



## 南方土壤中导致大豆皱叶的因子分析

陈文杰, 陈 渊, 韦清源, 汤复跃, 郭小红, 梁 江

(广西农业科学院 经济作物研究所/广西作物遗传改良重点实验室, 广西 南宁 530007)

**摘要:**为找出南方大豆皱叶症发生的诱因,本研究从南方土壤中非生物因素和生物因素两个角度进行探索研究。利用混池法和 ICP-OES 技术研究正常叶混池和皱叶混池的差异元素,利用构建的皱叶残留异质系中皱叶家系材料 GY\_C 和正常叶家系材料 GY\_N,采用单因素随机区组试验设计,研究皱叶土壤的不同土层、营养液、灰烬、叶浆,进行土壤浸泡液、土壤消毒、氮肥等处理后大豆皱叶材料皱叶症的变化。结果表明:皱叶环境土壤的表层、中层和底层土均可导致 GY\_C 叶片皱缩,中层土中的 GY\_C 叶片皱缩程度略高于表层和底层土。氮磷钾配比失衡的营养液处理 GY\_C 叶片未发生皱缩。ICP-OES 分析皱叶混池  $E_1$  和正常叶混池  $E_0$  的 31 种元素后,未发现  $E_1/E_0$  比值为 1.7 倍以上的元素,且  $E_1$  中锰元素含量低于  $E_0$ 。皱叶灰烬及土壤浸泡液处理基质后 GY\_C 叶片未发生皱缩。移栽试验表明,南方土壤和基质比例超过 3:1 时 GY\_C 长出的新叶依然皱缩,而复种的盆栽中南方土壤和基质比例低于 1:8 时 GY\_C 叶片也会发生皱缩,且随着复种次数增加,皱叶程度有所增加。解剖观察皱叶材料的根、茎、叶柄未发现明显的虫害痕迹。 $-80, 60, 80, 100$  和  $120$  °C 处理的南方土壤中 GY\_C 叶片不发生皱缩。综上所述,南方土壤中的微生物因素可能是导致大豆皱叶的关键因子。

**关键词:**大豆;皱叶;因子;土壤;南方;ICP-OES

## Analysis of Factors Causing Soybean Crinkle Leaf in Southern China Soil

CHEN Wenjie, CHEN Yuan, WEI Qingyuan, TANG Fuyue, GUO Xiaohong, LIANG Jiang

(Cash Crops Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences/Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Key Lab, Nanning 530007, China)

**Abstract:** To identify the causes of soybean leaf wrinkling in southern China, this study explored and studied from two perspectives; Non biological and biological factors in the soil of southern China. Differential mixing pool method and ICP-OES analysis technology was used to study the differential elements between the normal leaves mixing pool ( $E_0$ ) and crinkle leaves mixing pool ( $E_1$ ). Two materials GY\_C (crinkle grade is HS) and GY\_N (crinkle grade is HR) with almost the same genetic background were used to study the change of soybean leaf wrinkling in different soil layers, nutrient solution, ash, leaf pulp, after soil soaking solution, soil disinfection, nitrogen fertilizer and other treatments. And random block test design was used in these experiments. The results showed that leaves of GY\_C grown in surface, middle and subsurface layers soil all could cause the GY\_C leaves becoming wrinkled. GY\_C leaves grown in middle layers soil were more wrinkled than other two kind layers soil. GY\_C leaves treated with nutrient solution in which the nitrogen phosphorus potassium ratio was imbalanced did not become wrinkled. ICP-OES analysis results showed that the value of  $E_0/E_1$  to all elements were within 1.7-fold. And the manganese element content in  $E_1$  was lower than that in  $E_0$ . GY\_C leaves did not collapse after treatment of the substrate with leaf ash and soil soaking solution. The transplanting experiment showed that the new leaves of GY\_C continued to shrink when the southern soil and substrate ratio was more than 3:1, whereas the GY\_C leaf also collapsed when the southern soil and substrate ratio was less than 1:8 in the pot with re-planting, and the degree of leaf shrinkage increased as the number of re-plications increased. Dissection and observation of the root, stem, and petiole of the crumpled leaf material revealed no obvious traces of infestation. The  $E_1$  soil treated under  $-80, 60, 80, 100$  and  $120$  °C could not cause GY\_C leaves wrinkled. In summary, microbial factors in the southern soil may be the key factors that cause the crinkling of soybean leaves in southern China.

**Keywords:** soybean; crinkle leaf; factor; soil; southern China; ICP-OES

大豆是人们生活中最主要的植物蛋白来源,也是重要的植物油脂来源,在国民经济发展中占有重要的地位。南方是我国主要的大豆产区之一,然而近些年来在广西、广东、福建、贵州等地的生产上发现一种类似病毒病所致的大豆皱叶症状,该症状严

重时可导致大豆减产 40% 左右<sup>[1]</sup>,严重影响该地区大豆的生产。因此,找出南方大豆皱叶症的致病因子,对指导南方大豆生产有着重要的意义。导致植物产生皱叶的因素有很多:既有非生物因素,如除草剂<sup>[2-4]</sup>、锰毒<sup>[5-7]</sup>、营养混乱<sup>[8]</sup>等;也有生物因素,

收稿日期:2023-10-02

基金项目:国家自然科学基金(32260451,32060490);广西自然科学基金(2019GXNSFAA185009);广西农业科学院稳定资助科研团队项目(2021YT055);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-04-CES30)。

第一作者:陈文杰(1982—),硕士,副研究员,主要从事大豆遗传育种及耐逆境研究。E-mail:cenwenji1030@163.com。

通讯作者:梁江(1969—),硕士,研究员,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:liangjiang0626@163.com。

如病毒病<sup>[9-12]</sup>等;同时还有植物自身因素如基因突变<sup>[13]</sup>。不同因素所致的大豆皱叶症状有所不同:如病毒病所致的大豆叶片皱缩多表现为叶肉泡状突起,叶沿向后卷曲等<sup>[14]</sup>;除草剂麦草畏引起的大豆皱叶呈“杯状叶”(cupping leaf)<sup>[2]</sup>;锰毒引起的皱叶表现为叶片皱缩、幼叶黄化及老叶坏死斑<sup>[5]</sup>;钾、钙、氮元素的失衡也会引起大豆皱叶的产生<sup>[8]</sup>,表现为幼叶褐尖,随后变皱。另外根瘤菌菌株 IC3342 可诱导木豆 [*Cajanus cajan* (L) Mill sp.] 叶片的卷曲<sup>[15-16]</sup>。但目前在大豆上尚鲜见有关根瘤菌可导致大豆叶片皱缩的相关报道。研究表明,我国南方大豆皱叶症为外界环境所致,且诱因来自南方土壤<sup>[17]</sup>,但究竟缘于土壤中的何种因素目前尚不清楚。土壤中影响大豆生长的因子有非生物因子和生物因子,南方大豆皱叶的诱因是土壤的中生物因素还是非生物因素目前尚未明确。本研究利用构建成的皱叶残留异质系中皱叶差异家系材料,通过盆栽法等从非生物因素和生物因素方面探索南方土壤中导致大豆皱叶的诱因,以期找出大豆皱叶症致病因子及大豆皱叶症的防治提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试的大豆材料 GY\_C 是桂春 8 号和粤春 2017-1 衍生残留异质系材料中表现皱叶的材料。残留异质系是在 F<sub>2</sub> 的连续自交过程中获得的某个或某几个性状保留一个亲本特征,其他一些位点上保留了另一个亲本的特征,而某一位点杂合的遗传背景纯合的特殊群体。残留异质系材料创制的过程见陈文杰等<sup>[1]</sup>。以及皱叶症级为 7 的华夏 31 号,由华南农业大学提供。

盆栽试验使用的基质为长春赛世泥炭科技有限公司生产。

### 1.2 方 法

1.2.1 非生物因素分析 土层试验:试验于 2021 年 3—7 月在广西农业科学院明阳基地进行。分别取皱叶敏感材料表现皱叶土壤的表土(0~5 cm) H<sub>1</sub>、中层土(10~15 cm) H<sub>2</sub> 及底层土(25~30 cm) H<sub>3</sub>,装于花盆(口径×底径×高=240 mm×260 mm×195 mm)后种植 GY\_C 的种子。出苗后每盆定植 2 株,每个处理重复 3 次,植株长至 V3、R1 和 R5 期,分别参考陈文杰等<sup>[18]</sup>的方法鉴定每个处理的大豆皱叶症级。

营养失衡试验:试验于 2021 年 7—12 月在广西农业科学院明阳基地进行。根据 Hopkins 等<sup>[8]</sup>报道的可以强烈引起大豆叶片皱缩的营养液的配比配制营养液 W<sub>1</sub>,W<sub>1</sub> 中各化合物及含量:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 为

0.006 33 mol·L<sup>-1</sup>;MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 为 0.002 37 mol·L<sup>-1</sup>;CaCl<sub>2</sub> 为 0.001 46 mol·L<sup>-1</sup>;KNO<sub>3</sub> 为 0.002 14 mol·L<sup>-1</sup>。对照为正常溶液 W<sub>CK</sub>,其各化合物及含量:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 为 0.006 33 mol·L<sup>-1</sup>;MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 为 0.002 37 mol·L<sup>-1</sup>;CaCl<sub>2</sub> 为 0.001 46 mol·L<sup>-1</sup>;Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 为 0.003 57 mol·L<sup>-1</sup>。皱叶材料 GY\_C 播于装有蛭石的花盆中(口径×底径×高=160 mm×130 mm×175 mm),真叶期每盆定苗 2 株,随后每 2 d 浇灌 1 次营养液,每个处理设 4 个重复。植株长至 V3、R1、R5 期,分别参考陈文杰等<sup>[18]</sup>的方法鉴定每个处理大豆的皱叶症级。

叶片主要元素差异检测:由于土壤中各元素背景值差异较大,本研究直接测定皱叶敏感品种不同环境中皱叶和正常叶片间主要元素的差异。试验于 2021 年 6—12 月进行,设 2 个处理:E<sub>1</sub>,皱叶敏感材料表现皱叶的环境;E<sub>0</sub>,皱叶敏感材料表现正常叶的环境。E<sub>1</sub> 试验点包括南宁市的广西农业科学院明阳基地(红壤黏质土)、百色的百色市玉米研究所(红壤黏质土)、贺州的贺州市农业科学院(红壤黏质土);E<sub>0</sub> 试验点包括南宁市的广西农业科学院院部基地(红壤黏质土)、都安县地苏镇赞子村(红壤黏质土)、桂林的桂林市农业研究中心(红壤黏质土)。每个试验点设 3 个重复,小区长 5.0 m,大豆播种规格为 50 cm(行距)×20 cm(穴距),每穴留 2 株,每个小区播 5 行大豆。华夏 31 号长至盛花期时,参考陈文杰等<sup>[18]</sup>的大豆皱叶鉴定方法,鉴定各试验点大豆皱叶症级,然后在 E<sub>1</sub> 中每小区分别取叶片皱缩级别为 4 的叶片,在 E<sub>0</sub> 中每小区分别取皱叶症级为 0 的叶片,108 ℃ 杀青后 80 ℃ 烘干至恒重,然后各试验点中,每小区取 15 g 叶片放入拜杰 BJ-800A 型多功能粉碎机,粉碎叶片至粉状。E<sub>1</sub> 得到 3 个皱叶样品,E<sub>0</sub> 得到 3 个正常叶样品。分别取 E<sub>1</sub> 的 3 个样品 10 g 混合均匀得到 T<sub>1</sub> 混合池,同样的方法得到 E<sub>0</sub> 的 3 个样品的 T<sub>0</sub> 混合池。参考郑翌等<sup>[19]</sup>的方法对样品进行微波消解处理,然后利用电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP-OES,美国利曼公司)进行 31 种常见元素的半定量扫描测定,测定参数为:雾化功率 1.2 W、雾化器压力 190 kPa、等离子体流量 15 L·min<sup>-1</sup>、辅气流量 1.5 L·min<sup>-1</sup>、一次读数时间 5 s、仪器稳定时间 15 s、进样延时 13 s、汞速 13 r·min<sup>-1</sup><sup>[20]</sup>。测定后计算每个元素的 T<sub>1</sub>/T<sub>0</sub> 值,T<sub>1</sub>/T<sub>0</sub> ≥ 2.00 的作为导致南方大豆皱叶症的候选致病元素。

灰烬处理试验:如果大豆叶片皱叶是土壤中无机盐所致,那么无机盐会在叶片中富集,用皱叶的灰烬处理正常土壤可能会使皱叶材料 GY\_C 产生皱叶。试验于 2021 年 6—12 月在广西农业科学院明阳基地和院部基地进行,在明阳基地和院部基地分

别种植 GY\_C,待其长至盛花期时分别采集皱叶土壤环境和正常土壤中生长的 GY\_C 叶片,烘干后在高温煅烧炉中燃烧尽,将基质和灰分质量分别按照一定比例混合均匀,  $A_1:1\ 000:10$ 、 $A_2:1\ 000:30$ 、 $A_3:1\ 000:50$ ,然后种植 GY\_C,每盆留 2 株苗,植株长至 V3、R1、R5 期,参考陈文杰等<sup>[18]</sup>的方法鉴定每个处理大豆皱叶症级,每个处理设 3 个重复。

叶浆处理试验:试验地点及种植同灰烬处理试验,GY\_C 盛花期采集新鲜的 GY\_C 皱缩叶片,按照 1:5 质量比加入纯水,用破壁机打成浆,随后分别用纱布和滤纸过滤,获皱叶叶浆  $Y_1$ ,用 GY\_C 的正常叶片(正常土壤条件下)作对照  $Y_{CK}$ ,自真叶期开始处理种植在花盆基质中的 GY\_C(每盆 2 株),参考陈文杰等<sup>[18]</sup>方法鉴定每个处理大豆皱叶症级。

土壤浸泡液处理:取皱叶敏感材料表现皱叶地块中 10~15 cm 土层的土壤 15 L 放入 30 L 的水桶(口径×底径×高=370 mm×290 mm×360 mm)中,随后加满纯净水放于室温条件下,每 3 d 搅动 1 次,处理 21 d 后获土壤浸出液  $W_1$ ,设纯净水为对照  $W_{CK}$ ,重复 3 次。取上清液处理种植在花盆基质中真叶时期的 GY\_C 植株(每盆 2 株),植株长至 V3、R1、R5 期,参考陈文杰等<sup>[18]</sup>的方法鉴定每个处理大豆皱叶症级。

土壤混合试验:按照基质和皱叶土壤体积比例设 5 个处理,即  $S_1(8:1)$ 、 $S_2(3:1)$ 、 $S_3(1:3)$ 、 $S_4(1:8)$ 、 $S_5$ (纯基质)。皱叶土壤和基质混合均匀后装入花盆(口径×底径×高=215 mm×173 mm×148 mm)中,每盆播种 4~5 粒,出苗后真叶期定苗 3 株,设 3 次重复。待播种在皱叶土壤中的 GY\_C 生长至第 2 片复叶时,把 GY\_C 移栽至花盆中,移栽时根带部分大田土壤,随后观察不同土壤处理的花盆中 GY\_C 叶片变化。

1.2.2 生物因素分析 根部显微镜观察:R<sub>1</sub> 期取田间皱叶的 GY\_C 的根部、幼茎、叶脉,根部在纯净水中轻轻清洗掉表面泥后,连同幼茎和叶脉立即放入 FAA 标准固定液(Servicebio)固定保存,通过脱水—石蜡包埋—切片—脱蜡—染色等过程制成永久性石蜡切片,采用尼康 ECLIPSE Ni 型显微镜观察分析<sup>[21]</sup>。

土壤消毒处理:取皱叶敏感材料表现皱叶地块中 10~15 cm 土层的土壤装入 31 cm×66 cm 的灭菌袋封口后分别进行消毒处理,设 6 个处理: $T_0$ -常温对照; $T_1$ -冰箱-80℃放置 60 d; $T_2$ -60℃烘箱放置 10 d; $T_3$ -80℃烘箱,放置 10 d; $T_4$ -100℃烘箱,放置 10 d; $T_5$ -120℃高压灭菌锅,灭菌 40 min。处理完

毕后装入已消毒的花盆(口径×底径×高=215 mm×173 mm×148 mm),播种前先把 GY\_C 的种子放入 75% 的酒精 20 s,取出自然晾干后播种,每盆播种 4~5 粒,出苗后真叶期定苗 2 株,设 3 次重复。植株长至 V3、R1、R5 期,参考陈文杰等<sup>[18]</sup>的方法鉴定每个处理大豆皱叶症级。

土壤复种:使用  $S_0$ 、 $S_1$ 、 $S_2$ 、 $S_3$ 、 $S_4$  和  $S_5$  处理的土壤进行复种试验,每次前茬大豆收获后,晾晒 7 d 后继续用 75% 酒精消毒后的种子复种,且在植株长至 V3、R1、R5 期,参考陈文杰等<sup>[18]</sup>的方法鉴定每个处理大豆皱叶症级。

### 1.3 大豆植株皱叶症鉴定方法

先根据大豆叶片皱缩程度将叶片分为 5 级,具体分级标准为:0 级-正常,观测期冠层大豆叶片无皱褶状,叶片平展;1 级-较正常,观测期冠层叶片轻微皱褶但不出现“勾手”状,叶片能平展;2 级-较敏感,观测期冠层叶片皱褶明显,有轻微的“勾手”状;3 级-敏感,观测期冠层大豆叶片皱褶严重,有明显的“勾手”状;4 级-严重敏感,观测期冠层叶片皱褶十分严重,“勾手”状严重,且叶片向下弯曲已基本不能张开<sup>[18]</sup>。于 V3、R1、R5 期鉴定冠层叶片的皱缩程度,然后根据公式  $DI(\%) = \sum \frac{x_i n_i}{4N} \times 100$  计算每个处理的皱叶指数,式中,  $x_i$  表示叶片皱缩等级,  $n_i$  表示皱缩等级相应的植株数,  $N$  表示调查植株总数。然后根据公式  $CI(\%) = \frac{\sum DI_k}{3}$  计算综合皱

叶指数,式中  $DI_k$  表示处理的观察时期(V3、R1、R5)的皱叶指数。皱叶症级划分:0 级- $CI=0$  为免疫(HR);1 级- $0 < CI \leq 30$  为抗(R);3 级- $30 < CI \leq 60$  为中抗(MR);5 级- $60 < CI \leq 90$  为感(S);7 级- $90 < CI$  为高感(HS)。

### 1.4 数据分析

利用 Excel 2019 进行数据的整理,利用 SPSS 19.0 进行方差分析及显著性比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同土层对大豆皱叶症的影响

不同土层试验表明,皱叶环境土壤的不同土层对皱叶材料 GY\_C 的皱叶表现有一定影响,V3 期 3 个土层的叶片皱缩程度无显著差异,而 R1 和 R5 两个时期,中层土( $H_2$ )中 GY\_C 的叶片皱缩程度显著高于表层土( $H_1$ )和底层土( $H_3$ )(表 1),说明导致大豆皱叶的因子在土壤中的垂直分布上具有一定差异。

表1 不同土层皱叶环境土壤对 GY\_C 皱叶症影响

Table 1 Effects of different crinkle leaf environmental soil layers on the crinkle leaf disease of GY\_C

土层 Soil layers	DI			CI
	V3	R1	R5	
H <sub>1</sub>	41.67 ± 14.43 a	52.08 ± 3.61 b	50.00 ± 6.25 b	47.92 ± 5.51 b
H <sub>2</sub>	50.00 ± 0.00 a	72.92 ± 7.22 a	70.83 ± 9.55 a	64.58 ± 12.67 a
H <sub>3</sub>	50.00 ± 0.00 a	52.08 ± 3.61 b	54.17 ± 3.61 b	52.08 ± 2.08 b

注:不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

## 2.2 不同营养液对皱叶材料皱叶症的影响

W<sub>1</sub>营养液条件下,GY\_C 整个生长期叶片未见有皱叶的出现(表2),说明营养液配比混乱非 GY\_C 发生皱叶症的主要因子,且营养液造成的大豆叶片的皱缩可能还与大豆种质有关,不同种质对营养液的敏感程度不一样。

表2 营养液配置对 GY\_C 皱叶症的影响

Table 2 Effects of different nutrient solutions on the crinkle leaf disease of GY\_C

营养液 Nutrient solution	DI			CI
	V3	R1	R5	
W <sub>1</sub>	0	0	0	0
W <sub>CK</sub>	0	0	0	0

## 2.3 不同环境下皱叶材料叶片差异元素分析

利用 ICP-OES 技术对不同地区的皱叶混池和正常叶混池的 31 种元素进行差异分析,结果表明,两个混池的 31 种元素中,并未找到候选致病元素。砷等 18 种元素因含量较低无法检出,而余下的 13 种元素中钠的 T<sub>1</sub>/T<sub>0</sub> 值最大为 1.65,其次是硼和磷,T<sub>1</sub>/T<sub>0</sub> 值分别为 1.27 和 1.26,T<sub>1</sub>/T<sub>0</sub> 值最小的元素为铝和锶,均为 0.57,能引起大豆皱叶的锰元素在皱叶混池中含量为 63 mg·kg<sup>-1</sup>,而在正常叶中的含量为 102 mg·kg<sup>-1</sup>(表3)。前期研究推测,和正常土壤相比,导致南方大豆皱叶症的土壤中可能为某种成分过量<sup>[17]</sup>,本研究说明南方大豆皱叶症并非锰毒以及铝、锶、钡等 T<sub>1</sub>/T<sub>0</sub> 比值小于 1 的元素所致,另外 18 种无法检出的元素依然无法排除。

表3 正常叶混池和皱叶混池元素差异分析

Table 3 Element difference analysis on normal leaves pool and crinkle leaves pool

元素 Element	T <sub>0</sub> /(mg·kg <sup>-1</sup> )	T <sub>1</sub> /(mg·kg <sup>-1</sup> )	T <sub>1</sub> /T <sub>0</sub>
铝 Aluminium	23	13	0.57
砷 Arsenic	N. D. (<5)	N. D. (<5)	-
硼 Boron	41	52	1.27
钡 Barium	9	6	0.67
铋 Bismuth	N. D. (<5)	N. D. (<5)	-
钙 Calcium	9862	10007	1.01
镉 Cadmium	N. D. (<5)	N. D. (<5)	-
钴 Cobalt	N. D. (<5)	N. D. (<5)	-
铜 Copper	N. D. (<10)	N. D. (<10)	-
铬 Chromium	N. D. (<5)	N. D. (<5)	-
钾 Potassium	15513	18172	1.17
锂 Lithium	N. D. (<5)	N. D. (<5)	-
镁 Magnesium	3473	3142	0.90
锰 Manganese	102	63	0.62
钠 Sodium	20	33	1.65
镍 Nickel	N. D. (<5)	N. D. (<5)	-
铅 Lead	N. D. (<20)	N. D. (<20)	-

表 3(续)

元素 Element	$T_0/(mg \cdot kg^{-1})$	$T_1/(mg \cdot kg^{-1})$	$T_1/T_0$
硒 Selenium	N. D. (<20)	N. D. (<20)	-
锶 Strontium	14	8	0.57
钒 Vanadium	N. D. (<5)	N. D. (<5)	-
锌 Zinc	40	32	0.80
铁 Iron	116	98	0.84
钼 Molybdenum	N. D. (<10)	N. D. (<10)	-
锑 Antimony	N. D. (<10)	N. D. (<10)	-
硅 Silicon	314	290	0.92
钨 Tungsten	N. D. (<10)	N. D. (<10)	-
锡 Tin	N. D. (<5)	N. D. (<5)	-
钛 Titanium	N. D. (<5)	N. D. (<5)	-
铼 Rhenium	N. D. (<5)	N. D. (<5)	-
钯 Palladium	N. D. (<5)	N. D. (<5)	-
磷 Phosphorus	2704	3317	1.23

#### 2.4 灰烬、叶浆和土壤浸泡液对皱叶材料的影响

无论是皱叶的灰烬、叶浆还是土壤浸泡液处理正常土壤中的 GY\_C, 均不能导致其发生皱叶(表 4), 说明灰烬、叶浆、土壤浸泡液中不存在导致大豆皱叶的因子, 也可能因子失活或者浓度很低。

#### 2.5 土壤混合对皱叶材料皱叶症的影响

将已发生皱叶的 V2 期的 GY\_C 移栽至按不同

比例混合的土壤中, 结果表明基质和皱叶环境土比例为 8:1( $S_1$ )和 3:1( $S_2$ )的土壤中, GY\_C 后期长出的新叶不发生皱缩, 而基质和皱叶环境土比例为 1:3( $S_3$ )和 1:8( $S_4$ )的土壤中 GY\_C 后期长出的叶片依然表现为皱叶(表 5 和图 1), 说明土壤中能导致大豆皱叶的因子数量对皱叶有影响, 因子数量越多对大豆皱叶影响越大。

表 4 灰烬、叶浆、土壤浸泡液处理 GY\_C 的 DI 和 CI

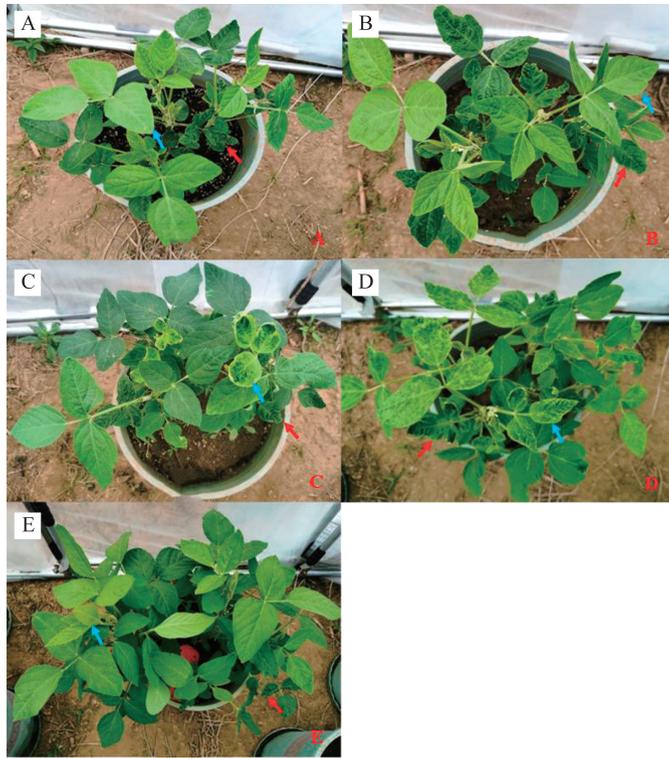
Table 4 The DI and CI value of ash, leaf pulp and soil soaking solution treatment on GY\_C

处理 Treatment	DI			CI
	V3	R1	R5	
A <sub>1</sub>	0	0	0	0
A <sub>2</sub>	0	0	0	0
A <sub>3</sub>	0	0	0	0
Y <sub>1</sub>	0	0	0	0
Y <sub>CK</sub>	0	0	0	0
W <sub>1</sub>	0	0	0	0
W <sub>CK</sub>	0	0	0	0

表 5 不同混合比例土壤移栽 GY\_C 的 DI 和 CI

Table 5 The DI and CI value of GY\_C post-transplant with different mixing ratio soil

处理 Treatment	DI			CI
	V3	R1	R5	
S <sub>1</sub>	52.78 ± 6.36	0	0	17.59 ± 2.12
S <sub>2</sub>	59.72 ± 6.36	0	0	19.90 ± 2.12
S <sub>3</sub>	63.89 ± 4.81	77.78 ± 4.81	72.22 ± 8.67	71.30 ± 5.26
S <sub>4</sub>	59.72 ± 6.36	61.11 ± 4.81	62.50 ± 11.02	61.11 ± 8.22
S <sub>5</sub>	0	0	0	0



注:A~E分别为 $S_1$ ~ $S_5$ 处理对移栽后GY\_C皱叶的影响。红色箭头表示育苗时携带的皱叶,蓝色箭头表示新长出的叶为皱叶。

Note: A-E indicate the effect of  $S_1$ - $S_5$  on the crinkle leaf disease of posttransplant GY\_C respectively. The red arrow means that the wrinkled leaves carried by the seedlings cannot be restored to normal leaves, and the blue arrow means that the newly grown leaves are wrinkled leaves.

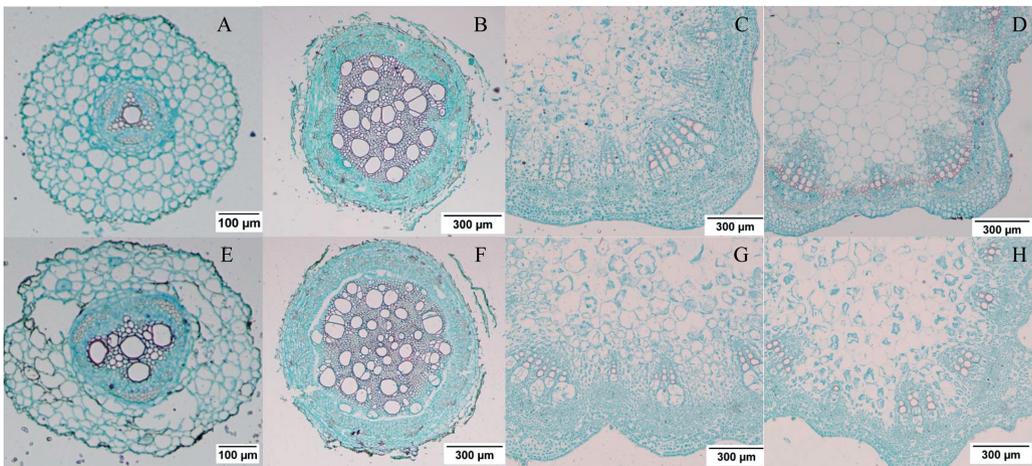
图1 不同混合比例的土壤对移栽后的GY\_C皱叶症的影响

Fig. 1 Effects of soil with different mixing ratio on the crinkle leaf disease of post-transplant GY\_C

## 2.6 皱叶材料根、茎及叶柄部形态观察

对皱叶环境和正常叶环境下R1期GY\_C的根茎叶进行横切解剖观察的结果如图2所示,正常环

境和皱叶环境中的GY\_C的根、茎及叶柄中均未见显著的虫害痕迹(图2)。



注:A. GY\_C在正常环境下的根尖横切图; B. GY\_C在正常环境下的侧根横切图; C. GY\_C在正常环境下的茎横切图; D. GY\_C在正常环境下的叶柄横切图; E. GY\_C在皱叶环境下根尖的横切图; F. GY\_C在皱叶环境下侧根横切图; G. GY\_C在皱叶环境下的茎横切图; H. GY\_C在皱叶环境下的叶柄横切图。

Note: A. Root tip cross cut of GY\_C in normal soil; B. Lateral root cross cut of GY\_C in normal soil; C. Stem cross cut of GY\_C in normal soil; D. Petiole cross cut of GY\_C in normal soil; E. Root tip cross cut of GY\_C in crinkle leaf environmental soil; F. Lateral root cross cut of GY\_C in crinkle leaf environmental soil; G. Stem cross cut of GY\_C in crinkle leaf environmental soil; H. Petiole cross cut of GY\_C in crinkle leaf environmental soil.

图2 GY\_C在正常土壤和皱叶土壤中的根、茎和叶柄的横切图

Fig. 2 Cross cut of roots, stems and petioles of GY\_C in normal and crinkle leaf environmental soil

## 2.7 不同温度处理对皱叶症的影响

无论是把皱叶环境土壤放置  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  下处理还是进行高温处理之后种植皱叶材料 GY\_C, 其叶片

均不发生皱叶,且当土壤在  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  下处理 10 d 后 GY\_C 已不能表现皱叶(表 6),说明土壤中能影响大豆皱叶的因子受土壤温度影响较大。

表 6 土壤不同温度处理下 GY\_C 皱叶症的 DI 和 CI

Table 6 The DI and CI value of crinkle leaf disease of GY\_C on soil treated with different temperatures

处理 Treatment	DI			CI
	V3	R1	R5	
T <sub>0</sub>	33.33 ± 3.61	60.42 ± 7.22	58.33 ± 3.61	50.69 ± 4.81
T <sub>1</sub>	0	0	0	0
T <sub>2</sub>	0	0	0	0
T <sub>3</sub>	0	0	0	0
T <sub>4</sub>	0	0	0	0
T <sub>5</sub>	0	0	0	0

## 2.8 复种土壤对皱叶材料皱叶症的影响

如表 7 所示, S<sub>1</sub> 和 S<sub>2</sub> 的土壤在第一次复种时 GY\_C 叶片表现正常,而复种第二次和第三次后 GY\_C

叶片开始皱缩,且复种第三次时 S<sub>1</sub> 和 S<sub>2</sub> 综合皱叶指数均显著高于复种第二次,推测导致大豆皱叶的因子可在土壤中增殖。

表 7 复种土壤对 GY\_C 皱叶症的影响

Table 7 Effects of multiple cropping soil on crinkle leaf disease of GY\_C

土壤处理 Soil treatment	复种第一次			
	DI			CI
	V3	R1	R5	
S <sub>1</sub>	0	0	0	0 c
S <sub>2</sub>	0	0	0	0 c
S <sub>3</sub>	6.25 ± 1.83	43.75 ± 12.50	50.00 ± 6.25	33.33 ± 9.55 b
S <sub>4</sub>	31.25 ± 6.25	52.08 ± 7.22	52.08 ± 7.22	45.14 ± 6.70 a
S <sub>5</sub>	0	0	0	0
土壤处理 Soil treatment	复种第二次			
	DI			CI
	V3	R1	R5	
S <sub>1</sub>	10.42 ± 9.55	43.75 ± 6.25	41.67 ± 14.43	31.94 ± 4.34 b
S <sub>2</sub>	0.00	35.42 ± 7.22	27.08 ± 25.26	20.83 ± 10.42 b
S <sub>3</sub>	39.58 ± 9.55	50.00 ± 0.00	52.08 ± 9.55	47.22 ± 3.18 a
S <sub>4</sub>	39.58 ± 9.55	45.83 ± 9.55	47.92 ± 3.61	44.44 ± 6.70 a
S <sub>5</sub>	0	0	0	0
土壤处理 Soil treatment	复种第三次			
	DI			CI
	V3	R1	R5	
S <sub>1</sub>	29.17 ± 12.43	68.75 ± 6.25	87.50 ± 12.50	61.81 ± 4.34 a
S <sub>2</sub>	20.83 ± 7.22	62.50 ± 0.00	52.08 ± 15.73	45.14 ± 7.32 a
S <sub>3</sub>	10.42 ± 9.55	56.25 ± 6.25	64.58 ± 9.55	43.75 ± 6.25 a
S <sub>4</sub>	35.42 ± 3.61	68.75 ± 6.25	79.17 ± 21.95	61.11 ± 7.89 a
S <sub>5</sub>	0	0	0	0

注:不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

在非生物胁迫方面,除草剂<sup>[24]</sup>、锰毒<sup>[5-7]</sup>、营养混乱<sup>[8]</sup>等均可导致大豆皱叶,前期本团队根据田间使用的除草剂的种类设计相应的试验,证明南方大豆皱叶症并非除草剂所致<sup>[17]</sup>。在本研究中,用南方皱叶环境土壤同基质混合,发现皱叶材料发生皱叶与否和南方皱叶土壤所占比例有关,皱叶环境土壤所占比例较低时,移栽的皱叶材料新叶不发生皱叶,所以推断南方土壤中的某种因子的浓度影响大豆的皱叶,浓度达到一定程度时才使皱叶敏感材料发生皱叶。由于目前未发现同一皱叶敏感大豆材料同时表现极皱叶和不皱叶的地块,为了减小土壤背景值的影响,尽量减少假阳性元素数量,因而分别取了3个地点的皱叶植株叶样和3个地点的正常植株叶样,将不同点皱叶植株叶样混合得到皱叶混池,将不同地点正常叶混合得到正常叶混池。ICP-OES分析结果显示皱叶混池的锰元素含量低于正常叶混池,说明南方大豆皱叶症也非锰毒所致,且可测出的其他12种元素中,皱叶混池含量最高的为钠,是正常叶含量的1.65倍,但两者含量均在正常的范围内<sup>[22-23]</sup>,且在盐碱地中未见有关大豆类似皱叶的报道,推测钠元素也非导致南方大豆皱叶的主要因子。其他元素的 $T_1/T_0$ 值均未超过1.5倍以上。说明能检测出的13中元素中无可导致南方大豆皱叶的元素,而另外18中未检测出的元素依然无法排除。同时按照Hopkins等<sup>[8]</sup>所报道的营养液处理皱叶材料GY\_C, GY\_C也未发生皱叶,推测南方大豆皱叶症也并非土壤营养混乱所致。本研究非生物试验内容并不能排除非生物胁迫所致南方大豆皱叶的可能,而是在前人研究的基础上进一步探索有可能导致大豆皱叶的非生物因子。

在生物胁迫方面,本团队已用多种途径检测发现南方大豆皱叶症并非病毒病所致<sup>[17]</sup>,在本研究中通过不同温度处理皱叶环境土壤发现,土壤中导致南方大豆皱叶症的因子对温度较敏感,低温和高温均可使大豆皱叶症致病因子“失活”,土壤复种试验表明这种致病因子在土壤中能够“增加”,且通过光学显微镜观察,在发生皱叶的GY\_C材料的根、茎、叶柄中并未发现虫害的痕迹,推测皱叶环境土壤中的致病因子可能同某种微生物有关。土壤中的很多微生物对植物生长有着重要的作用,如固氮菌群<sup>[24]</sup>、硝化菌群<sup>[25]</sup>、溶磷菌群<sup>[26]</sup>、放线菌群<sup>[27]</sup>等。一些有益微生物的特种株系可能对植物的生长产生不利影响,如土壤中的一些根瘤菌株可以和大豆互作导致大豆产生叶片黄化现象<sup>[28]</sup>。Rao等<sup>[29]</sup>发

现根瘤菌菌株IC3342可诱导木豆[*Cajanus cajan* (L) Millsp.]叶片卷曲,进一步研究发现,这种卷曲是由IC3342分泌细胞分裂素所致<sup>[13-14]</sup>。目前在大豆上尚未有根瘤可导致大豆皱叶相关的报道。南方土壤中大豆皱叶症的出现是单一微生物所致还是多种微生物所致未知,正常土壤和可导致南方大豆皱叶症土壤的微生物菌落间 $\beta$ 多样性如何可借助二代测序的扩增子(16S/18S/ITS)测序技术<sup>[30]</sup>及宏基因组测序技术<sup>[31]</sup>开展相关研究。

### 4 结论

可导致南方大豆皱叶症的因子在南方土壤中的垂直分布上具有一定差异,测定的31种元素中,未找到候选致病元素,土层在营养液、灰烬、叶浆、土壤浸泡液处理下均不能导致皱叶症敏感材料叶片皱缩,南方土壤中导致大豆皱叶症的因子含量越多,大豆皱叶越严重,且导致大豆皱叶症的因子受温度的影响,高温和低温均影响其致病能力,正常的基质可被导致南方大豆皱叶症的土壤“感染”,获得可导致皱叶敏感材料出现皱叶症的能力。结合土壤生物因素和非生物因素对南方大豆皱叶症影响分析,推测南方土壤中的微生物因素可能是导致大豆皱叶的关键因子。

### 参考文献

- [1] 陈文杰, 陈渊, 韦清源, 等. 南方大豆皱叶发生时叶片形态变化及其对产量性状的影响[J]. 南方农业学报, 2022, 53(2): 460-468. (CHEN W J, CHEN Y, WEI Q Y, et al. Changes of leaf morphology during the occurrence of wrinkled leaves in southern soybean and its effects on yield traits [J]. Journal of Southern Agriculture, 2022, 53(2): 460-468.)
- [2] KELLEY K B, WAX L M, HAGER A G, et al. Soybean response to plant growth regulator herbicides is affected by other postemergence herbicides [J]. Weed Science, 2005, 53(1): 101-112.
- [3] ROBINSON A P, SIMPSON D M, JOHNSON W G. Response of glyphosate-tolerant soybean yield components to dicamba exposure [J]. Weed Science, 2013, 61(4): 526-536.
- [4] DA SILVA D R O, DALLA NORA DA SILVA E, DE AGUIAR A C M, et al. Drift of 2, 4-D and dicamba applied to soybean at vegetative and reproductive growth stage [J]. Ciência Rural, 2018, 48(8). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180179>
- [5] REDDY M R, RONAGHI A, BRYANT J A. Differential responses of soybean genotypes to excess manganese in an acid soil [J]. Plant and Soil, 1991, 134(2): 221-226.
- [6] LAVRES J J, REIS A R, ROSSI M L, et al. Changes in the ultrastructure of soybean cultivars in response to manganese supply in solution culture [J]. Scientia Agricola, 2010, 67(3): 287-294.
- [7] SANTOS E F, KONDO SANTINI J M, PAIXÃO A P, et al.

- Physiological highlights of manganese toxicity symptoms in soybean plants; Mn toxicity responses [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2017, 113: 6-19.
- [8] HOPKINS E W. Leaf-wrinkle, a nutritional disorder of soybean [J]. *Plant Physiology*, 1933, 8(2): 333-336.
- [9] SAMRETWANICH K, KITTIPAKORN K, CHEMSOMBAT P, et al. Complete nucleotide sequence and genome organization of soybean crinkle leaf virus [J]. *Journal of Phytopathology*, 2001, 149(6): 333-336.
- [10] CAMPOS R E, BEJERMAN N, NOME C, et al. Bean yellow mosaic virus in soybean from Argentina [J]. *Journal of Phytopathology*, 2014, 162(5): 322-325.
- [11] 王大刚, 李凯, 智海剑. 大豆抗大豆花叶病毒病基因研究进展[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(16): 3040-3059. (WANG D G, LI K, ZHI H J. Progresses of resistance on soybean mosaic virus in soybean[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(16): 3040-3059.)
- [12] YANG X, NIU L, ZHANG W, et al. Increased multiple virus resistance in transgenic soybean overexpressing the double-strand RNA-specific ribonuclease gene PAC1[J]. *Transgenic Research*, 2019, 28(1): 129-140.
- [13] WANG Y, CHEN W, ZHANG Y, et al. Identification of two duplicated loci controlling a disease-like rugose leaf phenotype in soybean[J]. *Crop Science*, 2016, 56(4): 1611-1618.
- [14] 郑翠明, 常汝镇, 邱丽娟. 大豆花叶病毒病研究进展[J]. *植物病理学报*, 2000, 30(2): 97. (ZHENG C M, CHANG R Z, QIU L J. Progress on the disease of soybean mosaic virus [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2000, 30(2): 97.)
- [15] UPADHYAYA N M, PARKER C W, LETHAM D S, et al. Evidence for cytokinin involvement in *Rhizobium* (IC3342)-induced leaf curl syndrome of pigeonpea (*Cajanus cajan* millsp.) [J]. *Plant Physiology*, 1991, 95(4): 1019-1025.
- [16] YONG J W H, LETHAM D S, WONG S C, et al. *Rhizobium*-induced elevation in xylem cytokinin delivery in pigeonpea induces changes in shoot development and leaf physiology[J]. *Functional Plant Biology: FPB*, 2014, 41(12): 1323-1335.
- [17] 陈文杰, 梁江, 宁德娇, 等. 南方大豆皱叶症诱因分析研究[J]. *大豆科学*, 2022, 41(3): 300-307. (CHEN W J, LIANG J, NING D J, et al. Study on inducement of soybean crinkle leaf in southern China [J]. *Soybean Science*, 2022, 41(3): 300-307.)
- [18] 陈文杰, 陈渊, 韦清源, 等. 一种大豆皱叶症发生特性及材料症级鉴定[J]. *大豆科学*, 2020, 39(3): 431-441. (CHEN W J, CHEN Y, WEI Q Y, et al. Occurrence characteristics and identification of resistant materials for soybean crinkle leaf disease [J]. *Soybean Science*, 2020, 39(3): 431-441.)
- [19] 郑翌, 林毅侃, 李清清. 微波消解-电感耦合等离子体原子发射光谱法测定稻米中钼元素含量[J]. *理化检验(化学分册)*, 2021, 57(4): 318-321. (ZHENG Y, LIN Y K, LI Q Q. ICP-AES determination of molybdenum in rice with microwave digestion [J]. *Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis)*, 2021, 57(4): 318-321.)
- [20] 尹晓明, 陈昕妮. ICP-OES 测定绿叶蔬菜重金属的酸消解方法比较[J]. *中国农学通报*, 2017, 33(24): 80-84. (YI X M, CHEN X N. Comparison of different acid digestion methods for leafy vegetables in the determination of heavy metals by ICP-OES [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2017, 33(24): 80-84.)
- [21] 杨虎彪, 李晓霞, 罗丽娟. 植物石蜡制片中透明和脱蜡技术的改良[J]. *植物学报*, 2009, 44(2): 230-235. (YANG H B, LI X X, LUO L J. An improved clearing and de-waxing method for plant paraffin sectioning [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2009, 44(2): 230-235.)
- [22] 王冬群, 成美玲, 王立, 等. 菜用大豆对铜镁钠等元素吸收利用特点分析[J]. *浙江农业科学*, 2021, 62(12): 2427-2429, 2434. (WANG D Q, CHENG M L, WANG L, et al. Analysis on absorption and utilization characteristics of copper, magnesium and sodium by vegetable soybean [J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2021, 62(12): 2427-2429, 2434.)
- [23] 夏阳, 林杉, 张福锁, 等. 淋洗对盐胁迫下大豆生长和矿质营养基因型差异的研究[J]. *土壤学报*, 2003, 40(1): 155-159. (XIA Y, LIN S, ZHANG F S, et al. Effect of foliar leaching on growth and mineral nutrient contents of soybean under NaCl stress [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2003, 40(1): 155-159.)
- [24] 孙棋棋, 郑永美, 于天一, 等. 施氮对不同结瘤特性花生土壤固氮菌多样性和群落组成的影响[J]. *作物学报*, 2022, 48(10): 2575-2587. (SUN Q Q, ZHENG Y M, YU T Y, et al. Responses of soil diazotrophic diversity and community composition of nodulating and non-nodulating peanuts (*Arachis hypogaea* L.) to nitrogen fertilization [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2022, 48(10): 2575-2587.)
- [25] 石丽红, 孙梅, 唐海明, 等. 不同施肥模式下稻田土壤氮组分及微生物多样性研究进展[J]. *中国农学通报*, 2022, 38(27): 106-110. (SHI L H, SUN M, TANG H M, et al. Soil nitrogen fractions and microbial diversity in paddy field under different fertilization modes: A review [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2022, 38(27): 106-110.)
- [26] 王志刚, 徐伟慧, 莫继先, 等. 东北黑土区大豆根际促生菌群落组成研究[J]. *中国生态农业学报*, 2012, 20(5): 592-596. (WANG Z G, XU W H, MO J X, et al. Community structure of soybean plant growth-promoting rhizobacteria in the black soil region of Northeast China [J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2012, 20(5): 592-596.)
- [27] 李虹, 高华军, 吕洪坤, 等. 有机肥和品种互作对土壤微生物群落及雪茄烟叶生长和产量的影响[J]. *南方农业学报*, 2022, 53(6): 1552-1559. (LI H, GAO H J, LYU H K, et al. Interactions of organic fertilizers and varieties on soil microbial communities and cigar tobacco leaf growth and yield [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2022, 53(6): 1552-1559.)
- [28] ERDMAN L W, JOHNSON H W, CLARK F E A. A bacterial induced chlorosis in the Lee soybean [J]. *Plant Disease Reporter*, 1956, 40: 646.
- [29] RAO J K, DART P, KIRAN M. *Rhizobium*-induced leaf roll in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1984, 16: 89-91.
- [30] GOHL D M, VANGAY P, GARBE J, et al. Systematic improvement of amplicon marker gene methods for increased accuracy in microbiome studies [J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34: 942-949.
- [31] NALBANTOGLU U, CAKAR A, DOGAN H, et al. Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains [J]. *Food Microbiology*, 2014, 41: 42-51.