

河北地区大豆花叶病毒株系的组成与分布

杨永庆^{1,2}, 侯文焕¹, 边全乐³, 闫龙¹, 张梅申¹, 孟小莽⁴, 刘丽娟¹, 林静¹, 智海剑², 张孟臣¹

(1. 河北省农林科学院 粮油作物研究所/国家大豆改良中心石家庄分中心/农业部黄淮海大豆生物学与遗传育种重点实验室/河北省作物遗传育种实验室, 河北 石家庄 050035; 2. 南京农业大学 大豆研究所/作物遗传与种质创新国家重点实验室/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室/国家大豆改良中心, 江苏 南京 210095; 3. 中国农学会, 北京 100125; 4. 石家庄市农业局, 河北 石家庄 050051)

摘要:2012年对河北大豆产区13个县(区)市28个采样点采集的273份大豆花叶病毒(SMV)病样进行了生物纯化,最终共获得67个分离物,经ELISA和RT-PCR检测确认其中56个为SMV分离物。利用全国统一的SMV鉴别体系将这些分离物归为9个株系。与以往的研究结果相比,河北地区SMV株系组成和分布发生一定的变化,其中SC7和SC11仍为流行株系;SC8所占比例有所下降;未检测到SC12、SC13和SC15;发现SC1、SC3和SC18共3个新株系。今后应对SC3株系的发展动态予以密切关注。

关键词:河北;大豆花叶病毒;分离物;株系;抗病育种

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2014)01-0087-04

Composition and Distribution of SMV Strains in Hebei

YANG Yong-qing^{1,2}, HOU Wen-huan¹, BIAN Quan-le³, YAN Long¹, ZHANG Mei-shen¹, MENG Xiao-mang⁴, LIU Li-juan¹, LIN Jing¹, ZHI Hai-jian², ZHANG Meng-chen¹

(1. Institute of Cereal and Oil Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences/Shijiazhuang Branch of National Soybean Improvement Center/Huang-Huai-Hai Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Soybean, Ministry of Agriculture/Hebei Laboratory of Crop Genetics and Breeding, Shijiazhuang 050035, China; 2. Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University/National Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Soybean, Ministry of Agriculture/National Center for Soybean Improvement, Nanjing 210095, China; 3. Chinese Association of Agricultural Science Societies, Beijing 100125, China; 4. Agricultural Bureau of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: A total of 273 virus samples of SMV were collected from 28 locations distributed in 13 counties of Hebei province in 2012. The isolates were biologically purified from collected samples and detected by ELISA and RT-PCR. Then, SMV isolates were classified by the unified national identification system. Finally, 67 virus isolates were obtained and 56 virus isolates were identified to be SMV isolates by ELISA and RT-PCR. Base on the differential host responses to these isolates, these SMV isolates were classified into 9 strains. Compared with previous studies, composition and distribution of SMV strains in Hebei had showed some changes, however SC7 and SC11 were still popular strain; the percentage of SC8 strain decreased; SC12, SC13 and SC15 were undetected; three new strains SC1, SC3 and SC18 were first discovered in Hebei, and the development of SC3 strains should be given more attention.

Key words: Hebei; Soybean mosaic virus (SMV); Isolates; Strain; Resistance breeding

大豆花叶病毒(soybean mosaic virus, SMV)病是我国的主要大豆病毒病害。目前培育抗病品种是防治大豆花叶病毒病最经济、安全、有效的途径。病毒变异是新病毒产生、寄主范围变化和致病性变异的重要原因,它会导致流行株系的变化以及品种抗性的丧失,因此明确大豆花叶病毒的组成、主要流行株系和地理分布有助于确定各地抗病育种应针对的株系,对抗病育种具有重要的指导意义。日本学者利用4个鉴别寄主将本土的102份SMV分离物划分为5个株系,即A~E^[1]。美国学者利用8个鉴别寄主,将98份SMV分离物划分为7个株系,

命名为G1~G7^[2],在此基础上,从美国本土和韩国陆续划分出新株系G3A、G5H、G7A、C14、G5HD和G7H^[3-7],国内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^[8-11]。

河北地区属于黄海北部大豆产区,是我国夏大豆主产区之一,大豆花叶病毒病是该地区主要病毒性病害。战勇等^[12]对黄淮与长江地区流行株系的鉴定结果表明S3和SC7为黄淮流行株系,但其中没有来源于河北省的病样。郭东全等^[9]对黄淮北部各省SMV株系组成和分布的研究表明,来源于河

收稿日期:2013-09-02

基金项目:国家高技术研究发展计划“863计划”(2012AA101106);现代农业产业技术体系(CARS-004-PS06);国家“十一五”科技支撑计划(2011BAD35B06-3-6);河北省科技支撑计划(11220107D);国家自然科学基金(31171574)。

第一作者简介:杨永庆(1985-),男,博士,主要从事大豆抗病育种研究。E-mail:yyq287346@163.com。

通讯作者:张孟臣(1956-),男,研究员,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:mengchenzhang@hotmail.com。

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

北地区3市5个采集点的27个分离物中以SC7、SC8和SC11株系群为主,分别占总数的14.3%、14.3%和35.7%,未发现SC3株系群,但由于采集范围较窄,病样较少,其结果可能难以客观反映河北省SMV流行情况。随着全国抗病育种工作体系的建立,河北省的抗病育种主要是针对SC3和SC7,相应的抗性品种在河北省已经大面积推广。但随着时间的推移,病原物与大豆寄主互作过程中可能会发生变异,从而导致新株系的出现,并有可能成为流行株系。因此,在郭东全等^[9]研究的基础上,全面采集了河北地区(包括北京)各主要大豆产区大豆SMV病样,系统地研究了河北省SMV株系的组成、分布及动态变化,旨在为河北省大豆抗病育种工作提供必要指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病样来源 于2012年夏大豆发病盛期,在河北省的石家庄、沧州、邯郸、保定、廊坊以及北京等地开展病毒样品采集,采集地主要偏重于河北省大豆种植面积相对较大的地区,包括北京在内的共计13个县(区)市的28个采样点,共计采集到273份病样。

1.1.2 鉴别寄主 株系鉴定采用全国统一的鉴别寄主,分别是:南农1138-2、诱变30、8101、铁丰25、Davis、Buffalo、早熟18、广吉、齐黄1号和科丰1号,病毒纯化所用的材料是已报道过的菜豆品种Top-Crop^[2]。鉴别寄主材料和菜豆品种均由南京农业大学智海剑教授提供。

1.2 方法

1.2.1 病毒的分离纯化及鉴定 将273份病样在防虫网室经摩擦接种,在大豆感病品种南农1138-2上繁殖、鉴定,将呈现典型花叶症状的病样在菜豆Top-Crop上进行离体培养,形成单个枯斑后,将枯斑剪下,回接到南农1138-2上,将呈现典型病毒症状的叶片采集保存在-80℃冰箱中备用。

采用双抗体夹心酶联免疫吸附分析法(DAS-ELISA)和反转录RCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)检测法对各个分离物进行鉴定。阴性对照为未感染的南农1138-2,阳性对照为黄淮流行株系SC7。检测SMV所用的ELISA试剂盒购自上海逸峰生物科技有限公司,根据说明书进行操作。RT-PCR检测所需要的引物根据NCBI上已公布的SMV基因组序列,在保守区域设计特异引物,为CP-For-

ward: CTGGGACAGGAGCAAAGA; CP-Reverse: TA-AAGCGACCCGAAATGA。将最终判定为阳性的病毒分离物接种于株系鉴别寄主,进行株系鉴定。

1.2.2 接种鉴定 每个待测病毒分离物均接种10个大豆品种,每个品种接种数量保证15株以上,采用摩擦接种的方式,具体方法如下:将鉴别寄主材料播种于防虫温室内,当第一对真叶完全展开时,取南农1138-2上症状典型的叶片加入磷酸缓冲液(pH7.3~7.4)和少许金刚沙在研钵中研成匀浆,然后用毛刷将匀浆涂到第一对展开的真叶上,接种后用自来水冲洗。当第一对复叶展开时,在复叶上重复接种1次。在7d后开始调查发病情况,每3d调查1次,直至症状稳定(约接种后30d)。系统花叶记为“M”;叶脉坏死、顶枯或枯斑均看作坏死,记为“N”;花叶和坏死都有的记为MN,无反应症状记为“-”。鉴于坏死在生产具有较大的影响,本研究将系统花叶和上位叶的系统性坏死归为感病^[8-10]。

2 结果与分析

2.1 SMV分离物的获得

经初步接种繁殖鉴定,273份病样中有89个病样能够侵染南农1138-2形成典型的花叶等病毒病症状。89份病样在寄主Top-Crop上离体培养后,形成枯斑,枯斑回接到南农1138-2上,共获得67个分离物,对获得的67个分离物进行ELISA血清学检测和RT-PCR检测,分别检测出39和56个分离物呈阳性,其中ELISA检测出的39个样品RT-PCR检测结果均呈阳性。另外,对其中只有一种方法呈阳性的样品进行测序,并将序列提交NCBI比对后,同源性均与SMV最高,结果显示这些分离物均为SMV,最终确定阳性SMV分离物56个。

2.2 SMV分离物的鉴别寄主鉴定

统计56个分离物在10个鉴别寄主上的症状反应,根据症状反应可将其分为9个株系群,将每个株系群的抗感性与已报道的株系^[8-12]进行比较,其中1~8号株系群分别与SC7、SC11、SC6、SC3、SC8、SC18、SC1和SC4一致(表1)。9号株系群与以往报道株系都不同,但由于其分布较少,暂时没有在田间大面积流行,因此本研究中仅将其作为一个待定株系以备后续观察。从数量上分析,SC7和SC11分布最多,为主要流行株系群,SC3、SC6、SC8和SC18分布中等,为优势株系群,有可能发展成为流行株系群。

表 1 河北地区(含北京)56 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 56 SMV isolates from Hebei (including Beijing) of China

组别 Group	分离 物数目 No. of isolates	南农		8101	铁丰 25 Tiefeng 25	Davis	Buffalo	早熟 18 Zaoshu 18	Kwanggyo	齐黄	科丰	株系 Strains
		1138-2 Nannong 1138-2	诱变 30 Youbian 30							1 号 Qihuang 1	1 号 Kefeng 1	
1	11	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	SC7
2	11	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	SC11
3	7	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	SC6
4	6	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	SC3
5	6	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	SC8
6	5	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	SC18
7	4	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	SC1
8	4	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	SC4
9	2	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	待定 Undetermined

R 表示抗病;S 表示感病。R:Resistant; S:Susceptible.

2.3 河北省 SMV 动态分析

郭东全等^[9]研究发现,河北地区(含北京市)2002~2003 年存在 8 个 SMV 病毒株系,其中主要流行株系为 SC7、SC8 和 SC11,所占比例分别为 14.29%、14.29% 和 39.29%,流行株系均为中强毒株系(表 2)。本研究从河北地区共分离得到 2012 年的病毒分离物 56 个,分属 8 个株系。与以往株系组成相比,未发现侵染性相对较强的株系 SC12、

SC13 和 SC15,但出现了侵染性较弱的株系 SC1、SC3 和 SC18,值得注意的是 SC3 为黄淮海流行株系,以往在河北并未发现;与以往株系分布相比,SC7 和 SC11 仍为主要流行株系,所占比例均为 19.64%,而 SC8 所占比例下降为 10.71%,但分布比例仍然较高,有可能重新成为流行株系。此外,SC3 和 SC6 在本次研究中所占的比例也相对较高,应警惕其成为流行株系的可能。

表 2 河北地区(含北京)SMV 分离物的分布与变化

Table 2 Distribution and variation of SMV isolates in Hebei (including Beijing) of China

株系群 Strains group	2002~2003 ^[9]		2012	
	合计 Total	比率 Ratio/%	合计 Total	比率 Ratio/%
SC1	0	0	4	7.14
SC3	0	0	6	10.71
SC4	3	10.71	4	7.14
SC6	2	7.14	7	12.50
SC7	4	14.29	11	19.64
SC8	4	14.29	6	10.71
SC11	11	39.29	11	19.64
SC12	3	10.71	0	0
SC13	3	10.71	0	0
SC15	1	3.57	0	0
SC18	0	0	5	8.93
待定 Undetermined	1	3.57	2	3.57
合计 Total	28	100.00	56	100.00

3 讨论

3.1 两种病毒检测方法的比较

ELISA 血清学检测是经典检测病毒的方法,其

优点在于操作相对简便,适用于大批量操作,成本相对低廉。但马铃薯 Y 病毒属成员之间序列同源性很高,并且利用病样与健康叶片中病毒的吸光度(OD 值)比值来界定是否含有该类型病毒,其灵敏

度和特异性都相对较弱。RT-PCR 检测克服了以上两个缺点,其检测灵敏度和特异性是 ELISA 的上百倍。本研究利用两种方法对获得的 67 个分离物进行检测,对于两种方法结果不一致的样品进行重复和测序验证。结果显示,ELISA 和 RT-PCR 分别检测出 39 和 56 个 SMV 阳性分离物。其中 ELISA 检测出的 39 个阳性分离物利用 RT-PCR 检测也均呈阳性,表明检出准确性很高,达到 100%。但试验中有 17 个阳性分离物未检测出,表明 ELISA 检测方法有可能存在一定的假阴性。造成这种假阴性可能是由病毒分离物侵染性强弱不一,某些病毒分离物的蛋白含量在大豆叶片组织中积累不够,未达到 ELISA 检出浓度所致。

3.2 河北地区流行株系变化和抗病育种现状

河北地区隶属黄淮海夏大豆北部产区,本研究通过对河北地区 SMV 株系组成和分布研究发现,目前该地区以 SC7 和 SC11 株系为主。这与郭东全等^[9]报道 SC7 和 SC8 是本地区流行株系有所不同,这可能是由于河北省主栽品种的更替,新旧品种对 SMV 株系的抗病性不同,从而对田间的 SMV 株系选择压存在差异,导致了不同株系的消长。SC3 在以往研究中并未发现,在本研究中 SC3 占 10.71%,造成这种差异可能有两方面原因,一是 SC3 是河北地区本来存在的株系,由于之前研究中采样数量较少或采集点偏少而未能检测到;其次,种子带毒是 SMV 传播的主要方式之一,由于近年来地区间的种质资源交换频繁,在种质资源交换过程中将 SC3 株系引入了河北省。以往研究^[8-12]结果显示,尽管黄淮大豆产区 SMV 株系分布主要以 SC3 和 SC7 为主,但各省份之间 SMV 株系组成和分布也存在着少量偏差。目前河北地区抗病育种目标与黄淮海抗病育种目标一致,主要是针对 SC3 和 SC7 株系,这主要是考虑到生态区的一致性以及品种的推广范围。但针对河北省而言,在宏观抗病育种目标前提下,应兼顾本地 SMV 流行情况,在品种培育和推广过程中应给予充分考虑。

参考文献

- [1] Takahashi K, Tanaka T, Iida W, et al. Studies on virus disease and causal viruses of soybean in Japan[J]. Bulletin of the Tohoku National Agricultural Experiment Station, 1980, 62: 103-130.
- [2] Cho E K, Goodman R M. Strains of soybean mosaic virus; classification based on virulence in resistant soybean cultivars[J]. Phytopathology, 1979, 69: 467-470.
- [3] Cho E K, Choi S H, Cho W T. Newly recognized soybean mosaic virus mutants sources of resistance in soybeans[J]. Research Report, 1983, 25: 18-22.
- [4] Buzzell R I, Tu J C. Inheritance of soybean resistance to soybean mosaic virus[J]. Journal of Heredity, 1984, 75: 82.
- [5] Lim S M. Resistance to soybean mosaic virus in soybeans[J]. Phytopathology, 1985, 75: 199-201.
- [6] Kim J S, Lee E J. A new virulent strain of soybean mosaic virus infecting SMV resistant soybean cultivar, Deogyou[J]. Korean Journal of Plant Pathology, 1991, 7: 37-41.
- [7] 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.
- [8] 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.)
- [9] 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 soybean mosaic virus strains in middle and northern Huang Huai Region of China[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2005, 27(4): 64-68.)
- [10] 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.)
- [11] 李凯. 中国南方大豆花叶病毒株系的鉴定、抗性遗传和抗性基因的定位[D]. 南京: 南京农业大学, 2009. (Li K. Strain identification of soybean mosaic virus, inheritance and gene mapping of its resistance in soybean[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009.)
- [12] 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.)

[1] Takahashi K, Tanaka T, Iida W, et al. Studies on virus disease and