

2种大豆胞囊线虫鉴定方法比较及分析

高源,常玮,韩英鹏,李文滨

(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)

摘要:从计数方法、播种方法、鉴定准确性等方面对实用性较强的塑料钵柱法和酸性品红染色法2种大豆胞囊线虫鉴定方法进行了比较。塑料钵柱法鉴定时,可观察到大豆胞囊线虫病的主要发病特征,包括叶片变黄、植株矮小、根部有胞囊形成等典型症状。利用酸性品红染色法鉴定时未见叶片变黄,根部未见胞囊,但在20×显微镜下可检测处于二龄期的幼虫,可用于鉴定计数。2种鉴定方法对鉴别寄主具有同等区别抗感材料的能力,但在鉴别较大群体时品红染色法鉴定结果变异率低,同时在鉴定周期和效率上明显优于塑料钵柱法。因此,在对较大群体进行鉴定时,酸性品红染色法是一种便捷且准确性较高的鉴定方法。

关键词:大豆胞囊线虫病;抗性鉴定;塑料钵柱法;酸性品红染色法

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)02-0274-04

Comparisons and Analyses on the Two Methods of Evaluating Resistance to Soybean Cyst Nematode

GAO Yuan, CHANG Wei, HAN Ying-peng, LI Wen-bin

(Soybean Research Institute, Northeast Agricultural University/Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Education Ministry, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: The difference of two identification method of soybean cyst nematode including plastic column method and acid magenta dyeing method were compared from aspects of cyst counting methods, soybean planting method, and identification accuracy. For plastic column method, the typical symptom of infected plants including yellowed leaves, dwarfed plants and formation of cyst in root could be seen directly. For acid magenta dyeing method, the number of second-stage juveniles (J_2) of SCN could be counted under the 20× microscope, while the morphological variation couldn't be seen. The two methods had the same ability to identify resistant and susceptible materials, while acid magenta dyeing method showed higher efficiency and accuracy. Results suggest when identifying SCN resistance for larger soybean population, acid magenta dyeing method is suitable for its time-saving and high-efficiency characteristics.

Key words: Soybean Cyst Nematode; Resistance evaluation; Plastic column method; Acid magenta dyeing method

大豆胞囊线虫病(Soybean Cyst Nematode, SCN),是由大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines* Ichinohe)侵染引起的一种对大豆(*Glycine max* (L.) Merr.)生产危害极其严重的病害^[1]。SCN是一种土传的定居性内寄生线虫,其二龄幼虫从根尖处侵入根部,造成根组织的代谢失调与组织损伤,受害的大豆根系短粗,侧根减少,细根增多,植株矮小,叶片变黄,荚和种子萎缩瘪小,甚至不结荚,根上附有白色球状物,一般减产10%~30%,严重时甚至绝产^[2]。由于SCN的成活时间长,传播途径多,寄主范围广,因而极难防治。

防治大豆胞囊线虫病害的根本方法是应用抗线虫病品种。而培育抗病品种需要筛选抗源并对后代材料进行抗性鉴定。大豆研究工作者在抗源

筛选和后代鉴定方法方面已作了大量的工作,建立了一系列的鉴定方法^[3]。盆栽鉴定和病圃鉴定是常用的方法,但其存在费力、耗时和误差大等问题。在实验室条件下塑料钵柱法实用性较强,但是很少应用于大批量材料的鉴定。而大批材料SCN抗性鉴定又需要一种快速有效的胞囊鉴定方法。酸性品红染色法是通过Byrd等^[4]的方法进行改进,获得仅使发病组织中线虫着色,而发病组织不着色的理想技术。

为获得简单有效的大豆胞囊线虫病抗性鉴定方法,该研究采用耐病和感病品种,着重比较了塑料钵柱法^[5]和酸性品红染色法优缺点,为大豆胞囊线虫病抗性品种资源的有效筛选提供依据。

收稿日期:2011-10-10

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2006AA100104-4);国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2009CB118400);黑龙江省教育厅面上项目(11541025);哈尔滨市科技创新人才研究专项(2009RFQXN085)。

第一作者简介:高源(1985-),女,在读硕士,研究方向为大豆遗传育种。E-mail:gaoyuan200808@yahoo.cn。

通讯作者:李文滨(1958-),男,教授,博士生导师,从事大豆遗传育种研究。E-mail:wenbinli@neau.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 胞囊线虫生理小种的采集 采集大豆胞囊线虫生理小种发病严重的试验病圃或农场的病土(每 100 g 风干土胞囊量 30 个以上),将病土和无菌细沙以 3:1 的比例均匀混合制备成试验病土。大豆胞囊线虫 14 号生理小种采集自黑龙江省农科院大庆分院实验病圃;3 号生理小种采集自伊春市大豆连作地块。

1.1.2 大豆材料 感病品种黑农 37;感病对照品种 Lee68;抗病对照品种为对 14 号生理小种有较高抗性的 Pickett、Peking、PI90763 和 PI88788。

1.2 方法

1.2.1 塑料钵柱鉴定法 塑料钵柱准备:将 0.12 mm 的透气性塑膜剪成 25 cm×20 cm 的小块,用手提式缝包机沿窄边 1 cm 缝成有底的圆柱形筒。

播种和移栽:鉴定材料首先在蛭石中萌发,当子叶刚出土但还未完全展开时,连根完整取出整个植株,用清水洗净根上蛭石,选取根长相同的幼苗移栽到制好的钵柱中,每钵 1 株,每个品种移栽 5 株。将病土装至距筒口 1.5 cm 处。

出苗后室内管理:控制温度在 25℃ 左右,定期浇水,使土壤的绝对含水量保持在 18% 左右。

胞囊鉴定:于显囊盛期(大豆移苗后 30 d)统计各品种根系上所寄生的胞囊数量,并计算寄生指数,3 次重复。以感病品种 Lee68 的寄生胞囊数为 100,计算各鉴定品种胞囊数的比值,即雌虫指数(Female Index, FI),计算公式如下:

雌虫指数(%) = $\frac{\text{鉴别品种根上胞囊数}}{\text{Lee 68 根上胞囊数}} \times 100$

鉴定标准^[6]:FI≥10,则为“+”,表示感病;FI<10,则为“-”,表示抗病。

1.2.2 酸性品红染色鉴定法 鉴定植株的种植:将所有供试材料在一个塑料盒子里间距 5 cm 种植,每个株系播种 5 粒,并在每盒种植对照品种 Lee68。待出苗后挂牌,保留生长状态一致的 3 棵植株。播种后 15 d 左右将植株整株取出,注意对根的保护。

根部脱色:将根部的残土重新干净,浸泡于浓度为 3% 的安替福民(NaClO)水溶液中 4 min,期间搅拌 2 次。

根部染色:先用流水冲洗根部 30~45 s,并在蒸馏水中浸泡 15 min,然后将根浸泡于酸性品红染色

液中(3.5 g 品红,250 mL 冰乙酸,750 mL 蒸馏水),将漂白后的根系煮沸 45~60 s,冷却至室温。

压片镜检:将根组织压片,在 20× 的光学显微镜下计数。

1.3 数据分析

使用 SPSS 18.0 软件进行数理统计分析。

2 结果与分析

2.1 发病状况比较

在塑料钵柱法中,接种病土 15 d 植株变化不明显。接种 30 d 的子叶和真叶变黄,发育迟缓,生长受阻,地上部生长瘦弱,而且植株矮化枯萎明显,节间短,基部叶柄角度扩大,茎部褐变,叶片逐渐失绿黄化^[7]。地下部分根系不发达,侧根减少,须根增多。根瘤小而少,严重时根系腐烂。须根上可见大小约 0.3~0.5 mm 乳白色或黄色颗粒(即胞囊)^[8]。

在品红染色法中,接种 15 d 时地上部分正常生长,植株变化不明显,未见叶片变黄等症状。而此时大豆胞囊线虫侵染根部,经品红染色即可见处于二龄期的幼虫,而且恰好能够分辨开雌虫与雄虫(图 3),可以准确地记录根部的雌虫数目^[9]。

为了比较 2 种方法在抗感鉴定中的差异,分别用 2 种方法对含有大豆胞囊线虫 14 号生理小种及 3 号生理小种的土样进行鉴定。用于大豆胞囊线虫生理小种鉴定及对照的鉴别寄主大豆品种为 Pickett、Peking、PI88788、PI90763 及 Lee68(表 1 和表 2)。

表 1 塑料钵柱法进行小种鉴定

Table 1 Determination of races by plastic pot method

鉴别品种 Identification host	FI	3 号小种 Race 3	FI	14 号小种 Race 14
Pickett	4.5	-	95.2	+
Peking	3.2	-	55.6	+
PI88788	7.5	-	9.8	-
PI90763	5.0	-	15.9	+
Lee68	100.0	+	100.0	+

“+”表示感病;“-”表示抗病;下同。

“+”susceptible to SCN;“-”resistant to SCN;the same below.

表 2 品红染色法进行小种鉴定

Table 2 Determination of races by fuchsin dyeing method

鉴别品种 Identification host	FI	3 号小种 Race 3	FI	14 号小种 Race 14
Pickett	3.8	-	89.5	+
Peking	5.6	-	57.2	+
PI88788	6.8	-	8.5	-
PI90763	3.5	-	19.4	+
Lee68	100.0	+	100.0	+

从表1和表2可以看出,利用塑料钵柱法和酸性品红染色法对 Pickett、Peking、PI88788、PI9076 进行大豆胞囊线虫3号和14号生理小种进行鉴定,2种方法均能够对鉴别寄主的抗感情况进行有效鉴别。方差分析结果显示:3号生理小种鉴定 F 检验的概率Sig.值为 $0.894 > 0.05$,即表明2种鉴定方法对3号生理小种抗感性鉴定差异不显著;14号生理小种鉴定 F 检验的概率Sig.值为 $0.828 > 0.05$,同样表明2种鉴定方法对14号生理小种抗感性鉴定差异不显著。即酸性品红染色法和塑料钵柱法具有同等鉴定品种抗感的能力。

使用塑料钵柱法对 Lee68 进行胞囊数量动态检测。由图1可知,在移苗后30~42 d,随着时间的推移,胞囊数目急剧减少,33 d时的数量较30 d时减少一半,至40 d时可数胞囊数量接近0。造成这种现象的原因是雌虫成熟后,胞囊大量脱落进入土壤中。所以在使用塑料钵柱法鉴定数目较大群体时会造成较大误差。而使用品红染色法时由于J2期幼虫被固定,不能脱落,因而在鉴定较大群体时能保证数据的准确性。

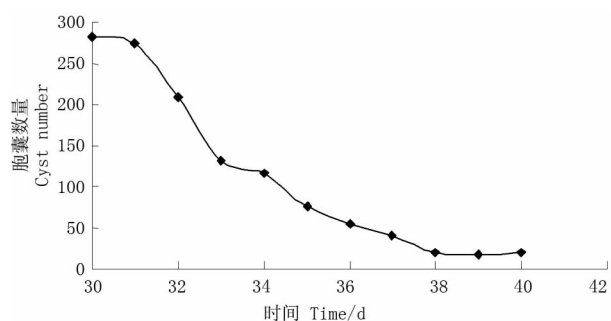


图1 移苗后胞囊量变化

Fig. 1 The change of cyst numbers after transplanting

为了比较2种方法鉴定结果的准确性是否存在差异,分别将感病亲本黑农37的种子采用2种方法进行鉴定,每种方法播种20粒种子,获取根部胞囊总数数据。由于2种方法所采用的计数方式不同,因此采用变异系数对2组数据的变异程度进行比较。经计算采用塑料钵柱法获得数据的变异系数为9.2%,而采用品红染色法的变异系数为4.6%。通过比较得知,采用塑料钵柱法获得数据的变异程度比较大,而采用品红染色法获得的数据比较稳定。

2.2 取样时间的比较

正常情况下大豆胞囊线虫完成一个生活史需30~35 d,其中二龄幼虫为主要侵染态。成虫雌雄异型,雄虫线型,可以活动。雌虫老熟死亡后撑破寄主根表皮露出成为胞囊(图2)。因此,塑料钵柱法是在线虫生长的一个世代来完成取样工作,加

上移苗前在蛭石中萌发阶段的7 d左右的时间,共需要40 d的时间。塑料钵柱法能控制根系周围的线虫数量,使其更集中一致,有利于线虫的侵染^[10]。根部可见发病症状,且易取全根系,可直接在根上计数胞囊。但对于QTL定位来说,需要将一个较大的群体(一般大于100株)进行计数,因此无法在短时间内完成,而随着时间的推移,白色或浅的胞囊进一步的发育,变褐成具致密保护层的胞囊脱落于土壤中。且在取样过程中,无法避免的会弄掉根部的一些胞囊,造成获取数据的误差。

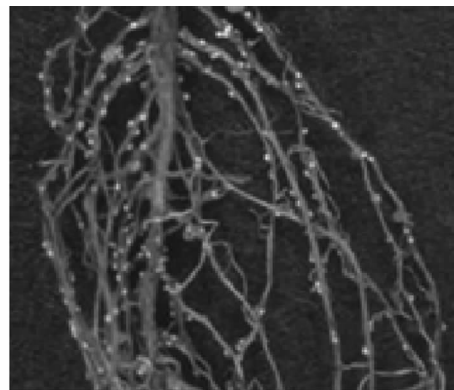


图2 根表皮露出变为胞囊

Fig. 2 The cyst on the roots

品红染色法在大豆胞囊线虫侵染根部约12~15 d取样,经品红染色即可见处于二龄期的幼虫,且这时恰好能够分辨雌虫与雄虫(图3),因此也可以准确地记录根部的雌虫数目。

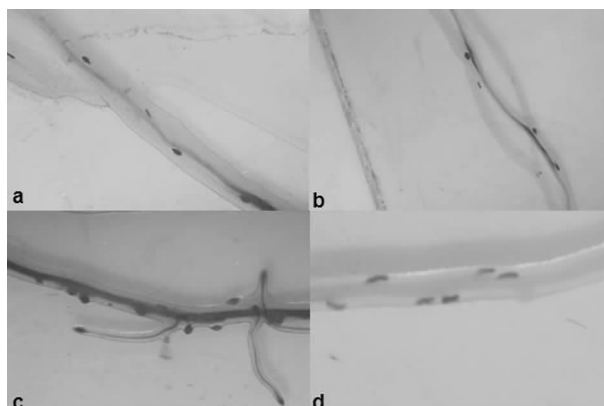


图3 胞囊线虫品红染色

Fig. 3 Fuchsin Dyeing of the cyst nematode

在取样时间上,与塑料钵柱法相比,30 d内可以进行2次鉴定,可以大大加快鉴定的速度。因此,对较大群体进行快速胞囊线虫抗性鉴定时,品红染色法比塑料钵柱法有优势。

2.3 播种条件的比较

塑料钵柱法种子需在蛭石中萌发再进行移栽,而采用品红染色法可直接将种子播种于病土中。

移栽可以保证鉴定所用的苗处于一致的生长状态,但采用品红染色法出苗后将生长状态不一致的苗拔掉,可以达到同样的目的,且省去了幼苗移栽的繁重工作。

3 讨 论

大豆胞囊线虫危害严重,选育抗病品种是主要的防治方法,近年来,分子标记辅助育种技术已逐渐成熟,这为加快大豆抗线育种提供了新的途径。而建立一种适合于较大规模大豆群体的快速有效的胞囊线虫抗性鉴定方法,对提高抗线分子标记辅助育种的效率至关重要。

经过对 2 种大豆胞囊线虫鉴定方法的比较发现,塑料钵柱法可观察到大豆胞囊线虫病的主要发病特征,包括叶片变黄,植株矮小,根部有胞囊形成等典型症状,可用于胞囊线虫和胞囊形态的鉴定;酸性品红染色法在鉴定胞囊线虫时未见叶片变黄,根部未见胞囊,由于可以在短时间内完成取样过程,然后经过漂洗及染色,在 20 × 显微镜下可见处于二龄期的幼虫,可以大大缩短鉴定周期。在数据稳定性方面,塑料钵柱法由于胞囊的脱落造成数据稳定性差,而品红染色法二龄期幼虫已被固定,不会随着时间的推移而发生变化从而减小误差。因此,采用品红染色法会提高分子标记辅助选育抗线品种(系)时数据的准确性,对于大豆胞囊线虫抗性 QTL 定位及抗性资源的筛选有重要意义。

参考文献

- [1] 靳学慧,辛惠普,郑雯,等. 长期轮作和连作对土壤中大豆胞囊线虫数量的影响[J]. 中国油料作物学报,2006,28(2):189-193. (Le X H, Xin H P, Zheng W, et al. The influence of soil on the long-term rotation and continuous cultivation on soybean cyst nematode[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2006, 28(2):189-193.)
- [2] 董丽民,许艳丽,李春杰. 黑龙江省大豆胞囊线虫胞囊密度和生理小种鉴定[J]. 中国油料作物学报, 2008,3(1):108-111. (Dong L M, Xu Y J, Li C J. Cyst density and subspecies identification of soybean cyst nematode in Heilongjiang province[J] Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2008;3(1):108-111.)
- [3] 王振华,时李波,吴海燕,等. 大豆根内胞囊线虫发育进程及分布[J]. 中国农业科学 2009,42(9):3147-3153. (Wang Z H, Shi L B, Wu H Y, et al. Distribution and developmental process of *Heterodera glycines* in soybean root[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009,42(9):3147-3153.)
- [4] Byrd D W, Kirkpatrick T, Barker K R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for the detection of nematodes[J]. Journal of Nematology, 1983, 15(1):142-143.
- [5] 刘学义,马俊奎,任小俊. 塑料钵柱法在大豆抗大豆胞囊线虫鉴定中的应用[J]. 华北农学报,1998,13(专刊):92-96. (Liu X Y, Ma J K, Ren X J, Identification of resistance to soybean cyst nematode in soybean plastic bowl column method in the application [J]. China Agricultural University, 1998, 13 (Special issue): 92-96.)
- [6] 齐军山,李长松,李林,等. 大豆胞囊线虫生理小种及其鉴定技术[J]. 中国油料作物学报,2000,22(4):71-74. (Qi J S, Li C S, Li L, et al. Soybean cyst nematode physiological races and identification method[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2000, 22(4):71-74.)
- [7] 卢为国,盖钧镒. 大豆对胞囊线虫抗性遗传与分子标记研究进展[J]. 大豆科学,2004,23(5):59-64. (Lu W G, Gai J Y. Advances in resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe) and resistant molecular markers in soybean (*Glycines max* Merr.) [J]. Soybean Science, 2004, 23(5):59-64.)
- [8] 吴和礼,姚振纯,李秀兰. 大豆胞囊线虫病抗病性鉴定技术的研究[J]. 大豆科学,1984,3(1):1-6. (Wu H L, Yao Z C, Li X L, et al. Studies on the methods of identification of resistant to cyst nematode (*Heterodera glycines*) [J]. Soybean Science, 1984, 3(1):1-6.)
- [9] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京:中国农业出版社,2000:23-26. (Liu W Z. Studies of plant pathogenic nematodes[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000:23-26.)
- [10] Noel G R, Stanger B A. Scanning electron microscopy of second-stage juvenile cephalic morphology in *Heterodera glycines* races [J]. Journal of Nematology 1986,8:475-478.
- [11] 刘维志,李秀兰,姚振纯. 大豆胞囊线虫抗病性鉴定技术的研究[J]. 大豆科学,1984,3(1):1-6. (Wu H L, Yao Z C, Li X L, et al. Studies on the methods of identification of resistant to cyst nematode (*Heterodera glycines*) [J]. Soybean Science, 1984, 3(1):1-6.)
- [12] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京:中国农业出版社,2000:23-26. (Liu W Z. Studies of plant pathogenic nematodes[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000:23-26.)
- [13] Noel G R, Stanger B A. Scanning electron microscopy of second-stage juvenile cephalic morphology in *Heterodera glycines* races [J]. Journal of Nematology 1986,8:475-478.
- [14] 刘维志,李秀兰,姚振纯. 大豆胞囊线虫抗病性鉴定技术的研究[J]. 大豆科学,1984,3(1):1-6. (Wu H L, Yao Z C, Li X L, et al. Studies on the methods of identification of resistant to cyst nematode (*Heterodera glycines*) [J]. Soybean Science, 1984, 3(1):1-6.)
- [15] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京:中国农业出版社,2000:23-26. (Liu W Z. Studies of plant pathogenic nematodes[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000:23-26.)
- [16] Noel G R, Stanger B A. Scanning electron microscopy of second-stage juvenile cephalic morphology in *Heterodera glycines* races [J]. Journal of Nematology 1986,8:475-478.
- [17] 刘维志,李秀兰,姚振纯. 大豆胞囊线虫抗病性鉴定技术的研究[J]. 大豆科学,1984,3(1):1-6. (Wu H L, Yao Z C, Li X L, et al. Studies on the methods of identification of resistant to cyst nematode (*Heterodera glycines*) [J]. Soybean Science, 1984, 3(1):1-6.)
- [18] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京:中国农业出版社,2000:23-26. (Liu W Z. Studies of plant pathogenic nematodes[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000:23-26.)
- [19] Noel G R, Stanger B A. Scanning electron microscopy of second-stage juvenile cephalic morphology in *Heterodera glycines* races [J]. Journal of Nematology 1986,8:475-478.
- [20] 刘维志,李秀兰,姚振纯. 大豆胞囊线虫抗病性鉴定技术的研究[J]. 大豆科学,1984,3(1):1-6. (Wu H L, Yao Z C, Li X L, et al. Studies on the methods of identification of resistant to cyst nematode (*Heterodera glycines*) [J]. Soybean Science, 1984, 3(1):1-6.)
- [21] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京:中国农业出版社,2000:23-26. (Liu W Z. Studies of plant pathogenic nematodes[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000:23-26.)
- [22] Zakria M, Ohsako A, Saeki Y, et al. Colonization and growth promotion characteristics of *Enterobacter* sp. and *Herbaspirillum* sp. on *Brassica oleracea* [J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2008, 54: 507-516.
- [23] Li X, Wu Z Q, Li W D, et al. Growth promoting effect of a transgenic *Bacillus mucilaginosus* on tobacco planting [J]. Applied Microbial and Cell Physiology, 2007, 74(5):1120-1125.
- [24] 王富民,张彦,吴皓琼,等. 解磷固氮菌剂的研制及其对小麦的增产效应[J]. 生物技术,1994,4(4):15-18. (Wang F M, Zhang Y, Wu H Q, et al. Study of dissolve phosphorus and nitrogen fixation bacterial manure as well as the effect of increase production for wheat [J]. Biotechnology, 1994, 4(4):15-18.)
- [25] 蒲一涛,钟毅沪,周万龙. 固氮菌和纤维素分解菌的混合培养及其对生活垃圾降解的影响[J]. 环境科学与技术,1999(1):15-18. (Pu Y T, Zhong Y H, Zhou W L. The mixed culturing of nitrogen-fixation bacteria and cellulose decomposing organism and the effects on the decomposing of the household garbage [J]. Environmental Science and Technology, 1999(1):15-18.)
- [26] 刘丽丽,王金华. 磷细菌和钾细菌混合培养的研究[J]. 南开大学学报(自然科学),1995,28(3):21-25. (Liu L L, Wang J H. A study on the mixed culture of potassium bacteria and phosphorus bacteria [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis, 1995, 28(3):21-25.)

(上接第 273 页)