虽然荚皮上有零星坏死斑点,但并不影响其中的种子发育,可以结出外表健康的种子。后期(荚开始变黄)对豆荚进行喷雾接种很难接上,偶尔在荚皮上可见褐色坏死斑点,病斑并不继续扩展。

2.3.2 菌丝块接种

幼苗期接种茎部和叶部可在接种部位产生褐色坏死斑块,逐渐扩大,环绕茎导致植株上部枯死。花期接种结果同幼苗期,只是死苗率稍低。英期接种结果同喷雾接种,不同的是发病程度更重。

2.3.3 病残体收集及观察

将病残体(包括病叶、病茎和病荚)收集,用自来水彻底冲洗干净后保湿培养,结果并不象其它植物疫病那样形成大量孢子囊,而是产生菌丝,然后在适宜的条件下由菌丝产生孢子囊。前期受病的豆荚,其中的豆粒绿色,从脐部开始变褐,秋天种子干瘪皱缩,外包一层灰白色膜状物,外观上似大豆霜霉粒,镜检发现外层的灰白色膜状物为病菌菌丝与豆荚内膜的混合物,其中有极少量的卵孢子。中期受病的豆荚,发病重的与上述相同,发病轻的到秋天可结出绿色或黄色皱缩的豆粒,镜检了 20 粒的种皮,共检出 7 个卵孢子。后期受病的豆荚可结出外表健康的种子,未在种皮内检出卵孢子。

2.3.4 “带菌种子”(病粒)传病试验

表面有白色霉层的病粒播种后不能出苗(播种 100 粒),扒出后发现全部腐烂,随后在花盆中播种 100 粒表面消毒种子,结果苗期疫病发病率达 83%,说明虽然这些病粒本身不能生长成病株,但能作为接种体导致邻近的健康植株发病,即能将病菌传至随后播种在同一小盆中的健康种子长出的植株上。

表面皱缩的豆粒出苗率只有 38%,且长出的豆苗非常弱小,有的植株子叶变黑变褐,怀疑是种子带菌所致,但从中未分离出大豆疫霉根腐病菌,而是纯净的镰刀菌。后期豆苗虽然长势比对照弱,但未见植株上有大豆疫霉根腐病症状。表面健康的种子出苗率 83%,植株长势良好,且未见到大豆疫霉根腐病症状。

从自然发病的生产田收集的“种子”中有很大部分是绿色的或皱缩的未成熟粒,用

MTT染色检查种皮,带菌率极低(黑龙江省植保植检站提供的资料),从每年收集的种子中随机取近 1000粒播种,结果出苗率只有 30%左右,在充分适合发病的条件下未见有大豆疫霉根腐病症状出现,也未从植株上分离出大豆疫霉根腐病菌。

3 结论及讨论

3.1 带菌土壤和病残体无论是在当年还是越冬后都可以有效地传播大豆疫霉根腐病,是大豆疫霉根腐病的主要侵染源和传播途径,这一结论印证了许多国内外专家的观点^[2]。

3.2 人工接种可以使大豆种子带菌,但只有在病菌直接接触到豆荚才有这种结果。通过几年的田间调查,还未发现自然条件下病菌直接侵染荚导致发病的现象,所看到的大都是茎部首先出现病斑,然后向上下蔓延,病菌侵入维管束后,沿维管束迅速蔓延,导致整株枯萎死亡,如果此时大豆植株正值结荚期,则荚中的种子停止发育,秋天收获的只是一些绿色或黄色的不饱满的瘪粒,这些瘪粒可以分两种,一种是由于疫病菌侵入植株维管束中,破坏了维管束的疏导功能,使正在发育中的种子得不到充足的养分和水分供应,导致发育障碍造成瘪粒;另一种是疫病菌通过维管束蔓延到临近的正在生长发育的豆荚上并进入种子,使种子停止发育并带菌,但这只是极个别现象,更多的是第一种情况。

3.3 作者通过接种不同发育时期的豆荚得到不同的豆粒,其中幼荚期发病的豆粒表面有菌丝而未见卵孢子,这样的豆粒经过几个月(当年 10月到次年 5月)的室内常规贮存,播种后虽然本身不能萌发,但能作为接种体导致邻近的健康植株发病,说明大豆疫霉根腐病菌除卵孢子外,还有其它越冬形式,说明由菌丝产生的厚垣孢子。在病害传播中起一定作用。

3.4 关于大豆疫霉根腐病种子传病问题,周肇慧等人认为,通过人工接种获得的带菌种子自身可以长出病株,也可以作为接种体导致邻近植株发病,这一结果与我们的结果相同。但他们并未对自然发病田的带菌种子做传病试验。作者通过大量的播种试验,到目前为止还未能证实来自自然发病田的种子经过常规越冬休眠后能够传病,可能是带菌率低或者是条件不适宜。相关工作还在进行中。

3.5 据周肇慧等(1998)报道,疫霉菌是以卵孢子、藏卵器和菌丝体存在于种子内,且卵孢子只产生在种皮内,胚和子叶中的为菌丝体。一般情况下种子出苗时种皮留在土壤中,而且紧靠着植株茎基部,那么如果土壤温湿度条件适宜,种皮中的卵孢子可萌发侵染本身,如果田间有流水,卵孢子萌发生成的游动孢子可侵染其它植株。作者通过大量的试验没能证实这一理论上的推测,有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Schmitthenner, A. E., Hobe, M., and Bhat, R. C., *Phytophthora sojae* races in Ohio over a 10-year 1994
- 2 Kleih H. H. Ecology of the *Phytophthora* disease of soybean. *Phytopathology*, 1959, 49: 380-383
- 3 周肇慧,严进,大豆疫霉根腐病种子带菌和传病研究,中国农业大学学报,1998,3(增刊): 54-60

TRANSMISSION OF *Phytophthora* ROT OF SOYBEAN

Wen Jingzhi Li Zhaolin Zhou Yanling

(Northeast Agricultural University, Harbin, 150030)

Abstract Studies on the transmission of *Phytophthora* root rot of soybean had been carried out with the soil debris and the seeds which came from natural diseased fields as well as the soil and seeds which inoculated with the pathogen. It shows that *Phytophthora* root rot of soybean is mainly transmitted by the soil and debris which naturally infected with pathogen. The seeds can be infected when the young seed pod is inoculated with pathogen. When planted, these seeds can cause nearby plants to be infected although they can not germinate themselves. So far we have no sufficient evidence to testify the seeds naturally infected with the pathogen in growing field can transmit this disease.

Key words *Phytophthora* root rot of soybean; Transmission; Soil; Debris; Seeds