

几种豆科植物病毒病原鉴定*

张满良 魏宁生 (导师)

(西北农业大学植保系)

摘 要

陕西大豆上引致花叶的是大豆花叶病毒 (SMV)。根据病毒在东农64—3513大豆品种上的症状可认为是三个不同的新类型: 花叶类型SMV—M, 疱疹类型SMV—H, 顶枯类型SMV—T。关中地区引起菜豆、豇豆及扁豆花叶、皱缩等症状的是黄瓜花叶病毒 (CMV), 属豆科系统群。在豇豆上分离的黄瓜花叶病毒 (CMV) 除致死温度低 (73—75℃)、种子能带毒、不感染蚕豆外, 寄主范围及其反应、蚜虫传毒、免疫双扩散等结果同于菜豆上分离的黄瓜花叶病毒 (CMV)。

关键词 豆科植物病毒; 花叶类型SMV—M; 疱疹类型SMV—H; 顶枯类型SMV—T

大豆、菜豆、豇豆是重要的粮食和蔬菜作物, 其病毒病近年来有不断蔓延和发展的趋势。这在一些年份能够造成大幅度减产, 特别是关中地区病毒病非常流行的菜豆和豇豆常常导致严重的损失。

有关危害这些作物的病毒病在国外有较多的研究^[1,2]。国内从五十年代开始, 裘维蕃、周家炽、刘仪等^[3,4,5]先后报道了大豆花叶病毒的症状、传播及电镜观察。近年来有人鉴定了东北和南京地区的大豆花叶病毒^[2,3]。危害豇豆的病毒病除俞大綏^[6]在1939年报道的南京地区豇豆花叶病毒外, 包括菜豆在内的国内工作很少。

为了查清我省这些作物病毒病的毒原种类, 为以后的研究和防治提供依据, 我们于1979~81年进行了毒原鉴定。

一、材料和方法

1. 生物鉴定

鉴定的大豆毒原是从陕西省各地大豆上各种类型的病株 (或带毒种子) 得到的, 菜豆、豇豆及扁豆毒原主要是从关中地区蔬菜田中采得的。得到的毒原在尼龙纱防虫网室或无虫温室内经生物纯化后繁殖扩大。大豆毒原在东农64—3513品种上繁殖, 菜豆、豇

*在试验中曾得到西安市农科所郑贵彬同志, 农业部植检所张成良、张作芳、胡伟贞同志的帮助, 特此致谢。

本文于1985年11月5日收到。

豆、扁豆上的毒原在心叶烟、普通烟上繁殖。根据各个毒原在主要鉴别寄主上的致病力和引起的症状进行初步归类, 各类取代表毒原, 测定其在鉴别寄主上的反应、寄主范围、传染方式及稳定性。

汁液接种、抗性测定、蚜虫传毒同于常规试验。

种子带毒试验, 是在感病植株(或分上、中、下三个部位)上收种, 在温室或尼龙纱棚内播种、苗期观察记载, 计算发病率。在一些种子传毒试验中, 包括一些毒原鉴定, 为了防止污染, 瓦盆、营养土均在1.5—2个大气压的高压灭菌锅中进行1—2小时湿热灭菌。

2. 病毒的初提纯

大豆花叶病毒(SMV)的提纯参考Ross的方法, 黄瓜花叶病毒(CMV)的提纯参考Lot的方法^[12]。

3. CMV、SMV病毒粒体的电镜观察

取上述提纯的病毒溶液, 用铜网滴样, 后用1%、pH7.5的磷钨酸负染2—5分钟, 干燥后电镜观察。

4. 免疫双扩散试验

(1) 称取精琼脂粉(日本进口琼脂)1.2克, 在沸水浴中溶于100毫升硼酸缓冲液(pH8.6, 离子强度0.025)中, 并加入0.1%叠氮化钠, 配制成1.2%琼脂凝胶。

(2) 用吸管吸取适量的琼脂凝胶, 均匀铺在玻璃片上, 使凝胶层厚度达2毫米, 待凝固后放在样品孔排列图样上, 用金属打孔器挖孔(孔直径为4毫米, 各孔间距4毫米), 并剔除孔内琼脂凝胶。

(3) 将抗血清加入中间孔, 已知(对照)抗原和待检样品加入外围孔中, 将玻璃板放入带盖瓷盘, 5—7小时以后(或过夜)在具有黑色背景的口光灯下观察沉淀线出现的情况, 待沉淀线基本稳定后记载结果。

扩散试验中SMV、CMV抗血清系由农牧渔业部植物检疫实验所提供。CMV抗血清是由澳大利亚引进的标准毒原制备, SMV抗血清由东北SMV毒原制备。

二、试验结果

(一) 症状观察和产量损失

1. 大豆病毒病的症状: 有沿叶脉两侧出现泡状突起, 未突起部分颜色变淡(图版 I—1)。有的叶片皱缩, 叶面出现大小不等、形状不同的隆起(图版 I—2)。也有的表现花叶, 先形成明脉, 脉区失绿, 以后又消失, 继而出现斑驳和花叶症状。在一些品种上可出现叶脉变褐。

病株上的种子常产生斑纹。斑纹的有无与大豆品种种皮的颜色有很大的关系。种皮为深褐色或黑色(红滚豆、黑滚豆)的无斑纹; 种皮为绿色(绿水豆)的品种可形成黑褐色斑纹; 淡绿色种皮(绿赖豆)形成红褐色斑纹; 黄色种皮(东农64—3513)形成褐

色斑纹。斑纹的形状和在种皮上的位置也因品种而异。有的呈“八”字形分布在种脐一端，有的则呈放射状、片状、带状以及扇形状分布在种脐、种脊两侧（图版 I—4）。不同品种褐斑率不一样。

2.菜豆病毒病的症状

菜豆上的病毒病，是在叶子上出现镶嵌斑驳，叶子小时容易呈现畸形，其中也有许多斑驳不明显而成皱缩状的。早期感染植株变得矮小，很少开花，即使开花，也多数凋谢，结荚不多，对产量影响很大（图版 II—6、8、9）。

3.豇豆病毒病的症状

在幼嫩的叶子上出现斑驳皱缩，老的叶子上主要是皱缩。而比较耐病品种上，先是斑驳，后变为失绿块。在一些易感病品种上产生褐色坏死，有的豆荚畸形，豆荚上有黑褐色坏死斑，植株极度矮缩，很少结荚，可造成严重的产量损失（图版 I—5、图版 II—7）。

4.扁豆 (*Dolichos Lablab*) 病毒病

在幼嫩的叶子上产生花叶斑驳，也有畸形，中、下部成令叶沿脉严重皱缩，有时出现植株矮化，结荚少。

（二）毒原的初步归类

从1979—1981年，采集大豆、菜豆、豇豆、扁豆各种类型病株（或带毒种子）标样141个，其中大豆34个，菜豆50个，豇豆52个，扁豆5个。全部标样在主要鉴别寄主上作常规汁液接种，并根据其病状特点进行初步归类，共归为 I（1、2、3），II（4、5）类，5组（见表1）。各类取代表毒原，测定其在鉴别寄主上的反应、寄主范围、传染方式及稳定性等。

表1 各类毒原在鉴定寄主上的反应

毒原类别		组别 来源	鉴别寄主								
			普通烟	心叶烟	曼陀罗	苋色藜	黄 瓜	大 豆	豇豆	菜豆	蚕豆
I	大豆	1	0	0	0	0	0	泡疹	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	花叶	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	顶枯	0	0	0
II	菜豆	4	M	M	LN	LN	M	0	M	M	M
	扁豆		M	M	LN	LN	M	0	M	M	M
	豇豆	5	M	M	LN	LN	M	0	M	M	0

LN—局部坏死，M—花叶，O—无症状。

(三) 各类分离物的寄主范围、寄主反应及物理性质

第 I 类

1. 寄主范围及寄主反应：这类三个组的毒原寄主范围是很窄的，它们只能系统侵染大豆 (*Glycine max*)。在菜豆 (*Phaseolus Vulgaris*) 品种家雀蛋、奇异豆 (*Kentucky Winder Pole wax*)、Topcrop、河南肉豆、延安豆、红旗豆、泰国豆上均无症状。不能侵染扁豆 (*Dolichos lablab*)、豇豆 (*Vigna sinensis*)、莞豆 (*Pisum sativum*)、普通烟 (*Nicotiana tabacum*)、心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*)、苋色藜 (*Chenopodium amaranticolor*)、曼陀罗 (*Datura stramonium*)、蚕豆 (*Vicia faba*) 等。三组病毒分离物在一整套鉴别寄主上的反应基本是一致的，仅在东农64—3513大豆品种上的症状不同区别为三个类型：(1) 泡疹；(2) 花叶；(3) 顶枯。经多次转接症状是固定的。

2. 传播：很容易汁液接种，一般接种发病率在70%以上。种子可传毒，带毒率常因品种而发生变化 (见表2)。

表2

大豆不同品种不同部位种子带毒情况

品 种	上 部			中 部			下 部			总出 苗株 数	总发 病株 数	发病 率 (%)
	出苗 株数	发病 株数	发病率 (%)	出苗 株数	发病 株数	发病率 (%)	出苗 株数	发病 株数	发病率 (%)			
绿 豆 子	148	0	0	56	0	0	224	8	3.6	428	8	1.9
红 滚 豆	80	8	10	60	12	20	52	16	30.6	192	36	18.6
十 月 寒	80	0	0	72	8	11.1	76	0	0	228	8	3.5
老 鼠 皮	240	0	0	108	8	7.4	132	0	0	480	8	1.7
面 豆 子	140	16	11.4	40	0	0	100	12	12	280	28	10
商洛大豆	59	0	0	43	0	0	54	2	3.7	156	2	1.3
合 计	747	24	3.2	379	28	7.4	638	38	60	1764	90	5.1

表2说明，不同品种种子带毒率不一样，同一品种不同部位带毒率也有差别。总的趋势是中、下部种子带毒率高于上部。

测定了蚜虫传毒，结果三个毒株都可以通过棉蚜 (*Aphis gossypii*)、桃蚜 (*Myzus persicae*)、菜蚜 (*Rhopalosiphum pseudobrassicae*)、大豆蚜 (*Aphis glycine*) 传毒。

3. 抗性测定：根据多次测定，花叶、泡疹、顶枯毒株的结果是相同的，致死温度为55—60℃，稀释限点为 10^{-2} — 10^{-4} ，体外保毒期为4—6天。

4. 交互保护作用：先将花叶型毒株接种在东农64—3513幼苗上，待植株出现花叶后，部分毒株作为对照，其余病株接种顶枯与泡疹毒株，同时设单独接顶枯、泡疹作

对照。结果（表 3）说明，花叶毒株与顶枯毒株之间有交互保护作用，花叶毒株与泡疹毒株也有交互保护作用。

表3 花叶与顶枯、泡疹毒株的交互保护作用

毒原种类		发 病 株 数					
		花 叶		顶 枯		泡 疹	
		I	II	I	II	I	II
对 照	花叶	29/35	16/20	0	0	0	0
	顶枯	0	0	13/19	6/10	0	0
	泡疹	0	0	0	0	15/15	10/10
花叶 + 顶枯		11/11	6/6	0	0	0	0
花叶 + 泡疹		13/13	6/6	0	0	0	0

5. 电镜下病毒粒体的形态：提纯的泡疹毒株病毒溶液经铜网滴样和负染以后进行电镜观察，镜下可见到约700nm×13nm纤维状弯曲的病毒粒子（图3）。

6. 免疫双向扩散试验：试验结果表明，在抗血清与各供测样品孔间都形成了沉淀线，并且各沉淀线完全融合，说明一类三个毒株与东北大豆上的SMV抗原性完全相同。

第 II 类

这一类毒原是来自菜豆、扁豆（第四组）和豇豆（第五组）。下面是来自菜豆的第四组毒原的寄主范围和抗性。

1. 寄主范围和寄主反应：用汁液接种6个科17种植物，证明其中5个科10种植物可被病毒侵染。表4列出了这些植物对第四组毒原的反应与症状。

未表现症状的有：小扁豆（*Lens culinaris*）、大豆（*Glycine soja*）、绿豆（*Phaseolus aureus*）、小豆（*Phaseolus angularis*）、箭栝豌豆（*Vicia sativa*）、芹菜（*Aphium graveolens*）、辣椒（*Capsicum annuum*）。

2. 传播途径

(1) 病毒很容易磨擦接种传毒。

(2) 测定了蚜虫传毒情况，结果表明桃蚜（*Myzus gossypii*）、菜蚜（*Rhopalosiphum Pseudobrassicae*）都可以传染病毒。

(3) 种子传毒：在田间自然感病和温室人工接种感病的菜豆（河南肉豆）植株上收获种子184粒，播种在温室内，连续观察五十天，未发现感病植株，说明种子不传毒。

表4

第四组毒原的寄主范围及寄主反应

寄主名称	学 名	症状与反应
茄 科	<i>Solanaceae</i>	
普 通 烟	<i>Nicotiana tabacum</i>	SM
心 叶 烟	<i>Nicotiana glutinosa</i>	SM
番 茄	<i>lycopersicum esculentum</i>	M, Shr
曼 陀 罗	<i>Datura stramonium</i>	LN
葫 芦 科	<i>Cucurbitaceae</i>	
黄瓜 (咸阳地黄瓜)	<i>Cucumis sativus</i>	M, Mt
豆 科	<i>Leguminosae</i>	
豇 豆	<i>Vigna sinensis</i>	SM
菜 豆	<i>Phaseolus Vulgaris</i>	Mt, M, shr
豌 豆	<i>Pisum sativum</i>	M, Vb
藜 科	<i>Chenopodiaceae</i>	
苋 色 藜	<i>Chenopodium amalanticolor</i>	LN
苋 科	<i>Amaranthaceae</i>	
千 日 红	<i>Gomphrena globosa</i>	Mt, D

LN——局部枯斑

M——花叶

SM——系统花叶

D——畸形

Mt——斑駁

Vb——沿脉失绿

Shr——叶皱缩

3.抗性测定：寄主植物为曼陀罗，每处理10株，测定结果，病毒的致死温度是75—78℃，稀释限点为 10^{-4} — 10^{-6} ，体外保毒期6—8天。

4.电镜下病毒粒体的形态：用提纯的Ⅱ类4组菜豆上的毒原，经铜网滴样和磷钨酸负染后电镜观察，镜下可见到直径约30nm的病毒粒体，未见到其它病毒粒体。

5.免疫双扩散试验：结果在抗血清与各供测样品孔间形成沉淀线，沉淀线完全融合，说明两类四组毒原与标准CMV有完全相同的抗原性。

同时，我们又取来自扁豆 (*Dolichos lablab*) 的这一类同组毒原、鉴定结果，同样可感染茄科、豆科、苋科、藜科等植物。在普通烟、心叶烟、黄瓜、菜豆、豇豆、蕃茄、千日红上表现花叶，曼陀罗、苋色藜上产生局部枯斑。大豆、绿豆等不能被感染。汁液、棉蚜、桃蚜可传染。从感病植株上收得带毒种子87粒，播种于温室内，连续观察未见发病。抗性测定结果：致死温度75—78℃，稀释限点 10^{-4} — 10^{-6} ，体外保毒期4—8天。琼脂扩散试验说明与标准的CMV有相同的抗原性。

本类第五组毒原是来自豇豆。这组毒原除抗性低 (73—75℃)，种子能带毒 (见表5)，不能感染蚕豆外，其它如寄主范围，寄主反应，扩散试验，传染方式等结果，基

本同于第四组。

表5

豇豆种子传毒试验结果表

品种名称	带毒种出苗株数	发病株数	发病率(%)	试验时间
红嘴燕	125	33	26.4	1980
	150	19	12.7	1981
凤县豇豆	78	17	21.7	1981
干阳绿皮	69	13	18.8	1981

三、结论与讨论

第Ⅰ类毒原全来自大豆。虽然在田间情况下产生皱缩、花叶、沿叶脉泡状凸起等症状,但经接种和系统观察,证明它们基本是由同一种病原病毒引起的病害。根据文献报道,危害大豆的主要病毒种类有:大豆花叶病毒(SMV)、菜豆黄色花叶病毒(BYMV)、烟草环斑病毒(TRSV)、烟草条纹病毒(TSV)、豆荚斑驳病毒(BPMV)、豇豆花叶病毒(CpMV)、苜蓿花叶病毒(AMV)、花生矮化病毒(PSV)等。

上述各种病毒,比较明显的区别是病毒粒体形态,寄主范围和特殊症状的表现。以粒体形态可分线状和球状两类,电镜观察表明,Ⅰ类毒原病毒粒体是线状的。在大豆上病毒粒体为线状的有大豆花叶病毒(SMV)和菜豆黄色花叶病毒(BYMV)两种。SMV可以种子带毒,寄主范围很窄,只能侵染大豆属几种植物。而BYMV不能由大豆种子传毒,能侵染多种豆科植物如:菜豆、绿豆、豌豆、蚕豆、香豌豆等。本试验的结果与前者一致,所以Ⅰ类毒原应属大豆花叶病毒(SMV)。从寄主范围看,病毒不能侵染普通烟、豇豆和莧色藜,因此,它不是烟草环斑病毒(TRSV)、烟草条纹病毒(TSV),还不能侵染菜豆、豌豆,也不可能是菜豆黄色花叶病毒(BYMV)、苜蓿花叶病毒(AMV)或豇豆花叶病毒(CPMV),与大豆花叶病毒很相似。又根据免疫双向扩散试验结果,东北SMV和Ⅰ类毒原与抗血清形成的沉淀线完全融合,说明Ⅰ类毒原与东北大豆上SMV抗原性完全相同。因此,根据陕西省危害大豆最普遍,表现为皱缩、花叶、沿脉泡状凸起等症状的毒原病毒应该是大豆花叶病毒(SMV),属于马铃薯Y病毒组。但根据在东农64—3513品种上的症状,可分为三个类型:顶枯、泡疹、花叶。这三类毒株所引起的症状彼此间有明显而稳定的差别,它们和国内外以往所报道的普通株系以及其它株系有明显的不同。在菜豆品种Topcrop上不产生枯斑,而区别于Eui-kyoo Cho等^[11]报道的SMV 7个株系。顶枯毒株与东北的SMV—T相似,也引起植株顶端坏死。但陕西省发生的病毒有一个重要的特点就是在菜豆品种家雀蛋上不产生枯斑而与其相区别。种子能传毒,也不同于南朝鲜报道的SMV—N株系^[9]。泡疹毒株与美

国Ross^[10]报道的SMV—B相似,但在Kentucky wonder pole wax菜豆品种上不出现枯斑而相区别。交互保护反应试验证明,花叶毒株与顶枯和泡疹毒株有保护作用。琼脂扩散试验说明,这三个毒株与东北SMV抗血清能形成沉淀线,并且相融合。因此认为是三个不同的新类型,即花叶类型SMV—M,顶枯类型SMV—T,泡疹类型SMV—H。

第Ⅰ类第四组毒原是来自己菜豆、扁豆。根据以上试验结果,从病毒粒体的形态、琼脂扩散、寄主范围和其它一些生物学特性看,病毒与国内外报道的黄瓜花叶病毒极为相似^[12, 13]。对照国内外资料,可以认为引起菜豆和扁豆病毒病的毒原是黄瓜花叶病毒(CMV)。根据日本小室以CMV的寄生性的分化在植物的科范围上来整理CMV的观点,属于黄瓜花叶病毒(CMV)豆科系统群。

这类第五组毒原是来自己豇豆。这组毒原除致死温度低(73—75℃)、种子可带毒、在豇豆上无症状外,其它如粒子形态、寄主范围等同于第四组,也属于黄瓜花叶病毒豆科系统群。

在试验中采得的毒原都用汁液接种来繁殖。以上几种植物上是否存在仅昆虫能传播的病毒有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 裴维蕃:大豆花叶病的研究初报,《科学》,1950年,第32期,第217页。
- [2] 张明厚等:大豆病毒病的类型及其病原鉴定,《植物病理学报》,1980年,第10卷,第2期,113—117页。
- [3] 陈永萱等:大豆花叶病毒的鉴定,《植物病理学报》,1981年,第11卷,第2期,第34—35页。
- [4] 周家炽等:1957—1958年豆类病毒的工作报告,《植物病理学报》,1959年,第6卷,第2期,第209—213页。
- [5] 刘 仪:大豆花叶病毒诊断研究初报。《植物病理学报》,1963年,第6卷,第2期,第209—213页。
- [6] Gardner, M.V., and Kendrick J.B.: Soybean mosaic Jour. Agric. 1921, 22, 111—114.
- [7] Kendrick, J.B., and Gardner, M.W.: Soybean mosaic, seed transmission and effect on yield. Jour. Agric. Res. 1924, 27, 91—98.
- [8] Yu, T. F.: 1939A mosaic disease of cowpea. The annals of applied biology. Vol, 33, No. 4, 450—454.
- [9] Galvez, G. E.: Host range, Purification and electron microscopy of soybean mosaic virus. Phytopathology. 1963, 53, 388—393.
- [10] Ross, J. B.: A newly recognized strain of soybean mosaic virus. Plant Dis. Repr. 59 (10) 1975, 806—808.
- [11] Eui-kyoo cho and Goodman, Robert M.: Strain of soybean mosaic virus, classification based on virulence in resistant soybean cultivars. Phytopathology, 70(3), 1980.
- [12] Description of plant virus CMI/AAB. 1975.
- [13] Smith, K. M.: A textbook of plant viruses, 1972.

Identification of Virus Diseases of Legume Plants

Zhang Manliang Wei Ningsheng (Teacher)
(The Northwestern Agricultural University)

Abstract

The mosaic disease found on soybean in Shaanxi Province is caused by SMV. The virus symptoms on soybean varieties of Dongnong 64-3513 can be considered as new types as SMV-M, SMV-H and SMV-T. The mosaic diseases found on beans, hyacinth dolichos and cowpeas in Guanzhong Plain in Shaanxi is caused by CMV. The virus belongs to the leguminous systematic group. The virus found on cowpeas, apart from the low TDP (73-75°C), the non-infection of broadbeans and the virus bearing through seeds have the same characteristics as the virus (CMV) isolated from beans in the way of host range, host reaction and results obtained from the tests of agar gel double diffusion.

Key words: virus diseases of legume plants, SMV-M, SMV-H, SMV-T

本刊1986年第1期更正

错

正

“目录”页

第10行: …基本类型次其…

…基本类型及其…

首页 “更改刊名致读者”

第6行: 特此奉告

特此奉告。

第10行: 方针指导上,

方针指导下,

第11行: 务服于…

服务于…

第44页 “摘要”

第1行: …念珠

…串珠

“关键词”: 念珠镰刀菌

串珠镰刀菌

前文第2行: 早“金凤五号”

“早金凤五号”

封底 “版权栏”: Edited by:

Edited by:

倒数第3行: Yanglin

Yangling

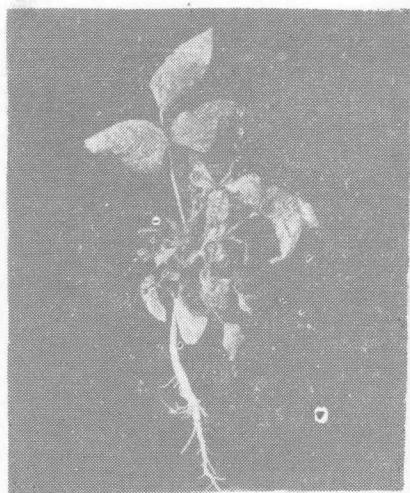


图5 CMV在豇豆上引起的矮缩症状

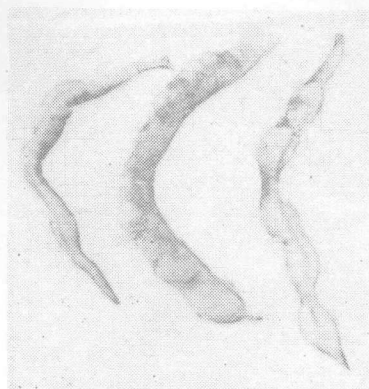


图6 CMV引起的菜豆豆荚畸形、瘤凸起

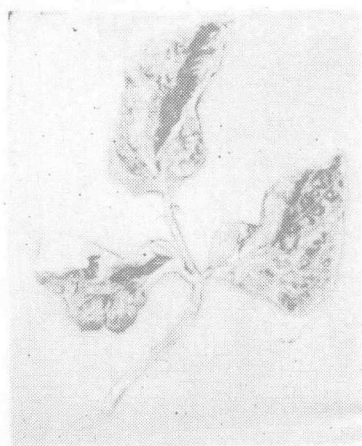


图7 CMV在豇豆叶片上引起的褐色坏死症状

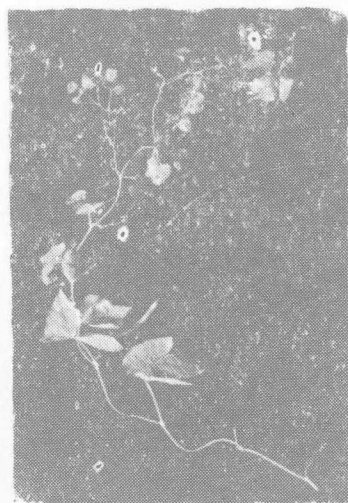


图8 CMV引起的菜豆矮缩症状

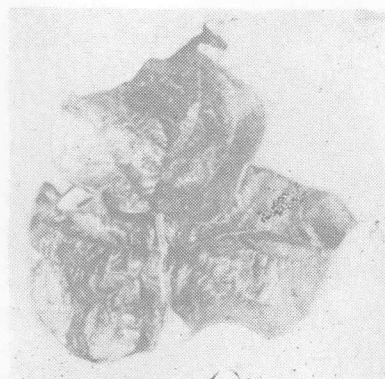


图9 CMV在菜豆上引起的叶片皱缩症状