

大豆菌核病鉴定方法比较及分析

孙明明¹, 韩英鹏¹, 陈浩², 滕卫丽¹, 李文滨¹

(1. 东北农业大学大豆研究所/教育部大豆生物学重点实验室, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院经济作物研究所, 哈尔滨 150086)

摘要 大豆菌核病鉴定方法对于大豆菌核病的研究至关重要, 本文比较了子叶接种、离体茎段接种、离体叶片接种和离体茎的草酸反应4种大豆菌核病鉴定方法。结果表明: 利用子叶接种法接种5 d后所有植株的子叶全部干枯皱缩, 10 d后敏感品种合丰25植株开始萎蔫变黄, 接种部位周围开始出现白色菌丝; 15 d后植株布满白色菌丝; 20 d后发病植株开始死亡; 而耐性品种 MAPLE ARROW 出现这些症状的时期较晚, 死亡率也较低。离体茎段接种法和离体叶片接种法, 基本上体现了大豆菌核病的主要致病特征。在离体茎的草酸接种中, 合丰25和 MAPLE ARROW 对草酸的敏感度明显不同, 且受害程度有明显差别, 是一种方便快捷而且准确性较高的鉴定方法, 对于大量种质资源筛选有着重要意义。

关键词 大豆菌核病; 鉴定方法; 比较; 分析

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)05-0728-04

COMPARISONS AND ANALYSES ON THE METHODS OF EVALUATING TOLERANCE TO SOYBEAN WHITE MOULD

SUN Ming-ming¹, HAN Ying-peng¹, CHEN Hao², TENG Wei-li¹, LI Wen-bin¹

(1. Soybean Research Institute /Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Education Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Industrial Crops Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract The methods of evaluating tolerance of soybean cultivars to soybean white mould are very important for selection of soybean variety with white mould resistance. Four methods including mycelia inoculation of cotyledons, stems, detached leaf assays and response to oxalic acid were discussed. The results showed that after 5 days inoculating in cotyledons, all of the cotyledons became kraurotic; susceptible cultivar Hefeng 25 became blasted and yellow, and white mycelia appeared in inoculation part 10 days later; all plants with white mycelia 15 days later; all plants with white mycelia died 20 days later. However, the above symptoms appeared later in tolerant cultivar MAPLE ARROW and mortality was low. Mycelia inoculation of stems and detached leaf assays basically showed the main processes and characters of soybean white mould, which were effective methods to simulate field disease processes. The results of response to

收稿日期: 2007-05-28

基金项目: 863项目“大豆优质、高产、多抗聚合育种研究”(2006AA10Z1F1)

作者简介: 孙明明(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向大豆生物技术、大豆抗病育种。

通讯作者: 李文滨, 教授, 博士生导师。E-mail: wenbinli@yahoo.com

oxalic acid showed significant differences between Hefeng 25 and MAPLE ARROW, it was a convenient and high veracity method for screening of mass germplasm resources of soybean.

Key words Soybean white mold; Evaluating methods; Comparison; Analysis

大豆菌核病 (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary stem rot) 是由子囊菌亚门的真菌侵染引起的真菌性病害, 该真菌以菌核形式在土壤、病株残体或混在种子里越冬, 第二年在适宜的环境里产生子囊盘和子囊孢子引发大豆菌核病。大豆花期到成熟期, 如有连续阴雨天气就有流行暴发的可能, 造成茎基部腐烂, 使整株枯萎, 由于发病率就是损失率, 因此田间一旦发病就会造成很大的损失。大豆菌核病在流行年份减产 20% ~ 30%, 严重地块减产达 50% ~ 90%, 甚至绝产^[1]。

大豆菌核病危害地区广泛, 尤其以黑龙江、内蒙古危害较重。1986 和 1987 年黑龙江省连续两年大发生, 发病面积分别为 14 167 万 hm^2 和 37 133 万 hm^2 , 仅 1987 年黑龙江省因菌核病大豆减产就达 11 029 亿 kg。近几年, 由于向日葵种植面积的加大和大豆重迎茬日趋严重, 菌核病的发生又有逐渐加重的趋势。目前传统防治措施主要依赖于化学防治方法, 但化学药剂带来的环境污染也越来越引起人们的重视。生物制剂对该病虽有一定控制效果, 但目前在生产上应用较少^[2]。

目前, 防治大豆菌核病的最有效方法是培育抗病品种, Boland、Chun、Cline、Grau 等^[3~7] 人研究了不同大豆材料对菌核病菌的抗性差异, 为开展大豆抗源筛选及抗菌核病育种工作提供了依据。目前国内对大豆菌核病研究尚处于初级阶段。研究大豆种质资源对菌核病的抗性鉴定技术, 尤其是简单有效、适合大规模筛选大豆种质资源的抗性鉴定方法, 是开展抗大豆菌核病育种工作的基础。

为了获得简单有效的大豆菌核病抗性鉴定方法, 本研究采用耐病和感病品种, 比较了 4 种不同接种方法的优缺点, 为大豆菌核病抗性品种资源的有效筛选提供依据。

1 材料与方

1.1 病原菌

采自依安县菌核病发病地块的菌种经实验室分离提纯, 保存在 PDA 培养基上 (马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 20 g、蒸馏水 1 000 mL), 每 30 d 扩

繁一次。

1.2 大豆材料

采用品种为合丰 25 和 MAPLE ARROW, 合丰 25 为感病品种, MAPLE ARROW 系加拿大品种, 为世界公认的耐菌核病品种。选用 11 cm \times 14 cm 的塑料营养钵, 放入灭菌土, 除土壤中自身的营养之外不加任何肥料。一个钵中播 5 粒无病种子, 植株长出第一片真叶后, 每钵保留 3 株生长较均一的植株。生长温度 25℃, 光照 12 h。

1.3 试验方法

1.3.1 子叶接种法 生长 14 d 的大豆植株, 在子叶上制造 0.5 cm \times 0.8 cm 左右大小的伤口, 在伤口上放置 PDA 培养基上生长 5 ~ 7 d 的菌碟, 菌丝面向下, 接种后伤口上覆盖凡士林保湿, 接种后的植株放在 20 ~ 22℃ 的温室中培养; 对照除不接菌丝外处理方法与其它植株相同。

1.3.2 离体茎段接种法 将生长 4 周的大豆植株贴地面剪断, 叶片和分枝全部剪掉, 将剪断的茎放在 26 \times 18 \times 16 cm 的塑料盒中, 在盒中平铺 2 cm 厚的蛭石, 蛭石用 500 mL 蒸馏水湿润。将茎段平行于短边放置, 取 PDA 培养基上生长 5 ~ 7 d 的菌碟, 将菌碟先浸在 0.3% 的琼脂中以增强其黏着性, 然后将菌碟放在茎的切口上。盒子表面用塑料薄膜覆盖以保湿, 放在 25 \pm 3℃、12 h 光照环境中处理, 5 d 和 7 d 后统计肉眼可见的茎腐的长度。每个品种 12 个植株, 3 次重复。

1.3.3 离体叶片接种法 选取开花初期到结荚初期植株的顶端第 3 片三重复叶中间的小叶, 叶片首先用 47.5% 的乙醇和 2.6% 的次氯酸钠溶液消毒 5 s, 用接种针在距叶轴 1 ~ 3 mm 处制造 2 mm 直径的伤口, 取 PDA 培养基上生长 5 ~ 7 d 的菌碟, 将菌碟先浸在 0.3% 的琼脂中以增强其黏着性, 然后将菌碟放在叶片的伤口上, 接种后的叶片被放置在放有充分湿润脱脂棉的培养皿中, 培养皿用封口膜封好, 25 \pm 3℃ 温室中培养, 12 h 光照环境中处理 7 d, 每天观察叶片情况。每个品种 12 个植株, 3 次重复。

1.3.4 离体茎的草酸接种法 将开花初期到结荚初期植株在距离地面 0.5 cm 处剪断, 除顶端完全生长的 2 片三重复叶外将茎上的所有分枝和叶片全部剪掉, 将茎立即放在含有 10 mL 浓度为 40 mmol L^{-1} 草酸的试

管中,试管以3次重复完全随机区组设计垂直放在试管架上,4 d后统计和测量茎的褪色长度。

2 结果与分析

2.1 子叶接种法鉴定

接种5 d后所有植株的子叶全部干枯皱缩;

接种10 d后,合丰25有83.3%的植株开始萎蔫变黄,接种部位周围开始出现白色菌丝;而MAPLE ARROW只有33.3%的植株开始萎蔫变黄,其余植株正常生长。接种15 d后,合丰25有83.3%植株生长出白色菌丝;而MAPLE ARROW只有33.3%的植株萎蔫并且出现菌丝。接种20 d后,合丰25有83.3%的植株发病死亡;而MAPLE ARROW只有33.3%的植株发病死亡(表1)。

表1 子叶接种法鉴定结果
Table 1 Result of mycelia inoculation of cotyledons

品 种 Variety	5 d		10 d		15 d		20 d	
	症状 Symptom	子叶发病率 Cotyledon morbidity	症状 Symptom	植株发病率 Plant morbidity	症状 Symptom	植株发病率 Plant morbidity	症状 Symptom	植株发病率 Plant morbidity
合丰25 Hefeng25	子叶干枯 Cotyledon Withered	100%	植株萎蔫 Plant wilted	83.3%	白色菌丝 White mycelia	83.3%	死亡 Died	83.3%
MAPLE ARROW	子叶干枯 Cotyledon Withered	100%	植株萎蔫 Plant wilted	33.3%	白色菌丝 White mycelia	33.3%	死亡 Died	33.3%

2.2 离体茎段接种法鉴定

接种5 d后,合丰25的平均茎腐长度为7.63 cm,而MAPLE ARROW的平均茎腐长度为4.36 cm;7 d后,合丰25的平均茎腐长度为12.32 cm,而MAPLE ARROW的平均茎腐长度为11.31 cm(图1)。t测验表明利用离体茎段接种法能够明显地鉴定出合丰25和MAPLE ARROW之间的差异。

2.3 离体叶片接种法鉴定结果

接种3 d后,合丰25叶片开始腐烂并伴有白色菌丝,而MAPLE ARROW无明显变化;5 d后,合丰25叶片全部布满白色菌丝,而MAPLE ARROW叶片只有部分变褐,其余叶片无明显变化;6 d后,MAPLE ARROW褐腐叶片的面积加大,但仍无菌丝形成(图2)。

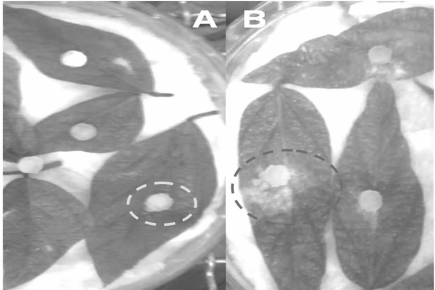


图2 离体叶片接种法鉴定,A:圈中为MAPLE ARROW接种后部分褐腐无明显变化;B:圈中为合丰25接种后叶片腐烂伴有菌丝

Fig. 2 Detached leaf assays after inoculated parts of MAPLE ARROW only became brown in the circle of picture A; Hefeng 25 leaves rotted with mycelium in the circle of picture B

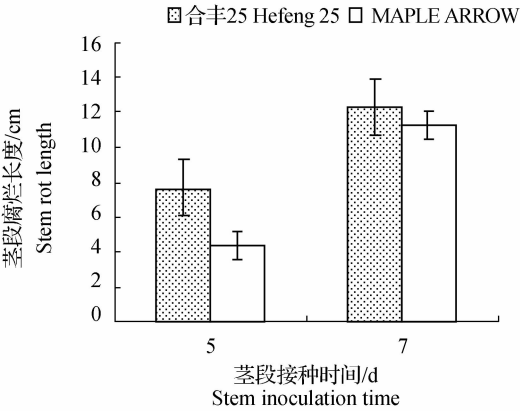


图1 离体茎段接种法鉴定结果
Fig. 1 Result of mycelia inoculation of stems

2.4 离体茎的草酸接种鉴定结果

MAPLE ARROW 在放入草酸中后,草酸马上变为粉红色,合丰 25 无明显变化。t 测验表明利用离体茎的草酸接种鉴定法能够明显地鉴定出合丰 25 和 MAPLE ARROW 之间的差异(图 3)。

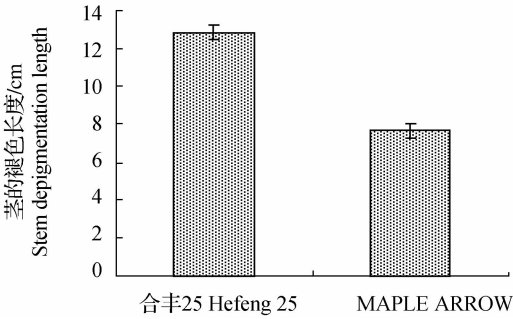


图 3 离体茎的草酸接种鉴定结果

Fig. 3 Result of response to oxalic acid

3 讨论

研究发现用这 4 种接种方法均可将大豆品种对菌核的反应区分开,4 种方法各有优缺点,可以根据需要选择适宜的接种方法。

利用子叶接种法感病品种合丰 25 接种 5 d 后所有植株就表现出发病症状,20 d 植株全部死亡;而耐性品种 MAPLE ARROW 出现症状的时期较晚,死亡率也较低。大豆菌核病菌是一种弱寄生而致病力很强的真菌,只要发病条件适合即可发病,大豆材料的抗性差异将主要表现在感染时间上的快慢。在 20 d 调查,结果表明敏感品种合丰 25 有 83.3% 的植株死亡,而抗性品种 MAPLE ARROW 也有 33.3%,相对其它方法死亡率较高,即使相对于大田条件下该方法的死亡率也偏高,这说明子叶接种法必须严格控制好适宜的发病条件。Cline 等^[6]研究指出,如果接种体在适宜的条件下保持长时间同菜豆品种的接触,将会导致一系列原抗病的品种(系)遭到淘汰。

在大田条件下,以大豆主茎受菌丝侵染危害最重,抗病品种表现为抗扩展能力较强。本研究采用的离体茎段接种法及离体叶片接种法,基本上体现了大豆菌核病的主要致病特征。离体茎段和叶片接种过程中需要注意以下几点:1、叶片和茎的整齐度,茎和叶片比较均一整齐的情况下测量的数据才较准

确;2、菌碟的摆放位置,直接影响菌丝的侵染;3、环境湿度的控制,湿度的高低是控制发病的关键因素。

Wegulo 等^[8]报道抗性品种茎中粉红色色素溶于草酸中的量高于感病品种。大豆菌核病对不同大豆种质资源造成的危害有明显的差异,推测认为这种差异与核盘菌所分泌的毒素—草酸有关。在离体茎的草酸接种中,合丰 25 和 MAPLE ARROW 对草酸的敏感度明显不同,且受害程度有明显差别。Tu 等^[9]通过研究也证实菜豆品种间菌核病的不同严重程度,平行于感病组织内草酸的分布和浓度。吴纯仁^[10]也证实了不同感病程度的油菜中草酸分布和浓度具有明显差异。虽然离体茎的草酸接种法的机理现在还没有明确完整的论证,但是大量试验证明这种接种方法是一种方便快捷而且准确性较高的鉴定方法,对于大量种质资源筛选有着重要意义。

参 考 文 献

[1] 赵丹,许艳丽,李春杰. 大豆菌核病的识别与综合防治[J]. 大豆通报,2006,82(3):15-16.

[2] 程宝军,关洪举,梁桂荣,等. 大豆菌核病生物防治研究[J]. 大豆通报,2006,84(5):29-30.

[3] Boland G J, Likon P, Ellie N, et al. Growthroom evaluation of soybean cultivars for resistance to sclerotinia sclerotiorum[J]. Canadian Journal Plant Disease, 1986, 66: 559-564.

[4] Boland G J, Hall R. Evaluating soybean cultivars for resistance to sclerotinia sclerotiorum under field conditions[J]. Plant Disease, 1987, 71: 934-936.

[5] Chun D, Kao L B, Lockwood J L, et al. Labory and field assessment of resistance in soybean to stem rot caused by sclerotinia sclerotirum[J]. Plant Disease, 1987, 71: 811-815.

[6] Cline M N, Pebor B, Hooddie M, et al. Methods for evaluating soybean cultivars for resistance to sclerotinia sclerotirum[J]. Plant Disease, 1983, 64: 784-786.

[7] Grau C R, Bissonette H L. Whetzelinia stem rot of soybean in Minnesota[J]. Plant Disease, 1974, 58: 693-695.

[8] Wegulo S N, Yang X B, Martinson C A. Soybean cultivar responses to Sclerotinia sclerotirum in field and controlled environment studies[J]. Plant Disease, 1998, 82: 1264-1270.

[9] Tu J C, Clara Triz, Lee M T, et al. Oxalic acid induced cytological alterations differ in beans tolerance or susceptible to white mold[J]. New Phytologist, 1989, 112(4): 519-525.

[10] 吴纯仁,刘后利. 草酸毒素在油菜抗病育种中的应用[J]. 中国农业科学, 1991, 24(4): 41-46.