

黄瓜绿斑驳花叶病毒在葫芦上的种传规律 及热处理效果评价

宋顺华^{1,2} 吴萍^{1,2} 官国义^{1,2} 孟淑春¹ 耿丽华^{1*}

(1. 北京市农林科学院蔬菜研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 农业部都市农业(北方)重点实验室, 北京 100097; 2. 北京京研益农科技发展中心, 北京 100097)

摘要: 为明确黄瓜绿斑驳花叶病毒(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)在葫芦上的种传规律,以西瓜砧木葫芦种子为材料,采用双抗体夹心酶联免疫吸附测定法(DAS-ELISA)、反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)与生物学检测相结合的方法研究葫芦种子的带毒率和传毒率的关系,并评价了干热处理对病毒的钝化效果。结果表明,DAS-ELISA灵敏度检测种子时,在感染种子研磨液:健康种子研磨液为1:1 000时,带毒量仍能检测出阳性,RT-PCR和DAS-ELISA两种方法均能准确检测葫芦种子的带毒情况;6个批次的葫芦种子有4个批次呈阳性,带毒率在0~100%之间,贮藏1年后的传毒率在0~5.6%之间;4个为CGMMV阳性的种子批经干热处理后,仅1株实生苗呈阳性。研究表明,CGMMV在葫芦作物上的隐性带毒现象非常普遍;种子的带毒率高而传毒率低,以表面带毒为主,且非常稳定;72℃ 72 h干热处理葫芦种子能有效地钝化CGMMV。

关键词: 黄瓜绿斑驳花叶病; 葫芦种子; 带毒率; 传毒率; 干热处理

Seed transmission of *Cucumber green mottle mosaic virus* on gourd and the evaluation of the effect of heat treatment

Song Shunhua^{1,2} Wu Ping^{1,2} Gong Guoyi^{1,2} Meng Shuchun¹ Geng Lihua^{1*}

(1. Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops in North China Area, Key Laboratory of Urban Agriculture (North), Ministry of Agriculture; Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 2. Beijing Jingyan Yinong Sci-Tech Development Center, Beijing 100097, China)

Abstract: The relationship between the rate of seed contamination and seed-to-seedling transmission of *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) on gourd seeds was studied and the effect of dry heat treatment on the virus passivation process was evaluated by using DAS-ELISA, RT-PCR and biological detection methods. The results showed that the sensitivity of DAS-ELISA detection was a ratio of 1/1 000 of CGMMV infected/healthy seeds in the grinding fluid mixtures. Both DAS-ELISA and RT-PCR methods could accurately detect CGMMV from gourd seed soaking liquid. Among six batches of gourd seeds, four batches of seeds were positive, and the contamination rates were between 0–100%. After one year of storage, the seed-to-seedling transmission rates were between 0–5.6%. Four batches of commercial gourd seeds infested with CGMMV were treated by dry heat treatment (DHT), only one seedling appeared positive. This study indicated that CGMMV hidden poison phenomenon was very common on the

基金项目: 国家现代农业产业技术体系北京市西甜瓜创新团队专项,北京市农林科学院创新能力建设专项(KJCX20140111),国家科技支撑计划项目(2011BAD35B07)

* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: genglihua@nrcv.org, Tel: 010-51503094

收稿日期: 2014-11-26

gourd crop. The transmission rate of gourd seed-to-seedling was low while the contamination rate was high, which indicated that the virus mainly distributed on the surface of the seeds and they were very stable. CGMMV could be effectively passivated on gourd seeds treated by DHT method at 72°C for 72 h.

Key words: *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV); gourd seed; seed contamination rate; seed-to-seedling transmission rate; dry heat treatment

黄瓜绿斑驳花叶病(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)是葫芦科植物上的重要病害,最早在英国发现报道(Ainsworth, 1935),目前已分布于20多个国家和地区(冯兰香等, 2007)。中国口岸检疫部门最早从日本引进的种苗中检测到该病毒,目前在我国广西、辽宁、河北、山东、湖北、广东和北京等很多地区也都发现了疫情。2006年12月21日我国农业部颁布第788号公告,将黄瓜绿斑驳花叶病毒列为全国检疫性的有害生物(2007)。CGMMV是一种重要的种传病毒(Choi, 2001; 吴会杰等, 2011),带毒种子是病毒远距离传播的主要途径,也是葫芦科植株生长早期病毒最有效的感染途径。目前由于引种量和制种基地面积迅速增长,病毒随种子传播的风险越来越高,给我国西瓜及甜瓜生产造成了严重的威胁。因此,加强种子检测、生产和使用无毒的种子是防治该病害最有效的方法。

目前血清学及分子生物学是快速检测CGMMV的主要方法,酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immune sorbent assay, ELISA)、反转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和免疫捕获反转录聚合酶链式反应(immuno-capture reverse transcriptase polymerase chain reaction, IC-RT-PCR)已被广泛应用于进出口种子携带CGMMV的检测(Kim & Lee, 2000; Kim et al., 2003; 黄静等, 2009),邓从良等(2009)还建立了实时荧光PCR技术。这些方法在检测大批量商品种子时均存在研磨种子的困难;RT-PCR费时、费力,且检测费用较高。在病害防治上,热水和干热处理种子一直是钝化病毒最有效的方法(Dawson & Kuhn, 1974; Kim & Lee, 2000),日本和韩国采取以干热处理为主的综合防治措施,成功控制了CGMMV的发生与流行(蔡明等, 2010),但其钝化病毒的原理还不清楚(Kim et al., 2003);Park et al. (2005)首次报道了通过转基因技术育成CGMMV的抗性砧木,而其推广应用还未见报道。

近年来,已有不少研究报道CGMMV葫芦科种子带毒率和传毒率的关系。黄瓜CGMMV带毒种子收获后保存1个月,传毒率为8%,在保存5个月后

传毒率由8%降到了0.1%(Hollings et al., 1975);当人工接种后,西瓜种子的带毒率为100%,传毒率为2.25%(吴会杰等, 2011);葫芦种子CGMMV的带毒率达到100%时,其植株发病率分别为0.91%和1.12%(秦碧霞等, 2009);CGMMV感染瓠瓜种子带毒率为84%,传毒率为2%(Choi, 2001)。不同的病毒株系和环境条件差异会对种子的传毒率等种传规律产生较大的影响(Mandal et al., 2008),但葫芦种子在这方面的相关研究鲜少。

已有研究表明,在西瓜大量采用嫁接栽培技术的生产方式下,该病毒主要通过砧木种子带毒传播,自然条件下西瓜种子很少带毒,甚至不带毒(蔡明等, 2011)。葫芦砧木是CGMMV的易感作物,因为种子携带CGMMV非常普遍,导致生产上大量采用南瓜代替葫芦作为西瓜的砧木,但以葫芦作为砧木所生产的西瓜甜度和口感等品质更好,有着南瓜作为砧木不可替代的优点。本研究以不同带毒率的葫芦种子作为材料,旨在了解葫芦种子带毒和传毒的规律;采用不同种子处理方法检测葫芦种子以明确检测种子的灵敏度,以期为商品葫芦种子提供准确、简便的检测程序;并通过实生苗评价干热处理对病毒的钝化效果,为带毒葫芦种子提供可行的种子处理和病毒钝化效果评价方法,对从源头控制该病害的蔓延和流行提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试品种:5个品种共12个批次的葫芦种子为:京欣砧胜、京欣砧优和京欣砧冠各3个批次、京欣砧王2个批次、京欣砧1号1个批次,均由北京市农林科学院蔬菜研究中心提供。

试剂:CGMMV的抗体,美国Agdia公司;RNA提取试剂盒、M-MLV反转录酶、RNasin抑制酶、100 bp DNA标准分子量、CGMMV特异性引物及其缓冲液,北京赛百盛基因技术有限公司;Taq DNA聚合酶、dNTPs,北京泽星生物科技有限公司;其它试剂均为国产分析纯。

仪器:MK3酶标仪,芬兰Thermo Labsystems

Multiskan(雷勃)公司; GeneAmp 9700 PCR 扩增仪, 美国 ABI 公司; 5500 自动凝胶成像仪, 美国 Alpha Innotech Corporation; 2100L 种子干热处理机, 韩国高丽器械株式会社。

1.2 方法

1.2.1 DAS-ELISA 方法检测葫芦种子

按照 Koenraadt & Remeus (2014) 方法进行。将 5 个品种共 12 个批次的葫芦种子, 按种子重量(g)与样品提取缓冲液体积(mL)为 1:10 的比例充分研磨种子配制成样品提取液, 样品提取缓冲液为 Na_2SO_3 1.3 g、PVP-40 20 g, 用 pH 7.4 的磷酸盐吐温缓冲液(phosphate tween-20 buffer solution, PBST)定溶至 1 L。用酶标仪读取 OD_{405} , 当(样品 OD_{405} - 空白 OD_{405})/(阴性对照 OD_{405} - 空白 OD_{405}) ≥ 2.0 时, 判定样品为阳性, 否则为阴性。阴性对照为经 DAS-ELISA 检测为阴性的种子, 空白对照以样品提取缓冲液代替样品提取液。

灵敏度检测: 取带毒率为 100% 的京欣砧胜种子, 按种子重量(g)与样品提取缓冲液体积(mL)为 1:10 的比例充分研磨种子, 用相同比例健康种子的研磨液将带毒种子的研磨液分别稀释成 1:10、1:20、1:50、1:100、1:200、1:300、1:500 及 1:1 000, 读取各稀释液的 OD_{405} , 重复 3 次, 计算各稀释液的平均 OD_{405} 。

不同种子处理方法对 DAS-ELISA 检测结果的影响: 取带毒率为 100% 的京欣砧胜种子, 共 4 种处理方法, 即单粒种子研碎、单粒种子浸泡 1 h、单粒种仁研碎及单粒种仁浸泡 1 h。浸泡液或研磨液均为样品提取缓冲液, 种子重量(g)与缓冲液体积(mL)的比例为 1:10。每种处理检测 10 粒种子, 读取每粒种子的 OD_{405} , 计算 10 粒种子平均 OD_{405} 。

1.2.2 RT-PCR 方法检测葫芦种子

采用以下 3 种方法分别提取种子中的总 RNA, 并比较不同提取方法对 RT-PCR 结果的影响。方法 1: 取带毒率为 100% 的京欣砧胜葫芦种子 10 粒, 每粒种子取半粒单独研碎并提取总 RNA; 方法 2: 剩余的 10 个半粒种子分别加 0.5 mL 无菌水浸泡 1 h, 从每半粒种子的浸泡液中吸取 100 μL 加入 400 μL 提取液提取总 RNA; 方法 3: 同时再从每半粒种子的浸泡液中吸取 5 μL 粗提 RNA。取 100 mg 子叶或真叶提取葫芦幼苗的总 RNA。种子和叶片的总 RNA 提取按照 RNA 提取试剂盒上的方法进行, RNA 粗提液的提取方法为: 将 5 μL 浸泡液与 0.5 mol/L NaOH 5 μL 溶液混合均匀, 培育 5 min, 然后从中吸

取 10 μL 提取液加入到 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0) 490 μL 中变性, 作为 RNA 粗提液。以提取的 RNA 反转录为 cDNA, 作为特异性 PCR 的模板。

PCR 的上游引物为 CGMMV1: 5'-CGTGCTA-AGCGGCATTCTAAACCTC-3', 下游引物为 CGMMV2: 5'-CCGCAAACCAATGAGCAAACCG-3', 产物大小 654 bp。RNA 的反转录和特异性 PCR 反应体系和步骤按 SN/T 2344-2009 检疫行业标准的方法进行(陈青等, 2009)。反应产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳检测, 在自动凝胶成像仪上观察拍照, 记录结果, 扩增结果产生大小为 654 bp 的片段时判断为阳性, 否则为阴性。

1.2.3 种子带毒率和传毒率的检测

采用 DAS-ELISA 方法检测种子的带毒率: 从每个批次取 100 粒种子, 10 粒种子为 1 个样品, 每个批次种子检测 10 个样品, 其中只要有 1 个样品为阳性, 这个种子批即为阳性。对结果为 CGMMV 阳性的种子进行种子带毒率检测, 每个种子批检测 100 粒种子, 计算种子的带毒率, 重复 3 次。种子带毒率 = 阳性种子数量/检测种子数量 $\times 100\%$ 。

采用生物学方法检测种子的传毒率: 将葫芦种子单粒播种在营养钵内的灭菌土中, 置于玻璃防虫温室内, 在温度为 25 ~ 34℃ 的条件下培养。出苗后每周观察实生苗的发病症状, 对有可疑症状的实生苗逐株取样进行 DAS-ELISA 检测; 待实生苗长至四叶期, 对其它无可疑症状的实生苗取样, 即从无可疑症状的每株实生苗上取一小块叶片, 10 块叶片作为 1 个样本进行 DAS-ELISA 检测, 对阳性的样本进行单株检测, 采用 RT-PCR 验证。每个种子批播种 400 粒种子。统计 CGMMV 的阳性株数, 计算带毒种子的传毒率。带毒种子传毒率 = 阳性幼苗株数/生长的幼苗株数 $\times 100\%$ 。

1.2.4 种子干热处理

干热处理方法是将种子置于干热处理机内, 分别按 35℃ 24 h、55℃ 24 h、72℃ 72 h 进行干热处理后, 关闭电源, 24 h 后取出种子, 种子保存于 6℃ 保存箱内。采用生物学方法检测干热处理钝化 CGMMV 的效果, 方法同 1.2.3, 华欣砧优播种 400 粒种子, 京欣砧 1 号播种 780 粒种子, 其余每个种子批播种 1 000 粒种子。

1.3 数据分析

利用 SPSS 13.0 软件中的单方差分析模型(one-way ANOVA model) 对试验数据进行统计分

析,用 SNK(Student-Newman-Keuls)法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 DAS-ELISA 方法对葫芦种子的检测

DAS-ELISA 方法检测种子带毒的灵敏度较高,带毒量在感染种子与健康种子研磨液体积比为 1:1 000 时仍能检测出 CGMMV 阳性结果(表 1)。

表 1 DAS-ELISA 检测葫芦种子的灵敏度

Table 1 The sensitivity of DAS-ELISA detection on gourd seeds

稀释倍数	Dilution	time	CGMMV	OD ₄₀₅	I/H
1:10			0.960 ± 0.046	a	14.31
1:20			0.784 ± 0.037	b	11.47
1:50			0.638 ± 0.021	c	9.11
1:100			0.511 ± 0.018	d	7.06
1:200			0.444 ± 0.019	e	5.98
1:300			0.361 ± 0.007	f	4.65
1:500			0.348 ± 0.018	fg	4.44
1:1 000			0.306 ± 0.009	g	3.76
阴性对照	Negative	CK	0.135 ± 0.006	h	—
空白对照	Blank	CK	0.073 ± 0.007	i	—

表中数据为平均数 ± 标准误。同列数据后不同小写字母表示经 SNK 法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。I 为样品 OD₄₀₅ 与空白对照 OD₄₀₅ 之差; H 为阴性对照 OD₄₀₅ 与空白对照 OD₄₀₅ 之差。Data are mean ± SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P < 0.05$ level by SNK test. I: The result of the positive sample's OD₄₀₅ value minus the blank CK sample's OD₄₀₅ value; H: the result of the negative sample's OD₄₀₅ value minus the blank CK sample's OD₄₀₅ value.

对葫芦种子进行不同处理发现研磨种子的方法能得到更高的 OD₄₀₅,以研磨整粒种子的 OD₄₀₅ 最高,但检测结果在不同处理方法之间是一致的,即均呈现阳性,种子的 CGMMV 带毒率为 100%(表 2)。同时也说明研磨种子方法能充分释放出种子内外的病毒,可以提高 DAS-ELISA 检测的准确度。

2.2 RT-PCR 方法对葫芦种子的检测

采用 RT-PCR 技术对 3 种方法提取的种子总 RNA 的检测结果表明,从研磨种子和浸泡液中提取的种子总 RNA,均能得到与预期大小一致的 654 bp 清晰的特异性条带,而从种子 RNA 粗提取液中没有得到特异性条带(图 1)。

2.3 种子的带毒率和传毒率的关系

生物学方法结合 DAS-ELISA 和 RT-PCR 技术检测了 6 份葫芦种子样品的带毒率(3 个品种)和 5 份带毒种子样品的传毒率(表 3)。葫芦种子的带毒率为 0 ~ 100%,传毒率为 0 ~ 5.6%,平均为 1.86%。大部分检测结果为阳性的植株都不表现任何症状。

表 2 不同种子处理方法对 ELISA 结果的影响

Table 2 The influences of different seed treatments by DAS-ELISA

种子处理方法	检测结果 *	OD ₄₀₅	I/H
Seed treatment	Detection result *		
单粒种仁浸泡	10/10	0.699	9.67
Seed kernel soaking			
单粒种子浸泡	10/10	0.740	10.31
Seed soaking			
单粒种仁研磨	10/10	0.828	11.69
Seed kernel grinding			
单粒种子研磨	10/10	1.518	22.47
Seed grinding			
阳性对照	—	2.518	—
Positive CK			
阴性对照	—	0.144	—
Negative CK			
空白对照	—	0.080	—
Blank CK			

* : 阳性种子数/检测种子总数; I: 阳性样品的 OD₄₀₅ 与空白对照 OD₄₀₅ 之差; H: 阴性对照 OD₄₀₅ 与空白对照 OD₄₀₅ 之差。
* : Number of positive seed samples/total number of seed samples; I: the result of the positive sample's OD₄₀₅ value minus the blank CK sample's OD₄₀₅ value; H: the result of the negative sample's OD₄₀₅ value minus the blank CK sample's OD₄₀₅ value.

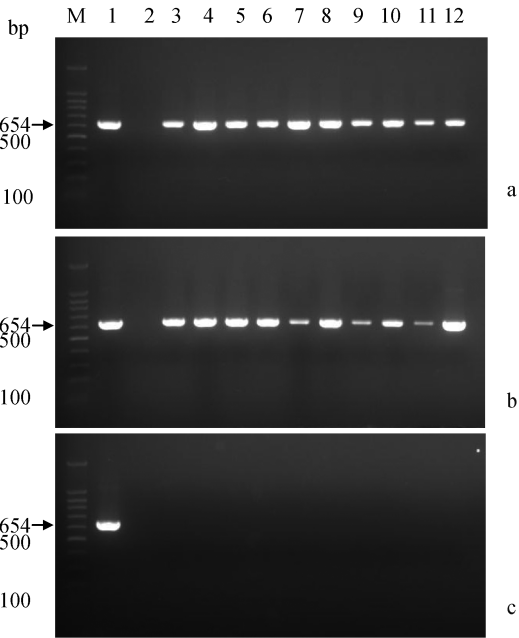


图 1 不同种子 RNA 提取方法对 RT-PCR 结果的影响

Fig. 1 The influences of different seed RNA extraction methods on RT-PCR

a: 种子研磨; b: 种子浸泡液; c: 种子浸泡液粗提; M: 100 bp DNA 标准分子量; 1: 阳性对照, 2: 健康种子, 3 ~ 12: 10 粒样品种子。a: Seed grinding for total RNA; b: seed soaking for total RNA; c: seed soaking for rush RNA; M: 100 bp DNA marker; 1: positive CK; 2: healthy seed; 3 - 12: 10 seed samples.

表 3 CGMMV 种子带毒率和传毒率的关系

Table 3 The relationship between the rate of seed contamination and seed-to-seedling transmission of CGMMV

样品 Sample	种子带毒率 Seed contamination (%)	生物学检测结果 The result of biological detection			
		播种总数 Number of sown seeds	出苗数 Number of seedlings	阳性株数 CGMMV positive number	传毒率 Seed-to-seedling transmission rate (%)
京欣砧胜-1 Jingxinzhensheng-1	100 ± 0.00	400	357	20	5.6
京欣砧胜-2 Jingxinzhensheng-2	50 ± 7.81	400	354	8	2.3
京欣砧优-1 Jingxinzhenyoun-1	14 ± 4.36	400	393	3	0.8
京欣砧优-2 Jingxinzhenyoun-2	10 ± 3.61	400	383	0	0.0
京欣砧冠-1 Jingxinzhenguan-1	25 ± 7.10	400	317	2	0.6
京欣砧冠-2 Jingxinzhenguan-2	0 ± 0.00	—	—	—	—

表中种子带毒率为平均数 ± 标准误。Data of seed contamination in the table are mean ± SE.

2.4 葫芦种子的干热处理

2.4.1 干热处理效果评价

对照处理和干热处理的葫芦种子分别出苗 357 株和 347 株,幼苗生长至二叶期,对照处理中有 20 株的子叶出现退绿斑点症状,一个至多个退绿斑点在子叶上呈随机分布,大小不等,均无凸起,子叶边缘为波浪状,稍有畸形,叶片大小比正常叶片小,但

所有的真叶均表现正常。对 20 株实生苗分别采取子叶和真叶进行 RT-PCR 检测,结果 20 株实生苗的子叶全部为阳性(图 2-a),14 株实生苗的真叶为阳性(图 2-b),种子的传毒率为 5.6%。将对照其余的实生苗和干热处理的实生苗进行定期分组取样检测,生长至 3 个月的实生苗共检测 3 次,未再发现 CGMMV 阳性样品。

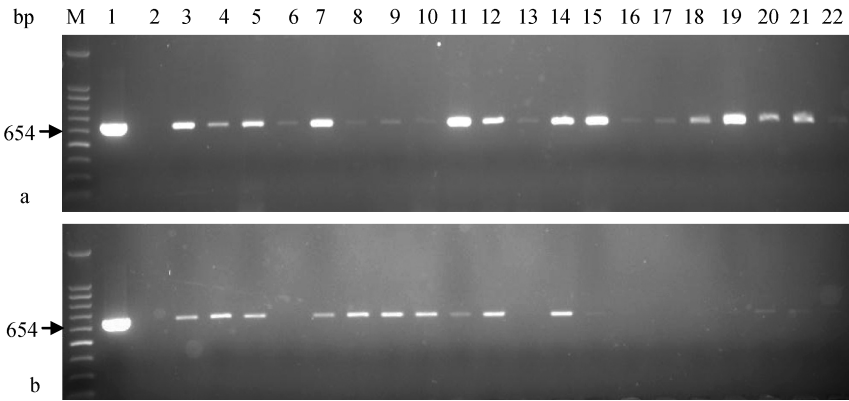


图 2 葫芦砧木子叶带症单株实生苗的检测结果

Fig. 2 The detection result of gourd seedling form cotyledon with CGMMV symptom

a: RT-PCR 检测子叶结果; b: RT-PCR 检测真叶结果; M: 100 bp DNA 标准分子量; 1: 阳性对照; 2: 健康叶片; 3 ~ 22: 20 株子叶带症单株。a: RT-PCR detection result of cotyledon; b: RT-PCR detection result of true leaf; M: 100 bp DNA marker; 1: positive CK, 2: healthy leaf; 3 - 22: 20 gourd seedlings of cotyledon with CGMMV symptom.

2.4.2 干热处理对种子携带 CGMMV 的钝化效果

大批量干热处理 6 个批次(5 个品种)的葫芦商品种子经 DAS-ELISA 检测,有 4 个批次的种子为

CGMMV 阳性。生物学方法结合 DAS-ELISA 方法检测干热处理对病毒的钝化效果,结果有 1 株京欣砧胜为阳性,其余所有品种的实生苗均为阴性(表 4)。

表 4 干热处理对葫芦种子的处理效果
Table 4 Passivation effect of CGMMV in gourd seeds by DHT

样品 Sample	京欣砧王-1 Jingxinzhenwang-1	京欣砧王-2 Jingxinzhenwang-2	京欣砧 1 号 Jingxinzhen 1	京欣砧胜 Jingxinzhensheng	京欣砧冠 Jingxinzhenguan	华欣砧优 Jingxinzhenyou
种子 Seed	—	+	+	+	—	+
实生苗* Seedling*	0/1 000	0/1 000	0/780	1/1 000	0/1 000	0/400

：阳性株数量/检测总株数；+：阳性；—：阴性。：Number of positive seedlings/total number of testing seedlings；+：positive；—：negative.

3 讨论

带毒种子是葫芦科作物发生 CGMMV 病害的主要初侵染源,加强种子检测是防治该病害的关键措施之一。本研究中 DAS-ELISA 方法能在种子研磨液带毒量为带毒种子研磨液占健康种子研磨液的 1/1 000 时检测出阳性,其灵敏度可以满足准确检测大批量商品种子的要求。在检测单粒种子时,虽然研磨整粒种子的 OD₄₀₅ 最高,但种子浸泡液的结果与种子研磨液一致,可解决研磨种子的难题。RT-PCR 方法的灵敏度虽然比 ELISA 高,但该方法中也存在研磨种子和提取高质量 RNA 的困难,RNA 粗提取的方法提取的 RNA 数量不足以产生足够的模板,本研究采用种子的浸泡液提取 RNA 克服了种子研磨等困难,使得应用 RT-PCR 技术检测葫芦种子更加简便可行。生物学检测方法可以检测病毒的传染性与种子的传毒率,证明病毒与病害发生的直接相关性,是种子处理后的唯一检测方法。但 CGMMV 普遍存在带毒率高传毒率低的情况,在样品的带毒率和传毒率都较低时,则要以增加样品数量来提高检测的可信度。以 95% 的可信度检测带毒率为 0.15% 的种子,检测种子样品量应该在 2 000 粒以上 (Koenraadt & Remeus,2014),费时、费力,需要较大的检测场所,环境条件也影响结果的稳定性。本试验结果也表明,从带毒种苗子叶症状不明显,真叶不表现症状,或子叶与真叶均不表现症状的幼苗上,DAS-ELISA 和 RT-PCR 方法都能检测到 CGMMV 阳性,即普遍存在隐症带毒的现象,表明生物学鉴定必须结合室内其它鉴定方法以提高检测结果的准确性。

本研究中葫芦种子的带毒率在 0~100% 之间,收获保存 1 年后的传毒率在 0~5.6% 之间,平均为 1.86%,与西瓜、甜瓜种子传毒率相差不大 (吴会杰等,2011)。这些研究结果说明 CGMMV

以种子表面带毒为主 (吴会杰等,2011),与种子带毒率相比,传毒率要低得多,但有一定的稳定性,与已有的研究结果一致 (Yasuo et al.,1971;Choi,2001;秦碧霞等,2009)。带毒率为 10% 的京欣砧优-2 葫芦种子,其传毒率为 0,可能是由于种子带毒率低,种植的样品数量太少的原因造成。不同种子批传毒率的差异与种子带毒率有关,可能还受寄主种类、品种、病毒株系的影响,此原因还需要进一步研究。不同的病毒感染方式、环境条件、样品数量和检测方法可造成不同研究之间传毒率的差异,实生苗不同部位的检测结果也存在差异。本研究中,RT-PCR 方法检测实生苗时,20 株子叶阳性植株中只有 14 株的真叶为阳性,将真叶阳性的实生苗同一叶位混合,从 1~7 叶位都能检测到特异性条带,说明病毒在植株中的扩展是一个从下到上的过程,但影响病毒在植株内扩展的条件还有待进一步研究。

一般可采用化学和物理方法处理种子以钝化病毒。日本和韩国的经验表明,干热处理可以大大减轻发病程度,甚至不发病,是钝化 CGMMV 最有效的方法 (蔡明等,2010)。本研究检测了 5 个葫芦品种 6 个批次的种子,有 4 个批次的种子为 CGMMV 阳性,干热处理后经实生苗结合 DAS-ELISA 检测,仅发现其中 1 个批次种子出现 1 株阳性,说明 72℃ 72 h 的干热处理能有效钝化 CGMMV,对 CGMMV 的防治效果显著。干热处理会引起种子的发芽率下降,对不同品种和同一品种在不同生产条件下生产的种子影响不同 (蔡明等,2010;2011),进一步的工作应该探索葫芦科作物不同种类、同一种类不同品种有效的种子干热处理条件及其对种子质量的影响。经处理后的种子需再经过实生苗检测,进一步确诊病毒的传染性,同时还要进行种子质量的检测,使种子符合安全、高质量的要求。CGMMV 在葫芦上的隐症带毒现象也是限制实生苗检测方法应用的一个瓶颈,必

须结合室内其它鉴定方法以提高检测结果的准确性, 以确保生产上使用健康无毒的种子。

参 考 文 献 (References)

- Ainsworth GC. 1935. Mosaic disease of the cucumber. *Annals of Applied Biology*, 22(1): 55–67
- Cai M, Li MF, Jiang D. 2010. Occurrence regularity and control measures of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Japan and Korea. *Plant Quarantine*, 24(4): 65–68 (in Chinese) [蔡明, 李明福, 江东. 2010. 日本、韩国黄瓜绿斑驳花叶病毒发生及防控策略. *植物检疫*, 24(4): 65–68]
- Cai M, Jiang D, Zhang LY, Li J, Zhang K. 2011. Study on CGMMV seed treatment. *Plant Quarantine*, 25(1): 62–63 (in Chinese) [蔡明, 江冬, 张丽英, 李眷, 张昆. 2011. 黄瓜绿斑驳花叶病毒种子处理试验研究. *植物检疫*, 25(1): 62–63]
- Chen Q, Deng CL, Zhang YJ, Liao FR, Lin SM, Chen HY, Wang HY, Li WF, Li SQ. 2009. Quarantine identification of *Cucumber green mottle mosaic virus*, SN/T 2344–2009. Beijing: China Standard Press (in Chinese) [陈青, 邓丛良, 张永江, 廖富荣, 林石明, 陈红运, 王宏毅, 李伟丰, 李树庆. 2009. 黄瓜绿斑驳花叶病毒检疫鉴定方法, SN/T 2344–2009. 北京: 中国标准出版社]
- Choi GS. 2001. Occurrence of two tobamovirus diseases in cucurbits and control measures in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 17(5): 243–248
- Dawson WO, Kuhn CW. 1974. Kinetics of multiplication, inactivation, and particle-breakdown of *Cowpea chlorotic mottle virus* in cowpea. *Phytopathology*, 64(7): 951–957
- Deng CL, Huang F, Lü YF, Zhang K, Guo YL, Zhao HS. 2009. Detection of *Cucumber green mottle mosaic virus* by real time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Plant Quarantine*, 23(4): 29–31 (in Chinese) [邓从良, 黄峰, 吕玉峰, 张凯, 郭育林, 赵焕生. 2009. 实时荧光 RT-PCR 方法检测黄瓜绿斑驳花叶病毒. *植物检疫*, 23(4): 29–31]
- Feng LX, Xie BY, Yang YH, Feng DX. 2007. The detection and control of quarantine pathogens—*Cucumber green mottle mosaic virus*. *China Vegetables*, 27(9): 34–38 (in Chinese) [冯兰香, 谢丙炎, 杨宇红, 冯东昕. 2007. 检疫性黄瓜绿斑驳花叶病毒的检测和防疫控制. *中国蔬菜*, 27(9): 34–38]
- Hollings M, Komuro Y, Tochihara H. 1975. Cucumber green mottle mosaic viruses. //Surrey K. Descriptions of plant viruses. England: CMI./AAB, 154: 4
- Huang J, Liao FR, Lin SM, Chen Q. 2009. Establish of IC-RT-PCR detection method of *Cucumber green mottle mosaic virus* in seed of pumpkin. *Journal of Zhangzhou Technical Institute*, 11(1): 12–15 (in Chinese) [黄静, 廖富荣, 林石明, 陈青. 2009. 南瓜种子中黄瓜绿斑驳花叶病毒 IC-RT-PCR 检测方法的建立. *漳州职业技术学院学报*, 11(1): 12–15]
- Koenraadt HMS, Remeeus PM. 2014. Detection of squash mosaic virus, *Cucumber green mottle mosaic virus* and *Melon necrotic spot virus* in cucurbits. //International Seed Testing Association. International Rules for Seeding Testing. Annexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods. Switzerland: International Seed Testing Association.
- Kim DH, Lee JM. 2000. Seed treatment for *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) in gourd (*Lagenaria siceraria*) seeds and its detection. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, 41(1): 1–6
- Kim SM, Nam SH, Lee JM, Yim KO, Kim KH. 2003. Destruction of cucumber green mottle mosaic virus by heat treatment and rapid detection of virus inactivation by RT-PCR. *Molecules and Cells*, 16(3): 338–342
- Mandal S, Mandal B, Haq QMR, Varma A. 2008. Properties, diagnose and management of *Cucumber green mottle mosaic virus*. *Plant Viruses*, 2(1): 25–34
- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. No. 788 Announcement of Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. 2007. *China Plant Protection*, 27(3): 11 (in Chinese) [中华人民共和国农业部公告(第 788 号). *中国植保导刊*, 27(3): 11]
- Park SM, Lee JS, Jegal S, Jeon BY, Jung M, Park YS, Han SL, Shin YS, Her NH, Lee JH, et al. 2005. Transgenic watermelon rootstock resistant to CGMMV (*Cucumber green mottle mosaic virus*) infection. *Plant Cell Reports*, 24(6): 350–356
- Qin BX, Lu XH, Hu DM, Liao FR, Cai JH, Liu ZM. 2009. Detection of cucumber green mottle mosaic virus in seed of bottle gourd. //Peng YL, Zhu YY. Academic Annual Conference of Botanical China Society of Plant Pathology in 2009. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, pp. 349 (in Chinese) [秦碧霞, 陆秀红, 胡冬梅, 廖富荣, 蔡健和, 刘志明. 2009. 葫芦种子携带黄瓜绿斑驳花叶病毒检测. //彭友良, 朱有勇. 中国植物病理学会 2009 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, pp. 349]
- Wu HJ, Qin BX, Chen HY, Peng B, Cai JH, Gu QS. 2011. The rate of seed contamination and transmission of *Cucumber green mottle mosaic virus* in watermelon and melon. *Scientia Agricultura Sinica*, 44(7): 1527–1532 (in Chinese) [吴会杰, 秦碧霞, 陈红运, 彭斌, 蔡建和, 古勤生. 2011. 黄瓜绿斑驳花叶病毒西瓜、甜瓜种子的带毒率和传毒率. *中国农业科学*, 44(7): 1527–1532]
- Yasuo K, Hiroshi T, Ryoei F, Yuji N, Shingo Y. 1971. *Cucumber green mottle mosaic virus* (watermelon strain) in watermelon and its bearing on deterioration of watermelon fruit known as konnyaku disease. *Annals Phytopathological Society of Japan*, 37(1): 34–42

(责任编辑: 高峰)