

野生大豆种质资源对大豆疫霉根腐病抗性评价

靳立梅¹,徐鹏飞¹,吴俊江²,李文滨¹,邱丽娟³,常汝镇³,陈维元⁴,于安亮¹,王金生¹,南海洋¹,陈晨¹,韩英鹏¹,陈艳秋⁵,丁广洲¹,张淑珍¹

(1. 东北农业大学大豆研究所,国家教育部大豆生物学重点实验室,哈尔滨 150030;2. 黑龙江省农业科学大豆所 哈尔滨 150086;3. 中国农业科学院作物科学研究所,北京 100081;4. 黑龙江省农业科学院绥化所,绥化 152052;5. 辽宁省农业科学院作物所,沈阳 110161)

摘要 由大豆疫霉菌引起的大豆疫霉根腐病是严重影响大豆生产的毁灭性病害之一。防治该病经济有效的方法是抗病育种,而抗性资源筛选又是抗病育种的基础。本研究采用下胚轴伤口接种法,用黑龙江省的大豆疫霉菌的1号优势生理小种对来自全国19个省份的415份野生大豆资源进行了抗性鉴定,表现抗病的有96份,占总鉴定资源的23.1%,表现中抗的资源有152份,占36.6%,表现感病的资源有167份,占40.2%。根据野生大豆的来源分析发现,在我国,抗性野生大豆资源分布较广泛。

关键词 野生大豆种质资源;大豆疫霉根腐病;下胚轴伤口接种法;抗性鉴定

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)03-0300-05

IDENTIFICATION THE RESISTANCE OF WILD SOYBEAN GERMPLASM TO *PHYTOPHTHORA SOJAE*

JIN Li-mei¹,XU Peng-fei¹,WU Jun-jiang²,LI Wen-bin¹,QIU Li-juan³,CHANG Ru-zhen³,CHEN Wei-yuan⁴,YU An-liang¹,WANG Jin-sheng¹,NAN Hai-yang¹,CHEN Chen¹,HANG Ying-peng¹,CHEN Yan-qiu⁵,DING Guang-zhou¹,ZHANG Shu-zhen^{1*}

(1. Soybean Research Institute,Northeast Agricultural University,Harbin Heilongjiang 150030;
2. Soybean Institute,Heilongjiang Province of Agriaultaral Science,Harbin 150086;3. Crop Science Institute,Chinese Academy of Agricultural Sciences,Beijing,100081;4. Suihua Research Institute of Agriculture Sciences Academy of Heilongjiang Province,Suihua 152052;5. Crop Research Institute,Academy of Agricultural Sciences of Liaoning Province,Shenyang 110161)

Abstract Phytophthora root rot caused by *P. sojae* was a destructive disease in soybean production regions all around the world. Utilization of resistant varieties was the most economical and environmentally safe method for controlling the disease. And it was base in fastness resource filtration. 415 wild soybean accessions from 19 province in China were identified for their reaction to race 1 of *P. sojae* from Hei-

收稿日期:2006-12-19

基金项目:973子课题(2004CB117203-4);国家自然科学基金(30400285,30671317);黑龙江省高校骨干教师项目(140022);黑龙江省青年科学基金(QC06C012);科技部国际合作项目(2005DFA30340);黑龙江省农科院博士后基金(LRB06-010)资助;农业部寒地作物生理生态重点开放实验室资助

作者简介:靳立梅(1981-),女,硕士研究生,主要从事大豆抗病遗传育种。

通讯作者:张淑珍,博士。E-mail:dnzhshzh@yahoo.com.cn

longjiang and using the hypocotyls inoculation technique. The results indicated that there were 96 lines resistant to *Phytophthora sojae*, and 152 lines intermediate responded to *P. sojae* and 167 susceptible to *P. sojae*. Their proportion was 23.1%, 36.6% and 40.2% respectively among the tested lines. The results indicated that the distribution of wild soybeans resistant to race 1 of *Phytophthora* was extensive in China.

Key words Wild soybean germplasm; *Phytophthora sojae*; Hypocotyls inoculation technique; Resistance identification

由大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae*) 引起的大豆疫霉根腐病是严重影响大豆生产的毁灭性病害之一^[1]。该病于 1948 年首次在美国的印第安纳州发现, 而后相继在澳大利亚、加拿大、巴西、日本、法国、英国、印度等主要大豆产国都发现了该病^[2~4]。我国由于分离技术上的原因, 直到 1989 年才由沈崇尧和苏彦纯首次分离到该病菌^[5]。1993 年在我国正式报导。迄今, 国外已在 8 个位点发现 15 个具有抗病作用的 *Rps* 基因。由于大豆疫霉菌具有高度的变异性和种植抗病品种造成的选择压力, 大豆疫霉菌种群变异很快, 毒力结构十分复杂^[6~8]。新的生理小种不断出现, 目前国际上已报道了 55 个大豆疫霉菌生理小种^[9,10]。更为严重的是新出现的生理小种具有更强的致病性。为了减轻新生理小种不断出现的压力, 必须不断地拓宽基因资源, 以确保抗病育种进程, 填补栽培大豆品种的单一化所导致大豆品种遗传基础越来越狭窄及单一化带来大豆品种抗性多样性的降低。许修宏^[11]曾对栽培大豆的大豆疫霉根腐病菌生理小种鉴定及抗源筛选做过研究。我国是大豆的起源地, 存在着丰富的野生大豆资源, 现已保存 6700 多份野生大豆种质资源^[12]。霍云龙等^[13]用美国 USAR1 菌株对全国 21 个省份的野生大豆进行抗性的初步筛选。其中主要对来源于河南、山西、陕西、浙江、福建、江苏等六省的野生大豆做了鉴定。由于东北四省是我国大豆的主要产地, 为了扩大研究的范围, 拓宽抗病种质资源, 创造抗病新材料, 用黑龙江大豆疫霉菌 1 号优势生理小种主要对来源于黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古四省区及其他共计 19 个省份的野生大豆进行了抗感性鉴定, 以期获得抗性野生大豆种质资源。

1 材料和方法

1.1 供试材料

野生大豆资源由中国农业科学院作物科学研究所邱丽娟研究员提供。来自全国 19 个省市, 共计 415 份。病原菌接种用菌种为大豆疫霉根腐病 1 号生理小种, 此生理小种为黑龙江省优势小种。

1.2 方法

1.2.1 大豆疫霉根腐病病原菌培养基的制备及菌种的扩繁

1.2.1.1 培养基的制备过程 将新鲜的胡萝卜洗净, 称取 200 g, 切成小块放入植物组织搅碎机中搅成匀浆, 加入 1 000 mL 蒸馏水煮沸 30 min, 过滤除去残渣, 将 20 g 琼脂加入滤液中搅拌融化后, 备用。

1.2.1.2 菌种的扩繁 将培养基和培养皿在一个大气压下灭菌 20 min 后, 放置于超净工作台冷却, 再将 15 mLCA 培养基倒入直径为 10 cm 的已灭菌的培养皿中, 冷却后制成 CA 固体培养基, 然后用接种针将活化的病原菌接种于平皿中央, 倒置于 25 ℃ 温箱中培养 10 d。

1.2.2 植株的培养 野生大豆种子先机械微破种皮, 促进种子萌发, 每个材料分别取 6 粒种子播种于掺入草炭土的直径为 8 cm 的盆钵中, 待对生真叶展开后, 用大豆疫霉根腐病病原菌 1 号生理小种对其进行接种。3 次重复。

1.3 接种方法及抗性评价

国际上常用的接种方法有菌悬液灌根法^[14]、下胚轴创伤接种法^[15]和下胚轴伤口接种法^[16]。虽然野生大豆的茎比较细, 但是木质部较坚硬, 仍然可以采用下胚轴伤口接种法。在野生大豆长出三初复叶后, 用消毒后的刀片在野生大豆子叶节下约 1 cm 处划一伤口, 伤口深度不超过野生大豆茎粗的三分之一, 取扩繁后的带有培养基的病原菌菌丝体切成 3 mm 的方块嵌入伤口中, 接种后在苗的上部罩上塑料膜, 向膜内浇水, 保持膜内相对湿度在 90% 以上, 在 22 ℃ ~ 30 ℃ 下培养 5 d, 接种后 7 d 进行病情调查。野生大豆和栽培大豆对大豆疫霉菌的反应共分为 3 种类型: 70% 或以上的植株死亡为感病 (S),

30% 或以下植株死亡为抗病 (R), 死亡植株率在
30% ~ 70% 的品种为中间类型 (I)。

2 结果与分析

2.1 野生大豆资源的抗性

接种发病,3 d 后感病植株的叶片发黄,茎部褐变,在伤口处出现水渍状病斑。在 5 d 之后感病植株下部叶片黄色加深,上部叶片褪绿,萎蔫,脱落,并从接种部位的上方 1 cm 处折断,倒伏,腐烂,死亡。抗病植株无变化或接种部位局部变褐色或棕褐色,病斑不扩展,植株继续正常生长。见图 1、2。

通过苗期接种黑龙江省的大豆疫霉菌的 1 号优势生理小种共对我国 19 个省的 415 份野生大豆资源进行了抗感性鉴定。其来源和数量及对病原菌抗感反应见表 1 及图 3。415 份资源对大豆疫霉菌的反应统计结果,表现抗病的资源植株有 96 份,占鉴定资源总数的 23.1%,表现中间反应类型的有 152 份,占鉴定资源总数的 36.6%,表现感病的植株有 167 份,占鉴定资源总数的 40.2%。

表 1 不同来源野生大豆资源对大豆疫霉菌的反应

Table 1 Reaction of *G. soja* accessions from different provinces to *P. sojae*

省份 Province	数量 Number	对疫霉菌的反应 Reaction to <i>Phytophthora sojae</i>		
		R	I	S
辽宁 Liaoning	87	18	34	35
黑龙江 Heilongjiang	54	17	19	18
内蒙古 Immer Mongolia	8	3	1	4
吉林 Jilin	54	9	18	27
山西 Shanxi	37	8	8	21
湖北 Hubei	10	1	5	4
河南 Henan	10	4	2	4
陕西 Shanxi	44	12	16	16
江苏 Jiangsu	12	1	6	5
四川 Sichuan	8	4	3	1
浙江 Zhejiang	17	6	6	5
湖南 Hunan	15	4	4	7
山东 Shandong	5	1	3	1
甘肃 Gansu	11	1	4	6
江西 Jiangxi	19	4	9	6
河北 Hebei	6	0	3	3
贵州 Guizhou	12	3	6	3
安徽 Anhui	5	0	4	1
云南 Yunnan	1	0	1	0
合计 Total	415	96(23.1%)	152(36.6%)	167(40.2%)

注:R = 抗病,I = 中间类型,S = 感病
Notation:R = Resistant,I = Intermediate,S = Susceptible

2.2 抗性野生大豆资源的分布

被鉴定的野生大豆资源来源于我国 19 个省市,结果在辽宁、黑龙江、内蒙古、吉林、山西、湖北、河南、陕西、江苏、四川、浙江、湖南、山东、甘肃、江西、贵州 16 个省资源中发现有抗大豆疫霉根腐病野生大豆资源,其中来源于四川的野生大豆资源抗性比例最高。在鉴定的 8 份四川资源中有 4 份表现为抗病反应,占 50%。其次抗性资源比例较高省份依次是河南(40%)、内蒙古(37.5%)、浙江(35.3%)、黑龙江(31.5%)、陕西(27.3%)、湖南(26.7%)、贵州(25%)、山西(21.6%)、江西(21.1%)、辽宁(20.7%)、山东(20%)比例都在 20% 以上。抗性资源比例较低的省份依次是吉林(16.7%)、湖北(10%)、甘肃(9.1%)、江苏(8.3%)、河北、安徽、云南(0%),都在 20% 以下。

图 1 野生大豆接种 1 d 后

Fig. 1 Wild soybean inoculation after one day

图 2 野生大豆接种 3 d 后病状

Fig. 2 The symptom of wild soybean inoculation after three days

注:1 辽宁 2 黑龙江 3 内蒙古 4 吉林 5 山西 6 湖北 7 河南 8 陕西 9 江苏 10 四川
11 浙江 12 湖南 13 山东 14 甘肃 15 江西 16 河北 17 贵州 18 安徽 19 云南

Note:1 Liaoning 2 Heilongjiang 3 Inner Mongolia 4 Jilin 5 Shanxi 6 Hunan 7 Henan 8 Shanxi 9 Jiangxi
10 Sichuan 11 Zhejiang 12 Hunan 13 Shandong 14 Gansu 15 Jiangxi 16 Hebei 17 Guizhou
18 Anhui 19 Yunnan

图3 19省野生大豆资源对大豆疫霉病的抗感性鉴定

Fig.3 Percentage of *G. soja* germplasm with resistance to *P. sojae* in 19 provinces in China

3 结论

在来源于全国 19 个省市的 415 份野生大豆资源中,共鉴定出抗病的资源 96 份,主要分布在辽宁、黑龙江、内蒙古、吉林、山西、湖北、河南、陕西、江苏、四川、浙江、湖南、山东、甘肃、江西、贵州 16 个省,占鉴定资源总数的 23.1%;中间反应类型的有 152 份,占鉴定资源总数的 36.6%;感病的植株有 167 份,占鉴定资源总数的 40.2%。

4 讨论

4.1 接种方法的探讨

野生大豆的茎比较细,曾参照了霍云龙等的茎注射方法进行接种^[13],该方法由于菌丝体难溶,不能和培养基混合均匀,无法吸入注射器中,接种未能成功。还采用疫霉菌游动孢子的方法,此方法的弊端是游动孢子获得较困难,孢子量需要镜检,且不容易控制,以致所接种的植株接种孢子量的大小不确定,很难鉴定资源是抗病还是感病。最终采用了鉴定大豆疫霉病抗性简便有效的方法,即苗期下胚轴伤口接种方法,虽然野生大豆的茎要比栽培大豆细

很多,但是它有一个优点是木质部比较坚硬,仍然可以使用原始的接种方法。实验证明该方法是可行的,并且得到很好的效果。采用该方法在野生大豆种质资源鉴定时要注意如下几点:第一,野生大豆的种皮比较坚硬,不易吸水,要用刀片将种皮划破,有利于出土。播种时要在土壤中掺入草炭土,草炭土与土的比例为 1:3,并且土壤颗粒要求细小均匀,覆土要薄,土质要细腻,保证出苗率;第二,接种后必须保证在 100% 的条件下保湿,发病温度控制在 26℃~28℃;第三,对所鉴定的材料一定设置重复,保证鉴定的准确性。

4.2 资源的进一步拓宽

为了保证大豆抗病育种的需求,必须不断鉴定新的抗原。由于栽培大豆资源有限,遗传基础狭窄,从野生大豆资源中发掘大豆疫霉根腐病抗病资源是一条有效途径^[13]。本研究鉴定了来源于我国 19 个省的 415 份野生大豆资源对大豆疫霉菌 1 号优势生理小种的抗性,其中有 16 个省发现有大豆疫霉根腐病的抗性资源,占总鉴定资源的 23.1%,来源于四川的野生大豆中抗性资源所占比例最高,但总的来说抗性野生大豆资源在我国分布较广泛。其中来源于河北、安徽、云南三省野生大豆资源中没有发现抗性资源。由于本研究对上述三省野生大豆采集数量

有限,有些地区可能存在抗病的野生大豆资源,以后还要进一步加大筛选力度,进一步发掘新的抗病资源。

参 考 文 献

[1] Schmitthenner A F. Problems and Progress in Control of *Phytophthora* Root Rot of soybean[J]. Plant Disease, 1985, 69(4):362-368.

[2] Hidebrand A A. root and stalk rot caused by *P. me. var. sojae*[J]. Canada Journal Boany, 1959, 37:927-957.

[3] Hilty J W. Phytopathogenic and cultural variability of single zoospore isolates of *P. me. Var. sojae*[J]. Phytopathology, 1962, 52: 859-862.

[4] Jee Hyeongjin. Occurance of *Phytophthora* root rot on soybean (*Glycine max*) and indentification of the causal fungus. RAD [J]. Journal of Crop Protection, 1998, 40(1):16-22.

[5] 沈崇尧, 苏彦纯. 中国大豆疫霉菌的发现及初步研究[J]. 植物病理学报, 1991, 21(3):298.

[6] Zhu Z D, Wang H B, Wang X M, et al. Distribution and virulence diversity of *Phytophthora sojae* in China [J]. Agriculture Science in China, 2004, 3:116-123.

[7] Ryley M J, Obst N R, Irwin J A G, et al. Changes in the racial

composition of *Phytophthora sojae* in Australia between 1979 and 1996[J]. Plant Disease, 1998, 82:1048-1054.

[8] Schmitthenner A F, Hobe M, Bhat R G. *Phytophthora sojae* races in Ohio over a 10-year period[J]. Plant Disease, 1994, 78:269-276.

[9] Morgan F. L. New Physiologic race of *Phytophthora megasperma* Var. *soje*[J]. Phytopatology, 1965, 55:1277-1279.

[10] Leiz R. A., Harman G. L. Races of *Phytophthora sojae* on Soybean in Illinois[J]. Plant Disease, 2000, 84:487.

[11] 许修宏, 吕慧颖, 杨庆凯, 等. 大豆疫霉根腐病抗源筛选[J]. 大豆科学, 1999, 18(2):147-150.

[12] 庄炳昌. 中国野生大豆研究二十年[J]. 吉林农业科学, 1999, 24(5):3-10.

[13] 霍云龙, 朱振东, 李向华, 等. 抗大豆疫霉根腐病野生大豆资源的初步筛选[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(2):182-185.

[14] 苏彦纯, 沈崇尧. 大豆疫霉根腐菌在中国的发现及其生物学特性的研究[J]. 植物病理学报, 1993, 23(4):341-346.

[15] 朱振东, 王晓鸣, 常汝镇, 等. 黑龙江省大豆疫霉菌生理小种鉴定及大豆种质的抗性评价[J]. 中国农业科学, 2000, 33(1):62-67.

[16] Yang X B. Races of *Phytophthora sojae* in Iowa soybean fields[J]. Plant Disease, 1996, 80:1418-1420.

(上接 299 页)

参 考 文 献

[1] 张玉革, 胡绪彬. 基于主成份和聚类分析的大豆品种生物学性状的比较研究[J]. 大豆科学, 2004, 23(3):178-183.

[2] 杨守臻, 李初英, 陈怀珠, 等. 广西春大豆地方品种农艺性状鉴定及聚类分析[J]. 广西农业科学, 2005, 36(1):71-74.

[3] 周述明, 谢林, 林文君. 四川大豆地方品种资源初步研究Ⅲ遗传距离测定及聚类分析[J]. 四川农业大学学报, 1994, 12(1):37-41.

[4] 李向华, 常汝镇. 中国春大豆品种聚类分析及主成份分析[J]. 作物学报, 1998, 24(3):325-335.

[5] 胡立成, 姚远, 李秀兰, 等. 黑龙江省大豆品种聚类分析初探

[J]. 大豆科学, 1991, 10(1):10-16.

[6] 何国浩. 江淮下游地区大豆地方品种资源的若干性状分析[J]. 大豆科学, 1983, 2(4):283-285.

[7] 范濂, 徐国平. 提型杂种小麦几个农艺性状的因子分析[J]. 河南农业大学学报, 1978, 21(1):1-7.

[8] 陈荣江, 王莹. 大豆农艺性状的因子分析及品种的聚类分析[J]. 河南职技师院学报, 1998, 26(2):20-24.

[9] Walton, P. D. Factor analysis of yield in spring wheat. Crop Science, 1972, 12:731-733.

[10] 段会军, 张彩英, 王省芬, 等. 河北省大豆品种主要农艺性状及聚类分析[J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(2):5-9.

[11] 陈霞. 不同生态区域环境对大豆蛋白质、脂肪含量的影响[J]. 大豆科学, 2001, 20(4):280-284.