

黑龙江省大豆三大主要病害抗性鉴定方法研究

马淑梅

(黑龙江大学农学院, 哈尔滨 150080)

摘要 对黑龙江省大豆生产上常发生和危害较重的三种主要病害大豆灰斑病、大豆疫霉病和大豆根腐病进行了抗性鉴定方法研究概述。较系统的总结了作者从事研究工作的部分内容——抗性鉴定方法,在借鉴和吸收他人研究经验的基础上,形成了三种病害较完整的鉴定方法和体系。

关键词 大豆病害; 抗性鉴定; 方法

中图分类号 S435.651 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2007)05-0744-04

METHODS ON RESISTANCE IDENTIFICATION OF THREE MAIN SOYBEAN DISEASES IN HEILONGJIANG PROVINCE

MA Shu-mei

(Agricultural College of Heilongjiang University, Harbin 150080)

Abstract The thesis reviewed the identification methods of resistance on the three main disease of soybean, *Cercosporidium sojinum*, *Phytophthora sojae* and *Fusarium oxysporum*, in Heilongjiang Province. By summarizing the author's studying experience and absorbing other's research work, the article formed a integrated system on the resistance identification methods of the three main soybean disease.

Key words Soybean disease; Resistance identification; Methods

大豆病害对大豆产量和品质影响很大。在世界各主要大豆产国,每年因当地的主发病害给大豆生产造成的经济损失是相当大的。因此,及时了解和研究大豆生产上主要病害的发生危害,并科学的提出研究方法和具体的防治建议,对于提高大豆产量和品质具有十分重要的现实意义。

目前在大豆生产地区发生的病害种类很多,因不同的生态区、不同的品种等发生的病害种类和危害程度不尽相同。在我国大豆生产区,已报道的大豆病害有40余种,对于目前大豆生产上发生的主要病害,已有一些防治方法和措施。但是2005年黑龙江省大豆生产上几种主要病害大发生甚至流行,原

因是由于重、迎茬面积大,导致有较充分的菌源量,但其中最主要的是大豆主要栽培品种90%以上均不抗病,再加之气候条件适合于一些病害发生和流行,这病害“三角”中的诸因素的充分配合造成了生产上病害的大发生,给大豆生产造成了很大危害和损失。这诸因素中品种是关键。抗病品种是控制病害的理想措施,因此研究病害的鉴定方法和技术为抗病种质鉴定打下基础,也为用最科学的方法——抗病品种控制病害提供了技术保障。

黑龙江省大豆生产上近几年发生的主要病害有大豆灰斑病、大豆疫霉病、大豆根腐病、大豆菌核病、大豆孢囊线虫病等。本文主要报导了作者从事研究

收稿日期:2007-04-03

基金项目:国家科技支撑计划—蔬菜大豆重大病虫害防控技术(2006BAD08A08)

作者简介:马淑梅(1959-),女,研究员,主要从事大豆病害研究。E-mail:msm2006@126.com

的三种(灰斑病、根腐病、疫霉病)大豆主要病害的鉴定方法和技术。

1 大豆灰斑病鉴定方法

1.1 病菌生理分化鉴定方法

首先是从大豆资源中(主要是国内生产上栽培品种、品系、农家种)筛选鉴别寄主。筛选鉴别寄主应注意如下几点,第一,要有明确而稳定的鉴别能力,即对试验菌株表现出较敏感和较清晰的反应类型;第二,材料本身不严重感染其它叶部类病害,以更准确的识别被鉴定的病害;第三,遗传基础纯合,出苗整齐一致;第四,最好是生产上栽培品种或好的农家品种骨干亲本。

鉴定设置和具体做法,将大豆灰斑病鉴别寄主—九农一号、双跃四号、合交 69-231、OGDEN、钢 5151、合丰 22 号分别播种在直径 15 cm、高 16 cm 的小泥盆中,盆土用已灭菌的肥沃田土、沙、腐熟廐肥按 3: 1: 1 混合,每盆播一个品种,播种数粒,留健苗 2 株。在植株第二片复叶全部展开时接种,每一病菌标样重复鉴定 2 次以上。

各供试菌株均从单病斑上分离,单孢菌株纯培养在 PDA 试管斜面上培养 10 d(25℃),扩大繁殖用高粱粒培养基,方法是用 500 mL 的三角瓶,每瓶放入煮熟 1/3 程度的高粱粒 100 g、灭菌(121℃、70 min)冷却后接种灰斑病菌,在 27~28℃ 培养 15 d,洗去菌丝,晾干后在干燥阴凉处保存。接种前 3 d 诱发产生新鲜孢子,以无菌水制成孢子悬浮液,用两层纱布过滤加 3% 蔗糖,孢子液浓度为 1×10^5 mL⁻¹。接种用电动吸引器带动喉头喷雾器定量喷雾接种,每盆喷孢子液 3 mL,制备孢子液及接种时均按菌株分别使用专用器具,注意隔离和消毒,以防菌种间混杂和污染。接种在 20~28℃ 保湿 24 h,将盆苗移至圃场,接种后第 15 天进行病斑型调查。病斑型调查:以同一标样,同一品种经 2~3 次鉴定表现一致时为准,按下列标准记载:0:无病斑;1:小型褐色斑,直径 1 mm 以下,不产生孢子;2:病斑直径 2 mm 以下,边缘褐色,中央灰白色,可产生少量孢子;3:直径 2 mm 以上的中型斑,边缘褐色,中央有较大部分灰白色坏死,产生多量孢子;4:直径 3~6 mm 的较不规则型病斑,灰绿色,边缘不明显,有时病斑连片,叶片枯死较快,产生多量孢子。0、1 级属于抗病型,记以 R(Resistant),2 级属于中间型,记以 I(Intermediate),3、4 级属感病型,记以 S(Suscepti-

ble)。

1.2 田间成株期抗病性鉴定方法

建立病害发生观测圃,固定试验地块,于大豆灰斑病发生时收集发病病残体(叶、茎、荚、籽实),每年于秋季翻地后埋于表土下 20 cm,逐渐积累菌源量。将被鉴定材料按生育期顺序排列种植在病圃内,按病害鉴定要求种植。

具体做法是在病情观测圃内有计划地对大量品种进行测定。每个品种在田间顺序排列,每品种种 1 行,行长 2 m,人工双粒点播(间苗后留 1 株),株距 5 cm,规定人工接种测定,土壤重施肥料(施 N 15 kg 667m⁻²,P₂O₅3.5 kg 667m⁻²,施适量的 K)。每隔 10 个测定的品种行,各播 1 行感病和抗病品种作为对照。试验区的保护行均种植感病品种。

接种方法:接种用灰斑病菌生理小种中出现频率较高的 7 个生理小种,即 1 号(频率 50%)、7 号(频率 22%)、10 号(频率 9%)、2、3、4、9 号出现频率各为 4%,将这 7 个生理小种按相应比例混合,各供试菌株用高粱粒培养基扩大繁殖(25~28℃ 15 d),洗去高粱粒上的表面菌丝,晾干后在干燥阴凉处保存。在接种前 3 d 诱发产生新鲜孢子,以无菌水制成孢子悬浮液,用两层纱布过滤加 3% 蔗糖,孢子液浓度为 1×10^5 mL⁻¹孢子。于大豆生育期进入 R3~R4 阶段选择雨后或傍晚进行接种。每隔 10 d 接一次,共接种两次。接种后沟灌充分的水分,以利保湿。10 d 后进行发病调查,按抗性评价标准,即根据单株病级记载,计算病情指数。依据鉴定材料群体的发病状况,确定抗性类型:

分级	描述	抗性评价
1	病情指数 5.0 以下	高抗(HR)
2	病情指数 5.1~20	抗(R)
3	病情指数 20.1~60	中抗(MR)
4	病情指数 60.1~80	感病(S)
5	病情指数 80.1 以上	高感(HS)

2 大豆疫霉病鉴定方法

2.1 大豆疫霉病生理小种鉴定方法

大豆疫霉病菌是较难分离的病原菌之一,用选择性培养基分离大豆疫霉菌是病菌分离成功的关键。菌种保存用燕麦片琼脂培养基。培养基制备用植病学常规方法。鉴别寄主—Harsoy, Harsoy63, Sanga, Mack, PI103091, Kingwa, Pi171442, Aitna。将鉴别寄主播种在盆钵里,每盆 10 株,重复 1 次,盆土

用无菌土壤,出苗前后温室要控制相对稳定温度,在苗期(真叶展开时)用胚轴伤口接种方法,将分离纯化菌株转移到 V₈ 或 CA 平面培养基上培养 7~10 d,取菌膜伤口贴菌接种,接菌后立即罩上塑料薄膜保湿,在 20~25℃ 下保湿 48 h,1 周后调查发病情况。病情调查:接种后,感病植株很快发生植株萎蔫,植株从接种部位折断,全株死亡,抗病植株仅在下胚轴伤口处发生局部变褐,植株继续生长。抗病记以 R(Resistant),感病记以 S(Susceptible)。

病菌菌株分离技术是疫霉病研究中的一个关键,因此,把其分离技术加以介绍。第一,分离材料选择,在采集标样前,预先准备好盛有选择培养基的培养皿,根据病害症状特点,采集新近发病的、离地面尽可能高的病斑植株(这样可避免腐霉菌),病组织经处理后,立即分离,若分离受环境条件限制时,分离标样的保存时间最好不要超过 24 h;第二,病组织消毒,疫霉病菌对许多消毒剂都很敏感,尤其是升汞,因此在消毒时应慎重选择消毒剂,严格掌握消毒时间。在分离大豆疫霉菌时,将病组织用自来水反复冲洗,以 70% 的酒精消毒 5 s,立即用灭菌水彻底冲洗,放在无菌的滤纸上吸干水份,消毒时间不要超过 30 s;第三,培养基选择,疫霉病菌是较难分离的病原菌,在 PDA 培养基上生长缓慢,易被其他病原菌所污染,为此,选择使用适宜的培养基是分离大豆疫霉菌成功的关键之一。在实验中,选用以下 4 种选择培养基和 2 种基础培养基。选择性培养基为:50% 苯菌灵 20 mg、五氯硝基苯 27 mg、新霉素硫酸盐 100 mg、氯霉素 30 mg;苯来特 0.01 g、五氯硝基苯 0.054 g、异菌脲 0.04 g、硫酸新霉素 0.1 g、氯霉素 0.01 g;匹马霉素 10 mg、氨卞青霉素 25 mg、利福平 10 mg、五氯硝基苯 100 mg、恶霉灵 20 mg;五氯硝基苯 20 mg、苯菌灵 10 mg、恶霉灵 20 mg、硫酸新霉素 100 mg、利福平 9 mg。基础培养基基础 V₈ 汁 100 mg,经 3 层纱布过滤,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mg;胡萝卜 200 g,捣碎,3 层纱布过滤,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL。将前两种选择培养基分别直接加到基础培养基中灭菌,后两种选择性培养基分别加到经 121℃ 高压灭菌后冷却至 45℃ 的 1 000 mL 基础培养基中,即为分离所需的选择培养基。四种选择性培养基中所含的硫酸新霉素、氯霉素、氨卞青霉素、利福平和五氯硝基苯抑制真菌,恶霉灵主要抑制腐霉菌。这四种选择性培养基对分离大豆疫霉病均有较好的效果,其中以第二种选择培养基分离效果最好,且配制简便,价格低廉。

2.2 大豆疫霉病抗病种质鉴定方法

供试材料分别由中国农科院作物品种资源所、黑龙江农科院合江所、黑龙江农科院绥化所、黑龙江农科院黑河所提供。这些供试材料中即有生产主栽品种,也有农家品种,还有国外品种。

具体鉴定方法,将在燕麦片琼脂培养基上保存的大豆疫霉菌 1 号病菌生理小种做为接种源,制作新的接种体,用 V₈ 培养基制备,其培养基的成份为,1 000 含 V₈ 汁 40 mL、蔗糖 1 g、酵母膏 0.2 g、0.6 g、琼脂 10 g。培养基制备后用直径为 9 cm 的无菌培养皿加入 13~15 mL 培养基制成平板,供试疫霉菌菌株 1 号生理小种接种平板后在 25~27℃ 无光照条件下培养 1 周。每个供试大豆材料挑选 15 粒分别播种于装有灭菌的土壤、直径 13 cm、高 15 cm 的花盆中,出苗前温室温度不超过 30℃,出苗后温度控制在不超过 25℃。1 周后每材料留 15 株大小一致的苗接种。每 30 盆设一感病对照,品种为合丰 25 或合丰 35。

在苗期(真叶展开时)用下胚轴伤口接种方法,将分离纯化菌株转移到 V₈ 或 CA 平面培养基上培养 7~10 d,取菌膜伤口贴菌接种,接菌后立即罩上塑料薄膜保湿,在 20~25℃ 下保湿 48 h,6 d 后调查发病情况。具体接种方法是用刀片将大豆子叶节下方 1 cm 处轻划长度约 1 cm 的伤口,取菌膜贴在伤口处,接种后立即涂上保湿剂保湿 48 h,在 20~25℃ 温度下继续培养,1 周后调查发病情况。接种后感病植株很快发生整株萎蔫,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,植株继续生长,抗病记以 R(Resistant),植株死亡率 30%,感病记以 S(Susceptible),植株死亡率 70%,中间类型 I(Intermediate) 植株死亡率在 31%~69% 之间,抗病和中间类型均进行 2~3 次重复鉴定。

3 大豆根腐病鉴定方法

供试材料由中国农科院品资所提供,其中大多数为资源材料,部分材料为生产上栽培品种。

3.1 接种用病原菌及大豆植株培植

接种菌主要用尖孢镰刀菌和腐霉菌两种致病菌,这两种致病菌是从黑龙江省大豆生产区发病样本中分离并纯化得到的,具有一定的代表性。

大豆被鉴定材料的植株先种植在田间自然发病重的病圃内进行初次鉴定,然后在温室内对发病轻

的进行人工接种再次鉴定。

将 PDA 培养基上培养生长的 *F. oxysporum* 和 *Pythum* 接种到二级高粱砂培养基上(高粱粉:细砂:水为 10:60:10)于 25℃ 培养 25~30 d 左右进行扩繁,然后将高粱砂培养菌按一定的比例和无菌土混合均匀。待接种用。

3.2 试验在温室内进行

在大小一致的花盆中装入一定比例接种的一定重量的菌土,保湿 3~4 d 后,每盆播种 10 粒大豆种子,每处理 3 盆,重复 2 次。光照采用自然光照,温度控制在白天 18~20℃,夜间 13~15℃,土壤湿度采用土壤称重法控制为土壤烘干重的 22%~23%,每天补足由于蒸发而损失掉的水份。

于播后 25 d 幼苗处于真叶期进行发病率和病情严重度调查。病情分级标准:0:幼苗茎基部和主根上均无病斑。1:茎基部和主根上有少量病斑,病斑面积在 1/4 以下。2:茎基部和主根上病斑面积占

茎基部和主根总面积 1/4~1/2 左右。3:茎基部和主根上病斑面积占 1/2~3/4 左右。4:茎基部和主根上病斑连片,形成绕茎现象,但根系并为坏死。5:根系坏死,地上部分萎蔫或死亡。初鉴的调查方法和复鉴的鉴定方法是一致的。

参 考 文 献

- [1] 马淑梅,李宝英. 大豆灰斑病发生规律及防治技术研究[J]. 植物保护学报,1997,24(3):242-248.
- [2] 马淑梅,李宝英. 大豆疫霉根腐病菌生理小种鉴定结果初报[J]. 大豆科学,1999,18(4):151-153.
- [3] 马淑梅,李宝英. 大豆疫霉根腐病资源筛选及抗性遗传研究[J]. 大豆科学,2001,20(3):197-199.
- [4] 马淑梅,丁俊杰,郑天琪. 黑龙江省大豆新品系抗灰斑病鉴定结果[J]. 大豆科学,2002,21(4):295-297.
- [5] 马淑梅,李宝英. 大豆品种资源对根腐病抗性鉴定研究[J]. 作物品种资源,1997,3:33-34.
- [6] 王晓鸣,朱振东,马淑梅. 大豆疫霉选择性分离技术研究[J]. 植物病理学报,1998,28(1):78.
- [7] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:农业出版社,1977.

欢迎订阅《昆虫知识》

《昆虫知识》为综合性学术期刊(双月刊),是中国生物类和植保类中文核心期刊,国内外公开发刊。设有研究选萃、科技前沿、综述与进展、研究论文、研究简报、技术与方法、基础知识、争鸣、学术动态、书评等栏目。本刊以促进科学和经济发展为宗旨,优先考虑发表创新突出和对生产有重要指导作用的科研成果。读者对象主要是从事昆虫学和植物保护研究的科技工作者、大中专学校师生,以及从事生物学教学的各类学校教师和昆虫爱好者。

《昆虫知识》2008 年页码 156 页,全铜板纸彩插印刷。单册定价:25 元,全年 150 元。凡在编辑部订阅 2008 年期刊 1 卷的个人或单位可获赠 2005 年前过刊 1 卷;中国昆虫学会会员可享受 8 折优惠价(120 元/年)。编辑部尚存 1999~2006 年各卷,3~5 折优惠(卷价分别为 1999,2000 年 20 元;2001,2002 年 25 元;2003,2004 年 30 元,2005 年 45 元,2006 年 75 元)。邮购创刊 50 周年全文检索数据光盘 A 款 300 元(1955~2003 年),B 款 200 元(1991~2005 年)。需要者请直接汇款至编辑部(以上邮购过刊均含邮费),并说明需要哪年的期刊。

地址:北京市朝阳区大屯路,中国科学院动物研究所《昆虫知识》编辑部,邮编:100101

电话:(010)64807137 电子信箱:entom@ioz.ac.cn

欢迎订阅 2008 年《北京林业大学学报》

《北京林业大学学报》是教育部主管、国内外公开发行的全国性林学与森林生物学学术期刊。

该刊重点报道以林木遗传育种学、森林培育学、森林经理学、森林生态学、树木生理学、森林土壤学、森林植物学、森林保护学、自然保护区学、园林植物与观赏园艺、水土保持与荒漠化防治、森林工程、木材科学与技术、林产化学加工工程、其他学科在林学上的应用等方面的论文。

《北京林业大学学报》为双月刊,大 16 开本,160 页左右,单月月底出版。每期定价 50 元。各地邮局发行,邮发代号:82-304。国内统一刊号:CN 11-1932/S。如当地邮局订阅不便或错过征订时间,也可直接汇款向本刊编辑部订阅。

地址:北京市海淀区清华东路 35 号《北京林业大学学报》编辑部

邮编:100083 发行电话:010-62338397 联系人:刘大林

发行电子信箱:liudalin@bjfu.edu.cn

网址:http://www.bjfujournal.cn/