

野生大豆种质资源对大豆菌核病抗性评价

董利东¹,王金生²,吴俊江²,李文滨¹,邱丽娟³,常汝镇³,徐鹏飞¹,张淑珍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. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所,黑龙江 哈尔滨 150086;3. 中国农业科学院 作物科学研究所,北京 100081)

摘要:采用离体叶柄接种法,利用大豆菌核病分离物 jia30 和 jian29 对来自全国 11 个省份的 286 份野生大豆资源进行了抗性鉴定。结果表明:在 289 份材料中,对 jia30 和 jian29 均表现抗性的材料有 34 份,占供试材料的 11.8%;抗菌核病菌株 jian29 的材料 50 份,占供试材料的 17.4%;抗菌核病菌株 jia30 的材料 62 份,占供试材料的 21.6%。根据野生大豆的来源分析发现,辽宁、黑龙江和吉林存在较多的抗大豆菌核病野生大豆种质资源。

关键词:野生大豆;种质资源;大豆菌核病;抗性鉴定

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2014.06.0900

Identification the Resistance of Wild Soybean Germplasm to *Sclerotinia sclerotiorum*

DONG Li-dong¹, WANG Jin-sheng², WU Jun-jiang², LI Wen-bin¹, QIU Li-juan³, CHANG Ru-zhen³, XU Peng-fei¹, ZHANG Shu-zhen¹

(1. Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University/Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Ministry of Education, Harbin 150030, China;2. Soybean Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China;3. Crop Science Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: *Sclerotinia stem rot* of soybean is a fungal disease caused by [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary] in the world. Resistance breeding was the most economical and environmentally safe method for controlling the disease, and screening on the resistance germplasm was the base for utilization of resistant cultivars. In this study, 286 wild soybean germplasm from 11 provinces in China, were identified for the reaction to strong virulent soybean *Sclerotinia* isolates of Jia30 and jian29 using leafstalk inoculation *in vitro* technique. The results showed that there were 34 wild soybean germplasm both resistant to Jia30 and jian29, accounting for 11.8% of the total materials tested. A total of 50 wild soybean germplasm were resistant to jian29, accounting for 17.4% of tested materials. 62 materials were disease-resistant to jia30, accounting for 21.6%. The wild soybean germplasm from Liaoning, Heilongjiang and Jilin with resistance to *Sclerotinia* was relatively high.

Key words: Wild soybean; Germplasm; *Sclerotinia sclerotiorum*; Resistance evaluation

由 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary] 引起的大豆菌核病是一种世界性大豆真菌病害^[1]。在巴西、加拿大、美国、南非和中国等国家均有报道^[2], 在中国主要分布于华北、华东、西南、东北地区等大豆产区, 以东北地区发病最为严重^[3]。流行年份减产 20% ~ 30%, 严重地块高达 50% 以上, 甚至绝产^[4]。近年来大豆菌核病危害面积逐渐增加, 危害程度逐年加重。菌核病菌具有的寄主范围广^[5], 生理小种分化不明显, 致病力无明显分化的特点, 因此在许多寄主植物上, 至今未找到有效的抗源。防治大豆菌核病最有效的方法是抗病育种, 而抗性资源筛选又是抗病育种的基础。虽有研究报道栽培大豆对菌核病菌存在着抗性差异^[6-8], 但由于大豆菌核病抗性资源缺乏^[9-10], 所以大大延缓了大豆抗性育种工作的开展。目前国际上利用人工接种的

方法对大豆抗菌核病鉴定的研究较多, 主要采用离体叶片法、叶柄剪切法和菌液喷雾法等, 已鉴定 Hodgson78 等 10 余份部分抗性种质^[11-14]。我国是大豆的起源地, 存在着丰富的野生大豆资源, 然而关于野生大豆抗菌核病资源筛选方面少有报道。为了扩大研究的范围, 拓宽抗病种质资源, 创造抗病新材料, 用来源于黑龙江致病性较强的大豆菌核病分离物 jia30 和 jian29 对来自全国 11 个省份的 286 份野生大豆进行了抗感鉴定, 以期获得抗性野生大豆种质资源, 为我国抗、耐大豆菌核病的育种研究提供种质资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料

野生大豆资源 286 份(来自全国 11 个省市, 由

收稿日期:2014-03-31

基金项目:国家自然科学基金(31171577, 31101167);黑龙江省杰出青年基金(JC201308);长江后备支持计划;龙江学者基金;哈尔滨市科技创新项目(2012RFQXN011, 2012RFXXN019)。

第一作者简介:董利东(1986-),男,硕士,主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail:donglidong1021@126.com。

通讯作者:张淑珍(1972-),女,教授,博导,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:dnzhshzh@163.com。

中国农业科学院作物科学研究所邱丽娟研究员提供),以感病品种合丰 25 为对照。病原菌菌种为较强致病性的大豆菌核病分离物 jia30 和 jian29^[15],分别采自佳木斯和建三江地区大豆种植田中的发病株上,经 PDA 培养基培养分离出菌丝鉴定、纯化后作为供试菌种。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌培养基的制备及菌种的扩繁 将新鲜的马铃薯洗净,称取 100 g 切成小块,加入 500 mL 蒸馏水煮沸 30 min,过滤,将 10 g 琼脂和 10 g 蔗糖加入滤液中搅拌融化后,制成 PDA 培养基。将灭过菌的培养基和培养皿放置于超净工作台中冷却,再将 15 mL PDA 培养基倒入直径为 10 cm 的培养皿中,冷却后用接种针将活化的病原菌接种于平皿中央,倒置于 25℃ 温箱中培养 6 d 接种备用。

1.2.2 植株的培养及接种 野生大豆种子先机械微破种皮,促进种子萌发,每个材料分别取 6 粒种子播种于掺入草炭土盆钵中,每个材料 3 次重复。参照矫洪双等^[16]的方法:采集盛花期植株生长点以下第 4 个节上叶片的叶柄,每个材料取 10 根顺序摆在铺有蛭石保湿的白瓷盘内,用打孔器(直径 1 cm)取 PDA 菌丝平皿内菌丝前缘 2 cm 范围菌块,以镊子将菌丝块放在叶柄中间,菌丝面朝向叶柄,然后套透明塑料袋封闭保湿,放置在(25 ± 2)℃、14 h 光照/8 h 黑暗环境下培养。

1.2.3 调查方法 从接种第 2 天开始每天以直尺测量可见病斑大小,并以第 7 天病斑大小作为该试验病情的最严重程度。

1.2.4 抗病性评价标准 按接种后各材料的发病表现,将发病程度分为 0~4 级。0 级:接种处无明

显病斑;1 级:接种处轻微病斑,长度 1~3 cm;2 级:接种处病斑长度在 3~6 cm,病斑环绕达全叶柄的 1/3;3 级:接种处病斑长度在 6~8 cm,病斑环绕达全叶柄的 1/3~2/3;4 级:接种处叶柄受到严重侵染,病斑绕及全叶柄。

以发病程度确定病情指数,病情指数以下列公式计算:

病情指数(DI) =

$$\frac{\sum(\text{病株数} \times \text{代表数值})}{\text{株数总和} \times \text{发病最重级的代表数值}} \times 100$$

相对抗病指数(Relative Index;IR)

$$= \ln[\text{Pi}/(1 - \text{Pi})] - \ln[\text{Pk}/(1 - \text{Pk})]$$

Pi:供试各材料的病情指数;Pk:对照品种的病情指数。

参照同类病害规定的抗(耐)病性评价标准^[13],结合试验所取得的各材料的发病程度差异,初步规定具体的抗病性指标。以 IR(病指范围)为指标将抗大豆菌核病的标准分为抗病、抵抗、感病和高感病 4 个级别,具体规定:当抗病标准 IR < -1.2 为抗病;当抗病标准 -1.2 ≤ IR < -0.4 为低抗;当抗病标准 -0.4 ≤ IR < 1.0 为感病;当抗病标准 IR ≥ 1.0 时为高感。

2 结果与分析

2.1 野生大豆的抗性资源筛选

由表 1 可知,接种 jian29 后,289 份材料中表现为抗病的有 50 份,占供试材料的 17.4%;低抗材料 16 份,占供试材料的 5.5%;感病材料 17 份,占供试材料的 5.9%;高感材料 203 份,占供试材料的 71.2%。

表 1 不同来源野生大豆资源对大豆菌核病分离物 jian29 的反应

Table 1 The reaction of wild soybean from different regions to the isolate jian29

省份 Province	数量 Number	对菌核病反应类型 Types			
		R	LR	S	HS
黑龙江 Hilongjiang	50	7(14.0%)	4(25.0%)	2(11.8%)	37(18.2%)
吉林 Jilin	45	7(14.0%)	3(18.8%)	5(29.4%)	30(14.8%)
辽宁 Liaoning	70	18(36.0%)	4(25.0%)	6(35.3%)	42(20.7%)
河北 Hebei	6	1(2.0%)	1(6.3%)	0	4(2.0%)
山西 Shanxi	32	5(10.0%)	1(6.3%)	0	26(12.8%)
河南 Henan	12	1(2.0%)	1(6.3%)	1(5.9%)	9(4.4%)
陕西 Shaanxi	30	6(12.0%)	1(6.3%)	1(5.9%)	22(10.8%)
江苏 Jiangsu	5	1(2.0%)	0	0	4(2.0%)
江西 Jiangxi	11	1(2.0%)	0	1(5.9%)	9(4.4%)
湖南 Hunan	20	2(4.0%)	1(6.3%)	1(5.9%)	16(7.9%)
内蒙古 Mongolia	5	1(2.0%)	0	0	4(2.0%)
合计 Total	286	50(17.4%)	16(5.5%)	17(5.9%)	203(71.2%)

LR = 低抗;R = 抗病;S = 感病;HS = 高感;括号内数值代表各省份抗感品种占同类型总数的百分比。下同。

LR = Low resistance;R = Resistant;S = Susceptible;HS = High susceptible. The value in brackets represent the percentage of the resistance and susceptible varieties to the total number of the same type. The same below.

表2 不同来源野生大豆资源对大豆菌核病分离物 jia30 的反应
Table 2 The reaction of wild soybean from different regions to the isolate jia30

省份 Province	数量 Number	对菌核病反应类型 Types			
		R	LR	S	HS
黑龙江 Heilongjiang	50	9(14.5%)	3(18.8%)	2(12.5%)	36(18.8%)
吉林 Jilin	45	8(12.9%)	2(12.5%)	6(37.5%)	29(15.1%)
辽宁 Liaoning	70	25(40.3%)	3(18.8%)	2(12.5%)	40(20.8%)
河北 Hebei	6	2(3.2%)	0	0	4(2.1%)
山西 Shanxi	32	4(6.5%)	0	1(6.3%)	27(14.1%)
河南 Henan	12	2(3.2%)	0	0	10(5.2%)
陕西 Shaanxi	30	6(9.9%)	3(18.8%)	1(6.3%)	20(10.4%)
江苏 Jiangsu	5	1(1.6%)	1(6.3%)	0	3(1.6%)
江西 Jiangxi	11	1(1.6%)	3(18.8%)	0	7(3.6%)
湖南 Hunan	20	2(3.2%)	1(6.3%)	3(18.8%)	14(7.3%)
内蒙古 Mongolia	5	2(3.2%)	0	1(6.3%)	2(1.0%)
合计 Total	286	62(21.6%)	16(5.5%)	16(5.5%)	192(67.4%)

而接种菌株 jia30 后,表现为抗病的材料 62 份,占供试材料的 21.6%;低抗材料 16 份,占供试材料的 5.5%;感病材料 16 份,占供试材料的 5.5%;高感材料 192 份,占供试材料的 67.4%(表 2)。同时兼抗 jia30 和 jian29 菌种的材料 34 份,占供试材料的 11.8%。

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 11 个省市(表 1),鉴定结果发现以上省市均有抗大豆菌核病野生大豆资源的分布。对于菌核病菌株 jian29,抗性材料多分布于辽宁(36.0%)、黑龙江(14.0%)、吉林(14.0%)、陕西(12.0%)、山西(10.0%),此外,辽宁(20.7%)分布较多的低抗材料;对于菌核病菌株 jia30,抗性材料多分布于辽宁(40.3%)、黑龙江(14.5%)、吉林(12.9%)、陕西 9.7%,同时辽宁(20.8%)和黑龙江(18.8%)也分布相对较多的低抗材料。通过两个菌株的抗性资源分布对比分析发现,辽宁、黑龙江和吉林省可能存在较多的抗大豆菌核病野生大豆种质资源。

3 结论与讨论

近年来,大豆菌核病发生逐渐加重,不断鉴定新的大豆菌核病的抗源,才可以确保大豆菌核病抗性育种的需求。申洪波等^[17]对黑龙江省 346 份种质资源进行大豆菌核病耐病性鉴定,鉴定出 1 级耐大豆菌核病的种质仅有 3 份。韩粉霞等^[18]利用不同地区和寄主来源的 4 个菌核病分离物对 44 份大豆微核心种质进行连续 2 年的田间接种鉴定,在 44 份微核心种质中,仅鉴定出中抗种质 6 份(13.64%)。由于栽培大豆资源有限,遗传基础狭窄,从野生大豆资源中发掘大豆菌核病抗病资源是一条有效途径。本研究采用离体叶柄接种方法,利用大豆菌核病分离物 jia30 和 jian29,对来自全国 11 个省市的 286 份野生大豆高世代品系进行接种鉴定。结果显示既表现抗 jia30 菌种又表现抗 jian29

菌种的材料 34 份,占供试材料的 11.8%,来源于辽宁、内蒙古和河北的野生大豆资源抗大豆菌核病比例较高。说明野生大豆中存在对菌核病表现稳定抗性的材料,但比例较低。此结果支持了关于菌核病抗原不易筛选的观点^[16]。根据野生大豆的来源分析发现,来源于辽宁、内蒙古和河北的野生大豆资源抗大豆菌核病比例较高。所鉴定的抗源可用于抗大豆菌核病育种,从而创造出新的抗病材料。

由于大豆菌核病症状的主要表现以主茎受到菌丝侵染为特征。对于此类病害的调查通常采用普遍率和严重度二个指标,普遍率的调查较为容易,且可重复性强,但严重度的情况则颇为复杂。考虑到相同条件下病斑长度的差异直接反映了不同大豆材料的抗病性差异,所以本试验采用了以病斑长度或直径来代表严重度,经试验结果的分析,这是一种简单、有效的方法。同时本试验采用相对抗病指数作为抗病指标,能够较为真实地反映出大豆抗、感性的本质,有效地提高了抗病鉴定结果的准确性和可靠性^[19]。

参考文献

- [1] Purdy L H. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact [J]. *Phytopathology*, 1979, 69: 875-880.
- [2] Hoffman D D, Hartman G L, Mueller D S. Yield and seed quality of soybean cultivars infected with *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Plant Disease*, 1998, 82: 826-829.
- [3] 苗保河. 大豆品种资源抗菌核病鉴定 [J]. *中国油料*, 1994, 3(16): 67-68. (Miao B H. Resistance identification to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean oil [J]. *Crops of China*, 1994, 16(3): 67-68.)
- [4] 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(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.)

(下转第 909 页)

- [4] Wang D, Wu H N, Hu X T, et al. Application of hazard analysis critical control points (HACCP) system to vacuum-packed sauced pork in Chinese food corporations[J]. Food Control, 2010, 21: 584-591.
- [5] 万娟, 钟国才, 陈威, 等. HACCP 体系在稻米加工中的应用[J]. 现代食品科技, 2012, 28(4): 445-448. (Wan J, Zhong G C, Chen W, et al. Application of HACCP system in rice production [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(4): 445-448.)
- [6] 刘志扬, 闫炳震, 王敏. HACCP 体系在复合维生素生产的应用[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(5): 210-212. (Liu Z Y, Yan B Z, Wang M. Application of HACCP system in the production of compound vitamin[J]. Food Research and Development, 2012, 33(5): 210-212.)
- [7] 庄沛锐, 丛懿洁, 孙为正, 等. HACCP 在果蔬肉脯加工工艺中的应用[J]. 现代食品科技, 2013, 29(6): 1437-1441. (Zhuang P R, Cong Y J, Sun W Z et al. Application of HACCP System in production of fruits and vegetables restructured jerky [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(6): 1437-1441.)
- [8] Peter M H, Andrew M P. HACCP-based program for on-farm food safety for pig production in Australia[J]. Food Control, 2011, 22: 1674-1688.
- [9] Ema M S, Li B, Rodolfo Ramirez-Valverde, et al. Comparison of implementing HACCP systems of exporter Mexican and Chinese meat enterprises[J]. Food Control, 2014, 38: 109-115.
- [10] Yaovi Ameyapoh, Comlan de Souza, Alfred S T. Hygienic quality of traditional processing and stability of tomato (*Lycopersicon esculentum*) puree in Togo [J]. Bioresource Technology, 2008, 99: 5798-5803.
- [11] Kyung Ryu, Ki-Hwan Park, Ji-Young Yang, et al. Simple approach in HACCP for evaluating the risk level of hazards using probability distributions[J]. Food Control, 2013, 30: 459-462.
- [12] 林真, 林梅西, 陈梅英, 等. HACCP 体系对出口速冻毛豆微生物的控制效果研究[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 222-225. (Lin Z, Lin M X, Chen M Y, et al. Study on microbial control effect of HACCP system on quick-frozen green soy bean[J]. Food Science, 2007, 28(12): 222-225.)
- [13] Samira S, Gilles S, Patrick G. A swot analysis of HACCP implementation in Madagascar [J]. Food Control, 2010, 21(3): 253-259.
- [14] 魏强华, 余春茹, 邓桂兰. HACCP 体系在椰子汁饮料加工中的应用[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(3): 103-106. (Wei Q H, Yu C R, Deng G L. Application of HACCP system to the processing of coconut milk beverage [J]. Food Research and Development, 2013, 34(3): 103-106.)

(上接第 902 页)

- [5] Purdy L H. Symposium on *Sclerotinia*. The seventh annual meeting of the American Phytopathological Society [J]. Phytopathology, 1978, 69(8): 857-880.
- [6] Boland G J, Hall R. Evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotium* under field conditions[J]. Plant Disease, 1987, 71: 934-936.
- [7] Chun D, Kao L B, Lockwood J L, et al. Laboratory and field assessment of resistance in soybean to stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Plant Disease, 1987(7): 811-815.
- [8] Cline M N, Jacobsen B J. Methods for evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Plant Disease, 1983, 64: 784-786.
- [9] 王金生, 于安亮, 徐鹏飞, 等. 栽培大豆种质资源对大豆菌核病的抗性评价[J]. 大豆科学, 2009, 28(6): 1054-1057. (Wang J S, Yu A L, Xu P F, et al. Identification of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean germplasm [J]. Soybean Science, 2009, 28(6): 1054-1057.)
- [10] 宋淑云, 张伟, 刘影, 等. 大豆品种对大豆菌核病 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 的抗性分析[J]. 吉林农业科学, 2009, 34(3): 30-32. (Song S Y, Zhang W, Liu Y, et al. Analysis on resistance of soybean varieties to *Sclerotinia sclerotium* [J]. Jilin Agricultural Science, 2009, 34(3): 30-32.)
- [11] Arahana S, Grac G L, Kent M, et al. Identification of QTL for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean [J]. Crop Science, 2001, 41: 180-188.
- [12] Chen Y, Wang D. Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Plant Disease, 2005, 12: 1268-1272.
- [13] Diers B W, Kopsisch-Obuch F J, Wang D C, et al. Registration of AxN-1-55 soybean germplasm with partial resistance to *Sclerotinia* stem rot [J]. Crop Science, 2006, 46: 1403-1404.
- [14] Wang D, Diers B W, Boyse J. Registration of Skylla soybean [J]. Crop Science, 2006, 46: 974-975.
- [15] 王金生. 大豆菌核病菌遗传多样性分析、抗病资源筛选及抗病基因的 QTL 定位[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2009. (Wang J S. Analysis of genetic diversity of *Sclerotinia sclerotiorum*, screening on resistant resources, and QTL mapping for tolerance gene [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2009.)
- [16] 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): 296-297. (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): 296-297.)
- [17] 申宏波, 丁俊杰, 孙文鹏, 等. 黑龙江省大豆种质对菌核病的抗病资源筛选[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(4): 136-140. (Sheng H B, Ding J J, Sun W P, et al. Screening of soybean germplasm of tolerance to *Sclerotinia sclerotiorum* in Heilongjiang province [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2012, 43(4): 136-140.)
- [18] 韩粉霞, 韩广振, 孙君明, 等. 44 份大豆微核心种质抗菌核病鉴定与评价[J]. 作物学报, 2013, 39(10): 1783-1790. (Han F X, Han G Z, Sun J M, et al. Resistance to *Sclerotinia* stem rot in 44 accessions from soybean mini core collection [J]. Acta Agronomica Sinica, 2013, 39(10): 1783-1790.)
- [19] 吴征彬, 郭介华, 冯纯大, 等. 棉花对枯、黄萎病的抗性研究[J]. 华中农业大学学报, 1998, 17(1): 1-5. (Wu Z B, Guo J H, Feng C D, et al. Studies on cotton resistance to *Fusarium* and *Verticillium* wilt [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 1998, 17(1): 1-5.)