

侵染冬瓜的病毒病原种类鉴定

尤毅^{1,2}, 李华平², 谢大森^{1*}

(1. 广东省农业科学院蔬菜研究所, 广东省蔬菜新技术研究重点实验室, 广州 510640;

2. 华南农业大学资环学院, 广州 510642)

摘要 本研究在我国主要冬瓜产区采集具有典型病毒病症状的病叶材料 105 份, 根据葫芦科作物上常见的 5 种病毒病原的 CP 基因设计特异性引物, 对 105 份待检冬瓜材料进行 RT-PCR 检测。检测结果表明: 5 对特异引物可分别在 105 份待检材料的 95 份中检测到小西葫芦黄花叶病毒(*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV)、西瓜花叶病毒(*Watermelon mosaic virus*, WMV)、黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)、番木瓜环斑病毒(*Papaya ring-spot virus*, PRSV) 4 种病毒, 未检测到南瓜花叶病毒(*Squash mosaic virus*, SqMV); 并且发现不同的冬瓜主产区致病的病毒种类有较大差异; 同时还发现, 在这些待检样品中 4 种病毒复合侵染现象较普遍, 其中以 PRSV 与 WMV 组合最常见, 占复合侵染现象的 31.25%; 未发现 4 种病毒复合侵染。

关键词 冬瓜; 病毒病; 病原鉴定

中图分类号: S 432.41 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.02.033

Identification of pathogenic viruses infecting wax gourd

You Yi^{1,2}, Li Huaping², Xie Dasen¹

(1. *Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Provincial Key Lab for New Technology Research on Vegetables, Guangzhou 510640, China*; 2. *College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*)

Abstract According to the CP genes of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV) and *Squash mosaic virus* (SqMV), five pairs of specific primers were designed for RT-PCR. A total of 105 diseased wax gourd leaf samples with typical symptoms collected from the main producing area were amplified with the specific primers. ZYMV, WMV, CMV and PRSV were detected in the 95 diseased samples, and all the tested samples showed negative with SqMV. There were different types of pathogenic viruses in different main producing areas. Complex infection is very common, and 31.25% of them is mixed infection of PRSV and WMV, which is the most common one. No infection was found by all four viruses.

Key words wax gourd; virus disease; pathogen identification

冬瓜 [*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.] 属葫芦科冬瓜属, 是一年生攀缘性草本植物, 起源于中国和印度, 广泛分布于亚洲的热带、亚热带及温带地区, 目前以中国、东南亚和印度等地种植为主。冬瓜是一种经济价值高的农作物, 在我国冬瓜栽培已有 2 000 多年的历史, 年播种面积达 25 万 hm²。由于市场需求的增加, 冬瓜的栽种面积逐年扩大, 复种指数提高, 导致冬瓜上的病害日益严重。过去人们的关注焦点主要集中在疫病、枯萎病等真菌病害, 在这些方面做了大量的研究工作。近

年来, 冬瓜病毒病呈上升趋势, 所造成的危害已超过真菌病害, 2003 年以来, 华南地区的冬瓜主产区冬瓜病毒病暴发成灾, 造成冬瓜大幅减产, 严重的甚至绝产绝收^[1]。

引发冬瓜病毒病的病毒种类各国相继有报道。Samretwanich 等^[2]认为番茄卷叶病毒(*Tomato leaf curl virus*) 是冬瓜病毒病的主要病原物, Chen 等^[3-4]报道台湾冬瓜病毒病的病原物是番茄斑萎病毒属(*Tospovirus*) 成员, 可能是西瓜银色斑驳病毒(*Watermelon silver mottle virus*, WSMV) 的 1 个

收稿日期: 2015-02-14 修订日期: 2015-04-17

基金项目: 广州市产学研协同创新重大专项(201508020085); 广东省公益研究与能力建设专项资金项目(20140202)

* 通信作者 E-mail: xiedasen@126.com

菌株。Tsuda 等^[5]分析了从 5 个不同寄主上分离的 *Tospovirus* 属毒株,发现冬瓜分离物的蛋白质分子量是 32 kD, S RNAs 的分子量是 1.21×10^6 , 与 WSMV 的序列同源率达 97%。Okuda 等^[6]也证实日本导致冬瓜产生病毒病的是 WSMV。Tomassoli 等^[7]首次报道香石竹斑驳病毒属 (*Carmovirus*) 成员甜瓜坏死病毒 (*Melon necrotic spot virus*, MNSV) 是意大利冬瓜病毒病的病原物。这说明不同地区或国家引起冬瓜病毒病的病毒种类可能不一样。

目前,我国发现的侵染葫芦科作物的病毒中,分布最广、危害最重的有 5 种,即小西葫芦黄花叶病毒 (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV)、西瓜花叶病毒 (*Watermelon mosaic virus*, WMV)、黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)、番木瓜环斑病毒 (*Papaya ringspot virus*, PRSV) 和南瓜花叶病毒 (*Squash mosaic virus*, SqMV)^[8]。由于缺乏有关冬瓜病毒病原种类的调查报告,本研究调查了葫芦科作物上 5 种常见的病毒在冬瓜上的发生情况,以及我国各主要冬瓜产区的病毒病发病及病原分布情况,可为冬瓜病毒病抗性育种提供依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

待检材料:具有典型或可疑病毒病症状的冬瓜材料 105 份,分别采自我国冬瓜主产区,主要包括广东三水(7 份)、台山(5 份)、徐闻(8 份)、清远(英德 8 份,清新 3 份)、广州(白云 7 份,番禺 4 份);江西樟树(7 份);湖南(长沙 4 份,浏阳 6 份);陕西(西安 2 份,宝鸡 4 份);重庆(4 份);广西(南宁 11 份,桂林 5 份);江苏大丰(9 份)以及海南(文昌 5 份,儋州 6 份),保存于 -80°C 超低温冰箱。

阳性对照:ZYMV、WMV、SqMV 毒源由中国农业科学院郑州果树研究所古勤生研究员惠赠,CMV 和 PRSV 由华南农业大学植物病毒研究室提供。所有阳性对照均采用摩擦接种的方法接种到西葫芦 (*Cucurbita pepo* L.) 叶片上,待显症后采用 DAS-ELISA 法进行检测,确认病原为唯一病毒病原后,取叶片干燥保存。

1.2 方 法

1.2.1 冬瓜叶片总 RNA 的提取

使用天根公司 RNAPrep pure 植物总 RNA 提

取试剂盒(离心柱型)提取待测样品和阳性对照的叶片总 RNA,具体提取步骤参照产品说明书。

(1)匀浆处理:取 50~100 mg 冬瓜叶片,在液氮中迅速研磨成粉末状,加入 450 μL 裂解液 RL(使用前加入 β -巯基乙醇,终浓度为 2%),混匀后室温放置 5 min。

(2)13 400 g 离心 5 min,取上清(约 400 μL)于另一新离心管。

(3)缓慢加入上清 0.5 倍体积的无水乙醇,混匀(此时可能会出现沉淀),将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱 CR3 中,13 400 g 离心 60 s,弃掉收集管中的废液,并将吸附柱 CR3 放回收集管中。

(4)向吸附柱 CR3 中加入 700 μL 去蛋白液 RW1,13 400 g 离心 60 s,弃掉收集管中的废液,将吸附柱 CR3 放回收集管中。

(5)向吸附柱 CR3 中加入 500 μL 漂洗液 RW(使用前已按比例加入无水乙醇),室温静置 2 min,13 400 g 离心 60 s,弃掉收集管中的废液,并将吸附柱 CR3 放回收集管中。

(6)重复步骤(5)。

(7)13 400 g 空柱离心 2 min,取出后将吸附柱 CR3 置于室温放置数分钟,以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

(8)将吸附柱 CR3 放入一个新的 RNase-free 离心管中,向吸附膜中间部位悬空滴加 50 μL RNase-free ddH₂O,室温静置 2 min,13 400 g 离心 2 min,得到 RNA 溶液。

RNA 溶液保存于 -80°C 冰箱。

1.2.2 冬瓜病毒病原 RT-PCR 检测

1.2.2.1 引物设计

根据文献报道及已有的病毒 CP 基因序列,设计引物组合(表 1)。

1.2.2.2 RT-PCR 扩增

采用宝生物工程(大连)有限公司 Reverse Transcriptase M-MLV(RNase H⁻)进行反转录,常规 PCR 扩增。反转录体系及 PCR 扩增体系参考产品说明书,5 种病毒的 PCR 扩增参数见表 2。PCR 产物 4°C 保存,取 8 μL 在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳,PCR 检测呈阴性的待检材料,重复 1 次 RT-PCR 扩增,若结果仍为阴性,则重新提取 RNA,再次进行 RT-PCR 扩增,若检测结果仍为阴性,即认为该材料不含有病毒。

表 1 检测 5 种病毒毒原 CP 基因的特异性引物

Table 1 Specific primers for detection of CP gene in the five virus pathogens by RT-PCR

引物名称 Primers	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物长度/bp Length of the amplified product
ZYMV-F	CTTTGCAAATGGAGATGACCTGATACTT	1 493
ZYMV-R	ACGGCACTCCTGGACAACATAACATAAAC	
WMV-F	TGGATCCTGGGATAGGAGCAAG	1 178
WMV-R	TGTCGACATAACGACCCGAAATG	
CMV-F	GTCGTCCAACCTATTAACCACCCAACC	662
CMV-R	GATTTCTCCACGACTGACCATTTTAGC	
PRSV-F	AGGGAGTGAGGAATGATTATGGTCT	465
PRSV-R	CTCCGTGTTTTCTTCCTTGTTACTG TACAGTGGATCCATGGTTCTACTGC-	
SqMV-R	CCAGAAATTCCTAGTA	1 135
SqMV-F	TACTTATCTAGAACCATGGAGCTAGATCTTGCGCAACT	

表 2 5 种病毒的 PCR 扩增参数¹⁾

Table 2 PCR amplification parameter for each virus

反应温度/℃ Temperature	反应时间 Reaction time				
	ZYMV	WMV	CMV	PRSV	SqMV
94	5 min	2 min	2 min	5 min	2 min
94	30 s	30 s	30 s	30 s	1 min
50	30 s	30 s	30 s	30 s	1 min
72	70 s	90 s	40 s	1 min	150 s
72	10 min	10 min	10 min	10 min	7 min
4	∞	∞	∞	∞	∞

1) 循环次数均为 35 次。∞代表反应时间不限定,直到样品取出为止。
35 cycles. ∞ indicated reaction time was unlimited till the samples were taken out.

2 结果与分析

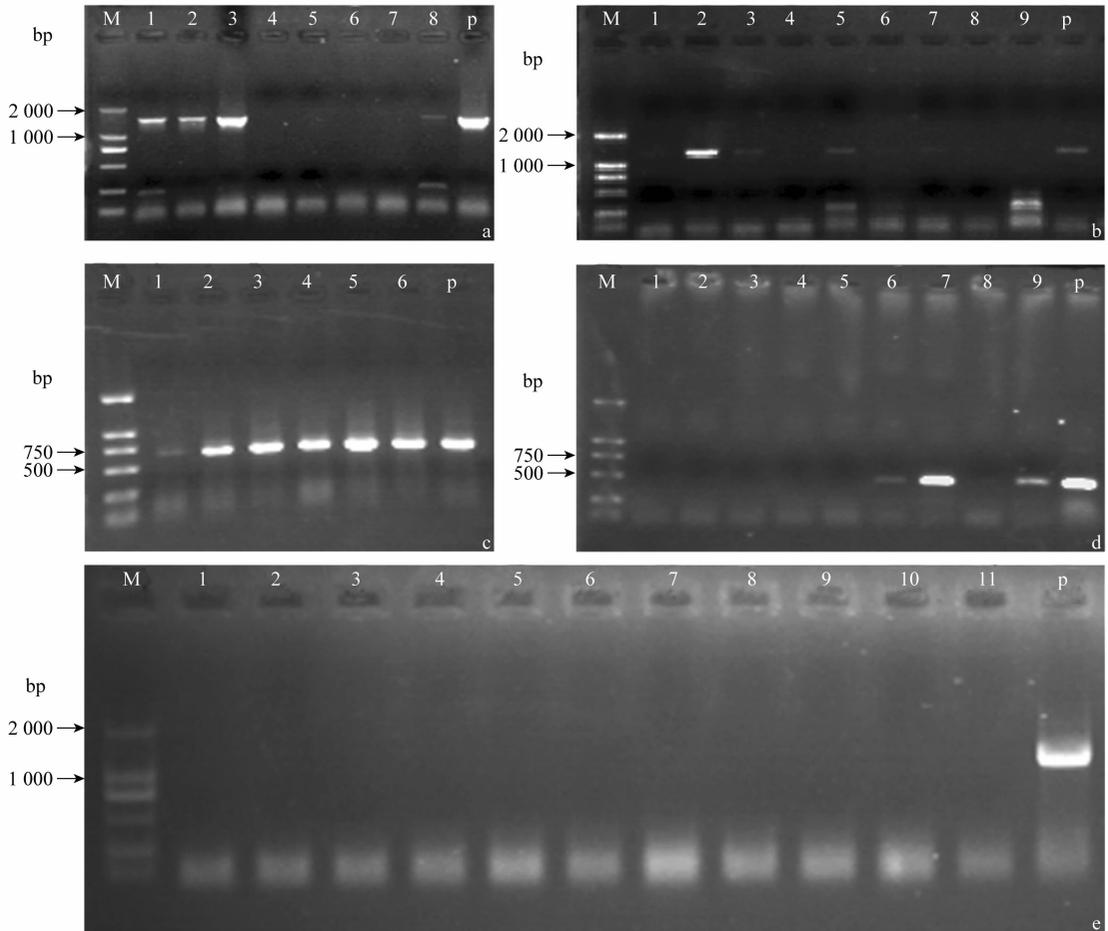
2.1 RT-PCR 扩增结果

在西葫芦上分别接种 5 种病毒,取有明显症状的叶片作为阳性对照。以待测样品及阳性对照的总 RNA 作为模板,分别用不同的引物对进行 RT-PCR 扩增。部分检测结果见图 1,阳性对照和待检样品中,引物 ZYMV-F/ZYMV-R 可扩增出大小约 1 500 bp 的条带(图 1a);引物 WMV-F/WMV-R 可扩增出大小约为 1 200 bp 的条带(图 1b);引物 CMV-F/CMV-R 可扩增出大小约 660 bp 的条带(图 1c),引物 PRSV-F/PRSV-R 可扩增出大小约 500 bp 的条带(图 1d);引物 SqMV-F/SqMV-R 仅在阳性对照中能扩增出大小约 1 100 bp 的条带(图 1e),在所有的待检材料中均没扩出目标条带。3 次重复检测结果一致。这表明在待检样品中能分别检测出 CMV、ZYMV、PRSV 和 WMV,但未检测到 SqMV。

2.2 各地区的发病情况统计

不同地区的待检材料 RT-PCR 检测结果见表 3。105 份材料中有 95 份分别检出 ZYMV、CMV、PRSV 和 WMV 4 种病毒,未检测出 SqMV,阳性检出率达 90.48%。其中阳性检出率最高为 PRSV 和 WMV(检出率分别达 47.62%和 45.72%),其次为 ZYMV 和 CMV(检出率分别达 24.76%和 21.90%)。按待检材料的采集区域来看,广东大部分区域(除广州白云、徐闻外)及海南所采的样品中,未检出 ZYMV;在广东清新、徐闻、海南、江西、江苏及湖南地区采集的样品中,未检出 CMV;在广东番禺、清新、陕西西安和宝鸡采集的样品中未检出 WMV;在各地区的样品中均能检出 PRSV;在所有的样品中,均未检出 SqMV。这些结果表明,PRSV 与 WMV 在我国主要冬瓜产区可能分布最为广泛,其次是 ZYMV 与 CMV,在冬瓜上尚未发现 SqMV。

表 3 的结果反映出在各地区普遍存在不同病毒的复合侵染现象。其中有 2 种病毒复合侵染,也有 3 种病毒复合侵染,但未见 4 种病毒复合侵染。且病毒组合多种多样,有 ZYMV 与 CMV 组合, ZYMV 与 PRSV 组合, ZYMV 与 WMV 组合, PRSV 与 WMV 组合, PRSV 与 CMV 组合, WMV 与 CMV 组合, ZYMV、WMV 与 PRSV 组合, ZYMV、WMV 与 CMV 组合, ZYMV、PRSV 与 CMV 组合。2 种病毒复合侵染,以 PRSV 与 WMV 组合最常见,在 95 份检出样品中有 15 份材料,占复合侵染组合的 31.25%;3 种病毒复合侵染则相对较少,共 5 份材料,其中有 3 份是 ZYMV、WMV 和 PRSV 组合。



a: ZYMV; b: WMV; c: CMV; d: PRSV; e: SqMV. M: DL2000 marker; P: 阳性对照; 其余泳道为待检材料
P: Positive control; The remaining channels are samples to be tested

图 1 5 种葫芦科常见病毒在部分冬瓜待检材料上的检测结果

Fig. 1 RT-PCR detection results of partial wax gourd samples

表 3 各地区冬瓜待检材料 5 种病毒的 RT-PCR 检测结果

Table 3 RT-PCR detection results of wax gourd samples from different areas

采集地 Site	样品总数/份 Total number of samples	携带不同病毒样本数/份 Number of samples with different viruses					复合侵染 Mixed infection		阳性检出率 Positive rate	
		ZYMV	CMV	PRSV	WMV	SqMV	份数 Number	百分率/% Percentage	份数 Number	百分率/% Percentage
白云 Baiyun	7	3	3	2	4	0	4	55.56	6	85.71
番禺 Panyu	4	0	1	2	0	0	0	0	3	75.00
清新 Qingxin	3	0	0	1	0	0	0	0	1	33.33
英德 Yingde	8	0	2	6	6	0	8	100	8	100
三水 Sanshui	7	0	3	2	5	0	3	42.86	7	100
台山 Taishan	5	0	1	1	3	0	1	20.00	4	80.00
徐闻 Xuwen	8	2	0	5	5	0	5	62.50	7	87.50
江苏 Jiangsu	9	6	0	5	4	0	6	66.67	9	100
江西 Jiangxi	7	2	0	2	4	0	2	28.57	7	100
陕西 Shaanxi	6	1	6	4	0	0	5	83.33	6	100
海南 Hainan	11	0	0	6	2	0	2	18.18	9	81.82
湖南 Hunan	10	3	0	4	6	0	2	20.00	10	100
广西 Guangxi	16	7	6	8	7	0	7	43.75	14	87.50
重庆 Chongqing	4	2	1	2	2	0	3	75.00	4	100
合计 Total	105	26	23	50	48	0	48	45.71	95	90.48

各地区样品的病毒检出率都较高,广东三水和英德、陕西、江西、江苏、湖南及重庆地区的检出率达到 100%,清新地区检出率最低。由于本研究所采集的冬瓜样品均为具有典型病毒病症状的冬瓜叶片,但部分样品未检出上述 5 种病毒中的任意一种,说明除了这 5 种病毒外,可能还存在其他种类的病毒危害冬瓜生产。

3 讨论

从本研究的结果来看,侵染冬瓜的病毒病原主要有 ZYMV、CMV、PRSV 和 WMV 4 种,未检测出 SqMV 阳性的材料。利用机械摩擦人工接种冬瓜叶片, SqMV 可以成功接种,并在冬瓜叶片上产生典型的病毒病病斑^[9],本研究在所有供试冬瓜材料中未检出 SqMV 的主要原因有:(1)病毒毒原的分布具有地区性,在我国,报道该病毒发生的地方并不多,目前只在黑龙江的南瓜(*Cucurbita moschata*)^[10],新疆^[11-13]、甘肃^[12]的甜瓜(*Cucumis melo*),山西运城的南瓜^[14]、河南开封和孟津的西葫芦(*Cucurbita pepo*)^[14]上发现。(2)样品采样的主要依据是冬瓜叶片上有无病斑,由于病毒侵染具有潜伏期,在潜伏期内植株不表现症状,导致漏采。(3)采样量少,一方面的原因是采样地点具有病毒病症状的植株少;有的病株已经枯萎,失去研究的可能性;另一方面,采样地点发病植株表现的症状非常相似,具有差异的病株较少,导致重复采样。

本研究中,尚有部分材料具有典型病毒病症状,但对 5 种所检病毒均呈阴性的材料,未检出病毒的原因主要有:(1)保存时间过长且保存条件不好,导致 RNA 降解。(2)材料受到除本文涉及的 5 种病毒以外的其他病毒侵染,据目前的报道,冬瓜上的病毒病原除了本研究所涉及的 5 种外,已经确认的还有黄瓜绿斑驳花叶病毒、西瓜银色斑驳病毒^[4]、番茄曲叶病毒^[2]、马蹄莲褪绿斑病毒^[15]等,其中有部分为检疫病毒,但如黄瓜绿斑驳花叶病毒在我国已有相关报道,不排除该病毒侵染冬瓜的可能性。

参考文献

- [1] 谢大森,柯剑,何晓明,等. 多抗冬瓜材料的获得及其生理变化规律初步研究[J]. 热带作物学报, 2011, 32(9): 1665 - 1668.
- [2] Samretwanich K, Chiemsoombat P, Kittipakorn K, et al. Yellow leaf disease of cantaloupe and wax gourd from Thailand caused by *Tomato leaf curl virus* [J]. Plant Disease, 2000, 84(2): 200.
- [3] Chen C C, Ho H M, Chang T F. Characterization of a tospovirus-like virus isolated from wax gourd [J]. Plant Protection Bulletin (Taipei), 1995, 37(1): 117 - 131.
- [4] Chen C C, Ko W F, Pai K F. Ecology of *Watermelon silver mottle virus* disease on watermelon in Taiwan [J]. Plant Pathology Bulletin, 2004, 13(4), 317 - 328.
- [5] Tsuda S, Kameya-Iwaki M, Hanada K, et al. Grouping of five tospovirus isolates from Japan [J]. Acta Horticulturae, 1996 (431): 177 - 185.
- [6] Okuda M, Takeuchi S, Taba S, et al. *Melon yellow spot virus* and *Watermelon silver mottle virus*; outbreak of cucurbit infecting tospovirus in Japan [J]. Acta Horticulturae, 2002(588): 143 - 148.
- [7] Tomassoli L, Barba M. Occurrence of melon necrotic spot carmovirus in Italy [J]. Bulletin OEPP, 2000, 30(2): 279 - 280.
- [8] 彭斌,顾青,古勤生,等. 5 种病毒侵染葫芦科作物的症状观察[J]. 中国西瓜甜瓜, 2004(6): 14 - 16.
- [9] 尤毅,鄢慧琼,李华平,等. 冬瓜人工接种 5 种病毒后的症状观察[J]. 中国蔬菜, 2009(22): 58 - 62.
- [10] 李凤梅. 黑龙江省南瓜病毒病原鉴定和品种资源抗性筛选的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2002.
- [11] 裴美云,邱平生,谢浩,等. 哈密瓜花叶病毒病的研究 I 病原学[J]. 植物病理学报, 1982, 12(4): 27 - 32.
- [12] 魏宁生,张满良,吴云峰,等. 新疆、甘肃甜瓜病毒病的鉴定及防治[J]. 植物病理学报, 1991, 18(1): 81 - 85
- [13] 赵荣乐. 感染新疆甜瓜的南瓜花叶病毒的鉴定[J]. 喀什师范学院学报, 2004, 25(3): 46 - 50.
- [14] 古勤生,田延平,彭斌,等. 基于外壳蛋白基因序列对 3 种葫芦科作物病毒的分子分析[J]. 植物病理学报, 2008, 38(4): 357 - 363.
- [15] Chen C C, Chen T C, Lin Y H, et al. A Chlorotic spot disease on calla lilies (*Zantedeschia* spp.) is caused by a tospovirus serologically but distantly related to *Watermelon silver mottle virus* [J]. Plant Disease, 2005, 89(5): 440 - 445.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 150 页)

- [15] 王振荣,高同春,顾江涛,等. 猕猴桃溃疡病主要发病条件研究[J]. 安徽农业科学, 1998, 26(4): 347 - 348.
- [16] 李瑶,承河元,方书苗,等. 猕猴桃细菌性溃疡病流行预测初探[J]. 应用生态学报, 2001, 12(3): 355 - 358.
- [17] 王永兰,杜永章,施正伟. 猕猴桃溃疡病发生特点及综合防治技术[J]. 现代农业科技, 2009(23): 188.

- [18] 金平涛,冯华,吕岩. 猕猴桃溃疡病的发生特点和综合防治技术[J]. 植保技术与推广, 2003, 23(8): 27 - 28.
- [19] 李瑶,承河元,方书苗,等. 猕猴桃溃疡病流行的生态因子及药剂对病菌的抑菌作用[J]. 应用生态学报, 2001, 12(3): 359 - 362.

(责任编辑: 杨明丽)