

国内外大豆菌核病鉴定方法研究现状

张毅瑞^{1,2},滕卫丽¹,李文滨¹

(1. 东北农业大学 大豆研究所,大豆生物学教育部重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150030;2. 黑龙江省种子管理局,黑龙江 哈尔滨 150008)

摘要:研究大豆菌核病的鉴定方法是开展抗菌核病育种的基础,对预测病害的发生、流行均具有重要意义。该文就国内外的大豆菌核病鉴定方法方面的研究进行阐述,并提出目前我国大豆抗菌核病鉴定工作中存在的问题。

关键词:大豆菌核病;鉴定方法

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2010)01-0161-03

Comparison on the Methods of Evaluating Soybean *Sclerotinia sclerotiorum* in China and Foreign Countries

ZHANG Yi-rui^{1,2}, TENG Wei-li¹, LI Wen-bin¹

(1. Soybean Research Institute, Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Education Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang; 2. Seed Management Bureau of Heilongjiang Province, Harbin 150008, Heilongjiang, China)

Abstract: Studying identification method of soybean varieties to *Sclerotinia sclerotiorum* is the basis of its resistant breeding and is of great significance for predicting the occurrence and prevalence of the disease. In the paper, the resistance evaluation methods of soybean to *Sclerotinia sclerotiorum* between China and foreign countries were described, and the problem of evaluation methods to *Sclerotinia sclerotiorum* in China was also prospected.

Key words: Soybean; *Sclerotinia sclerotiorum*; Evaluation method

大豆菌核病发生于我国东北、华东、西南等各大豆产区,尤其在黑龙江省,由于大豆栽培面积不断扩大,使大豆重茬面积占大豆播种面积70%以上,加之油菜、向日葵、马铃薯等经济作物面积不断扩大,加剧了大豆菌核病的发生,发病面积呈上升趋势,在流行年份减产20%~30%,严重地块减产达50%~90%,甚至绝产^[1]。目前生产上种植的大豆品种均有不同程度的感病,因此有必要尽快培育抗菌核病的大豆新品种,而研究大豆抗病性鉴定方法是开展大豆抗菌核病育种的基础工作。国内外学者在抗病性鉴定方法方面积累了一些经验,该文就国内外相关研究结果进行阐述,期望为我国大豆抗病育种工作提供一定指导作用。

1 国内大豆菌核病鉴定方法研究现状

1.1 室内或温室鉴定方法

在我国,大豆菌核病鉴定工作开展较晚,而且大

豆菌核病鉴定工作主要在室内或温室进行。

1994年苗保河^[2]在温室内采用菌核根埋法对东北365份大豆材料进行鉴定,并按照Boland^[3]大豆菌核病抗病性分级和评价标准来评定抗病性。结果抗病品种仅占6.6%,且未发现免疫材料,表明东北三省大部分材料都不抗菌核病,这也是东北地区大豆菌核病发生愈来愈重的主要原因之一。

1992年吴炳芝等^[4]通过盆栽试验对叶柄接种法和茎尖接种法进行比较,发现叶柄接种法明显优于茎尖接种法,并利用叶柄接种法鉴定出免疫品种嫩丰12和高抗品种北丰1号、嫩丰13、14、北呼豆。

1996年矫洪双等^[5]在实验室条件下,在V3期分别采用PDA菌丝块接种大豆离体茎、麦粒菌丝接种大豆离体整株、菌丝悬液喷雾接种大豆整株、菌丝滤液浸大豆根来评价对菌核病的抗性。结果表明,除V3离体叶接种方式外,其它几种接种鉴定方法均能明显区分不同大豆材料的抗感水平。PDA菌

收稿日期:2009-10-08

基金项目:国家高技术研究发展计划资助项目(2006AA100104-4);引进国际先进农业科学技术计划资助项目(2006-G5);黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z07228);黑龙江省教育厅科学技术研究资助项目(11531020);东北农业大学科学研究基金。

第一作者简介:张毅瑞(1979-),女,农艺师,现从事种子质量监督检验工作。E-mail:zhangyirui@hotmail.com。

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

丝块 V3 期离体茎接种和菌丝悬液 V3 期整株接种, 简便易行, 是适于大规模筛选大豆抗源的有效方法, 菌丝滤液 V3 期整株浸根鉴定, 更为直观方便, 在确定稳定的对照品种后, 有望适于大批材料的初选鉴定。

2007 年孙明明等^[6]利用感病品种合丰 25 和加拿大的世界公认耐病品种 Maple Arrow, 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, 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。在草酸浸泡离体茎中, 合丰 25 和 Maple Arrow 对草酸的敏感度明显不同, 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。

2008 年宋淑云等^[7]在温室内通过盆栽方法用菌核根埋法, 对黑龙江省和吉林省生产上主推和即将推广的 103 个大豆品种和品系进行了大豆菌核病的抗性评价, 参考 Boland^[2]的分级标准及矫洪双等^[7]采用的抗性鉴定标准, 鉴定出高抗品种 1 个(吉育 35), 抗病品种 12 个, 中抗品种 17 个, 同时发现高粱粒培养基对菌核萌发产生菌丝具有一定的促进作用。

1.2 田间鉴定方法

我国学者在田间进行大豆种质资源菌核病的抗性研究相对较少。1994 年矫洪双等^[8]在黑龙江省大豆菌核病发生较重的嫩江地区, 依靠 1991 ~ 1993 年自然感病条件, 评价了 800 多份大豆种质资源对菌核病的相对抗性, 结果筛选出 9 份大豆种质材料具有相对稳定的抗性。

2007 年孙玉龙^[9]在黑龙江省拜泉县田间自然发病的条件下, 以发病率为评价标准, 发现不同品种对大豆菌核病的抗性不同, 抗性较强的如垦农 18 等发病率基本在 10% 以内, 抗性中等的品种如合丰 47、合丰 48、黑农 35、黑农 48 等发病率在 10% ~ 30%, 感病品种如东农 44、绥农 14 等发病率在 40% 以上, 但这些品种的抗性机理尚未明确。

鉴于我国大豆菌核病研究工作起步较晚, 目前还没有被所有研究者认可的鉴定方法, 也没有一个公认的对照品种^[2], 采用的抗感等级评价指标也不一致, 因此需要寻找一个适合的品种作为对照, 使鉴定结果更具有可比性, 同时有必要制定或统一大豆菌核病鉴定方法和评价标准。

2 国外大豆菌核病鉴定方法研究现状

2.1 室内鉴定方法

1983 年 Cline 等^[11]在温室内采用 3 种接种方法, 对成熟期组为 II ~ IV 的大豆品种进行了抗菌核病鉴定, 评价级别分为 0, 1, 2, 3, 4, 5 级。结果表明, 其中在 R2 时期喷洒孢子($1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个 \cdot mL^{-1})和在 V4 ~ V5 时期将菌块直接放在植株叶片上 2 种方法, 证明参试品种均高度感病; 限期接种法即在 V4 ~ V5 时期将菌块放在植株节处 24 h, 鉴定出 10 个大豆品种的感病性不同。

2004 年 Aulair 等^[12]利用 4 个分离的菌核病菌株, 通过麦秸接种法对 5 个大豆品种进行抗病性鉴定, 采用 1 ~ 9 的 9 级评分标准。结果表明, 品种间感病程度显著不同, 其中 NK S08-80 感病最轻, 证明来自同一地区的不同菌株鉴定大豆品种的菌核病抗性是一致的。

2005 年 Chen 等^[13]在温室内采用菌液喷洒植株叶片法和菌液滴入主茎的茎尖法, 以叶柄剪切法做对照并以萎蔫扩展曲线下的面积(area under the wilt progress curve, AUWPC)为评价指标, 发现喷洒菌液和滴注菌液法与剪切叶柄法存在显著相关。与剪切叶柄法相比, 喷洒菌液叶片和茎尖滴注菌液法, 尤其是茎尖滴注菌液法成本低、效率高、可靠性强, 适于进行大量种质资源的抗性鉴定。

2.2 田间鉴定方法

1984 年 Grau 等^[14]在 2 个地点的自然发病地块比较了 6 个大豆品种的菌核病抗性, 以发病指数(Disease severity indices, DSI)为评价标准, 结果表明, 其中 Hodgson 和 Corsoyde 较 Wells、SRF - 200、Steele、Asgrow 2656 感病轻, 并证明大豆品种种植在垄距 25 ~ 38 cm 的地块较垄距 76 cm 的地块发病重, 产量低。无论在开花前或开花后进行灌溉都比不灌溉发病重, 如果在 R1 期前减少灌溉可降低发病率并提高产量 10% ~ 22%。

Boland 等^[15]在发病地区 Woodstock 和 Ontario 于 1981 和 1982 年分别鉴定了 23 和 18 个大豆品种, 在发病地区 Arkell 和 Ontario 于 1984 年鉴定了 24 个大豆品种。并发现, 不同大豆品种的抗病性显著不同, Maple Arrow 和 Ace 在 4 个试验点均表现出最强的抗病性。成熟期病害发生率与品种株高、倒伏度、成熟期等性状相关, 同时提出避病是一个防治大豆菌核病的方式。

Kim 等^[16]采用田间小区环境下土壤接种法对 18 个大豆品种菌核病的抗性进行了评价。在春季播种后,将菌核撒于土壤中与 3 cm 表土层均匀混合。从出苗至 R1 期进行喷灌保湿,直至全部植株均开花为止。结果所有植株全部发病,品种间的病情指数差异达到极显著程度。McLaren 等^[17]在田间条件下,采用土壤接种和植株喷洒 2 种方法,证明根据病害发生率对大豆品种进行分级的结果与播期、季节或地点无相关性,但不同品种在不同环境下对病害的反应有明显的差异。采用非线性回归法分析不同品种在不同环境下的病害反应。结果将大豆品种分为 3 类,即与病害潜力线性相关型;在低病害潜力下高感型;在高病害潜力下表现出多种抗性级别的类型。以病害潜力曲线下的面积对不同环境下的大豆品种反应进行定量,但是不能区分不同环境下品种的病害发生时间和病害反应比率。

2.3 室内或温室内与田间鉴定方法的相关性研究

Chun 等^[18]在温室内用离体茎接种法,接种来自成熟期组为 0、I、II 和 III 的 21 个大豆品种,并在自然发病地块鉴定相同的品种,温室内记载病斑长度,田间记载病害程度(1984 年:0,1,2,3 级;1985 年:0,1,2 级),结果表明,2 a 中 13 个品种的田间发病结果与温室内茎腐长度存在显著相关($r=0.72$)。Kim 等^[19]利用 18 个大豆品种,比较了麦粒接种茎、菌丝块接种子叶和离体叶接种等 3 种方法,除菌丝块接种子叶法与田间鉴定不相关外,其它均存在相关性,但在某些品种上也有不一致现象发生,因此提出实验室接种结果需要到田间进行鉴定。其中 NK S19-90 和 Corsoy 在田间试验和实验室接种试验中均表现出最低的病情指数(Disease severity index, DSI),证明最抗品种与最感品种在各种接种法以及田间鉴定中表现都较为一致。Vuong 等^[20]采用茎尖接种法,对大豆植株的主茎顶端通过剪茎制造伤口,在伤口处接入菌丝培养基的柱块,研究在温室内与在田间进行大豆菌核病抗性评价的相关性。结果表明,在温室和田间二者评价结果的相关系数分别为 0.74 和 0.50,表明在温室内接菌比在田间接菌效果好。

3 小结

国外将叶柄剪切法作为大豆菌核病抗性鉴定的标准方法或对照方法,鉴定结果最为准确^[21],而我国尚无统一的鉴定方法和评价指标;国外学者无论在室内或温室条件下还是在田间条件下研究的均较

多,而且二者间的相关性研究也较深入,而我国在田间接种以及在室内或温室内与田间相关研究方面均尚未见报道,同时目前我国大豆主栽品种中高抗材料极少,并缺少明确的对照品种。因此还需要在大豆菌核病的鉴定方面进行深入研究。

参考文献

- [1] 赵丹,许艳丽,李春杰.大豆菌核病的综合防治[J].大豆通报,2006(3):15-16. (Zhao D, Xu Y L, Li C J. Identification and integrated managements for soybean *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Soybean Bulletin, 2006(3):15-16.)
- [2] 苗保河.大豆品种资源抗菌核病鉴定[J].中国油料,1994,16(3):67-68. (Miao B H. Resistance identification to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean [J]. Oil Crops of China, 1994, 16(3):67-68.)
- [3] Boland G J. Growthroom evaluation of soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Plant Science, 1986, 66: 559-564.
- [4] 吴炳芝,李勇,林佩力,等.大豆品种抗菌核病鉴定方法的研究简报[J].大豆科学,1992,11(3):246. (Wu B Z, Li Y, Lin P L, et al. Research notes of the methods of evaluating resistance of soybean varieties to *Sclerotinia rot* under laboratory conditions [J]. Soybean Science, 1992, 11(3):246.)
- [5] 矫洪双,程志明,许修宏,等.大豆对菌核病室内抗性鉴定方法研究[J].大豆科学,1996,15(4):295-301. (Jiao H S, Cheng Z M, Xu X H, et al. Studies on the methods of evaluating varietal resistance of soybean to *Sclerotinia rot* under laboratory conditions [J]. Soybean Science, 1996, 15(4):295-301.)
- [6] 孙明明,韩英鹏,陈浩,等.大豆菌核病鉴定方法比较及分析[J].大豆科学,2007,26(5):728-731. (Sun M M, Han Y P, Chen H, et al. Comparisons and analyses on the methods of evaluating tolerance to soybean white mold [J]. Soybean Science, 2007, 26(5):728-731.)
- [7] 宋淑云,晋齐鸣,张伟,等.大豆菌核病(*Sclerotinia sclerotiorum*)接种技术研究综述[J].吉林农业科学,2008,33(4):26-28. (Song S Y, Jin Q M, Zhang W, et al. A review on studies of inoculation technique to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Journal of Jilin Agricultural Science, 2008, 33(4):26-28.)
- [8] 矫洪双,程志明,许修宏,等.大豆种质资源对菌核病的抗性鉴定研究[J].大豆科学,1994,13(4):349-356. (Jiao H S, Cheng Z M, Xu X H, et al. Studies on evaluation for resistance of soybean germplasm resource to *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB) de bary [J]. Soybean Science, 1994, 13(4):349-356.)
- [9] 宋淑云,张伟,苏前富,等.大豆品种对大豆菌核病的抗性鉴定[J].植物保护科技创新与发展,2008:577-580. (Song S Y, Zhang W, Su Q F, et al. Evaluation for resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Innovation and Development of Plant Protection Science and Technology, 2008:577-580.)

3 结论

通过对 ADS-7 大孔吸附树脂纯化淡豆豉异黄酮的研究,确定该树脂的最佳工艺参数为:上样液浓度 $0.225 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH4.5, 最大上样量 1.125 g 生药 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 树脂,最佳上样流速 $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,先用 5 BV 水洗,再用 8 BV 70% 乙醇 $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱。在此条件下,该树脂的解析率在 77% 以上,产物中异黄酮纯度达 42%。

参考文献

- [1] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 230. (Chinese Pharmacopoeia Committee. China pharmacopoeia version(part one)[M]. Beijing: Chemical Industrial Press, 2005: 230.)
- [2] 王鑫国, 葛喜珍, 白霞, 等. 淡豆豉对去卵巢大鼠脂代谢的影响[J]. 中草药, 2003, 26(9): 652-654. (Wang X G, Ge X Z, Bai X, et al Effects of Semen sojæ preparatum on lipid metabolism in ovariectomized rat [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2003, 26(9): 652-654.)
- [3] 高淑丽, 牛丽颖, 曹秀莲, 等. 淡豆豉提取物抗心肌缺血作用的研究[J]. 河北医药, 2007, 29(9): 923-924. (Gao S L, Niu L Y, Cao X L, et al Protective effect of fermented soybean extraction on myocardial ischemia in mice[J]. Hebei Medical Journal, 2007, 29(9): 923-924.)
- [4] 牛丽颖, 刘娇, 崔力剑, 等. 淡豆豉对早期动脉粥样硬化大鼠血管内皮损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 120-122. (Niu L Y, Liu J, Cui L J, et al Effects and mechanisms of semen sojæ preparatum extracts on rats' injury at the early stage of atherosclerosis[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2007, 23(5): 120-122.)

- [5] 牛丽颖, 田鹏娜, 李清, 等. 淡豆豉水煎液对早期动脉粥样硬化大鼠主动脉平滑肌细胞凋亡的影响[J]. 大豆科学, 2009, 28(1): 156-159. (Niu L Y, Tian P N, Li Q, et al. Effects of Semen Sojæ preparatum on the apoptosis of aortic smooth muscle cells in rats with early stherosclerosis[J]. Soybean Science, 2009, 28(1): 156-159.)
- [6] 牛丽颖, 王鑫国, 葛喜珍, 等. 淡豆豉中降血糖活性成分研究[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(5): 21-22. (Niu L Y, Wang X G, Ge X Z, et al. Study on active components of fermented soybean in reduceing blood glucose[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2004, 20(5): 21-22.)
- [7] 毛俊琴, 李铁军, 黄晓瑾. 淡豆豉异黄酮抗骨质疏松的实验研究[J]. 解放军药理学学报 2006, 22(2): 136-138. (Mao J Q, Li T J, Huang X J. Empirical study on anti-osteoporosis effect of Semen sojæ praeparatum(SSP) [J]. Pharmacy Journal Chinese People's Liberation Army, 2006, 22(2): 136-138.)
- [8] 牛丽颖, 杜红娜, 刘姣, 等. 淡豆豉炮制前后异黄酮组分含量的比较研究[J]. 大豆科学, 2008, 27(4): 672-678. (Niu L Y, Du H N, Liu J, et al. The comparative study on the content of isoflavone in Sojæ preparatum extracts before and after processing[J]. Soybean Science, 2008, 27(4): 672-678.)
- [9] 顾建明, 潘春云. 大豆异黄酮的测定方法及其评价[J]. 上海大学学报(自然科学版), 2007, 13(6): 65-67. (Gu J M, Pan C Y. Analytical approach of soybean isoflavones and its evaluation[J]. Journal of Shanghai University(Natural Science Edition), 2007, 13(6): 65-67.)
- [10] 崔力剑, 黄芸, 杜淑娟, 等. 紫外分光光度法测定淡豆豉中总异黄酮的含量[J]. 河北中医药学报 2004, 19(3): 32-34. (Cui L J, Huang Y, Du S J, et al. Assay isoflavonids content in semen sojæ preparatum with ultraviolet spectrophotometry[J]. Journal of Hebei Traditionnal Chinese Medicine and Pharmacology, 2004, 19(3): 32-34.)

(上接第 163 页)

- [10] 孙玉龙. 拜泉县大豆菌核病大面积发生规律的探讨[J]. 农民致富之友, 2007(5): 16. (Sun Y L. Happen on soybean *Sclerotinia sclerotiorum* on Baiquan county[J]. Peasant Friend, 2007(5): 16.)
- [11] Cline M N, Jacobsen B J. Methods for evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Plant Disease, 1983, 67(7): 784-786.
- [12] Aulair J, Boland G J, Kohn L M, et al. Genetic interactions between *Glycine max* and *Sclerotinia sclerotiorum* using a straw inoculation method[J]. Plant disease, 2004, 88(8): 891-895.
- [13] Chen Y, Wang D. Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Plant Disease, 2005, 89(12): 1268-1272.
- [14] Grau C R, Radke V L. Effects of cultivars and cultural practices on *Sclerotinia* stem rot of soybean[J]. Plant Disease, 1984, 68(1): 56-58.
- [15] Boland G J, Hall R. Evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* under field conditions[J]. Plant Disease, 1987, 71(10): 934-936.

- [16] Kim H S, Sneller C H, Diers B W, et al. Evaluation of soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia* stem rot in field environments [J]. Crop Science, 1999, 39: 64-68.
- [17] McLaren N W, Craven M. Evaluation soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia* stalk rot in South Africa[J]. Crop Protection, 2008, 27: 231-235.
- [18] Chun D, Kao L B, Lockwood J L. Laboratory and field assessment of resistance in soybean to stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Plant Disease, 1987, 71(9): 811-815.
- [19] Kim H S, Hartman G L, Manandhar J B, et al. Reaction of soybean cultivars to *Sclerotinia* stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations[J]. Crop Science, 2000, 40: 665-669.
- [20] Vuong T D, Hoffman D D, Diers B W, et al. Evaluation of soybean, dry bean, and sunflower for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Crop Science, 2004, 44(3): 777-783.
- [21] 董志敏, 王曙明, 刘玉芝, 等. 大豆抗菌核病研究进展[J]. 大豆科学, 2008, 27(6): 1053-1057. (Dong Z M, Wang S M, Liu Y Z, et al. Progress on resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean [J]. Soybean Science, 2008, 27(6): 1053-1057.)