广东小麦根腐病初侵染源及土壤 孢子量测定方法的研究

吴柏材

黎毓干

(植保系)

提 要

小麦根腐病是广东小麦重要病害之一。病原菌在干旱土壤中可存活281天以上,在淹水土壤中80天便死去,"麦→稻→稻"水旱轮作制的地区不存在土壤带菌问题。室外堆放的病秆所带分生孢子可存活281天以上,但菌丝体在220天以前死去,不能产孢传播。室内人工接种有6种作物和11种杂草感病,其中甘蔗、茭白、雀稗、纤毛鸭咀草和川谷为前人所未报道。但大田调查结果,除小麦外迄今未见有自然感病寄主。种子带菌很普遍,是广东小麦根腐病的主要初侵染源。

本试验对Ledingham和Chinn的土壤孢子数估算法作了改进,测定方法简单,较为准确,可供田间孢子量测定之用。

前 言

小麦根腐病 (Helminthosporium sorokinianum Sacc. et Sorok., Syn. Bipolaris sorolinianum (Sacc. in Sorok.) Shoem. 有性世代 Cochliobolus sativas (Ito et Kurib.) Drechs. et Dast.) 是小麦的重要病害之一。此病在我国北方许多地区曾严重发生[2][8][4][6]。近年来在广东也日趋严重,已成为小麦生产的严重限制因素之一。由于过去一向主要发生在北方,所以北方小麦根腐病发生规律研究得较多,而南方尚未有这方面的报道。关于初侵染源问题,何家泌[2],陆师义[8],黄桂潮[5]和黑龙江省农科院植保所[6]等都报道了带菌土壤和带病种子是主要初侵染源,还有人认为病秆和田间30多种杂草都可成为初侵染源。广东地处亚热带,气候条件和耕作制度都与北方有很大差异,病害的发生规律就不一定相同。为了解本病害在广东的主要初侵染源,我们于1980~1981年进行了研究。

土壤孢子量的测定一向是较难解决的问题,前人曾对此进行过研究,但测定效果都不够理想。本试验在对Boosalis的孢子印法[7],Ledingham & Chinn的漂浮法[12]和 Chinn等的孢子数估算法[10]比较试验的基础上,对Chinn等的"孢子数估算法"作了改进,以求提高测定的效果。

本文承范怀忠教授、咸佩坤和林孔勋付教授审阅,梁宝汉教授帮助鉴定植物,谨此致谢。

试验方法与结果

一、土壤孢子量测定方法比较

用沙壤土分别制备每克土含孢子62.5个, 250个, 1000个, 4000个和 16000 个 的 样品, 含水量调至 2 % 左右备用。

本试验所用的测定方法是由Chinn等[10]的"土壤孢子数估算法"改进的。即把原来吸取部分上层液来估算总孢子数改为吸取全部上层液来计算孢子数;用玻片检查方法改为浮载于培养皿中,用"培养皿计数法"检查以减少人为误差。具体步骤是:称取40克样品置于30×300毫米的试管内,然后加入石蜡油10毫升,充分混和,加水至试管高度的2/3,反复倒置摇湿5分钟,再加满水后垂直放置半小时。取一培养皿,内放10~20毫升已溶45°C的"选择性培养基"。,用吸管把试管内的上层液全部吸到培养皿中,盈匀后在低倍镜下检查50个视野,得每视野的平均孢子数再按下列公式计算每克土壤中孢子数。培养12小时后检查孢子萌发率,当检查结果为零时,再培养5~7天,检查产孢情况。

每克土孢子数 = 培养皿半径×每视野平均孢子数 视野半径×40

1. 四种孢子量测定方法的比较:分别用孢子印法、孢子数估算法、漂浮法及改进后的测定方法对上述不同孢子含量的样品进行测定,比较它们的测定效果,结果见表1、2。

表 1

三种测定方法比较试验(1)

		抱	子 回	收 2	率 (%)	
方 法	16000个/克土	4000个/克土	1000个/克土	250个/克土	62.5个/克土	平均
改进后的方法(2)	32.12	28.76	31.41	29.18	32.17	30.73
孢子数估算法(3)	22.59	19.94	23.00	19.84	41.28	25.33
漂 浮 法 (4)	3.25 _b	2.03 _b	4.79 _b	6,20 _b	13.80 _a	6.014

- (1) 表内测定结果均为3次重复的平均值。空白对照为0。
- (2) 试验结果经Duncan复分级显著性测定法进行分析表明显差异不显著 (p=0.05) 。
- (3) 经Duncan复分级显著性测定法分析差异不显著 (p=0.05)。
- (4) Duncan复分级显著性测定法分析,数字后有相同字母的表示差异不显著 (p=0.05)。

表 2

孢 子 印 法 测 定 效 果⁽¹⁾

样品孢子数/克土	16000	4000	1000	250	62.5
测定结果 (孢子数/mm²)	17.60	4.50	0.90	0.33	0.07

(1) 样品含水量为1.5%,每处理检查10平方厘米,3次重复,取平均值。

^{*}选择性培养基:硝酸钠 3 克,磷酸一氢钾1克,硫酸镁0.5克,氮化钾0.5克,硫酸钠少量,蔗糖30克,洋菜12~20克,蒸馏水1000cc,pH6.8—6.9,消毒后加进0.2%苯来特,100ppm链霉素[13]。

试验结果表明,漂浮法在孢子量不同的情况下测定效果不稳定,而且测定效率低,平均孢子回收率仅为6.014%,不宜用于大田的测定。改进后的方法和孢子数估算法在不同孢子量的情况下3次测定的效果都稳定,可用于小麦根腐病土壤带菌量的测定,两者比较,改进后的方法比孢子数估算法测定效率更高。所以,三种方法中以改进后的方法为最理想。

试验结果表明, 孢子印法测定效果差, 在孢子量少的时候难以测定, 故不宜应用于定量测定。

2. 样品含水量对孢子量测定的影响: 把每克土含16000个孢子的样品分别调至含水量为1.5%, 6.5%, 16.5%和21.5%, 用改进后的方法进行测定, 结果见表 3。

表 3 样品不同含水量对孢子量测定的影响(1)

样品含水量 (%)	1.5	6.5	11.5	16.5	21.5
孢子回收率 ⁽²⁾ (%)	33.04 _a	^{24.71} b	3.96 _c	3.66 _c	3.34c

- (1) 孢子含量是16000个/克土,用改进后的方法进行测定。
- (2) 表内数字是 3 次试 验 平均 值。经 Duncan复分级显著性测定进行 分析, 数字后有相同字母的 表示 差 异 不 显 (p=0.05)。

样品的含水量不同对孢子量测定的影响极大。五种含水量的试验结果表明,样品含水量越高,孢子回收率就越低。当含水量高于,11.5%时,孢子回收率不超过4%,而含水量在1.5%时,孢子回收率可达33.04%

二、初侵染源

1. 土壤:关于土壤中病原菌的存活能力,由于环境条件不同,各国报道差异很大。加拿大Chinn & Ledingham (*)认为在实验室饱和湿度下可存活 9 个月以

上,菲律宾Fuentes等[11]的试验表明,孢子接种在干热灭菌后的土壤中,于室内干燥的情况下可存活 6 个月,在室外露天情况下则只存活 3 个月。

本试验在收获小麦后把病秆埋于 5、10、20公分深的土壤中,分别作淹水、旱地两种处理。定期测定病秆附近土壤的孢子量,孢子萌发率和病秆内菌丝体存活情况,结果见表 4、表 5。

试验结果可见:在室外淹水土壤中,分生孢子到30天时仍可存活,到第50天时则已死亡;病残组织内菌丝体到59天时仍可存活,到第80天时则已死亡;病残组织到第30天时已不能产孢;在旱地土壤中分生孢子可存活281天以上,分离培养后接种小麦叶片仍可致病;病残组织中的菌丝体到80天时仍可存活,到第110天则已死亡;病残组织30天便不能产孢;两种处理的不同土壤深度(20厘米内)对病原菌的存活力无影响。

据报道北方土壤带菌很普遍^{[2][3][4][6][6]},但我们在播种前对广州市郊、佛山市郊和南海县不同类型田的调查结果(见表 6)表明。高旱地种植小麦后遗留在土壤中的孢子可存活至当年冬季播小麦之时,平均每克土壤含孢子3.5个,检查43个孢子有 4 个萌发,萌发率为9.5%,经分离繁殖后接种小麦叶片,证实可致 病;在"麦→稻→稻"一年水旱轮作地中,土壤中孢子不能萌发,犁冬的对照田未发现有孢子。以上调查试验结果表明,在广东的旱地土壤中分生孢子可存活至下一生长季节,所以带菌的旱地土壤

表 4	淹水土壤中病原菌存活力(1/							
取样深度			处 理	时间(天	()			
	调查项目	30	50	59	80			
(厘米)		(5月2日)	(5月22日)	(5月31日)	(6月21日)			
20	孢子萌发率 (%)	9.1	0 (2)					
10	孢子萌发率 (%)	6.2	0 (2)					
20	病残组织产孢情况	_ (2)	,	,				
10	病残组织产孢情况	_(2)						
20	病残组织内菌丝存活情况	+	+	+	_(2)			
10	病残组织内菌丝存活情况	+	+	+	_(2)			
			1	1				

- (1) 病秆在1980年4月2日埋下,土壤测定每处理40克土,重复3次。
- (2) 两次测定的结果。空白处表示试验已停止进行。

表 5 旱 地 土 壤 中 病 原 菌 存 活 力⁽¹⁾

			处	理	时间	(天)	
调查项目	30	50	59	80	110	172	222	281
	(5月2日)	(5月22日)	(5月31日)	(6月21日)	(7月21日)	(9月11日)	(10月31日)	(12月1日)
孢子萌发率	37.5	11.0	11.0	2.0	3.0	5.0	2.5	2.0
	29.0	10.0	10.0	13.4	14.2	15.6	2.5	2.0
(%)	60.0	90.0	81.0	18.5	0 (2)			
病残组织	_(2)		,					
// / / AL //	(2)		+	+	_ (2)			
产孢情况	-+	+			_ (2)			<u> </u>
		+	+	+	_(2)		 	
病残组织内菌	+	+	+	+	_ (2)			
// サロ とは /庫 /ロ	+	+	+	+	_(2)			
丝存活情况	+			_				

- (1) 处理及调查方法同表1,旱地土壤一般含水量6%左右。
- (2) 两次测定结果。空白处表示试验已停止进行。

可成为初次侵染源;但广东小麦田大都为"麦→稻→稻"制,而在淹水土壤中的病原菌 存活不长,所以水旱轮作田的土壤不能成为初侵染源。

2. 病秆: 定期对室内和室外放置的病秆分离测定结果(见表7)表明,室内病秆放置281天后仍有18.5%的分生孢子萌发,病秆内的菌丝体也能存活,并于保湿后产孢,

表 6	大田土:	壤 孢 子 :	量 调 查(1)	
排 作 制 度	取土地点及 发 病 情 况 ⁽²⁾	调查时间	孢子数(个)/克土	萌发孢子数/调查数子数
麦→花生→瓜	中病田,佛山兰石(3)	10月31日	3.5	4/42
	重病田, 佛山兰石	10月31日	3.1	0/32
	重病田 佛山兰石	12月2日	2.2	0/38
	中病田 佛山兰石	12月2日	1.3	0/35
麦→稻→稻	中病田 南海盐步	11月10日	1.9	0/31
	中病田 南海盐步	11月10日	1.3	0/25
	中病田 南海平洲	11月13日	1.3	0/21
	中病田 广州石牌	11月10日	2.3	0/25
型冬→稻→稻	对 照 佛山兰石	10月31日	0	
	对 照 南海平洲	10月13日	0	

- (1)1980年进行调整,多点随机取样,每一样品40克已过100号筛后的土壤, 3次重复取平均值。
- (2) 重病田出现穗枯、死株; 中病田叶枯死; 轻病田仅有叶斑。
- (3) 取样地点是村边地的干旱沙质土, 其余样品为水稻田壤土。

表 7

病秆中病原菌的存活力

	*************				_	5	化	E B	j 间	(天)	
处理	调	查	项	目	30	50	59	80	110	172	220	281
					5月2日	5月22日	5月31日	7月1日	7月21日	9月11日	10月31日	12月11日
室				%) ⁽¹⁾	90	90	90	10	15	26	20	18.5
	菌丝				+	+	+	+	+	+	+	+
内	菌丝	产孢	(2)		+	+	+	+	+	+	+	+
室	孢子	萌发	定率(%) ⁽¹⁾	90	80	30	40	25	17	14	10.7
	菌丝	存活	į(2)		+	+	+	+	+	+	_ (3)	
外	菌丝	产猪	_] (2)		+	+	+	+	+	_ (2)		

- (1) 检查孢子500个以上。
- (2) 检查病秆20根, "+"表示存活或产孢, "-"表示不存活或不产孢。
- (3) 两次测定的结果。

室外病秆于堆放281天后仍有10.7%的孢子萌发,病秆内的菌丝体到第172天时仍存活,但到第220天便己死去。

3. 种子: 从云浮、韶关等12个县市收集麦种,用水洗离心方法,从一定量的麦种

中收集孢子,用培养皿计数法测定每克种子所带的孢子量,结果表明种子表面都粘有不同数量的病原分生孢子。重病田的种每克粘有孢子达400~1410个,中病田的为200个以下,无病田的种子不带孢子。当地种子所带孢子的萌发率为9.4~17.7%,北繁种子所带孢子萌发率达74.5%。广东现有品种除"白沙13"外,其余品种都不同程度地有黑胚粒,一般都在10%以下,严重的达30~40%。

用0.2%升汞液进行种子表面消毒后,选择性培养基分离的结果表明,除"白沙13"外,其余品种种子内部都不同程度地带菌,一般的种子带菌率为1~12%,重病田的达35~46%。可见种子带病率比种子黑胚率高,即种子真正带菌率比肉眼判断的高。

对上述轻、中、重病粒*各20粒在播种前进行表面 消毒2.5分钟后 分别 对 外 皮 (果皮),内皮(种皮)、种胚进行分离培养,结果表明,重病粒的外皮,内皮和胚的带菌分别是80%,85%和70%,中病粒的带菌率分别是75%、60%和35%,轻病粒的带菌率分别是

	表 8	病种的成苗率及病苗率*
--	-----	-------------

病种	土堰	消毒	对 照		
	成苗率	病苗率	成苗率	病苗率	
级别	(%)	(%)	(%)	(%)	
重病粒	67.0	52.2	69.0	44.9	
中病粒	80.0	20.9	85.0	18.8	
轻病粒	94.0	17.0	89.0	16.9	
健粒	100.0	0.0	100.0	0.0	

每处理100粒,病苗率是播后10天分离的 结果,是用病苗数与总数之比求得,不萌 发粒末算在内。 5%,10%和0%。由此可见,轻病粒的病原菌只入侵至内皮层,胚带菌率为0%; 中病粒的胚带菌率达35%;而重病粒的胚 带菌率达70%。

用轻、中、重病粒分别播种的试验结果(见表8)表明:发病重的种子成苗率最低69%,发病轻的种子较高达89%,无病种子则齐苗;病苗率:种子发病越重其发病率越高,达44.9%,无病种子则无病苗出现,大田调查发现苗期一般病株率为3.1~15.7%。

以上调查试验结果证明, 带病种子是 本病的初侵染源。

4. 寄主范围: 菲律宾Fuentes等[11]进行的人工接种试验证明小麦根腐病菌可侵染 6 种作物和12种杂草。黑龙江省农科院植保所[8]认为可侵染30多种植物。

在1980年冬和1981年春我们进行了两次寄主范围接种试验。第一次用田间挖回的常见杂草进行盆栽,待4~5叶时进行喷雾接种。第二次用田间收集的杂草种子盆栽,4~5叶时进行喷雾接种,保湿48小时,接种后4天检查,结果(见表9)表明,在供试的30种植物中,发病的有6种作物和11种杂草,其中甘蔗(Saccharum officinarum),茭白(Zizania caduciflora),雀稗(Paspalum thumbergii)纤毛鸭咀草(Ischaemum ciliare)和川谷(Coix lacryma-jobi)5种为前人所未报道过的。其余12种是小麦(Triticum aestivum),水稻(Oryza sativa),高梁(Sorghum vulgare)玉米(Zea mays),

^{*} 病种子的分级按白金铠等[2]所订标准。

轻病粒, 胚尖、种沟或种皮上有很小病斑。

中病粒: 胚尖、种沟或种皮上有较大的病斑。

重病粒: 胚部或种粒一半均变黑褐色, 或种粒瘪瘦、变黑褐色。

牛筋草 (Eleusine indica), 光头稗 (Echinochloa colonum), 千金子 (Leptochloa chinensis), 羊草 (Panicum maximum), 粗轴草 (Rottboellia exaltata), 两耳雀稗 (Paspalum conjugatum), 游草 (Leersia hexandra), 莠狗尾 (Staria geniculata)。下述13种杂草不感病: 碎米砂草 (Cyperus iria), 靈颖草 (Sacchiolepis indica), 鼠尾草 (Sporobolus elongotus), 四星臂草 (Brachiaria subquadripara), 类芦 (Neyraudia reynautiana), 知风飘拂草 (Fimbristylis eragrostis), 小栗 飘拂草 (F.miliacea), 帝文马塘 (Digitaria timorensis), 马塘 (D.sanguinalis), 水蔗草 (Apluda mutica), 狗牙根 (Cynodon dactylon),白茅(Imperata cylindrica),和铺地黍 (panicum repens)。其中铺地黍、白茅和狗牙根与前人报道结果不一致,即Fuentes[11]等认为可感病,而本试验则表现为不感病。在感病的16种植物中,一般接种后4天左右便产生褐斑。除甘蔗和牛根草外,其余14种植物在接种2个月后带有病斑的枯叶经保湿尚能产孢。

表9 人工接种的寄主范围*

			第一批发病	第二	土批	前人报道
	植物名称	ξ	调查	发病调查	两月后枯叶 产 孢	 发病情况
小	麦 Triticum aestivum		+++	+ + +	+	+
水	稻 Oryza sativa		++	+ +	+	+
高	梨 Sorghum vulgare		+++	+++	+	+ + +
E	₭ Zea mays		+++	+ + +	+	+ +
甘	蕉 Saccharum officinarum		+		-	i
茭	슄 Zizania caduciflora		+ +	. + +	+	
雀	率 Paspalum thumbergii		-	+	+	
纤毛鸭	且草 Ischaemum ciliare		+	+	+	
羊	草 Panicum maximum			+++	+	+
JH -	今 Coix lacryma-jobi		+++		+	
舖 地	黍 Panicum repens		-	-	-	++
白	茅 Imperata cylindrica			-	-	+ +
狗 牙:	艮 Cynodon dactylon		-	-	-	+
牛 筋	淖 Eleusine indica		++	+ +	-	++
光 头	卑 Echinochloa colonum	ļ	+	+	+	+
莠狗	尼 Staria geniculata		+++	+ + +	+	+
千金	子 Leptochloa chinensis		++	+	+	+
粗轴:	🖫 Rottboellia exaltata			+	+	++
两耳雀	卑 Paspalum conjugatum			+	+	+ +
游	草 Leersia hexandra		+ +	++	+	+++
水蔗	草 Apluda mutica			- }	-	

^{*}第一批接种杂草用再生苗,第二批接种杂草用播种长出的苗,接种后第四天调查发病情况。 "+++"严重感病,"++"较重,"+"轻,"-"不感病,空白为缺试验。

为了解田间是否存在自然感病寄主植物,我们对病区的常见杂草进行定期调查。结果未发现病株。

讨论与结论

广东小麦根腐病的为害与华北^{[2][3]}、西北^[4]等地所报道的有所不同,与东北春麦区的相类似^{[5][6]},主要表现为后期叶枯、早衰、穗枯和黑胚。但发病规律与上述两个地区所报道的相差较大。

据报道北方小麦根腐病初侵染源很多,包括带菌土壤,带病种子和田间 30 多 种 杂草^[6]。而广东地处亚热带,绝大部分麦田是"麦→稻→稻"的水旱轮作地,由于土壤中病原菌不能在淹水条件下越夏,所以一般不存在土壤带菌问题,在室内人工接种条件下虽然 6 种作物和11种杂草可感病,但田间的大量调查迄今还未发现有自然感病寄主;广东的病秆极少存留,室外堆放的病秆其组织内的菌丝又易于失去产孢能力,因而,病秆也不可能成为主要初侵染源,唯有带病种子是广东主要的初侵染源。

我国北方小麦根腐病的初侵染源很多,要基本上消灭初侵染源是难以办到的。但广东主要初侵染源仅为带病种子。因此,如何解决种子带菌问题就成了广东小麦根腐病防治的关键。

土壤孢子的测定一向被认为是难以解决的问题。直到目前尚未有一种准确方法。土壤孢子的测定方法最早是Chinn⁽⁸⁾报道的玻片技术,后来Boosalis⁽⁷⁾加以改进,但两种方法由于不能进行定量测定,所以实际应用很少。1955年Ledingham & Chinn⁽¹²⁾报道了漂浮法,它具有简单快速的优点,缺点是人为的误差大,影响了其准确度。后来Chinn等对此再加以改进,成为土壤孢子数估算法(Flotion-Viacility Count Method)⁽¹⁰⁾。但程序复杂,准确度也未见提高多少。还有人报道用小麦苗来进行生物测定,但受外界环境影响较大,费时也多,更难用于定量测定。本试验所用的方法是根据Chinn等⁽¹⁰⁾的土壤孢子数估算法加以改进,经与上述几种方法进行比较试验,证明此方法具有操作简单,较为准确,可供小麦根腐病的土壤孢子定量测定之用。沙壤土样品含水量以1.5%左右为宜。

参考文献

- 〔1〕白金铠、陈其本,1957,春小麦蠕虫菌病害调查记载方法,《植病知识》1 (2):48-49。
- [2] 何家泌、1964, 小麦根腐病的发生及防治意见, 《植物保护》2(3):112-114。
- [3] 陆师义、范桂芳、杨作民、周嘉平、史光中,1957,华北地区小麦的根腐病,《植病知识》1 (2):19—23。
- [4]欧阳骁,1962,柴达木盆地小麦根腐病调查,《植物保护学报》1 (2):123。
- [5] 黄桂潮、李坡生、顾嗣芳、常淑芝、1957, 小麦根腐病初步调查报告(1954—1955) 《东北农业科学通报》1:100—108。
- [6]黑龙江农业科学院植保所,1974,小麦根腐病的研究,《农业科学通讯》1:25。
- [7] Boosalis, M.G.1960. A soil infestion method for studying spores of Helminthosporium sativum. Phytopath. 50: 860-865.

- (8) Chinn, S.H.F., 1953. A slide technique for the stndy of fungi and actinomycetes in soil with special reference to Helmithosporium sativum. Can. Jour. Bot. 31:718-724.
- [9] Chinn, and R.J.Ledingham, 1958. Application of a new laboratory method for the determination of the survival of Helminthosporium sativum spores in soil. Can Jour. Bot.36: 289-295.
- (10) —,—and B. J. Sallans, 1960. Population and viability studies of Helminthosporium sativum in field soil. Can, Jour, Bot, 38: 533—539.
- (11) Fuentes, F.D., O.R. Exconde, E.S Gical, 1966. Etiology of Helminthosperium leaf spot of wheat in Philippines. Philippine Agriculturist, 48:711-729.
- [12] Ledingham, P.J. and S.H.Chinn, 1955. A flotation method for obtaining spores of Helminthosporium sativum from soil. Can. Jour. Bot. 33: 298-303.
- (13) Stack, R. W., 1977. A simple selective medium for isolation of Cochliobolus sativus from diseased cereal crouns and roots. Plant.Dis.Reporter, 61:521.

AN INVESTIGATION ON THE SOURCES OF PRIMARY INOCULUM OF WHEAT COMMON ROOT ROT AND A COMPARRISON OF METHODS OF COUNTING CONIDIA IN SOIL IN GUANGDONG

Wu Baichai Le Yugan (Dept.of Plant Protection)

ABSTRACT

The common root rot of wheat caused by Helminthosporium sorokinianum Sacc, et Sorok. (Cochliobolus sativus (Ito et Kurib.) Drechs, et Dast.) has become one of the important diseases in South China in recent years.

The present investigation, carried out in 1980 and 1981 in Guangdong Province, proved that the conidia of the causal fungus remained viable for more than 281 days in dry soil and less than 80 days in water-soaked soil. The soil in the regions where the main cropping system consisted of "wheat-rice-rice" were not infested. Among the 30 species of plants, including crops and weeds, inoculated in the greenhouse, five kinds of crops and eleven species of weeds showed certain degrees of susceptibility, but these susceptible hosts had not been found in the fields. The infected seeds were found to be the main source of primary inoculum.

By a comparison of five different methods of counting the conidia in the soil, a method modified from Chinn's "Flotation—Viability Count Method" was recommended.