

大豆疫霉根腐病菌的分离鉴定及种质资源对 3 号生理小种的抗性评价

徐鹏飞¹, 吴俊江², 范素杰¹, 陈晨¹, 李宁辉¹, 王金生², 李文滨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, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:采用下胚轴伤口接种法, 用在黑龙江省建三江农场分离到的大豆疫霉菌 3 号生理小种对 292 份栽培大豆材料(其中农家品种 153 份、其它大豆栽培品种 139 份)和 236 份野生大豆材料进行了抗性鉴定。结果表明:栽培大豆资源抗病 80 份, 占 27.4%, 中间类型 93 份, 占 31.8%, 感病 119 份, 占 40.8%。153 份农家品种中, 抗病的有 49 份, 占农家品种的 32.0%, 表明农家大豆品种资源抗性比例较高。野生大豆资源中抗病的有 49 份, 占 20.8%; 中间类型 55 份, 占 23.3%; 感病 132 份, 占 55.9%。鉴定的这些高抗资源可为我国大豆抗疫霉根腐病育种奠定基础。

关键词:大豆种质资源; 大豆疫霉根腐病; 3 号生理小种; 抗性鉴定

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2010)02-0272-04

Isolation of *Phytophthora sojae* and Identification of Resistance to Race 3 in Soybean Germplasm

XU Peng-fei¹, WU Jun-jiang², FAN Su-jie¹, CHEN Chen¹, LI Ning-hui¹, WANG Jin-sheng¹, LI Wen-bin¹, ZHANG Shu-zhen¹

(1. Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University, Key Laboratory of National Education Department, Harbin 150030; 2. Soybean Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

Abstract: *Phytophthora* root and stem rot of soybean caused by *Phytophthora sojae* is a destructive disease in soybean production regions all around the world. Utilization resistant cultivar is the most economical and environmentally safe method for preventing against the disease, and screening on resistance germplasm is the basement for resistance breeding. A total of 292 soybean cultivars (including 153 native soybean germplasm and 139 soybean cultivars) and 236 wild soybean germplasm were inoculated with race 3 of *Phytophthora sojae* isolated from Jiansanjiang where there is serious disease occurring in Heilongjiang Province. A total of 80 cultivars were resistant, 93 had intermediate reaction, and 119 were susceptible to race 3, representing 27.4%, 31.8% and 40.8% of all the cultivars tested respectively. The number of resistant native soybean was 49, representing 32.0% of all the native soybean germplasm, which means that the percentage of native resistant germplasm was higher. A total of 49 wild soybean germplasm were resistant, 55 had intermediate reaction, and 132 were susceptible to race 3, representing 20.8%, 23.3%, and 55.9% of all the wild soybean germplasm tested, respectively. These resistant germplasm can be used in breeding for resistance to *P. sojae*.

Key words: Soybean germplasm; *Phytophthora sojae*; Race 3; Germplasm screening

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世界病害^[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、印度等主要大豆生产国都发现了该病^[2-4]。我国直到 1989 年才由沈崇尧和苏彦纯首次分离到病

原菌^[5]。其后, 该病在我国黑龙江省大豆主产区严重发生, 现已对大豆生产构成了严重的威胁^[6]。

大豆疫霉菌具有复杂的遗传组成和丰富的遗传变异, 目前国际上已报道了至少 55 个生理小种^[7]。抗病育种是防治该病的一项经济有效的措施, 而抗性资源筛选是抗病育种的工作基础。拓宽

收稿日期: 2009-10-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671317, 30810103063, 30400285); 黑龙江省新世纪人才培养计划资助项目(NCET-06-007); 黑龙江省自然科学基金资助项目(C200814); 黑龙江省农业科学院博士后基金资助项目(LRB06-010); 中国博士后基金资助项目(20060400835); 博士后落户黑龙江科研启动基金资助项目(LBH-Q05032)。

第一作者简介: 徐鹏飞(1980-), 男, 博士, 研究方向为大豆抗病遗传育种。E-mail: xpf_2008@yahoo.com.cn。

通讯作者: 张淑珍, 教授, 博士。E-mail: dnzhangshuzhen@yahoo.com; 李文滨, 教授, 博士。E-mail: wenbinli@yahoo.com。

基因资源、减轻新生理小种对生产造成的压力,是推进抗病育种进程的保证。

我国学者已经对大豆疫霉根腐病抗性鉴定进行了相关研究^[8-13]。鉴于大豆疫霉根腐病在黑龙江省的严重危害及其生理小种分化快、毒力类型复杂的特点,定期进行病样采集、病原菌分离纯化、毒力类型鉴定对防治该病尤为重要。在黑龙江发病严重的建三江农场,进行病样采集、病原菌分离纯化及生理小种鉴定,并用鉴定出的生理小种对 292 份栽培大豆和 236 份野生大豆资源进行抗性评价,以期拓宽我国栽培大豆的抗性基因谱。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

1.1.1 病株的采集 在黑龙江省发病严重的建三江农场,选取 5 块大豆田,采用 5 点取样法^[14]取样。

1.1.2 抗性资源鉴定 大豆品种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。包括 292 份栽培大豆资源(其中 153 份农家大豆品种)和 236 份野生大豆资源。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离、纯化与鉴定 取新鲜的大豆疫霉典型发病植株,采用病组织分离法进行大豆疫霉根腐病菌分离,然后在 CA 选择性培养基^[15]上培养。

病原菌分离:对采集到的新鲜病株的病茎放在自来水龙头下流水冲洗 1 h 后,75% 酒精浸泡 30 s,无菌水冲洗 3 次,用灭菌的滤纸吸干表面水分,通过酒精灯外焰 2 次,取病健交界处组织置于 CA 固体选择性培养基上,18℃ 温箱中培养 5 d。

病原菌的镜检、纯化与鉴定:将培养皿倒置于 15×10 倍显微镜下观察,对形态与疫霉菌丝相似的菌落部位进行标记,然后在超净工作台里将选取部位的菌丝转接于固体 CA 选择性培养基上,按此程序,纯化 6~7 次。

单孢分离与菌株保存:参照左豫虎等的^[16]诱导大豆疫霉根腐病菌游动孢子的方法,每隔 30 min 换 1 次水,待观察到有适宜浓度的游动孢子后,转入细胞培养板中培养,2~3 d 后,在倒置显微镜下进行单孢分离。单孢分离的菌丝生长 5~6 d 后,转接到装有正常 CA 培养基的试管中,菌丝长满管后,4℃ 遮光保存,每隔 3~4 个月继代活化 1 次。

1.2.2 病原菌生理小种鉴定 病原菌的扩繁:将 15 mL CA 固体培养基融化后倒入直径为 10 cm 的培养皿,尽量保持水平,冷却后制成 CA 固体平板培

培养基,将在试管斜面培养基活化的病原菌接种于平板中央,倒置于 25℃ 温箱中培养 8 d。

鉴别寄主的准备:采用国际上通用的一套鉴别寄主(分别携带 *Rps1a*, *Rps1b*, *Rps1c*, *Rps1d*, *Rps1k*, *Rps3a*, *Rps6*, *Rps7* 基因;由加拿大农业部 Harrow 研究所提供)作为大豆疫霉根腐病生理小种鉴别寄主,生理小种鉴定参照 Schmitthenner 的方法^[17]。

1.3 抗性评价

每个大豆材料分别取 15 粒种子播种于直径为 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 3 号生理小种对其进行下胚轴接种^[18],3 次重复。

栽培大豆和野生大豆对生真叶完全展开后,用消毒过的刀片在其子叶节下约 1 cm 处划一伤口,伤口深度不超过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 25℃ 下培养 3 d,接种后 4 d 进行病情调查。

参照 Yang^[19]的抗性评价标准,大豆对大豆疫霉菌的反应共分为 3 种类型:≥70% 倒伏率的为感病(S),≤30% 倒伏率的为抗病(R),植株倒伏率在 30%~70% 的品种为中间类型(I)。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离、镜检、纯化与单孢分离

大豆疫霉菌感染大豆植株后,田间发病的典型症状是叶片黄化、萎蔫,叶柄下垂,但不脱落,主茎一般保持坚挺,上有条状病斑,一般呈褐色或咖啡色,茎内部变褐。在黑龙江省建三江农场采集到具有上述典型病症的病株 23 份。用病组织分离法进行病原菌分离,通过分离、镜检、纯化与单孢分离,共计分离出 12 个菌株。

2.2 疫霉菌的形态学观察与鉴定

大豆疫霉菌在 CA 培养基上生长的菌丝体为白色、绒毡状。在电镜下观察,菌丝一般无隔多核,有呈近 90 度的分枝,基部缢缩。经过单孢分离,由单个孢子产生的菌丝细长,弯曲,数量较少。菌丝在水浸条件下可产生无色倒梨状孢子囊,大小为 40~60 μm×30~50 μm。表明分离到的 12 个大豆疫霉菌株均符合大豆疫霉菌特征。

2.3 毒力类型和生理小种鉴定

采用国际上通用的鉴别寄主,对分离的 12 个大豆疫霉根腐病菌株进行毒力类型鉴定,其中 5 个菌株被鉴定为 1 号生理小种,毒力公式为 7;3 个菌

株为3号生理小种,毒力公式为1a,7;4个菌株为中间类型,毒力公式分别为 $\pm 3a, 6, 7$;1b, $\pm 3a, 7$;1d, 6, ± 7 ;1a, 1c, $\pm 3a, 7$ (表1)。

表1 菌株及来源

原始菌株代号 Codes of original isolates	毒力公式及生理小种 Virulence formula and physiologic race
08-jsj-1	$\pm 3a, 6, 7$
08-jsj-5	7(1)
08-jsj-3	1a,7(3)
08-nks-3	1b, $\pm 3a, 7$
08-nks-8	1a,7(3)
08-nks-4	7(1)
08-43-2	1a,7(3)
08-jsj-17	7(1)
08-jsj-14	1d, 6, ± 7
08-nks-6	7(1)
08-43-3	7(1号小种)
08-43-8	1a, 1c, $\pm 3a, 7$

2.4 大豆种质资源对大豆疫霉根腐病的抗性鉴定

采用下胚轴伤口接种法,用分离到的大豆疫霉菌3号生理小种对292份栽培大豆材料(其中农家品种153份、其它大豆品种139份)和236份野生大豆材料进行了抗性鉴定,292份栽培大豆材料中,抗病80份,占鉴定栽培大豆资源的27.4%,中间类型93份,占31.8%,感病119份,占40.8%。栽培大豆中153份农家品种中,抗病49份,占农家品种的32.0%;236份野生大豆资源中,抗病49份,占鉴定野生大豆资源的20.8%,中间类型55份,占23.3%,感病132份,占55.9%(图1)。

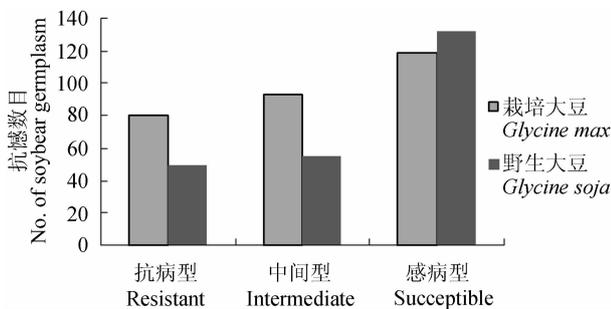


图1 栽培和野生大豆种质资源对大豆疫霉根腐病的抗感鉴定

Fig. 1 Number of cultivation and wild soybean germplasm with resistance to *P. sojae*

3 讨论

尽管大豆疫霉根腐病毒力类型复杂,并且新小种出现也较快,利用抗、耐性品种仍然是最有效的

防治手段,国外对于抗源的筛选和利用作了大量的工作,自从抗大豆疫霉根腐病的基因发现以来,已培育出大量的抗病品种并广泛应用于生产,但是抗病品种种植8~10a后,会出现抗性丧失而成为感病品种。随着大豆疫霉新小种的不断出现,寻找新的抗性基因、拓宽抗性种质资源对抗病育种工作尤为重要。目前黑龙江省的优势生理小种是1号小种^[20-21],但在近年的生理小种鉴定中,3号生理小种出现频率也较高^[22],因此进行3号生理小种的抗性资源筛选,可为抗病种质创新、选育抗病品种和防范3号生理小种的进一步蔓延提供资源上的保障。我国大豆科研工作者曾对我国的部分大豆栽培品种(品系)进行了疫霉根腐病的抗性鉴定^[8-10,13,23-25],但是栽培大豆资源对大豆疫霉根腐病3号生理小种的抗性研究鲜有报道,只有Lohnes等^[26]、Kyle等^[27]对我国南方大豆品种资源进行过大豆疫霉根腐病3号生理小种的抗性鉴定。该研究用大豆疫霉根腐病3号生理小种对292份栽培大豆材料(其中包括153份农家大豆品种)进行了抗性评价,抗病的80份,占栽培大豆资源的27.4%;153份农家品种中,抗病的有49份,占农家品种的32.0%,这表明农家大豆品种资源抗性比例较高。

由于栽培大豆亲本遗传基础狭窄,缺乏丰富的基因源,因此,利用野生大豆拓宽栽培大豆遗传基础,受到国内外大豆育种家的重视。我国存在着丰富的野生大豆资源,南起北纬24°的广东、广西北部到北纬52°55'的黑龙江畔都有野生大豆生长^[28]。国外对野生大豆对大豆疫霉根腐病抗感反应的研究少有报道,国内只有霍云龙等^[11]用USAR1、靳立梅等^[12]用大豆疫霉根腐病1号生理小种进行过野生大豆抗性资源筛选,该研究首次利用3号生理小种进行野生大豆抗性资源评价,结果表明,236份野生大豆材料抗病的49份,占野生大豆资源的20.8%。鉴定的这些高抗资源可为我国大豆抗疫霉根腐病育种奠定良好的基础。

参考文献

- [1] Schmitthenner A F. Problems and progress in control of phytophthora root rot of soybean[J]. Plant Disease, 1985, 69: 362-368.
- [2] Hildebrand A A. A root and stalk rot caused by *P. me. var. sojae* [J]. Canadian Journal of Botany, 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 H, Kim W, Cho W. Occurrence of Phytophthora root rot on soybean (*Glycine max*) and identification of the causal fungus [J]. Crop Protection, 1998, 40: 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. (Shen C Y, Su Y C. Discovery and preliminary studies of *Phytophthora megasperma* on soybean in China[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1991, 21(3): 298.)
- [6] 韩晓增, 何志鸿, 张增敏. 大豆主要病虫害防治技术[J]. 大豆通报, 1998, (6): 5-6. (Han X Z, He Z H, Zhang Z M. Major pests prevention in soybean[J]. Soybean Bulletin, 1998(6): 5-6.)
- [7] Leiz R A, Harman G L. Races of *Phytophthora sojae* on soybean in Illinois[J]. Plant Disease, 2000, 84: 487.
- [8] 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. (Xu X H, Lu H Y, Yang Q K, et al. Screening of soybean germplasm for resistance to *Phytophthora sojae*[J]. Soybean Science, 1999, 18(2): 147-150.)
- [9] 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. (Zhu Z D, Wang X M, Chang R Z, et al. Identification of Race of *Phytophthora sojae* and reaction of soybean germplasm resources in Heilongjiang Province[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2000, 33(1): 62-67.)
- [10] 王晓鸣, 朱振东, 王化波, 等. 大豆种质对疫霉根腐病抗性特点研究[J]. 植物遗传资源科学, 2001, 2(2): 22-26. (Wang X M, Zhu Z D, Wang H B, et al. The resistance of soybean germplasm to *Phytophthora* root rot[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2001, 2(2): 22-26.)
- [11] 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. (Huo Y L, Zhu Z D, Li X H, et al. Preliminary screening for *Phytophthora* root rot resistance in wild soybean[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2005, 6(2): 182-185.)
- [12] 靳立梅, 徐鹏飞, 吴俊江, 等. 野生大豆种质资源对大豆疫霉根腐病抗性评价[J]. 大豆科学, 2007, 26(3): 300-304. (Jin L M, Xu P F, Wu J J, et al. Identification the resistance of wild soybean germplasm to *Phytophthora sojae*[J]. Soybean Science, 2007, 26(3): 300-304.)
- [13] 张淑珍, 徐鹏飞, 吴俊江, 等. 栽培大豆种质资源对大豆疫霉根腐病的抗性评价[J]. 大豆科学, 2007, 26(6): 914-917. (Zhang S Z, Xu P F, Wu J J, et al. Identification of resistance to *Phytophthora sojae* in soybean germplasm[J]. Soybean Science, 2007, 26(6): 914-917.)
- [14] 方仲达. 植病研究方法(第三版)[M]. 北京: 农业出版社, 1998, 12-13. (Fang Z D. Plant disease research methods. the third edition[M]. Beijing: Agriculture Press, 1998, 12-13.)
- [15] 徐鹏飞. 大豆疫霉根腐病菌遗传多样性分析及种质资源抗性评价[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2007: 25-29. (Xu P F. The analysis of genetic diversity of *Phytophthora sojae* and evaluation for resistant germplasm[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2007: 25-29.)
- [16] 左豫虎, 臧忠婧, 刘锡若, 等. 影响大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)游动孢子产生的条件[J]. 植物病理学报, 2001, 31(3): 241-245. (Zuo Y H, Zang Z J, Liu T R, et al. Studies on production condition of zoospores of *Phytophthora sojae*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2001, 31(3): 241-245.)
- [17] Schmitthenner A F. *Phytophthora* rot [M]//In "Compendium of soybean disease." 3rd ed. J B Sinclair, P A Backman. American Phytophthora Society. St. Paul, MN, 1989: 35-38.
- [18] Kaufmann M J, Gerdemann J W. Root and stem rot of soybean caused by *Phytophthora sojae*[J]. Phytopathology, 1958, 48: 201-208.
- [19] Yang X B, Ruff R L, Meng X Q, et al. Race of *Phytophthora sojae* in Iowa soybean fields[J]. Plant Disease, 1996, 80: 1418-1420.
- [20] 许修宏, 吕慧颖, 曲娟娟, 等. 大豆疫霉根腐病菌生理小种鉴定及毒性分析[J]. 植物保护学报, 2003, 30(2): 125-128. (Xu X H, Lu H Y, Qu J J, et al. *Phytophthora sojae* races in Northeast of China and the virulence evaluation of the isolates[J]. Journal of Plant Protection, 2003, 30(2): 125-128.)
- [21] 张淑珍, 吴俊江, 徐鹏飞, 等. 黑龙江省大豆疫霉根腐病菌毒力类型及 15 号小种的首次报道[J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(2): 229-234. (Zhang S Z, Wu J J, Xu P F, et al. Identification of virulence *Phytophthora sojae* in Heilongjiang province and the first report on race 15 in China[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2008, 30(2): 229-234.)
- [22] 马淑梅. 大豆疫霉根腐病 3 号生理小种抗性遗传及抗病种质创新[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2008, 25(3): 347-350. (Ma S M. Study on the resistance to No. 3 biological race of *Phytophthora* root rot of soybean germplasm and breeding for resistant varieties[J]. Journal of Natural Science of Heilongjiang University, 2008, 25(3): 347-350.)
- [23] 李长松, 路兴波, 尚佑芬, 等. 大豆疫霉根腐病菌的分离及品种抗病性鉴定[J]. 吉林农业大学学报, 1998, 20: 133. (Li C S, Lu X B, Shang Y F, et al. Isolation of *Phytophthora megasperma* yf. sp. *glycinea* and screening of resistant soybean cultivars[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 1998, 20: 133.)
- [24] 朱振东, 霍云龙, 王晓鸣, 等. 大豆疫霉根腐病抗源筛选[J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(1): 24-30. (Zhu Z D, Huo Y L, Wang X M, et al. Screening for resistance sources to *Phytophthora* root rot in soybean[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2006, 7(1): 24-30.)
- [25] 李宝英. 大豆种质资源对疫霉根腐病的抗性鉴定[J]. 农机化研究, 2005(5): 205-206. (Li B Y. Identification the resistance of soybean germplasm to *Phytophthora* root rot[J]. Journal of Agricultural Mechanization Research, 2005(5): 205-206.)
- [26] Lohnes D G, Nickell C D, Schmitthenner A F. Origin of soybean alleles for *Phytophthora* resistance in China[J]. Crop Science, 1996, 36: 1689-1692.
- [27] Kyle D E, Nickell C D, Nelson R L, et al. Response of soybean accessions from provinces in Southern China to *Phytophthora sojae*[J]. Plant Disease, 1998, 82: 555-559.
- [28] 李福山. 中国野生大豆资源的地理分布及生态分化研究[J]. 中国农业科学, 1993, 26(2): 47-55. (Li F S. Studies on the ecological and geographical distribution of the chinese resources of wild soybean (*G. Sojae*) [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1993, 26(2): 47-55.)