

THE PATHOGENICITY
MECHANISM OF TOXIN FROM
CERCOSPORA SOJINA

大豆 灰斑病菌毒素 的致病机理

刘亚光 著

黑龙江科学技术出版社



大豆灰斑病菌毒素的致病机理

THE PATHOGENICITY MECHANISM OF TOXIN FROM CERCOSPORA SOJINA

刘亚光 著

黑龙江科学技术出版社
中国·哈尔滨

图书在版编目 (CIP) 数据

大豆灰斑病毒毒素的致病机理/刘亚光著. —哈尔滨:
黑龙江科学技术出版社, 2005.10
ISBN 7-5388-4984-X

I. 大... II. 刘 III. 大豆—灰斑病
IV. S 435.651

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 119987 号

责任编辑 常瀛莲
封面设计 洪 冰
版式设计 汪 涟

大豆灰斑病菌毒素的致病机理
THE PATHOGENICITY MECHANISM OF
TOXIN FROM CERCOSPORA SOJINA
刘亚光 著

出 版 黑龙江科学技术出版社
(150001 哈尔滨市南岗区建设街 41 号)
电话 (0451) 53642106 电传 53642143 (发行部)
印 刷 黑龙江龙新印刷有限公司
发 行 黑龙江科学技术出版社
开 本 850×1168 1/32
印 张 6.25
字 数 180 000
版 次 2005 年 12 月第 1 版·2005 年 12 月第 1 次印刷
印 数 1—1 000
书 号 ISBN 7-5388-4984-X/S·638
定 价 17.00 元

前 言

大豆灰斑病是由 *Cercospora sojina* Hara 引起的一种大豆叶部病害, 至今已分布世界各地。大豆灰斑病菌不仅浸染大豆的茎、叶和荚而导致减产, 还会引起子粒斑驳, 影响大豆的品质和出口, 严重发病时, 减产可达 50% 以上。该病在我国主要发生在东北大豆产区, 尤以黑龙江省东部的三江平原以及绥化地区危害最重。因此, 开展大豆灰斑病抗病和致病机理的研究, 最终目的是为生产解决和预防灰斑病。目前, 尽管对大豆灰斑病菌的生物学特性、遗传育种以及抗性资源筛选和病害流行等方面已有较深入的研究, 但对大豆抗灰斑病的生化机制了解得还不够全面和深入, 而且还未涉及大豆灰斑病的致病机理。

病原物的浸染过程是在病原物与寄主植物相互适应的基础上完成的。由于不同病原物对不同寄主植物的致病性及机理不同, 不同寄主植物对不同病原物浸染的反应和抗性机理亦不同, 加之环境条件的影响, 使得寄主植物与病原物之间的互作复杂多变。在适宜的环境条件下, 病原物对寄主植物致病能力大小取决于它们所具有致病因子多少和活性的大小。现已明确, 病原物对寄主的致病作用主要通过产生破坏寄主的酶类、产生破坏寄主细胞膜和正常代谢的致病毒素、产生使植物异常生长的植物激素、产生阻塞寄主植物导管的物质、产生使植保素失活的酶类等途径。其中以酶、毒素和植物激素这三类物质为主要致病因子。目前未见有关大豆灰斑病菌致病机理的研究报道, 因此对大豆灰斑病有必要要进一步深入研究。

本书主要介绍筛选适合大豆灰斑病菌毒素的液体培养条件、分离和提取灰斑病菌毒素的方法; 说明毒素的组分、特性、致病活性, 以及毒素致病性与灰斑病菌生理小种的田间致病力的关

系；阐述灰斑病菌毒素是导致大豆灰斑病的主要机理之一，以及灰斑病菌和毒素对抗病品种主要起生物激发子的作用，而对感病品种则起抑制子作用的观点。

本书还介绍了利用大豆灰斑病菌及其毒素等生物因子诱导不同抗性的大豆品种，分析不同生物诱导因子对大豆的诱导抗性机理。这将为在生产实践中用生物因子来诱导大豆产生抗灰斑病，和抗多种病害的可能性提供理论依据。

希望本书的出版能够为今后的同类研究提供一些有益的帮助和借鉴。同时由于笔者经验不足、时间有限，书中难免有不妥之处，敬请有关专家、同行和广大读者批评指正。

目 录

目 录

第一章 大豆灰斑病和病原菌毒素的研究现状	(1)
第一节 大豆灰斑病研究现状与展望	(1)
一、大豆灰斑病研究现状	(1)
二、大豆灰斑病研究展望	(10)
第二节 植物病原真菌毒素的研究进展	(14)
一、植物病原真菌毒素概念	(14)
二、寄主选择性毒素与寄主非选择性毒素	(16)
三、病原真菌毒素的致病机理	(18)
四、毒素研究中几个理论性问题的探索	(22)
五、植物病原菌毒素与杀菌剂开发的展望	(24)
六、植物病原菌毒素在农业上的应用	(26)
第三节 植物诱导抗性研究现状	(27)
一、植物诱导抗病性的特征	(27)
二、植物诱导抗病性的诱导因子	(30)
第二章 大豆灰斑病菌毒素的分离提取及其致病活性 的测定	(40)
第一节 大豆灰斑病菌毒素产生条件的筛选	(40)
一、材料与方法	(40)
二、结果与分析	(43)
三、小结	(49)
第二节 大豆灰斑病菌毒素的分离提取及其致病 性测定	(49)
一、材料与方法	(50)
二、结果与分析	(54)
三、小结	(79)

第三章 大豆灰斑病菌毒素的产量及其组分分析	(82)
第一节 测定灰斑病菌 10 个生理小种的毒素产量	(82)
一、材料与方法	(82)
二、结果与分析	(86)
三、小结	(89)
第二节 大豆灰斑病菌毒素的组分分析	(90)
一、材料与方法	(90)
二、结果与分析	(95)
三、小结	(109)
第四章 感染灰斑病菌后大豆叶片中几种生化指标的动态变化	(112)
一、材料与方法	(113)
二、结果与分析	(120)
三、小结	(135)
第五章 灰斑病菌毒素对大豆叶片内几种生化物质的诱导作用	(138)
一、材料与方法	(139)
二、结果与分析	(140)
三、小结	(150)
第六章 讨论与结论	(152)
一、讨论	(152)
二、主要结论	(164)
参考文献	(169)

第一章 大豆灰斑病和病原菌毒素的研究现状

第一节 大豆灰斑病研究现状与展望

一、大豆灰斑病研究现状

大豆灰斑病是由 Hara 于 1915 年首先在日本发现的一种真菌病害, 定名为 *Cercospora sojina* Hara。1982 年刘锡进等重新研究大豆灰斑病菌, 根据分生孢子和分生孢子梗的形态、色泽, 将大豆灰斑病菌重新定为 *Cercosporidium sojinum* (Hara) Liu et Guo, 属大豆褐斑短胖孢菌。自 Hara 首次发现该病以来, 相继在美国、英国、中国、澳大利亚、巴西、德国、朝鲜、前苏联以及印度等国也发现此病, 至今已分布世界各地 (Lehman, 1928; Athow, 1952; Yorinori, 1971; 刘忠堂, 1985; 廖林, 1992)。最新报道, 1997~1998 年间首次在阿根廷西北部的 5 个省检测到了由 *Cercosporidium sojinum* (Hara) 引起的大豆灰斑病, 并于 1999~2000 年度间阿根廷整个北部地区暴发一次大豆灰斑病 (L. D. Ploper, et al., 2001); 在 1999~2000 年间, 大豆灰斑病在美国的衣阿华州的中部、中南、中东和东南等大部分地区突然性的蔓延 (X. B. Y, Yang, M. D. Uphoff et al., 2001)。该病在我国主要发生在东北大豆产区, 尤以黑龙江东部的三江平原以及绥化地区危害最重 (刘忠堂, 1985; 许忠仁, 1987)。大豆灰斑病菌不仅浸染大豆的茎、叶和荚而导致减产, 还引起子粒斑驳 (许忠仁, 1987; Bishit, V. S. et al., 1985), 影响大豆

的出口,严重发病时,减产可达50%以上,同时导致蛋白质含量下降1.2%,脂肪含量下降2.9%(Bisht, et al., 1982; Yorinori, 1981; 刘忠堂, 1985)。

由于大豆灰斑病分布广泛且危害严重,自20世纪50年代以来,国内外的学者们分别对病菌生物学特性、生理分化、病害流行规律、抗原筛选、抗病性遗传、抗病机制以及防治等方面展开了大量的研究,现分述如下:

(一) 大豆灰斑病菌生理小种的分化

大豆灰斑病菌具有明显的生理分化现象,即存在着形态相同而致病力不同的生理小种。Yorinori (1989) 认为,大豆灰斑病菌的多数生理小种具有广泛的适应性,不同地区的小种经常发生变化。美国的 Athow 1952 年首次报道了大豆灰斑病菌的生理分化现象,鉴定出1号和2号生理小种 (Athow 等, 1952, 1962); 1968 年 Ross 又提出了灰斑病菌的3号和4号生理小种; Phillips (1981) 等相继鉴定出了5号生理小种。随后 Yorinori 分别采用了由不同品种组成的不同鉴别寄主体系,鉴定出美国大豆灰斑病菌另外的7个生理小种以及巴西的20多个生理小种 (Yorinori 和 Henechin, 1978; Yorinori, 1982, 1989)。在我国,黄桂潮 (1984) 与霍虹 (1988) 等用筛选出的6个品种组成的鉴别体系,先后鉴别出东北三省的11个大豆灰斑病菌生理小种,并明确其中1号、7号、10号小种为该地区的优势小种,它们分布的频率分别为50%, 22%和9%。

大豆灰斑病菌具有明显的生理分化现象,存在着多个形态相同而毒力不同的生理小种。由于传统的鉴定生理小种是根据小种在鉴别寄主上的毒性反应来确定的,而缺乏对小种毒力变异本质的了解。针对此问题,袁凤杰等 (1997) 用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,通过对同工酶及可溶性蛋白的图谱分析,初步明确了各生理小种间亲缘关系及演化序列,反应出小种间遗传基础的相似性及演化特点。

随着分子生物学的发展,分子标记技术也开始用于大豆灰斑病菌的研究。刘学敏等(1996)用 RAPD 技术对常用的 10 个生理小种和采于中国东北地区的 35 个菌株进行了分析,发现各菌株间 RAPD 的相似系数与毒力标记呈正相关。并从一致病力较强的菌株中克隆出一重复序列 DNA 片段,以其为探针对 16 个大豆灰斑病菌株构建了 DNA 指纹图谱。结果表明,RAPD 和 RFLP 标记均能提供大量的遗传标记,揭示出大豆灰斑病菌体内存在丰富的遗传多态性。

(二) 大豆灰斑病菌生物学特性、浸染及流行

大豆灰斑病菌在常规培养基上产孢量不高,国外通常采用 V-8 培养基(Yorinori, 1981)。钟兆西等(1989)研究认为小白菜琼脂培养基产孢量较高;而刘学敏等(1991)等发现利马豆琼脂培养基则是该菌产孢较高的培养基。Veiga 等(1979)认为光暗交替比连续光照或黑暗更有利于病菌产孢;而钟兆西等则认为连续黑暗培养病菌生长最快且产孢量亦高。一般认为病菌生长的最适温度是 25~28℃,分生孢子萌发的最佳温度是 25~33℃,在水中萌发比例最高,萌发的最适 pH 值在 6~8 之间(钟兆西, 1989; 李本宁, 1989; 刘艳萍, 1989)。

对于大豆灰斑病浸染循环,马淑梅(1987)和钟兆西(1991)等研究得出一致性的结果,即大豆灰斑病田间的初浸染来源主要是土壤中病残体,而非来自病种子。刘学敏(1995)指出病菌浸染温度范围在 15~32℃之间,最适为 25~28℃。在适宜温度下接种保湿 2 h 即可侵入,田间则主要取决于露温、露时条件。其潜育期与有效积温有关,抗性品种发病所需的有效积温高于感病品种,在接种条件下一般为一周左右。

(三) 大豆灰斑病菌的抗性遗传

大豆灰斑病抗性遗传的研究始于美国的 Probst 和 Athow 等人。到目前为止,在美国已确定出 3 个抗灰斑病菌的显性基因

RCS_1 , RCS_2 和 RCS_3 , 它们分别控制着大豆对美国灰斑病菌 1 号, 2 号和 5 号生理小种的抗性 (Athow, 1952; Blankman, 1984; Probst, 1958, 1965; Phillips, 1981)。刘忠堂 (1983) 研究表明: 大豆对中国灰斑病菌 1 号生理小种的抗性是受一对显性基因控制的; 而张晓刚等 (1991) 认为两个独立显性基因 $Hrcs_1$ 和 $Hrcs_2$ 分别控制大豆对灰斑病菌 1 号和 7 号的抗性, 并且两个基因有一定的互作效应。杨庆凯等 (1988) 根据抗感品种杂交后代的分离特征指出, 大豆对灰斑病菌的田间抗性为数量遗传。此后又相继报道了田间抗性遗传的基因效应、遗传参数和回交效应 (杨庆凯, 1996; 曹越平等, 1995); 曹越平等 (1999) 利用数量性状的主基因-多基因混合遗传模型鉴别的结果表明: 大豆对灰斑病菌的抗性存在明显的主基因效应, 且分别符合一个主基因+多基因遗传模型。另外, 分析遗传参数的结果表明: 主基因的加性、显性以及主基因之间的相互作用普遍存在, 而且对抗病性的遗传起很大的作用。

(四) 大豆抗灰斑病育种

抗病育种是解决植物病虫害的有效途径之一, 而筛选和创新高抗的品种资源和亲本材料是抗病育种的前提和基础 (杨庆凯等, 1996)。20 世纪 50 年代中后期的美国在筛选到抗性材料的基础上, 培育并推广了 Beeson, Kent 和 Davis 等抗多个生理小种的品种, 基本控制了美国灰斑病的发生 (Root, 1958; 廖林, 1992)。朱希敏等 (1988)、齐宁等 (1987)、黄桂潮等 (1984) 以及刘忠堂 (1986)、李本宁 (1988) 和万学臣 (1987) 分别对吉林省、辽宁省、黑龙江省的 4 000 多份大豆材料进行了抗性鉴定; 另外, 姚振纯 (1986) 还调查了 166 份野生大豆材料的抗感情况。其结果如表 1-1 所示。

张丽娟和杨庆凯 (1997) 首次在生理小种水平上对 108 份大豆品种 (系) 进行了灰斑病菌 1~10 号生理小种的抗性鉴定, 并

筛选出了一批抗 8 个以上生理小种的抗性材料，为培育抗多个生理小种的抗病品种提供了育种材料。

表 1-1 我国抗灰斑病育种抗源筛选的情况

材料类型	省 份	时 间 (年)	材料数量 (份)	占总数的百分率 (%)		
				免疫材料	高抗材料	中抗材料
品 种 (系)	吉 林	1987	638	0.31	90.9	16.46
	黑龙江	1987	323	1.55	17.46	23.22
	黑龙江	1986	1 103	—	8.16	1.63
	辽宁和吉林	1988	1781	4.5	0.5	—
野生大豆		1986	166	34.34	22.89	—

从以上研究可以看出，大豆群体内有丰富的抗性资源，同时大豆对灰斑病抗性具有简单遗传的特点。刘忠堂（1986）根据大豆对灰斑病的抗性遗传特点，提出了“一次杂交，简单回交”的大豆抗灰斑病育种程序；并在抗源筛选基础上，应用这个程序先后选育出合丰 25 号、28 号、29 号、30 号、33 号与 35 号等抗性品种（刘忠堂，1986；郭泰，1993）。东北农业大学大豆所采用同样的方法也选育了一批抗 8 个以上生理小种的品种（系），如东农 9674、东农 593 和东农 1574 等（杨庆凯，1996）。对以抗多个生理小种为目标的育种，杨庆凯等（1996）认为，如果育种目标为抗 5 个小种以下时，可以用一次杂交多次回交的方法，若抗 5 个以上小种时，则应在筛选抗源的同时，导入并积累抗病基因。

（五） 大豆灰斑病抗性机制

在寄主与病原物相互作用的复杂过程中，病原菌浸染的过程并不是畅通无阻的，都会遇到寄主某些性状的障碍、抵抗、抑制、甚至伤害，寄主的这种防御能力在病理学上称为抗病性。植物的抗病性不可能依赖于一种机制或某种化合物，而是决定于多

种机制以不同方式和不同部位而表达的联合作用。根据寄主植物防御病原物的机制,可将植物的抗病性分为形态结构抗病性和生理生化抗病性。前者主要是通过寄主形态结构的差异产生物理上的阻碍或诱导寄主形态结构发生改变而机械地阻碍病原菌的浸染,如寄主株形、叶形、叶表面蜡质层有无、角质层和木栓层的厚薄、毛和刺的多寡、气孔的结构和运动以及细胞壁的硬度和厚薄等;而后者则主要是当病原菌入侵寄主时或浸染后,诱导寄主的生理生化过程发生改变而抵抗病原物的浸染,或产生对病原菌有毒的物质,如酚类物质、植保素(phytoalexin)等(董金皋,1995)。

1. 大豆对灰斑病菌的结构抗性

6

植物的表面结构和叶肉细胞组成对病原菌的侵入起着重要的天然屏障作用。李海英等(1996)对不同抗性大豆品种叶片的表面组织、形态和结构(包括气孔密度、茸毛密度、叶片组织的石蜡切片及蜡质含量等)进行了初步研究,结果表明:大豆抗感品种叶表面上的茸毛与抗病性无关;而抗病品种叶表面的气孔密度少于感病品种是抗病品种抵抗菌丝侵入的第一结构屏障;同时发现抗病品种的栅栏组织表现的排列整齐、紧密而且层数多,这可能是抗病品种抵抗病原菌侵入和扩展的第二个结构屏障。另外,抗病品种的叶片蜡质含量比感病品种高,这可能是抵抗和延迟病原菌侵入的又一屏障。

虽然植物具有天然的不利于病原菌侵入的结构屏障,但是,一般来讲无论是抗病品种还是感病品种,病原物最初都可以侵入到寄主体内;不过,抗病品种具有一定的阻止病原菌在体内扩展或杀死病原菌的能力。植物抵抗病原菌在体内扩展的主要途径,是通过体内各种生理生化反应来抑制病原菌的繁殖或者直接杀死病原菌。

2. 大豆对灰斑病菌的生理生化抗性

植物能产生各种各样的与植物抗病性有关的生理活性物质。

这些物质有的是植物体本身固有的，如酚类化合物、有机硫化物、不饱和内脂、皂角及一些小分子抗病物质以及能与病菌几丁质结合而破坏真菌细胞透性的蛋白质和核糖体等物质。而有些抗性物质是通过病原菌或其他因素诱导产生的，包括植物保卫素、病程相关蛋白（如几丁质酶、 $\beta-1, 3$ 葡聚糖酶等）、富含羟脯氨酸和富含甘氨酸的糖蛋白、木质素和免疫信息物质（章元寿，1996；杜良成等，1990）等。

廖林（1993）研究了6个不同抗性的大豆品系感染灰斑病菌后体内生理生化的变化。结果表明：大豆感染灰斑病菌后体内过氧化物酶（Peroxidase, POD）和超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase, SOD）的活性都有所增加，但感病品系体内的过氧化物酶和超氧化物歧化酶的活性明显高于抗病品系。刘丽君等（1992）在灰斑病菌对大豆保护酶体系的影响研究中指出：保护酶体系的酶活性和同工酶的变化与品种抗性有关；感病品种在感染灰斑病菌后，脂酶过氧化加强，保护酶体系的酶活性降低，同工酶谱变化很大，而抗病品种保护酶体系的酶活性增强，同工酶谱变化不大。李海英等（1996）研究结果表明：感染灰斑病菌后，感病品种的可溶性糖含量的增加幅度比抗病品种大，且游离氨基酸的总含量呈增加趋势，而抗病品种的自由氨基酸的总含量呈下降趋势；抗病品种的过氧化物同工酶谱有C3带的出现，而感病品种的过氧化物酶同工酶谱带则没有变化。过氧化物酶活性的表现为：接种前抗病品种高于感病品种，而接种后抗病品种酶活性增加的幅度高于感病品种。因此，李海英认为可溶性糖、游离氨基酸总量和过氧化物同工酶及其活性的变化可作为大豆灰斑病抗性的生化指标。张丽娟等（1998）对不同抗性品种接种大豆灰斑病菌1~10个生理小种后，大豆叶片内的超氧化物歧化酶、过氧化物酶、多酚氧化酶等酶的活性以及自由基、丙二醛、木质素、可溶性蛋白和可溶性糖的含量等生理生化指标进行了动态分析，结果表明：多酚氧化酶活性与大豆对灰斑病的抗性呈正相关，可以

作为大豆品种对灰斑病抗性鉴定的一个生化指标。并初步得出：大豆抗病品种可能主要是通过生化反应产生一些具有生理活性的物质（自由基、酚类物质的氧化物）形成化学屏障来抑制或杀死灰斑病菌的，而感病品种主要是通过生化反应形成物理屏障（木质素）来封锁灰斑病菌，同时在一定程度上抑制灰斑病菌在体内的生长和扩展。

（六）大豆灰斑病的致病因子

病原物的浸染过程是在病原物与寄主植物相互适应的基础上完成的。由于不同病原物对不同寄主植物的致病性及机理不同，不同寄主植物对不同病原物浸染的反应和抗性机理亦不同，加之环境条件的影响，使得寄主植物与病原物之间的互作复杂多变。在适宜的环境条件下，病原物对寄主植物致病能力大小取决于它们所具有致病因子多少和活性的大小。现已明确，病原物对寄主的致病作用主要通过以下途径：①产生破坏寄主的酶类（enzymes），如角质酶、果胶降解酶（pectinase）、半纤维素酶（hemicellulase）、纤维素酶（cellulase）和蛋白酶（proteinase）等；②产生破坏寄主细胞膜和正常代谢的致病毒素（pathotoxins），如 HMT 毒素、麦赤霉毒素等；③产生使植物异常生长的植物激素（hormones），如植物生长素、细胞分裂素、赤霉素、脱落酸、乙烯等；④产生阻塞寄主植物导管的物质，如颗粒物质（GM）和纤维状物质（FM）等；⑤产生使植保素（phytoalexins）失活的酶类等方面，其中以酶、毒素和植物激素这三类物质为主要致病因子（章元寿，1996）。目前有关大豆抗灰斑病的抗性机制研究的报道很多，但未见有关大豆灰斑病菌致病机理的研究报道。

我国植病工作者从 20 世纪 80 年代初，先后对玉米大斑菌、小斑菌、圆斑菌等致病毒素和小麦根腐菌、赤霉菌以及棉花枯萎菌、黄萎菌等致病毒素进行了研究（陈捷等，1993；吕金殿等，1997；董金皋等，1997），取得了有意义的成果。但国内外有关

大豆灰斑病菌毒素培养的报道极少，且不详细。东北农业大学大豆研究所曾利用固体培养基提取毒素（陈绍江等，1995），初步研究表明：大豆灰斑病菌在马铃薯蔗糖液体培养基和小麦或高粱固体培养基上，均能产生对寄主与非寄主植物具有生物活性的代谢产物，其滤液中可能存在着非专化性毒素，且不同生理小种间培养滤液对大豆幼根的生物活性存在差异；还对从高粱固体培养基上提取的毒素，进行分离和纯化，初步认为该毒素是一非糖非蛋白类的小分子化合物，可能为胺类化合物；并用灰斑病菌各生理小种的培养滤液进行了抗性鉴定，认为各小种滤液毒性的小种专化性不明显。但由于固体培养基的成分、pH 值、菌丝生长量等难以控制和测定，而且增加了毒素提纯的过程和难度，从而影响毒素的收得率。为了建立一个实用的液体培养产毒方法，以取得更多毒素样品供科研之用，因此本试验应针对大豆灰斑病菌在液体培养条件下产毒性进行研究，并亟须建立一套从液体培养基中分离并提取大豆灰斑病菌毒素的体系，以便进一步明确大豆灰斑病菌产生毒素的性质和毒素致病组分，以及大豆灰斑病菌 10 个生理小种之间毒素的产量和组分是否与致病力相关。旨在为进一步揭示大豆灰斑病菌的致病机理提供良好的研究基础。

（七）大豆抗病基因分子标记

随着分子生物学的发展，以分子标记为基础的抗病基因定位在植物抗病遗传育种中广泛应用，利用与抗病基因紧密连锁的分子标记，可缩短抗源筛选及抗病基因鉴定过程，减少大量的田间试验工作，提高选择效率，缩短育种周期，从而促进抗病育种研究和抗病基因的合理快速利用。邹继军等（1998，1999）在 1 号、7 号优势小种单基因显性遗传的基础上，以抗感亲本杂交后代的分离群体，研究与大豆灰斑病抗病基因紧密连锁的分子标记，首次得到了与灰斑病抗病基因连锁的分子标记，其一为共显性的 RAPD 标记；为标记辅助选择、抗病基因累加及最终分离克隆抗病基因奠定基础。同时利用 RAPD 结果的聚类分析和多

维标度分析，可反应出灰斑病抗感种质资源的遗传多样性，为恰当、充分地利用种质资源提供参考。

二、大豆灰斑病研究展望

目前，人们已经对大豆灰斑病菌的生物学特性、浸染及流行、抗病遗传与育种、大豆抗灰斑病的机制等方进行了研究。但是，仍然存在着许多问题，有待于进一步的深入研究。

（一）大豆灰斑病菌生理小种变异的鉴定和种群变化的监测

10 在环境选择压力（如抗病品种的使用）作用下，灰斑病菌不断地通过变异来适应环境，因而产生了致病力更强的生理小种。与此同时，抗病品种的大面积推广和使用，又为能浸染抗病品种的生理小种（或新生理小种）提供了生长条件。这些生理小种在田间大量繁殖积累，改变了生理小种种群组成和分布频率，这也许也是生产中抗病品种抗性丧失的一个主要原因。在生产中可以根据生理小种的变化，来正确指导农民合理布局抗病品种，这不仅可以控制灰斑病菌生理小种的变化，还可以延长抗病品种的使用年限。因此，在原来病原菌生理小种鉴定方法的基础上，将田间寄主鉴定技术和室内生化技术及分子技术相结合，寻找新的鉴定方法，使灰斑病菌的鉴定更为准确快捷，是非常必要的。

（二）大豆灰斑病菌的致病机理

病原菌除借助机械穿透力来浸染寄主外，还要通过分泌一些酶类来分解破坏组织结构，侵入到寄主体内。病原菌首先分泌的酶是用来降解寄主表面的角质和细胞壁的，如角质酶、果胶酶和纤维素酶等。当病原菌侵入到寄主体内后又分泌其他的酶类（蛋白酶、使植保素失活的酶类等）和毒素来破坏、甚至杀死寄主细胞。但是，还不清楚灰斑病菌是如何突破大豆植株的结构屏障，侵入到寄主体内的；目前，已经知道大豆灰斑病菌能产生毒素，