

大豆灰斑病菌毒素筛选抗源的研究^{*}

杨庆凯¹ 陈绍江² 王纪安¹ 刘亚光¹
曹越平¹ 邹继军¹

(¹东北农业大学 哈尔滨 150030 ²中国农业大学 北京 100094)

摘 要

以大豆灰斑病菌 7 号小种的培养基滤液和层析后的粗毒素,对 30 个大豆品种的幼苗和叶片的致萎初始时间和失水萎蔫程度进行了研究分析,结果指明初始反应时间和失水率是大豆灰斑毒素效应的两个量化指标,也分别反应其品种的敏感性和受害严重度。滤液和粗毒素、幼苗和叶片鉴定结果以及它们和田间抗性鉴定结果一致性表明毒素可以用来作抗源鉴定,由此建立了大豆灰斑病毒素筛选抗源的方法和标准。

关键词 大豆;毒素;筛选方法;大豆灰斑病

前 言

大豆灰斑病 (*Cercospora sojina* Hara)是 1915 年 Hara 于日本首先发生的一种真菌病害,现在已在亚洲、北美洲、南美洲、澳洲等的 10 多个国家发生,而成为一种世界性病害。在我国东北大豆产区,特别是黑龙江,该病已成为主要病害之一。建国以来 4 次大发生,给大豆生产和外贸出口造成了巨大损失^[1-2],已被列为大豆抗病育种的主要目标之一。

关于大豆灰斑病的生物学特性、抗性鉴定与抗源筛选、抗性遗传和抗病育种国内外均有不少报导,“七五”以来,结合国家攻关课题大豆抗病育种和国家自然科学基金重大项目“东北大豆种质资源拓宽和改良”,在大豆灰斑的研究上更是取得了明显进展,并且通过抗病品种的选育和推广,使该病的危害受到了一定的控制。近年在生产上又发现了抗病品种抗性丧失的新问题,这表明抗病研究还应从接菌鉴定提高到深入揭示病菌和寄主关系、研究其抗病机制的新水平。

病菌在侵染寄主过程中产生的代谢产物如酶、激素、毒素是病菌与寄主间相互作用的重要生理生化物质,特别是毒素因在许多病害中起到重要作用而格外受到重视^[3],一些病害已有这方面的较深入的研究^[4-7]。郭洋 (1991)曾对大豆灰斑病菌培养滤液作为诱导物对大豆细胞壁的影响作了初步研究^[4]。为了深入揭示大豆灰斑病致病机理,为抗性鉴定、抗源筛选提供新的途径、技术和方法,我们研究了大豆灰斑病菌粗毒素的毒性效应、鉴定

^{*} 国家自然科学基金资助项目

效果 用于抗源鉴定的方法和标准报告如下。

材料与amp;方法

1 供试品种

以经过 2年以上鉴定 ,表现为抗感不同的 30份大豆品种 (系)为试验材料。

2 田间抗性鉴定方法与标准

以 10个生理小种的混合孢子 - 菌丝悬浮液 ,在幼苗期进行喷雾接种 ,15天显症后 ,进行抗性调查 ,调查标准根据叶片上病斑的大小和数量制定 ,参见文献^[2]。

3 毒源及浸渍方法

所用毒源为 7号生理小种高粱培养基滤液以及经层析后所制得的粗毒素。将毒液盛入洗净的青霉素小瓶 (5ml)中 ,取幼苗时期的单个复叶 (带叶柄)或切根幼苗放入 1小时后 ,逐小时观察记载 粗毒素浓度为 10mg /ml,以清水处理为对照

4 萎蔫程度记载标准

等级	单叶处理	幼苗处理
0	不萎蔫	无反应
1	叶柄不蔫 ,叶缘微卷	主茎不弯 ,叶直立 ,叶缘微卷
2	叶柄不蔫 ,叶缘卷曲	主茎不弯 ,叶直立 ,叶缘卷曲
3	叶柄稍弯 ,叶部 1/3萎蔫	主茎稍弯 ,叶部 1/3萎蔫
4	叶柄弯曲 ,叶部 2/3萎蔫或枯死	主茎稍弯 ,叶部 2/3萎蔫
5	叶柄萎蔫 ,叶片枯死	主茎弯曲 ,叶片枯死

以上 0, 1为抗毒型 (R) , 2, 3为中间型 (M) , 4, 5为敏感型 (S)

5 符合率计算

失水率 (%) = [(初始鲜重 - 处理后重量) /初始鲜重] × 100

田间鉴定和浸渍处理的符合率、部分符合率和不符合率分别为二鉴定结果一致的品种数或符合部分的品种数或不一致的品种数占供试品种总数的百分率

结果与分析

1 初始反应时间与毒素反应强度的相关

毒素浸渍后 ,大豆叶片对毒素的反应主要表现为萎蔫 单叶浸渍后 ,1小时后即可观察到敏感品种的萎蔫现象 ,抗性品种可延至 10小时以后 ,幼苗反应出现早至 2小时 ,迟至 20小时。 30个品种的初始反应时间与对毒素反应的强度的负相关系数 ,单叶法为 - 0. 8301,幼苗法为 - 0. 7882,均达到 0. 01显著水平。

如果把每二个反应级合并 ,而分为抗 (R) 、中 (M) 、感 (S)三种毒性类型 ,那么三类型

间平均初始反应时间(如表 1)呈现显著差异,这表明所确立的抗性分级标准可以反映材料对毒素的敏感性差异。

2 叶片失水率与品种抗毒性的相关分析

叶片毒素处理后,失水率和萎蔫程度相关达到极显著水平,单叶法和幼苗法的此种相关系数分别为 0.9421和 0.8640

分类分析表明,抗毒性不同的材料的平均失水率间存在显著差异(表 2),也同样表明,叶片失水率可反应叶片受害程度,反映品种的抗毒性水平。

表 1 毒素处理后各类材料的平均初始反应时间(h·r)

Table 1 The mean beginning wilting time of different materials treated with toxin

抗性	Resistance	反应级别	Class	平均开始萎蔫时间		Mean beginning wilting time	
				单叶	Leaf treatment	幼苗	Seedling treatment
	R	0- 1		12.93a±	2.2500	17.00a±	1.0954
	M	2- 3		6.42b±	2.5027	11.45b±	4.4803
	S	4- 5		3.84c±	1.9078	5.25c±	2.4156

注: 显著水平 α= 0.05

表 2 抗毒性不同的品种失水率的比较

Table 2 The comparison of water lost ratio among different toxin- resistant cultivars

抗性	Resistance	反应级别	Class	失水率		Water- lost ratio	
				单叶	Leaf treatment	幼苗	Seedling treatment
	R	0- 1		18.63a±	8.0911	6.52a±	2.7374
	M	2- 3		32.81b±	10.3153	13.99b±	2.2265
	S	4- 5		4.687c±	6.6902	34.83c±	13.1272

3 粗毒素与滤液鉴定结果的一致性

粗毒素和滤液鉴定,其抗性分级结果具有很明显的一致性,以单叶法作鉴定时,二鉴定结果完全和不完全符合率分别达到 56.67%和 33.33%,即基本符合率为 90%,幼苗处理的完全和不完全符合率分别达到 40%和 46.67%,其和为 86.67%。这表明粗毒素和滤液鉴定品种抗毒性的基本符合率均达到 85%以上。

试验还得出:在田间抗性鉴定为抗性的品种,在以粗毒素和滤液作鉴定时,在以单叶法和幼苗法鉴定时,基本符合率分别为 85%和 81.67%,表明室内幼苗法和单叶法可互相替代,作为田间鉴定的重要参考。

4 适宜筛选方法的选择

表 3列出粗毒素和滤液、单叶法和幼苗法 4种组合条件下的鉴定结果与田间接种鉴定结果的一致性 表 3表明,以滤液的幼苗处理法的鉴定与田间抗性鉴定的符合率最高,完全符合率超过 70%,基本符合率达 90%,这表明滤液幼苗处理可作为毒素筛选抗源的适宜方法

表 3 不同处理与田间鉴定结果的一致性

Table 3 Conformation of the result of different treatments and field evaluating

与田间鉴定结果 的符合类型	粗毒素 Toxin				滤液 Filtrate			
	单叶法		幼苗法		单叶法		幼苗法	
	品种数	Variety	品种数	Variety	品种数	Variety	品种数	Variety
完全符合 Complete conformation	11	36.67	12	40.00	10	33.33	19	63.33
部分符合 Partical conformation	15	50.00	11	36.67	15	50.00	8	26.67
不符合 Disaccondant	4	13.33	7	23.33	5	16.6	3	10.00

讨 论

1 大豆灰斑病毒毒素筛选抗原的可行性

棉花枯萎病、黄萎病、玉米小斑病、小麦根腐病的毒素的致萎作用都已用来作抗性鉴定和抗原筛选^[3 5 8]。本试验表明大豆灰斑病菌的培养基滤液和经层析后的粗毒素对大豆叶片和幼苗都具有明显的致萎作用,并且品种间差异显著,无论是两种毒源间,还是单叶处理和去根的幼苗处理间鉴定结果均具有高于 80% 的符合率,并且它们都与田间鉴定结果有很高的一致性,这表明毒素鉴定可作为抗原鉴定和筛选的一种方法,且较小受环境条件影响。

2 大豆灰斑病毒毒素筛选抗原的方法

毒素筛选抗原时,纯度会影响实验结果。是用纯毒素还是用粗毒素或滤液,根据毒素的专化性、组份的复杂性不同在不同作物上有不同的结果^[6-8]。就大豆灰斑病而言,目前制备高纯度的毒素方法尚不成熟,从实用和抗原鉴定的需要出发,滤液和粗毒素均可用来作抗原鉴定,二者效果基本一致,完全不符合率均只占 10%。相比较而言,滤液制备容易,与田间鉴定结果符合率也略高,在建立室内鉴定系统时具有的实用性。

表 4 依据毒素处理后开始萎蔫时间划分的毒素抗性标准 (小时)

Table 4 The beginning wilt time for building toxin-resistant criterion(hr)

开始萎蔫时间		反应级别		抗性级别	
单叶	幼苗	Responsible grade		Resistent grade	
> 9	> 15	0- 1		R	
5- 9	8- 15	2- 3		M	
< 5	< 8	4- 5		S	

3 大豆灰斑病毒毒素抗性鉴定的标准

本试验表明,大豆灰斑病菌毒素的作用是使叶片萎蔫。叶片幼苗在粗毒素浸渍后萎蔫的初始时间和失水率可作为毒害反应的两个量化指标,前者反映材料受毒害的敏感程度,后者表现受害的严重程度,这种表明萎蔫程度的两个指标和田间接种鉴定的抗性鉴定结果具有较高的一致性,平均符合率超过 80%。为此,制定了以毒素筛选抗原的两个量化指

标(表 3 表 4),可作为研究和应用的参考

表 5 依据毒素处理后失水率划分的毒素抗性标准 (处理 18小时,%)

Table 5 The water- lost ratio for buildding toxin- resistant criterion
(18 hours after treatment with toxin,%)

失水率(%) Water- lost ratio		反应级别	抗性级别
单叶 Leaf	幼苗 Seedling	Responsible grade	Resistent grade
< 25	< 10	0- 1	R
25- 40	10- 20	2- 3	M
> 40	> 30	4- 5	S

这里所引的标准,只是根据 30个大豆品种毒素反应的结果作出的,需要以更多的品种进行观察分析,在实际应用中不断完善和改进。

结 语

- 1 大豆品种对毒素初始反应时间在一定时间内与其耐毒能力呈现显著负相关(单叶法为- 0. 8301,幼苗法为- 0. 7882) 进行抗源鉴定的最佳时间单叶法在 12小时左右,幼苗处理在 18小时左右。
- 2 叶片失水率和毒素致萎程度呈极显著正相关,单叶法和幼苗法的相关值分别为 0. 9421和 0. 8640
- 3 初始反应时间和失水率是品种对毒素敏感性和严重度的两个量化指标,滤液和粗毒素间、单叶法和幼苗法的处理间这两个指标的一致性以及品种间两个指标间显著差异和这种差异与田间抗性鉴定结果的 80% 以上的符合率,表明这两项指标可作为毒素筛选抗源的量化指标
- 4 从抗性筛选效果看,滤液和粗毒素的两种处理可以互相替代,滤液易于制备,较为实用。

参 考 文 献

[1] 许忠仁,1987,黑龙江省大豆灰斑病发生现状及防治对策,植物保护,(2): 2- 4

[2] 杨庆凯,1988,大豆抗灰斑病遗传育种问题,东北农学院学报,19(1): 10- 15

[3] 章元寿,1991,植物病原真菌毒素的研究现状,真菌学报,10(3): 169- 181

[4] 郭洋等,1991,植物细胞壁伸长蛋白与大豆灰斑病关系的研究,植物病理学报,21(3): 217- 231

[5] 陆家云等,1985,棉花品种对黄萎病抗性的菌期鉴定,南京农业大学学报,(2): 59- 65

[6] 周凯南等,1986,棉花枯萎病抗病性鉴定方法的探讨,山东农业大学学报,17(4): 59- 66

[7] 董金皋,黄梧芳,1988,离体玉米根冠细胞 Hm- 毒素敏感性的研究,植物病理学报,22(2): 175- 178

[8] Gwinn K. D. et al. , 1987, Effect of corn plant age and cultivar on resistance to *Cercospora Zoae* - maydis and Sensitivity to *Cerwosporin* , Plant Disease, 71(7): 603- 606

STUDY ON SCREENING OF DISEASE RESISTIBILITY WITH TOXIN FROM *CERCOSPORA SOJINA* HARA

Yang Qingkai¹ Chen Shaojiang² Wang Jian¹ Liu Yaguang¹
Cao Yueping¹ Zou Jijun¹

(1 *The Northeast Agricultural University, Harbin, 150030*

2 *Chinese Agricultural University, Beijing, 100094*)

Abstract

The seedlings and leaves of 30 soybean cultivars were treated with filtrates and rude toxin made from race 7 of *Cercospora soja* Hara. The beginning time and degree of wilting were studied. The results showed that the beginning wilting time and water- lost ratio were both the quantitative indexes of toxin effects and the reflections of the sensitivity and serious degree. The screening results of treating with filtrates, as well as between the leaf and seedling method were highly in accordance with each other. The fact suggested rude toxin could be used in the screening of resistant resources. The screening method and standard of resistance treated with toxin from *Cercospora soja* were also established.

Key words Soybean; Toxin; Screening method