

大豆对紫斑病抗性鉴定方法的研究^{*}

朱振东 李怡琳 邱丽娟 李向华 常汝镇 韩春雨

(中国农业科学院作物品种资源研究所 北京 100081)

摘要 本研究通过自然发病和人工接种鉴定了不同大豆品种对紫斑病的抗性,旨在建立大豆对紫斑病抗性鉴定方法,为大豆品种资源抗性筛选创造条件。对不同成熟期的37个大豆品种在自然条件下对紫斑病的抗性调查结果表明,大豆紫斑病的发生受气候条件、大豆成熟期和品种抗性的影响,由于避开了病害发生的有利时期,晚熟大豆品种紫斑病发生很轻或不发病。1998年和1999年,分别在防虫网室和温室人工接种鉴定45份大豆种质,两次的鉴定结果均表明大豆品种间对紫斑病的抗病性存在显著差异,但在温室条件下大豆紫斑病平均病情指数显著低于网室条件下的试验结果。为提高大豆对紫斑病抗性鉴定的准确性,建议不同成熟期的品种同期鉴定时可对早熟品种进行摘花,保证接种时接种荚荚龄一致;对接种荚进行标记;设立高感对照;鉴定为抗病的材料进行重复鉴定。

关键词 大豆;紫斑病;抗病性鉴定

中图分类号 S 435.651 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2002)02-0096-05

由 *Cecropora kikuchii* (T. Matsu. & Tomoyasu) Gardner 引起的大豆紫斑病是大豆的病害之一,严重影响种子的商品质量。一般情况下,紫斑种子延迟萌发和产生弱苗,严重龟裂或瘪小种子导致活力丧失^[1,2]。药剂防治能有效控制大豆紫斑病的发生^[3,4],但易残留、污染环境和导致紫斑病菌抗药性的产生。因此,利用抗病品种是生产高质量大豆的主要途径^[3,5]。由于大豆紫斑病对产量的影响不明显,该病在我国一直未受到重视,少数研究也仅局限在病原菌学方面^[6,7]。本研究对大豆抗紫斑病的鉴定方法进行了探索,旨在建立有效的大豆紫斑病抗性资源筛选方法,为抗病品种的选育和资源创新服务。

1 材料与方法

1.1 大豆材料

本研究所用的大豆品种、品系(见表1、表2)由中国农科院作物品种资源所大豆种质资源研究室提供。

1.2 病原菌

大豆紫斑病菌(*Cecropora kikuchii*)CK-2菌株从感病的大豆种子上分离获得。

1.3 不同大豆品种在自然条件下对紫斑病的抗性调查

1996年在自然条件下对从国外引进的成熟期为0—Ⅷ的大豆种质进行抗紫斑病性鉴定,并在成熟期为0—Ⅳ的品种中选出10个品种在1997年进行重复试验。在防虫网室种植鉴定材料,每品种1盆,出苗后定植2株,整个生育期进行正常的肥水管理。10月上旬未能成熟的品种移入温室管理。成熟后分别收获种子,计算紫斑病粒率。

1.4 大豆对紫斑病抗性的接种鉴定

1.4.1 接种体生产 CK-2菌株在PDA培养基平板培养7d,取生长前沿菌丝块接种高粱粒培养基,25℃条件下培养3d后,摇动三角瓶使菌丝体分布均匀,7d后将高粱粒培养物铺在消毒瓷盘内润湿的消毒吸水纸上,瓷盘上覆盖三层湿润的纱布,25℃条件下保湿培养2~3d诱发产生分生孢子。产孢后用蒸馏水洗脱分生孢子,配制105个孢子/mL悬浮液用

* 收稿日期:2001-04-29

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670468)

作者简介:朱振东(1965-),男,硕士,副研究员,研究方向大豆抗病研究。

于接种。产孢高粱粒培养物也可阴干后密封保存于4℃冰箱备用。

1.4.2 接种鉴定方法 1998 和 1999 年分别对 45 份大豆种质进行鉴定。鉴定材料分别盆栽在防虫网室或温室内, 每品种 1 盆, 播 3~5 粒, 出苗后定植 2 株。根据开花结荚情况, 分批进行接种。当一个品种的豆荚在 0.5~2cm 时为最佳接种时间^[8]。接种时孢子悬浮液加适量吐温, 喷雾接种豆荚和叶片至有水滴滴下。接种后, 植株在 25~30℃喷雾保湿间保湿 3d。保湿后, 1998 年在防虫网室进行后期管理, 1999 年在温室进行后期管理接种株移入防虫网室或温室, 并用小型喷灌装置间隔喷雾以保持湿度至收获种子。

表 1 10 个大豆种质在自然条件下对紫斑病抗性鉴定结果
Table 1 Natural infection by *C. kikuchii* in 10 soybean cultivars

品种 Cultivar	成熟期 Maturity group	1996 年 紫斑率(%) Purple seed rate in 1996	1997 年 紫斑率(%) Purple seed rate in 1997
Vrozsanjnaja (PI297550)	0	31.8	11.24
Faribault (PI583364)	I	15	2.50
Amsoy (PI548506)	II	7.1	0.00
Sandusky (PI576145)	II	3.3	4.4
Manchu (PI548365)	III	10.0	0.00
Resnik (PI534645)	III	0.25	0.00
Daidzuhi nshu (PI86024)	III	16.7	0.00
Nik (PI572240)	IV	12	0.00
G89-5193 (T175)	IV	0.0	0.00

1.4.3 病情调查及分级 品种成熟后及时收获种子, 以防豆荚炸裂。脱粒后在光线充足条件下挑出紫斑粒(必要时借助放大镜确定紫斑粒)和确定每一紫斑粒的病级, 计算病情指数, 根据病情指数确定每一品种的抗感类型。紫斑粒分级标准为: 0 级, 无病斑; 1 级, $0 < \text{病斑面积} \leq 25$; 2 级, $25 < \text{病斑面积} \leq 50$; 3 级, $50 < \text{病斑面积} \leq 75$; 4 级, $\text{病斑面积} > 75$ 。抗感划分标准为: 高抗(HR), 病情指数(%) ≤ 0.5 ; 抗病(R), $0.5 < \text{病情指数}(\%) \leq 1$; 中抗(MR), $1 < \text{病情指数}(\%) \leq 5$; 中感(MS), $5 < \text{病情指数}(\%) \leq 10$; 感病(S), $10 < \text{病情指数}(\%) \leq 20$; 高感(HS), 病情指数(%) > 20 。

2 结果与分析

2.1 不同大豆品种在自然条件下对紫斑病的抗性

调查

1996 年, 对国外引进的 37 份大豆种质在防虫网室进行紫斑病自然发病调查, 成熟期为 0—IV 的 23 个品种中有 20 个品种发生紫斑病, 占 86.96%, 品种间紫斑病粒率为 0—31.80%, 存在明显的抗感差异; 在成熟期为 V—VIII 的 14 个品种中仅成熟期分别为 V 和 VI 的两个品种中发现紫斑病粒, 其发病率也仅为 0.7% 和 0.8%, 这表明早熟品种的紫斑病发生率高于晚熟品种。在大豆生长季节, 早熟品种在开花至荚熟期多为阴雨天气, 易满足紫斑病发病条件; 晚熟品种开花结荚较晚, 最佳感病时期已处于相对干燥的天气条件下, 避开了大豆紫斑病菌侵染和病害发生的有利条件, 因此, 晚熟品种所表现的抗病, 极有可能为避病。1997 年对 10 个品种进行重复试验, 结果表明, 除 Sandusky 紫斑病粒率略有升高外, Vrozsanjnaja 和 Faribault 的紫斑病粒率显著降低, 其余 7 品种没有发现紫斑病粒(表 1), 这可能是与 1997 年干旱少雨、湿度低, 不利于大豆紫斑病的发生有关。

2.2 大豆种质对紫斑病的抗性接种鉴定结果

1998 年和 1999 年对 45 个大豆品种分别进行了抗紫斑病的接种鉴定(表 2)。比较这些品种的两 次鉴定结果, 12 个品种抗性表现一致, 占鉴定总数的 26.67%; 17 个品种分别在抗病或感病范围内变化, 占 37.78%, 其余 16 个品种由抗病变为感病或由感病变为抗病, 占 35.55%。1998 年平均病情指数为 26.22, 1999 年的平均病情指数为 13.78。1999 年平均病情指数下降的原因可能是温室条件不能满足紫斑病发展的最适温度、湿度; 另外, 温室 内空气缺乏流动, 不易造成大豆紫斑病菌的再次侵 染。由于不同大豆品种始荚期不同, 同时接种可能 导致某些品种的接种失败, 因而导致一些品种两次 的鉴定结果变化很大。综合 1998 和 1999 年的试验 数据, 以高病情指数作为最终抗性评价结果, 在 45 个品种中仅有中品 96—6143 表现为抗, 中特 1 号、 晋豆 13、齐黄 26、鲁 877141 和诱变 30 号 5 个品种 表现中抗。

2.3 大豆紫斑病自然侵染发生率和接种鉴定结果的比较

对 12 个大豆品种 1996 年自然侵染和 1998 年 接种鉴定结果的进行比较, 除 Vrozsanjnaja、Okushiro me 和 Mejiro 3 个品种紫斑病粒率的变化 具可比性外, 其它 9 个品种紫斑病粒率在两个试验 中的变化极大, 接种鉴定的大豆紫斑病粒率显著高

于自然侵染的结果(表 3)。

表 2 45 份大豆种质对紫斑病的抗性鉴定结果^a

Table 2 Reaction of 45 soybean varieties to C. kikuchii by artificial inoculation ^a					
品种 Cultivars	病情指数(%) Disease index	抗感反应 Reaction	品种 Cultivars	病情指数(%) Disease index	抗感反应 Reaction
中品 96—6143 Zhongpin 96—6143	0.86(0.30)	R(R)	Mar—49	20.80(7.10)	HS(MS)
诱变 30 Youbian No. 30	1.00(4.90)	M R(MR)	晋豆 9 Jindou No. 9	32.39(7.60)	HS(MS)
冀豆 12 Jidou No. 12	6.94(8.00)	MS(MS)	中品 95—6036 Zhongpin 95—6036	42.53(9.60)	HS(MS)
中品 95—5234 Zhongpin 95—5234	15.96(12.00)	S(S)	Charleston(PI567902)	64.77(9.80)	HS(MS)
A93—2S3	27.27(46.60)	HS(HS)	冀 HB—3 JI HB—3	74.11(8.30)	HS(MS)
鲁 86503—5 Lu 86503—5	27.91(36.80)	HS(HS)	中品 95—5571 Zhongpin 95—5571	81.94(5.90)	HS(MS)
Elf	30.56(47.70)	HS(HS)	郑 100 Zheng 100	0.00(29.30)	HR(HS)
Sprite 87	43.06(29.50)	HS(HS)	中豆 19 Zhongdou No. 19	0.00(11.50)	HR(S)
L82—2051(Tic)	46.83(27.60)	HS(HS)	豫豆 21 Yudu No. 21	0.63(21.90)	R(HS)
L82—2020(Tib)	32.55(20.50)	HS(HS)	Mejiro(PI80837)	1.85(33.80)	M R(HS)
鲁 871064 LU 871064	37.22(45.60)	HS(HS)	诱处 4 Youchu No. 4	1.00(10.30)	MR(S)
中作 96p11 Zhongzuo 96p11	79.76(28.20)	HS(HS)	郑 88091	1.82(27.03)	MR(S)
中特 1 号 Zhongte No. 1	0.00(2.50)	HR(MR)	科新 3 号 Kexin No. 3	1.44(9.30)	M R(MS)
晋豆 13 Jindou No. 13	0.00(3.10)	HR(MR)	鲁豆 10 Ludou No. 10	3.08(9.70)	M R(MS)
齐黄 26 Qihang No. 26	0.00(3.50)	HR(MR)	科丰 6 Kefeng No. 6	15.71(2.30)	S(M R)
鲁 877141 Lu 877141	4.44(0.70)	MR(R)	Century(lx2)	18.10(0.30)	S(HR)
Holbit 87	10.87(8.70)	S(MS)	Century(lx23)	19.30(2.80)	S(M R)
丹豆 5 号 Dan dou No. 5	16.03(8.00)	S(MS)	Century(lx13)	24.10(4.60)	HS(MR)
鲁豆 4 Ludou No. 4	18.75(5.10)	S(MS)	冀 8818 JI 8818	24.51(3.10)	HS(MR)
中黄 4 号 Zhonghuang No. 4	35.94(18.50)	HS(S)	鲁 871068 Lu 871068	39.88(4.50)	HS(MR)
中作 96p28 Zhongzuo 96p28	47.97(11.70)	HS(S)	中品 95—5697 Zhongpin 95—5697	53.41(3.60)	HS(MR)
早熟 18 Zaoshu No. 18	48.03(12.10)	HS(S)	中作 96p17 Zhongzuo 96p17	62.93(4.50)	HS(MR)
L81—4590(titi)	63.68(11.80)	HS(S)	平均 Average	26.22(13.78)	HS(S)

a: 括号内为 1999 年鉴定结果(the data in brackets are the results in 1999)

表 3 大豆紫斑病自然侵染发生率和接种鉴定结果的比较

Table 3 Incidence of seed purple stain by natural infection and artificial inoculation							
品种名称 Cultivar name	成熟期 Maturity group	1996 年自然侵染 紫斑率(%) Purple seed rate by natural infection in 1996	1998 年接种 鉴定结果 Purple seed rate by inoculation in 1998	品种名称 Cultivar name	成熟期 Maturity group	1996 年自然侵染 紫斑率(%) Purple seed rate by natural infection in 1996	1998 年接种 鉴定结果 Purple seed rate by inoculation in 1998
M87—1569(PI584527)	0	10	100	Charleston(PI567902)	III	2.0	79.55
Vrozsanjnaja(PI297550)	0	31.8	34.27	Daidzuhinshu(PI86024)	III	16.7	100
Faribault(PI583364)	I	15	87.1	Okushirome(PI423888)	IV	0.0	5.41
Mercury(PI583835)	II	0.0	78.57	Mejiro(PI80837)	IV	1.5	7.14
Amsoy(PI548506)	II	7.1	95.12	Flyer(534646)	IV	0.5	69.57
Resnik(PI534645)	III	0.25	54.55	A93—2S3		18.2	77.27

3 讨论

1996 年在大豆开花及后期阴雨较多, 温度低、空气湿度大, 有利于大豆紫斑病的发生, 而 1997 年相同时期干旱, 抑制病害的发生, 因而 10 份大豆材料

在 1997 年的紫斑病自然发病率明显低于 1996 年。前人研究结果也表明, 由于地理和气候条件的差异, 一些品种因早熟或晚熟而避开大豆紫斑病菌侵染和病害发生的有利条件而表现抗病^[4, 5, 9]。在自然条件下鉴定大豆对紫斑病的抗性, 病情指数偏低, 并且极不稳定, 必须重复鉴定多年才能得到可靠的结果^[5, 8]。

要快速、有效地鉴定大豆对紫斑病的抗性, 必须建立合适的人工抗病性鉴定方法。Orth 和 Schuh (1994) 研究表明, 大豆紫斑病在种子和叶部病害之间没有相关性, 认为利用苗期接种叶片鉴定大豆对紫斑病的抗性是不可行的^[10]。因此, 大豆对紫斑病的抗性鉴定必须以种子病害的严重度为依据。本研究在大豆初荚期人工接种, 接种后, 植株在 25~30℃ 喷雾保湿间保湿 3d, 之后接种株移入防虫网室或温室, 并用小型喷灌装置间隔喷雾以保持湿度至收获种子, 两次的鉴定结果均表明大豆品种间对紫斑病的抗病性存在显著差异, 但总体上温室内的发病程度明显低于网室。在温室, 由于空气流动性差, 病原菌再次侵染可能低于网室试验, 导致大豆紫斑病的严重度低于网室试验。

在保证湿度的情况下, 人工接种鉴定大豆对紫斑病的抗性是可行的, 如本研究中网室试验获得很高的发病率。为提高鉴定的准确性, 减少试验误差, 建议对大豆抗紫斑病鉴定方法进行以下改进: 不同成熟期的品种同期鉴定时对早熟品种进行摘花, 保证接种时接种荚龄一致; 标记接种荚数, 仅对接种荚进行病害调查。每次接种必须设置高感对照。鉴

定为抗病的材料必须进行重复鉴定。

参 考 文 献

1 Singh D P, Agarwal V K. Effect of different levels of purple stain infection on viability and germination of soybean seed [J]. Seed Research, 1984, 12(2): 44—46.

2 Pathan M A, Sinclair J B, McClary R D. Effects of *Cercospora kikuchii* on soybean seed germination and quality [J]. Plant Disease, 1989, 73(9): 720—723.

3 Fujita Y. Ecology and control of purple seed stain of soybean caused by *Cercospora kikuchii* [J]. Bull. Tohoku Nat. Agric. Exp. Stn., 1990, 81: 99—101.

4 Suzuki H. Mode of occurrence and control of purple speck of soybean [J]. JARQ, 1985, 19(1): 7—12.

5 Okabe A, Sasaki K, Igita K. Varietal difference in resistance to purple seed stain of soybean and the method of selecting for resistance [J]. JARQ, 1990, 23(3): 163—169.

6 裘维蕃. 关于大豆紫斑病菌 (*Cercospora kikuchii* Matsumoto et Tomoyasu) 的生物学研究 [J]. 植物病理学报, 1955, 1(2): 191—202.

7 朱振东, 李怡林, 戴法超, 等. 大豆紫斑病菌在培养条件下分生孢子产生的初步研究 [J]. 植物病理学报, 1998, 28(2): 144.

8 Schuh W. Effect of pod development stage, temperature and pod wetness duration on the incidence of purple seed stain of soybeans [J]. Phytopathology, 1992, 82(4): 446—451.

9 Oh J H, Kwon S H. Evaluation of native soybean collection for resistance to purple blotch. Korean [J]. Journal of Plant Protection, 1981, 20(3): 131—134.

10 Orth C E, Schuh W. Resistance of 17 soybean cultivars to foliar, latent, and seed infection by *Cercospora kikuchii* [J]. Plant disease, 1994, 78(7): 661—664.

METHOD OF IDENTIFYING RESISTANCE TO PURPLE SEED STAIN
(*CERCOSPORA KIKUCHII*) OF SOYBEAN

Zhu Zhendong Li Yilin Qiu Lijuan Li Xianghua Chang Ruzhen Han Chunyu

(*Institute of Crop Germplasm Resources, CAAS, Beijing 100081*)

Abstract Natural incidence of purple seed stain incited by *Cercospora kikuchii* was investigated in 37 soybean cultivars belonging to MG 0—VIII. The results showed that incidence of purple seed stain was affected by weather condition, maturing stage and resistance of soybean cultivars. Late—maturing cultivars appearing resistance to natural infection might be due to disease escape rather than genetic resistance. 45 soybean cultivars were identified for resistance to seed infection by artificial inoculation with *C. kikuchii* in screenhouse in 1998 and in greenhouse in 1999. Significantly resistant difference to purple seed stain among cultivars was discovered in two tests. However, average value of disease index of 45 cultivars for greenhouse test was much lower than that for screenhouse test. In order to accurately evaluate the resistance of soybean to purple seed stain, It was suggested

that the maturing times of cultivars are synchronized by picking off flowers of early-maturing cultivars at the early flowering stage, tag and investigate the inoculated pods. In addition, high susceptible cultivars are need for control. The resistant cultivars must be identified for two or more times.

Key words Soybean; Purple seed stain; Resistance identification

大豆三类优异品质新种质的创建

“大豆三类优异品质新种质的创建”获北京市科技进步三等奖,第一完成单位为中国农业科学院作物育种栽培研究所,主要完成人有丁安林,孙君明,常汝镇,韩粉霞。

“大豆三类优异品质新种质的创建”系“863”大豆优质分子标记及应用课题,属作物遗传育种领域,主要适用于大豆特用品质育种,且创造出的优异种质具有广泛的用途,其中无胰蛋白酶抑制剂的大豆可作为饲料,减低加工能源,提高蛋白利用率;无脂肪氧化酶的大豆可减低豆腥味,改善加工品质;高异黄酮含量的大豆具有抗肿瘤、提高人体免疫力等作用。

种质创新:利用引进的缺失胰蛋白酶抑制剂(SKTI)及缺失脂肪氧化酶(LOX)的近等基因系分别与我国大豆主栽品种杂交,创造出一批特异新种质,培育出优异的新品种(系)。

1. 国内首次转育成功无胰抑制剂(titi)的大豆新种质,填补了我国 1.9 万份大豆种质中无 SKTI 缺失类型的空白;并选育出国内第一个缺失 SKTI 的优质、早熟、高产、抗病的大豆新品种—中豆 28,该品种平均产量 $175.6\text{kg}/667\text{m}^2$,比对照早熟 18 增产 16.4%。

2. 国内首次转育成功无脂肪氧化酶的大豆新种质,培育一批低豆腥味大豆优质新品种,如无 LOX-2 的中黄 18,该品系口尝豆腥味低、矮秆、早熟、抗病、高产,区试表现增产 10%,达显著水平。

3. 国际上首次报道 SKTI 和 LOX 双无的大豆种质的转育成功,并创造出一批 SKTI 和 LOX 双无、多隐性的大豆新品系中作 96-952(ti/lx-2.3)等。

4. 国内首次开展了大豆异黄酮的遗传和育种工作,国际上首次报道了异黄酮的遗传特性,表现为数量性状遗传特点;并培育出高异黄酮含量的大豆新品系—中豆 27,该品系异黄酮含量高、早熟、稳产。

生化标记技术:在建立和改进了 SKTI、LOX 和异黄酮的生化标记检测技术的基础上,首次将生化标记技术与大豆优质育种相结合,准确地进行了大豆品质的隐性性状的跟踪和辅助选择。

应用情况:本项技术已被山东、河北、山西、吉林等省市引用,创造出 SKTI 和 LOX 单/双无新种质 155 份及苗头品系 17 个。无 SKTI 新品种中豆 28 于 1999 年北京市推广面积达 266.7hm^2 ,创经济效益 122.9 万元。此外,该品种因缺失 SKTI,在加工方面可节省资金 22.5 万元,共创社会效益 145.4 万元,应用前景十分广阔。

联系人:孙君明 常汝镇 韩粉霞

地址:北京市白石桥路 30 号 100081

电话、传真:010-68918780(0) 010-68975212(Fax)