

大豆菌核病鉴定方法研究进展

孙明明^{1,2}, 韩英鹏¹, 赵雪¹, 王萍², 吕世翔², 李智媛², 王冠², 李文滨¹

(1. 东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室/东北农业大学农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030;
2. 黑龙江省农业科学院 信息中心, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:大豆菌核病在全球范围内均有发生, 由于病原菌寄主范围较广, 难于防治, 对大豆产量和品质产生严重影响。对于大豆菌核病抗性种质资源的鉴定是抗性机理研究、基因定位及抗病育种工作的重要基础, 文章对大豆菌核病资源鉴定中涉及的接种体(菌丝、孢子和菌核)的培养、植株不同部位的接种鉴定、草酸鉴定、茎中可溶性色素水平测定及田间鉴定方法进行了系统的总结和分析, 并针对接种体的选择、环境条件对发病的影响及田间与温室鉴定结果不一致等问题展开讨论, 为大豆菌核病抗性资源的筛选, 菌核病发病机理及抗性基因的定位研究奠定基础。
关键词:大豆菌核病; 核盘菌; 鉴定; 接种体; 环境条件
中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2017.03.0470

Research Development of Identification Methods in Soybean White Mold

SUN Ming-ming^{1,2}, HAN Ying-peng¹, ZHAO Xue¹, WANG Ping², LYU Shi-xiang², LI Zhi-yuan²,
WANG Guan², LI Wen-bin¹

(1. Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education/Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding (Genetics) of Chinese Agriculture Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Information Center of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: Soybean white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*, SWM) caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary is a world-wide soybean disease. The pathogen has a extensive host range, so it is difficult to prevent and causes serious yield and quality loss every year. The SWM resistance identification of soybean germplasm is the foundation of resistance mechanism research, gene location and resistant breeding. We summarized and analyzed the inoculum (mycelium, ascospore, and sclerotia), and different identification methods (different plant parts inoculation, oxalic acid identification, soluble pigments content, and field identification), and discussed the choices of inoculum, environment factors influence and different results between growthroom and field identification. This paper could supply reference for SWM resistant germplasm screening, disease mechanism and resistant gene location.
Keywords: Soybean white mold; *Sclerotinia sclerotiorum*; Identification; Inoculum; Environment factors

大豆菌核病是一种全球范围内发生的大豆土传病害, 是由 *Sclerotinia Sclerotiorum* (Lib.) de Bary 侵染产生, 该病原菌寄主广泛, 对包括大豆、向日葵、油菜等在内的 500 多种植物均可造成侵染, 防治较为困难, 对大豆产量和品质产生严重影响^[1]。针对菌核病的病原菌生理特性及侵染循环等前人已经进行了较为透彻的研究^[2-4], 病原菌侵染的主要是利用前一年发病地块中残留在土壤中的菌核在次年产生子囊盘萌发子囊孢子, 开花期弹射侵染大豆花器, 并借助花粉管不断扩展侵染全株, 在冷凉多雨的气候条件下易造成大面积发病, 造成严重的产量损失。菌核病由于其寄主范围广, 菌核耐性强等特点, 防治较为困难^[5]。因此, 目前最有效的防治方法是选育耐大豆菌核病品种。

分子生物学技术的不断发展为大豆菌核病的抗病育种研究提供了新的手段, 近年来针对大豆菌

核病的分子生物学研究取得了一定的进展, 定位到了一批与大豆抗菌核病基因相关的遗传位点。Kim 和 Diers^[6]利用 Williams 82 × S19-90 的 F3 群体分别在连锁群 C2、K 和 M 上定位到了 3 个与菌核病抗性相关的 QTLs, 其中 2 个 QTLs 与大豆避害机制相关, 例如株高、倒伏性和开花日期等。Arahana 等^[7]利用感病品种 Williams 82 分别与 5 个部分抗性品种杂交获得的重组自交系在 15 个连锁群上定位到了 28 个抗病相关的 QTLs; Guo 等^[8]利用两个回交群体分析得出 4 个与大豆菌核病抗性相关的基因区域; Li 等^[9]利用合丰 25 × Maple Arrow 的 149 份 F_{5,6} 重组自交系群体获得了 3 个抗病相关 QTLs; Zhao 等^[10]通过简化基因组测序获得 330 个大豆种质资源的单倍型图谱, 包含 25 179 个高质量 SNP 标记, 通过全基因组关联分析在大豆 13 号染色体上发现主效抗病位点, 其中 5 个显著关联的 SNP 位于同

收稿日期: 2017-01-25
基金项目: 黑龙江省自然科学基金面上项目 (C2015011)。
第一作者简介: 孙明明 (1983 -), 女, 博士, 农艺师, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: soybeansmm1@126.com。
通讯作者: 韩英鹏 (1978 -), 男, 博士, 教授, 主要从事大豆遗传育种和分子生物技术研究。E-mail: hyp234286@aliyun.com。
李文滨 (1958 -), 男, 教授, 博导, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: wenbinli@neau.edu.cn。

一连锁不平衡区段中,另一个关联 SNP 未包含在连锁不平衡区段中;同时,检测到 3 个 SNP 与抗病性关联,分别分布在除 13 号染色体外的 3 个染色体上。

无论是传统育种方法还是分子生物学研究,对不同抗性种质资源的有效筛选是重要前提,学者们多年来利用不同接种体采用多种方法鉴定了大量的大豆资源,但大豆菌核病目前为止尚未有完全抗性的资源,但发现了部分抗性类型^[11-13]。大豆种质资源丰富,选择操作简便、重复性较好的菌核病鉴定方法一直是大家研究的重点基础工作,是后续研究可靠性的重要保障,因此本文对包括接种病原体的培养、不同器官接种、草酸鉴定等在内的多种鉴定方法进行了系统的综述,旨在为大豆菌核病研究抗性资源的筛选,菌核病发病机理及抗性基因的定位奠定基础。

1 接种病原体的培养

1.1 菌丝

采用菌丝接种鉴定是大豆菌核病鉴定中最常用的手段,主要分为固体菌丝块和菌丝悬浮液两种形式。菌丝的纯化方法为:从田间发病植株茎秆或发病地块土壤中取菌核,菌核依次在 70% 乙醇中浸泡 1 min 进行表面消毒,1% 次氯酸钠溶液中浸泡 3 min,蒸馏水中清洗 3 次,然后将菌核接种到含有 1 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯霉素的 PDA 培养基上,培养 3 d,温度为 20 ~ 22℃^[14],12 h 光照/12 h 黑暗,之后放入 4℃ 冰箱保存^[15]。待使用菌丝作为接种体时采用以上菌源进行重新扩繁,通常使用的培养基有 PDA、高粱^[16]、燕麦^[17]、胡萝卜^[16]、芹菜^[18]、大麦^[19]等,然后取生长较为旺盛的菌丝固体培养基进行侵染。菌丝悬浮液制备时取菌丝块接种进装有 PDB 培养基^[20]或麦芽提取物^[21]中,22℃,150 ~ 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 5 ~ 10 d,以菌丝生长情况为准,接种前高速搅拌 10 s 后用于鉴定操作。菌丝固体培养基具有操作简便的特性,因此鉴定过程中使用更为广泛。

1.2 菌核

在模拟田间病圃鉴定时,需人工繁育大量的菌核,菌核的实验室扩繁基本同菌丝体培养过程,消毒后在 PDA 培养基上,20℃ 12 h 光/12 h 暗条件下连续培养直至菌核长出^[15];另将 PDA 培养基上产生的菌丝体作为菌源,接种进装有浸泡后燕麦的大三角瓶中,2℃ 振荡培养 25 ~ 30 d,直至瓶中形成菌核,收集菌核室温下干燥后冰箱保存^[17]。受生长特性影响,菌核培养的周期较长,大量制备时工作量较大。

1.3 子囊孢子

大豆菌核病田间主要的侵染方式为花期子囊

孢子弹射侵染,因此孢子侵染在一定程度上最接近于自然发病,但由于子囊孢子难于制备^[3,22],采用孢子进行鉴定的报道较少^[23-24],Rousseau 等^[24]采用 Magenta® box 培养子囊孢子,首先将带有子囊盘的菌核转移到装有 10 mL 琼脂的 Magenta® box 中,盒子倒置摆放在 9 000 $\text{lm}\cdot\text{m}^{-2}$ 的灯下方 50 cm 处,显微镜载玻片放置在盒盖上收集释放出的孢子,孢子每 2 d 用刀片从玻片上刮取收集 1 次,4℃ 干燥器中保存。实验室条件下制备子囊孢子用于接种鉴定试验可参照上述方法进行调整改良,例如扩大容器体积,以便于大量孢子的制备。

2 植株不同部位的接种鉴定方法

2.1 子叶接种

子叶接种法在 V1 期即可进行接种操作,具有操作简便,鉴定周期短的特点。Kim 等^[17]在 V1 期利用长有菌丝的燕麦粒对子叶进行接种,首先在子叶距离主茎大约 3 mm 的位置上打 2 mm 直径圆孔,然后一个小孔中放一个培养后带有菌丝体的燕麦粒,处理植株放在 27 ± 2℃,叶片表面保有浮水的环境中培养,培养 5 ~ 7 d 后调查相应性状进行评价。Djordjie 等^[25]采用菌丝块接种子叶的方法对菌核病发病过程中大豆的抗氧化酶体系进行了研究,接种方法为切去 4 mm 接种 2 d 的 PDA 菌碟,菌丝面朝下放置在 V1 期子叶的中间位置,每天喷雾保湿。Kull 等^[26]采用 3 mm²菌丝块进行接种,但摆放位置选择了子叶与主茎的临近处。Djordjie 和 Kull 等^[25-26]的方法中,需要注意菌丝块位置的固定,而子叶上制造伤口侵染更有利于固定接种体,但要保证创伤位置的一致,以减小试验误差。子叶接种鉴定时均采用的是菌丝体,便于侵染和观察,除燕麦粒和 PDA 菌丝块外,其它培养方式的菌丝体均可以作为接种菌源。

2.2 茎接种

大豆菌核病的茎接种鉴定主要分为两种方式,一种是直接在活体植株上进行,一种是将茎段切下进行接种鉴定,接种体主要有菌丝固体培养基和菌丝悬浮液。

2.2.1 活体植株茎接种 Rousseau 等^[24]取 R1 ~ R2 期开花的植株,利用解剖刀去除第一节位的花序,将培养 2 d 的 10 mm PDA 菌丝块放置在伤口处,其上以湿润的棉片覆盖以保证侵染环境的湿度;Monik 等^[1]在茎顶端制造切口放置 PDA 菌丝块^[27-28]进行接种研究菌核病菌侵染后大豆的生化反应机制。茎的活体接种方法还可以采用菌丝悬浮液侵染的方式,但由于操作比较复杂应用较少,Chen 等^[20]将制备好的 OD₆₀₀ 为 1.5 ~ 2.0 的菌丝悬浮液喷洒在 V3 期的大豆的叶片和主茎上,平均用

量为4.6 mL·株⁻¹,另一种方式为将悬浮液滴在顶端分生组织上,标准为少部分菌液可以沿主茎下流,平均用量为1 mL·株⁻¹。

2.2.2 茎的离体接种 Kull等^[26]取第5~6片三重复叶完全展开时的大豆植株,利用剃刀片自第4或5节上方0.5 cm处垂直切取主茎,然后从培养基边缘切取3 mm²生长旺盛的菌丝块菌丝面向下放置在主茎切口处,相对温度(RH)80%,20±1℃,黑网遮光培养。Vuong等^[29]采用的接种方法与Kull等的方法类似,但取样时期稍早,为第4片复叶完全展开时进行取样接种。茎的离体接种法取样时期十分重要,进入生殖生长期的主茎木质化程度较高,不利于取样和菌丝侵染。

2.3 花接种

Rousseau等^[24]分别采用菌丝块和孢子对花进行了接种,菌丝接种时,取培养2 d的10 mm菌碟的1/8放入最下节的一朵花中,然后利用喷雾器保湿培养进行鉴定观察;子囊孢子接种时,在R1~R2期每株选2~3朵花接种10 μL孢子悬浮液[采用水和表面活性剂调节孢子悬浮液浓度为(3~5)×10⁴·mL⁻¹],自然光源下,16 h光/8 h暗,28℃/25℃,RH80%,培养5 d后转入28℃/25℃,RH80%的温室中继续培养观察侵染情况。

Bastien等^[18]在R1期前,采用菌丝悬浮液浸润的棉片覆盖在第一节的分化花芽的叶柄基部,培养7~8 d后观察病斑长度。棉片法采用菌丝直接侵染花芽,排除了植株的避病机制,同时棉片可以保持湿润的侵染环境。

菌核病田间侵染时主要是花期的孢子侵染,但由于子囊孢子的产生和收集工作比较耗时,因此应用较少。

2.4 叶片接种

大豆菌核病的叶片接种多采用离体叶片接种方法,主要是采用PDA菌碟接种,但在取样时期、菌碟摆放位置、叶片是否制作伤口、保湿方式等方面存在一定的差别。Kull等^[26]取生长28 d的植株上最新一片完全展开的三出复叶,接种中间叶片,菌碟摆放在主叶脉距离叶缘之间,轻压以保证贴合,以湿润的纸面巾保湿,铝盘整体使用塑料薄膜包裹,(20±2)℃培养。Wegulo等^[15]取R1~R3期顶端数第三片三出复叶的其中的一片,放在装有2%水琼脂的培养皿中,在叶片正面距离叶边缘1~3 mm处用钉子制造2 mm直径的伤口,然后在伤口上放置10 mm直径大小的培养5~7 d的菌碟,培养皿以封口膜缠绕,20℃,12 h光/12 h暗条件下培养。

Zhang等^[30]采用菌丝悬浮液对离体叶片进行接种,取生长28 d植株完全展开的三出复叶,放在铺有三层纸毛巾的塑料托盘中,每片叶在主叶脉中

心处滴50 μL菌丝悬浮液,喷雾保湿,19~21℃培养,5 d后观察叶片侵染情况进行鉴定评价。

2.5 叶柄接种

叶柄接种法与茎的离体鉴定法类似,即取R1期3片复叶的叶柄接种PDA菌碟进行菌核病鉴定^[17,31-34]。相对于其它接种方法,接种叶柄所需要的空间较小,因此可以用于一次性进行大量资源的接种试验。

3 其它鉴定方法

3.1 草酸鉴定

研究表明草酸是核盘菌致病性的关键因子,它作为一种非特异性毒素^[35],使寄主组织的pH降低,阻碍寄主防御系统的酶活性发挥,提高破坏寄主细胞壁的相关酶活性^[36],可能阻碍氧化酶的激发及Ca²⁺向细胞液的流动^[37],在病害发展过程中诱导寄主细胞的坏死反应Kim等^[38],在侵染过程中参与钙调节并在侵染后期产生毒害作用^[35],因此利用草酸进行菌核病抗性鉴定得到普遍的认可。鉴定方法为取R1~R3期的大豆,距离土层5 cm处剪断,剪掉除顶端两片完全展开的三出复叶外的其它叶片及叶柄,立即插入装有10 mL 40 mmol·L⁻¹草酸的16 mm×150 mm试管中,4 d后测定茎的褪色长度^[15]。

3.2 茎中可溶性色素水平测定

采用草酸进行鉴定时,插有部分抗性材料茎的草酸溶液会呈现粉红色,因此色素水平在一定程度上反映了材料的抗性,选择V1~V2期的大豆植株主茎操作同草酸鉴定,20℃,12 h光/12 h暗培养48 h后,取4 mL试管中的草酸溶液测定518 nm处的最大吸光值^[9-10,15]。

3.3 田间鉴定

以上介绍的方法都是在实验室内对菌核病进行鉴定,田间鉴定除在菌核病常年发病地块进行种植外,还可以采用人工接种菌核的方式,菌核可以采自田间发病植株,还可以人工进行扩繁^[24],田间的接种量一般为80个·m⁻²^[15]。McLaren和Craven^[16]还采用开花后田间人工播撒菌丝扩繁的高粱的方法进行第一次田间接种鉴定,14 d后进行二次接种,分别采用高粱菌丝接种体和喷洒菌丝溶液两种方法。由于菌丝在田间接种时因环境条件影响容易失活,因此二次接种十分必要。

4 讨论与展望

4.1 接种体对大豆菌核病鉴定的影响

大豆菌核病鉴定过程中通常采用菌丝、孢子和菌核3种方式进行接种,基于菌丝扩繁比较简便的特性,采用菌丝接种的方式较多,但扩繁的方式存

在差别,例如 PDA、燕麦、高粱、胡萝卜、芹菜等培养基均有使用,目前为止没有文献对不同扩繁方式是否对侵染产生影响进行比较, Kim 等^[17] 研究显示菌丝扩繁的燕麦粒接种后较 PDA 菌丝块早 1 d 出现症状,但认为不同的扩繁方式可根据鉴定方法的不同进行选择,保证接种的一致性即可。

子囊孢子接种方式在菌核病的鉴定研究中应用较少,这与孢子的大量制备及保存比较困难有很大的关系,但 Rousseau 等^[24] 认为尽管繁殖和收集子囊孢子的过程较为费时,但这种接种方法对于评价大豆对于菌核病的抗性十分可靠,温室中孢子接种与田间花期的菌丝接种鉴定结果表现的一致性说明孢子接种方法可以很好地模仿核盘菌的自然侵染,且温室内鉴定方法通常都规避了植株自身的防御机制,但是这种假设还需要大量资源的鉴定试验验证。

采用菌核进行田间接种鉴定时植株历经全生育期,自身的避病防御机制等可以得到充分的发挥,完全处于自然发病状态下,对于资源的抗性评价更为客观,但由于年际气象条件的不同,需进行多年重复试验验证。

无论采用哪种方式进行扩繁,对于最初选择的菌源进行致病力的鉴定是重要前提^[14],即使同一地块的病原菌在侵染力上也会存在较大差异。Kull 等^[26] 认为在可控制环境下进行大豆资源的菌核病抗性鉴定,结果的准确性主要取决于采用的鉴定方法和核盘菌分离物的选择,分离物侵染性的差异会对结果产生影响。此外 Zhang 等^[30] 认为如果田间试验中的核盘菌致病性与温室鉴定所使用的菌种差异较大,则二者的鉴定结果会产生较大的差异,因此建议在实验室可以采用多种菌源进行鉴定。

4.2 环境条件对于发病的影响

众所周知,病害的发生主要取决于基因型与环境的互作,对于大豆资源进行菌核病抗性环境条件的控制对于鉴定结果的准确性有着至关重要的作用。Pennypacker 和 Risius^[39] 发现光照条件影响资源的抗性表现, Peltier 和 Grau^[34] 比较了不同光照强度对大豆菌核病发病的影响,结果表明光照强度可以改变发病程度,影响病害的表型, $337 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光强下,田间和温室表现极显著相关。由于光照强度影响植株的光合效率,因此低光强条件下,植株光合效率较低,更易遭受病原菌的侵染^[40]。还有研究表明大豆品种分为光强度敏感型和不敏感型两种,接种期间随着光强的增加,光敏感型品种的发病率降低,光不敏感型品种的发病率则比较稳定^[39,41]。

除光照外温度和湿度也是影响菌核病侵染的重要环境因子。核盘菌适宜在冷凉、潮湿的环境中

存活,因此通常接种后温度都保持在 22°C 左右,相对湿度保持在 80% 以上。

4.3 温室与田间鉴定结果的不一致性

多年来,国内外对大豆资源菌核病抗性鉴定存在在一个统一的问题,即温室与田间的鉴定结果存在不一致的现象,对其原因的分析主要有以下几点:田间鉴定条件下,植株的株高、冠层、密度、倒伏、花期及成熟期等性状会形成避病机制^[33],自然气象条件变化较大,此外田间菌核的侵染力存在差异,这些因素都会造成田间发病的不稳定性;温室条件下进行鉴定,人为对接种方法和病原菌进行选择,规避了植株自身的避病机制,通常选用侵染力最强、侵染活性最高的接种体进行鉴定,并采用冷凉高湿的环境条件进行侵染,整体试验条件一致,则更有利于植株发病,虽然很容易观察到发病症状,但由于侵染力较强,会造成一些部分抗性品种的流失,误判为感病品种。因此,不能仅以温室与田间鉴定结果不一致淘汰资源,田间试验应进行多年重复,温室鉴定则需要根据试验目的进行鉴定方法的选择。

自 1947 年首次报道以来,大豆菌核病的研究已经取得了较大的进展,但由于目前为止仍未鉴定出抗性资源,部分抗性的资源也十分有限,这在一定程度上限制了对于抗性机理、基因定位等方面的深入研究,本文对大豆菌核病多种鉴定方法进行总结和分析,但未对不同鉴定方法的准确性做以评价,因为接种鉴定结果的准确性与菌源、环境条件等多种因素相关,仍需要利用大量资源、结合不同侵染性的致病菌进行不断的摸索验证。

参考文献

- [1] Monik E L, Joaõ B D S, Pedro M R J, et al. Biochemical responses associated with common bean defence against *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. European Journal of Plant Pathology, 2014, 138: 391-404.
- [2] Boland G J, Hall R. Epidemiology of *Sclerotinia* stem rot of soybean in Ontario [J]. Phytopathology, 1988, 78: 1241-1245.
- [3] Coley-Smith J R, Cooke R C. Survival and germination of fungal sclerotia [J]. Annual Review of Phytopathology, 1971, 9: 65-92.
- [4] Doupnik B J. Soybean production and disease loss estimates for north central United States from 1989 to 1991 [J]. Plant Disease, 1993, 77: 1170-1171.
- [5] Singh S P, Schwartz H F. Breeding common bean for resistance to disease: A review [J]. Crop Science, 2010, 50: 2199-2223.
- [6] Kim H S, Diers B W. Inheritance of partial resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean [J]. Crop Science, 2000, 40: 55-61.
- [7] Arahana V S, Graef G L, Specht J E. Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean [J]. Crop Science, 2001, 41: 180-188.
- [8] Guo X M, Wang D C, Gordon S G, et al. Genetic mapping of

- QTLs underlying partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean PI 391589A and PI 391589B [J]. *Crop Science*, 2008, 48;1129-1139.
- [9] Li D M, Sun M M, Han Y P, et al. Identification of QTL underlying soluble pigment content in soybean stems related to resistance to soybean white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) [J]. *Euphytica*, 2010, 172;49-57.
- [10] Zhao X, Han Y P, Li D H, et al. Loci and candidate gene identification for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean (*Glycine max* L. Merr.) via association and linkage maps [J]. *The Plant Journal*, 2015, 82(2);245-255.
- [11] Nelson B D, Helms T C, Olson M A. Comparison of laboratory and field evaluation of resistance in soybean to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Plant Disease*, 1991b, 75;662-665.
- [12] Kim H S, Sneller C H, Diers B W. Evaluation of soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia* stem rot in field environments [J]. *Crop Science*, 1999, 39;64-68.
- [13] Hartman G L, Gardner M E, Hymowitz T, et al. Evaluation of perennial *Glycine* species for resistance to soybean fungal pathogens that cause *Sclerotinia* stem rot and sudden death syndrome [J]. *Crop Science*, 2000, 40;545-549.
- [14] Nelson B D, Helms T C, Kural. Effects of temperature and pathogen isolate on laboratory screening of soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 1991, 71;347-352.
- [15] Wegulo S N, Yang X B, Martinson C A. Soybean cultivar responses to *Sclerotinia sclerotiorum* in field and controlled environment studies [J]. *Plant Disease*, 1998, 82(11);1264-1270.
- [16] McLaren N W, Craven M. Evaluation of soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia* stalk rot in South African [J]. *Crop Protection*, 2008, 27;231-235.
- [17] Kim H S, Hartman J B, Manandhar G L, et al. Reaction of soybean cultivars to *Sclerotinia* stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations [J]. *Crop Science*, 2000, 40;665-669.
- [18] Bastien M, Huynh T T, Giroux G, et al. A reproducible assay for measuring partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean [J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2012, 92;279-288.
- [19] Auclair 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.
- [20] Chen Y, Wang D. Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to *Sclerotinia scleroiorum* [J]. *Plant Disease*, 2005, 89(12);1268-1272.
- [21] Boland G J, Hall R. Growthroom evaluation of soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 1986, 66;559-564.
- [22] Dillard H R, Ludwig J W, Hunter J E. Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination [J]. *Plant Disease*, 199, 79;411-415.
- [23] Hunter J E, Dickson M H, Boettger M A, et al. Evaluation of plant introductions of spp. for resistance to white mold [J]. *Plant Disease*, 1982, 66(4);320-322.
- [24] Rousseau G, Thanh T H, Dostaler D, et al. Greenhouse and field assessments of resistance in soybean inoculated with sclerotia, mycelium, and ascospores of *Sclerotinia sclerotirum* [J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2004, 84(2);615-623.
- [25] Djordje M, Biljana K, Milan P, et al. Changes in antioxidant systems in soybean as affected by *Sclerotinia sclertiorum* (Lib.) de Barry [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48;903-908.
- [26] Kull L S, Powers K S, Eskridge K M, et al. Evaluation of resistance screening methods for *Sclerotinia* stem rot of soybean and dry bean [J]. *Plant Disease*, 2003, 87(12);1471-1476.
- [27] Pezoldt R, Dickson M H. Straw test for resistance to white mold in beans [J]. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 1996, 39;142-143.
- [28] Singh S P, Ter  n H, Schwartz H F, et al. Introgressing white mold resistance from Phaseolous species of the secondary gene pool into common bean [J]. *Crop Science*, 2009, 49;1629-1637.
- [29] Vuong T D, Hartman G L. Evaluation of soybean resistance to *Sclerotinia* stem rot using reciprocal grafting [J]. *Plant Disease*, 2003, 87(2);154-158.
- [30] Zhang J X, Xue A G. Evaluation of soybean cultivars for resistance to *Phomopsis longicolla* and *Sclerotinia sclerotiorum* using excised leaves [J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2014, 94;955-961.
- [31] Leone G, Tonneijck A E G. A rapid procedure for screening the resistance of bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Euphytica*, 1998, 48;87-90.
- [32] del Rio L, Kurtzweil N C, Grau C R. Petiole inoculation as a tool to screen soybean germplasm for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Phytopathology*, 2001, 91(S);S176.
- [33] Hoffman D D, Diers B W. Selected soybean plant introductions with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Plant Disease*, 2002, 86(9);971-980.
- [34] Peltier A J, Grau C R. The influence of light on relationships between *Sclerotinia* stem rot of soybean in field and controlled environments [J]. *Plant Disease*, 2008, 92(11);1510-1514.
- [35] Annerose H, Tanja W G. Oxalic acid has an additional, detoxifying function in *Sclerotinia sclerotiorum* pathogenesis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8);e72292.
- [36] Riou C, Freyssinet G, F  vre M. Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1992, 58;578-583.
- [37] Cessna S G, Sears V E, Dickman M B, et al. Oxalic acid a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant [J]. *The Plant Cell Online*, 2000, 12;2191-2199.
- [38] Kim K S, Min J Y, Dickman M B. Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development [J]. *Molecular Plant Microbe Interact*, 2008, 21;605-612.
- [39] Pennypacker B W, Risius M L. Environmental sensitivity of soybean cultivar response to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Phytopathology*, 1999, 89;618-622.
- [40] Kenyon D M, Dixon G R, Helfer S. Effects of relative humidity, light intensity and photoperiod on the colony development of *Erysiphe* sp. on *Phododendron* [J]. *Plant Pathology*, 2002, 51;103-108.
- [41] Pennypacker B W, Kniesel D P, Risius M L, et al. Photosynthetic photon flux density \times pathogen interaction in growth of alfalfa infected with *Verticillium albo-atrum* [J]. *Phytopathology*, 1994, 84;1350-1358.