文章编号:1003-8701(2015)03-0069-04

一种引起大豆根腐病的尖镰孢致病性苗期鉴定方法

王春玲[1],耿肖兵[1],黄铭慧[1],孙丽萍[1],李永刚[1,2]*

(1. 东北农业大学农学院,哈尔滨 150030;
2. 东北农业大学寒地作物品种改良与生理生态重点开放实验室,哈尔滨 150030)

摘　要:通过试验研究,建立了一个科学、快速和准确的尖镰孢侵染大豆所致根腐病苗期鉴定方法。利用该鉴定方法,分析了6株尖镰孢与11个大豆品种的互作。结果表明不同品种间抗性差异较大,如绥农28与菌株K31互作病指为15.24,而与菌株YA25互作病指为44.90;东农54与菌株M63互作病指为19.31,而与菌株H1互作病指为71.43。通过应用该鉴定方法,证明其适用于大批量、快速和准确地进行尖镰孢与大豆品种(品系)互作中的尖镰孢致病性测定及抗源筛选。

关键词:大豆根腐病;尖镰孢;分级标准;症状;鉴定方法

中图分类号:S435.2　　**文献标识码**:A

DOI:10.16423/j.cnki.1003-8701.2015.03.018

A Method to Determine Pathogenicity of Fusarium oxysporum Causing Root Rot of Soybean at Seedling Stage

WANG Chun-ling[1], GENG Xiao-bing[1], HUANG Ming-hui[1], SUN Li-ping[1], LI Yong-gang[1,2]*

(1. *College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin* 150030;
2. *Key Laboratory of Cold Crop Variety Improvement, Physiology and Ecology, Northeast Agricultural University, Harbin* 150030, China)

Abstract: A method was developed in this study to fast and accurately determine pathogenicity of Fusarium oxysporum causing root rot of soybean at seedling stage. The method was used to study interactions between 6 stains of F. oxysporum and 11 soybean cultivars. Results showed that there were significant differences among the cultivars in resistance to the disease. Mean disease indices were 15.24, 44.90, 19.31, or 71.43 in the interactions between Suinong 28 and strain K31, Suinong 28 and strain YA25, Dongnong 54 and strain M63, and Dongnong 54 and strain H1, respectively. The results indicated that this method could be applicable to large-scale, fast and accurate determination of pathogenicity of F. oxysporum and screening of host resistance in interactions between the pathogen and soybean cultivars or lines.

Key words: Soybean root rot; Fusarium oxysporum; Disease scale; Symptom; Identification method

大豆根腐病(*Fusarium oxysporum*)是一种分布广,危害重和防治较困难的世界性病害[1-2]。大豆根腐病主要致病菌的种类变化不大,主要的病原菌有腐霉菌(*Pythium spp.*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、燕麦镰孢(*Fusarium avenaceum*)、木贼镰孢(*F. equiseti*)、禾谷镰孢(*F. graminearum*)、腐皮镰孢(*F. solani*)、尖镰孢(*F. oxysporum*)和拟轮枝镰孢(*F. verticillioides*)[3]。Li等、王晓艳等、邢安等和白丽艳等[4-7]均认为尖镰孢是大豆镰孢根腐病的优势菌株。

目前,针对大豆镰孢根腐病菌致病性和抗源筛选的方法较多,而且病情指数分级标准存在较大差别。但不同的鉴定方法和分级标准,所鉴定出来镰孢菌致病性和品种的抗病性表现不同,如李本金等采用根部伤根接种法接种镰孢菌[8];马淑梅采用高粱砂培养菌按一定的比例和无菌土混

收稿日期:2014-12-17

基金项目:东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室开放基金资助(SB12B01)

作者简介:王春玲(1992-),女,蒙古族,在读硕士,主要从事大豆病害研究。

通讯作者:李永刚,男,副教授,博士,E-mail: neaulyg@126.com

合接种[2]；杨帅等采用蘸根接种法，将大豆幼苗的根部轻微损伤，在层出镰孢菌孢子悬浮液中浸泡接种[9]；魏巍等对大豆根腐镰孢菌致病性测定采用镰孢菌孢子悬液法进行接种[3]。由于接种方法不同，导致接种量、调查时间和调查标准也均不同。因此，不同研究者之间所鉴定的病原菌的致病性和品种的抗病性缺乏可比性，严重限制了大豆根腐病菌基础和应用方面的研究。

因此，本研究对尖镰孢侵染大豆苗期的鉴定方法进行深入细致的研究和分析，可大批量、快速和准确进行尖镰孢致病力的检测及大豆抗源的筛选。

1 材料和方法

1.1 材料

供试菌株：大豆尖镰孢菌株K31、M63、M38、H1、W13和YA25由本课题组分离并鉴定。

供试品种：大豆品种黑农53、东农62、绥农26、东农52、合丰50、合丰55、东农54、丰收25、东农47、东农48和绥农28由大豆生物学教育部重点实验室提供。

1.2 引起大豆根腐病的尖镰孢致病性的鉴定方法

1.2.1 种子处理

大豆品种经10%的次氯酸钠处理10 min，无菌水冲洗干净，备用。

1.2.2 接种方法

用高粱粒接种法，将上述6个尖镰孢菌株尖镰孢分别在PDA平板上培养4 d，打取直径7 mm的菌碟接种到高粱粒培养基中（高粱粒开水煮20 min，然后捞到250 mL三角瓶中，每瓶125 g，然后湿热灭菌121℃ 20 min），每个三角瓶中接种5个菌碟，26℃培养箱中黑暗培养，期间每天震荡三角瓶1次，待菌丝布满每一个高粱粒表面即可用于接种，大约需要5 d，作为固定的接种量；接种方法为：在直径8 cm培养钵中放入无菌蛭石至培养钵2/3处，之后每钵均匀接入10粒带菌高粱粒，覆上约0.5 cm无菌蛭石后播种大豆品种，每钵10粒种子，最后用2 cm的无菌干蛭石覆盖在种子表面，放入不锈钢盘中，以不接种病原菌作对照，每个处理3次重复，试验重复2次。培养条件为不锈钢盘底部浇足水后放在25℃、光暗（12 h/12 h）交替培养（温室中），定期浇水保持蛭石湿润，10 d后调查结果。

1.2.3 尖镰孢致病性分析及分级标准的制定

通过症状观察，分析尖镰孢与大豆互作过程中的症状表现，并参考Burpee等[10]和白丽艳等[7]对镰孢菌侵染的分级标准，确定尖镰孢侵染大豆苗期病害分级标准，对尖镰孢致病的典型特征进行归纳和总结，然后制定尖镰孢侵染大豆苗期病害分级标准，并依据该分级标准调查6个尖镰孢菌株与11个大豆品种互作后发病情况，并计算病情指数。

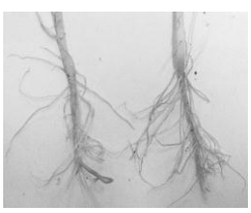
病情指数公式为：

$$\text{病情指数}=\frac{\sum(\text{各级并株数}\times\text{相对级数值})}{\text{调查总株数}\times 7}\times 100$$

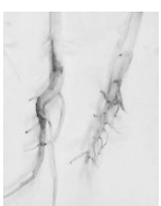
2 结果与分析

2.1 尖镰孢引起大豆根腐病的典型症状

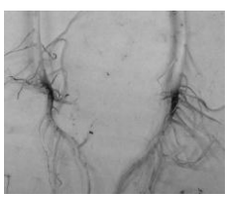
通过对尖镰孢与大豆品种互作所表现的病状进行观察，典型症状大致分为以下几类，见图1。



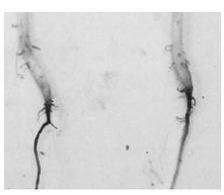
A 没有变化



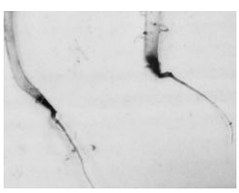
B 主根轻微变褐，须根变短生长点变褐



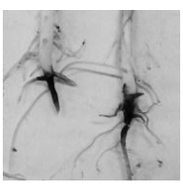
C 主根严重变褐，须根没有变化或部分须根变褐



D 主根严重变褐，须根较少且变褐



E 主根严重变褐，没有须根



F 主根严重变褐，几乎不能通过侵染点继续向下生长，须根少且部分变褐

G　主根严重变褐，不能通过侵染点继续生长，较少较短的须根，部分须根变褐

H　主根严重变褐，不能通过侵染点继续生长，没有须根

I　较短的主根，子叶和主根完全腐烂

图1　尖镰孢引起大豆根腐病的症状

从图1可以看出,尖镰孢侵染大豆苗期所引起的根部症状差别较大,品种间对尖镰孢侵染症状表现不同,病害从轻到重分为以下几组:有些不发病(如A);有些影响须根的生长,主根基本正常(如B);有些主根变褐,而须根影响不大(如C);有些主根严重变褐,但主根能通过侵染点继续生长,基本不长须根(如D和E);有些主根不能通过侵染点继续生长,须根明显减少或不长(如F、G和H);最严重的症状是种子刚萌发就全部腐烂,子叶也呈腐烂状(如I)。地上部分生长正常与否,主要与根部发病的严重程度有关。

2.2　尖镰孢引起大豆根腐病病情分级标准的制定

根据根系腐烂程度将尖镰孢引起的大豆根腐病病情严重度划分为5个级别。

0级:未发病,根部正常生长(如图1A);1级:主根基本不变或轻微变褐,须根不长且生长点变褐,植株生长正常(如图1B);3级:主根变黑,主根能通过侵染点继续生长,须根根尖变黑,植株生长正常(如图1C、D和E);5级:主根严重变黑,不能通过侵染点继续生长,须根明显减少或没有,地上部生长不良,植株生长矮小(如图1F、G和H);7级:根部腐烂,不能正常生长或出苗,部分子叶腐烂或植株死亡(如图1I)。

2.3　对大豆根腐病菌致病性苗期鉴定方法的应用

6个尖镰孢菌株与11个大豆品种互作,结果如表1所示。

表1　尖镰孢与大豆品种互作中致病性的分析

品种(品系)	菌株/病情指数					
	K31	M63	M38	H1	W13	YA25
黑农53	28.87 ± 7.02ab	32.41 ± 1.75ab	42.65 ± 3.48a	41.97 ± 4.48ab	31.59 ± 2.36cde	31.59 ± 2.36ab
东农62	32.00 ± 3.45ab	32.14 ± 3.94ab	35.18 ± 6.81a	41.93 ± 13.12ab	30.65 ± 3.63bcde	30.65 ± 3.63ab
绥农 26	38.28 ± 8.68b	31.27 ± 3.75ab	27.78 ± 6.78a	53.57 ± 17.86ab	35.40 ± 4.89e	35.40 ± 4.89abc
东农 52	27.22 ± 7.83ab	29.78 ± 6.21ab	42.26 ± 3.90a	51.44 ± 1.40ab	17.33 ± 4.84a	58.59 ± 1.28e
合丰 50	28.77 ± 5.44ab	44.97 ± 13.64b	37.46 ± 7.51a	46.26 ± 13.66	27.45 ± 0.56abcde	47.22 ± 5.61cde
合丰55	29.37 ± 4.83ab	29.73 ± 1.83ab	28.10 ± 11.46a	47.62 ± 11.91	39.23 ± 2.78e	41.27 ± 4.42bcd
东农 54	35.32 ± 8.59ab	19.31 ± 3.20a	20.24 ± 2.68a	71.43 ± 0.00a	20.94 ± 2.24abc	35.56 ± 4.22abc
丰收 25	16.55 ± 6.87ab	33.78 ± 8.11ab	25.00 ± 10.31a	29.37 ± 6.78b	22.62 ± 2.48abcd	48.57 ± 3.30de
东农 47	32.14 ± 3.57ab	32.87 ± 11.04ab	34.29 ± 10.82a	55.71 ± 7.96ab	18.26 ± 3.97ab	29.11 ± 2.83ab
东农 48	26.19 ± 5.99ab	29.29 ± 2.15ab	22.36 ± 6.37a	36.51 ± 13.84ab	21.59 ± 6.71abcd	23.58 ± 5.30a
绥农 28	15.24 ± 5.79a	27.67 ± 6.30ab	36.51 ± 11.44a	40.14 ± 21.09ab	34.29 ± 4.37de	44.90 ± 2.04cd

从表1可以看出,不同尖镰孢菌株对不同品种致病力存在显著差异,所致症状也差别较大。总体说来,针对尖镰孢菌株,品种间抗性差异较大,如绥农28与菌株K31互作病指为15.24,而与菌株YA25互作病指为44.90;东农54与菌株M63互作病指为19.31,而与菌株H1互作病指为71.43。通过以上检测方法,可以清晰地分辨出病株的发病级数,准确鉴定出病原菌致病力和品种的抗病性。

3　讨　论

通过本研究对尖镰孢引起大豆根腐病的症状描述与Burpee[10]描述的分级标准差别较大,以往研究主要以田间镰孢菌危害大豆根部进行调查分

析[1,5]。目前,多数研究者都是根据前人所描述的田间苗期症状特点及自己的接种方法出现的症状表现制定相应的病害分级标准,但由于接种不同,调查时间也不同,特别是田间是混合侵染,而盆栽则是单一菌株侵染,导致温室内盆栽接种症状与田间症状有差别,近而病害分级标准也有较大差别,如:魏巍等[3]、周克琴等[11]、马淑梅[2]。这些分级标准的调查时间均为接种后30 d至40 d,由于分级标准存在较大差异,导致不同研究者之间的数据缺乏可比性和共享性。

为寻找一种快速、准确,且研究者之间可以共同参考的一种鉴定方法,本研究模拟田间病害发生特点,针对大豆镰孢根腐病的优势种尖镰孢采用根部接种法以蛭石为载体,恒定条件下培养10 d后的结果;本检测方法仅需要10 d,比以往的调查时间少20 d至30 d,节省了大量时间;10 d的苗较小,培养钵(钵口直径8 cm)就可以种植10株,所占空间小,劳动量小,可以大批量进行尖镰孢致病性测定或是抗源筛选。同时,细化的病害分级标准,调查结果准确性更高而误差更小。

本鉴定方法是基于尖镰孢侵染大豆所引起根腐病所设计的,采用高粱粒接种法,明确接种量、接种方法、培养条件和调查时间。本方法保证了该鉴定方法的稳定性和可重复性;其次,通过对症状的观察和描述,确定侵染后所引起的各种症状特点及危害等级;再次,通过对不同症状的分析及结合实际发病特点,确立了病情指数的分级标准,将该分级标准确定为5个级别。通过实际应用该鉴定方法,验证其可行性,可以快速、大批量和准确地进行尖镰孢侵染大豆引起根腐病的鉴定工作。本研究将对今后大豆尖镰孢致病力的测定、抗源的筛选和抗病品种选育具有较好的指导和参考作用。

参考文献:

[1] Li Y G, Ma F M. Antagonistic mechanism of Fusarium oxysporum of soybean root rot by *Bacillus subtilis*[J]. Applied Mechanics and Materials, 2012(108): 127-131.

[2] 马淑梅. 黑龙江省大豆根腐病致病病原种类分布及抗病种质鉴定[J]. 中国农学通报,2012,28(27):230-235.

[3] 魏 巍,许艳丽,张思佳,等. 大豆根腐病原镰孢菌种群多样性DGGE分析及其致病性研究[J]. 植物病理学报,2013,43(5):500-508.

[4] Li Y G, Zhang L, Wang C L, et al. Antagonistic mechanism and control effect of Bacillus subtilis Y2 against Fusarium oxysporum causing soybean root rot[J]. African Journal of Microbiology Research, 2013, 7(8): 652-656.

[5] 王晓艳,文景芝. 东北三省大豆根腐镰孢菌种类及其致病力分析[J]. 中国油料作物学报,2011,33(4):391-395.

[6] 邢 安,文景芝,吕国忠,等. 黑龙江省大豆根腐病株上镰孢菌的分离与鉴定[J]. 东北农业大学学报,2009,40(8):5-9.

[7] 白丽艳,张全党,李 斌,等. 新疆阿勒泰地区大豆镰刀菌根腐病病原鉴定及致病性测定[J]. 新疆农业科学,2009,46(3):543-548.

[8] 李本金,陈庆河,兰成忠,等. 福建省大豆根腐病病原菌的鉴定[J]. 福建农业学报,2011,26(5):798-803.

[9] 杨 帅,王健生,马振川,等. 引致大豆根腐病的层出镰孢菌分离鉴定及其特性[J]. 植物保护学报,2012,39(2):187-188.

[10] Burpee L L. Pathogenicity of Ceratobasidium cornigerum and relater fungi representing five anasomosis groups[J]. Phytopathology, 1980, 70(9): 843-846.

[11] 周克琴,韩秉进,张秋英,等. 生防菌BRF-1和BRF-2对大豆根腐病和产量的影响[J]. 大豆科学,2012,31(5):801-803.

(上接第22页)

[12] Slewinski T L, Garg A, Johal G S, et al. Maize SUT1 functions in phloem loading[J]. Plant Signal Behavior, 2010(5): 687-690.

[13] Slewinski T L, Meeley R, Braun D M. Sucrose transporter functions in phloem loading in maize leaves[J]. Journal of Experimental Botany, 2009(60): 881-892.

[14] Riesmeier J W, Frommer W B. Einfluß der Überexpression von Saccharosetransportern auf das Blühverhalten von Pflanzen: German, 4439 748.8[P]. 1994.

[15] 马小龙,刘颖慧,袁祖丽,等. 玉米蔗糖转运蛋白基因ZmERD6 cDNAs的克隆与逆境条件下的表达[J]. 作物学报,2009,35(8):1410-1417.

[16] Chincinska I, Gier K, Krügel U, et al. Photoperiodic regulation of the sucrose transporter StSUT4 affects the expression of circadian-regulated genes and ethylene production[J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4(26): 1-11.

[17] Sun A, Xu H, Gong W K, et al. Cloning and expression analysis of rice sucrose transporter genes OsSUT2M and OsSUT5Z[J]. J. Integr. Plant Biology, 2008(50): 62-75.

[18] Sun A, Dai Y, Zhang X, et al. A transgenic study on affecting potato tuber yield by expressing the rice sucrose transporter genes OsSUT5Z and OsSUT2M[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2011, 53(7): 586-595.