

引进美国大豆种质资源的健康筛选*

朱振东 王晓鸣 霍纳新 王建民

(中国农科院作物品种资源所 北京 100081)

陶珍珠

(首都机场动植物检疫局 北京 100621)

摘 要

在国家农作物引种隔离检疫基地,对从美国引进的287份大豆种质资源进行隔离检疫及筛选健康种质。干种子直接检查结果表明有76.0%的品种带有病粒,其中214份带有被大豆花叶病毒(SMV)侵染产生的黑色(或褐色)斑驳粒,病粒率为2—100%。抽样38份大豆种质进行洗涤检验和吸水纸法检验,两种方法共检测出8属病原真菌,一种线虫和一种细菌,其中以串珠镰刀菌(*F. moniliforme*)和大豆霜霉病菌(*P. manaschurica*)的带菌率最高。生长试验发现6种类型的类似于病毒病症状的病株,生物检测、血清学检测及电镜观察结果表明有4株为SMV侵染病株。血清学检测没有发现我国对外检疫的4种危险性病毒(TomRSV、TRSV、ArMV、SBMV)。同时,也未发现对外检疫重要性病原真菌大豆疫病菌(*Phytophthora megasperma* (Drechs.) f. sp. *glycinea* Kuan & Erwin)。淘汰病株后共收获273份健康种质。

关键词 大豆;种传病原菌;隔离检疫;种质健康

种传病原菌不仅造成对农业生产的直接威胁,而且具有极大的潜在危险。一方面,由于种子作为许多植物病原菌的有效载体,在引进国外作物种质资源时随时可能传入新的

* 本文为国家动植物检疫总局“八五”植检研究课题的一部分。

本研究得到沈淑琳研究员的热心帮助和指导,田玉兰协助完成部分实验,在此表示感谢!

本文于1995年3月15日收到。

This paper was received on March 15, 1995.

病害造成对农业生产的危害^[9],在收集保存种质资源时,种传病原菌随种质进入种质库而造成对种质库的污染^[10]。另一方面,在利用种质资源改良作物品种时,种传病原菌的存在也会影响种质资源遗传潜能的充分发挥^[10]。

据统计,大豆能种传 38 种病原真菌、18 种植物病毒和多种病原细菌^[2,5,7,10],因此,在大豆种质资源的引进、利用和保存时,种传病原菌是主要的制约因子。本研究以 1993 年中国农科院品资所从美国引进的 287 份大豆种质资源为材料,对种子的健康状况进行检测和筛选,以保证这些大豆种质资源能安全有效的利用。并作为自美国进口大豆及引进大豆研究材料检疫问题的参改。

一、材料与方法

1. 材料

1) 1993 年中国农科院品资所从美国引进 287 份大豆种质资源,该批材料在国家农作物引种隔离检疫基地进行隔离检疫。

2) 用于血清学检测的番茄环斑病毒(Tomato ring-spot virus, TomRSV)、烟草环斑病毒(Tobacco ring-spot virus, TRSV)、南方菜豆花叶病毒(Southern bean mosaic virus, SBMV)、南芥菜花叶病毒(Arabis mosaic virus, ArMV)、大豆花叶病毒(Soybean mosaic virus, SMV)的抗血清由农业部植物检疫实验所提供。

2. 方法

1) 干种子直接检验:在光线充足的条件下,直接用肉眼淘汰病粒和杂质。

2) 洗涤检验:抽取 38 份材料,每份 20 粒种子(主要为干种子检验时淘汰的种子)放入 50ml 的三角瓶中,加 15ml 蒸馏水,在振荡机上振荡 5 分钟,收集洗涤液在 3000—5000rpm 下离心,离心后去除上清液,在显微镜下检测沉淀物。

3) 吸水纸法检验:38 份样品在洗涤检验中完成水洗后直接用于吸水纸法检验。每 10 粒种子均匀置于直径 9cm 培养皿内的三层经蒸馏水浸湿的滤纸上。每份两皿,在 25℃ 及 12 小时光照 12 小时黑暗条件下孵育,6 天后分别在实体解剖镜和显微镜下进行病原菌检测及鉴定。

4) 生长试验

选取 187 份材料在防虫温室进行生长试验。每个品种取 20 粒外表健康的种子(健种不足 20 粒的品种用 SMV 黑色或褐色斑驳种子补足),用 10% 的 Na_3PO_4 溶液消毒 10 分钟,用清水反复冲洗后播种于含基质为 3:1 营养土蛭石的小塑料钵中,每钵播种 2 粒。每个品种 10 钵,按品种引进编号顺序置于花盆架上。温室温度控制在 20—23℃。另 100 份材料,每份用同样的方法选 20 粒种子直接播种于防虫网下的地内,每品种播一行,按引进编号顺序编号。两种方式均在大豆出苗后连续进行病害监测,记录病害发生、发展情况,最后淘汰所有病株。

5) 生物学检测

以昆诺阿藜、苋色藜、大豆(“猴子毛”)、菜豆(“Monorebean”)、千日红、番杏等为鉴别寄主对产生类似病毒病症状的病株进行病毒检测。

6)血清学检测

用琼脂双扩散法对典型病株进行 TomRSV、TRSV、ArMV 和 SBMV 检测。

7)电镜观察

对典型病株用直沾法或免疫电镜(1/500SMV 抗血清诱捕)观察病毒粒体。

8)繁殖健康种子

在防虫温室进行生长试验的 187 份材料,经 6—8 叶期汰除病株后,每一个品种选 8 株健株,每 2 株为一组混合取样,接种在苋色藜、“猴子毛”、“Monorebean”菜豆等鉴别寄主上进行病毒检测。淘汰在鉴别寄主上有症状反应的组,其它健株 2 株为一组移植在大瓦盆中,然后转入防虫网室繁殖。直播于防虫网田内的 100 份材料,发现病株后挂牌标记,选健株作留种株。在繁殖过程中对所有留种材料继续进行病害监测,发现病株及时淘汰。整个繁殖过程严格防虫,最后择健壮株收种。

二、结果与分析

1. 种子健康检查

对 287 份大豆种质直接检验发现有 218 个品种带有病粒,品种带病率为 76.0%。其中,214 份带有 SMV 引起的黑色或褐色斑驳病粒,品种带 SMV 率为 74.6%,不同品种斑驳粒率为 2—100%。除 SMV 外,有 3.5%的品种带有大豆霜霉病粒,2.8%的品种带有大豆紫斑病粒。

对 38 份样品进行洗涤检验共检出 6 属真菌和一种线虫(见表 1),其中以大豆霜霉菌检出率最高,品种带菌率为 36.8%。吸水纸法共检出 7 属真菌和一种细菌,以串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)带菌率最高,为 83.9%(见表 2)。

表 1 大豆种质传带的种传病原菌

Table 1 Seedborne pathogens on soybean seed lots

病原菌	Pathogens	品种带菌率	Affected seed lots (%)
<i>Peronospora manshurica</i>			36.8
<i>Alternaria sp.</i>			26.3
<i>Fusarium sp.</i>			10.5
<i>Cercospora kikuchii</i>			2.6
<i>Phakospora sp.</i>			5.3
<i>Heterodera glycines Ichinche</i>			5.3

注:水洗法检验 Washing test

2. 病毒检测结果

在生长试验过程中,有 15 个品种共产生 6 种类型的类似于病毒病症状的病株(见表 3)。淘汰所有病株,将其分别单株取样接种在昆诺阿藜等鉴别寄主上,结果有 5 株在昆诺阿藜上产生局部褪绿斑,其中还有 2 株在菜豆上产生局部坏死斑。用直沾法和 1/500

SMV 抗血清诱捕对 6 种典型病毒病症状植株进行电镜观察,有 4 株的样品在两种方法中都观察到长度约为 650—700nm 的线状病毒粒体(见表 4)。综合该 4 株的症状,生物检测及电镜观察结果,4 株均为大豆花叶病毒病株。

对淘汰出的其它病株进行血清学检测,没有发现 TomRSV,TRSV,ArMV,SBMV。

表 2 大豆种质传带的种传病原菌

Table 2 Seedborne pathogens on soybean seed lots

病原菌 Pathogens	品种带菌率 Affected seed lots(%)
<i>Fusarium moniliforme</i>	83.9
<i>Alternaria sp.</i>	29.0
<i>Aspergillus sp.</i>	67.7
<i>Penicillium sp.</i>	32.3
<i>Cercospora kikuchii</i>	3.2
<i>Diaporthe sp.</i>	3.2
<i>Bacteria</i>	19.4

注:吸水纸法检验 Blotter test

3. 健康种质的繁殖

所有繁种植株在防虫网室内繁种过程中没有发生任何病害,同时防虫网室内也没有任何传毒介体发生。最后有 273 个品种收获到健康种子。其余 14 个品种因种子带菌严重造成烂种和死苗,未获得健苗,因而未收获种子。

表 3 生长试验中大豆出现的类似病毒病症状类型

Table 3 Soybean lots showing typical viruslike symptoms during growing—on test

症状类型 Symptom type	品种编号 No. variety	病株数 Num. diseased plant
黄斑花叶 Yellow spot mosaic	930041	1
	930061	2
	930092	1
	930215	2
	930218	1
	930282	1
复叶褪绿坏死斑 Compound leaf chlorotic and necrotic local lesions	930045	2
褪绿轻斑驳 Chlorotic mild mottle	930054	2
单叶深绿皱缩,复叶黄脉 Simple leaf dark green, rugosity, compound leaf yellow vein	930056	1
	930087	1
单叶深绿,似梭型 Simple leaf dark green, shuttle—like	930067	3
	930069	1
	930099	1
	930147	2
单叶深绿斑块 Simple leaf dark green spot	930278	1

表 4 典型类似病毒病症状植株的病毒检测

Table 4 Virus detection of typical viruslike symptom plants

品种编号 No. variety	生物检测 Biological test	电镜观察 Detected by EM
930041	—	0
930045	—	0
930054	—	0
930056	—	0
930061	—	0
930067	—	0
930069	—	0
930087	LC	+
930092	—	—
930099	LC	+
930147	—	0
930215	—	0
930278	LC, LN	+
930281	LC	—
930282	LC, LN	+

LC: 在昆诺阿藜上产生局部褪绿斑 Chlorotic local lesions on *Chenopodium quinoa*

LN: 在菜豆上产生局部坏死斑 Necrotic local lesions on bean (*Monorebean*)

“—”: 在鉴别寄主上不产反应或在电镜下未观察到病毒颗粒

No reaction on diagnostic hosts or no virus particles detected by EM

“+”在电镜下发现病毒颗粒 Virus particles detected by EM

“0”: 未检测 Not detected

“EM”: 电子显微镜 Electron microscopy

三、讨论

大豆是我国禁止引进的植物之一。因特殊需要而从国外引进的大豆种质资源必须进行严格的隔离检疫,以防止种传 TomRSV、TRSV、ArMV、SBMV 和 *P. megasperma* (*Drechs.*) *f. sp. glycinea* Kuan & Erwin 等 5 种对外检疫的危险性病原菌传入我国。在美国,除 SBMV 外, *P. megasperma* (*Drech.*) *f. sp. glycinea* Kuan & Erwin、TomRSV、TRSV 和 ArMV 均普遍发生^[2],但本研究过程中所检测出的病株均没有表现出以上 5 种病原菌所引起的病害症状。电镜观察仅发现线状粒体。对所有病株进行血清学检测也没有检测出 TomRSV、TRSV、ArMV、SBMV。因此,可以肯定,引进的美国大豆种质不带有我国对外检疫的危险性病原菌。实验结果表明影响大豆种质质量的主要病毒是大豆花叶病毒。

许多研究表明 SMV 有多种株系^[1,2,6]。因此,在引进大豆资源的同时传进新的 SMV 株系的可能性很大。在检疫检验时,淘汰病粒只能除去部分毒源,还有一部分带毒种子并不表现症状,只有通过生长试验才能表现出来^[6]。再者,并不是所有的 SMV 斑驳种子都产生带毒种苗^[6]。本实验中检测出的 4 株 SMV 病株均由无症状种子所产生,而所播种的 SMV 斑驳种子在生长过程中未表现出症状。因此,对于引进的大豆种质资源来说,由于每

个品种引进的量少,而有些品种带有很多的 SMV 斑驳粒,在检疫检验时淘汰所有的 SMV 斑驳粒是不必要的,只有通过生长试验淘汰病株,才能真正保证种质的健康。

种传病毒是影响大豆种质健康的主要因素,但种传真菌对其影响也很明显。大豆能种传 30 多种植物病原真菌^[7],其中大豆疫病菌是我国对外检疫的一类危险性病原之一。在本实验中种子健康检查没有发现大豆疫病菌,生长试验中也没有发现大豆疫病株。大豆霜霉病菌(*P. manschurica*)和串珠镰刀菌(*F. moniliforme*)是大豆种质携带的主要病原真菌,其中 *F. moniliforme* 是造成一些品种烂种和死苗的主要原因。调查还表明少数烂种由细菌所致。所有品种没有发现传带在美国危害很大的 *Phomopsis* spp^[3]。

对引进大豆种质资源进行隔离检疫不是单纯地对大豆上种传的 5 种对外检疫的危险性病原菌的检验,通过生长试验淘汰病株,选择健株繁殖无病种子,并汰除所有潜隐性病毒、真菌和细菌。本实验中产生的病株仅有 4 株被鉴定为 SMV 病株,其它病株在鉴别寄主上不产生症状反应或在电镜下观察不到病毒粒体,因而无法鉴定出病害类型,但正是通过生长试验使这些病害表现出来而淘汰,从而纯洁了大豆种质。

参考文献

- [1] Cho, E. K. and Goodman, R. M., 1979, Strain of Soybean mosaic virus: Classification based on virulence in resistant soybean cultivars, *Phytopathology*, 69: 467—470
- [2] Sinclair, J. B. and Hackman, P. A., 1989, *Compendium of soybean diseases* (third edition), APS Press
- [3] Sinclair, J. B., 1993, *Phomopsis seed decay of soybeans—a prototype for studying seed disease*, *Plant disease*, 77 (4): 329—334
- [4] 陈永莹, 朱明德, 孙健, 1981, 大豆花叶病毒的鉴定, *植物病理学报*, 11(1): 31—35
- [5] 季良, 1992, 种传病毒的检疫, *植物检疫*, 7(4): 288—302
- [6] 吕文清, 张明厚, 钟兆西, 1981, 大豆褐斑粒与大豆花叶病毒若干株系的关系, *植物病理学报*, 11(2): 31—36
- [7] 刘美因, 周肇葱, 韩闻毅, 1983, 植物种苗传播的真菌病害检疫重要性的评价, *植物检疫研究报告*
- [8] 徐巧珍, 1993, 国外大豆种质资源在我国南方产区的表现和利用, *作物品种资源*, 增刊: 138—139
- [9] 朱振东, 1992, 谈国外引种与检疫, *植物检疫*, 6(2): 145—147
- [10] 朱振东, 1993, 种传病原菌对保存种质的影响, *作物品种资源*, (2): 35—36

SCREENING FOR HEALTH OF IMPORTED SOYBEAN GERMPLASMS FROM UNITED STATES OF AMERICA

Zhu Zhenrong Wang Xiaoming Huo Naxin Wang Jianmin

(*Institute of Crop Germplasm Resources, CAAS, Beijing, 100081*)

Tao Lingzhu

(*Capital Airport Animal & Plant Quarantine Bureau, Beijing, 100621*)

Abstract

At the National Station for Plant Introduction and Quarantine, 287 soybean germplasms imported from U.S.A are isolated and screened for health. Results of dry seed visual test show 76.0% varieties contain diseased seed, and 214 varieties carry 2—100% mottled seed infected by SMV. Washing test and blotter test on 38 varieties, 8 genera of plant pathogenic fungi, 1 plant pathogenic nematode and 1 plant pathogenic bacterium are detected. Among detected plant pathogens, *Fusarium moniliforme* and *Peronospora manshurica* have high proportion. During growing—on test, 6 types of viruslike symptom are found. By biological test, serological test and detected by electron microscope, found that 4 diseased plants are infected by SMV. No quarantine plant viruses (ArMV, TRSV, SBMV, TomRSV) are detected by serological test. *Phytophthora megasperma* (Drechs.) f. sp. *glycinea* Kuan & Erwin, an important quarantine plant pathogenic fungus, is not detected too. Finally, 273 varieties that are free of plant pathogens were harvested.

Key words Soybean; Seedborne pathogen; Quarantine isolation; Germplasm health

《大豆通报》1996 年征订启事

《大豆通报》是由中国作物学会大豆专业委员会、全国大豆科技推广协调指导小组、国家农业部大豆专家顾问组、黑龙江省大豆技术开发研究中心联合主办,国内外公开发行的综合性科技期刊。双月刊,每期 32 块版,彩色封面,每册订价 1.80 元。邮发代号 14—228。全国各地邮局(所)均可办理订阅。亦可直接向本刊编辑部联系订阅。地址:哈尔滨市太平区南通大街 25 号 邮编:150050。全年邮寄费在内,每份 12 元。