

大豆拟茎点种腐病菌 (*Phomopsis longicolla*) 对大豆种子致病性及侵入部位研究

李雪光^{1,2}, 李淑娴³, 宋洁^{1,2}, 许艳丽²

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 中国科学院 东北地理与农业生态研究所, 黑龙江 哈尔滨 150081; 3. 美国农业部农业研究局 作物遗传研究所, 美国 斯通维尔 38776)

摘要:大豆拟茎点种腐病菌 (*Phomopsis longicolla* Hobbs) 可引起大豆种腐病, 严重影响大豆产量和品质。为探讨大豆拟茎点种腐病菌对大豆种子发芽的影响及侵染种子的部位, 在实验室条件下采用种子接菌法进行了研究。结果表明, 大豆拟茎点种腐病菌可明显降低种子的发芽势和发芽率。侵入部位包括种子的种皮、子叶及胚, 严重影响种子活力。

关键词: *Phomopsis longicolla*; 大豆; 种子; 致病性; 侵染部位

中图分类号: S435.651

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.03.0455

The Pathogenicity and Infection Site of *Phomopsis longicolla* on Soybean Seed

LI Xue-guang^{1,2}, LI Shu-xian³, SONG Jie^{1,2}, XU Yan-li²

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, China; 3. Crop Genetics Research Unit, United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service, Stoneville, MS 38776, United States)

Abstract: *Phomopsis longicolla* is the primary cause of *Phomopsis* seed decay (PSD) in soybean. The pathogen can seriously affect soybean yield and seed quality. The effect of soybean germination and infection site was explored by seed inoculating the pathogen in lab test. The results showed that *Phomopsis longicolla* significantly reduced seed germination potential and germination rate. The site of infection included seed coat, cotyledon and embryo of soybean. It seriously affects seed vigor.

Key words: *Phomopsis longicolla*; Soybean; Seed; Pathogenicity; Infection site

大豆拟茎点种腐病菌 (*Phomopsis longicolla*) 是引起大豆种子腐烂的重要病菌, 也是种传病害的病原之一, 能够造成严重的产量损失^[1], 目前在美国、阿根廷、意大利、韩国、南斯拉夫、澳大利亚、克罗地亚、希腊和新墨西哥等都有该病菌引起的病害报道^[1-2]。2010 年我国首次报道了黑龙江省佳木斯市大豆田间发现由 *P. longicolla* 引起的大豆茎枯病, 在大豆的生育中后期出现下部茎秆、叶、分枝与茎连接处产生颜色较淡的干枯病斑, 导致植株上部萎蔫和枯死, 后期病斑上散布黑色的分生孢子器^[3]。*P. longicolla*除了能引起大豆茎枯病外, 还能引起大豆种子腐烂。根据 *P. longicolla* 的感染程度, 被侵染的大豆种子可表现为从无症状到有明显症状, 无症状的种子也可能已被感染, 同时种子的萌发及活力也有所降低^[4], 2012 年 Shan 等曾报道在中国的广州、南昌和武汉 3 个地区从无症状种子上分离出 *P. longicolla*^[5], 并通过试验证明了分离自武汉的 *P. longicolla* 对大豆幼苗具有致病力。而严重受感染

的种子会出现皱缩、延长、开裂, 部分或全部覆盖白色霉层的症状^[6-7]。此外, *Phomopsis* 感染种子的发病率与大豆发芽和质量之间呈显著负相关^[8-9]。大豆拟茎点种腐病菌可造成严重的经济损失, 由于该病菌的感染大豆产量从 1996 年的 4.3×10^8 kg 降到 2007 年的 3.8×10^8 kg^[10]。据报道 2006 年种腐病在美国引起重大产量损失的 25 种病害中排名第 17 位, 产量损失估计达 1.22×10^8 kg^[11], 因此, 近年该病引起了美国等大豆生产国的广泛重视。

在中国和美国有报道 *P. longicolla* 的菌丝可通过种脐和叶柄侵入胚珠、种皮和子叶的所有组织直至胚根和胚芽进而导致种子发病和腐烂^[6-7], 我国关于大豆拟茎点种腐病菌对种子侵染情况和侵入部位的研究报道较少。为进一步明确 *P. longicolla* 对大豆种子的致病性和侵染部位, 将从大豆种子上分离到的寄藏真菌——*P. longicolla* 接到大豆种子上, 对其致病性和侵入种子的部位进行了研究, 旨在为 *P. longicolla* 生物学进一步研究提供依据。

收稿日期: 2013-12-30

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2006BAD21B01-15)。

第一作者简介: 李雪光 (1989-), 女, 在读硕士, 主要从事大豆病害研究。E-mail: lixueguang1989518@yeah.net。

通讯作者: 许艳丽 (1958-), 女, 博士, 研究员, 博士生导师。主要从事作物病虫害生物生态控制研究。E-mail: xyll@iga.ac.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆品种为合丰 25,由中国科学院东北地理与农业生态研究所保存提供;供试大豆拟茎点种腐病菌(*Phomopsis longicolla*)菌株从 2011 年大豆种子中分离并纯化得到,由中国科学院东北地理与农业生态研究所保存提供;菌株纯化及分离所用培养基为酸性 PDA 培养基(Acid-PDA,简称 APDA),配方为马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂条 20 g,蒸馏水 1 000 mL,待 PDA 培养基冷却到 45~50℃时加 1.5 mL 的 10% 的乳酸(pH4.8~5.2)、75 mg 的硫酸链霉素(100 万单位)。

1.2 种子接种方法

参照崔永林等^[3]的方法,将供试病菌接种于 APDA 培养基平板上,25℃下暗培养 5 d,选取健康大豆种子,经 75% 酒精消毒 3 min 后置于灭菌的滤纸上稍风干,将种子匀距放在供试病菌的培养皿内,种子接于菌落边缘紧贴培养皿内壁。以种子接种在 APDA 培养基上(不接种真菌)培养为对照,培养条件为 25℃下暗培养。每培养皿 10 粒种子,共 5 皿,3 次重复。接种后第 4 天调查种子发芽数和菌丝覆盖情况,第 5 天调查种子发芽率、带真菌率及种子被菌丝覆盖率。种子表面完全被菌丝覆盖且不能萌发即为覆盖。

菌丝覆盖率(%)=(菌丝覆盖种子数/供试种子总数)×100

发芽率(%)=[发芽终期(第 5 天)正常发芽粒

数/供试种籽粒数]×100

发芽势(%)=[发芽初期(第 4 天)正常发芽粒数/供试种籽粒数]×100

种子带真菌率(%)=(带真菌种子数/供试种子总数)×100

1.3 种子不同部位病原的再分离

将接种 6 d 后被菌丝覆盖的种子清除覆盖菌丝得到种皮、子叶和胚 3 部分,经 75% 酒精消毒 3~5 s,1% NaClO 消毒 3 min,无菌水充分洗涤 3 次后放置在灭菌的滤纸上稍风干,再将种子部位等距放置在 APDA 培养基上 25℃下培养;对照组将未接种病菌培养基上未长菌的种子同样按上面 3 部分经消毒后放置于 APDA 培养基上 25℃下培养;每培养皿 3 块种子部位,共 3 皿,5 d 后调查病原菌的再分离获得率。

病原菌的再分离获得率(%)=分离得到病原菌数/供试种子部位数)×100

1.4 数据分析

使用 Excel 2003 对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 大豆拟茎点种腐病菌对大豆种子的致病力

由表 1 可知,对照种子的发芽率为 90.7%,发芽势为 56.0%,种子带真菌率为 14.0%;而接种病原菌后种子的发芽率和发芽势均为 0;接种病菌第 5 天后病菌菌丝几乎全部覆盖种子,菌丝覆盖率为 98.7%,致使种子不发芽。

表 1 大豆拟茎点种腐病菌对大豆种子的致病性

Table 1 Pathogenicity of *Phomopsis longicolla* on soybean seed

处理 Treatment	发芽势 Germination vigor/%	发芽率 Germination rate/%	带真菌率 Percentage of seed with fungi/%	菌丝覆盖率 Percentage of hyphae coverage/%
对照 Control	56.0±30.0	90.7±5.0	14.0±4.0	0±0
接种病菌 Inoculation Pathogens	0±0	0±0	—	98.7±1.2

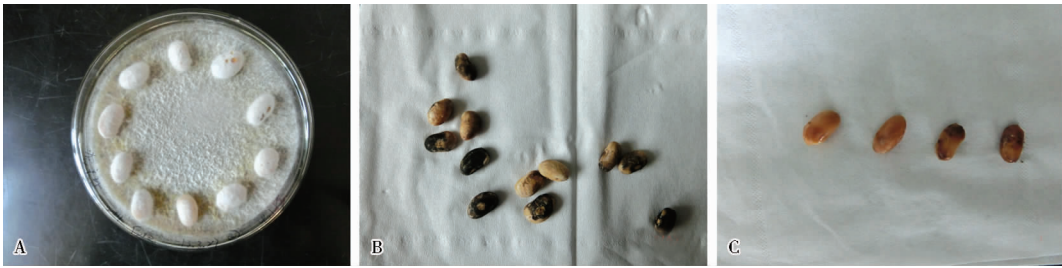
2.2 大豆拟茎点种腐病菌对大豆种子的致病性

接种病菌 3 d 后膨胀的种子上开始出现菌丝,并于第 4 天后有种子被菌丝覆盖,第 5 天后种子几乎被菌丝全部覆盖,同时被覆盖的种子也未发芽,且有时溢出褐色的液滴状物质(图 1A)。第 6 天时将被菌丝覆盖的种子去除表面菌丝,可看到被侵染的种子表面皱缩且变褐或变黑,有的还可看到整个种子布满小黑点(分生孢子器)(图 1B);去除种皮

可看到子叶也变褐或变黑,种皮干瘪,被侵染的甚至腐烂,无法保持完整的形态(图 1C)。

2.3 种子不同部位病原菌分离率

对种子不同部位病原菌的分离调查结果显示,对照种子的种皮、子叶和胚的病原菌再分离率为 0,而发病种子的种皮、子叶和胚均分离出接种的原始病原菌,且病原菌再分离均达到 100%(表 2)。



A:对种子的覆盖情况;B:去除覆盖菌丝的种子;C:被菌丝覆盖的子叶
A:Covering of the seeds;B:Seeds of removing hyphae;C:The cotyledons covered by hyphae

图 1 大豆拟茎点种腐病菌对种子的侵染覆盖情况
Fig.1 Infection of the seeds by *Phomopsis longicolla*

表 2 种子部位病原菌再分离获得率

Table 2 Re-isolation percentage of pathogen from different parts of seeds

种子部位	处理	再分离获得病菌率
Seed sites	Treatment	Re-isolation percentage of pathogen/%
种皮 Seed coats	对照 CK	0 ± 0
	接种病菌 Inoculation	100.0 ± 0
子叶 Cotyledons	对照 CK	0 ± 0
	接种病菌 Inoculation	100.0 ± 0
胚 Embryos	对照 CK	0 ± 0
	接种病菌 Inoculation	100.0 ± 0

2.4 种子不同部位接菌后受害症状

由图 2 可看出,剥离得到的对照种子的种皮未分离出任何菌株,且呈现正常的黄色,子叶为正常的绿色;而接种病菌的种子上得到的种皮多变黑且被菌丝覆盖(图 2A),子叶变暗变黑,失去绿色,表面布满菌丝(图 2B)。接种病菌种子的胚未见有伸长生长,表面都布满菌丝,与对照相比 5 d 时间抑制胚生长 2~6 cm(图 2C)。

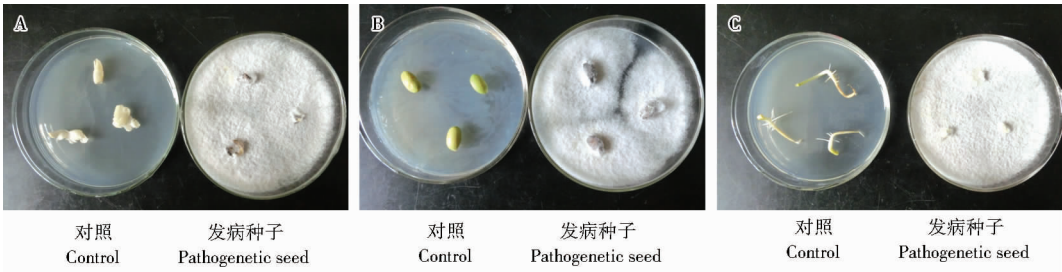


图 2 发病种子与对照种皮(A)、子叶(B)和胚(C)的比较

Fig.2 Comparison on the pathogenetic seed coat(A) ,cotyledons(B) and embryo(C) with the control

3 结论与讨论

大豆拟茎点种腐病菌寄主范围广,不仅可侵染大豆,还可侵染豆科其他植物,甚至其它科和属的植物,如豆科的花生、菊科的苍耳和锦葵科的苘麻等^[2],近年来引起人们越来越多的重视。Li 等^[10]对从植物上分离的 48 个拟茎点霉属菌株对大豆进行了致病性测定,结果显示从大豆和青麻上分离的 *P. longicolla*和从非大豆寄主上分离的其他 *Phomopsis* spp. 的致病性范围很广。Vidic'等^[12]采用不同比例 α 分生孢子悬浮液人工接种大豆种子,调查结果显示 α 分生孢子表现出对大豆高水平的致病性。本研究采用种子接种法探讨了大豆拟茎点种腐病菌的致病性,结果表明该病菌可明显降低种子的发芽势及发芽率,严重时造成种子不发芽,甚至导致种子变褐、变黑,引起腐烂,对种子具有较强的致病

性,严重影响种子的质量。在被大豆拟茎点种腐病菌侵染后,大豆种子的种皮、子叶和胚均分离得到了原始病原菌即大豆拟茎点种腐病菌,说明该病菌可侵入种子内部,并在种子内继续生长繁殖,侵染种子的子叶和胚,使其失去活力,引起种子发病。在对种子各部位进行分离时,由于种子的腐烂,有时得不到完整的胚,但仍可证明菌株可侵染到胚,可为大豆拟茎点种腐病菌今后的研究提供依据。但本试验并未对大豆植株和其他品种的种子进行致病性测定,结果具有一定的局限性。鉴于大豆拟茎点种腐病菌对种子较高的致病性,对大豆商品品质的影响较大,而且有时被该病菌侵染的种子并不显症状,因此建议大豆生产上应通过药剂拌种等方法进行防治。

(下转第 462 页)

当前研究的热点与重点;该刊拥有一大批高素质作者队伍,核心作者群科研实力雄厚,研究深入、持久,且高度稳定,重复发文率较高,拥有合作精神。从分析中不难看出,《大豆科学》拥有较高的学术性和权威性,并且深受广大作者信任与支持。与此同时,《大豆科学》在同级别期刊中,进步速度相对不快,因此,应借助编委和众多优秀学者的力量,把握论文学术质量,以质量求发展,在学术上谋求新的突破;此外,该刊作者过于集中也可能会成为其发展的一个障碍因素,应在稳定固定作者群的基础上,开发、培养新生作者群体,比如对于研究基础相对薄弱、论文写作水平不高的作者,应采取积极扶持的态度,不厌其烦地帮助其修改稿件,培养其逐渐成为今后的核心作者,并且可以因此而扩大刊物的影响力,吸引更大范围的投稿,更充分地体现期刊的价值。世界万物都是在不断的总结中汲取经验、教训,期刊的发展也不例外,《大豆科学》将通过不断的总结与完善,提高综合影响力,更好地服务于我国大豆科研与生产事业。

参考文献

- [1] 廉清.《图书情报工作》核心作者群分析研究[J].现代情报,2004,24(11):55-59. (Lian Q. Analysis on core authors groups of Library and Information Service[J]. Modern Information, 2004, 24(11):55-59.)
- [2] 葛文,冯婷.《甘肃科学学报》2009-2013年再问分析及可持续发展思考[J].甘肃科学学报,2014,26(1):147-150. (Ge W, Feng T. Statistical analysis of papers in 2009-2013 issues of Journal of Gansu Sciences and its sustainable development[J]. Journal of Gansu Sciences, 2014, 26(1):147-150.)
- [3] 安秀芬,王景文,黄晓鹏.《中国科技期刊研究》1990~2002年的载文分析[J].中国科技期刊研究,2003,14(3):264-267. (An X F, Wang J W, Huang X L. An analysis and review of papers published by Chinese Journal of Scientific and Technical Periodicals from 1990 to 2002[J]. Chinese Journal of Scientific and Technical Periodicals, 2003, 14(3):264-267.)
- [4] 李文以.《档案管理》1995~2005年核心作者群分析[J].档案管理,2006(4):48-50. (Li W Y. Analysis on core authors groups of Archives Management in 1995-2005[J]. Archives Management, 2006(4):48-50.)
- [5] 丁学东.文献计量学基础[M].北京:北京大学出版社,1992. (Ding X D. Basis of bibliometrics[M]. Beijing: Beijing University Press, 1992.)
- [6] 幸建华,汪卓赞.《中国科技期刊研究》2000~2006年载文作者群分析[J].中国科技期刊研究,2008,19(3):398-401. (Xing J H, Wang Z Y. Analysis on authors group in Chinese Journal of Scientific and Technical Periodical in 2000-2006[J]. Chinese Journal of Scientific and Technical Periodical, 2008, 19(3):398-401.)

(上接第457页)

参考文献

- [1] Suli S, Kyujung V, Moon Y K, et al. Evaluation of soybean cultivars for resistance to *Phomopsis* seed decay in Korea[J]. Journal of Crop Science and Biotechnology, 2012, 15(2):85-91.
- [2] Dhanushka U, Liu X Z, Eric H C M, et al. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens[J]. Fungal Diversity, 2011, 50:189-225.
- [3] 崔友林,段灿星,丁俊杰,等.一种新发生的大豆茎枯病病原菌鉴定[J].中国油料作物学报,2010,32(1):99-103. (Cui Y L, Duan C X, Ding J J, et al. Pathogen identification of a newly occurred soybean stem blight in China[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2010, 32(1):99-103.)
- [4] Mengistu A, Smith J R, Bellaloui N, et al. Irrigation and time of harvest effects on evaluation of selected soybean accessions against *Phomopsis longicolla*[J]. Crop Science, 2010, 50:2055-2064.
- [5] Shan Z, Li S, Liu Y, et al. First report of *Phomopsis* seed decay of soybean caused by *Phomopsis longicolla* in South China[J]. Plant Disease, 2012, 96(11):1693.
- [6] Velicheti R K, Kolipara K P, Sinclair J B, et al. Selective degradation of proteins by *Cercospora kikuchii* and *Phomopsis longicolla* in soybean seed coats and cotyledons[J]. Plant Disease, 76(8):779-782.
- [7] 张建成,顾建锋,徐瑛,等.大豆拟茎点种腐病的研究进展及其检疫意义[J].植物检疫,2005(9):163-167. (Zhang J C, Gu J F, Xu Y, et al. The research progress and its significance in quarantine of *Phomopsis longicolla*[J]. Plant Quarantine, 2005(9):163-167.)
- [8] Jose P S, Gary P M. Impacts of foliar fungicides on infection of soybean by *Phomopsis* spp. in Iowa, USA[J]. Crop Protection, 2011(30):577-580.
- [9] Anne M G, James R S, Alemu M, et al. Effects of maturity and *Phomopsis longicolla* on germination and vigor of soybean seed of near-isogenic lines[J]. Crop Science, 2012, 52:2757-2766.
- [10] Li S X, Glen L H, Deborah L B. Aggressiveness of *Phomopsis longicolla* and other *Phomopsis* spp. on soybean[J]. Plant Disease, 2010, 94(8):1035-1040.
- [11] Wrather A, Shannon G, Balardin R, et al. Effect of diseases on soybean yield in the top eight producing countries in 2006[J]. Plant Health Progress, 2010, 10:1094.
- [12] Vidic' M, Petrovic' K, Dordevic V, et al. Occurrence of *Phomopsis longicolla* β conidia in naturally infected soybean[J]. Journal of Phytopathology, 2013, 161:470-477.