



刘冬旭,陈庆山,辛大伟,等.大豆细菌性斑点病抗感品种的筛选[J].黑龙江农业科学,2021(9):50-53.

# 大豆细菌性斑点病抗感品种的筛选

刘冬旭,陈庆山,辛大伟,宋皓晨

(东北农业大学 农学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:**为了更加准确地筛选抗病种质资源,丰富我国抗病种质资源库,同时探究丁香假单胞菌在大豆上的致病机制,本研究选用能够准确鉴定的高压喷雾-涂板调查法,利用分离的假单胞杆菌 *Psgneau* 001 菌株接种含有野生大豆基因组背景的全基因组导入系 96 份大豆材料进行抗性鉴定。结果表明:全基因组导入系共 96 份材料,其中抗病材料 57 份,占 59%;中抗材料 12 份,占 13%;感病材料 27 份,占 28%。本研究结果可以作为进一步利用导入系群体进行大豆抗细菌性斑点病的基因挖掘基础,同时为大豆的抗细菌性病害育种提供抗病材料。

**关键词:**细菌性斑点病;大豆;抗感品种的筛选

大豆细菌性斑点病是非常普遍的一种大豆病害,可以在大豆整个生育时期发病,可以侵染叶片、叶柄、茎秆,以侵染叶片为主。早期呈现近圆形淡黄色病斑,随着侵染时间的延长,病斑变为黄色近褐色,病斑外缘会形成褪绿的晕圈。茎秆和荚的病斑为褐色圆形,种子感病会在表皮形成细菌黏液。病粒萎缩,病菌在残株上过冬。病害在低温多雨条件下传播。黑龙江省是我国最大的大豆生产区,国产大豆有一半产自黑龙江省。细菌性病害近年来在黑龙江省的生产中对生产的危害有逐年增加的趋势,但是相应的抗原筛选工作却比较滞后。

细菌性斑点病主要分为 3 种:即大豆细菌性斑点病,病原菌为丁香假单胞菌大豆致病变种(*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*)<sup>[1-4]</sup>;大豆细菌性斑疹病,病原菌为油菜黄单胞菌大豆致病变种 [*Xanthomonas campestris* pv. *glycinea* (NaKmo)Dye];大豆细菌性野火病,病原菌为丁香假单胞菌烟草致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*)<sup>[5-8]</sup>。其中,最为普遍的是大豆细菌性斑点病,主要危害大豆叶部,使大豆产量降低<sup>[9]</sup>。对于抗病和感病品种的鉴定,不同的研究

人员所使用的方法和标准不尽相同。目前国内鉴定结果较为一致的抗大豆细菌性斑点病的品种有东农 42 和绥农 8 号<sup>[10]</sup>。本研究采用高压喷雾-涂板调查法,利用分离的假单胞杆菌 *Psgneau* 001 菌株接种于全基因组导入系材料鉴定筛选抗感材料,对未来深入探究丁香假单胞杆菌的致病性和培育大豆抗病种质资源的发展具有推动作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌种:病原菌 *Psgneau* 001,由东北农业大学大豆遗传改良课题组已经分离纯化的田间细菌性斑点病病原菌。

大豆品种:对照品种选用黑龙江省农垦科研育种中心筛选的抗病品种野生大豆 ZYD00006 和感病品种绥农 14,鉴定材料为 ZYD00006 和绥农 14 亲本的全基因组导入系 96 份大豆种质资源。

### 1.2 方法

1.2.1 菌液制备及接种方法 将病原菌 *Psgneau* 001 接种在 NYG 液体培养基中 220 r·min<sup>-1</sup>,设定温度 28℃,培养过夜。3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,除上清,10 mol·mL<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>重悬菌体,测 OD<sub>600</sub> 吸光值(1 OD 约为 5×10<sup>8</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>)。

将菌液稀释至 1×10<sup>5</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>,加入表面活性剂 Silwet L-77 至终浓度 0.05%,平摇充分混匀(不要剧烈晃动产生泡沫),准备高压喷射侵染。

每个品种 5 次重复,播种在育苗钵中,放置在

收稿日期:2021-06-17

基金项目:国家自然科学基金(U20A2027,32072014);中国博士后科学基金(2020M681072)。

第一作者:刘冬旭(1999—),女,在读学士,专业为大豆生物技术。E-mail:ldxwm1203@163.com。

通信作者:陈庆山(1973—),男,博士,教授,从事大豆生物技术研究。E-mail:qshchen@126.com。

人工气候室内,16 h(光照)/8 h(黑暗),25 ℃ 培养 14 d 左右,至第一片三出复叶完全展开。

取长势相近的植株,利用高压电动喷枪,从叶片背面,将准备好的菌液喷射入叶片中,看到接种处叶片区域变湿润为标准,呈轻微水渍状<sup>[11]</sup>。同时避免过度接种,损伤叶片。

接种 4 d 后,用直径为 2 mm 的打孔器取 3 个叶碟,放入含有 400 μL 10 mol·mL<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 1.5 mL EP 中充分研磨,加 600 μL MgCl<sub>2</sub> 至 1 mL,稀释 1 000 倍,取 100 μL 涂布于羧苄青霉素抗性的 NYG 平板上,培养 2 d 后,统计平板菌落个数,计算平均数<sup>[12]</sup>。

1.2.2 大豆抗病性评价 接种后 12 d,观察统计叶片发病情况,结合叶片表型和统计的平均菌落个数共同判断不同大豆品种抗感情况。根据发生病害的症状,以叶片病斑个数为单位,将病情级别分为 0 级、1 级、2 级、3 级和 4 级 5 个级别(表 1)。

表 1 大豆抗细菌性斑点病鉴定病情级别及发病情况	
病情级别	发病情况
0	接种叶片上看不到病斑或斑点数为 5 个以下
1	叶片上少量散生斑点,斑点数为 5~20 个
2	病斑区域扩展,周围形成褪绿晕圈,斑点数为 20~50 个
3	病斑区域扩展蔓延,斑点数为 50~80 个
4	发病病斑面积超过叶面积一半以上,叶片变黄脱落 <sup>[13]</sup>

1.2.3 数据分析 试验数据采用 Excel 2013 软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗感品种接种后发病情况

利用高压喷雾法接种不同大豆品种,4 d 后涂板调查,统计平均菌落个数,12 d 后观察叶片发病情况。将感病对照绥农 14 和抗病对照 ZYD00006 的平板菌落个数对比(图 1),获得感病对照绥农 14 和抗病对照 ZYD00006 接种 12 d 后叶片发病情况对比(图 2),接种 12 d 后绥农 14 叶片发病明显严重,而 ZYD00006 的三出复叶无明显病斑。

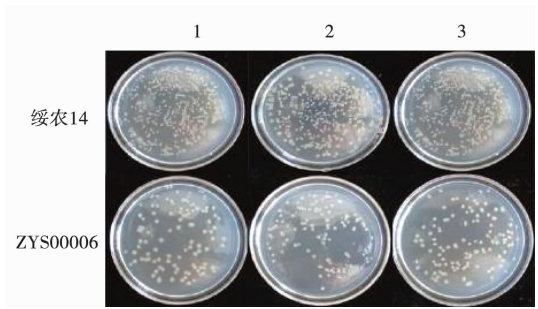


图 1 绥农 14 和 ZYD00006 接种后 4 d 取样涂板菌落个数对比

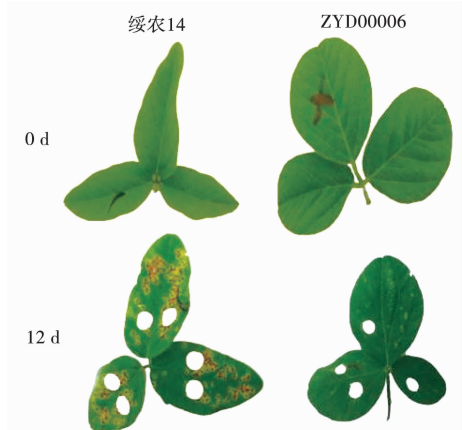


图 2 绥农 14 和 ZYD00006 接种 *Psgneau* 001 菌株 12 d 后叶片发病情况对比

### 2.2 全基因组导入系抗感情况

由表 2 和图 3 可知,以绥农 14 和 ZYD00006 为亲本的全基因组导入系 96 份材料接种 *Ps-gneau* 001,进行抗感鉴定,得到全基因组导入系 96 份材料中抗病材料 57 份,占 59%;中抗材料 12 份,占 13%;感病材料 27 份,占 28%。

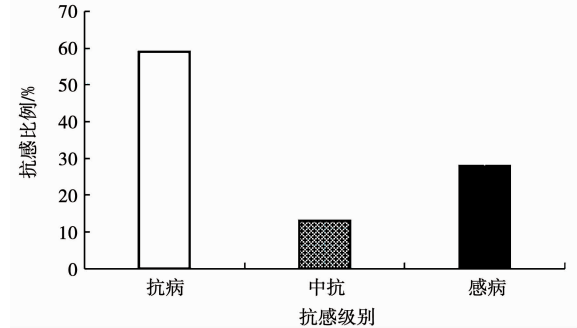


图 3 全基因组导入系的抗感比例

表 2 全基因组导入系抗感性材料									
项目	种质资源名称	平均菌落个数/个	发病等级	种质资源名称	平均菌落个数/个	发病等级	种质资源名称	平均菌落个数/个	发病等级
抗病材料	B70-2	1	0	B132-2	138	1	B41-2	261	1
	B62-1	10	1	B101-2	139	1	B46-2	264	0
	B78-2	20	0	B31-2	140	1	B102-2	269	1

表 2 (续)

项目	种质资源名称	平均菌落 个数/个	发病 等级	种质资源名称	平均菌落 个数/个	发病 等级	种质资源名称	平均菌落 个数/个	发病 等级
抗病材料	B117-2	21	0	B59-2	152	1	B60-2	289	1
	B95-1	23	0	B81-7	154	1	B87-7	290	1
	B11-2	29	0	B23-2	156	1	B159-1	291	1
	B15-2	29	0	B99-8	157	1	B113-1	298	1
	B30-1	29	0	B20-3	169	1	B106-1	300	1
	SB26-3	31	1	B68-1	170	1	B107-2	308	1
	B98-2	37	1	B24-2	182	0	B44-3	309	0
	B45-3	42	1	B109-2	187	0	B6-1	332	1
	B114-2	48	1	B120-2	195	1	B144-2	342	1
	B92-1	48	1	B120-1	200	1	B100-2	344	1
	B65-3	60	0	B53-2	200	1	B148-2	362	1
	B108-3	65	1	B85-2	205	0	B94-1	367	1
	B45-1	84	1	B123-1	218	1	B27-2	369	1
	B50-3	84	1	B51-1	231	1	B80-2	375	1
	B103-1	108	0	B40-2	244	1	B7-2	390	1
	B126-2	121	0	B49-3	244	1	B81-3	415	1
中抗材料	B12-3	668	2	B15-2	776	2	B26-2	932	2
	B91-2	722	2	B67-3	803	2	B10-2	1275	2
	B25-1	725	2	B142-2	914	2	B146-3	1277	2
	B82-1	775	2	B42-2	922	2	B154-1	1597	2
感病材料	B83-7	680	3	B73-2	1028	3	B155-2	1541	3
	B9-2	704	3	B119-2	1080	3	B58-2	1602	3
	B157-1	818	3	B162-1	1108	3	B94-2	1663	3
	B122-2	852	3	B164-2	1112	3	B29-1	1857	3
	B136-2	866	3	B147-1	1120	3	B63-2	2146	3
	B127-3	912	3	B149-2	1158	3	B36-2	2631	4
	B160-3	913	3	B16-2	1216	3	B56-2	2941	4
	B147-2	970	3	B151-1	1270	3	B33-2	5076	3
	B55-1	1011	3	B83-4	1416	3	B32-1	5748	4

3 讨论

本研究共分析了 96 个导入系,通过接种细菌性斑点病菌后的表型分析发现不同的导入系具有不同的抗病表型。由于导入系群体每个个体含有的野生大豆导入片段不同,所以其表现的遗传特征也有所不同。基于本研究结果可以推定,不同导入系个体的抗病表型差异是由于导入系个体中含有不同的野生大豆导入片段。进而影响了所分析个体的抗病表型。在其他作物中已经有利用导入系个体进行目标性状的基因挖掘工作,并且成功地找到了目标性状的调控基因。所以本研究结果对于进一步的利用导入系群体进行大豆抗细菌性斑点病的基因挖掘具有重要的理论意义。

对于细菌性病害的接种方法除高压喷雾法<sup>[14-15]</sup>、高压喷雾-涂板调查法<sup>[16]</sup>外,评价大豆细菌性斑点病抗病性接种方法还有针刺法<sup>[17]</sup>。在本研究中,以绥农 14 为感病材料,ZYD00006 为抗病材料,在其全基因组导入系 96 份材料中,平均菌落数最大值为 5 748 个,最小值为 1 个,菌落数主要分布在 0~6 000 个区间内。对大豆种质资源抗感能力遗传多样性的研究,要选用典型代表品种样本通过不断回交和抗性筛选,改良种质资源农艺性状。同时利用分子杂交和分子辅助标记等方法准确找到与目标性状相关的基因,使性状得到稳定遗传,获得具有优异抗性的大豆种质资源,对改良现有品种的抗病性和培育抗病新品种具有重要的应用价值。

## 4 结论

本研究共鉴定了 96 个导入材料,确定了不同导入系个体的抗病表型,结果表明不同的野生大豆导入片段可以直接影响大豆的抗病性,同时所鉴定的材料对于进一步挖掘抗病候选基因具有重要的理论意义。

### 参考文献:

- [1] 丁俊杰. 大豆细菌斑点病抗性鉴定的研究概况[J]. 黑龙江农业科学, 2013(1): 132-134.
- [2] CHIKU K, TSUNEMI K, YAMAMOTO M, et al. Defects in D-Rhamnosyl residue biosynthetic genes affect lipopolysaccharide structure, motility, and cell-surface hydrophobicity in *Pseudomonas syringae* pathovar *glycinea* Race 4[J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2013, 77(3): 505-510.
- [3] WORLEY J N, RUSSELL A B, WEXLER A G, et al. *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 CmaL(PSPTO4723), a DUF1330 family member, is needed to produce L-allo-isoleucine, a precursor for the phytotoxin coronatine[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 195(2): 287-296.
- [4] MCCANN H C, EHA R, BERTELS F, et al. Correction: Genomic analysis of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* provides insight into the origins of an emergent plant disease [J]. Plos Pathogens, 2013, 9(7): e1003503.
- [5] 赵海红. 大豆细菌性斑疹病的发病原因及防治方法[J]. 黑龙江农业科学, 2013(11): 159-160.
- [6] ABDELHALEEM H, WOOD E D, BOERMA H R, et al. Registration of G08PR-394 and G09PR-80 soybean germplasm lines with diverse pedigrees[J]. Journal of Plant Registrations, 2013, 7(3): 347.
- [7] LEE S, DONG S Y, UPPALAPATI S R, et al. Suppression of plant defense responses by extracellular metabolites from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in *Nicotiana benthamiana* [J]. BMC Plant Biology, 2013, 13(1): 65.

- [8] GUPTA K J, BROTMAN Y, SEGU S, et al. The form of nitrogen nutrition affects resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in tobacco[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(2): 553-568.
- [9] LANA D F, ZIEGELMANN P K, MAIA A H N, et al. Meta-analysis of the relationship between crop yield and soybean rust severity [J]. Phytopathology, 2014, 105 (3): 307-315.
- [10] 张淑珍, 徐鹏飞, 吴俊江, 等. 黑龙江省大豆品种对细菌性斑点病的田间抗病性调查及室内接种鉴定分析[J]. 东北农业大学学报, 2006, 37(5): 588-591.
- [11] YANG N N, REIGHARD G, RITCHIE D, et al. Mapping quantitative trait loci associated with resistance to bacterial spot (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) in peach[J]. Tree Genetics & Genomes, 2013, 9(2): 573-586.
- [12] 陈庆山, 于仁敬, 辛大伟, 等. 大豆细菌性斑点病抗性品种和种质资源筛选[J]. 东北农业大学学报, 2016, 47(1): 1-8.
- [13] DONG H K, KIM K H, VAN K, et al. Fine mapping of a resistance gene to bacterial leaf pustule in soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 120 (7): 1443-1450.
- [14] 孙永吉, 刘宗麟. 大豆品种资源抗细菌斑点病鉴定与评价[J]. 大豆科学, 1989(2): 185-189.
- [15] 刘亚光, 马超, 冯蕾. 几种化学诱抗剂对大豆细菌性斑点病诱导抗性的研究[J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(1): 116-118.
- [16] MUKHERJEE D, LAMBERT J W, COOPER R L, et al. Inheritance of resistance to bacterial blight (*Pseudomonas glycinea* Coerper) in soybeans (*Glycine max* L.) [J]. Crop Science, 1966, 6(4): 1080-1083.
- [17] WANG J, SHINE M B, GAO Q M, et al. Enhanced disease susceptibility1 mediates pathogen resistance and virulence function of a bacterial effector in soybean[J]. Plant Physiology, 2014, 165(3): 1269-1284.

## Screening of Soybean Varieties Resistant and Susceptible to Bacterial Spot

LIU Dong-xu, CHEN Qing-shan, XIN Da-wei, SONG Hao-chen

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** In order to more accurately screen disease-resistant germplasm resources, enrich disease-resistant germplasm resources, and detect the pathogenic mechanism of *Pseudomonas syringae* on soybeans, a high-pressure spray-coating survey method was used to identify the soybean phenotype after inoculated with *Pseudomonas syringae*. The isolated *Pseudomonas Psagneau* 001 strain was used to inoculate 96 soybean lines of the chromosome segment substituted lines (CSSL) for resistance identification. The results showed that there were 96 CSSL lines showed different phenotype, including 57 lines with resistant phenotype, accounting for 59%; 12 lines with moderately resistant phenotype, accounting for 13%; and 27 with susceptible phenotype, accounting for 28%. These result supply a foundation for further gene identification *via* CSSL, and also supply the resistant materials for breeding.

**Keywords:** bacterial spot; soybean; selection of resistant and susceptible varieties