

# 转基因大豆种质资源对大豆疫霉根腐病的抗性评价

张金花, 王博文, 丁岩, 李茂海\*

(吉林省农业科学院植物保护研究所, 吉林 公主岭 136100)

**摘要:**大豆疫霉根腐病是影响大豆生产的重要病害之一, 选育抗病品种对防治大豆疫霉根腐病是最有效的方法, 其中抗大豆疫霉根腐病的转基因品种选育是重要手段之一。本研究主要采用下胚轴接种法对 280 个转基因大豆种质资源接种大豆疫霉根腐病菌吉林省优势生理小种 1 号, 进行抗根腐病鉴定。结果表明: 吉林省农科院提供的 280 份转基因大豆种质资源对 1 号生理小种表现抗病的有 27 份, 占 9.6%, 表现感病的有 188 份, 占 67.1%, 表现中间型的有 65 份, 占 23.2%。

**关键词:**大豆; 疫霉根腐病; 抗性评价

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2019)04-0043-03

## Evaluation of Resistance to *Phytophthora sojae* in Genetically Modified Soybean Germplasm

ZHANG Jinhua, WANG Bowen, DING Yan, LI Maohai\*

(Institute of Plant Protection, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

**Abstract:** *Phytophthora* root and stem rot caused by *Phytophthora sojae* is a destructive disease in soybean production regions in the world. To plant resistant variety is the most effective method for controlling the disease, and utilization of GMO play a major role in disease resistance breeding. Total 280 soybean GMO from Jilin Academy of Agriculture Sciences were evaluated by inoculated at hypocotyl using Physiologic Race 1 of *Phytophthora sojae*, which is the superiority race in Jilin Province. The results showed that the resistant germplasms were 27, which accounted for 9.6%; the susceptible germplasms were 188, which accounted for 67.1%; and the medium germplasms were 65, which accounted for 23.2%, respectively.

**Key words:** Soybean; *Phytophthora sojae*; Evaluation of resistance

大豆疫霉根腐病是由大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)引起的危害性比较严重的土传病害之一, 是影响大豆生产的重要病害之一, 在大豆整个生育期均可发病, 苗期发病尤为明显, 在大豆连作和土壤湿度较大的种植区发病尤为严重, 在病害高发区可导致大豆绝产<sup>[1]</sup>。1948 年在美国印第安纳州首次发现大豆疫霉病, 之后相继在加拿大、巴西、澳大利亚、印度、法国、朝鲜等国大豆生产区发生危害<sup>[2]</sup>。1989 年沈崇尧和苏彦纯首次在我国东北地区分离到大豆疫霉根腐菌<sup>[3]</sup>, 目前在内蒙古、山东、北京、吉林等地都有分布, 该病危害严重, 对大豆生产存在潜在较大威胁, 深入研

究该病害对保证我国大豆生产健康稳定发展具有重要意义<sup>[4]</sup>。

大豆疫霉根腐病防治措施主要为选择抗病品种, 广义抗病品种可分为两种: 一种是具有小种专化性的抗病品种, 这种品种含有抗病基因, 可抗一个或多个生理小种; 另一种是部分抗病品种, 表现为对所有小种都有一定的抵抗能力, 出现感病症状, 只是症状较轻或引起的损失很少。由于大豆根腐疫霉菌变异克服抗性基因, 菌量逐渐累积成为优势小种, 从而导致转抗病基因资源的抗病性丧失<sup>[5-6]</sup>, 因此选择既有特异性抗病又有部分抗病性的品种尤为重要。本研究主要是利用吉林省大豆疫霉菌 1 号生理小种对 280 份转基因大豆材料进行抗性评价, 为将来大豆生产抗病育种奠定理论基础。

## 1 材料与方 法

收稿日期: 2019-02-17

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFC1201200)

作者简介: 张金花(1978-), 女, 副研究员, 硕士, 从事农药微生物降解及植物病害生物防治研究。

通讯作者: 李茂海, 男, 博士, 副研究员, Email: maohai\_li@163.com

## 1.1 供试材料

### 1.1.1 供试植物

转基因大豆种质资源由吉林省农业科学院生物技术研究所提供,共计280份。以常规大豆品种“九农21”和“吉育71”为对照。

### 1.1.2 供试菌种

病原菌为大豆疫霉菌1号生理小种,由吉林省农业科学院植物保护研究所提供。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 培养基的制备

胡萝卜琼脂培养基(CA):将新鲜胡萝卜清洗干净,称取200g,切成小块放入植物组织搅碎机内搅碎,加入1000mL蒸馏水煮沸30min后进行过滤,再将20g琼脂粉加入滤液中进行搅拌,待琼脂融化后,将滤液定容至1000mL,在120℃高压蒸汽灭菌20min后,至于超净工作台内进行冷却,将培养基倒入已灭菌的培养皿(直径9cm)内,冷却后制成厚度0.5cm的CA培养基,备用。

### 1.2.2 原菌的活化

将保存于10℃条件下的大豆疫霉根腐病病原菌斜面试管取出,在无菌条件下,利用接种环挑取0.5cm<sup>2</sup>左右的边缘菌落,再将挑取菌落转接于CA平板培养基中央,转接完成后,利用封口膜进行封口,然后倒置于25℃温箱中培养7d,每天观察病菌生长情况,及时去除被污染的培养基。

### 1.2.3 接种方法

每个大豆测试品种播种于装有无菌土的塑料花盆内(直径12cm×高10cm),进行等距、等深播种,每个花盆育苗3株,每个重复5盆,共设置3次重复,以感病和抗病品种为对照。待第一对真叶平展后,选取生长一致的植株,将消毒的手术刀片在植株子叶下1cm处划一伤口,伤口要以能看到组织液流出为标准,将在CA培养基上扩繁的

病原菌取出,用消毒刀片将附着菌丝的培养基切成3mm左右的方块,将其嵌入伤口内,使附有菌丝面朝内,完成病原菌接种,再将接种后的大豆放在塑料薄膜架子内,进行24h喷水保湿,放置在25℃下进行培养,接菌4d后调查植株死亡情况,然后统计平均死亡率。

### 1.2.4 抗病性评价标准

试验采用Gordon等的抗性评价标准<sup>[7]</sup>,大豆对大豆疫霉菌的抗性共分为三个类型:死亡率高于70%的为感病型(Susceptible, S)、在30%~70%之间的为中间型(Medium, M)、低于30%的为抗病型(Resistant, R)。接种后,感病植株伤口处出现水渍状病斑,很快变成淡褐色,从而整株萎蔫,植株从接种部位折断,全株枯死;抗病植株仅在下胚轴伤口处发生局部变褐或棕褐色甚至凹陷,病斑不扩展,植株仍可继续生长。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗病性评价

通过用下胚轴伤口接种法接种大豆疫霉菌菌株1号生理小种,共对280份转基因大豆种质资源进行抗大豆疫霉根腐病的鉴定,并以“九农21”和“吉育71”分别作为感病品种和抗病品种为对照。试验结果表明,在接种大豆疫霉根腐病菌后,“九农21”表现为感病,“吉育71”表现为抗病,与所选对照结果相符。280份转基因大豆种质资源对疫霉菌的抗性反应统计结果见表1。试验结果表明,接种大豆疫霉1号生理小种后,有188份植株死亡率在30%以下,表现为抗病型(R),占鉴定资源总数的67.1%;65份植株死亡率在30%~70%之间,呈中间型(M),占鉴定资源总数的23.2%;27份转基因植株死亡率在70%以上,呈感病型(S),占鉴定资源总数的9.6%。

表1 280份转基因大豆种质资源对大豆疫霉菌的反应

生理小种	接种方法	数量	对疫霉菌的反应		
			R	M	S
生理小种1号	下胚轴伤口	280	188	65	27

注: R为抗病型, M为中间型, S为感病型

### 2.2 转基因种质资源世代上抗病性评价

在280份转基因大豆中包含T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、T<sub>5</sub>、T<sub>6</sub>五个世代的种子, T<sub>2</sub>世代种子31份, T<sub>3</sub>世代种子58份, T<sub>4</sub>世代种子76份, T<sub>5</sub>世代种子55份, T<sub>6</sub>世代种

子60份。T<sub>2</sub>世代种子中筛选出抗性转基因大豆12份,占T<sub>2</sub>世代资源总数的38.7%; T<sub>3</sub>世代种子中筛选出抗性转基因大豆22份,占T<sub>3</sub>世代资源总数的37.9%; T<sub>4</sub>世代种子中筛选出抗性转基因大豆

33份,占 $T_4$ 世代资源总数的43.4%; $T_5$ 世代种子中筛选出抗性转基因大豆17份,占 $T_5$ 世代资源总数的30.9%; $T_6$ 世代种子中筛选出抗性转基因大豆43份,占 $T_6$ 世代资源总数的71.6%(图1)。

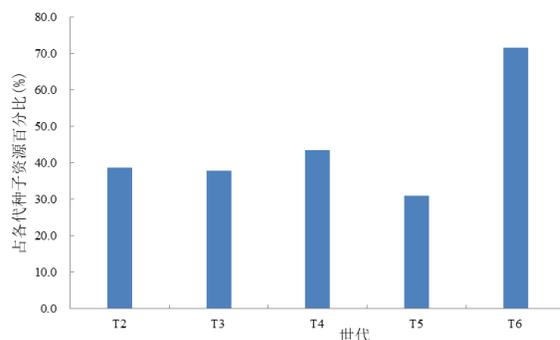


图1 280份不同世代抗性种子占各代种子资源比

### 2.3 转基因种质资源受体上的抗病性评价

280份转基因大豆种质资源来源于W82、沈九、JACK、HC6、TL1、P3和Y2七种不同受体,其中各转基因大豆种质资源受体分别为31、37、42、29、50、42和49份。从以W82为受体的转基因大豆中筛选出抗病型9份,占资源总数的29.0%;从以沈九为受体的转基因大豆中筛选出抗病型14份,占资源总数的37.8%;从以JACK为受体的转基因大豆中筛选出抗病型21份,占资源总数的50%;从以HC6为受体的转基因大豆中筛选出抗病型12份,占资源总数的41.3%;从以TL1为受体的转基因大豆中筛选出抗病型31份,占资源总数的62%;从以P3为受体的转基因大豆中筛选出抗病型27份,占资源总数的64.2%;从以Y2为受体的转基因大豆中筛选出抗病型18份,占资源总数的36.7%(图2)。

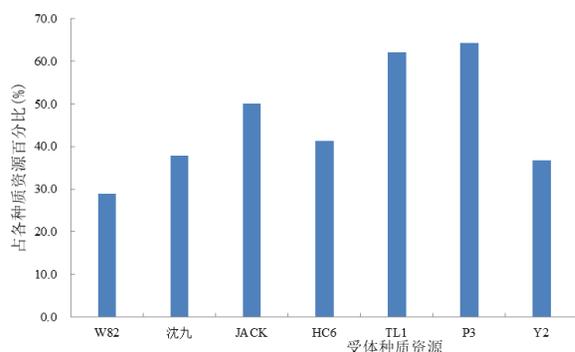


图2 280份不同受体种质资源中抗病型资源占各不同受体种质资源比

## 3 结论与讨论

### 3.1 下胚轴接种法优缺点

下胚轴接种法技术成熟,在大豆疫霉根腐病的研究上应用最多,而且表型明显,但接种后会感病植株死亡而不能够保存杂交后代中的感病植株,在以后的研究中,在选用下胚轴接种方法的同时,还可选用子叶接种法、离体叶片接种法等方法做为对比试验,以便克服因下胚轴接种后导致的感病植株死亡的不足,可以保存杂交后代中的感病植株,这对于遗传分析非常重要。

### 3.2 转基因大豆抗病性评价

利用抗病或耐病品种仍然是作物生产中对重要病害防治的最有效手段,国内外对抗性资源的大量筛选工作以及对抗性遗传的分析结果表明,抗病品种可完全控制病害,并且抗性基因易于转育。本研究共对280份转基因大豆进行筛选工作,有188份转基因大豆死亡率在67.1%以下,表现为抗病型。从转基因种子世代上来看, $T_2 \sim T_5$ 抗性种子所占资源总数都在35%左右, $T_6$ 抗性种子所占资源总数的71.6%,明显高于其他世代;从受体上来看,以P3为受体的转基因大豆种子占资源总数的64.2%(最高),其次是以L1为受体的转基因大豆占资源总数的62%,以W82为受体的转基因大豆抗性品种占资源总数的29.0%(最低),其他品种转基因大豆抗性品种占资源总数的40%左右,属于中间状态。研究结果表明,转基因受体材料的选择在大豆抗大豆根腐病转基因育种中具有重要作用,即受体的抗病性直接决定其后代抗病性材料的数额。

吉林省大豆种植地区存在多个致病生理小种,并且新小种出现较快,目前培育的大豆抗疫霉根腐病品种的抗病性一般只能维持8~10年,随着小种变化,其抗病性会逐渐消失,成为感病品种。本研究所用的280份大豆材料对大豆疫霉根腐病吉林生理1号小种抗病性的表现存在差异,但均以抗病品种居多,这与近年来大豆抗病品种的选育密切相关,因此,选育抗病品种的同时,加强大豆疫霉病不同生理小种鉴定工作,对品种合理布局具有重要意义。

### 参考文献:

- [1] 马淑梅,丁俊杰,郑天琪,等.黑龙江省大豆疫霉根腐病生理小种鉴定结果[J].大豆科学,2005,24(4):260-262.
- [2] 张淑珍,徐鹏飞,吴俊江,等.栽培大豆种质资源对大豆疫霉根腐病的抗性评价[J].大豆科学,2007,26(6):914-918.
- [3] 沈崇尧,苏彦纯.中国大豆疫霉病菌的发现及初步研究[J].植物病理学报,1991,21(4):298.

(下转第49页)

同稻田共作模式对土壤微生物群落结构的影响,所以能更全面地反映群落组成。从检测结果来看,各样本共检测到细菌类群46门、112纲、210目、370科、664属、1227种。和Jangid K<sup>[9]</sup>等的研究一致,在门的分类水平上各样品均以变形菌门为最优势菌门。在主要优势种属中,硫化菌属(*Sulfuricurvum*)的相对丰度则在SDHXZ和SDLXZ中高于SDKBZ,SDLXZ和SDKBZ差别显著( $P < 0.05$ )。norank\_c\_Bacteroidetes\_VadinHA17则在SDHXZ中相对丰度最高,与SDKBZ差别显著( $P < 0.05$ )。

3.3 Yachi S等研究证实生物多样性越高生态系统越稳定<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,河蟹和龙虾2种稻田共作模式的Chao指数均高于稻田单作组。这说明河蟹和龙虾引入后土壤的微生物种类越发丰富,土壤微生物群落结构在河蟹和龙虾两种共作模式中比稻田单作模式要稳定。河蟹和龙虾与水稻共作复合生态系统具有更加丰富的微生物生态组成。

#### 参考文献:

- [1] Tilman D, Cassman K G, Matson P A, et al. Agricultural sustainability and intensive production practices[J]. *Nature*, 2002, 418(6898): 671-677.
- [2] Bromley D W. Food security: Beyond technology[J]. *Science*, 2010, 328(5975): 169.
- [3] Pretty J. Agricultural sustainability: Concepts, principles and evidence[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2008, 363(1491): 447-465.
- [4] 金京德,张三元,岩石真嗣,等.水稻有机栽培苗期恶苗病和立枯病防治技术的研究[J]. *吉林农业科学*, 2008, 33(3): 30-32.
- [5] 高军,陈莫军,孟凡梅,等.增穗施肥对水稻产量和氮肥利用率的影响[J]. *东北农业科学*, 2018, 43(2): 1-4.
- [6] 赵旭,于凤泉,田春晖.稻田养蟹对防除杂草的效果[J]. *辽宁农业科学*, 2018(2): 68-70.
- [7] 朱杰,刘海,吴邦魁,等.稻虾共作对稻田土壤nirK反硝化微生物群落结构和多样性的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2018, 26(9): 1324-1332.
- [8] 房昫昊,彭剑峰,宋永会,等.高通量测序法表征潜流人工湿地中不同植物根际细菌群落特征[J]. *环境科学学报*, 2018, 38(3): 911-918.
- [9] Bates S T, Berg-Lyons D, Caporaso J G, et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(5): 908-917.
- [10] 李金融,侯湖平,王琛,等.基于高通量测序的复垦土壤细菌多样性研究[J]. *环境科学与技术*, 2018, 41(12): 148-157.
- [11] 罗衡,赵良杰,李丰,等.养殖蟹的引入对稻田土壤细菌群落结构的影响[J]. *水产学报*, 2018, 42(5): 720-731.
- [12] 袁红朝,吴昊,葛体达,等.长期施肥对稻田土壤细菌、古菌多样性和群落结构的影响[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(6): 1807-1813.
- [13] 陈哲,陈春兰,秦红灵,等.化肥对稻田土壤细菌多样性及硝化、反硝化功能菌组成的影响[J]. *生态学报*, 2009, 29(11): 6142-6147.
- [14] Ge Y, Zhang J B, Zhang L M, et al. Long-term fertilization regimes affect bacterial community structure and diversity of an agricultural soil in northern China[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2008, 8(1): 43-50.
- [15] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [16] 赵翔刚,罗衡,刘其根,等.稻田养殖沙塘鳢对稻田水体及底泥微生物群落结构及多样性的影响[J]. *淡水渔业*, 2017, 47(4): 8-14.
- [17] Wietz M, Hall M R, Høj L. Effects of seawater ozonation on biofilm development in aquaculture tanks[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32(4): 266-277.
- [18] Kirchman D L, Cottrell M T, Lovejoy C. The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(5): 1132-1143.
- [19] Jangid K, Williams M A, Franzluebbers A J, et al. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(11): 2843-2853.
- [20] Yachi S, Loreau M. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(4): 1463-1468.

(上接第45页)

- [4] 孙石.大豆疫霉根腐病抗性的遗传分析及基因定位的初步研究[D].南京:南京农业大学,2008.
- [5] Kyle D E, Nickell C D, Nelson R L, et al. Response of soybean accessions from provinces in southern China to *Phytophthora sojae*[J]. *Plant Disease*, 1998, 82: 555-559.
- [6] 鞠会艳,韩丽梅,王树起.邻苯二甲酸和丙二酸对大豆根腐病原菌的化感作用[J]. *吉林农业科学*, 2002, 27(5): 38-40.
- [7] Gordon S G, Martin S K, Dorrance A E. Rps8 maps to a resistance gene rich region on soybean molecular linkage group F[J]. *Crop Science*, 2006, 46: 168-173.