

# 烟草黑胫病及其抗性鉴定方法研究进展

孙计平, 李雪君, 朱景伟

(河南省农业科学院 烟草研究中心/ 河南省烟草公司烟草研究所, 河南 许昌 461000)

**摘要:** 简要介绍了烟草黑胫病的病原、发病症状、防治方法, 并重点综述了该病害的抗性鉴定方法, 包括菌种分离与培养、接种方法与剂量、鉴定与分级等, 为进一步开展烟草抗黑胫病品种选育等研究提供参考。

**关键词:** 烟草; 黑胫病; 抗病性鉴定

**中图分类号:** S435.72      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2011)08-0036-04

## Tobacco Black Shank Disease and Identification Methods of the Disease Resistance

SUN Ji-ping, LI Xue-jun, ZHU Jing-wei

(Tobacco Research Center of Henan Academy of Agricultural Sciences, Tobacco Research Institute of Henan Tobacco Company, Xuchang 461000, China)

**Abstract:** The pathogen, symptoms and control methods of tobacco black shank disease were introduced briefly. The identification methods of the disease were primarily summarized, including isolation and cultivation of the pathogen, inoculation method and concentration, and identification and classification. The review would provide references for further research on tobacco resistance breeding to black shank disease.

**Key words:** Tobacco; Black shank disease; Identification of disease resistance

烟草黑胫病最早是 van Breda de Haan 于 1896 年在印度尼西亚的爪哇发现<sup>[1]</sup>, 1924 年以后, 该病已遍布全世界温带、亚热带和热带地区, 只有津巴布韦至今没有记载<sup>[2]</sup>。中国于 1950 年首次报道, 当时该病发生在黄淮烟区<sup>[3]</sup>, 目前各个烟区均有发生<sup>[4]</sup>。该病的发生对烟草生产有严重的影响, 尤其是留种田, 在个别地块的一些品种, 由于黑胫病的危害几乎造成种子绝收。近年来, 由于我国连作烟田面积不断扩大, 连作年限不断延长, 加重了该病害的流行<sup>[5-6]</sup>, 我国每年因烟草黑胫病造成的经济损失平均在 1 亿元以上<sup>[7]</sup>。近几年, 由于气候、土壤等原因, 该病害发生呈上升趋势, 特别是黄淮烟区。

烟草黑胫病自发现以来, 引起了世界各烟草产区的关注, 人们对病害症状、病原物生物学特性、病害的发生及防治等进行了大量研究。病害防治方法主要有抗病育种、植物检疫、化学防治、农业防治、物

理防治和生物防治等<sup>[8-11]</sup>, 其中选育抗病新品种是最根本的解决办法, 而品种抗病性鉴定是抗病育种的重要环节。鉴此, 简要介绍了烟草黑胫病的病原、发病症状、防治方法, 并重点综述了该病害的抗性鉴定方法, 包括菌种分离与培养、接种方法与剂量、鉴定与分级等, 为进一步开展烟草抗黑胫病品种选育等研究提供参考。

### 1 烟草黑胫病病原、发病症状及防治方法

#### 1.1 病原及生理小种

烟草黑胫病主要是由鞭毛菌亚门的烟草疫霉菌 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Breda de Haan) Tucker) 侵染引起<sup>[12]</sup>, 是一种土传性真菌病害。不同生理小种是指形态相同, 但在人工培养、生物学、生物化学和致病性等方面均有不同表现的群体。目前, 已鉴定出 4 个烟草黑胫病菌的生理小

种<sup>[13]</sup>: 1962 年, Apple 在美国北卡罗莱纳州发现了 0 号和 1 号小种; 1973 年, Pringsloo 等在南非鉴定出烟草黑胫病菌 2 号小种; 1978 年, McIntyre 和 Taylor 在美国康涅狄克州发现了 3 号小种。烟草黑胫病菌以 0 号小种为主, 大多数产烟国家目前有过 1 号小种的报道, 2 号小种仅在南非存在, 3 号小种仅在美国康涅狄克州发现。我国烟草黑胫病菌至少有 0 号和 1 号 2 个生理小种, 当前以 0 号小种为优势小种<sup>[14-20]</sup>。

### 1.2 发病症状

烟草黑胫病菌主要危害成株的茎基部和根部, 也侵染叶片和茎中、上部, 苗期一般发病较少, 但有些晚苗床发病也严重<sup>[12, 21-22]</sup>。苗期发病, 首先在茎基部产生黑斑, 病斑向上下扩展, 延及茎、叶及根部, 容易引起猝倒<sup>[23]</sup>。天气干燥时, 病苗干枯呈黑褐色; 高温多雨时, 病苗腐烂, 表面产生白色绵毛状霉, 造成烟苗烂死。大田成株烟苗茎基部受侵染后, 病菌向髓部扩展, 很快阻塞茎部水分运输, 茎部病斑有时长达 30~70 cm, 病株叶片自下而上依次变黄, 纵割病株茎部, 髓部变成黑褐色, 干缩成碟片状, 根部也常发病变黑<sup>[4]</sup>。病斑以上部位叶片萎蔫, 上部茎受害较多, 发生严重时, 有的病斑蔓延到花茎, 致使种子不能成熟。植株生长后期, 雨水多发病重, 伤口多发病重, 前茬或邻作是马铃薯的地块也易发病。

### 1.3 发病时期及防治方法

烟草黑胫病发病初期, 白天病株凋萎, 夜间稍能恢复, 4~5 d 后植株叶片全部凋萎, 最后全株枯死, 所以应在发病前采取药剂预防或发病初期采用药剂控制。6 月和 7 月是烟草黑胫病发病期, 为防止和减轻病害的发生, 应提前做好药防。于海芹等研究表明, 若一旦发现苗期烟草黑胫病的危害, 建议在病害发生的第 5 天之前进行防治, 在病害发生的第 7 天之后防治作用不大<sup>[24]</sup>。

## 2 烟草黑胫病的抗性鉴定

品种抗病性是由品种自身遗传因素决定的, 是决定品种能否在生产上大面积推广应用的一个重要因素, 也是综合防治病害的经济、有效措施, 同时还有利于提高烟叶安全性, 符合无公害烟叶发展趋势<sup>[6]</sup>。

### 2.1 鉴定方法

烟草黑胫病抗性鉴定方法分为成株鉴定和苗期鉴定, 可以在温室病圃进行, 也可以在大田进行, 其中大田鉴定又分为自然诱发抗性和人工诱发抗性 2 种。

2.1.1 大田成株鉴定 烟草品种抗病性的测定大多数是通过大田鉴定, 即利用病株连作烟田作病圃, 诱其自然发病的方法, 也可进行人工辅助接种。2008 年, 孔凡玉等起草的烟草品种抗病性鉴定国家标准 (GB/T 23224-2008)<sup>[25]</sup>, 是在朱贤朝等 1996 年起草的行业标准 (YC/T 41-1996)<sup>[26]</sup> 基础上增加了对地力和生理小种的规定: 选择排灌方便、肥力水平中等、连年发病较重的烟田作鉴定圃, 病圃应明确病原生理小种类别。2 个标准均规定: 每个品种种植 1 行, 每行 20 株以上, 至少 3 次重复, 随机排列, 每重复设抗病品种革新三号, 中抗品种金星 6007 和感病品种小黄金 1025 各 1 行为对照。另设当地种植的抗、中、感品种作辅助对照, 若人工辅助接菌, 烟苗移至大田成活后 (10~20 d) 用菌谷接种 (每株接种量 4 g), 接种后天气干旱要灌水, 使田间土壤含水量处于饱和状态。GB/T 23224-2008 明确规定“参鉴烟草品种在全生育期内不应使用杀菌剂, 杀虫剂的使用根据病圃内害虫发生种类和程度而定”。自然诱发抗性的方法虽然可以反映品种的自然抗性, 但是由于环境条件的多样化, 以及年份间的气候条件各不相同, 有可能导致各烟区抗性鉴定的结果存在较大差异, 在不利于病害流行的年份很难通过自然诱发抗性的方法准确地测定品种的抗性<sup>[24]</sup>。于海芹等认为, 采用人工诱发抗性的方法 (接种量为菌谷 3~5 g/株, 接种时间为移栽后 18 d) 能较准确地测定品种的抗性<sup>[27]</sup>。自然诱发抗性和人工诱发抗性都需要在病圃内整个生育期进行, 鉴定周期长, 费时费力。

2.1.2 苗期鉴定 GB/T 23224-2008 规定: 烟苗长至 5~6 片真叶时, 移栽至直径大于 10 cm 的花盆, 每盆 2 株。每品种 10~20 株, 对照品种设置同大田成株鉴定, 待烟苗成活后, 每株按 0.25~0.5 g 菌谷量接种, 置于温度 28℃、相对湿度 80% 的条件下诱发病害发生。接种后第 3、5、7、10 天调查病情, 每次均应调查各品种全部植株。病害严重分级按 GB/T 23222-2008 (烟草病虫害分级及调查方法) 的规定, 计算发病率和病情指数<sup>[28]</sup>。2007 年 3 月 7 日, 国家知识产权局公开一项由云南省烟草科学研究所申请的发明专利 (200610048658): 一种烟草黑胫病抗性的苗期鉴定方法<sup>[29]</sup>。从感病烟茎上分离病原菌, 经纯化、培养后得到黑胫病接种体, 将接种体接种至待测烟苗的茎基部, 并分别于接种后第 5 天、第 7 天和第 10 天各调查一次病指, 以 3 次病指的平均值作为测试品种的抗性指标。从育苗到鉴定完成只需 65 d 左右, 大幅度地缩短了鉴定时间, 操作简便, 成本较

低。

苗期鉴定时间短, 操作简便, 成本低廉, 能有效避免外部环境对鉴定结果的影响, 提高了烟草黑胫病抗性鉴定的准确性<sup>[24]</sup>。于海芹等研究发现, 当苗期接种量为 0.5 g/株, 大田接种量为 5 g/株时, 可用苗期鉴定结果代替大田鉴定结果<sup>[14]</sup>。近年来, 用苗期初步鉴定烟草品种资源抗病性得到广泛推广和应用, 但在选育的抗病新品种推广前仍需做大田成株鉴定。

## 2.2 菌种分离纯化

将病株茎秆用自来水洗净晾干, 从病健交界处取 5 mm × 5 mm 髓部组织块, 移入含抗菌素的选择性 LBA(利马豆)培养基上, 每皿(直径 9 cm)均匀放置 5 块组织, 置于 25℃培养箱, 黑暗培养 3 d。待菌落形成后, 用灭菌解剖刀从菌落边缘切取 2 mm × 2 mm 的菌丝块在选择性培养基上转移一次, 每皿 4~5 块, 25℃黑暗培养 3 d, 然后再从菌落边缘切取 2 mm × 2 mm 的菌丝块转移至盛有 LBA 的试管斜面上, 25℃黑暗培养 7 d 后, 低温保存备用<sup>[30]</sup>。

## 2.3 菌种培养

李云梅等研究了云南烟草黑胫病菌在 8 种培养基上的生长情况, 认为燕麦培养基和选择性培养基上菌落生长较好, 番茄汁和马铃薯培养基上生长较差。在 30℃下菌丝生长速率最高, 其次为 28℃, 以 35℃生长最差<sup>[31]</sup>。

专利 200610048658 中显示, 将烟草黑胫病菌菌丝体移入燕麦培养基上培养 5~7 d 后, 转入菌谷培养基上培养 18~20 d 得到黑胫病接种体<sup>[29]</sup>; YC/T 4-1996 规定, 菌谷需在 28~30℃下培养 10~14 d<sup>[26]</sup>; GB/T 23222-2008 中规定, 菌谷需在 28~30℃下培养 15~20 d<sup>[28]</sup>。

## 2.4 接种方法

烟草黑胫病菌的致病力表现受多种因素的综合影响, 谢成颂等<sup>[15]</sup>研究认为整株接种最能反映出植株的抗病性, 但比较麻烦, 茎表皮接种也能测定抗病性。接种方法的选择及接种剂量的确定直接影响鉴定结果的准确性。接种方法是根据病原菌的侵染特性来确定的。烟草黑胫病菌主要是通过游动孢子囊、游动孢子和菌丝体借流水而传播, 侵染部位大多在根部和茎基部, 叶部也可侵染。大田鉴定多采用菌谷接种。迄今为止, 国内外研究者已采用诸多接种方法对烟草黑胫病菌的致病性及生理生化特性进行研究, 马国胜对接种方法进行了归纳, 主要有如下几种<sup>[30]</sup>: ①游动孢子悬浮液浸根接种; ②菌丝体悬浮液浸根接种; ③菌丝体悬浮液离体叶片接种; ④游

动孢子悬浮液喷雾接种; ⑤游动孢子或菌丝体悬浮液茎注射接种; ⑥游动孢子囊悬浮液灌根接种; ⑦菌丝块创伤茎基部接种; ⑧菌丝块不创伤接种。马国胜研究认为, 菌丝块创伤茎基部方法效果最好, 可以较好地反映出烟草黑胫病菌的致病力和烟草品种的抗病性水平<sup>[30]</sup>, 这和王革等<sup>[18]</sup>、黄成江等<sup>[6]</sup>、于海芹等<sup>[24]</sup>的研究结果相同。

## 2.5 接种剂量

苗期鉴定菌谷接种量为 0.25~0.5 g/株。McIntyre 等<sup>[32]</sup>提出, 进行烟草黑胫病抗性鉴定时游动孢子的最优接种剂量是 10<sup>4</sup> 个/mL。YC/T 4-1996 烟草品种抗病性鉴定中也规定游动孢子剂量要达到 10<sup>4</sup> 个/mL。王智发等<sup>[19]</sup>则认为, 游动孢子剂量达到 10<sup>3</sup> 个/mL 即可取得较好效果。马国胜<sup>[30]</sup>通过研究认为, 游动孢子浸根接种时, 游动孢子剂量以 (10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup>) 个/mL 为宜, 并使各菌株的接种剂量保持在相同水平上。

## 2.6 对照品种选择

所有鉴定方法都是以小黄金 1025 为感病对照, 金星 6007 为中抗对照, 革新 3 号为抗病对照; 可另设当地种植的抗、中、感品种作辅助对照。

## 2.7 鉴定与分级

2.7.1 调查时期 成株鉴定于发病初期、盛期和末期各调查 1 次; 苗期鉴定于接种后第 3、5、7、10 天调查病情, 以株为单位分级调查。每次均应调查各品种全部植株, 一般应在晴天中午以后调查。

2.7.2 分级方法 1996 年, 朱贤朝等起草的烟草病害分级及调查方法(YC/T 39-1996)<sup>[33]</sup>将病害严重程度分为 5 级: 0 级: 全株无病; 1 级: 茎部病斑不超过茎围的 1/2, 或半数以下叶片轻度凋萎, 或下部少数叶片出现病斑; 2 级: 茎部病斑超过茎围的 1/2, 或半数以上叶片凋萎; 3 级: 茎部病斑环绕茎围, 或 2/3 以上叶片凋萎; 4 级: 病株全部叶片凋萎或枯死。

2008 年, 任广伟等起草的烟草病虫害分级及调查方法国家标准(GB/T 23222-2008)<sup>[28]</sup>将病害严重程度分为 6 级: 0 级: 全株无病; 1 级: 茎部病斑不超过茎围的 1/3, 或 1/3 以下叶片凋萎; 3 级: 茎部病斑环绕茎围 1/3~1/2, 或 1/3~1/2 叶片轻度凋萎, 或下部少数叶片出现病斑; 5 级: 茎部病斑超过茎围的 1/2, 但未全部环绕茎围, 或 1/2~2/3 叶片凋萎; 7 级: 茎部病斑全部环绕茎围, 或 2/3 以上叶片凋萎; 9 级: 病株基本枯死。

2.7.3 发病率和病情指数计算方法 发病率=(发病株数/调查总株数) × 100%;

病情指数=  $\sum$  (各级病株或叶数 × 该病级值) /

(调查总株或叶数×最高级值)×100。

### 3 研究展望

烟草黑胫病是我国烟草的主要病害之一,选育抗病品种是一项重要而经济有效的防治措施,而利用亲本的抗性遗传是目前选育抗病品种的主要方法,因此,筛选现有的一些抗黑胫病烤烟品种资源是育种工作者重要的基础性研究。另外,烟草黑胫病在低代的抗性能够一直稳定到高代,因此,可在品种选育的早期,利用苗期大量的接种鉴定,筛选出抗黑胫病的品种,淘汰大量感病品种,对选育黑胫病抗性品种提供了一条捷径。

总结发现,苗期抗病性鉴定方法周期短、成本低,不受季节的限制,将成为今后筛选优质抗黑胫病资源的主要方法。利用抗病资源进行多抗、优质品种选育将是今后育种工作的重点,因此,抗性鉴定方法的研究具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] van Breda de Haan. De Bibitziekte in de Deli-tabak veroorzaakt door *Phytophthora nicotianae* Mded [J]. Slands Plentuim, 1896, 15: 1-107.
- [2] 尚志强.烟草黑胫病病原、发生规律及综合防治研究进展[J].中国农业科技导报, 2007, 9(2): 73-76.
- [3] 陈瑞泰,朱贤朝,王智发,等.全国16个主产烟省(区)烟草侵染性病害调研报告[J].中国烟草科学, 1997(4): 1-7.
- [4] 闫克玉,赵铭钦.烟草原料学[M].北京:科学出版社, 2008: 337-338.
- [5] 马国胜,高智谋,陈娟.烟草黑胫病研究进展[J].烟草科技, 2001(9): 44-48.
- [6] 黄成江,李天福,卢向阳.抗黑胫病烤烟品种资源的筛选[J].烟草农业科学, 2006, 2(3): 255-259.
- [7] 韦发才,莫仁敏,杨再豪,等.烤烟主要病虫害发生特点及防治对策[J].广西植保, 2007, 20(1): 35-37.
- [8] 方敦煌,白万明,李天飞.烟草病害防治的问题与对策[J].植物医生, 1998, 11(1): 32-33.
- [9] 王静,孔凡玉.烟草黑胫病综合防治技术[J].烟草科技, 2002(8): 45-47.
- [10] 孔凡玉,朱贤朝,石金开,等.我国烟草侵染性病害发生趋势及防治对策[J].中国烟草, 1995(1): 31-34.
- [11] 方敦煌,白万明,李天飞.烟草病害防治的问题与对策[J].植物医生, 1998, 11(1): 32-33.
- [12] 中国农业科学院烟草研究所.中国烟草栽培学[M].上海:上海科学技术出版社, 1987.
- [13] 朱贤朝,郭镇业,刘保安.烟草黑胫病菌生理小种研究初报[J].中国烟草, 1984(1): 4-7.
- [14] 于海芹,焦芳婵,李德团,等.烟草品种黑胫病抗性鉴定及不同接种方法间的相关性分析[J].内蒙古农业科技, 2007(6): 48-51.
- [15] 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.
- [16] 朱贤朝,郭振业,刘保安,等.我国烟草黑胫病菌生理小种研究初报[J].中国烟草, 1987(4): 1-3.
- [17] 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.
- [18] 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): 30-35.
- [19] 王智发,刘延荣,谢成颂,等.山东省烟草黑胫病菌生理小种初步鉴定[J].植物保护学报, 1985, 12(1): 51-55.
- [20] 朱贤朝,郭振业,刘保安.在山东省烟草黑胫病菌中出现0号和1号小种的分化[J].中国烟草, 1986(2): 8-9.
- [21] 杨建卿,江彤,承河元.烟草病理学[M].合肥:中国科学技术大学出版社, 2003: 164-167.
- [22] 华南农业大学、河北农业大学.植物病理学[M].2版.北京:中国农业出版社, 2000: 244-247.
- [23] 屈霞,李爱国,颜合洪.烟草黑胫病研究进展[J].作物研究, 2007, 21(5): 725-728.
- [24] 于海芹,焦芳婵,肖炳光,等.烟草种质资源苗期黑胫病抗性鉴定研究[J].中国农业科技导报, 2008, 10(4): 70-75.
- [25] 孔凡玉,王凤龙,张成省,等. GB/T 23224-2008 烟草品种抗病性鉴定[S].北京:中国标准出版社, 2008.
- [26] 朱贤朝,石金开,孔凡玉,等. YC/T 41-1996 烟草品种抗病性鉴定[S].北京:中国标准出版社, 1996.
- [27] 于海芹,高玉龙,张谊寒,等.人工接种诱发烟草黑胫病抗性鉴定的应用研究[J].中国农学通报, 2008, 24(7): 378-380.
- [28] 任广伟,孔凡玉,王凤龙,等. GB/T 23222-2008 烟草病虫害分级及调查方法[S].北京:中国标准出版社, 2008.
- [29] 云南省烟草科学研究所.一种烟草黑胫病抗性的苗期鉴定方法:中国, 200610048658[P]. 2007-03-07.
- [30] 马国胜.烟草黑胫病菌生理生态及对甲霜灵抗性监测与遗传研究[D].合肥:安徽农业大学, 2002.
- [31] 李云梅,卢秀萍,李永平.烟草黑胫病菌培养特性的研究[J].植物保护, 2006, 32(6): 81-84.
- [32] McIntyre J L, Taylor G S. Race 3 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* [J]. Phytopathology, 1978, 68(1): 35-38.
- [33] 朱贤朝,石金开,孔凡玉,等. YC/T 39-1996 烟草病害分级及调查方法[S].北京:中国标准出版社, 1996.