

鲁豫皖大豆产区大豆花叶病毒株系的鉴定及动态变化分析

王大刚^{1,2}, 田震¹, 李凯¹, 李华伟¹, 黄志平², 胡国玉², 张磊², 智海剑¹

(1. 南京农业大学 国家大豆改良中心/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095; 2. 安徽省农业科学院 作物研究所/安徽省农作物品质改良重点实验室, 安徽 合肥 230031)

摘要:大豆花叶病毒(soybean mosaic virus, SMV)病是一种世界性大豆病害,严重影响大豆产量和品质。对2010年采集的鲁豫皖等大豆产区14个县市的383份病毒病样进行生物纯化及血清学检测,得到64个SMV分离物及部分其他病毒分离物。利用一套统一的SMV株系鉴别寄主对64个SMV阳性分离物进行接种鉴定。根据其在10个鉴别寄主上的反应,将其归为13个株系。其中11个株系与以往在该地区鉴定的株系SC3~SC9、SC11、SC13~SC15相同,一个株系是以往在该地区没有发现而在其他地区存在的株系SC17,另外一个是从以往没有发现过的株系,它能侵染广谱抗源科丰1号,为中强毒株系,现定名为SC22。株系SC3、SC7、SC8和SC13目前仍然是鲁豫皖等地区的主要流行株系,其比率分别为23.4%、14.1%、15.6%和10.9%,是抗病育种和品种审定需要考虑的株系。本研究明确了鲁豫皖等地区SMV株系的变化趋势,可为确定当地大豆抗病育种的方向提供指导。

关键词:鲁豫皖;大豆;大豆花叶病毒;株系;鉴定

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2013)06-0806-04

Identification and Variation Analysis of Soybean Mosaic Virus Strains in Shandong, Henan and Anhui Provinces of China

WANG Da-gang^{1,2}, TIAN Zhen¹, LI Kai¹, LI Hua-wei¹, HUANG Zhi-ping², HU Guo-yu², ZHANG Lei², ZHI Hai-jian¹

(1. National Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement/Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University/National Center for Soybean Improvement, Nanjing 210095, China; 2. Crop Institute of Anhui Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Crop Quality Improvement of Anhui Province, Hefei 230031, China)

Abstract: Soybean mosaic virus (SMV) is one of the most broadly distributed viral diseases worldwide in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. It causes yield loss and seed quality deficiency seriously. The purpose of this study was to conduct identification and variation analysis of the SMV strains from Shandong, Henan, Anhui and other provinces. The results showed that 64 isolates of 383 specimens were positive to SMV. According to the responses to the 10 soybean differentials, 64 isolates were grouped into 13 strains. Twelve of 13 strains were respectively same as reported strains SC3-SC9, SC11, SC13-SC15 and SC17. A new strain was discovered and assigned SC22. The comparison between present and previous identification results of SMV strain showed that the strains SC3, SC7, SC8 and SC13 still were predominant in Shandong, Henan, Anhui and other provinces. The ratio of them to total number of the isolates respectively were 23.4%, 14.1%, 15.6% and 10.9%. We suggested that SC3 and SC7 were used as target strains of the soybean breeding program for resistance to SMV in these regions.

Key words: Shandong, Henan and Anhui Provinces; Soybean; Soybean mosaic virus; Strain; Identification

大豆花叶病毒(soybean mosaic virus, SMV)病是我国最主要的大豆病害之一,在各大豆产区均有发生,严重影响大豆的产量和品质。南京农业大学国家大豆改良中心利用一套鉴别寄主体系将全国的SMV统一划分成21个株系^[1-6],有效地推动了各地区间SMV研究的交流和抗病材料的共享,加快了抗病品种的选育与推广。

黄淮地区是我国大豆第二大主产区,而鲁豫皖相邻地区则是黄淮大豆产区最集中的连片种植区,也是大豆花叶病毒病严重流行和危害地区。王修强等^[1]、郭东全等^[3]和战勇等^[5]曾对该地区的SMV株系进行过鉴定和分析。但随着时间的推移,在病原与寄主的相互作用中,病毒株系可能会发生突变

或重组,再加上对株系专化抗病品种的更替以及引入带病毒种子等原因也可能导致田间病毒株系组成的变化。因此,了解该地区SMV的动态变化对SMV的防控和抗病品种培育都有重要指导意义。

本研究主要从鲁豫皖等地区田间采集疑似病毒病样,通过分离和鉴定,系统分析了该地区目前SMV株系的组成、分布和流行情况,并与以往株系鉴定结果进行了对比。

1 材料与方法

1.1 病样的采集与保存

2010年在SMV发病盛期从山东、河南和安徽

收稿日期:2013-04-24

基金项目:国家自然科学基金(31171574, 31201235);现代农业产业技术体系(CARS-004);转基因生物新品种培育专项(2008ZX08004-004)。

第一作者简介:王大刚(1979-),男,博士,助理研究员,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:smvwang@163.com。

通讯作者:智海剑(1957-),男,教授,博士生导师,从事大豆遗传育种研究。E-mail:zhj@njau.edu.cn。

(皖北)大豆的主要生产地区以及江苏(苏北)和河北等 14 个县市大豆生产田和部分试验田采集大豆植株上具有典型花叶或坏死症状的叶片 383 份,所有病样在防虫网室或温室内接种到感病品种南农 1138-2 上繁殖保存。

1.2 病毒的生物纯化和血清检测

利用枯斑寄主菜豆品种 Top-crop 进行生物纯化即枯斑分离。病样被接种在暗处理 24 h 的离体 Top-crop 叶片上,人工气候箱内保湿培养 3~5 d。剪下 Top-crop 叶片上产生的单个枯斑在防虫网室或温室内回接到南农 1138-2,待产生症状后,采集病叶接种离体菜豆叶片,如此多次重复,以获得单一的病毒分离物。

采用双抗体夹心酶联免疫吸附分析法(DAS-ELISA)对各个分离物进行血清学鉴定,阴性对照为未感染的南农 1138-2,阳性对照为黄淮地区广泛分布的 SMV 弱毒株系 SC3 和强毒株系 SC7^[5],其他病毒类型的阳性对照由抗血清制造商提供。分离物的光密度值(OD)为阴性对照的 2 倍或以上视为阳性。SMV 阳性分离物用于本研究,SMV 以外的病毒阳性分离物用于其他相关研究。

1.3 鉴别寄主和株系鉴定

供试的 10 个鉴别寄主为南农 1138-2、诱变 30、8101、铁丰 25、Davis、Buffalo、早熟 18、Kwanggyo、齐黄 1 号和科丰 1 号,均由南京农业大学国家大豆改良中心提供。

在防虫温室和网室内将 10 个鉴别寄主分别播种于塑料盆中,待第一对真叶完全展开时,剔除疑似病株和弱苗后,分别接种待测 SMV 分离物。以南

农 1138-2 作感病对照接种 SC3 和 SC7 检验接种效果。

鉴别寄主接种各个分离物后 30 d 内连续观察发病情况,分别记载接种叶和上位叶症状反应,系统花叶记为“M”;系统叶脉坏死、顶枯或枯斑均记为“N”;同时出现花叶和坏死的记为 MN,无症状记为“-”。无症状或显症率 50% 以下的分离物进行 2~3 次重复试验以确认发病情况。

2 结果与分析

2.1 鲁豫皖地区大豆病毒的分离和鉴定

将 383 份病样接种在南农 1138-2 上繁殖,获得 109 份症状典型的病样。用枯斑分离寄主 Top-crop 对 109 份进行枯斑分离,一个病样一般产生 1~3 个枯斑,分别剪取各个病样在 Top-crop 上产生的 1 个枯斑回接到南农 1138-2 上,显症后经过 DAS-ELISA 血清学检测,共获得 64 个 SMV 阳性分离物,SMV 阳性率为 58.7%,说明在鲁豫皖等地区危害大豆的病毒病害中以 SMV 为主。除 SMV 外,也有部分西瓜花叶病毒、烟草花叶病毒等其他类型病毒的阳性分离物,证明侵染大豆的病毒不限于 SMV 一种,甚至同一病样同时分离出 2 个分离物,分别对 2 种不同病毒呈阳性,证明存在复合侵染。

2.2 SMV 分离物的株系鉴定

根据 64 个 SMV 分离物在 10 个鉴别寄主上的症状反应,将其分成 13 组,各组包含的分离物数目不等。将 13 组 SMV 分离物在 10 个鉴别寄主上的反应与已报道的株系^[6]进行比较,结果见表 1。

表 1 鲁豫皖等地区 64 个 SMV 分离物在 10 个大豆鉴别寄主上的反应型
Table 1 Responses of 10 differential soybean genotypes to 64 SMV isolates from Shandong, Henan, Anhui and other provinces of China

组别 Group	分离物 数目 No. of isolates	南农 1138-2 Nannong 1138-2	诱变 30 Youbian 30	8101	铁丰 25 Tiefeng 25	Davis	Buffalo	早熟 18 Zaoshu 18	Kwanggyo	齐黄 1 号 Qihuang 1	科丰 1 号 Kefeng 1	株系 Strains
1	15	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	SC3
2	10	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	SC8
3	9	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	SC7
4	7	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	SC13
5	4	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	SC17
6	3	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	SC6
7	3	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	SC11
8	3	S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	SC14
9	3	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	SC22
10	2	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	SC5
11	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	SC9
12	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	SC15
13	1	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	SC4

R 表示抗病;S 表示感病。R:resistance;S:susceptible.

由表1可知,其中12组与已报道的部分株系一致。其中1~8组分别与已报道株系SC3、SC8、SC7、SC13、SC17、SC6、SC11和SC14对应,10~13组分别与株系SC5、SC9、SC15和SC4对应。然而,第9组的寄主反应与已知的株系都不同,是过去没有发现或新出现的株系,将这个新株系命名为SC22。

2.3 鲁豫皖等地区 SMV 株系组成、分布和动态变化

王修强等^[1],郭东全等^[3]和战勇等^[5]先后在鲁豫皖等地区鉴定出13个SMV株系(表2),其中既有只能侵染高度感病品种南农1138-2,而不能侵染所有其他鉴别寄主的弱毒株系SC1,也有能够侵染所有鉴别寄主的强毒株系SC15,显示出该地区的SMV株系组成较为复杂。本文分别从山东、安徽各鉴定出10个株系,从河南鉴定出8个株系,河北和

江苏等其他地区仅有5个病样,分别属于5个株系。以往株系SC3、SC7、SC8和SC13在鲁豫皖等地区的比率分别是19.8%、11.1%、14.3%和8.7%;而本次该地区的株系鉴定结果表明,4个株系仍然是主要流行株系,分别占新鉴定分离物总数的23.4%、14.1%、15.6%和10.9%,是抗病育种和品种审定首选考虑的株系。以往在鲁豫皖地区鉴定出的SC1和SC12株系,在本次调查中均没有检测到。但检测到该地区以往没有发现的SC17和新株系SC22,它们都能侵染广谱抗源科丰1号,为中强毒株系。新发现的SMV株系SC22的3个分离物中1个来自山东省,2个来自安徽省。SC9以往在安徽省和河南也有较高的比率,但本次检测结果显示安徽比率下降、在河南没有检测到,这可能与采样数量以及采样地点不同有关。

表2 鲁豫皖等地区 SMV 分离物的分布与变化

Table 2 Distribution and variation of SMV isolates in Shandong, Henan, Anhui and other provinces of China

株系 Strains	山东 Shandong		安徽 Anhui		河南 Henan		其他 Others		汇总 Total	
	原	新	原	新	原	新	原	新	原	新
	PD	ND	PD	ND	PD	ND	PD	ND	PD	ND
SC1	2/6.7	0/0	0/0	0/0	1/2.6	0/0	3/7.1	0/0	6/4.8	0/0
SC3	7/23.3	4/22.2	3/20.0	4/18.2	5/12.8	6/31.6	10/23.8	1/20.0	25/19.8	15/23.4
SC4	2/6.7	1/5.6	0/0	0/0	6/15.4	0/0	5/11.9	0/0	13/10.3	1/1.6
SC5	0/0	1/5.6	1/6.7	1/4.5	3/7.7	0/0	0/0	0/0	4/3.2	2/3.1
SC6	0/0	1/5.6	0/0	0/0	2/5.1	1/5.3	2/4.8	1/20.0	4/3.2	3/4.7
SC7	2/6.7	3/16.7	5/33.3	6/27.3	3/7.7	0/0	4/9.5	0/0	14/11.1	9/14.1
SC8	5/16.7	4/22.2	3/20.0	2/9.1	6/15.4	3/15.8	4/9.5	1/20.0	18/14.3	10/15.6
SC9	0/0	0/0	2/13.3	1/4.5	5/12.8	0/0	0/0	1/20.0	7/5.6	2/3.1
SC11	2/6.7	1/5.6	0/0	1/4.5	3/7.7	1/5.3	10/23.8	0/0	15/11.9	3/4.7
SC12	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	3/7.1	0/0	3/2.4	0/0
SC13	6/20.0	1/5.6	1/6.7	1/4.5	3/7.7	5/26.3	1/2.4	0/0	11/8.7	7/10.9
SC14	0/0	0/0	0/0	2/9.1	2/5.1	1/5.3	0/0	0/0	2/1.6	3/4.7
SC15	4/13.3	1/5.6	0/0	0/0	0/0	1/5.3	0/0	0/0	4/3.2	2/3.1
SC17	0/0	0/0	0/0	2/9.1	0/0	1/5.3	0/0	1/20.0	0/0	4/6.3
SC22	0/0	1/5.6	0/0	2/9.1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	3/4.7
合计 Total	30/100.0	18/100.0	15/100.0	22/100.0	39/100.0	19/100.0	42/100.0	5/100.0	126/100.0	64/100.0

斜线上方为标样数,下方为所占该地区病样的比率(%)。

The value in front of slant is number of specimens from corresponding region; the value behind it is ratio to total number of specimens from corresponding region. PD: previous documented; ND: newly discovered.

3 讨论

本文对采集的SMV病样进行研究发现,在鲁豫皖等地区危害大豆的病毒病害以SMV为主,但也有其他病毒的存在。王雨^[7]对该地区的病样进行检测发现,除了SMV外,还有南方菜豆花叶病毒、烟草花叶病毒和苜蓿花叶病毒等。由此推测,该地区侵染大豆的病毒不止SMV一种病毒,也应关注其他病毒对大豆的危害。类似的情况在王成坤^[8]的研究

中也有发现,如编号为HF08的病样经DAS-ELISA检测后发现大豆花叶病毒和西瓜花叶病毒均呈阳性反应,说明该病样是不同病毒的复合侵染。在复合侵染情况下,如果他们之间没有交叉保护现象,就可能出现“协生”现象,增加对大豆的危害,甚至造成病毒的重组,产生新的病毒类型,从而导致病毒致病性产生变异。由于变异产生的强致病性病毒有潜在的流行风险,应引起重视。

本试验通过对鲁豫皖交界地区SMV病样的采

集研究发现,目前该地区流行株系仍然以 SC3、SC7 和 SC8 为主。但个别株系的比率有所变化,这种变异可能是由于田间主栽品种的更替,新品种的抗病性与原有主栽品种抗性不同,从而存在对株系选择的差异,导致不同株系的消长。

株系在 SC7、SC8 和 SC13 之间比率变化较大,其中有的增加,有的下降。实际上 3 个株系的致病性差异只体现在 1~2 个鉴别寄主上的反应差异,由此推断,该地区的株系实际变化比数据反映的小。另外,新类型株系的发现也可能与取样的地点和数量有关,如在河南周口发现的株系 SC15 和 SC17,可能以往就存在,但由于采样数量少或没有到该地区采样而没有发现。

利用鉴别寄主划分 SMV 株系是目前最常用的一种方法,但结果易受环境条件的影响,必须尽可能在一致的条件下反复鉴定才会取得可靠的结果。精确的株系划分体系应该建立在病毒的分子水平上,对病毒的核苷酸及氨基酸序列进行比较研究。以往本实验室以及国内外其他专家曾对 SMV 不同基因序列与致病性之间的关系进行过研究,但并没有发现序列差异与致病性的对应关系^[9-15],这需要进一步探索。

参考文献

- [1] 王修强,盖钧镒,濮祖芹. 黄淮和长江中下游地区大豆花叶病毒株系鉴定与分布[J]. 大豆科学, 2003, 22(2): 102-106. (Wang X Q, Gai J Y, Pu Z Q. Classification and distribution of strain groups of soybean mosaic virus in middle and lower Huang-Huai and Changjiang valleys[J]. Soybean Science, 2003, 22(2): 102-106.)
- [2] 杨雅麟. 长江中下游地区大豆花叶病毒(SMV)株系组成、分布及抗性研究[D]. 南京:南京农业大学, 2002. (Yang Y L. Classification and distribution of strains of soybean mosaic virus in the middle and lower Changjiang river valleys and the resistance to soybean mosaic virus in soybeans[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2002.)
- [3] 郭东全,智海剑,王延伟,等. 黄淮中北部大豆花叶病毒株系的鉴定与分布[J]. 中国油料作物学报, 2005, 27(4): 64-68. (Guo D Q, Zhi H J, Wang Y W, et al. Identification and distribution of strains of soybean mosaic virus in middle and northern of Huang Huai Region of China[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2005, 27(4): 64-68.)
- [4] 王延伟,智海剑,郭东全,等. 中国北方春大豆区大豆花叶病毒株系的鉴定与分布[J]. 大豆科学, 2005, 24(4): 263-268. (Wang Y W, Zhi H J, Guo D Q, et al. Classification and distribution of strain groups of soybean mosaic virus in northern China spring planting soybean region[J]. Soybean Science, 2005, 24(4): 263-268.)
- [5] 战勇,智海剑,喻德跃,等. 黄淮地区大豆花叶病毒株系的鉴定与分布[J]. 中国农业科学, 2006, 39(10): 2009-2015. (Zhan Y, Zhi H J, Yu D Y, et al. Identification and distribution of SMV strains in Huang-Huai Valleys[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(10): 2009-2015.)
- [6] Li K, Yang Q H, Zhi H J, et al. Identification and distribution of soybean mosaic virus strains in southern China[J]. Plant Disease, 2010, 94(3): 351-357.
- [7] 王雨. 侵染大豆的病毒鉴定和部分病毒 CP 基因的序列分析[D]. 南京:南京农业大学, 2010. (Wang Y. Identification of virus infecting soybean and sequences analysis of CP genes of several viruses[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010.)
- [8] 王成坤. 侵染大豆的主要病毒种类检测及 SMV 高温隐症现象的初步研究[D]. 南京:南京农业大学, 2013. (Wang C K. Identification of the main type's virus infecting soybean and the preliminary study of high temperature hidden disease[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.)
- [9] 黎昊雁,陈炯,陈剑平. 大豆花叶病毒杭州分离物基因组全序列测定及其结构分析[J]. 科技通报, 2003, 19(2): 90-93. (Li H Y, Chen J, Chen J P. Molecular characterization of a soybean mosaic virus isolate from Hangzhou, China[J]. Bulletin of Science and Technology, 2003, 19(2): 90-93.)
- [10] 王延伟,智海剑,郭东全,等. 致病性不同的大豆花叶病毒分离物外壳蛋白的基因序列分析[J]. 中国油料作物学报, 2006, 28(4): 461-464. (Wang Y W, Zhi H J, Guo D Q, et al. The sequence analysis of coat protein(CP) gene of soybean mosaic virus(SMV) isolates with different virulence[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2006, 28(4): 461-464.)
- [11] 郭东全,智海剑,王延伟,等. 大豆花叶病毒 5 个分离物的鉴定及外壳蛋白序列分析[J]. 大豆科学, 2006, 25(3): 218-222. (Guo D Q, Zhi H J, Wang Y W, et al. Identification and sequence analysis of coat protein gene of five soybean mosaic virus isolates[J]. Soybean Science, 2006, 25(3): 218-222.)
- [12] 刘若森. 大豆花叶病毒 CP 基因的克隆分析及不同毒株在大豆品种上致病性的差异[D]. 南京:南京农业大学, 2009. (Liu R M. CP gene clone analysis and pathogenic difference of different strain to soybean mosaic virus in soybean variety[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009.)
- [13] Kim Y H, Kim O S, Lee B C, et al. G7H, a new soybean mosaic virus strain: Its virulence and nucleotide sequence of CI gene[J]. Plant Disease, 2003, 87: 1372-1375.
- [14] 杨清华. 我国大豆花叶病毒的株系分化、P3 基因序列特征以及大豆对强毒株系抗病基因的标记定位[D]. 南京:南京农业大学, 2009. (Yang Q H. Strain differentiation and P3 sequence characteristics of soybean mosaic virus in China and gene mapping of resistance to a virulent strain in soybean[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009.)
- [15] 刘宁,刘若森,马莹,等. 中国大豆花叶病毒 HC-Pro 基因的克隆与序列分析[J]. 大豆科学, 2009, 28(4): 549-554. (Liu N, Liu R M, Ma Y, et al. Cloning and sequence analysis of HC-Pro gene of soybean mosaic virus[J]. Soybean Science, 2009, 28(4): 549-554.)