

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2016.03.010

黄瓜资源对黄瓜绿斑驳病毒广东分离物的抗性水平鉴定

汤亚飞^{1,2}, 何自福^{1,2*}, 余小漫¹, 林毓娥³, 蓝国兵¹

¹广东省农业科学院植物保护研究所, 广东 广州 510640; ²广东省植物保护新技术重点实验室, 广东 广州 510640; ³广东省农业科学院蔬菜研究所, 广东 广州 510640

摘要:【背景】黄瓜绿斑驳花叶病毒(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)是严重威胁葫芦科作物生产的毁灭性病原之一,该病毒已入侵我国十多个省份,危害西瓜、黄瓜等作物并造成严重的经济损失。早在2009年广东即发现CGMMV为害西瓜和黄瓜,但黄瓜等葫芦科作物对其抗性情况尚不清楚。【方法】采用人工机械摩擦接种方法,测定了14份黄瓜种质资源对CGMMV广东分离物的抗性水平。【结果】从广东葫芦病样中分离获得CGMMV,该病毒分离物MP基因序列与国内报道的各分离物同源率均在99%以上;14份黄瓜种质资源对该病毒分离物均表现为感病。【结论与意义】广东主要黄瓜资源对CGMMV均表现为感病,这为我省防控该病毒病提供了科学依据,也为黄瓜抗病育种提供了指导。

关键词: 黄瓜绿斑驳花叶病毒; 黄瓜种质资源; 抗性水平

Identification of cucumber germplasm resistance to *Cucumber green mottle virus* Guangdong isolate

Ya-fei TANG^{1,2}, Zi-fu HE^{1,2*}, Xiao-man SHE¹, Yu-e LIN³, Guo-bing LAN¹

¹Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China;

²Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Guangzhou, Guangdong 510640, China;

³Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China

Abstract:【Background】*Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) is one of the most devastating pathogens of cucurbit crops. The virus has invaded more than ten provinces of China and infected crops such as watermelon and cucumber, causing serious economic losses. CGMMV infected watermelon and cucumber in Guangdong Province in 2009, but the resistance of cucumber and other cucurbits was unknown.【Method】The resistance of 14 cucumber germplasms to a CGMMV isolate was tested using artificial mechanical inoculation and nucleotide sequencing.【Result】The MP nucleotide sequence of CGMMV of Guangdong isolate from the diseased cucurbit samples was 99% similar to other isolates of CGMMV collected in China. All of 14 cucumber germplasms were susceptible to the isolate of CGMMV.【Conclusion and significance】The main cucumber germplasms from Guangdong are not resistant to CGMMV. This result provides a scientific basis for control of CGMMV, and some guidance for cucumber breeding to resist CGMMV in Guangdong.

Key words: *Cucumber green mottle mosaic virus*; cucumber germplasm; resistance levels

黄瓜绿斑驳花叶病毒(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)是一种大小为300 nm×18 nm的直杆状、正单链RNA病毒,属芜菁花叶病毒科Tymoviridae烟草花叶病毒属*Tobamovirus*(Hollings *et al.*, 1975)。CGMMV极易通过汁液传播,也是典

型的种传病毒,种子带毒是其主要的远距离传毒方式,也可通过嫁接、菟丝子传播(冯兰香等, 2007)。该病毒自然寄主范围较窄,主要包括黄瓜、西瓜、甜瓜、瓠子、南瓜、葫芦、丝瓜、苦瓜等葫芦科作物。田间症状表现为叶片斑驳、畸形、花叶、有绿色凸起、

收稿日期(Received): 2016-05-11 接受日期(Accepted): 2016-06-27
基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201303028); 广东省科技计划项目(2014B070706017、2014B020202004)
作者简介: 汤亚飞, 女, 硕士研究生。研究方向: 植物病毒。E-mail: yf.tang1314@163.com
* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: hezf@gdppri.com

脉间黄化、叶脉呈绿带状,并伴随植株矮化等,严重影响作物的品质和产量,是威胁葫芦科作物生产的重要病毒之一(李小妮等,2009)。

Ainsworth(1935)首次报道在英国黄瓜上发生了 CGMMV 为害。目前,欧洲、亚洲、南美洲的 20 多个国家已有报道(陈京和李明福,2007)。在中国,Hseu *et al.* (1987)首次在中国台湾的冬瓜、西瓜、甜瓜和黄瓜上分离鉴定出该病毒,表明该病毒正式入侵我国。随后,在广西(秦碧霞等,2005)、甘肃(李红霞等,2007)、辽宁(陈红运等,2009)、北京(田永蕾等,2009)、广东(李小妮等,2009)、山东(田永蕾等,2009;王云等,2014)、云南(吴鑫等,2010)、湖北(汤少云等,2011)、浙江(林燚等,2012)、湖南(赵慧茹等,2013)、江苏(任春梅等,2013)、上海(胡亚萍等,2013)、海南(王峰等,2014)、山西(杜江等,2015)、贵州(王莉爽等,2015)等地的棚室保护地及大田栽培的瓜类作物上陆续发现该病毒。由于 CGMMV 已在我国部分地区造成大田瓜类作物的毁灭性损失,农业部发布了第 788 号公告,将其确定为全国农业植物检疫性有害生物。

选育和种植抗病品种是防治植物病毒最有效、最经济的措施,而筛选抗病材料和抗病基因是该措施的前提。笔者在调查广东 CGMMV 的发生与为害基础上,通过人工接种评价了主要黄瓜种质资源的抗性水平,以期为黄瓜抗病育种及 CGMMV 的综合防控提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

病源材料:葫芦病叶于 2014 年 1 月采自广东省佛山市三水区瓜类产区,病株主要表现为叶片严重花叶,有轻微泡状凸起,田间发病率 100%。

供试材料:14 份黄瓜种质资源由广东省农业科学院蔬菜研究所提供。

1.2 毒原的检测、鉴定与分离

1.2.1 血清学检测 取葫芦病叶 100 mg,按 1 g : 10 mL 加入 0.01 mol · L⁻¹ PBS (pH7.2) 研磨,8000 r · min⁻¹ 离心 3 min,上清液为葫芦病叶粗提液。参照董晓辉等(2009)的方法,用 CMV、CGM-MV 单克隆抗体对葫芦病叶粗提液进行 Dot-ELISA

血清学检测。CMV、CGMMV 单克隆抗体由浙江大学谢艳教授惠赠。

1.2.2 RT-PCR 检测 应用 RNA 提取试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)分别抽提葫芦病样叶片的总 RNA,以提取的葫芦病样总 RNA 4 μL 作模板,用随机引物(TaKaRa 公司)逆转录合成 cDNA。利用 CGMMV MP 基因的特异引物 CGMMV-F(5'-CCACGAGTTGTTTCCTAATGC TG-3')和 CGMMV-R(5'-TTTGCTAGGCGTGATCGGATTGT-3')进行 PCR 扩增,目的片段大小为 870 bp,PCR 产物在 1%的凝胶电泳上检测。PCR 产物直接送上海生工生物技术有限公司测序,DNAStar 软件(DNASTAR Inc, Madison, USA)对所获得的基因序列进行拼接,BLAST 程序进行序列相似性搜索,DNAStar 的 MegAlign 进行序列比较分析。

1.2.3 毒原的分离 将 CGMMV 葫芦病样人工摩擦接种到子叶期黄瓜上,接种后 30 d,采集发病叶,应用 RT-PCR 方法对其再检测与验证。

1.3 抗病性鉴定

对上述经过人工摩擦接种的子叶期的黄瓜苗进行繁殖,用于抗病性测定。待黄瓜苗长至子叶期,取繁殖的毒原病叶,按 1 g 病叶 : 10 mL 0.01 mol · L⁻¹ 磷酸缓冲液 (pH7.2) 进行研磨匀浆,用缓冲液再稀释 10 倍后用于人工摩擦接种。每个处理 40 株,3 次重复。接种后,每 2 周调查一次接种株的病情指数。接种后第 8 周,待各处理病株的病情基本稳定,可根据此时的病情指数对待鉴定品种的抗病性水平进行评价。

1.4 抗病性评价标准

病情指数分级标准:0 级,无任何发病症状;1 级,心叶明脉或轻花叶;3 级,心叶及中部叶片花叶、斑驳;5 级,多数叶片花叶,少数叶片畸形、产生泡状凸起,植株轻度矮化;7 级,重花叶,多数叶片产生浓绿泡状凸起或叶脉绿带、畸形、皱缩,植株矮化;9 级,重花叶,叶片明显畸形,植株严重矮化甚至死亡。

$$\text{病情指数(DI)} = \frac{\sum (\text{各级病株数} \times \text{相对级数值})}{\text{调查总株数} \times \text{最高级数值}} \times 100$$

根据病情指数将参试材料的抗性水平分为 5 类:免疫(I),DI 为 0;高抗(HR),0 < DI ≤ 5;抗病(R),5 < DI ≤ 20;耐病(MR),20 < DI ≤ 40;感病(S),40 < DI。

运用 Excel 对数据做统计分析。

2 结果与分析

2.1 毒原的检测、鉴定与分离

2.1.1 病原血清学检测结果 Dot-ELISA 检测结果显示,采集的葫芦疑似病样叶组织粗提取液与 CGMMV 单克隆抗体反应均为阳性,而与 CMV 单克隆抗体反应均为阴性,说明该葫芦病样受到 CGMMV 的侵染。

2.1.2 病原 RT-PCR 检测结果 利用 CGMMV MP

基因的特异引物 CGMMV-F/CGMMV-R 进行 RT-PCR 检测,从上述所有葫芦疑似病样的 cDNA 中均能扩增到 1 条预期大小 870 bp 的特异片段,而健康葫芦样品中未扩增出任何片段(图 1)。对 PCR 产物纯化测序,在 NCBI 中进行 BLAST 比对发现,分离自广东葫芦病叶的 CGMMV MP 基因序列与中国其他地区报道的序列同源率均在 99% 以上,进一步证实该葫芦病样受到 CGMMV 的侵染。

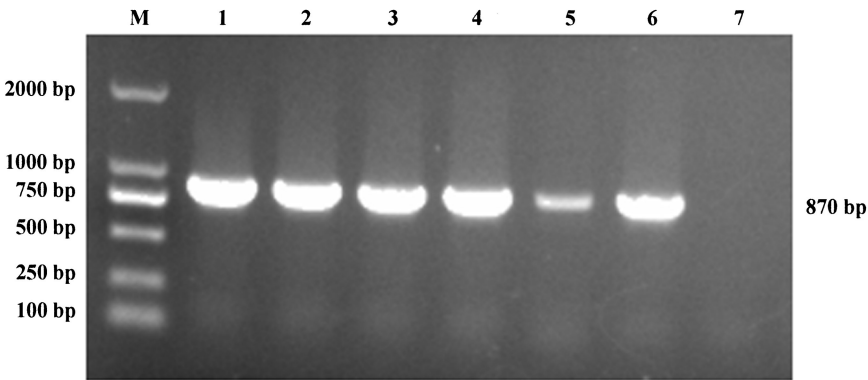


图 1 葫芦病样 RT-PCR 检测结果

Fig.1 Detection result of the diseased cucurbit samples using RT-PCR

M:2000 bp marker; 1~6: 葫芦病样; 7:健康葫芦样品。

M: 2000 bp marker; 1~6: Diseased samples; 7: Healthy sample.

2.1.3 毒原的分离 人工摩擦接种 30 d 后,黄瓜新出的真叶表现为花叶、有绿色泡状凸起。RT-PCR 检测表明,这些接种发病的黄瓜样品受到 CGMMV 的侵染,可作为 CGMMV 的毒原用于抗性评价。

2.2 黄瓜种质资源抗性鉴定结果

应用人工摩擦接种方法将 CGMMV 广东分离物分别接种到 14 份黄瓜上。接种后第 8 周,各处理病情基本稳定,统计各处理的病情指数。结果显示(表 1):G17 的平均病情指数最高(100%),YF 的平均病情指数最低(71.54%)。方差分析显示,YF 与其余 13 份黄瓜种质的病情指数差异达到极显著水平;K13 与其余 12 份黄瓜种质的病情指数差异达到极显著水平;A4 * YF 与 G13、A8、B80、G13 * G28、力丰及 G17 差异达到极显著水平,与 B35、N2、G6 差异也达到显著水平;82 大与 G13、A8、B80、G13 * G28、力丰及 G17 差异达到极显著水平,与 G6 差异达到显著水平;A4 与 G17 差异达到极显著水平,与 G13、A8、B80、G13 * G28、力丰差异

也达到显著水平;其余种质病情指数间差异均未达到显著水平。虽然参试的 14 份黄瓜种质的病情指数存在不同程度的差异,但这 14 份黄瓜种质对 CGMMV 抗性水平均表现为感病。

3 讨论

将分离自葫芦病样上的 CGMMV 广东分离物,通过人工摩擦接种方式,评价 14 份黄瓜种质的抗性水平。结果显示,该病毒分离物对黄瓜具有强致病力,这些黄瓜均表现为感病,表明我省主要黄瓜育种资源缺乏抗 CGMMV 的材料,需要进一步广泛收集和筛选,以满足黄瓜抗病新品种选育及 CGMMV 综合防控要求。

对 CGMMV 广东分离物的 MP 基因进行克隆及序列分析,该序列与国内报道的各分离物同源率高达 99% 以上,说明侵染广东葫芦的病毒分离物是 CGMMV 的一个分离物。

自 2005 年首次在我国大陆报道发现 CGMMV 以来,全国有多个省份先后出现了 CGMMV 的疫情。吴元华等(2010)对 CGMMV 在我国的风险性

进行了分析,认为 CGMMV 定殖、扩散的可能性极高,属于高度危险性的有害生物。一旦瓜类作物被侵染,则防治较为困难,做好该病害的预防和控制刻不容缓。培育抗病品种是最经济有效的预防和控制措施之一,而对种质资源的抗病性进行测定是

培育抗病品种的前提和基础。目前,国内仅见到砧木与西瓜品种对 CGMMV 耐病性比较的报道(叶建人等,2015),未见到其他葫芦科作物对 CGMMV 抗性的相关报道。

表 1 14 份黄瓜种质资源对 CGMMV 抗性水平鉴定结果

Table 1 The resistance levels of 14 cucumber germplasms to cucumber green mottle virus

黄瓜名称 Cucumber name	接种后 8 周各处理的病指 Disease index after 8 weeks post inoculation				5%显著水平 5% significance levels	1%极显著水平 1% significance levels	抗性水平 Resistance levels
	I	II	III	均值 Average			
G17	100.00	100.00	100.00	100.00	a	A	S
力丰	99.11	98.50	100.00	99.20	a	AB	S
G13 * G28	96.10	100.00	100.00	98.70	a	AB	S
B80	98.18	97.34	100.00	98.51	a	AB	S
A8	100.00	98.81	96.68	98.50	a	AB	S
G13	100.00	95.45	100.00	98.48	a	AB	S
G6	95.45	93.23	100.00	96.23	ab	ABC	S
N2	92.06	97.80	95.54	95.13	abc	ABC	S
B35	94.47	92.12	96.91	94.50	abc	ABC	S
A4	90.48	88.82	95.92	91.74	bcd	BC	S
82 大	85.33	93.65	92.21	90.40	cd	C	S
A4 * YF	86.81	92.86	86.36	88.68	d	C	S
K13	66.55	84.87	89.80	80.41	e	D	S
YF	78.35	71.43	64.84	71.54	f	E	S

黄瓜是广东省重要的蔬菜作物,目前正在遭受 CGMMV 的威胁。本文评价了收集到的 14 份黄瓜种质资源对 CGMMV 的抗性水平,虽然这些资源的病情指数存在不同程度的差异,但对 CGMMV 均表现为感病,说明我省主要黄瓜种质资源中缺少抗 CGMMV 的资源。下一步将收集更多黄瓜种质资源材料,评价其对 CGMMV 的抗病性,为黄瓜抗 CGM-MV 育种提供抗源材料,也为我省 CGMMV 综合防控提供指导。

参考文献

陈红运,林石明,陈青,赵文军,廖富荣,陈洪俊,朱水芳, 2009. 黄瓜绿斑驳花叶病毒辽宁分离物全基因组序列测定. 病毒学报, 25(1): 68-72.

陈京,李明福, 2007. 新入侵的有害生物——黄瓜绿斑驳花叶病毒. 植物检疫, 21(2): 94-96.

董晓辉,孟春梅,黎军英,吴建祥,荣松,张超,洪健, 2009. 单抗免疫斑点法和组织印迹法检测侵染蝴蝶兰的建兰花叶病毒. 微生物学报, 36(10): 1614-1617.

杜江,成媛媛,牛二波,牛颜冰, 2015. 黄瓜绿斑驳花叶病毒山西西瓜分离物外壳蛋白基因序列分析. 植物保护,

41(2): 142-145, 148.

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 (9): 34-38.

胡亚萍,董萍,赵驾浩,张艇,于子翔,于翠,杨翠云, 2013. 上海郊区黄瓜绿斑驳花叶病毒的鉴定和防治对策. 上海农业学报, 29(1): 55-58.

李红霞,白静,陈红运,朱水芳,谭天伟, 2007. 南瓜果实中黄瓜绿斑驳花叶病毒病的 RT-PCR 检测及 CP 基因序列分析. 植物检疫, 21(5): 268-270 .

李小妮,任小平,王琳,王明强,周国辉, 2009. 广东省黄瓜绿斑驳花叶病毒分子检测及防疫. 植物保护学报, 36(3): 283-284.

林焱,杨瑜斌,王驰,王文华,毛玲荣, 2012. 温台地区西瓜发生黄瓜绿斑驳花叶病毒病调查初报. 浙江农业科学 (1): 83-85.

秦碧霞,蔡健和,刘志明,陈永惠,朱桂宁,黄福新, 2005. 侵染观赏南瓜的黄瓜绿斑驳花叶病毒的初步鉴定. 植物检疫, 19(4): 198-200.

任春梅,程兆榜,缪倩,王锋,张重阳,徐冬青,周益军, 2013. 江苏黄瓜绿斑驳花叶病毒的鉴定. 江苏农业学报, 29(1): 65-70.

汤少云,刘万里,张凯,王双宁,朱伯华,王凌锋,杨方文,

2011. 武汉地区黄瓜绿斑驳花叶病毒病的监测及防控. 长江蔬菜 (3): 41-42.

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.

王峰, 任春梅, 季英华, 缪倩, 姚恋秋, 周益军, 徐冬青, 程兆榜, 2014. 黄瓜绿斑驳花叶病毒海南分离物基因组测定与毒源分析. 植物保护, 40(6): 75-81.

王莉爽, 陈小均, 陈文, 谭清群, 杨学辉, 2015. 贵州蔬菜病毒病主要病毒种类检测. 广东农业科学 (20): 63-67.

王云, 辛志梅, 赵黎明, 竺晓平, 王云祥, 2014. 侵染丝瓜的黄瓜绿斑驳花叶病毒山东分离物分子鉴定. 山东农业科学, 46(8): 10-14.

吴鑫, 丁元明, 何月秋, 李旻, 李克海, 王绍君, 周剑, 2010. 黄瓜绿斑驳花叶病毒的分子检测及云南分离物的序列分析. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 31(3): 75-80.

吴元华, 李立梅, 赵秀香, 王文航, 王林, 蔡明, 2010. 黄瓜绿斑驳花叶病毒在我国定殖和扩散的风险性分析. 植物保护, 36(1): 33-36.

叶建人, 施海萍, 蔡美艳, 李程巧, 冯永斌, 周琳娜, 2015. 砧木与西瓜品种对黄瓜绿斑驳花叶病毒病的抗病性比较. 中国植保导刊, 35(8): 69-70.

赵慧茹, 林振亚, 朱俊子, 张亚东, 高必达, 2013. 湖南首次检测到黄瓜绿斑驳花叶病毒. 植物病理学报, 43(2): 219-221.

Ainsworth G C, 1935. Mosaic diseases of the cucumber. *Annals of Applied Biology*, 22(1): 55-67.

Hollings M, Komuro Y and Tochihiro H, 1975. Cucumber green mottle mosaicvirus//Surrey K. *Descriptions of Plant Viruses*. Kew, England: CMI./AAB, 154: 4.

Hseu S H, Huang C H and Chang C A, 1987. The occurrence of five viruses in six cucubits in Taiwan. *Plant Protection Bulletin*, 29(3): 233-244.

(责任编辑:郭莹)