

周淼平, 姚金保, 张鹏, 等. 小麦幼苗纹枯病抗性评价新方法[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(1): 61-66.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.01.010

小麦幼苗纹枯病抗性评价新方法

周淼平, 姚金保, 张鹏, 杨学明, 余桂红, 马鸿翔
(江苏省农业科学院生物技术研究所/江苏省农业生物学重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 为验证在室内采用禾谷丝核菌菌丝悬浮液直接接种小麦发芽种子来评价小麦苗期纹枯病抗性方法的准确性, 本研究采用 16 份小麦品种(系)进行室内幼苗纹枯病抗性、田间苗期纹枯病抗性、温室苗期纹枯病抗性和田间成株期抗性鉴定及相关性分析。结果表明, 室内幼苗纹枯病抗性鉴定结果与田间苗期纹枯病抗性鉴定结果显著相关, 该方法可用于小麦苗期纹枯病抗性评价, 小麦苗期与成株期纹枯病的抗性机制可能不同。采用该鉴定方法对黄淮麦区 302 份小麦品种(系)进行幼苗纹枯病抗性评价, 筛选到 5 份抗病新种质。这些研究结果将为小麦纹枯病抗病育种工作的开展提供帮助。

关键词: 小麦; 幼苗; 纹枯病; 抗性; 鉴定

中图分类号: S435.121 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)01-0061-06

New method for the resistance evaluation of wheat sharp eyespot in seedling

ZHOU Miao-ping, YAO Jin-bao, ZHANG Peng, YANG Xue-ming, YU Gui-hong, MA Hong-xiang
(*Institute of Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Provincial key laboratory of Agrobiology, Nanjing 210014, China*)

Abstract: In order to validate the accuracy of new evaluation method for wheat sharp eyespot(WSE) resistance of seedling by inoculating directly with the suspension of disease mycelia, sixteen varieties were respectively identified the resistance to WSE by the evaluation methods of seedling indoor, seedling in field, seedling in greenhouse and adult plant in field. The correlation between the evaluation methods was analyzed in this study. The results showed that there was significant correlation between the resistance of seedling indoor and that of seedling in field. The evaluation method of seedling indoor could be used to identify the resistance to WSE in seedling stage. The results also indicated that there could be different resistance mechanisms between seedling and adult plant of wheat. Using the new method, five wheat varieties with the seedling resistance to WSE were screened from 302 varieties of Huanghuai wheat region. These results will be helpful to the breeding of wheat cultivar with the resistance to WSE in the future.

Key words: wheat; seedling; wheat sharp eyespot; resistance; evaluation

收稿日期: 2016-04-05

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大科技专项
(2016ZX08002001); 国家公益性行业科研专项
(201503112); 江苏省科技支撑计划(BE2014351)

作者简介: 周淼平(1968-), 男, 江苏兴化人, 硕士, 研究员, 主要从事小麦生物技术育种研究。(E-mail) mpzhou@jaas.ac.cn

小麦纹枯病(Wheat sharp eyespot)是世界性的土传真菌病害, 主要是由禾谷丝核菌(*Rhizoctonia cerealis* Vander hoeven)侵染小麦基部茎秆引起的。小麦纹枯病病害导致小麦基部茎秆腐烂, 抗倒伏能力下降, 严重时会产生死苗和枯白穗, 该病害在欧洲、美洲、大洋洲和亚洲均有报道^[1]。该病在中国黄淮麦区和长江中下游麦区发生频繁, 使小麦产量损失

严重,2005-2008年中国因小麦纹枯病而造成的经济损失超过 1×10^9 元^[2-3]。培育和应用抗纹枯病小麦品种无疑是防治该病害最经济有效的途径,而小麦纹枯病抗性的准确鉴定是培育小麦抗病品种的重要前提。

纹枯病在小麦整个生育期内有2个发病高峰,分别在苗期和拔节孕穗期(成株期)^[4]。苗期病害主要表现为烂芽、病苗和死苗,成株期病害主要表现为花秆烂茎和枯白穗^[5]。目前已报道的小麦纹枯病抗性鉴定方法主要针对成株期,分为自然病圃鉴定和人工接种鉴定^[6]。人工接种鉴定的方法主要有玉米砂混法、菌丝外贴法、嵌入法、土表接种法和沟带接种法^[7-9],针对苗期小麦纹枯病抗性鉴定方法的报道较少,有研究表明,纹枯病发病越早,小麦产量损失越严重^[10]。因此,建立准确、可重复的小麦苗期纹枯病抗性评价方法对小麦抗纹枯病品种的培育和抗性遗传分析非常必要。

本研究拟采用禾谷丝核菌菌丝悬浮液在室内直接接种中国黄淮麦区302份小麦品种(系)的幼苗,调查幼苗纹枯病抗性,并对小麦的田间苗期、温室苗期和田间成株期纹枯病抗性分别进行相关分析,探索小麦苗期纹枯病抗性评价新方法,为今后培育抗纹枯病的小麦新种质奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

黄淮麦区302份供试品种或品系由江苏省农业科学院农业生物技术研究所小麦室提供和保存。小麦纹枯病病菌禾谷丝核菌R0301由江苏省农业科学院植物保护研究所陈怀谷研究员提供。

1.2 试验方法

1.2.1 室内小麦幼苗纹枯病抗性评价方法 禾谷丝核菌R0301接种于马铃薯葡萄糖液体培养基,22℃、150 r/min振荡培养5 d,将培养菌液分批转移至50 ml离心管中,加入20个直径3 mm的钢珠,采用涡旋器涡旋,直至将纹枯病病菌菌丝打成1~2 mm的小片段后混匀,形成菌丝悬浮液。

小麦种子消毒后萌发催芽,芽长5 mm左右,浸于禾谷丝核菌菌丝悬浮液中并轻轻搅动,浸泡接种5 min后,将10粒接种种子呈直线均匀置于灭菌的湿润纸巾(24 cm×16 cm)上,芽的生长方向一致,指向纸巾边缘,将纸巾从一端向另一端卷起置于塑料

盒中,在15℃、90%湿度的环境中培养14 d,调查小麦幼苗纹枯病的发病情况。

根据病害严重程度将纹枯病病级分为5级:1级是第1叶叶鞘病斑长度小于1.0 cm,2级是第1叶叶鞘病斑长度为1.0~2.0 cm,3级是第1叶叶鞘病斑长度大于2.0 cm但幼苗未萎蔫,4级是幼苗出现萎蔫病症,5级是幼苗死亡。计算平均病级。

2014年11月-2015年2月共进行3次独立的抗性鉴定试验。

1.2.2 田间小麦苗期纹枯病抗性评价方法 随机选取16份小麦品种(系),于2015年11月在江苏省农业科学院试验地进行苗期纹枯病抗性鉴定,试验设计1 m行长,每行40粒种子,每个品种(系)播2行,其中1行采用病麦粒和健康种子混合播种接种纹枯病病菌,1行作为对照,计算小麦成苗率。苗期纹枯病抗性调查于3叶期进行,以小麦幼苗成活率作为纹枯病抗性指标,成活率愈高,抗性愈强。试验重复3次。

1.2.3 温室小麦苗期纹枯病抗性评价方法 温室小麦苗期纹枯病抗性鉴定于2015年11-12月在江苏省农业科学院温室进行,纹枯病病菌接种和抗性评价方法参照任丽娟等的方法^[11],在小麦3~4叶期接种,接种部位缠绕水浸湿的医用脱脂棉,接种后保湿48 h,1 d喷1次水,30 d后调查小麦纹枯病发病情况,计算纹枯病平均病级。试验重复3次。

1.2.4 田间小麦成株期纹枯病抗性评价方法 小麦成株期纹枯病抗性鉴定采用病麦粒接种法,分别于2013年、2014年和2015年小麦拔节期在江苏省农业科学院试验地进行。将带有禾谷丝核菌的病麦粒均匀播于小麦植株基部,覆土保湿7 d。在小麦乳熟期调查纹枯病发病情况,每个品种调查30个发病茎秆,计算平均病级。病级判定标准参照王裕中等方法^[12]并略作修改:1级为叶鞘有典型的纹枯病病斑,但不侵茎;2级为病菌侵入茎秆,病斑环茎宽度不超过茎秆周长的1/2;3级为茎秆上病斑环茎宽度是茎秆周长的1/2~3/4;4级为茎秆上病斑环茎宽度是茎秆周长的3/4以上或茎秆已软腐;5级为出现枯孕穗或枯白穗。

1.3 数据统计分析

方差分析和相关性分析分别采用Excel和SAS9.0软件进行。

2 结果与分析

2.1 室内小麦幼苗纹枯病抗性鉴定结果

新的小麦幼苗纹枯病抗性评价方法在室内进行,既可以有效避免田间小麦茎腐病和根腐病等病原菌的干扰,又能方便调控试验所需的温度和湿度。该方法采用禾谷丝核菌悬浮液直接接种刚发芽的小麦种

子,于2~3叶期调查纹枯病发病情况,室内幼苗纹枯病病害典型症状见图1。对302份黄淮海区小麦品种(系)幼苗鉴定结果进行方差分析,结果显示小麦品种(系)的纹枯病病情差异显著($DF=301, F=9.61, P<0.0001$),品种(系)间的抗性异同可以区分。3次独立试验间的相关性均达到极显著水平且相关系数较高(表1),表明该评价方法有较好的重复性。

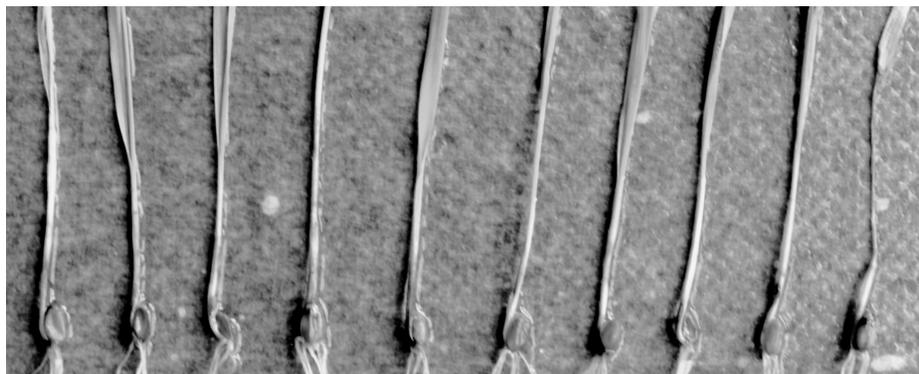


图1 小麦苗期纹枯病症状

Fig.1 Symptoms of sharp eyespot in wheat seedling

表1 室内幼苗纹枯病抗性鉴定试验间的相关性分析

Table 1 The correlation analysis among experiments for wheat sharp eyespot resistance evaluation in the lab

试验编号	1	2
2	0.75**	
3	0.73**	0.74**

**表示极显著相关($P<0.01$)。

2.2 室内幼苗纹枯病抗性鉴定结果与田间苗期纹枯病抗性鉴定结果的相关性

为验证室内小麦幼苗纹枯病抗性评价方法的准确性以及与其他苗期、成株期小麦纹枯病抗性评价方法的相关性,随机选取了16份小麦品种(系)分别进行了田间苗期、温室苗期以及田间成株期的纹枯病抗性鉴定,结果如表2显示。

方差分析结果(表3)表明,4种方法对品种间差异鉴定的结果都达到显著水平。

在田间,纹枯病病菌对萌发的幼芽和幼苗均有侵染,侵染幼芽会造成烂芽,使芽不能破土而在土壤中死亡,侵染幼苗会使叶鞘或叶片产生病斑,严重时叶片基部腐烂、叶片掉落,直至植株死亡。目前对小麦苗期纹枯病抗性的评价尚未有合适标准,多以幼

表2 16份小麦品种(系)纹枯病抗性鉴定结果

Table 2 The results of resistance evaluation for WSE in sixteen varieties

品种(系)	室内幼苗纹枯病平均病级	田间幼苗平均成活率(%)	温室苗期纹枯病平均病级	田间成株期纹枯病平均病级
淮麦20	2.9	20.0	2.4	2.6
徐麦29	2.8	38.2	2.8	3.4
周麦22	2.7	65.3	2.0	2.3
许农14	2.5	55.7	2.8	2.3
徐麦26	2.5	48.9	2.3	2.7
淮麦30	2.5	41.0	2.6	3.2
烟优361	2.4	55.2	2.4	2.2
连0809	2.4	52.4	2.0	2.0
济麦25	2.3	46.8	2.5	2.2
新麦23	2.3	27.8	3.1	3.0
皖麦52	2.0	50.5	2.5	2.9
豫麦49	1.9	52.4	2.8	2.4
济麦23	1.8	61.9	2.5	2.3
AHY11	1.5	61.4	2.6	2.3
N22	1.3	80.5	2.3	2.2
N7	1.2	67.9	2.4	2.5

苗的成苗率作为衡量指标,一般认为成苗率越高,纹枯病抗性越强。采用健康种子与人工培养的病麦粒混合播种的方法对16份品种(系)苗期纹枯病的抗性进行鉴定。结果(表2)显示,品种(系)间幼苗的成活率为20.0%~80.5%,差异显著,方差分析结果(表3)表明品种(系)间的纹枯病抗性差异明显。对室内幼苗纹枯病抗性鉴定的平均病级与田间幼苗平均成活率进行相关性分析,发现两者呈极显著的负相关,相关系数为-0.69(表4)。室内幼苗鉴定病害愈重,其田间成苗率愈低,表明室内幼苗的纹枯病抗性鉴定结果可以较好地反映田间苗期纹枯病的抗性。

2.3 室内幼苗纹枯病抗性鉴定结果与温室苗期纹枯病抗性鉴定结果的相关性

采用任丽娟等的温室苗期纹枯病鉴定方法^[11]对16份品种(系)进行抗性鉴定,结果(表2)显示,温室苗期纹枯病平均病级为2.0~3.1。与室内幼苗纹枯病抗性鉴定结果进行相关性分析,发现两者之间没有相关性,与田间幼苗平均成活率的相关系数虽然达到-0.43(表4),但相关性没有达到显著水平($P=0.10$)。这些结果表明,该温室苗期纹枯病抗性鉴定方法不能准确评价小麦苗期纹枯病抗性。

表3 不同抗性评价方法鉴定结果的方差分析结果

Table 3 ANOVA of the resistance to WSE identified by different evaluation methods

鉴定方法	差异源	SS	df	MS	F	P
室内幼苗抗性鉴定法	品种间	12.228 1	15.000 0	0.815 2	8.469 7	2.530 0×10 ⁻⁷
	品种内	3.080 0	32.000 0	0.096 3		
田间幼苗抗性鉴定法	品种间	10 197.224 7	15.000 0	679.815 0	4.722 9	0.000 1
	品种内	4 606.050 0	32.000 0	143.939 1		
温室苗期抗性鉴定法	品种间	3.414 6	15.000 0	0.227 6	3.644 8	0.001 0
	品种内	1.998 6	32.000 0	0.062 5		
田间成株期抗性鉴定法	品种间	7.111 5	15.000 0	0.474 1	2.063 2	0.042 0
	品种内	7.353 3	32.000 0	0.229 8		

SS:平方和;df:自由度;MS:均方;F:F值;P:均方期望。

2.5 小麦幼苗抗纹枯病种质的筛选

采用室内幼苗纹枯病抗性评价方法对302份黄淮麦区小麦品种(系)进行抗性鉴定,结果显示,纹枯病病级变幅为1.2~4.0,平均病级为2.6。本研究将纹枯病的平均病级(A) ≤ 1.5 定义为抗病,1.5 $<A$ ≤ 2.0 定义为中抗,2.0 $<A$ ≤ 2.5 定义为中感, $A > 2.5$ 定义为感病,发现大部分品种为中感和感病

品种,抗病品种只有5份,占1.66%,中抗品种32份,占10.60%(图2)。筛选出抗病和中抗的品种(系)(表5)作为小麦纹枯病抗源使用,这些品种(系)多为黄淮麦区国审或省审品种以及参加中国和江苏省区试和预试的品系,农艺性状优良,与野生小麦和地方品种抗源相比,可以节省抗源改造时间,育种利用的优势明显。

2.4 室内幼苗纹枯病抗性鉴定结果与田间小麦成株期纹枯病抗性鉴定结果的相关性

16份小麦品种(系)的室内幼苗抗性鉴定结果与田间成株期纹枯病抗性鉴定结果的相关性分析结果(表4)显示,两者不显著相关($r=0.33$, $P=0.22$)。进一步采用85份成株期纹枯病抗性具有显著差异($DF=84$, $F=1.63$, $P<0.01$)的小麦品种(系),对其室内幼苗纹枯病抗性鉴定结果与相应的成株期纹枯病抗性鉴定结果进行相关分析,发现两者相关系数较低,未达到显著水平($r=0.20$, $P=0.06$),表明小麦幼苗的纹枯病抗性机制与成株期可能不完全相同,需采用不同的评价方法对纹枯病抗性进行鉴定。

表 4 不同小麦纹枯病抗性评价方法鉴定结果的相关性分析

Table 4 The correlation analysis of the results from different WSE evaluation methods

抗性鉴定结果	室内幼苗平均病级	田间幼苗平均成活率	温室苗期平均病级
田间幼苗平均成活率	-0.69**		
温室苗期平均病级	-0.01	-0.43	
田间成株期平均病级	0.33	-0.57	0.52*

*表示显著相关($P < 0.05$); **表示极显著相关($P < 0.01$)。

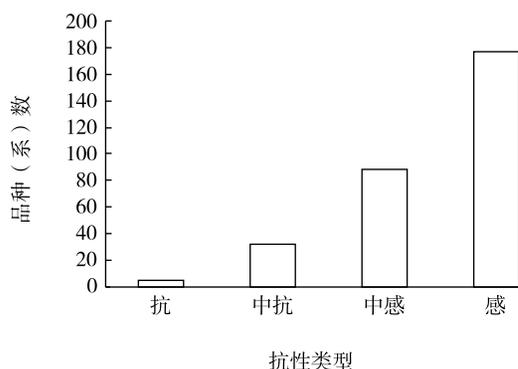


图 2 小麦品种幼苗纹枯病抗性分布图

Fig.2 Distribution of the resistance to wheat sharp eyespot in seedling

表 5 抗幼苗纹枯病的小麦品种(系)

Table 5 The wheat varieties with the resistance to sharp eyespot in seedling

抗性类型	品种(系)
抗病	漯 08T17、AHY11、N7、N22、11E17
中抗	矮抗 58、丰德存麦 9 号、衡 09-6186、淮麦 1109、淮麦 36、济麦 23、兰考 518、兰考 678、漯 08T09、漯 88076、洛麦 29、石家庄 8 号、皖科 09636、皖麦 52、信资 10-804、豫麦 49、郑 9023、郑 9405、周麦 20、周麦 21、周麦 25、N33、11E19、11E20、11E25、11E28、11E41、12E3、12E36、12E37、12F8、12F14

3 讨论

小麦纹枯病发病高峰主要在苗期和拔节孕穗期。苗期纹枯病从小麦种子萌发至越冬前均可能发生,主要表现为烂芽、黄苗和死苗^[6]。小麦抽穗后茎秆变硬,阻止了纹枯病菌的继续繁殖,使小麦纹枯病的病情趋于稳定^[5]。大多研究都于此时调查小麦纹枯病抗性,实际反映的是小麦成株期纹枯病的抗性。对于小麦苗期和成株期抗性进行比较研究的报道较少,且结论不一,檀根甲等^[13]比较了 6 个

主栽品种感染纹枯病后的差异,认为苗期病株率反映不出品种感病程度的差异,以灌浆后期的病情指数作为比较品种间抗侵染程度的标准较为适宜。任丽娟等^[11]采用 9 个抗感品种在温室对苗期和成株期纹枯病抗性进行鉴定,发现两者有很高的相关性。本研究结果表明,任丽娟等方法鉴定的不是小麦苗期抗性而是成株期抗性。对 85 份黄淮麦区小麦苗期和成株期纹枯病抗性进行相关性分析的结果表明,小麦苗期和成株期纹枯病抗性没有显著的相关性。苗期和成株期抗性差异在小麦白粉病、条锈病和叶锈病等其他病害中也经常被报道,已有研究结果表明这些抗性差异是由不同抗性机制引起的,由此可推测,小麦苗期和成株期纹枯病抗性机制可能不完全相同,对这 2 个时期纹枯病的抗性鉴定可能需要采用不同的评价方法。

目前小麦纹枯病抗性研究关注的重点是成株期抗性,但有研究表明,冬前苗期的发病程度与后期的枯白穗率有较大关系^[14],发病愈早,病情愈重^[10]。因此,小麦苗期纹枯病抗性的研究也应引起足够重视。缺少成熟的苗期抗性评价方法是苗期抗性研究进展缓慢的主要原因之一,生产上多以苗期病株率或死苗率指示苗期纹枯病的抗性,比较粗放。岳红宾等^[15]借鉴 Lipps 和 Herr 测定病原菌致病性的方法^[16]进行小麦苗期纹枯病抗性鉴定,但这种方法操作复杂,不适合大量筛选使用。本研究在室内采用纹枯病菌菌丝悬浮液对小麦发芽种子直接接种,在控温控湿条件下进行幼苗纹枯病抗性鉴定,该方法操作简便,重复性好,鉴定结果与田间幼苗纹枯病抗性鉴定结果相关性高,可以作为小麦幼苗纹枯病抗性评价方法。在前期研究中,采用该方法对 42 份小麦品种(系)幼苗进行了纹枯病抗性鉴定,同时采用荧光定量 PCR (Polymerase Chain Reaction) 方法测定基部茎秆禾谷丝核菌 DNA 含量,发现两者具有较高的相关性,相关系数高达 0.76^[17],也验证了该方法的准确性。该抗性评价方法可以有效避免田间小麦茎腐病、全蚀病和根腐病等小麦茎基部病害早期症状对小麦幼苗纹枯病病害调查的干扰,适用于小麦苗期抗病种质的高通量筛选。

参考文献:

- [1] HAMADA M S, YIN Y, CHEN H, et al. The escalating threat of *Rhizoctonia cerealis*, the causal agent of sharp eyespot in wheat

- [J]. Pest Management Science, 2011, 67(11): 1411-1419.
- [2] LEMANCZYK G, KWASNA H. Effects of sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) on yield and grain quality of winter wheat [J]. European Journal Plant Pathology, 2013, 135(1): 187-200.
- [3] CHEN L, ZHANG Z Y, LIANG H X, et al. Overexpression of *TiERF1* enhances resistance to sharp eyespot in transgenic wheat [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(15): 4195-4204.
- [4] 张会云, 陈荣振, 冯国华, 等. 中国小麦纹枯病的研究现状与展望 [J]. 麦类作物学报, 2007, 27(6): 1150-1153.
- [5] 檀根甲, 季伯衡. 小麦纹枯病的研究进展(综述) [J]. 安徽农业大学学报, 1998, 25(1): 70-75.
- [6] 李斯深, 刘爱新, 李 强. 小麦纹枯病抗性研究进展 [J]. 山东农业大学学报, 1999, 30(1): 85-90.
- [7] 史建荣, 王裕中, 陈怀谷, 等. 小麦纹枯病品种抗性鉴定技术及抗病资源的筛选与分析 [J]. 植物保护学报, 2000, 27(2): 107-112.
- [8] 陈厚德, 王彰明, 倪桂花. 用嵌入法接种小麦纹枯病菌的研究 [J]. 江苏农业科学, 2002(5): 31-32.
- [9] 颜 伟, 蔡士宾, 吴纪中, 等. 小麦纹枯病不同接种方法的比较 [J]. 安徽科技学院学报, 2007, 21(5): 8-12.
- [10] 史建荣, 王裕中, 杨新宁. 小麦纹枯病产量损失研究 [J]. 江苏农业学报, 1989, 5(3): 44-45.
- [11] 任丽娟, 姚金保, 陈 萍, 等. 一种新的小麦纹枯病抗性苗期鉴定评价方法 [J]. 江苏农业科学, 2009(5): 131-133.
- [12] 王裕中, 吴志凤, 史建荣, 等. 小麦纹枯病流行规律研究 [J]. 江苏农业科学, 1993(9): 48-53.
- [13] 檀根甲, 丁克坚, 张成林, 等. 小麦品种间感染纹枯病的差异及普遍率与严重度的关系 [J]. 应用生态学报, 1998, 9(6): 608-612.
- [14] 刘朝晖, 张 旭, 陆维忠. 小麦纹枯病的研究进展和对策 [J]. 江苏农业学报, 2000, 16(3): 185-190.
- [15] 岳红宾, 王守正, 李洪连, 等. 小麦抗纹枯病鉴定及其方法研究 [J]. 河南农业科学, 1995(12): 22-24.
- [16] LIPPS P E, HERR L J. Etiology of *Rhizoctonia cerealis* in sharp eyespot of wheat [J]. Phytopathology, 1982, 72(2): 1574-1577.
- [17] 周森平, 姚金保, 张 鹏, 等. 小麦基部茎秆禾谷丝核菌 DNA 含量的定量检测 [J]. 江苏农业学报, 2015, 31(4): 750-755.

(责任编辑:王 妮)