

大豆种质对菌核病的耐病性评价及资源筛选

赵雪, 吕春梅, 韩英鹏, 滕卫丽, 李文滨 (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)

摘要 [目的] 探明大豆种质资源对大豆菌核病的耐受性(部分抗性)水平, 挖掘耐病种质资源是选育抗病品种的前提和基础。[方法] 通过茎中可溶性色素法和离体叶柄接种法对 130 份大豆品种(系)进行抗/耐病性评价。[结果] 2 种方法的评价结果相关系数达到 0.69, 通过色素法鉴定得到耐病材料 6 份, 中度耐病材料 16 份, 通过叶柄接种法获得高抗材料 13 份, 囊括了色素法筛选得到的全部耐病材料和部分中耐材料。[结论] 说明色素法作为一种间接鉴定方法, 筛选标准较叶柄接种法更为严格和精准, 适合大量种质资源的耐病性筛选。

关键词 大豆; 菌核病; 茎中可溶性色素水平; 耐病性

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)16-05014-04

Evaluation and Identification of Tolerance to *Sclerotinia Sclerotiorum* in Soybean Cultivars

ZHAO Xue et al (Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Ministry of Education, Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding/Genetics of Chinese Agriculture Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract [Objective] To explore the tolerance or partial resistance to *Sclerotinia Sclerotiorum* in soybean germplasm in appropriate methods and determine the basis of breeding for disease resistance. [Methods] Two methods were used, including soluble pigment in stem and petiole inoculation for resistance/tolerance identification were used to evaluate 130 soybean cultivars or lines. [Results] The correlation coefficient of results from two methods was 0.69. A total of 6 accessions were found to be tolerance and 16 were showed medium tolerance to *Sclerotinia Sclerotiorum* through measuring soluble pigment in stem after treated with oxalic acid. A total of 13 resistant accessions were identified to be resistant to *Sclerotinia Sclerotiorum* by petiole inoculation method, including all the 6 tolerant and partial medium tolerant accessions that were screened by the method of soluble pigment in stem. [Conclusion] The soluble pigment in stem method was stricter than petiole inoculation method in resistance identification and can be used for identification of tolerant germplasm to *Sclerotinia Sclerotiorum* from plenty of soybean accessions.

Key words Soybean; *Sclerotinia Sclerotiorum*; Soluble pigment in stem; Tolerance

大豆菌核病(*Sclerotinia sclerotiorum*)于 1946 年在加拿大安大略州首次被发现^[1-2], 相继在世界范围内扩展传播^[3-5]。目前, 大豆菌核病已成为仅次于大豆胞囊线虫的第二大世界性病害^[6]。该病原菌为核盘菌属, 在大豆苗期、成株期均可发病, 严重时致植株死亡, 严重影响大豆产量^[7]。在生产上, 抗病品种的有效利用可以降低该病害带来的产量损失。筛选对大豆菌核病具有抗性的种质资源是选育抗病品种的前提和基础。针对大豆种质资源的抗菌核病鉴定研究, 国内外均有报道。早在 1987 年, Boland 等^[8]报道大豆种质资源中存在对菌核病的部分抗性即耐病性, 大豆栽培种 Maple Arrow 为典型的部分抗性种质。我国大豆菌核病抗病资源筛选研究开始较晚, 矫洪双等^[9]于 1994 年报道了大豆菌核田间抗性鉴定, 孙鲜凤等^[10]、王金生等^[11]相继报道了大豆菌核病抗性鉴定的研究, 但多数研究所用的鉴定方式不尽相同。大豆菌核病抗性或部分抗性鉴定方法较多^[12-16], 其中离体茎的可溶性色素法是一种快捷的鉴定手段, 适合大量

种质资源的筛选。笔者采用该方法对 130 份栽培大豆种质资源进行耐感性初评, 并利用离体叶柄法结果与之比较, 进一步确认鉴定结果的可行性和精准性, 为大豆抗菌核病种质资源大量筛选工作提供支持, 同时为抗病亲本的选择和优异抗病基因的挖掘奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株。采集东北农业大学实验实习基地大豆种植田中发病株的菌核, 经马铃薯葡萄糖琼脂(Potato Dextrose Agar, PDA)培养基培养分离出菌丝, 保存于培养基中备用。

1.1.2 供试大豆种质资源。供试材料包括生产推广的大豆品种及优良品系共 130 份(表 1), 感病对照品种为合丰 25^[17], 抗病对照品种为 Maple Arrow^[8]。

1.2 鉴定方法

1.2.1 茎中可溶性色素法及评价标准。茎中可溶性色素法(简称色素法)参考孙鲜凤等^[10]的方法, 并在实施中加以改进。具体方法: 将供试材料播种于温室盆栽, 12 h 光暗交替, 每份材料保苗 10 株。在第一复叶展开时期选取长势一致的大豆植株, 自子叶痕处剪断, 并剪去所有叶片, 用浓度 40 mmol/L 草酸处理 48 h 后, 测定试管中草酸溶液在 518 nm 处的吸光值(OD_{518})。每份材料重复 5 次, 取 OD_{518} 平均值进行评价。

1.2.2 离体叶柄接种法及评价标准。用 PDA 培养基培养核盘菌, 活化 6 d 后的菌丝体用于接种鉴定。接种和抗性分级参照矫洪双等^[15]的方法, 略改进。在长宽高为 70 cm × 40 cm × 15 cm 的矩形塑料盒内铺 5 cm 厚的蛭石, 用灭菌蒸馏水

基金项目 国家“十二五”科技支撑计划(2011BAD35B06-1); 现代农业农业部大豆产业技术体系项目(CARS-04-PS04); 国家重点基础研究发展计划“973 计划”项目(2012CB126311); 国家自然科学基金项目(31201227, 31301339); 中国博士后项目(20110491024); 黑龙江省博士后项目(LBH11220, LBH-TZ1210); 黑龙江省教育厅骨干教师项目的资助项目(1252G014); 黑龙江省教育厅新世纪项目优秀人才的资助项目(1253-NCET-005); 教育部博士点项目(2012232-5120012); 东北农业大学博士后启动金项目(2012-RCB11); 大豆生物学教育部重点实验室开放基金项目(SB12A05)。

作者简介 赵雪(1983-), 女, 黑龙江绥化人, 助理研究员, 从事大豆遗传育种研究。

收稿日期 2014-05-09

完全浸润后,将纱布铺于上层,采集田间盛花期大豆植株生长点以下第4个节上生长的叶柄置于纱布上,接种直径1 cm带有核盘菌活化菌丝的琼脂块,敷保鲜膜保湿,放置在(25 ± 2)℃、12 h光照环境下观察其菌丝侵染情况。接种后以第7天茎腐长度作为评价基础数据。将叶柄腐烂严重度记载标

准规定为0~4级,分别为免疫、高抗、中抗、中感和感病类型。0级:接种处无明显病斑;1级:接种处病斑长度1~3 cm;2级:接种处病斑长度在3~6 cm;3级:接种处病斑长度在6~8 cm;4级:接种处病斑长度在8 cm以上,病斑绕叶柄,并有黑色菌核产生^[15]。

表1 参试大豆种质资源信息

品种名称	品种来源	品种名称	品种来源	品种名称	品种来源	品种名称	品种来源
黑农 37	黑龙江	垦丰 14	黑龙江	绥农 14	黑龙江	铁豆 54	辽宁
合丰 47	黑龙江	东农 L-79	黑龙江	黑河 48	黑龙江	铁豆 58	辽宁
绥 04-5804	黑龙江	华疆 4403	黑龙江	和龙油太	黑龙江	辽豆 3 号	辽宁
抗线 2 号	黑龙江	北 1361	黑龙江	绥农 30	黑龙江	中黄 13	北京
哈 04-1824	黑龙江	东农 48	黑龙江	垦农 29	黑龙江	中品 03-5179	北京
东农 L-13	黑龙江	黑农 51	黑龙江	黑河 18	黑龙江	中品 03-5355	北京
绥 03-3046	黑龙江	绥农 28	黑龙江	合丰 50	黑龙江	中豆 32	北京
元宝金	黑龙江	黑农 44 号	黑龙江	黑农 48	黑龙江	中黄 10 号	北京
垦 04-8579	黑龙江	垦农 30	黑龙江	东农 8004	黑龙江	中作 00-683	北京
东农 46	黑龙江	克北 1 号	黑龙江	绥农 1 号	黑龙江	中豆 35	北京
黑河 45	黑龙江	东农 49	黑龙江	压破车	黑龙江	中品 03-5334	北京
合 05-991	黑龙江	绥 02-339	黑龙江	东农 L-79	黑龙江	小白脐	北京
嫩丰 15	黑龙江	东农 594	黑龙江	东农 L-21	黑龙江	中豆 27	北京
牡丰 1 号	黑龙江	合丰 25	黑龙江	丰地黄	吉林	早熟 18	北京
猫眼豆	黑龙江	东农 56	黑龙江	铁荚四粒黄	吉林	中豆 33	北京
抗线 3 号	黑龙江	北 1484	黑龙江	九农 21 号	吉林	诱变 30	北京
黑农 55	黑龙江	华疆 1 号	黑龙江	吉林 47	吉林	中黄 20	北京
东农 50	黑龙江	绥农 25	黑龙江	吉育 94 号	吉林	化诱 446	北京
垦丰 22	黑龙江	东农 42	黑龙江	吉林 30 号	吉林	中黄 35	北京
绥农 29	黑龙江	东农 L-5	黑龙江	吉林茶里花	吉林	中品 03-5363	北京
合丰 52	黑龙江	黑河 38	黑龙江	九农 20	吉林	冀豆 17	河北
东农 93-046	黑龙江	绥农 10 号	黑龙江	茶色豆	吉林	石大豆 1 号	河北
丰收 6 号	黑龙江	北 4834	黑龙江	V111-4	吉林	大屯小黑豆	河北
绥 04-6018	黑龙江	小粒秣食豆	黑龙江	吉育 89	吉林	邯豆 5 号	河北
北 1873	黑龙江	北豆 14	黑龙江	黑秣食豆	吉林	DY2004-5	河北
东农 44	黑龙江	红丰 11	黑龙江	白城秣食豆	吉林	呼交 04-528	内蒙古
北丰 9 号	黑龙江	合丰 55	黑龙江	大粒黑豆	辽宁	蒙豆 9 号	内蒙古
东农 47	黑龙江	合 05-31	黑龙江	辽农 2 号	辽宁	呼交 03-286	内蒙古
嘟噜豆	黑龙江	华疆 2 号	黑龙江	铁荚子	辽宁	蒙豆 14 号	内蒙古
黄宝珠	黑龙江	东农 07-909	黑龙江	铁豆 51	辽宁	呼交 423	内蒙古
嫩丰 11 号	黑龙江	东农 L-57	黑龙江	铁豆 50	辽宁	Maple Arrow	加拿大
庆安黑豆	黑龙江	黑龙江 41	黑龙江	铁丰 8 号	辽宁		
龙选 1 号	黑龙江	合丰 35	黑龙江	铁豆 52	辽宁		

2 结果与分析

2.1 茎中可溶性色素法鉴定结果 参试的130份大豆种质资源茎中可溶性色素水平分布情况见图1。频数分布显示,草酸处理后的供试材料在518 nm下的吸光值为0.001~0.058,其中耐病标准品种Maple Arrow的吸光值为0.058,为供试品种中的最大值,感病对照品种合丰25的吸光值为0.009,吸光值低于感病对照品种的材料占总体的54%,说明对菌核病敏感的品种在种质资源中占主体地位(图1A)。

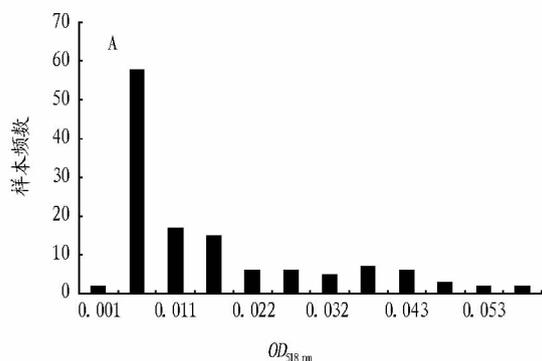
图1B虚线指示吸光值的经验分布右尾分界线,0.05水平经验分布临界值为0.048,说明吸光值高于该临界值的材料耐病水平显著高于其他材料。以此临界值为标准,结合前人研究的耐病性划分方法,进一步确定了较为合理的划分标准(表2)。将供试材料按此标准进行划分,筛选出感

病材料71份(54.62%),中度感病材料37份(28.46%),中度耐病材料16份(12.31%)以及耐病材料6份(4.62%)(图2)。

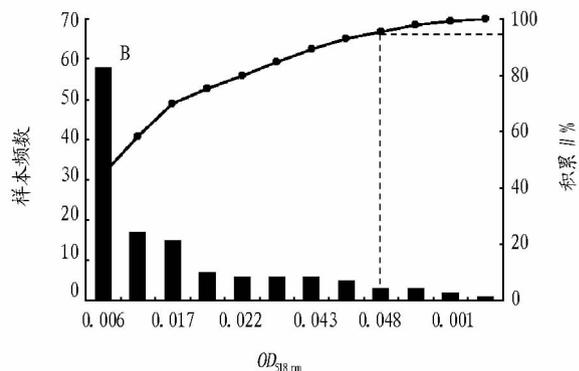
2.2 叶柄接种法鉴定结果 为了进一步证明茎中可溶性色素法对耐感性鉴定的准确性,利用离体叶柄接种法对参试材料进行了评价。叶柄腐烂长度为1.0~13.5 cm,与茎中可溶性色素水平整体呈现负相关关系,相关系数(R^2)绝对值为0.69,根据相关显著水平判断标准($P < 0.01$,130样本的 R^2 临界值为0.23),两者达到极显著相关关系,说明2种鉴定方法结果一致性较好(图2)。

按照矫洪双等^[15]的5个级别的抗性划分方法,将供试材料进行分类。整体而言,未筛选到完全免疫的类型,供试材料分布在除0级以外的4个级别中,其中高度感病类型(4

级)材料居多,占总体的79.23%。筛选到抗病材料(1级)13



个,占总体的10%,其余为中间过渡类型(图3)。



注:A:水平频数分布;B:水平分布经验分布。

图1 130份大豆种质资源茎中可溶性色素水平分布

表2 抗病指数和抗病等级划分标准

抗病级别	抗病指数范围	吸光值(OD_{518})范围
感病(S)	<15%	<0.009
中度感病(MS)	15%~50%	0.009~0.030
中度抗病(MT)	51%~70%	0.030~0.048
抗病(T)	>80%	0.048

表3 基于2种筛选方法的抗病性材料信息

品种名称	平均吸光值(OD_{518})	抗病指数//%	抗病级别(色素法)	平均茎腐长度//cm(叶柄法)	抗病级别(叶柄法)
呼交03-286	0.037	63.25	中度抗病	1.0	1
东农8004	0.040	68.38	中度抗病	1.0	1
白城秣食豆	0.042	71.79	中度抗病	1.5	1
垦农29	0.042	71.79	中度抗病	1.8	1
绥农30	0.038	64.39	中度抗病	2.6	1
邯豆5号	0.039	67.24	中度抗病	2.6	1
和龙油太	0.037	62.68	中度抗病	3.0	1
铁豆58	0.037	63.82	中度抗病	3.0	1
黑河18	0.048	82.62	抗病	1.3	1
黑农48	0.048	82.62	抗病	2.0	1
合丰50	0.051	86.32	抗病	2.0	1
辽豆3号	0.054	91.45	抗病	1.5	1
Maple Arrow	0.059	100.00	抗病	1.0	1

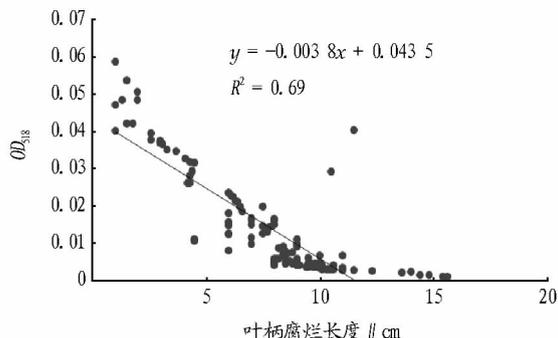
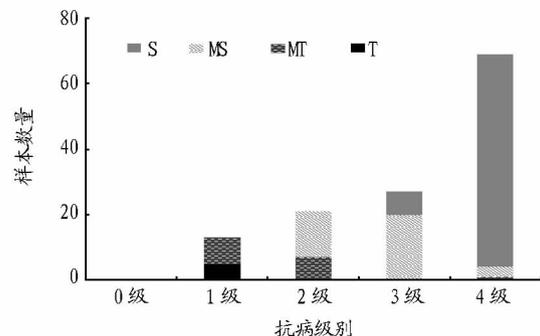


图2 叶柄接种法与吸光值(OD_{518})的相关关系



注:S、MS、MT和T分别代表感病、中度感病、中度抗病和抗病。

图3 色素测定法与叶柄接种法鉴定结果比较

通过叶柄接种法和色素测定法对抗/耐/感病类型划分结果的比较发现,叶柄接种法鉴定为感病(3和4级)的材料中包含了色素测定法鉴定结果中的全部感病类型和绝大部分中度感病类型,而高抗类型(1级)则囊括了色素法鉴定出的全部抗病类型和吸光值相对较高的8个中度抗病类型(表3),由此说明2种方法对抗源的筛选和高度感病材料的鉴定具有较好的一致性和较高的效力。

3 结论与讨论

我国作为栽培大豆的起源地,种质资源非常丰富,其中不乏优异基因资源等待被挖掘和利用。抗病资源的筛选作为抗病品种选育和新基因发掘的基础研究具有重要意义。针对菌核病的抗感性鉴定,国内外研究人员开发出包括室内和室外鉴定的多种方式以适应不同试验的需要,然而多种方法建立的评价体系不尽相同使得同类研究难以进行平行比较^[12-15]。

该研究利用2种室内鉴定方法对130份大豆种质资源进行菌核病抗病性进行评价和比较,其中茎中可溶性色素法是一种间接的鉴定手段^[18-19],它是建立在核盘菌的草酸发病机制基础上^[20],通过植株对一定浓度草酸的耐受性模拟菌丝接种,具有较好的重复性^[17],试验条件易于控制,该研究对抗病标准品种和感病对照品种的草酸耐受性评价结果与其他同类研究得到的结果基本一致,可以实现不同研究结果的平行比较和整合。

离体叶柄接种法作为一种直接接种方法,通过调查叶柄腐烂程度能够较直观地反映待测材料的抗感性水平,在该研究中作为色素法评价结果的验证试验,通过比较发现2种鉴定结果整体相关系数达0.69,同时对极端耐/感品种划分的

一致性说明 2 种方法对耐病资源的筛选均具可靠性和准确性。比较中间过渡类型材料的划分结果,显示出一定程度的不一致,说明 2 种方法在分辨中度耐/感类型材料方面存在局限性,需要在后续研究中对划分标准进行合理优化。另外,该研究发现品系 DY2004-1 在 2 种评价方法中出现相反的结果,即茎腐长度符合感病类型级别而茎中可溶性色素水平达到中度耐病级别,推测在菌核病抗病或耐病性方面可能存在其他机制,有待进一步研究。

该研究通过 2 种筛选方法获得的 6 份耐病大豆种质中, Maple Arrow 为世界公认的加拿大耐病品种^[14],其余 5 份来自黑龙江和辽宁的耐病种质未见与前人研究结果的交叉,为该研究首次鉴定为耐病的种质,可作为大豆菌核病抗病育种的新资源加以利用。

参考文献

- [1] KOCH L M, HIDEBRAND A A. Soybean diseases in southwestern Ontario in 1946[J]. Canadian Plant Disease Survey, 1946, 26: 27-28.
- [2] HILDEBRAND A A. Soybean diseases in Ontario[J]. Soybean Digest, 1948, 10: 16-17.
- [3] GRAU C R, RADKE V L, GILLESPIE F L. Resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Plant Disease, 1982, 66: 506-508.
- [4] CLINE M N, JACOBSEN B J. Methods for evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Plant Disease, 1983, 67: 784-786.
- [5] BOLAND G J, HALL R. Growth room evaluation of soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Canadian Journal of Plant Science, 1986, 66: 559-564.
- [6] WRATHER J A, ANDERSON T R, ARSYAD D M, et al. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994[J]. Plant Disease, 1997, 81: 107-110.
- [7] 张波, 王国庆, 王桂华, 等. 大豆菌核病发病因素分析与防治方法[J].

杂粮作物, 2004, 24(1): 48-49.

- [8] BOLAND G L, HALL R. Evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* under field conditions[J]. Plant Disease, 1987, 71: 934-936.
- [9] 矫洪双, 程志明, 许修宏, 等. 大豆种质资源对菌核病的抗性鉴定研究[J]. 大豆科学, 1994, 13(4): 351-355.
- [10] 孙鲜凤, 滕卫丽, 李冬梅, 等. 大豆新品种(系)的菌核病耐病性鉴定[J]. 大豆科学, 2011, 30(5): 834-837.
- [11] 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.
- [12] AULAIR 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.
- [13] CHEN Y, WANG D. Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Plant Disease, 2005, 89(12): 1268-1272.
- [14] GRAU C R, RADKE V L. Effects of cultivars and cultural practices on *Sclerotinia stein rot* of soybean[J]. Plant Disease, 1984, 68(1): 56-58.
- [15] 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): 295-301.
- [16] PENNYPACKER B W, HATLEY O E. Greenhouse technique for detection of physiological resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean[J]. Phytopathology, 1995, 85: 1178.
- [17] 孙明明, 韩英鹏, 陈浩, 等. 大豆菌核病鉴定方法比较及分析[J]. 大豆科学, 2007, 26(5): 728-731.
- [18] KOLKMAN J M, KELLY J D. An indirect test using oxalate to determine physiological resistance to white mold in common bean[J]. Crop Science, 2000, 40: 281-285.
- [19] 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.
- [20] FERRAR P H, WALKER J R. o-Diphenol oxidase inhibition - an additional role for oxalic acid in the phytopathogenic arsenal of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium rolfsii*[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1993, 43(6): 415-422.

(上接第 5001 页)

- [4] KIM J H, KIM S Y, LEE H, et al. An event-specific DNA microarray to identify genetically modified organisms in processed foods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(10): 6018-6026.
- [5] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): 63.
- [6] AHMED M U, HASAN Q, MOSHARRAF HOSSAIN M, et al. Meat species identification based on the loop mediated isothermal amplification and electrochemical DNA sensor[J]. Food Control, 2010, 21(5): 599-605.
- [7] WANG F, JIANG L, YANG Q, et al. Rapid and Specific Detection of *Escherichia coli* Serogroups O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 in Ground Beef, Beef Trim, and Produce by Loop-Mediated Isothermal Amplification[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(8): 2727-2736.
- [8] RANDHAWA G J, SINGH M, MORISSET D, et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification: Rapid Visual and Real-Time Methods for Detection of Genetically Modified Crops[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(47): 11338-11346.
- [9] ZHANG J, FENG Y, HU D, et al. Rapid and Sensitive Detection of H7N9

Avian Influenza Virus by Use of Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51(11): 3760-3764.

- [10] 焦文强, 殷相平, 柳纪省. 环介导等温扩增技术原理及其在检测诊断病原微生物中的应用[J]. 生物技术通报, 2009(9): 50-53.
- [11] ISO EN 21571:2005[J]. Foodstuffs-Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products-nucleic acid[S]. 2013.
- [12] FU S, QU G, GUO S, et al. Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 163(7): 845-850.
- [13] CHEN X, WANG X, JIN N, et al. Endpoint visual detection of three genetically modified rice events by loop-mediated isothermal amplification[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(11): 14421-14433.
- [14] 刘津, 凌莉, 吴少云, 等. 转基因大豆 GTS 40-3-2 品系特异性环介导等温扩增法检测方法的建立与应用[J]. 粮食与饲料工业, 2012(12): 60-63.
- [15] 凌莉, 刘静宇, 易敏英, 等. 转基因玉米 B176 品系特异性环介导等温扩增检测方法的研究[J]. 食品工业科技, 2013(3): 310-313.