

野生大豆抗胞囊线虫鉴定技术规范

Technical specifications for bioassay of wild soybean resistance to soybean cyst
nematode (*Heterodera glycines*)

2018 - 12 - 13 发布

2018 - 12 - 30 实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由吉林省农业农村厅提出并归口。

本标准起草单位：吉林省农业科学院。

本标准主要起草人：袁翠平、董英山、王玉民、赵洪锜、刘晓冬、齐广勋、王英男、李玉秋、颜秀娟。

野生大豆抗胞囊线虫鉴定技术规范

1 范围

本标准规定了野生大豆对大豆胞囊线虫抗性的鉴定方法和抗性评价。
本标准适用于野生大豆种质资源对大豆胞囊线虫的抗性鉴定与评价。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

胞囊 cyst

大豆胞囊线虫雌虫，每个胞囊内约含 200 粒~600 粒卵，从胞囊中孵化出来即为二龄幼虫。

2.2

胞囊指数（雌虫指数） female Index (FI)

接种后 28 d~30 d，供试植株根系上的胞囊数占感病对照植株根系上胞囊数的百分比。

2.3

大豆胞囊线虫类群 HG type Heterodera glycines type (HG type)

在形态上没有差异，但在寄主上具有显著致病性差异的大豆胞囊线虫群体，需采用特定的一套鉴别寄主进行鉴别。目前主要采用Niblack等学者提出的HG type鉴别寄主。

3 鉴定方法

3.1 接种物的准备

3.1.1 大豆胞囊线虫的繁殖

3.1.1.1 宜使用本地区优势 HG type 或混合大豆胞囊线虫群体。

3.1.1.2 将含有大于 30 个/100 g 胞囊的病土装入高度 16 cm~25 cm，盆口径 15 cm~25 cm 的塑料盆中，播种高感大豆品种，每盆 3 株~5 株。

3.1.1.3 出苗后 30 d~35 d，将大豆根系轻轻拔出，用高压水枪冲洗根系，将根系上的胞囊收集于干净的塑料桶内。

3.1.2 胞囊和二龄幼虫悬浮液的制备

3.1.2.1 将含有胞囊的悬液倒入自上而下依次为 20 目，40 目，60 目的套筛上，将胞囊收集在 60 目网筛上。

3.1.2.2 将 3.1.2.1 收集到的胞囊用橡胶棒碾碎，使之释放出卵和少数的二龄幼虫。用洗瓶冲洗卵和二龄幼虫，将其冲入自上而下依次为 200 目，500 目的套筛上，将卵和二龄幼虫收集在 500 目网筛上。

3.1.2.3 用洗瓶将 500 目网筛上的卵和幼虫转移到烧杯中，加水配制成卵和幼虫悬浮液。

3.1.2.4 摇匀并用 100 μ L 的移液器吸取一定量的卵和幼虫悬浮液置于载玻片上，通过 40 倍显微镜观察计数卵和幼虫，配制成 2 000 个/mL 卵和幼虫的悬浮液，备接种用。

3.2 接种植物的准备

3.2.1 种子消毒

将健康饱满待鉴定的野生大豆、感病对照种子，用 1% 次氯酸钠溶液浸泡 3 min，期间搅动 2 次~3 次，然后用灭菌的蒸馏水冲洗 3 次~4 次。

3.2.2 种子萌发

3.2.2.1 消毒后的野生大豆种子在萌发前用无菌刀片在远胚芽处划破种皮。

3.2.2.2 将灭菌的滤纸放置在灭菌的培养皿内，然后将种子放置在湿润的滤纸上，于光照培养箱中 25 $^{\circ}$ C 发芽 3 d，期间保持滤纸湿润。

3.2.3 幼苗移栽

3.2.3.1 抗胞囊线虫鉴定试验在温度保持在 27 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C 温室内进行。

3.2.3.2 试验完全随机或随机区组设计，设 3 次重复，每个重复 5 株。

3.2.3.3 在直径 27 cm，高 30 cm 的塑料桶中放入 5 cm 厚的灭菌细砂，然后将直径 4 cm，长 25 cm 两端通透的 PVC 管插入细砂中，每个桶约插入 20 个 PVC 管，PVC 管内和管间填好细砂，且高度一致，细砂距离上管口 2 cm。

3.2.3.4 将萌发 3 d 健壮的幼苗移栽于 PVC 管中，每管移栽 1 株，将移栽后的塑料桶置于 27 $^{\circ}$ C~28 $^{\circ}$ C 的自动恒温水浴箱中。

3.3 接种

3.3.1 接种时期

幼苗移栽后 3 d~5 d。

3.3.2 接种方法、接种量

在距离供试植株 1 cm 处用玻棒扎一个深 4 cm~5 cm 的孔，用移液器向孔中注射 1 mL 的卵和幼虫悬浮液，用灭菌的细砂将孔填平。

3.4 接种后管理

苗期及时浇水，保持细砂湿润，温室温度保持在 27 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C，每个处理定期施用等量营养液。

3.5 调查方法

3.5.1 调查时期

接种后 28 d~30 d。

3.5.2 调查记载方法

3.5.2.1 胞囊收集

3.5.2.1.1 将 PVC 管连同细砂和植株从桶中轻轻拔出，用高压水枪冲洗 PVC 管，将细砂和植株冲洗到干净塑料桶中，再将胞囊从根系上冲洗到该塑料桶中。

3.5.2.1.2 将含有孢囊和细砂的悬浊液过 20 目, 40 目, 60 目的套筛, 再向塑料桶注入自来水, 摇匀, 将含有孢囊和细砂的悬浊液再过 20 目, 40 目, 60 目的套筛, 如此重复 2 次, 将孢囊收集在 60 目网筛上, 将收集的孢囊用自来水冲洗转移到 15 mL 塑料管中保存。

3.5.2.2 孢囊计数

将收集在 15 mL 塑料管的孢囊混合液倒入计数培养皿中, 并用少量水冲洗塑料管内壁, 倒入计数培养皿中, 然后于 20 倍显微镜计数, 即为该供试植株的根系孢囊数。

3.5.2.3 记载方法

分别记载每个重复每个供试品种和感病对照的孢囊数 (表1)。

表1 野生大豆抗孢囊线虫鉴定调查汇总表

供试材料	重复	孢囊数 个					平均孢囊数 个	孢囊指数	抗性级别
		1	2	3	4	5			
感病对照	I								
	II								
	III								
供试材料1	I								
	II								
	III								
供试材料2	I								
	II								
	III								
供试材料X	I								
	II								
	III								

4 抗性评价

4.1 鉴定有效性

感病对照品种平均单株根系上的孢囊数超过100, 判定该批次鉴定试验视为有效。

4.2 抗性评价标准

4.2.1 孢囊指数计算

根据胞囊指数确定供试野生大豆种质的抗性水平。按照下列公式（1）计算。

$$FI = \frac{T}{C} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

T ——供试种质的平均胞囊数，单位为个每株（个/株）；

C ——感病对照的平均胞囊数，单位为个每株（个/株）。

4.2.2 分级

抗性级别划分见表2。

表2 抗性级别划分

胞囊指数 (FI)	抗性级别
FI < 10	高抗
10 ≤ FI < 30	中抗
30 ≤ FI < 60	中感
FI ≥ 60	高感

注：如果重复间抗性级别跨2个级别以上，应进行二次鉴定。