

马国胜,高智谋.烟草黑胫病菌致病力的影响因子及其互作效应[J].江苏农业科学,2013,41(12):111-113.

# 烟草黑胫病菌致病力的影响因子及其互作效应

马国胜<sup>1,2</sup>,高智谋<sup>1</sup>

(1. 安徽农业大学植物保护学院,安徽合肥 230036; 2. 苏州农业职业技术学院生态环境系,江苏苏州 215008)

**摘要:**采用 3 因素随机区组设计方法研究接种方法、烟草品种、菌种 3 种因子对烟草黑胫病菌致病力的影响。结果表明:各因子对烟草黑胫病菌致病力的影响依次为接种方法 > 烟草品种 > 菌种,不同接种方法接种后的病斑长度依次为菌丝块茎基部创伤接种 > 游动孢子悬浮液灌根接种 > 菌丝块茎基部不创伤接种,不同烟草品种接种后的病斑长度依次为红大 > G140 > NC89,接种不同菌株后的病斑长度依次为 BZ-8 > FY-10 > SX-3;接种方法与烟草品种间的互作效应达到了显著水平,其他因子互作效应均未达到显著水平。

**关键词:**烟草黑胫病菌;致病力;接种方法;烟草品种;菌株

**中图分类号:** S435.72 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0111-03

烟草黑胫病是由烟草疫霉菌 (*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan) 引起的烟草主要病害之一,可以危害所有栽培烟草,烟株一旦发病,往往都是整株死亡,严重影响烟草生产,是烟草病害的攻克难题之一,在中国各烟区广泛发生<sup>[1-3]</sup>。我国过去在进行抗黑胫病品种鉴定中,发现不同地区菌株致病力有较大差异<sup>[4]</sup>。龚龙英等研究指出,不同接种方法对烟草黑胫病菌致病力测定有一定的影响,甚至会产生较大差异,但未作系统研究<sup>[5]</sup>。本试验就影响烟草黑胫病菌致病力的主要因子及其互作效应进行研究,以期为今后致病力分化测定方法的选择、寄主植物抗病性的鉴定以及烟草黑胫病的综合防治等相关研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

供试烟草疫霉菌菌株为 BZ-8、FY-10、SX-3,保存于安徽农业大学植物病原真菌研究室,均分离自烟草新鲜病组织,分别来自皖北烟区的安徽省亳州市、江淮烟区的安徽省凤阳县、皖南烟区的安徽省歙县。

收稿日期:2013-09-03

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(编号:3-20);江苏省

高校哲学社会科学基金(编号:2011SJB790023)。

作者简介:马国胜(1974—),男,安徽定远人,副教授,研究方向为生态环境与植物保护。E-mail: goshinema@163.com。

密度 21 万~22.5 万株/hm<sup>2</sup>。条播时行距 40 cm 为宜。

### 3.3 施肥与杂草防除

播种前整地时,施氮磷钾复合肥 450~750 kg/hm<sup>2</sup> 作为基肥,苗期和始花期分别追施尿素 75 kg/hm<sup>2</sup> 左右。播种后立即喷洒 55% 乙草胺乳油 1 000 mL/hm<sup>2</sup>,兑水 800 kg/hm<sup>2</sup> 均匀喷雾防治杂草,使用乙草胺时要注意用量、浓度以防产生药害;出苗后及时查苗补缺、间苗定苗。及时中耕除草。

### 3.4 病虫害防治及防倒伏

在植株幼苗期注意防治地老虎等地下害虫,花荚期注意防治豆龟蜡、斜纹叶蛾、大豆食心虫、豆卷叶螟等害虫。植株

### 1.2 供试寄主植物

供试烟草品种 G140、NC89、红大,均由安徽省农业科学院烟草科学研究所提供。将种子装在布袋内,催芽至露白,然后播入盛有灭菌土壤的盆钵中进行培养,待烟苗长至 3 张真叶时移栽到底部打孔的塑料杯内(2 孔/杯),每天早晚各浇水 1 次,每周用 Hoagland 完全营养液喷 1 次。待烟苗长至 7~8 张叶时,供接种用。

### 1.3 培养基(液)的配制

1.3.1 LBA 培养基 取 60 g 利马豆粉加入去离子水 1 000 mL,60 ℃ 恒温水浴加热 1 h,用 4 层纱布过滤,取滤液,用去离子水定容至 1 000 mL,加入琼脂 20 g,在微波炉内加热至琼脂完全熔化,趁热分装,121 ℃ 灭菌 20 min。

1.3.2 10% V<sub>8</sub>C 培养液 参照马国胜等方法<sup>[3]</sup> 配制,121 ℃ 灭菌 20 min,待用。

### 1.4 接种方法

1.4.1 游动孢子悬浮液灌根接种 供试菌株在 LBA 平板上 25 ℃ 暗培养 3 d,从菌落边缘切取 10 块大小约 2 mm × 2 mm 的菌丝块,移入盛有 20 mL 10% V<sub>8</sub>C 培养液、直径 9 cm 的培养皿中,25 ℃ 暗培养 3 d,用灭菌镊子把菌丝丛转移到另一无菌培养皿中,加入灭菌水 20 mL,并加入 4 滴土壤浸出液,25 ℃ 光照培养,每 12 h 换 1 次灭菌水,并同时加入 4 滴土壤浸出液,直至孢子囊大量形成。待大量孢子囊产生后,将培养皿置于 4 ℃ 冰箱中 15 min,取出置于 25 ℃ 温度下 30 min,即得到有大量孢子的孢子悬浮液。取样镜检测定其浓度,并将

旺长时,运用多效唑或矮壮素等进行控制,防止倒伏。

### 3.5 及时收获

茎秆豆荚变黄褐色,植株摇动听到部分籽粒响声时,进行收获,收获后晾晒 2~3 d,完成后熟作用,脱粒,晒干进仓。

## 参考文献:

[1] 赵团结,盖钧镒,李海旺,等.超高产大豆育种研究的进展与讨论[J].中国农业科学,2006,39(1):29-37.

[2] 范旭红,王跃强,张云峰,等.超高油大豆新品种吉育 202 选育报告[J].大豆科技,2013(4):63-64.

其稀释成 1 万个/mL 对烟苗进行灌根接种,每株 10 mL,每天浇水保湿。设等体积无菌水灌根处理作为空白对照。

1.4.2 菌丝块茎基部针刺创伤接种 参照马国胜等方法<sup>[6]</sup>,略有改进。供试菌株在 LBA 培养基平板上 25 ℃暗培养 5 d,用直径 0.6 cm 的灭菌打孔器制成菌碟,将有菌丝的一面向下,贴于用昆虫针束(4 根小号昆虫针束)轻度刺伤的烟草茎基部,用脱脂棉蘸灭菌水覆盖保湿。接种后烟苗置于室内室温(25±2)℃培育,每天喷水保湿。设无烟草黑胫病菌的纯培养基碟片处理为空白对照。

1.4.3 菌丝块茎基部不创伤接种 参照马国胜等方法<sup>[6]</sup>,略改进,接种前不创伤,其他同“1.4.2”节。

1.5 试验设计

采用 3 因素随机区组设计,以接种方法、烟草品种、菌株为试验因子,各设 3 个水平,3 次重复,每重复 3 株烟苗。各因素、水平设置及代码如下所示:(1)接种方法(A),其中 A1 为菌丝块茎基部针刺创伤接种、A2 为游动孢子悬浮液灌根接种、A3 为菌丝块茎基部不创伤接种;(2)菌株(B),其中 B1 为 BZ-8、B2 为 FY-10、B3 为 SX-3;(3)烟草品种(C),其中 C1 为红大;C2 为 NC89、C3 为 G140。

1.6 结果观察与统计分析

菌丝块创伤和不创伤接种法以接种处纵向扩展的病斑长度作为评价致病力的标准;游动孢子悬浮液灌根接种法,以土表以上病斑长度作为评价致病力的标准。接种后第 3 天开始观察,第 4 天开始记载,以后每 2 d 记载 1 次,共记载 3 次。按 3 因素随机区组设计,对接种后第 8 天的病斑长度资料进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 影响烟草黑胫病病斑长度的主因子效应分析

由表 1 可知,不同处理间病斑长度大小存在极显著差异,各因子影响均在 0.01 水平上差异显著。A1B1C1 处理组合病斑长度最长,达到 60.3 mm;A2B2C1 处理组合病斑长度次之,达到 39.6 mm;其次分别是 A1B1C3、A1B2C1、A2B1C1、A1B2C3 处理组合,病斑长度分别达到 38.9、38.5、35.9、34.5 mm;再次分别是 A1B3C1、A1B2C2 处理组合,病斑长度分别达到 24.2、22.3 mm;9 个处理组合 A2B1C3、A2B2C2、A2B3C2、A3B1C1、A3B2C1、A3B2C2、A3B2C3、A3B3C2、A3B3C3 没有发病。

由表 2 可知,接种方法(A)与烟草品种间(C)的互作达到了显著水平,其他因子互作差异均不显著。由于 F 的大小表示各因子及互作变异的大小,所以各因子及互作对致病力大小影响的次序为接种方法>烟草品种>菌种>接种方法×烟草品种>菌种×烟草品种>接种方法×菌种>接种方法×烟草品种×菌种。

2.2 单因子对烟草黑胫病病斑长度的影响

2.2.1 接种方法的影响 由表 3 可知,各单因子对病斑长度大小的影响差异显著,以接种方法最显著。试验设计的 3 种接种方法以菌丝块茎基部创伤接种的病斑长度最长,平均病斑长度 27.0 mm;其次为游动孢子悬浮液灌根接种,平均病斑长度 8.5 mm;菌丝块茎基部不创伤接种病斑最小,平均病斑长度 1.5 mm,可见创伤有利于病斑的发生扩展。

表 1 不同接种方法、烟草品种和菌株组合对烟草黑胫病病斑长度的影响

处理组合	平均病斑长度 (mm)	差异显著水平	
		0.05	0.01
A1B1C1	60.3	a	A
A1B1C2	7.3	de	D
A1B1C3	38.9	b	B
A1B2C1	38.5	b	B
A1B2C2	22.3	c	C
A1B2C3	34.5	b	BC
A1B3C1	24.2	c	C
A1B3C2	7.8	de	D
A1B3C3	8.9	de	D
A2B1C1	35.9	b	BC
A2B1C2	0.9	e	D
A2B1C3	0	e	D
A2B2C1	39.6	b	B
A2B2C2	0	e	D
A2B2C3	2.7	de	D
A2B3C1	0.6	e	D
A2B3C2	0	e	D
A2B3C3	0.8	e	D
A3B1C1	0	e	D
A3B1C2	1.1	e	D
A3B1C3	10.3	d	D
A3B2C1	0	e	D
A3B2C2	0	e	D
A3B2C3	0	e	D
A3B3C1	1.6	e	D
A3B3C2	0	a	A
A3B3C3	0	de	D

表 2 不同因素对烟草黑胫病病斑长度影响的方差分析

变异来源	df	SS	MS	F	F <sub>0.05</sub>	F <sub>0.01</sub>
区组	2	20.82	10.41	0.05	3.18	5.06
处理	26	23 669.94	910.38	4.3	1.74	2.18
A	2	9 276.43	4 638.21	21.91	3.18	5.06
B	2	2 389.95	1 194.98	5.65	3.18	5.06
C	2	4 456.29	2 228.15	10.53	3.18	5.06
A×B	4	1 148.45	287.11	1.36	2.56	3.72
A×C	4	2 910.43	727.61	3.44	2.56	3.72
B×C	4	1 206.15	301.54	1.42	2.56	3.72
A×B×C	8	2 290.02	286.25	1.35	2.13	3.72
误差	52	11 007.38	211.68			
总变异	80	34 677.32				

表 3 单因子对烟草黑胫病病斑长度的影响

影响因子	平均病斑长度 (mm)	显著水平	
		0.05	0.01
A1	27.0	a	A
C1	22.3	ab	AB
B1	17.6	b	AB
B2	15.3	bc	B
C3	10.7	bc	BC
A2	8.5	c	BC
B3	4.9	c	BC
C2	4.4	c	BC
A3	1.5	c	C

2.2.2 烟草品种的影响 表 3 表明,烟草品种对烟草黑胫病菌致病力的影响极显著。红大的病斑长度最长,平均病斑长度 22.3 mm;其次为 G140,平均病斑长度 10.7 mm;NC89 最

不易侵入,平均病斑长度 4.4 mm。说明品种红大最感病,而 G140、NC89 有一定的抗病性,以 NC89 抗病性最强。

2.2.3 菌株的影响 由表 3 可知,菌种对致病力的影响极显著。BZ-8 的病斑长度最长,平均为 17.6 mm;其次为 FY-10,平均病斑长度为 15.3 mm;SX-3 的病斑长度最短,平均为 4.9 mm。说明 SX-3 的致病力最弱,BZ-8 的致病力最强。

2.3 因子互作的影响

由表 4 可知,品种与接种方法组合对烟草黑胫病菌致病力的影响差异显著,而其他各因子互作差异均不显著。红大品种的接种方法很重要,而 G140、NC89 的接种方法则表现得不明显。对同一接种方法,品种的抗病性影响较大,总体来看,NC89 的抗病性最强。

表 4 接种方法与烟草品种互作的影响

接种方法	不同烟草品种接种后的病斑长度(mm)		
	红大	NC89	G140
不创伤接种	28.4aA	16.7abA	12.7abA
灌根	25.0abA	27.3bA	2.4bA
创伤接种	3.4bA	10.7bA	14.1abA

注:同列数据后不同大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ ),不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

2.4 烟草黑胫病菌的致病力

供试菌株在烟草品种上的致病力差异极显著。表 1 表明,红大在创伤接种和灌根接种时,各菌种之间致病力差异极显著,不创伤接种则差异不显著。研究结果还表明,同一菌株对不同品种的致病力差异较大。菌株 BZ-8 创伤接种红大与 NC89 的病斑长度差异极显著;灌根接种时,红大与 NC89、G140 的病斑长度差异极显著;创伤接种时,菌株 FY-10 引起的病斑长度在各烟草品种间差异显著,在灌根接种条件下,FY-10 对红大引起的菌斑长度与 NC89、G140 差异显著;而菌株 SX-3 引起的病斑长度仅创伤接种存在差异。

由表 5 可知,采用创伤接种时,3 个品种的发病率均达 100%;采用灌根接种时,红大发病率达 55.5%,G140 发病率为 22.2%,NC89 发病率为 7.5%;采用不创伤接种时,各品种几乎没有发病。

表 5 不同接种方法下烟草的发病率

接种方法	发病率(%)		
	红大	NC89	G140
创伤接种	100.0	100.0	100.0
灌根	55.5	22.2	7.5
不创伤接种	0	3.7	3.7

2.5 不同烟草品种对烟草黑胫病的抗性反应

从测定结果可以看出,红大、G140、NC89 这 3 个烟草品种对烟草黑胫病的抗病能力有明显差异,其中红大最感病,G140、NC89 表现抗病,且 NC89 比 G140 强。研究还发现,红大品种灌根接种后 3 d 开始出现症状,6 d 后病斑达一定长度;G140、NC89 这 2 个品种接种后 3 d 症状不明显,6 d 后开始出现症状,而且很少,发病明显推迟。

3 结论与讨论

本研究表明,不用烟草种植区的烟草黑胫病菌存在致病

力分化现象,BZ-8 的致病力最强,其次为 FY-10,致病力最弱的是 SX-3;烟草品种对致病力的表现影响较大,供试菌株在 G140、NC89 上致病力的分化不明显,但在红大品种上致病力的分化较明显。试验结果还表明,在尽量减少系统误差的情况下,菌丝块茎基部创伤接种可能是测定致病力的最好方法,此法简单,通过病斑的出现时间、大小、发展速率来判断致病力的强弱。王革等研究认为,菌丝块茎基部不创伤接种可能是一种较理想的接种方法,不创伤接种比创伤接种侵染率低<sup>[7]</sup>。本研究也发现,不创伤接种发病率较低。笔者认为感病品种可采用游动孢子悬浮液灌根接种,而抗病品种可采用菌丝块创伤接种。

谢成颂等研究结果表明,烟草植株的茎表皮具有一定的抗病性,表皮无伤口时,抗病品种不易被病菌侵入,几乎不发病,而感病品种发病率可达 50%<sup>[8]</sup>。这已经在游动孢子悬浮液灌根法中得到证实,感病品种红大的发病率达 55.5%,而抗病品种 NC89 发病率仅为 7.5%。苏德成报道,在大田中,烟草疫霉菌主要是由孢子萌发产生芽管侵入寄主,游动孢子悬浮液灌根是最接近自然条件的方法,但烟草黑胫病的发病部位多在茎基近地面处,并由此向上、向下扩展,且向上扩展速度较快,表现出局部坏死<sup>[9]</sup>。但谢成颂等报道,游动孢子悬浮液灌根接种法的接菌量不易控制,分级标准不易掌握,需要确定一套理想实用的病情指数分级标准<sup>[8]</sup>。所以,笔者认为,如果评价致病力的指标为发病率,那么游动孢子悬浮液灌根接种比较好,但此法需将烟草根部拔出调查,不利于系统的操作;菌丝块茎基部创伤接种对病斑的发生扩展影响最显著,但由于损伤了茎表皮,不利于寄主的生物学抗性表现,不能真实反映寄主固有抗病性和病原物致病力。苏德成报道,致病力的强弱包括病原菌对寄主植物的破坏程度以及对寄主引起相同发病程度所需的时间<sup>[9]</sup>。本研究发现,当采用菌丝块茎基部创伤接种破坏寄主植物生物学结构时,抗病品种的病斑扩展依然较缓慢,由此推断,抗病品种对病原菌的抗性除烟草生物学抗性机制之外,还有其他抗病性机制。

参考文献:

[1] Antonopoulos D F, Melton T, Mala A L. Effects of chemical control, cultivar resistance, and structure of cultivar root system on black shank incidence of tobacco[J]. Plant Disease, 2010, 94(5): 613-620.

[2] 朱贤朝, 王彦亭, 王智发. 中国烟草病害[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 3-5.

[3] 马国胜, 高智谋. 安徽省烟草黑胫病菌的交配型及其地理分布研究[J]. 植物病理学报, 2006, 36(6): 566-568.

[4] 王智发, 刘延荣, 谢成颂, 等. 我国烟草黑胫病菌生理小种鉴定[J]. 山东农业大学学报, 1987, 18(1): 1-8.

[5] 龚龙英, 郑小波, 刘翔, 等. 烟草疫霉对烟草的致病力及生理分化研究[J]. 南京农业大学学报, 1993, 16(4): 68-72.

[6] 马国胜, 高智谋, 曹舜. 烟草黑胫病菌的寄主范围[J]. 中国农业科学, 2012, 45(5): 867-876.

[7] 王革, 郑小波, 陆家云, 等. 云南省烟草黑胫病菌致病力分化的研究[J]. 南京农业大学学报, 1997, 20(4): 33-38.

[8] 谢成颂, 王智发, 刘延荣. 国内外烟草黑胫病菌生理小种鉴定评价[J]. 中国烟草, 1987(1): 12-16.

[9] 苏德成. 烟草病虫害[M]. 北京: 中国财政经济出版社, 1992: 5-10.