

大豆对菌核病室内抗性鉴定方法研究

矫洪双* 程志明 许修宏 李晓峰** 张喜萍

奚启新 张伟丽 郭玉莲

(东北农业大学, 哈尔滨, 150030)

摘 要

实验室条件下,利用菌丝悬液、麦粒菌丝接种体、PDA 菌丝块等接种不同大豆材料的钵栽幼苗、离土整株及离体茎叶。结果表明:除 V₃ 期离体叶接种方式外,其它几种接种鉴定方法均能明显地区分不同大豆材料的抗感水平,并与疫区田间自然感病鉴定的结果基本符合。PDA 菌丝块 V₃ 期离体茎接种和菌丝悬液 V₃ 期整株接种,简便易行,是适于大规模筛选大豆抗源的有效方法,菌丝滤液 V₃ 期整株浸根鉴定,更为直观方便,在确定稳定的标准对照品种后,可望适于大批材料的初选鉴定。

关键词 大豆;菌核病;抗病性;抗源筛选

前 言

大豆菌核病菌[*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary]具有广泛的寄主范围^[1],并且其致病力无明显分化。因此在许多寄主植物上,至今未找到有效的抗源。

Boland^[2](1986,1987)、Chun^[3](1987)、Cline^[4](1983)、Grau^[5](1982)等人研究了不同大豆材料对菌核病菌的抗性差异,肯定了在大豆种质资源中存在对菌核病的抗病性,从而为开展大豆抗源筛选及抗菌核病育种工作提供了依据。

国内大豆种质资源抗菌核病的研究工作尚处在初期阶段。研究大豆种质资源对菌核病的抗性鉴定技术,尤其是适于大规模筛选抗源的抗病性鉴定方法,是开展大豆抗菌核病育种的基础工作。本文报道了室内几种鉴定方法在大豆菌核病抗性鉴定中的应用结果。

* 矫洪双,东北农业大学 90 级硕士研究生,现在大庆温室工作。

** 李晓峰,东北农业大学 89 级本科生,现在大庆供电公司土地科工作。

本文于 1995 年 8 月 1 日收到。This paper was received on Aug. 1, 1995.

材料和方法

1. 试验材料

供试大豆材料近 300 份,分别由东北农业大学大豆研究所,黑龙江省农科院大豆所,绥化农科所、九三农科所提供。

2. 供试菌源

菌核采自黑龙江省国营农场管理局山河农场大豆田,经 PDA 培养基培养分离出菌丝纯化后作为试验菌种。

3. 接种体制备

①PDA 菌丝块接种体

取 PDA 平板(D=9cm),在中央处接种少许菌丝,置 25℃下培养 3—4 天,待菌落前缘长至距皿边缘 2cm 时,作接种用。

②麦粒菌丝接种体

取三角瓶麦粒培养基,接种少许菌丝,置 25℃下培养 3—4 天,待白色菌丝长满麦粒表面后,作接种用。

③菌丝滤液接种体

菌丝经液体培养基培养后,用双层纱布滤除菌丝,将培养液分别稀释 2 倍、5 倍、10 倍后作浸根接种用。

4. 接种方法

①V₃ 期大豆离体茎 PDA 菌丝块接种

从大豆幼苗第一个 3 重复叶节开始向上取 10cm,两端缠湿棉球,然后将直径 3.5mm 的 PDA 菌丝园片置于大豆茎中间,使菌丝面与大豆茎接触,室温下用透明塑料袋封闭保湿。发病严重度以大豆茎受菌丝侵染长度计算。

②V₃ 期大豆离土整株麦粒菌丝接种

将麦粒菌丝接种体置于 V₃ 期大豆离土植株第一个 3 重复叶的叶腋处,大豆根系保持于水层内,室温下套罩保湿,24 小时后陆续记载菌丝侵染及植株受害程度。

③V₃ 期大豆菌丝悬液整株喷雾接种

钵栽大豆进入 V₃ 期,用菌丝悬液喷雾接种,室温下套塑料罩保湿,48 小时后逐日观察记载发病情况。

④菌丝滤液浸根测定

将 V₃ 期大豆幼苗根浸于菌丝滤液的原液、稀释 2 倍液、5 倍液及 10 倍液内,在室温下每隔 24 小时观察记载(拍照)不同大豆材料的受害萎蔫程度,设清水浸根为对照。

5. 抗(耐)病性评价指标

为了使不同接种鉴定方法的试验结果能相互进行比较,以鉴定同一大豆材料在不同接种鉴定方法中的相对抗病性,本文将各种试验的结果均进行了统一转换,采用如下指标:

相对抗性指数[Relative Index;RI]

$$RI = \ln[P_i / (1 - P_i)] - \ln[P_k / (1 - P_k)]$$

* RI—相对抗性指数,是衡量农作物品种抗性的通用指标。采用逻辑斯蒂公式的转换形式,把抗病鉴定结果线性化,从而使不同抗病鉴定方法的试验结果间能够进行直接比较。

Pi—供试材料的发病严重度

Pk—对照材料的发病严重度

RI 值是衡量农作物品种抗性的通用指标,它与抗性呈负相关,当供试品种严重度与对照相等时, $RI=0$,品种较对照抗病时 $RI<0$,品种较对照感病时 $RI>0$ 。在不同接种鉴定方法中,由于接种的时期、接种体种类、接种部位及控制环境因子等因素的影响,同一材料的发病严重度会有明显的不同,因而难于直接比较,采用 RI 值转化后,不同试验结果的 RI 值随严重度呈线性变化,因此可以使各试验结果进行平行比较。

本项研究采用的抗感评价标准是

高抗(HR) $RI<-1.5$

中抗(MR) $RI<-1.0$

低抗(LR) $RI<0$

低感(LS) $RI>0$

中感(MS) $RI>1.0$

高感(HS) $RI>1.5$

结果与分析

1. V₃ 期大豆离体茎 PDA 菌丝块接种

表 1 离体茎接种鉴定结果

Table 1 Result of infection on stems inoculated with PDA plot in ritre

大豆材料编号 Soybeans	病斑长度(cm) Spot length				RI 值*	抗病类型 Resistant type
	3 天	6 天	13 天	16 天		
137	0.3	0.5	0.5	0.5	-2.1	HR
186	1.3	3.6	7.5	10.0	1.6	HS
108	0	0.1	0.1	0.1	-3.9	HR
142	1.8	4.0	6.1	10.0	1.1	MS
368	1.4	2.4	8.1	10.0	2.3	HS
100	0.9	0.9	3.9	9.5	-0.3	LR
28	1.0	1.2	2.4	5.7	-1.0	MR
361	1.4	1.5	5.9	9.5	0.7	LS

* 以第 13 天的病斑长度计 RI 值

分别取 HR, R 和 HS 材料不同时间内的病斑长度为纵坐标,时间为横坐标作图 1。从中看出,高抗材料病程进展缓慢,耐病材料前期病程进展缓慢,而后期病程进展加快,高感材料的病程基本呈直线上升趋势。

将表 1 中各材料的 RI 值与 1992 年田间自然感病鉴定各材料的 RI 值作相关分析,则

得相关系数 $r=0.7639$, 经检验在 0.05 水平上显著。因此认为, V_3 期离体茎接种鉴定方法所得结果, 与田间自然感病鉴定结果具有较好的一致性(表 2)。

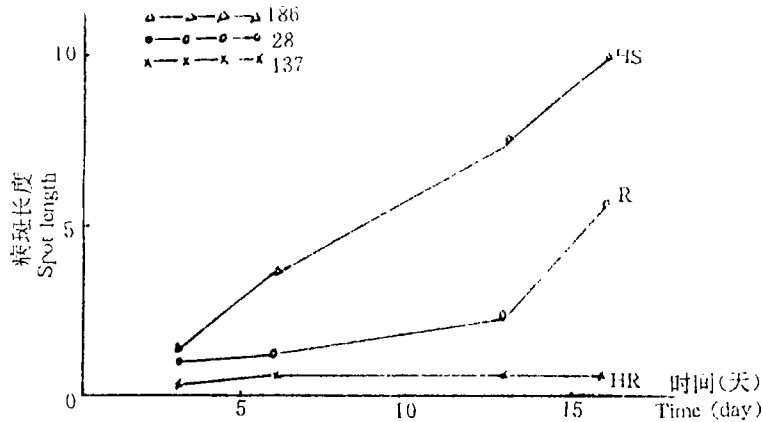


图 1 不同抗性类型材料的病情进展速率

Fig 1 Disease developing speed of different resistant type soybeans

表 2 室内鉴定结果*与田间自然感病鉴定结果比较

Table 2 Comparision between the results of test in laboratory and in soybean field

大豆材料编号 Soybeans	室内鉴定 RI 值 In laboratory RI	田间鉴定 RI 值 In soybean field RI
137	-2.1	-1.30
186	1.6	3.26
108	-3.9	-2.60
142	1.1	0.75
368	2.3	-0.46
100	-0.3	0.12
28	-1.0	-1.2
361	0.7	1.76

* 室内菌丝接种

2. V_3 期大豆离土整株麦粒菌丝接种

用供试材料的病情指数与平均病情指数求出各材料的 RI 值, 并与 1991 年、1992 年疫区田间自然感病鉴定相对应材料的 RI 值进行相关分析, 分别得相关系数 $r_1=0.6061$ 和 $r_2=0.6302$ 。经检验二者均在 0.01 水平上显著, 因此认为 V_3 期大豆离土整株鉴定, 与田间自然感病鉴定结果具有很好的一致性(表 3)。

表 3 室内鉴定*与田间自然感病鉴定结果比较

Table 3 Comparison between the results of test in laboratory and in soybean field

大豆材料编号 Soybeans	室内鉴定 RI 值 In laboratory RI	1991 年田间鉴定 RI 值	1992 年与田间鉴定 RI 值
		1991 in soybean field RI	1992 in soybean field RI
381	0.27	0.47	0.18
191	-0.37	-0.05	-0.35
195	-0.98	-0.21	-1.80
4	-2.02	-1.27	-1.64
368	-0.27	-0.46	-2.25
30	-0.47	-1.45	-4.66
177	-1.09	-1.36	-1.26
142	0.92	0.75	0.79
137	-1.31	-1.30	-2.45
328	-0.37	-2.14	-2.16
156	0.77	-0.08	1.45
89	0.92	-0.12	0.22
10	-0.89	-0.43	-3.04
144	-0.06	-0.66	-0.53
154	0.15	-1.80	-0.80
5	-0.67	-2.06	-1.29

* 室内菌丝接种

3. V₃ 期大豆菌丝悬液整株喷雾接种

结果表明,供试 13 份材料表现了明显的抗病差异,与 1992 年田间自然感病鉴定相对应材料的 RI 值进行相关分析,得相关系数 $r=0.5690$,经检验在 0.05 水平上显著,因此认为二者符合性较好(表 4)。

表 4 V₃ 期大豆菌丝悬液喷雾接种鉴定结果*Table 4 Result of inoculation with hypha suspension in V₃ stage

大豆材料编号 Soybeans	病情指数 RI	室内鉴定 RI 值	1992 年田间鉴定 RI 值
		In laboratory RI	Year 92 field RI
137	28.1	-0.18	-1.30
139	30.0	-0.08	-4.47
108	30.0	-0.08	-2.60
606	72.5	1.73	2.86
125	27.5	-0.21	-2.06
781	15.6	-0.93	-1.40
788	31.3	-0.02	-1.26
328	25.0	-0.34	-0.83
597	40.0	0.36	-0.84
177	27.5	-0.21	-1.36
812	25.0	-0.34	-1.26
770	25.0	-0.34	-1.76
716	30.0	-0.08	-2.60

* 注:接种后 48 小时调查结果

4. V₃期大豆菌丝滤液浸根鉴定

选取在多次抗性鉴定中均表现抗病的大豆材料 137 号及另外 5 份材料的 V₃ 期大豆植株,进行菌丝滤液浸根测定。结果表明,不同浓度的菌丝滤液及不同大豆材料之间,均具有明显的感病差异。利用原液浸根处理 8 小时后,感病材料的叶片即出现萎蔫,24 小时后则严重萎蔫,处理 96 小时,所有 5 份材料的供试植株均已枯死,而 137 号材料仅略显萎蔫。稀释 2 倍液、5 倍液及 10 倍液处理平行于原液处理结果,只是致萎时间略长。这表明不同大豆材料对菌丝滤液的毒性抵抗能力存在差异,这种差异基本上平行于其它接种鉴定方法所得到的结果。可望通过深入研究,确立抗性稳定的对照品种及建立客观的抗感评价标准后,成为大豆材料对菌核病抗性鉴定的有效方法。

讨 论

大田条件下,菌核病以大豆主茎受菌丝侵染危害最重,抗病材料通常表现为主茎抗扩展能力较强^[3,4]。所以,将 PDA 菌丝块和麦粒菌丝接种体,置于 V₃ 期大豆材料的茎及叶腋处,基本体现了大豆菌核病的主要致病特征,因此,试验效果较好。

以菌丝悬液喷雾接种,植株表面遍布接种体,在持续保持高湿条件下,病情进展很快。菌核病菌作为一种弱寄生而致病力很强的真菌^[7,8],只要湿度适宜,大豆材料的抗性差异将主要表现在感染时间上的差异。试验中,96 小时后调查,几乎全部材料的发病严重度都达到了 100%。这说明,菌丝悬液喷雾接种鉴定,必须控制好适宜的湿度及持续时间。正如 Cline^[5]指出,如果接种体能在潮湿条件下保持长时间同菜豆品种接触,将导致一系列原本抗病的品系遭到淘汰。

菌丝滤液浸根接种鉴定,不同大豆材料表现了明显的受害差异。推测认为这种差异与滤液中核盘菌所分泌的毒素—草酸有关。Tu^[4]通过研究证实了菜豆品种间菌核病的不同严重度,平行于感病组织内草酸的分布及浓度。吴纯仁等^[10]也证实了不同感病程度的油菜品种内草酸的分布和浓度具有明显差异。从而看出,毒素应用于大豆菌核病的抗源筛选有着良好的应用前景。

本试验所采用的几种抗性鉴定方法,都有其独特的优点及局限性,并主要以病斑的扩展速率作为抗性鉴定依据,更为客观实际。从而突破了大豆菌核病抗性鉴定工作的季节性限制,开创了室内大规模鉴定筛选抗源的可行性,适于对大批原始育种材料或早期世代材料进行筛选,淘汰严重感病材料,从而缩小了试验规模,缩短了育种年限。

参 考 文 献

- [1] Purdy, L. H. 1978. Symposium on Sclerotinia. the seventh annual meeting of the American Phytopathological society. *Phytopathology* 69(8):857~880
- [2] Boland, G. J. et al. . 1986. Growthroom evaluation of soybean cultivars for resistance to sclerotinia sclerotiorum. *Canadian Journal Plant Science* 66:559~564
- [3] Boland, G. J. et al. . 1987. Evaluating soybean cultivars for resistance to sclerotinia sclerotium under field conditions. *Plant Disease* 71:934~936

- [4] Chun, D. et al. , 1987, Laboratory and field assessment of resistance in soybean to stem rot caused by sclerotinia sclerotiorum. Plant Dis. 71:81~85
- [5] Cline, M. N. et al. , 1983, Methods for evaluating soybean cultivars for resistance to sclerotinia sclerotiorum. Plant Disease. 64:784~786
- [6] Grau, C.F. et al. , 1982, Resistance of soybean cultivars to sclerotinia sclerotiorum. Plant Dis. 66:506~508
- [7] Sialai, H. B. et al. , 1990, Compendium of soybean disease. APS Press.
- [8] Sutton, D. C. et al. , 1983, Studies on infection of soybean by ascospores of sclerotinia sclerotiorum. Plant Pathology. 32:251~261
- [9] Tu, J. C. 1989, Oxalic acid induced cytological alterations differ in beans tolerance or susceptible to white mold. New Phytologist 112(4):519~525
- [10] 吴纯仁等.1991.油菜菌核病致病机制.植物病理学报.21(2):135~139

STUDIES ON THE METHODS OF EVALUATING VARLETAL RESISTANCE OF SOYBEAN TO SCLEROTINIA ROT UNDER LABORATORY CONDITIONS

Jiao Hongshuang Cheng Zhiming Xu Xiuhong Li Xiaofeng
Zhang Xiping Xi Qixin Zhang Weili Guo Yulian

(Northeast Agricultural University, Harbin, 150030)

Abstract

New screening methods for evaluating resistance (tolerance) of soybean cultivars to sclerotinia rot were tested. The results showed significant differences in susceptibility among cultivars. Inoculating soybean seedlings detached seedlings or detached stems at V₃ stage with mycelial suspension, wheat-seed culture or PDA cultural block were all effective to differentiate resistance of soybean cultivars, with the only exception of detached leaf method. The results had a better accordance with the field test. Both the methods of inoculation with PDA mycelia block and mycelia suspension were more convenient and suitable for screening resistant resources on large scale in laboratory. Method of soaking roots with cultural filtrate was simple and may obtain results directly. It would become an effective method for screening resistant resources if CK varieties with stable resistance were found.

Key words Soybean; Stem rot; Resistance; Screening resistant resources