

黑龙江省大豆花叶病毒(SMV)株系的动态变化分析

李 凯,夏迎春,王大刚,杨永庆,任 锐,高 乐,张 锴,智海剑

(南京农业大学 大豆研究所/国家大豆改良中心/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室/作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏 南京 210095)

摘 要:2012年大豆花叶病毒(SMV)病发病盛期,在我国黑龙江省大豆主产区的哈尔滨、绥化、黑河、齐齐哈尔、佳木斯和牡丹江市的68块大豆生产田、国营农场及部分科研单位的试验田采集病样461份,经在感病大豆品种南农1138-2上初步繁殖鉴定、单斑分离纯化和血清学鉴定,最终获得阳性SMV单一分离物63个。采用一套共10个大豆鉴别寄主鉴定了63个分离物在鉴别寄主上的反应,发现63个分离物分属2个SMV致病型。其中6个(9.5%)分离物属SC15株系,57个(90.5%)分离物属SC18株系。发现黑龙江省SMV株系组成较简单,强毒株系SC15零星发生,弱毒株系SC18为优势株系且分布较广。与以往鉴定结果比较,发现SC15与吕文清等鉴定的东北3号株系致病性相近,SC18与东北1号株系相近。建议黑龙江省大豆SMV防控和大豆抗病育种应以优势SMV株系SC18为主,并兼顾强毒株系SC15。

关键词:大豆;大豆花叶病毒;单斑分离生物学纯化;血清学鉴定;鉴别寄主

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2014.06.0880

Analysis of Dynamic Change of Soybean Mosaic Virus Strains in Heilongjiang Province of China

LI Kai, XIA Ying-chun, WANG Da-gang, YANG Yong-qing, REN Rui, GAO Le, ZHANG Kai, ZHI Hai-jian

(Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University/National Center for Soybean Improvement/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Soybean, Ministry of Agriculture/National Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China)

Abstract: From 461 leaf samples with *soybean mosaic virus* (SMV)-like symptoms collected from 68 fields (production fields, some experimental farm and research plots) of 6 cities (Harbin, Suihua, Heihe, Qiqihar, Jiamusi and Mudanjiang) of Heilongjiang province in China during *soybean mosaic virus* disease onset peak in 2012, sixty-three positive SMV isolates were obtained after preliminary identification on the susceptible soybean *cv.* Nannong 1138-2, biological purification with single-lesion isolation and serological determination. Based on disease reactions on 10 differentials used in China as a representative from various reported differential cultivar systems, the 63 isolates were divided into 2 strains. Six isolates were classified into strain SC15, and the other 57 isolates were SC18 strain. The composition of SMV strains found in Heilongjiang province was relatively simple, less virulent strain SC18, which was predominant and widespread in Heilongjiang province, accounted for 90.5% of the total isolates and was distributed in 6 cities. While virulent strain SC15, accounted for only 9.5% of the total isolates and was distributed in 3 cities. Comparison with the previous identification results showed that SC15 and SC18 were similar to Northeastern No. 3 strain and No. 1 strain identified by Lyu et al in pathotypic, respectively. It is clear that SC18 is the key consideration SMV strains during disease control and soybean breeding program for SMV resistance.

Key words: Soybean; *Soybean mosaic virus* (SMV); Biological purification with single-lesion isolation; Serological determination; Soybean differentials

大豆在其生长过程中受到多种病虫害的影响,其中大豆花叶病毒(*Soybean mosaic virus*, SMV)病是主要病害之一。SMV在大豆叶片上引起的症状有轻花叶、花叶、黄斑花叶、畸形叶、叶脉坏死和顶端坏死等多种类型^[1],在大豆籽粒上也可引起褐斑粒。SMV流行可造成大豆较大的产量损失^[2],严重年份可致绝产。抗病育种是提高大豆单产、控制SMV危害最经济、有效和环保的手段。SMV存在明

显致病性分化,因此,明确各产区SMV株系组成和重点防控对象是抗病育种的前提。目前南京农业大学国家大豆改良中心将我国的SMV划分成22个株系^[3-8]。

黑龙江省是我国种植大豆面积最大的省份,其产量约占全国大豆总产的1/3。该地区的大豆抗病育种工作甚为重要。国内学者吕文清等^[9]曾报道黑龙江地区SMV株系为东北1号、东北2号(主要

收稿日期:2014-05-18

基金项目:国家自然科学基金(31101164, 31171574);现代农业产业技术体系(CARS-004);转基因生物新品种培育科技重大专项(2008ZX08004-004);“十二五”农村领域国家科技计划(2011BAD35B06-4)。

第一作者简介:李凯(1979-),男,博士,讲师,主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail: kail@njau.edu.cn。

通讯作者:智海剑(1957-),男,教授,博导,主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail: zhj@njau.edu.cn。

流行株系)和东北 3 号;王延伟等^[4]曾报道黑龙江地区 SMV 株系为 SC4、SC7、SC8、SC11、SC12 和 SC13 共 6 个株系,其中 SC11 为主要流行株系,其余 5 个株系每个株系所占比例极低。随着近年抗病品种的推广种植,SMV 因发生重组或突变等变异可能导致田间 SMV 株系组成及流行株系发生变化,因此,了解当地目前 SMV 株系的组成和分布对抗病育种工作具有重要指导意义。

本研究采集了黑龙江省 6 个市的田间 SMV 病样,通过单斑分离纯化、血清学鉴定、SMV 株系鉴别分析了黑龙江省目前的 SMV 株系的组成和分布,并与吕文清等^[9]和王延伟等^[4]所报道结果进行了初步比较。

1 材料与方法

1.1 病样的采集与初步繁殖鉴定

2012 年于大豆 SMV 发病盛期,在我国黑龙江大豆产区的哈尔滨、绥化、黑河、齐齐哈尔、佳木斯、牡丹江 6 市的生产大田、国营农场及部分科研单位试验田广泛采集典型 SMV 症状病样。每个县至少取 12 块大豆田,每块大豆田随机采集的典型病样数不少于 5 个,共采集病样 461 份,以真实反应该地区 SMV 株系的组成与分布情况。

1.2 病样的生物学纯化

病样生物学纯化的单斑分离寄主采用菜豆品种 *Phaseolus vulgaris* Topcrop,由南京农业大学国家大豆改良中心(SMV 课题组)提供。首先将 Topcrop 种子盆播防虫网室或温室,待第一对真叶充分展开,黑暗处理 24 h。将待纯化病样摩擦接种在离体的菜豆 *Phaseolus vulgaris* Topcrop 叶片上,将接种叶片放入人工气候箱,在 25~30℃,湿度:90%,光照:48~72 h 内保湿培养 2~3 d,待出现明显叶脉坏死或局部坏死斑,用消毒剪刀剪取单个坏死斑分别回接在感病寄主南农 1138-2 上进行繁殖。

1.3 SMV 分离物的血清学鉴定

采用双抗体夹心酶联免疫吸附分析(DAS-ELISA)对单斑分离纯化后的所有分离物进行血清学鉴定。阴性对照为未接种的健株南农 1138-2,阳性对照为黄淮地区广泛分布的 SC3 株系。分离物的光密度值(OD)为阴性对照的 2 倍或以上视为阳性。

1.4 鉴别寄主与 SMV 株系鉴定

供试的 10 个鉴别寄主南农 1138-2、诱变 30、8101、铁丰 25、Davis、Buffalo、早熟 18、Kwanggyo、齐黄 1 号及科丰 1 号,均由南京农业大学国家大豆改良中心(SMV 课题组)提供。

经单斑分离纯化和血清学鉴定为阳性的 SMV 分离物分别接种在 10 个鉴别寄主上,南农 1138-2 用作感病对照,所有接种试验均在防蚜网室或温室进行,温度 20~30℃。每个分离物在 10 个鉴别寄主上重复验证 2~3 次直至症状稳定以保证试验结果的可靠性。

接种 7 d 后开始,30 d 内连续观察记载发病情况,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”;花叶和坏死都有的记为 MN,无反应症状记为“-”。

2 结果与分析

2.1 SMV 分离物的获得

采集的 461 份典型 SMV 症状病样经菜豆品种 *Phaseolus vulgaris* Topcrop 单斑分离纯化,获得病毒分离物 77 个,进一步 DAS-ELISA 血清学鉴定,最终得到 63 个阳性 SMV 分离物(表 1),SMV 阳性率达 81.82%,说明危害我国黑龙江大豆产区的病毒病以 SMV 为主,伴有其他病毒病与 SMV 协同危害大豆。由表 1 还可看出,黑龙江省哈尔滨、黑河、佳木斯及牡丹江地区获得 SMV 分离物较多,说明这些地区 SMV 发生较重,绥化与齐齐哈尔地区 SMV 发生较轻。

表 1 黑龙江省 SMV 病样分布

Table 1 Distribution of samples of soybean mosaic virus from Heilongjiang province

采样地点 Sampling locations	采集病样数目 No. of collected symptomatic samples	生物学纯化分离物数目 No. of biologically purified isolates *	血清学鉴定阳性 SMV 分离物数目 No. of isolates serologically positive for SMV
哈尔滨 Harbin	140	20	16
绥化 Suihua	55	5	4
黑河 Heihe	80	14	11
齐齐哈尔 Qiqihar	37	3	3
佳木斯 Jiamusi	95	25	20
牡丹江 Mudanjiang	54	10	9
合计 Total	461	77	63

* 经 Topcrop 生物学纯化后分离物数目。
* Number of biologically purified isolates from *Phaseolus vulgaris* cv. Topcrop.

2.2 黑龙江地区 SMV 株系的鉴定与分类

根据 63 个 SMV 分离物在 10 个鉴别寄主上引发的不同症状反应,将其分成 2 组(表 2),第 1 组包含 57 个分离物,致病力较弱,仅能系统侵染品种南农 1138-2 和 8101,与以往鉴定的 SC18 株系相同,占分离物总数的 90.5%,属于该地区的优势株系;第 2

组包含 6 个分离物,可系统侵染所有 10 个不同抗性的大豆鉴别寄主,包括广谱抗性品种科丰 1 号,因此为强毒株系,与以往鉴定的 SC15 株系相同,占分离物总数的 9.5%(表 2 和表 3)。由此可见,我国黑龙江地区 SMV 株系组成较简单,且以弱毒株系 SC18 发生为主。

表 2 黑龙江地区 63 个 SMV 分离物的归类

Table 2 Classification of 63 SMV isolates from Heilongjiang province

株系 Strains	SMV 分离物 SMV isolates	来源 Sources	数目 Number	百分比 Percentage/%
SC18	HEB-48-1, 2042-1, 2176-1, 2152-1, 2189-2, 2253-1, 2180-2, 2193-1, 2210-4, 2112-3 90.5QQ207-1, JS-15-1, 2190-5, 2206-3, 2190-1, JS-15-2, JS-15-3, HEB-16-1, 2189-1, 2210-3 QQ207-2, 2180-3, JS-16-1, 2206-2, 2253-2, JMS-4-3, 2089-1, JMS-4-2, 2262-2, 2229-4 2210-1, 2262-1, SH-14-1, 2229-3, 2112-2, MDJ-8-1, JMS-4-1, 2246-1, 2183-1, JMS-6-1 MDJcaidou-1-1, 2247-1, JS-16-2, 2180-1, 2190-2, 2176-2, 2176-3, 2140-2, 2138-1 2165-1, 2152-3, JS-25-1, 2180-4, 2008-1, 2140-1, 2246-2, 2132-1	哈尔滨、绥化、九三、齐齐哈尔、佳木斯、牡丹江	57	90.5
SC15	SH112-1, 2190-4, JS305-1, JS310-1, 2190-3, SH112-2	绥化、九三、佳木斯	6	9.5
合计 Total			63	100

表 3 两个 SMV 株系在 10 个大豆鉴别寄主上的反应型

Table 3 Responses of 10 soybean differentials to 2 SMV strains

株系 Strains	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	Kwang gyo	齐黄 1 号 Qihuang 1	科丰 1 号 Kefeng 1
SC18	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
SC15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R:抗病;S:感病。下同。

R:Resistance;S:Susceptible. The same below.

2.3 黑龙江地区 SMV 株系的组成与分布

黑龙江地区各市的主要 SMV 株系及各株系在各地区分布情况见表 4。从地区间 SMV 株系组成看,绥化、黑河及佳木斯均存在 SC15 和 SC18 两个株系;而哈尔滨、齐齐哈尔及牡丹江仅有 SC18 株系,株系组成简单。从 SMV 株系的地域分布看,强

毒株系 SC15 仅在绥化、黑河及佳木斯零星发生;而弱毒株系 SC18 则分布在哈尔滨、绥化、黑河、齐齐哈尔、佳木斯及牡丹江 6 个市,为黑龙江省大豆产区广分布株系,它是黑龙江地区大豆 SMV 防控、抗 SMV 育种及品种审定重点考虑的对象株系。

表 4 我国黑龙江地区 SMV 株系的组成及分布

Table 4 Composition and distribution of SMV strains in Heilongjiang province in China

采样地点 Sampling locations	SC15	SC18	分离物数量 Isolates	占总分离物百分比 Percentage/%
哈尔滨 Harbin	0	16	16	25.4
绥化 Suihua	2	2	4	6.3
黑河 Heihe	2	9	11	17.5
齐齐哈尔 Qiqihar	0	3	3	4.8

王延伟等^[4]发现黑龙江省的主要流行株系由中毒株系东北 2 号变为弱毒株系 SC11,东北 2 号株系可以侵染齐黄 1 号,而 SC11 株系不能侵染。本研究发现 2012~2013 年间黑龙江省流行 SMV 株系为 SC18,毒性较 SC11 有进一步弱化趋势(表 6)。说明随着时间推移,大豆新旧品种的不断更替,SMV 株系继续分化变异,田间流行株系处于动态变化过程中。本研究也发现以往没有报道的强毒株系 SC15 有零星发生,比率仅占 9.5%。没有检测到王延伟报道的 SC4、SC7、SC8、SC12 和 SC13 这 5 个株系,可能是这些株系本身比例就较少,本次没有采到病样,另一种可能是这些株系已经消失。

3 讨 论

黑龙江是我国最大的大豆生产区,其产量约占全国大豆产量的 1/3。该地区的大豆抗病育种工作对我国大豆生产至关重要,明确该地区主要大豆病害及主要流行株系是抗病育种的前提。以往吕文清^[9]及王延伟^[4]曾对该地区大豆花叶病毒病流行进行报道,但时间久远,随着近年生产上抗病品种的不断更替及种质资源的相互交流,田间大豆花叶病毒株系组成和分布可能发生变化。本研究通过对我国黑龙江省大范围采集病样,对 SMV 分离物进行系统鉴定、分类,发现该地区的 SMV 株系组成趋于简单化,仅由 SC15 和 SC18 两个株系组成,且流行株系由 SC11 变为 SC18,株系毒性有所减弱。

由于黑龙江大豆产区属北方一熟制春作大豆区,SMV 主要传播介体蚜虫发生量较黄淮与南方大豆产区轻,因此该地区 SMV 发生程度也较轻,SMV 株系的组成也较黄淮与南方大豆产区简单。本研究采集了 461 份病样,最终仅获得 63 个阳性 SMV 分离物,其原因可能是该地区 SMV 发生较轻,所采样本并非是 SMV 感染,二是采集的部分病样在运输过程中可能失活。

王大刚等^[8]、杨永庆等^[10]通过对我国鲁、豫、皖、冀等大豆主产区 SMV 的系统鉴定研究发现,以上地区的 SMV 株系组成和分布均发生一定程度变化。弱毒株系 SC18 为我国南方大豆产区的优势株系和广分布株系^[7],本研究发现随着时间推移,该株系也成为我国东北大豆主产区黑龙江省的主要流行株系,杨永庆等^[10]也在河北省发现该株系且存在一定比例。由此可见,SC18 株系有在我国南方、黄淮及东北三大主产区流行的趋势,应引起品种管

理部门和大豆育种单位高度重视。

参考文献

- [1] Cho E K, Goodman R M. Strains of soybean mosaic virus; Classification based on virulence in resistant soybean cultivars[J]. Phytopathology, 1979, 69(5): 467-470.
- [2] Ross J P. Effect of aphid-transmitted soybean mosaic virus on yields of closely related resistant and susceptible soybean lines[J]. Crop Science, 1977, 17: 869-872.
- [3] 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): 102-107. (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): 102-107.)
- [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] 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(4): 64-68. (Guo D Q, Zhi H J, Wang Y W, et al. Identification and distribution of soybean mosaic virus strains in Middle and Northern Huang Huai Region of China[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2005(4): 64-68.)
- [6] 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.)
- [7] 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.
- [8] 王大刚, 田震, 李凯, 等. 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[J]. 大豆科学, 2013, 32(6): 806-809. (Wang D G, Tian Z, Li K, et al. Identification and variation analysis of soybean mosaic virus strains in Shandong, Henan and Anhui provinces of China[J]. Soybean Science, 2013, 32(6): 806-809.)
- [9] 吕文清, 张明厚, 魏培文, 等. 东北三省大豆花叶病毒(SMV)株系的种类与分布[J]. 植物病理学报, 1985, 15(4): 225-229. (Lyu W Q, Zhang M H, Wei P W, et al. Classification and distribution of strains of soybean mosaic virus in Northeast China[J]. ACTA Phytopathologica Sinica, 1985, 15(4): 225-229.)
- [10] 杨永庆, 侯文焕, 边全桀, 等. 河北地区大豆花叶病毒株系的组成与分布[J]. 大豆科学, 2014, 33(1): 87-90. (Yang Y Q, Hou W H, Bian Q L, et al. Composition and distribution of SMV strains in Hebei[J]. Soybean Science, 2014, 33(1): 87-90.)