

南方三省(区)抗大豆疫霉根腐病野生大豆资源的筛选

任海龙, 宋恩亮, 马启彬, 杨存义, 王瑞鹏, 马天翔, 唐玉娟, 年海

(华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642)

摘要: 采用下胚轴伤口接种法, 用大豆疫霉菌株 Pm14 对南方部分地区野生大豆资源进行了筛选, 并进一步探讨了野生大豆的抗病资源分布和抗病能力。结果表明: 江西、湖南和广西的 273 份野生大豆资源中 3.30% 表现为抗病, 16.48% 表现为中间反应类型。南方地区野生大豆存在大豆疫霉根腐病的抗性资源, 其中广西的野生大豆抗性稍强。

关键词: 南方; 野生大豆; 大豆疫霉根腐病; 抗性筛选

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)06-1012-04

Screening for Resistance Sources to Phytophthora Root Rot in *Glycine soja* from Three Provinces of Southern China

REN Hai-long, SONG En-liang, MA Qi-bin, YANG Cun-yi, WANG Rui-peng, MA Tian-xiang, TANG Yu-juan, NIAN Hai

(College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China)

Abstract: The hypocotyl inoculation technique was used to screen 273 wild soybean lines (*Glycine soja* L.) from Southern China by *P. sojae* strain Pm14, and to further explore their resistant distribution and capacity. The results indicated that 3.30% and 16.48% of wild soybean lines from Jiangxi, Hunan provinces and Guangxi Zhuang Autonomous Region held resistant and intermediate reactions to race Pm14, respectively. It suggested that there are resistant recourses to Phytophthora root rot among wild soybean lines taken from Southern China. While there were a little higher percent of resistant recourses in Guangxi.

Key words: Southern China; *Glycine soja* L.; Phytophthora root rot; Resistance screening

大豆疫霉根腐病是一种严重的土传病害,可以在大豆生长的各个时期发病,但在苗期更为明显,在连作和土壤湿度大的地区危害尤为严重。感病品种的损失通常为 25% ~ 50%,个别高感品种损失可达 100%^[1]。大豆疫霉根腐病于 1948 在印第安纳州首次被发现,之后蔓延至美国大部分大豆产区,现已成为仅次于大豆胞囊线虫病的美国第二大病害^[2]。如今,世界的主要大豆产区都有大豆疫霉根腐病为害的报道^[3]。我国直到 1989 年才由沈崇尧首次在东北发现大豆疫霉根腐病并报道^[4]。虽然发现至今只有 20 a 的时间,但其蔓延速度很快,现已在黑龙江、吉林、北京、内蒙古、山东、安徽、福建、河南、江苏、浙江、新疆、湖北等地分离到了大豆疫霉菌^[5]。

防治大豆疫霉根腐病有很多措施,目前最有效的方法是抗病育种^[6]。但由于大豆疫霉菌自身变

异性高,而且种植抗病品种也会造成选择压力,所以大豆疫霉菌种群变异很快^[7-8],大豆抗病品种的抗性一般只持续 8 ~ 15 a 就会被克服^[6],给抗病育种带来了极大的挑战。因此,必须不断地发掘新的抗病基因,以确保抗病育种工作持续、有效的开展^[9]。

中国是大豆的起源地,拥有丰富的大豆资源,其中野生大豆资源含有很多好的抗病虫基因,现已发现高抗蚜虫、抗病毒病、抗大豆疫霉根腐病、抗大豆食心虫、抗胞囊线虫病等野生大豆资源^[10]。关于抗大豆疫霉根腐病野生大豆资源的筛选已有相关报道,霍云龙等^[11]用毒力型为 1a、1d、2、3b、5、7 的大豆疫霉菌株对来源于我国 21 个省(市)、自治区的野生大豆资源进行鉴定,结果在辽宁、河北、河南、山西、山东、安徽、四川、贵州、陕西、浙江、江苏、湖北、江西 13 个省的资源中发现有抗大豆疫霉根

收稿日期:2010-09-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30971814);引进国际先进农业科学技术计划资助项目(2006-G5);国家高技术研究发展计划资助项目(2006AA100104-14);农业部现代农业产业技术体系建设专项资助项目(nycyt-004);农业部公益性行业科研专项资助项目(nyhyzx07-004-11);华南农业大学校长基金资助项目(4100-k09130);公益性行业(农业)科研专项资助项目(200903002)。

第一作者简介: 任海龙(1985-),男,在读硕士,研究方向为大豆抗病遗传育种。E-mail: renhailong_2006@163.com。

通讯作者: 年海,教授,博士生导师。E-mail: hnian@scau.edu.cn。

腐病的野生大豆资源;靳立梅等^[7]用黑龙江大豆疫霉菌 1 号优势生理小种,对主要来源于黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古四省区及其它共计 19 个省份的野生大豆进行了抗感性鉴定,也发现有抗大豆疫霉根腐病的野生大豆资源,但对南方地区的野生大豆研究甚少。该研究对收集来自江西、湖南、广西等省(区)的野生大豆资源进行大豆疫霉根腐病的抗病性筛选,以探讨南方野生大豆的抗病资源分布和抗病能力。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 野生大豆材料 273 份野生大豆资源由华南农业大学大豆遗传与育种实验室搜集,分别来自江西省的德兴市、南昌市、九江市、都昌县、修水县、万载县、宁都县;湖南省的新田县、华容县、岳阳县、道县;广西壮族自治区的灌阳县、永福县、全州县、兴安县、资源县、灵川县。

1.1.2 大豆疫霉菌和鉴别寄主 大豆疫霉菌 Pm14 和 14 个大豆鉴别寄主由南京农业大学王源超教授和邢邯教授提供,Pm14 经下胚轴接种方法测定其毒力公式为:1a、1b、1c、1d、1k、2、3a、3c、4、5、6、7。鉴别寄主为:Harlon(1a)、Harosoy13XX(1b)、Williams79(1c)、PI103091(1d)、Williams82(1k)、L76-1988(2)、Chapman(3a)、PRX146-36(3b)、PRX146-48(3c)、L85-2352(4)、L85-3059(5)、Harosoy62XX(6)、Harosoy(7)、Williams(none)。

1.2 试验方法

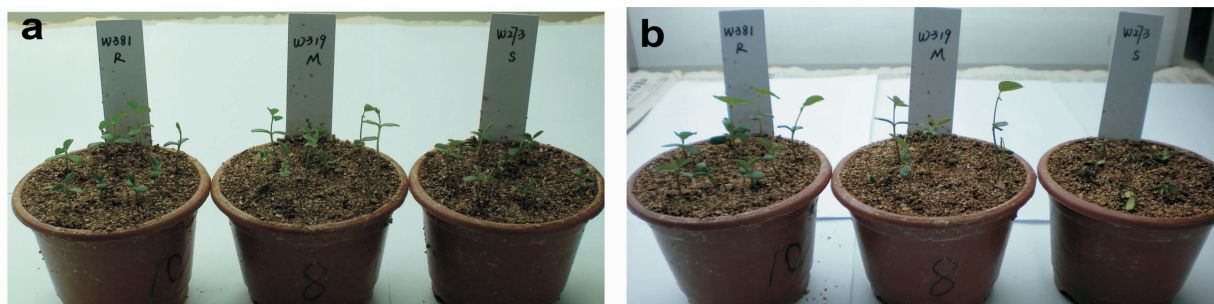
1.2.1 大豆疫霉根腐病病原菌培养基的制备 美国进口的 V8 蔬菜汁每 120 mL,加入碳酸钙 1.2 g;

在 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 25°C 条件下离心 8 min;取上清液 100 mL,加超纯水定容到 1 L;再加入 15 g 琼脂, 121°C 灭菌锅灭菌 20 min;最后在超净工作台中加入过滤灭菌的利福平(质量体积比为 1 mg:100 mL),混匀后,倒入直径为 9 cm 的培养皿备用,培养基的厚度以 0.3 cm 为宜。

1.2.2 大豆疫霉根腐病病原菌的活化 取保存在 10°C 冰箱中的大豆疫霉根腐病病原菌,用接种环挑取 0.5 cm^2 左右的边缘菌落,转接于平皿中央,于 25°C 温箱中倒置培养 7 d。

1.2.3 野生大豆的种植 野生大豆播种前先用单面刀片割掉长轴端一块种皮,然后将野生大豆播种在以蛭石为基质的直径为 9 cm 的花盆中,每盆种 12 粒,保证出苗 10 株左右,播种后浇水;播种 3 d 后大豆发芽,待子叶拱出时浇第 2 次水;播种 7 d 后第 1 对真叶平行时,即接种前浇第 3 次水。整个过程温度控制在 25°C ,每天光照 14 h。

1.2.4 接种方法及抗性评价 采用 Sandhu 等^[12]的下胚轴接种法,略有修改:在野生大豆第 1 对真叶平行时,一般为 7 d,选取生长一致的植株,用酒精灯外焰灭菌后的刀片在野生大豆子叶节下 1 cm 左右处划一伤口,伤口以能看到组织液为宜,越薄越好。然后取 25°C 温箱中培养 7 d 的病原菌接种,尽量取活性强的边缘菌落,切成 3 mm^2 左右的方块嵌入伤口中,菌丝面向内,接种后把大豆放在塑料薄膜架子内,喷水保湿 24 h,所有处理重复 3 次,接种 4 d 进行病情调查。野生大豆抗性共分为 3 种类型^[13]:植株死亡率在 70% 以上的为感病(S),介于 30%~70% 之间的为中间类型(M),死亡率在 30% 以下的为抗病(R),如图 1 所示。



a: 接种前的野生大豆;b: 接种后 3d 野生大豆。W381、W319 和 W273 为野生大豆的 3 个株系,对疫霉根腐病的响应分别表现为抗病、中间类型和感病 3 种不同的类型。

a. Wild soybean lines before inoculating *P. sojae* Pm14; b. Wild soybean lines after inoculating *P. sojae* Pm14 for three days. W381, W319 and W273 were wild soybean lines which showed the resistant, medium and susceptible characteristic to *P. sojae* Pm14, respectively.

图 1 野生大豆对疫霉菌的响应

Fig. 1 Responses to *P. sojae* of wild soybean resources

2 结果与分析

2.1 野生大豆资源的抗病性鉴定

以 Willams 为感病对照品种,以 PRX146-36 为抗病对照品种,以大豆疫霉菌菌株 Pm14 为致病菌株,采用下胚轴接种法对 273 份野生大豆资源进行抗病性鉴定。接种后,Willams 表现为感病,PRX146-36 表现为抗病,结果稳定。统计结果(表 1)表明,273 份野生大豆资源中有 9 份资源植株死亡率在 30% 以下,表现为抗病反应,占鉴定资源总数的 3.3%,其中 W381 和 GW513 抗病率都为 100%;有 45 份资源植株死亡率在 30% ~ 70% 之间,呈中间反应类型,占 16.5%;219 份资源植株死亡率在 70% 以上,表现为感病类型,占 80.2%。

表 1 不同来源野生大豆资源对大豆疫霉菌 Pm14 的响应

Table 1 Responses to Pm14 <i>P. sojae</i> of wild soybean resources from different provinces				
省份 Province	数量 Number	对疫霉菌的响应 Responses to <i>P. sojae</i>		
		R	M	S
江西 Jiangxi	153	5	27	121
湖南 Hunan	62	2	6	54
广西 Guangxi	58	2	12	44
合计 Total	273	9	45	219

R = 抗病, I = 中间类型, S = 感病; R = Resistant, M = Medium, 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南方地区江西、湖南、广西 3 个省(区),研究发现有 9 份野生大豆资源抗大豆疫霉根腐病,其中来源于广西的野生大豆资源抗性比例最高(图 2)。在鉴定的 58 份广西资源中有 2 份表现为抗病反应,占 3.5%;江西省的 153 份资源中有 5 份表现为抗病反应,占 3.3%;湖南省的 62 份资源中有 2 份表现为抗病反应,占 3.2%。

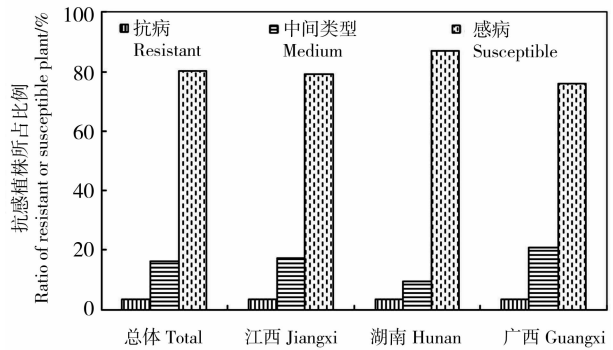


图 2 江西、湖南、广西 3 个省(区)野生大豆抗病性类型分布

Fig.2 Resistance types to *P. sojae* of wild soybean germplasms from Jiangxi, Hunan and Guangxi provinces

3 讨论

3.1 野生大豆的下胚轴接种方法

试验采用国际上常用的下胚轴伤口接种法,由于该方法操作简便,表型明显且结果重复性高,所以广泛应用于栽培大豆疫霉根腐病的抗病性评价,该方法也是野生大豆抗疫霉根腐病资源鉴定的常用方法^[7, 14-18]。由于野生大豆在生理特性方面有别于栽培大豆,因而在接种鉴定的操作方面也存在其特殊性。首先,野生大豆的种皮坚硬,吸涨能力比较差,直接播种会导致出苗不一致,因此,野生大豆播种前的适度割皮是非常重要的环节。其次,野生大豆茎秆纤细,切割伤口时需格外小心,以防止机械致死。接种时还要选择活力强的边缘菌落,以使病原菌侵染能力一致。

3.2 野生大豆的抗性评价

研究所选用的大豆疫霉菌株毒力较强,苗期野生大豆的茎秆较细,且江西、湖南、广西 3 省(区)尚未发现大豆疫霉根腐病流行,依据病原菌与寄主植物协同进化理论,这些地区的大豆资源不会受到疫霉菌的影响而变异进化,因此,野生豆资源表现为较低的抗病性。2005 年霍云龙等^[11]用大豆疫霉菌对野生大豆鉴定所得的结果中有 13.4% 的资源抗大豆疫霉根腐病,15.3% 的资源表现为中间反应类型。其中江西 7 份材料,抗病的占 14.3%,湖南 7 份,广西 13 份材料均未发现抗病资源。该研究结果还显示,中间类型比抗病类型高 13.18%,说明江西、湖南、广西 3 省(区)存在新的抗病基因的潜力。2007 年靳立梅等^[7]也用大豆疫霉菌对野生大豆资源进行了鉴定,所得的结果中,江西 19 份材料,抗病的占 21.1%,中间类型占 47.4%,所得结果野生大豆的抗病性比例更高。前人的研究所用的江西、湖南、广西三省(区)野生大豆的群体都比较少,该研究所用的 273 份野生大豆资源分别来自江西、湖南和广西等省(区)的不同县市,取材范围广泛。下胚轴接种鉴定结果表明 3.30% 的资源表现为抗病,16.48% 表现为中间反应类型,并首次发现湖南和广西的野生大豆存在抗大豆疫霉根腐病资源。

3.3 抗性基因的推导

大豆疫霉根腐病的抗病性是基因对基因学说的一个经典例证^[19],其基本观点可概括为:植物对大多数病害的抗性取决于病原的无毒基因和植物的抗性基因的互作;如果寄主带有抗性基因,病原带相对应的无毒基因,病原就会被抗病的植物识

别,产生抗性反应,表现抗病;反之,如果寄主的抗性基因或病原相对应的无毒基因,二者缺一,植物表现感病^[20]。该研究所用的大豆疫霉菌 Pm14 测定的毒力公式为 1a、1b、1c、1d、1k、2、3a、3c、4、5、6、7。Pm14 菌株具有无毒基因 Avr3b,可能含有 Avr8^[21]或新的无毒基因中的一个或多个。根据基因对基因学说的作用原理,筛选到的抗病野生大豆中应该含有 *Rps3b* 抗性基因,同时可能含有至少一个 *Rps8* 抗性基因或新的抗病基因。南方大豆产区江西、湖南和广西等省(区)大豆疫霉根腐病抗性基因资源的分离与鉴定以及抗病性机理尚待深入研究。

致谢 感谢南京农业大学王源超教授提供的大豆疫霉菌株和相关培训。

参考文献

- [1] 马淑梅,丁俊杰,郑天琪,等. 黑龙江省大豆疫霉根腐病生理小种鉴定结果[J]. 大豆科学, 2005, 24(4): 260-262. (Ma S M, Ding J J, Zheng T Q, et al. The identification of physiological races of *phytophthora megasperma* [J]. Soybean Science, 2005, 24(4): 260-262.)
- [2] Wrather J A, Stienstra W C, Koenning S R. Soybean disease loss estimates for the United States from 1996 to 1998 [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2001, 23(2): 122-131.
- [3] Schmitthenner A F. Phytophthora root rot[M]// Compendium of soybean diseases, fourth edition. American Phytopathological Society, 1999: 39-42.
- [4] 沈崇尧,苏彦纯. 中国大豆疫霉病菌的发现及初步研究[J]. 植物病理学报, 1991, 21(4): 298. (Shen C Y, Su Y C. Discovery and preliminary studies of *Phytophthora megasperma* on soybean in China[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1991, 21(4): 298.)
- [5] 孙石. 大豆疫霉根腐病抗性的遗传分析及基因定位的初步研究[D]. 南京:南京农业大学, 2008: 1-2. (Sun S. Primary study on genetic analysis and gene mapping of resistance to *P. sojae* in soybean [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008: 1-2.)
- [6] Schmitthenner A F. Problems and progress in control of Phytophthora root rot of soybean[J]. Plant Disease, 1985, 69(4): 362-368.
- [7] 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(2): 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(2): 300-304.)
- [8] Kaitany R C, Hart L P, Safir G R. Virulence composition of *Phytophthora sojae* in Michigan [J]. Plant Disease, 2001, 85: 1103-1106.
- [9] 范爱颖. 大豆品种豫豆 25 抗疫霉根腐病基因的分子标记与作图[D]. 武汉:中国农业科学院, 2009: 7-8. (Fan A Y. Molecular marker and mapping of *Phytophthora* resistant gene in cultivar soybean Yudou 25 [D]. Wuhan: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009: 7-8.)
- [10] 马晓萍,杨光宇,杨振宇,等. 野生大豆在大豆育种中的应用[J]. 作物研究, 2009, 23(1): 11-12. (Ma X P, Yang G Y, Yang G Y, et al. Application of wild soybean in soybean breeding [J]. Crop Research, 2009, 23(1): 11-12.)
- [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] Sandhu D, Schallcock K G, Rivera-Velez N, et al. Soybean *Phytophthora* resistance gene *Rps8* maps closely to the *Rps3* region [J]. Journal of Heredity, 2005, 96(5): 536-541.
- [13] 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(5): 555-559.
- [14] Pazdernik D L, Hartman G L, Huang Y H, et al. A greenhouse technique for assessing *phytophthora* root rot resistance in *glycine max* and *G. soja* [J]. Plant Disease, 1997, 81(10): 1112-1114.
- [15] Sugimoto T, Yoshida S, Watanabe K, et al. Identification of SSR markers linked to the *Phytophthora* resistance gene *Rps1-d* in soybean [J]. Plant Breeding, 2008, 127: 154-159.
- [16] Demirbas A, Rector B G, Lohnes D G, et al. Simple sequence repeat markers linked to the soybean *rps* genes for *phytophthora* Resistance [J]. Crop Science, 2001, 41: 1220-1227.
- [17] Gardner M E, Hymowitz T, Xu S J, et al. Physical map location of the *Rps1-k* allele in soybean [J]. Crop Science, 2001, 41: 1435-1438.
- [18] Dorrance A E, Schmitthenner A F. New sources of resistance to *Phytophthora sojae* in the soybean plant introductions [J]. Plant Disease, 2000, 84(12): 1303-1308.
- [19] Flor H H. Host-parasite interaction in flax rust-its genetics and other implications [J]. Phytopathology, 1955: 45, 680-685.
- [20] Flor H H. Current status of the gene-for-gene concept [J]. Annual Review of Phytopathology, 1971, 9: 275-296.
- [21] Burnham K D, Dorrance A E, Francis D M, et al. *Rps8*, a new locus in soybean for resistance to *Phytophthora sojae* [J]. Crop Science, 2003, 43: 101-105.