

济南地区倒瓢西瓜 CGMMV 的检测

刘颖^{1, 2} 彭斌² 杨晓红^{1*} 李向东³ 古勤生^{2*}

(¹南方山地园艺学教育部重点实验室, 西南大学园艺园林学院, 重庆 400715; ²河南省果树瓜类生物学重点实验室, 中国农业科学院郑州果树研究所, 河南郑州 450009; ³山东农业大学植物保护学院, 山东泰安 271000)

摘要: 山东省济南地区 2011 年嫁接西瓜严重发生倒瓢, 通过实地调查, 初步判断为病毒侵染引起, 经对采集的 80 份西瓜病样进行 ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) 和 RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) 验证。结果表明: 经 ELISA 检测 80 份西瓜样本中有 70 份感染了黄瓜绿斑驳花叶病毒 (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV), 证明山东省济南地区嫁接西瓜严重发生倒瓢是由 CGMMV 引起的。

关键词: 西瓜; 倒瓢; 黄瓜绿斑驳花叶病毒; ELISA; RT-PCR

中图分类号: S651 文献标识码: A 文章编号: 1000-6346 (2012) 10-0075-05

Detection of *Cucumber Green Mottle Mosaic Virus* of Watermelon Blood Flesh in Jinan Area

LIU Ying^{1, 2}, PENG Bin², YANG Xiao-hong^{1*}, LI Xiang-dong³, GU Qin-sheng^{2*}

(¹Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China; ²Biological Technology Center, Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China; ³College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271000, Shandong, China)

Abstract: The blood flesh of watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai] out broke on grafted watermelon in Jinan area, Shandong Province in 2011. The viral pathogen was suspected as its cause after survey in fields. Eighty samples of grafted watermelon leaves and fruits with viral symptoms and non-symptom collected from Jinan area, Shandong Province were detected by ELISA and RT-PCR. The results showed that 70 of these 80 samples were infected by *Cucumber green mottle mosaic virus*, preliminary confirming that CGMMV was the cause of blood flesh of watermelon in Jinan area, Shandong Province.

Key words: Watermelon; Blood flesh; CGMMV; ELISA; RT-PCR

2011 年 5 月, 山东省济南地区嫁接西瓜严重发生果实倒瓢, 当地农民称水瓢瓜, 通过实地调查, 症状显示病毒病的典型特征, 即全株性系统性特征, 叶片斑驳花叶。病果呈暗花红色水

收稿日期: 2012-02-09; 接受日期: 2012-03-06

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-26-13)

作者简介: 刘颖, 女, 硕士研究生, 专业方向: 微生物学与植物营养, E-mail: jsluoying@163.com

* 通讯作者 (Corresponding authors): 杨晓红, 教授, 博士生导师, 专业方向: 应用微生物学, E-mail: yangxh2@swu.edu.cn;

古勤生, 研究员, 博士生导师, 专业方向: 分子植物病理学, E-mail: guqsh@126.com

瓢样。据此初步推断是由黄瓜绿斑驳花叶病毒 (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) 侵染引起。笔者从发病的不同大棚嫁接西瓜种植地采集了 80 份样本, 通过酶联免疫吸附反应法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 测定, 并对其中的 27 份阳性样本采用反转录聚合酶链式反应 (real-time reverse transcription PCR, RT-PCR) 方法进行了进一步的验证, 证实了济南地区嫁接西瓜严重发生 CGMMV。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2011 年 5 月采集自济南地区疑似 CGMMV 侵染的嫁接西瓜叶片和瓜瓢样本共 80 份 (图 1), 采样时西瓜生育期为果实膨大期。SD1 ~ SD12 (章丘市), SD13 ~ SD20 (济阳县), SD21 ~ SD41、D1 ~ D10、H1 ~ H10 (平阴县), 西瓜叶片浓绿色并出现严重斑驳 (图 1-a、b), 瓜瓢倒瓢 (图 1-c), 带回实验室并于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存。

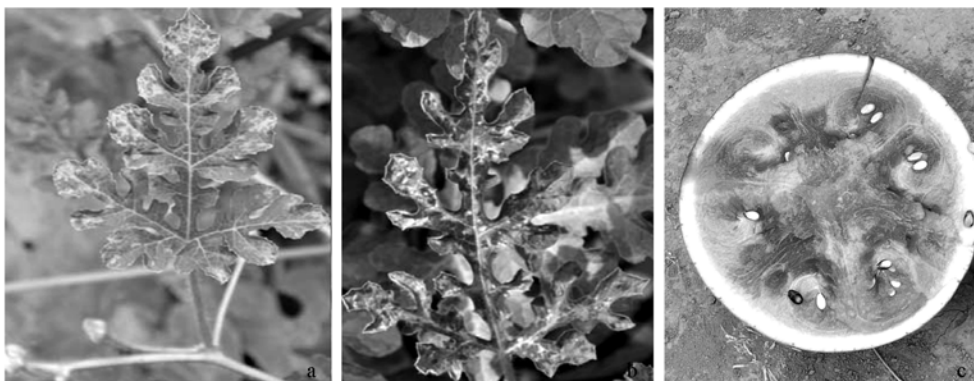


图 1 西瓜叶片和瓜瓢感染 CGMMV 症状

a, SD1 叶片; b, SD11 叶片; c, H9 瓜瓢。

1.2 试验方法

1.2.1 ELISA 检测 CGMMV 检测抗体购自北京安德珍生物科技公司, 按照说明书进行操作。

1.2.2 RT-PCR 检测 根据 GenBank 数据库中公布的 CGMMV 全序列设计 MP (Movement Protein, 运动蛋白) 引物, 引物序列如表 1 所示, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 用于 PCR 扩增的引物序列

引物	序列 (5'-3')	位置	扩增片段/bp	Tm/ $^{\circ}\text{C}$
CGF	YGGYTGATTTGTTACCCCTG	第 4737 ~ 4757 位	1 032	58.0
CGR	YTGAGTYTGGAARGCGGT	第 5861 ~ 5879 位	1 032	58.0

取冷冻西瓜叶片 0.1 g, 按照 TRIzol 试剂盒 (TaKaRa 宝生物工程有限公司) 的说明书提取植物总 RNA, 用 30 μL DEPC 处理的去离子水溶解沉淀, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。取 2 μL 5 \times M-MLV buffer、3.5 μL dNTP ($2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、1 μL 下游引物 ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、0.2 μL RNasin ($40\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)、3 μL 总 RNA、0.3 μL M-MLV 反转录酶 ($200\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 总体积 10 μL , 按照 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min 进行反转录。取 17.3 μL ddH₂O、2.5 μL 10 \times buffer、2 μL dNTP、上下游引物各 0.5 μL 、2 μL cDNA 模板、0.2 μL Taq DNA 聚合酶 ($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 总反应体系 25 μL , 按照 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 31 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min 的程序进行扩增。PCR 产物检测: 取 5 μL PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳、EB 染色后, 在凝胶成像系统上观察、拍照。

2 结果与分析

ELISA 检测呈阳性的西瓜叶片样品 (表 2) 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 样品

表 2 CGMMV 样本检测结果

编号	样本采集				ELISA 检测			RT-PCR 检测	编号	样本采集				ELISA 检测			RT-PCR 检测
	品种名称	采集地点	部位	症状	ABS	I/H	阳性判断			品种名称	采集地点	部位	症状	ABS	I/H	阳性判断	
D1	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.63	17.4	+	+	SD3	京欣王	章丘市	叶片	花叶斑驳	1.74	32.2	+	+
			瓜瓢	倒瓢	0.54	15.0	+	ND	SD4	京欣王	章丘市	叶片	花叶斑驳	1.45	26.9	+	+
D2	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.57	16.0	+	ND	SD5	京欣王	章丘市	叶片	花叶斑驳	1.52	28.3	+	ND
			瓜瓢	倒瓢	0.58	16.1	+	ND	SD6	京欣王	章丘市	叶片	花叶斑驳	1.42	26.4	+	+
D3	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.48	13.3	+	ND	SD7	京欣王	章丘市	叶片	花叶斑驳	0.01	0.1	-	ND
			瓜瓢	倒瓢	0.55	15.3	+	ND	SD8	京欣王	章丘市	叶片	花叶斑驳	0.05	0.9	-	ND
D4	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.66	18.4	+	ND	SD9	京欣王	章丘市	叶片	花叶斑驳	0.05	0.9	-	ND
			瓜瓢	倒瓢	0.60	16.6	+	ND	SD10	京欣王	章丘市	叶片	花叶斑驳	0.02	0.3	-	ND
D5	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.50	13.9	+	+	SD11	京欣王	章丘市	叶片	花叶斑驳	1.05	19.4	+	+
			瓜瓢	倒瓢	0.50	13.9	+	ND	SD12	京欣王	章丘市	叶片	花叶斑驳	1.28	23.8	+	ND
D6	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.61	16.9	+	ND	SD13	尚品	济阳县	叶片	花叶斑驳	1.61	29.9	+	+
			瓜瓢	倒瓢	0.64	17.8	+	ND	SD14	尚品	济阳县	叶片	花叶斑驳	1.40	26.0	+	ND
D7	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.63	17.5	+	+	SD15	尚品	济阳县	叶片	花叶斑驳	1.33	24.6	+	+
			瓜瓢	倒瓢	0.56	15.4	+	ND	SD16	尚品	济阳县	叶片	花叶斑驳	1.50	27.8	+	+
D8	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.57	16.0	+	+	SD17	尚品	济阳县	叶片	花叶斑驳	1.57	29.2	+	ND
			瓜瓢	倒瓢	0.61	16.8	+	ND	SD18	尚品	济阳县	叶片	花叶斑驳	1.35	25.0	+	+
D9	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.64	17.9	+	+	SD19	尚品	济阳县	叶片	花叶斑驳	1.38	25.7	+	+
			瓜瓢	倒瓢	0.44	12.1	+	ND	SD20	尚品	济阳县	叶片	花叶斑驳	1.54	28.5	+	ND
D10	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.71	19.7	+	+	SD21	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	1.41	26.2	+	+
			瓜瓢	倒瓢	0.57	16.0	+	ND	SD22	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	1.38	25.7	+	ND
H1	抗丰三	平阴县	叶片	无症状	0.21	5.9	+	+	SD23	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	1.47	27.4	+	+
			瓜瓢	倒瓢	0.56	15.5	+	ND	SD24	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	1.41	26.3	+	ND
H2	抗丰三	平阴县	叶片	无症状	0.58	16.1	+	+	SD25	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	1.27	23.5	+	ND
			瓜瓢	倒瓢	0.53	14.3	+	ND	SD26	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	1.43	26.5	+	+
H3	抗丰三	平阴县	叶片	无症状	0.32	8.8	+	+	SD27	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	1.27	23.5	+	ND
			瓜瓢	倒瓢	0.48	13.4	+	ND	SD28	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.21	3.8	+	ND
H4	抗丰三	平阴县	叶片	无症状	0.60	16.8	+	ND	SD29	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.02	0.4	-	ND
			瓜瓢	倒瓢	0.54	14.9	+	ND	SD30	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	1.54	28.6	+	+
H5	抗丰三	平阴县	瓜瓢	倒瓢	0.59	16.4	+	ND	SD31	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	1.34	24.9	+	+
H6	抗丰三	平阴县	叶片	无症状	0.28	7.7	+	ND	SD32	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	1.68	31.3	+	ND
			瓜瓢	倒瓢	0.54	15.0	+	ND	SD33	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.23	4.2	+	ND
H7	抗丰三	平阴县	叶片	无症状	0.60	16.6	+	ND	SD34	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.07	1.3	-	ND
			瓜瓢	倒瓢	0.45	12.5	+	ND	SD35	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.03	0.6	-	ND
H8	抗丰三	平阴县	叶片	无症状	0.50	13.8	+	ND	SD36	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.08	1.6	-	ND
			瓜瓢	倒瓢	0.25	6.9	+	ND	SD37	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.07	1.3	-	ND
H9	抗丰三	平阴县	叶片	无症状	0.57	15.9	+	+	SD38	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	1.44	26.7	+	ND
			瓜瓢	倒瓢	0.60	16.6	+	ND	SD39	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	1.41	26.2	+	+
H10	抗丰三	平阴县	叶片	无症状	0.50	13.9	+	ND	SD40	京欣王	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.05	1.0	-	ND
			瓜瓢	倒瓢	0.50	14.0	+	ND	SD41	京欣王	平阴县	叶片	花叶斑驳	1.68	31.2	+	ND
SD1	京欣王	章丘市	叶片	花叶斑驳	1.47	27.3	+	+	阳性对照	抗丰三	平阴县	叶片	花叶斑驳	0.51	14.3	+	+
SD2	京欣王	章丘市	叶片	花叶斑驳	1.74	32.2	+	+	阴性对照	抗丰三	平阴县	叶片	健康叶片	0.04	1.0	-	-

注: “+” 为阳性样品; ELISA 检测结果 I/H 值大于 3 认定为阳性; RT-PCR 检测结果出现清晰可见的特异性条带认定为阳性; “ND” 为未进行 RT-PCR 检测; I/H = (样本 ABS 值 - 空白对照 ABS 值) / (阴性对照 ABS 值 - 空白对照 ABS 值)。

中扩增出约 1 032 bp 的目标条带 (图 2), 与根据引物设计的片段大小一致, 而健康材料中未扩增出相应大小的片段。章丘市、济阳县和平阴县的 ELISA 检出率分别为 66.7%、100.0%和 90.0%。抗丰三、京欣王和尚品的 ELISA 检出率分别为 91.4%、64.3%和 100.0%。

对 ELISA 检测中呈阳性的 27 份样本进行了 RT-PCR 检测, RT-PCR 检测阳性率都为 100.0%。

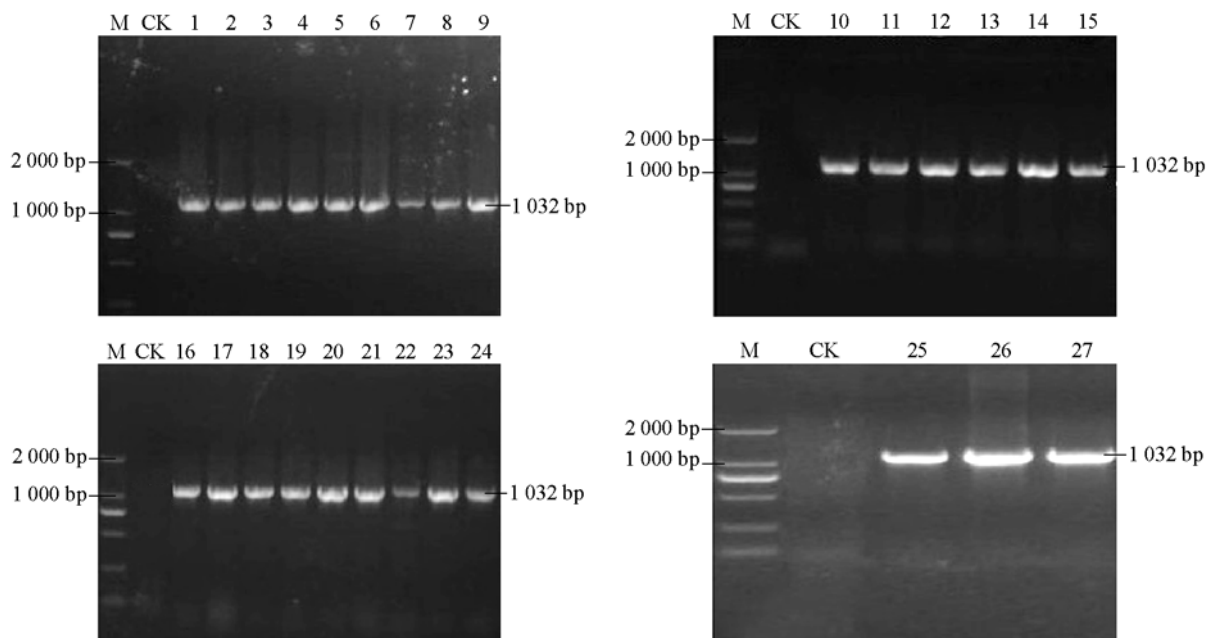


图 2 RT-PCR 检测结果

M, DL2000 Mark; CK, 阴性对照; 1~27, 分别代表样本 SD1、SD2、SD3、SD4、SD6、SD11、SD13、SD15、SD16、SD18、SD19、SD21、SD23、SD26、SD30、SD31、SD39、D1、D5、D7、D8、D9、D10、H1、H2、H3、H9。

3 结论与讨论

田永蕾等 (2009) 在山东西瓜上检测到了 CGMMV, 李晓颖等 (2010) 采用 RT-PCR 方法从山东泰安地区田间南瓜上检测到了 CGMMV。本试验从山东济南地区爆发西瓜倒瓢的 3 个地区 (章丘市、济阳县、平阴县) 不同瓜地采集了 80 份嫁接西瓜样本, 对其进行了 ELISA 检测, 然后对其部分阳性样本进行了 RT-PCR 验证, 结果表明有 70 份样本感染了 CGMMV 病毒, 可见 2011 年山东济南地区西瓜倒瓢是由该病毒侵染引起的。

西瓜倒瓢也称西瓜水瓢、血瓢, 可以由 CGMMV (Komuro et al., 1971; Choi, 2001; Boubourakas et al., 2004) 或生理原因引起, 李立梅等 (2010) 的研究表明压蔓期前接种该病毒可导致西瓜果实 100% 倒瓢, 压蔓期、授粉期接种西瓜倒瓢率分别为 48% 和 34%, 即使结瓜后再接种西瓜倒瓢率仍高达 18%。说明植株感染 CGMMV 的时期决定该病毒造成的倒瓢率。本试验所采集的叶片样本大多显症, 少数无症状, 但是被 CGMMV 感染的植株上的果实均出现倒瓢。

CGMMV 主要通过种子传播和田间农事操作接触传播, 也可以通过土壤、水、花粉等传播。随着工厂化育苗的广泛应用和棚室种植的推广, 在高密度的嫁接育苗、棚室种植的西瓜整枝打杈过程中, 种子所带的病毒会被大量传播。笔者调查发现, 有些地块该病发生率高达 90% 以上, 多数地块在 10%~30% 之间。病害的爆发与所采用的砧木种子来源高度相关, 对该疫区的西瓜种子和砧木进行了带毒和传毒分析, 也证明了这种相关性 (待发表)。在防治上应采取相应措施, 最根本的方法就是切断第一侵染源, 严格检疫。种子必须经过严格的干热处理, 确保种子不带

毒。相关植保植检部门要对所有出售瓜类种子的部门逐一清查,如发现病种立即销毁不得出售。同时要追查病种源头,从源头上处理带毒种子(古勤生,2007;李立梅等,2010)。

本试验结果表明,山东省济南地区2011年嫁接西瓜严重发生倒瓢是由CGMMV病毒侵染引起的。

参考文献

古勤生. 2007. 防治监控黄瓜绿斑驳花叶病毒,确保瓜类安全生产. 中国瓜菜, (1): 47-48.

李立梅, 吴元华, 赵秀香, 王文航, 王林, 蔡明. 2010. 黄瓜绿斑驳花叶病毒对西瓜产量、品质及种子带毒的影响. 植物保护, 36 (6): 82-86.

李晓颖, 江蓓蓓, 王迅, 景茂峰, 公娇芬, 竺晓平. 2010. 黄瓜绿斑驳花叶病毒山东南瓜分离物外壳蛋白基因序列分析. 山东农业科学, (7): 1-4.

田永蕾, 刘冬梅, 张永江, 李明福, 马占鸿. 2009. 黄瓜绿斑驳花叶病毒北京和山东分离物的生物学测定及其基因组比较. 植物检疫, 23 (6): 1-6.

Boubourakas I N, Hatziloukas E, Antignus Y, Katis N I. 2004. Etiology of leaf chlorosis and deterioration of the fruit interior of watermelon plants. Journal of Phytopathology, 152 (10): 580-588.

Choi G S. 2001. Occurrence of two tobamovirus diseases in cucurbits and control measures in Korea. The Plant Pathology Journal, 17 (5): 243-315.

Komuro Y, Tochiara H, Fukatsu R, Nagai Y, Yoneyama S. 1971. Cucumber green mottle mosaic virus (watermelon strain) in watermelon and its bearing on deterioration of watermelon fruit as 'konnyaku' disease. Ann Phytopath Soc Japan, 37: 34-42.

[http:// www. cnveg. org](http://www.cnveg.org) 或 <http:// www. cnveg. com. cn>

《中国蔬菜》 网站全新开通

实现在线投稿和过刊浏览

The screenshot displays the homepage of the 'China Vegetables' journal website. The header includes the journal's name in Chinese and English, along with logos of the Chinese Academy of Agricultural Sciences and the Ministry of Agriculture. A navigation bar lists various site functions like 'Home', 'Table of Contents', 'Editorial Board', etc. The main content area is divided into several sections: 'Current Table of Contents' (当期目录) featuring a thumbnail of the journal cover and a list of articles with their titles, authors, and download links; 'Information Dynamics' (信息动态) with news updates; and 'Recommended Articles' (推荐文章) highlighting specific research papers. The left sidebar contains a 'Reader Login' (读者会员登录) section and a 'Online Office' (在线办公) section for authors and editors.

《中国蔬菜》学术论文下载 www.cnveg.org