

大豆花叶病毒种子带毒及其 检测技术研究*

梅丽艳

(黑龙江省农科院植保所)

摘要 采用生长试验、Top-crop 枯斑反应、免疫电镜、A-蛋白包被微板酶联免疫法等 4 种方法对大豆不同品种种子带毒率进行检测,结果表明,4 种检测方法结果基本吻合。检测种子带毒部位试验结果表明,大豆种子的胚部和子叶都带有病毒。同品种内种传率与种皮斑驳程度无明显关系,而不同大豆品种种传率表现明显差异。

关键词 大豆花叶病毒 种传率 免疫

中图分类号 S565.1

大豆花叶病毒(SMV)是一种既可蚜传又能种传的病毒。田间自然条件下,种传率不很高,但它是田间传播的唯一来源。种传率的高低与该病在田间的发生危害和流行有直接的关系。植物病毒种传率受许多因素的影响,有人认为这与病毒在植物体内的转移速度不同有关,多数人认为是由于植物体内病毒浓度的不同造成的。许多学者研究结果表明,种子带(传)毒率不仅受病毒本身的影响,还受大豆品种、环境条件、感病时间以及它们之间的交互作用的影响。因此,我们对大豆花叶病毒种子带毒问题及其检测技术进行研究,现将试验结果总结如下。

1 材料与方 法

1.1 供试大豆品种及来源

从 579 份材料中经生长测定选出有代表性的 Merit、紫丰 4 号、Lakota、合交 83-637、黑农 26、60 天还家;田间设立病圃,一组复叶时接种 SMV-3,秋季收获后为试验用种。

1.2 试验方法

检测种子带毒方法的比较试验采用生长试验、Top-crop 枯斑反应、免疫电镜、A-蛋白包被微板的酶联免疫法;种子带毒部位检测采用 A-蛋白包被微板的酶联免疫法对吸胀去皮种子和萌发种子的胚根进行检测,不同斑驳种子带毒比较试验采用生长试验和 A-蛋白包被微板的酶联免疫检测法。

1.3 种子带毒检测方法

1.3.1 生长试验 将供试种子播于防虫网室中,待一组复叶展开时调查病苗率。

1.3.2 Top-crop 枯斑反应 摘取生长试验有疑问的叶片研碎后接种在菜豆 Top-crop 叶片上,以出现 1 个以上枯斑为阳性反应。

1.3.3 免疫电镜观察测定法 将铜网用 1:1 000SMV 抗血清包被,室温孵育 5 分钟,滤纸吸干后,将稀释 10 倍的种胚研碎液滴在铜网上,10 分钟孵育,吸干冲洗,经 3%醋酸铀处理 10 分

* 收稿日期 1997-02-08

钟在电镜下观察,以正常血清为对照,每品种测 10 粒种子。

1.3.4 A-蛋白包被微板的酶联免疫法(SPA-ELISA 法) 待测种子用蒸馏水浸泡 24~48 小时,剥去种皮。每粒种子加入 0.02M、pH7.2 的 PBS 缓冲液 1ml,研磨后取上清液稀释 50 倍供测定。底物为邻苯二胺,以大于阴性对照 1.5 倍的 OD 值(490nm)为阳性对照,阴性对照、无毒种子由东北农业大学提供。

2 结果与分析

2.1 几种检测种子带毒方法的比较

表 1 表明,4 种方法对大豆种子带(传)毒率的检测结果基本吻合,品种间差异明显。

表 1 几种检测种子带毒率方法的比较

品种	田间抗性	种传率(%)			
		生长试验	免疫电镜	A-蛋白法	枯斑反应
Merit		0.42	0/10	0.0	无
紫丰 4 号	中抗	3.45	0/10	0.0	无
Lakota		10.83	4/10	3.9	有
合交 83-637		2.10	2/10	3.9	有
黑衣 26	感病	27.50	6/10	7.14	有

生长试验是目前生产中常用的检测的方法,经济、方便,可进行大量种子样品的检测,缺点是病苗症状的产生易受环境因素的影响,且试验周期长;A-蛋白包被微板的 ELISA 法具有快速、敏捷、准确、易行、特异性强等优点,是较理想的 ELISA 法,适于条件较好的试验室;枯斑反应和免疫电镜法不仅受条件所限,而且工作量较大。

2.2 用 SPA-ELISA 法检测种子带毒部位试验

表 2 试验结果表明,大豆种子胚部和子叶部带病毒,这与张明厚、陈永萱等的研究结果一致。检测胚根时采用的是群体测定,不能说明单个芽的带毒情况,这还有待于研究。

表 2 SPA-ELISA 法检测种子带毒部位试验结果

品种	吸胀种子带毒率(%)	胚根血清反应	品种	吸胀种子带毒率(%)	胚根血清反应
Merit	0	阴性	Lakota	3.85	阳性
紫丰 4 号	0	阴性	60 天还家	3.85	阳性
合交 83-637	3.85	阳性	黑衣 26	7.14	阳性

表 3 不同斑驳种子带毒率测定结果

品种	生长试验法						SPA-ELISA 法		
	1987 年			1988 年		1990 年		1990 年	
	无斑	轻斑	重斑	无斑	有斑	无斑	有斑	无斑	有斑
Merit	0	2.63	—	0.88	0.47	0.79	0.41	0.0	0.0
紫丰 4 号	0	8.7	—	4.56	6.58	3.01	5.82	0.0	0.0
合交 83-637	25	4.76	7.69	—	—	—	—	0.0	0.0
Lakota	8.7	11.1	12.5	5.8	5.63	8.81	12.84	0.0	7.7
60 天还家	—	—	—	—	—	—	—	7.7	0.0
黑衣 26	33.3	21.7	30	—	—	—	—	0.0	13.3

2.3 不同斑驳种子带毒比较试验

关于种皮斑驳情况与种子带毒的关系,目前说法不一,但大多数学者认为两者无明显关系。表 3 试验结果表明,不同品种带毒率表现差异明显;同品种不同年度间其种传率表现一定的稳定性,而不同斑驳种子间未表现明显差异,出现无斑驳种子带毒率高于有斑驳种子带毒率的现象,斑驳程度轻的却比斑驳程度重的种子带毒率高,这些说明了种子带毒率与品种密切相关,而与大豆种皮的斑驳情况无明显关系。

3 结论与讨论

3.1 利用生长试验、Top-crop 枯斑反应、免疫电镜、A-蛋白包被微板的酶联免疫检测法对大豆不同品种种子带毒检测结果基本相吻合,但由于各方法所要求的条件和适应范围不同,所以生产上我们主张以生长试验为主,辅以 A-蛋白包被微板的酶联免疫检测方法。

3.2 关于种子带毒问题,我们仅做了初步研究,尚有许多方面需要深入研究,如:种传率与环境条件的关系,不同时期种子内的带毒情况等。

3.3 试验证明,不同大豆品种种传率表现明显差异,而大豆种皮斑驳情况与种传率无明显关系,这与东北农业大学的葛莘,南京农业大学的陈永萱的研究结论一致,所以不能用种皮斑驳程度预测种传率。种传率是一个很重要的抗性指标,它受许多因素影响,因此,今后应对影响大豆种传率因素进行系统研究,为降低种传率、大豆花叶病毒病的防治提供理论依据。

参 考 文 献

- 1 葛莘等.影响大豆花叶病毒种子传毒和种子斑驳因素的研究.植物病理学报,1986,16(4):211~217
- 2 李莫然等.筛选大豆花叶病毒种传率低品种的研究.大豆科学,1986,5(3):245~248

Study on Viruliferous Seeds of Soybean Mosaic Virus and Its Detection Methods

Mei Liyan

(Plant Protection Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences)

Abstract Four methods, growing test, Top-Crop local lesion assay, immunoelectron microscopy and the ELISA that Micro-Polystyrene Plates are coated with Protein A were used to detect the viruliferous seed rate of different soybean varieties and the results of the four methods were practically identical.

The test of virus-carrying parts of soybean seeds showed that the virus exists in embryos and cotyledons of the seeds. The seed transmission rate had no relations with seed-coat spots in the same variety, but the rate of different varieties was remarkably different.

Key words Soybean Mosaic Virus, Seed transmission rate, Immune