

大豆叶部病害研究的简易离体叶片培养技术

莫贱友¹, 郭堂勋^{1,3}, Navi S S², 李 讯², 杨小冰²

(1. 广西农业科学院植物保护研究所, 南宁 530007; 2. Department of plant pathology, Iowa State University, Ames, IA 50010; 3. 广西大学农学院, 南宁 530004)

摘要 为寻找简易有效的大豆叶部病害研究方法, 利用大豆离体叶片, 进行了相关试验。试验结果表明, 大豆离体复叶培养 30 d, 新根长达 16.8 ~ 41.2 cm, 平均根长 > 24 cm, 移至营养杯 30 d 后, 叶色及叶片仍保持完好。经离体叶片法和整株法接种大豆锈病病原菌后, 不同品种和不同菌株表达出不同的病斑反应型; 接种大豆白粉病病原菌, 也同样表达出在不同品种和不同接种浓度条件下, 大豆白粉病发生程度不同; 两种接种方试验结果一致。本方法试验条件可控、易控, 省时, 省空间, 因此可考虑应用于大豆叶部病害研究的各种试验。

关键词 大豆; 离体叶片; 再生根; 大豆锈病 [*Phakopsora pachyrhizi*]; 大豆白粉病 [*Microsphaera diffusa*]; 感病性

中图分类号 S435.651 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2007)05-0740-04

A SIMPLE DETACHED LEAF CULTURE TECHNIQUE FOR STUDY OF SOYBEAN FOLIAR DISEASE

MO Jian-you¹, GUO Tang-xun^{1,3}, Navi S S², LI Xun², YANG Xiao-bing²

(1. Plant Protection Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007; 2. Department of plant pathology, Iowa State University, Ames, Iowa 50010, USA; 3. Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530004)

Abstract Detached leaves were used to find a simple and reliable method for studying the foliar diseases of soybean. The result showed the root generated from soybean detached leaf as long as 16.8 ~ 41.2 cm (with mean length of more than 24 cm) after culturing for 30 days, and remained green for additional 30 days in a pot with soil. It demonstrated that detached leaves produced identical or similar responses to leaves from the whole plants when inoculated with two fungal pathogens soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) and soybean powdery mildew (*Microsphaera diffusa*). This method could be applied for other foliar diseases study of soybean with easier controlled experiment condition and without more time and space.

Key words Soybean; Detach leaf; Root regeneration; Soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.); Soybean powdery mildew (*Microsphaera diffusa*); Susceptibility

收稿日期: 2007-04-02

基金项目: 国家杰出青年科学基金“植物病害系统演变及长期动态”项目(30328018)提供部分资助

作者简介: 莫贱友(1962-), 男, 副研究员, 主要从事植物病害研究, E-mail: mojianyou@sina.com

为害大豆叶部的病害有很多,例如,大豆锈病(*Phakopsora pachyrhizi* Syd.),大豆灰斑病(*Cercospra sojina* Hara),大豆白粉病(*Microsphaera diffusa*),大豆霜霉病(*Peronospora manshurica*),大豆细菌性角斑病(*Pseudomonas savastanoi pv. glycinea*)和褐斑病(*Septoria glycines*)等,在进行这些病害研究时,通常是用整株进行,工作量和占用空间都较大^[1~6],也较为麻烦。作者在研究大豆锈病的过程中,发现大豆复叶有很强的再生能力,而且离体叶片完全可以用简易的方法进行离体培养,存活时间也较长^[1,2],可考虑应用于大豆叶部病害病原菌单孢分离与纯化(如大豆锈病和白粉病)、保存与繁殖、病原菌生理小种和品种抗病性的测定、评估与鉴定,以及用于各种叶部病害的侵入、发生与扩展等各方面的研究,为此应用于相关试验,验证其可行性。

1 材料与方法

试验所用离体叶片采自播种后 15~20 d,3~5 片真叶期植株,取第一或二片真叶,或者是未开花大豆植株的倒数第二片叶,每次试验所用大豆离体叶片,均采自同一批大豆植株相同叶位的叶片,取复叶时,用锋利刀片或剪刀沿主茎与复叶叶柄间切断,置于 15~20 cm 的培养皿内,然后放置在恒温(24℃~

26℃)、光照(2500~3000 Lx)条件下,待用。

1.1 大豆离体复叶再生根特性与持久性

品种:桂早 1 号和柳豆 1 号,分海绵保湿和浅水(叶柄接触水 0.2~0.5 cm)保湿两种处理方法,每处理重复 3 次,共 27 张大豆离体复叶,测量离体叶片在恒温(24~26℃)、光照(2500~3000 Lx)条件下 10、18、25、30 d 长根情况;30 d 后,将长根的离体叶片,种植到营养杯中,移至室外(15~28℃),盖膜保湿 24 h,然后观察至叶片开始变黄色为止。

1.2 大豆锈病病原菌株致病性和品种感病性研究

供试大豆寄主品种:TN4、TK5、Ankur、PI459025、PI230971、PI200492 和猴子毛(7 个品种由中国农科院油料所提供)、SRE-B-15B(由亚洲蔬菜研究发展中心泰国分中心提供)、柳豆 1 号(由柳州地区农科所提供)、雁青×布雷梅(由福建三明市农科所提供)共 10 个。SRE-B-15B 和柳豆 1 号在本所锈病圃种植 2 年,表现为中等抗病,而雁青×布雷梅表现为高度感病。

供试菌种:分别采自桂林、柳州和南宁田间秋大豆锈病病叶,分别采用单孢分离法,用感病品种(雁青×布雷梅)离体叶片,经 2~3 次单孢分离,获得以下 6 个菌株(如下表 1),并繁殖。

表 1 菌株来源及编号
Table 1 Origin and number of *Phakopsora pachyrhizi* isolates

菌株来源	菌株编号 <i>Phakopsora pachyrhizi</i> isolates No.					
Origin	1	2	3	4	5	6
品种	阳朔小毛豆	阳朔黄豆	柳豆 1 号	小粒六月黄	桂豆 1 号	平果豆
Variety	Yangsuo Xiaomaodou	Yangsuo Huangdou	Liudou 1	Xiaoliliuyuehuang	Guidou 1	Pingguodou
地点	桂林	桂林	柳州	柳州	南宁大豆锈病圃	
Location	Guilin	Guilin	Liuzhou	Liuzhou	Soybean rust nursery in Nanning	

分别从繁殖寄主叶片上取各菌株新鲜夏孢子,配成浓度为 0.1% 的夏孢子悬浮液(每 10 mL 液加 1 滴 Towne80),待 1 h 后孢子发芽率达 25%~40% 时,待试验时用^[1]。

盆栽接种:将 10 个寄主品种按顺序分别播于在规格为 60 cm×25 cm×13 cm 的塑料盆内。出苗后每个寄主品种定苗 5 株。植株长至第 4~5 张真叶完全展开时,按菌株编号,分别用微型喷雾器将夏孢子悬浮液均匀地喷在鉴别寄主叶片上,然后用塑料薄膜罩盆保湿,移于恒温暗房(24±1℃)内培养 24 h 后,移出室外放置,室外温度 17~28℃。

离体叶片接种:在隔离网室种植以上 10 个寄主品种,分别采各寄主品种无病复叶 6 张,置于直径为 15 cm 的培养皿内,用上述相同浓度的各菌株夏孢子悬浮液分别喷于各寄主品种离体叶片的叶背,保湿、恒温(24±1℃)暗培养 24 h 后,置于室内 20~26℃、光照(2500~3000 Lx)条件下培养。

于接种后 10 d 和 15 d,调查各菌株在各寄主品种整株和离体叶片上的病斑反应型和孢子堆密度。病斑反应型按中国农科院油料所制定的统一标准来区分^[1]。

O(反应型):无症状;R—BR(过敏型):叶片上

出现针尖大小黑点,不产生孢子堆;R—N(枯斑型):红色或紫色枯斑,叶表现出红色素,14~20 d后形成少数孢子堆,少数孢子堆散出或仍未见产生孢子;S—L(局限型):产生黑色局限型病斑,孢子堆破裂,产生大量孢子,叶较绿;S—S(扩散型):1周后,开始形成孢子堆且破裂,病斑为扩散型,叶片孢子堆密布,叶片很快发黄。

1.3 大豆白粉病发生情况研究

供试菌种:采自美国依阿华州立大学植病系玻璃温室内大豆白粉病病症明显病株,经室内鉴定为大豆白粉病病原菌(*Microspheara diffusa*)。

供试寄主品种3个:Latham 2485, Pioneer 93M42 和 Pioneer 93M40RR,种于玻璃温室,播种后20 d(3叶株龄),每个品种接3个浓度,分别为 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 ,各配50 mL,每个品种和每个接菌浓度分别取4张离体复叶,以培养皿保湿,用微型喷雾器分别取以上3个浓度孢子悬浮液喷叶片1 s;另每个品种每个浓度接4株,用塑料薄膜罩盆保湿24 h后揭开,做整株接种对照;各处理均设空白对照,接种后均置于温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$,光强: $5.48 \text{ J s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ (用美国 Solar Light Company 公司生产的 photometer/radiometer model PMA2100 version 1.19 光强仪测)下观察。15 d后,调查记录各处理叶片病斑发生数量,整株法接种的处理只调查所接种的第一片真叶。

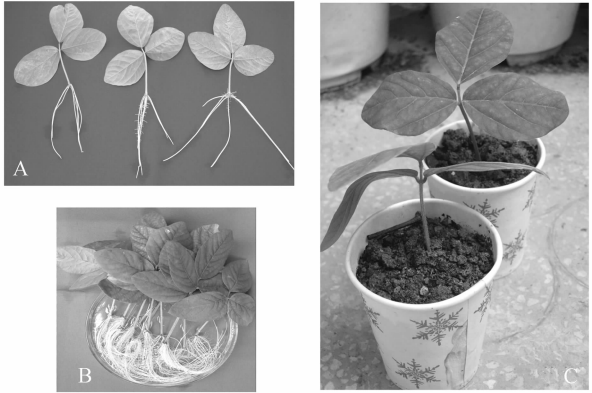
2 结果与分析

2.1 大豆复叶长根再生力与持久性

试验调查表明,在培养皿内,离体叶片保持正常状态可达30 d以上(图1B),根长达16.8~41.2 cm,平均根长>24 cm(表2);品种间长根长度差异不明显,在两种保湿条件下,长根长度差异也不明显;30 d后,长根的离体叶片移种到营养杯中,经观察,叶片能保持完好,叶色浓绿仍可持续达30 d以上(图1C)。

2.2 大豆锈病病原菌株致病性和品种感病性

调查结果表明,整株和离体叶片的病斑反应型一致(表3),6个菌株可初步划分为4个生理小种,在10个品种和材料中,PI 459025, PI 230971, PI 200492 和柳豆1号抗锈病能力较强。



A:15 d 的离体叶片;B:30 d 的离体叶片;C:营养杯中 30 d 的离体叶片

A:15 days detached leaf; B:30 days detached leaf; C: detached leaf growing in a pot for additional 30 days

图1 大豆离体叶片生根过程

Fig.1 Root regeneration of detached leaf

表2 大豆复叶再生根情况

Table 2 Root regeneration of detached leaf

离体时间 Detached leaf/days	海绵保湿 Water in sponge		浅水保湿 Shallow water	
	根长幅度 Range of root length/cm	平均值 Mean root length/cm	根长幅度 Range of root length/cm	平均值 Mean root length/cm
10	0.3~4.3	2.16	0.5~5.3	2.83
18	4.6~14.4	9.43	8.4~26.9	13.78
25	11.2~41.0	23.17	15.0~40.3	22.32
30	21.7~28.9	24.77	16.8~41.2	24.84

表3 不同品种接种不同菌株病斑反应型

Table 3 The disease-reaction type of soybean host and different strains of *Phakopsora pachyrhizi*

品种/材料 Hosts	菌 株 <i>Phakopsora pachyrhizi</i> isolates					
	1	2	3	4	5	6
Ankur	S-L	S-L	S-S	S-L	S-L	S-L
T K5	S-L	S-S	S-S	S-L	S-S	S-L
T N4	S-L	S-L	S-S	S-L	S-L	S-L
P I 459025	R-N	R-N	R-N	R-N	R-N	S-L
P I 230971	R-N	R-N	S-L	R-BR	S-L	S-L
P I 200492	R-BR	R-BR	S-L	S-L	S-L	R-BR
猴子毛 Houzima	S-L	S-L	S-S	S-L	S-L	S-L
柳豆1号 Liudou 1	R-N	R-N	R-N	R-N	R-N	S-L
SRE-B-15B	S-L	S-L	S-L	S-L	S-L	R-N
雁青×布雷梅 Yanqing×Buleimei	S-S	S-S	S-S	S-S	S-S	S-S
生理小种划分 Races	IV	IV	II	III	II	I

2.3 大豆白粉病发生结果

试验在美国依阿华州立大学植病系 Dr. X B Yang 实验室完成;结果表明(图 2,3),离体叶片法和整株法接种大豆白粉病,不论是在不同品种上和在不同接菌浓度条件下,病害发生程度都极为相近;在 3 个品种中,以 Pioneer 93M42 最感白粉病;在不同接菌浓度条件下,接菌浓度为 1×10^5 的处理白粉病发生最严重,与 1×10^4 和 1×10^3 两个浓度差异明显。

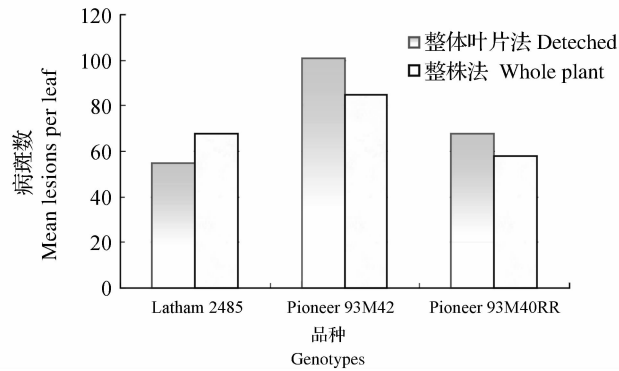


图 2 两种方法接种大豆白粉病比较(3 个品种)

Fig 2 Comparison of two methods in soybean powdery mildew (three genotype)

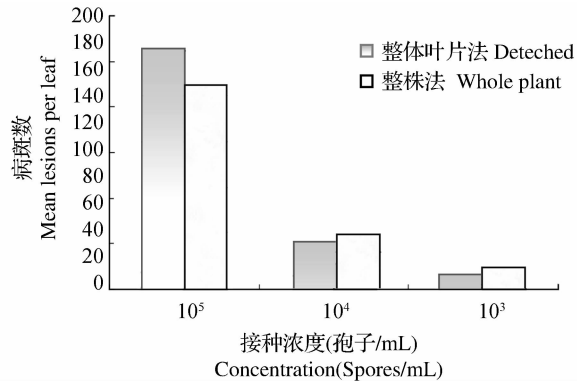


图 3 两种方法接种大豆白粉病比较(不同接种浓度)

Fig. 3 Comparison of two methods in soybean powdery mildew (Different inoculation concentration)

3 讨论

3.1 试验结果表明,大豆离体复叶再生根能力很

强、长根较长,可保持叶片绿色时间也长,其再生根特性和持久性,非常方便进行各种大豆叶部病害试验研究。

3.2 本离体叶片方法进行大豆锈病试验表明,不同菌株在同一品种上的症状表现有差异,不同品种对同一菌株病症表现也有差异,并且与盆栽整株的表现一致;不同品种的大豆离体叶片在接种不同浓度的大豆白粉病原菌后,也能表现出明显不同的病害发生程度。说明本方法可用于大豆多种叶部病害病原菌生理小种和品种感病性方面的测定、评估和鉴定,既可用于研究各种叶部病害的侵入、发生与发展等过程,也可应用于大豆叶部病害(如大豆锈病和白粉病)病原菌单孢菌株纯化、保存与扩增繁殖。

3.3 相对于用整株进行相关试验,本离体叶片法既简易方便,又可靠,不需加任何营养液或激素成份,试验占用空间小,既可提前又可集中大量地进行相关试验,试验所需的光、温、湿等其它条件可控,易控,可缩短病原菌生理小种和品种感病性鉴定时长。

3.4 各大豆品种或材料离体叶片再生根能力强弱差异,有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 谈宇俊,孙永亮. 大豆锈病病原菌生理小种的初步研究[J]. 大豆科学,1989,1:71 - 74.

[2] 谈宇俊,孙永亮. 大豆锈病的鉴定技术[J]. 中国油料,1989, 1:65 - 67.

[3] Bromfield K R. Soybean Rust [C]. Monograph 11. The American Phytopathological Society, St. Paul, M N, 1984.

[4] Burdon J J, Marshall D R. Evaluation of Australian native species of Glycine for resistance to soybean rust [J]. Plant Disease, 1981, 65:44 - 45.

[5] Herath, I H M H B, Stoddard, F L, Marshall, D R. Evaluating faba beans for rust resistance using detached leaves [J]. Euphytica. 2001, 117:47 - 57.

[6] Potential of detached soybean leaves for evaluation of rust resistance [C]. (Abst.) Poster presented at Molecular and Cellular Biology of the Soybean Conference in Lincoln, Nebraska, August 5 - 8, 2006.