

黄瓜绿斑驳花叶病的发生及防控策略

宋顺华, 吴 萍, 官国义, 孟淑春, 邢宝田

(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)

摘 要:黄瓜绿斑驳花叶病(CGMMV)是葫芦科植物上的重要病害之一,该病毒因其为害的严重性,在国外已引起了高度的重视。现对黄瓜绿斑驳花叶病毒生物学特性、寄主范围、传播方式、发生及分布情况、危害情况、以及该病毒的检测方法各自的优缺点等进行综述,并对该病害的综合防治提出了应生产健康优质种子、加强种子检疫、进行种子除害处理,加强田间管理和药剂防治等措施。

关键词:黄瓜绿斑驳花叶病毒;生物学特性;检测方法;防治措施

中图分类号:S 642.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)08-0105-04

黄瓜绿斑驳花叶病(CGMMV)是葫芦科植物上的重要病害之一,该病毒因其为害的严重性,在国外已引起了高度的重视。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。近年来,我国检疫部门多次从进口的葫芦科植物种子中检查出CGMMV,国内的学者也愈加重重视对该病毒的研究,但该病害的发生和危害情况还是呈越来越严重的态势,给我国葫芦科植物的生产造成了严重的威胁。

1 CGMMV 的生物学概况

1.1 病毒的生物学特性

1.1.1 病毒的形态特征 病原的学名为Cucumber green mottle mosaic virus,缩写为CGMMV,分类地位属于烟草花叶病毒的成员。病毒粒体杆状,粒子大小为300 nm×18 nm^[1],是一种正单链RNA病毒,病毒核壳由壳粒呈螺旋状排列而成。超薄切片观察,细胞中的病毒粒子排列成晶形内含体。

1.1.2 病毒的理化性质 CGMMV的适生性和抗逆性很强,所有的株系都有极强的稳定性,特别是在黄瓜汁液中。其致死温度为80~90℃,致死时间为10 min,稀释限点1 000 000倍(10⁻⁶~10⁻⁷),体外保毒期在常温下

病毒侵染力可保持数月,在0℃可保持数年,-20℃病毒仍能存活^[2],一旦条件适宜还能继续侵染蔓延。在盐贮藏的条件下,果实内的病毒经1.5 a后仍有活力。田间一旦发病,如未进行特殊的杀灭处理,病毒在病残体中可存活多年,即使将病残体埋在土壤中1 a,病毒仍能保持侵染的能力。

1.2 寄主范围

CGMMV有较为广泛的寄主范围,自然条件下主要侵染黄瓜、西瓜、葫芦和南瓜等葫芦科作物^[3],也能侵染角瓜、瓠瓜、丝瓜、苦瓜和冬瓜等,一些杂草也是CGMMV的寄主,如北美苋、板枝苋、天芥菜、马齿苋和龙葵等。人工接种还可侵染茄科的三生烟和矮牵牛^[1]。

1.3 传播方式

虽然常见的瓜类病毒传播介体昆虫、蚜虫不能传播CGMMV,但该病毒具有多种多样传播方式和侵染途径。主要通过带毒种子进行远距离传播,田间病害的扩展流行以农事操作为主,病株汁液通过寄主微小伤口进入组织内部,或通过嫁接工具进行机械传播,如在西瓜种植区,嫁接常造成CGMMV的广泛发生。另外,带毒的花粉和被病残体污染土壤也能传播CGMMV,土壤被病残体污染,病毒从根部侵染健康植株,但传毒率较低。

2 CGMMV 的发生概况

2.1 发生历史及分布情况

黄瓜绿斑驳花叶病毒(CGMMV)是世界上许多国家和地区葫芦科植物上的重要检疫性病毒,给葫芦科作物造成严重的威胁。1935年英国Ainsworth^[4]首次报道了CGMMV在黄瓜上的危害,随后迅速的传播到德国等欧洲国家,20世纪60年代因引种黄瓜、西瓜和瓠瓜而传

第一作者简介:宋顺华(1963-),女,本科,副研究员,现主要从事蔬菜种子种传病害检测及种子处理等研究工作。E-mail:songshunhua@nrcv.org.

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2011BAD35B07);北京市科技计划资助项目(D101105046510091);北京市西甜瓜创新团队资助项目。

收稿日期:2013-12-18

入亚洲的印度和日本,20世纪80年代传入韩国和我国台湾地区,21世纪初,几乎所有的欧洲国家,以及中亚、东亚和南亚一些国家也均有发生。目前已分布在20多个国家和地区^[5]。

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,随后厦门动植物检疫局2004年从日本进口的南瓜种子上检测到CGMMV^[6];秦碧霞等^[7]2005年在广西某农业展示温室的观赏南瓜上发现该病毒;黄静等^[8]于2007年在广西南宁一个温室的黄瓜上采集到病叶,鉴定为CGMMV日本西瓜株系;李红霞等^[9]也从甘肃的南瓜上也检测到CGMMV;赵世恒等^[10]从日本引进的西瓜种子种植在隔离苗圃的西瓜苗中检测到了CGMMV。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都发现了疫情。

2.2 发生症状

据Thomas^[11]报道,CGMMV有典型株系(即黄瓜绿斑驳花叶病毒)、黄瓜桃叶珊瑚花叶株系、西瓜株系、日本黄瓜株系、洋东株系、印度株系6个株系。在不同条件下,病毒不同株系在寄主上表现不同的症状。在黄瓜上的表现症状一般为叶片斑驳并凸起,畸形,造成植株矮化,果实上可产生黄或银色条斑,果实严重受损,产量可下降15%。西瓜受侵染后叶片轻型叶斑驳,植株矮化,果实成熟期症状严重,果实表面产生浓绿圆斑,内部出现果肉变色和腐烂。甜瓜受害后,茎端新叶出现黄斑,但随叶片老化症状减轻,生长后期顶部叶片有时产生大型黄色轮纹斑。瓠子受害后叶片出现花叶,有绿色突起,脉间黄化,叶脉呈绿带状,植株上部叶片变小,下部叶片边缘波浪状。南瓜感病,植株表现脉绿、花叶。

2.3 危害性

CGMMV的寄主范围较为广泛,已经对疫区的葫芦科作物造成了很大的危害。CGMMV在前苏联的Geonia地区发生率达80%~100%,受害的西瓜内部呈现丝瓜瓢状和大量空洞,因味苦而没有食用价值,减产30%,甚至绝收^[12]。该病毒曾给日本的西甜瓜生产造成严重的损失,1966年日本德鸟县在黄瓜久留米落合H型一个品种上发现CGMMV,发生面积达4 842 hm²。

我国各省、市都有CGMMV寄主葫芦科作物的分布,且周年衔接,一些杂草寄主,如马齿苋等也分布广泛,这些都为该病毒提供了周年繁殖保存的场所。由于CGMMV能通过汁液、授粉和嫁接传播,目前规模逐步扩大的嫁接育苗的栽培模式使得播种带毒种子在发病田间极易扩散。我国2005年在辽宁省首次报道田间西瓜大面积发生CGMMV,发病面积达333 hm²,其中有13 hm²绝收^[13]。在2006年至2008年,该病在辽宁省各西瓜产区连年发生,农民视其为“瘟疫”,给辽宁省西

瓜生产带来巨大经济损失。据报道,在田间进行人工接种试验,不同品种的自生根西瓜产量损失为11.4%~47.6%,采收期西瓜果实倒瓤率达66.7%~75%;嫁接西瓜接种后仍可减产2.5%~17.5%,采收期果实倒瓤率为93.3%~100%^[14]。受侵染黄瓜产量损失达15%。

3 CGMMV 的检测方法

建立方便、快速、准确和灵敏的CGMMV检测技术是防止该病毒随进口种苗传入国内及扩散流行的关键措施。目前病毒病的检测方法有生物学检测、电镜观察、血清学检测、分子生物学。随着分子生物学的发展,CGMMV的检测技术也逐步的从传统的生物学检测方法发展到目前基于核酸的各种分子检测方法。目前该病毒的检测方法主要有以下几种。

3.1 生物学检测

生物学检测是以鉴别寄主上所表现出的症状作为判定依据的鉴定方法。利用疑似病株的汁液摩擦接种敏感的健康植株或指示植物,在有利于病害发生的条件下观察症状,可以进行该病的鉴定。生物学试验虽然可以确定病原的侵染性,但由于病毒在实生苗上的症状不稳定,且受检测环境的影响,往往出现不表现症状的假阴性现象,在进行生物学检测的同时,还必须应用其它室内方法对实生苗进行检测。生物学检测存在稳定性差、工作量大、费时长等缺点。

3.2 血清学检测

目前主要采用酶联免疫吸附方法进行检测,如单克隆及多克隆抗体夹心ELISA(DAS-ELISA)、间接ELISA、斑点免疫杂交ELISA(DOS-ELISA)等。利用CGMMV的专化性抗血清来检测病毒,不仅可以用于病毒的快速鉴定,还可以用于病毒株系的鉴别及亲缘关系的分析,不需要大量的仪器设备,具有特异性强和操作简单易行等优点,大大提高了检测的速度和准确性,是常规检测的最有效方法。但制备高纯度、专一性很强的抗血清存在一定的困难,实际应用中增加了检测成本。

3.3 分子生物学检测

分子生物学技术是检测病毒核酸的一种方法,目前常用的分子生物学技术主要有RT-PCR、免疫捕捉RT-PCR(IC-RT-PCR)和实时荧光RT-PCR。这些技术具有快速、简便、灵敏度高、特异性强和所需样品少等优点。

3.3.1 RT-PCR 技术 RT-PCR技术是通过提取总RNA后反转录成cDNA,然后对cDNA进行扩增得到特异性片段。这种方法快速灵敏,应用在各种植物病毒检测上。该方法的灵敏度高,影响其成功率的最大因素是能否提取出高纯度和完整的RNA,因此操作难度较大,对检测人员的要求较高,且存在不稳定性。

3.3.2 免疫捕捉 RT-PCR(IC-RT-PCR)技术 免疫捕

捉 RT-PCR 技术是通过捕捉富集抗原,然后释放出 RNA,将 RNA 反转录成 cDNA,最后对 cDNA 进行扩增得到特异性片段。该方法结合了 DAS-ELISA 捕捉抗原与 RT-PCR 特异性反转录的特点,简化了 RNA 的提取,降低了对操作人员的要求。与 RT-PCR 方法相比,操作更为简便、特异性强,并可以克服 ELISA 方法中出现假阳性的不足,使得结果更为可靠。但是该方法需要特异性的抗体。

3.3.3 实时荧光 RT-PCR 技术 实时荧光 RT-PCR 技术是在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光的积累实时监测整个 PCR,利用此方法可对病毒进行定量分析。实时荧光 PCR 方法整个试验过程是完全闭管检测,产物不需要电泳检测,减少了有毒染色剂对环境的污染,缩短了检测时间。与常规 PCR 相比,它具有剪异性强、自动化程度高、有效解决 PCR 过程污染问题等特点。但是这种方法需昂贵的仪器和试剂,检测成本较高。

4 CGMMV 的防控策略

黄瓜绿斑驳花叶病毒(CGMMV)具有高危害性、流行性和难以防治等特点,对 CGMMV 的防治措施主要采取以使用无病种子为主的综合防治对策。

4.1 生产无病种子

建立无病留种田,施用无病毒的有机肥,培育壮苗;农事操作应小心从事,清除制种田内外的杂草寄主,及时拔除病株,采种要注意清洁,防止种子带毒。

4.2 加强种子检疫,防止病毒的扩散和蔓延

带毒种子和机械传播是 CGMMV 的主要传播途径,因此要加强对引进的葫芦科种子的检疫,禁止从疫区引进栽培和砧木用的种子,发现带毒的种子应立即销毁。

4.3 种子除害处理

对常发病地区或田块生产的种子,或可能带有 CGMMV 的种子进行种子除害处理。目前常用的处理方法有干热处理和化学处理。干热处理是将种子在高温下处理一定的时间,将附着在种子所携带的病原菌杀灭。日本和韩国采取以干热处理为主的综合防治措施,成功的控制了 CGMMV 的发生与流行^[15]。干热处理时,首先要进行预热处理,温度从低温到高温逐步提高,种子边通风边干燥,水分降到 4% 左右时再经过 72℃、72 h,然后关闭干燥箱,处理后的种子在干燥箱内放置 1 d 取出,之后在阴凉的仓库自然吸湿,水分恢复到 5% 左右时在低温贮藏库保管。化学处理一般采用 10% 磷酸三钠浸种 10 min 后,用清水充分冲洗干净后晾干备用或催芽播种。

4.4 加强田间管理

做好防止接触传染的预防措施,嫁接等田间操作时

手和工具必须用 10% 脱脂奶溶液随时消毒;打杈、绑蔓、授粉、采收等农事操作时注意减少植株碰撞,中耕时减少伤根,浇水要适时适量,防止土壤过干;及时去掉具有疑似病状的植株,并集中处理;控制不必要人员的出入。

4.5 做好田间药剂防治

发病初期喷洒 5% 菌毒清可湿性粉剂 300 倍或 7.5% 克毒灵水剂 700~800 倍液、30% 毒克星(盐酸吗啉胍·铜)可湿性粉剂 500 倍液、NS-83 病毒诱导剂 100 倍液、植物病毒钝化剂 912,每 667 m² 用 75 g 加 1 kg 开水浸泡 12 h 兑水 15 kg 喷洒。此外喷洒高锰酸钾 1 000 倍液或硫酸锌 1 500 倍也有一定效果。

4.6 彻底做好土壤消毒管理

发病的地块轮作其它非葫芦科作物;发病地块按 0.2 kg/m² 的用量撒施消石灰,使茎叶等病残体快速分解;彻底清理病残体,包括感病的植株、果实、茎叶等,集中销毁或深埋处理;做好田间排水管理,以防积水。

参考文献

- [1] Hollings M, Komuro Y, Tochihara H. Cucumber green mottle mosaic virus[M]//Descriptions of Plant Virus. CMI/AAB Kew, UK, 1975, 154:4.
- [2] Komuro Y, Tochihara H, Fukatsu R, et al. Cucumber green mottle mosaic virus (watermelon strain) in watermelon and its bearing on deterioration of watermelon fruit known as konnyaku disease[J]. Annals Phytopathological Society of Japan, 1971, 37:34-42.
- [3] Hollings M, Komuro Y, Tochihara H. Cucumber green mottle mosaic virus[P]. Plant Viruses Online, Descriptions and lists from the VIDE database. Association of Applied Biologists, 1988.
- [4] Ainsworth G C. Mosaic disease of cucumber[J]. Ann Appl Biol, 1935, 22:55-57.
- [5] 冯兰香, 谢丙炎, 杨宇红, 等. 检疫性黄瓜绿斑驳花叶病毒的检测和防疫控制[J]. 中国蔬菜, 2007(9):34-38.
- [6] 陈京, 李明福. 新入侵的有害生物-黄瓜绿斑驳花叶病毒[J]. 植物检疫, 2007, 21(2):94-96.
- [7] 秦碧霞, 蔡健和, 刘志明, 等. 侵染观赏南瓜的黄瓜绿斑驳花叶病毒的初步鉴定[J]. 植物检疫, 2005(4):198-200.
- [8] 黄静, 廖富荣, 林石明, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒的鉴定及分子检测[J]. 中国农学通报, 2007, 23(4):318-322.
- [9] 李红霞, 白静, 陈红运, 等. 南瓜果实中黄瓜绿斑驳花叶病毒的 RT-PCR 检测及 CP 序列分析[J]. 植物检疫, 2007, 21(5):268-270.
- [10] 赵世恒, 李明福, 张永江, 等. 引进种质西瓜中黄瓜绿斑驳花叶病毒的检测[J]. 北京农学院学报, 2007, 22(2):32-34.
- [11] Thomas B J. Occurrence and epidemiology of the cucumber necrosis strain of tobacco necrosis virus in cucumber crops [M]. Annual Report Glasshouse Crops Research Institute, 1982:117-123.
- [12] 吴元华, 李立梅, 赵秀香, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒在我国定殖和扩散的风险性分析[J]. 植物保护, 2010, 36(1):33-36.
- [13] 陈红运, 赵文军, 程毅, 等. 辽中地区花叶病原的分子鉴定[J]. 植物病理学报, 2006, 36(4):306-309.
- [14] 周玲玲, 吴元华, 赵秀香, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒生物学特性及对西瓜产量和质量的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2008, 39(4):417-422.
- [15] 蔡明, 李明福, 江东. 日本、韩国黄瓜绿斑驳花叶病毒发生及防控策略[J]. 植物检疫, 2010, 24(4):65-68.

抗枇杷根腐病菌的枇杷主干内生真菌生物学特性研究

鲁海菊¹, 郝小燕^{2,3}, 崔同敏¹, 张晓永¹, 郑肖兰⁴

(1. 红河学院 生命科学与技术学院, 云南 蒙自 661199; 2. 常州市新北区孟河镇农业综合服务站, 江苏 常州 213138;
3. 常州市新北区农业局, 江苏 常州 213022; 4. 中国热带农业科学院 环植所, 海南 儋州 571737)

摘要:以枇杷为试材, 对抗枇杷根腐病菌的 6 株枇杷主干内生真菌进行生物学特性研究。结果表明: PDA、PSA 和 CA 培养基为最适合各参试菌株菌丝生长的培养基; 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖为最适合各参试菌株菌丝生长的碳源; 牛肉膏、酵母膏、蛋白胨为最适合各参试菌株菌丝生长的氮源; 25~30℃ 最适合各参试菌株菌丝生长; 所有参试菌株适宜菌丝生长的 pH 值为中性或偏碱性; 全光照处理有利于参试菌株菌丝生长。

关键词:枇杷; 内生真菌; 枇杷根腐病; 生物学特性

中图分类号:S 667.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)08-0108-04

枇杷(*Eriobotrya japonica*)属蔷薇科常绿乔木果树, 是我国亚热带地区的特色水果^[1]。始载于《神农本草经》, 含川贝碱、西贝素等多种生物碱^[2]。植物内生真菌普遍存在于各种植物健康组织内或细胞间隙, 不仅能促进寄主植物生长, 还可以产生与寄主相同或相似的次级代谢产物, 具有抗菌、杀虫等多种生物活性^[3-6]。目前, 关于枇杷内生真菌的研究尚鲜见报道。因此, 该课题组对

枇杷内生真菌开展系列研究。枇杷根腐病是枇杷生产上发生严重而普遍的土传病害之一, 其田间症状初期表现出树势衰退, 叶片起初变黄, 之后变成褐色。叶片在脱落之前缓慢下垂。偶尔下大雨时, 植株发病相当快, 只留下褐色干枯的叶片挂在死树枝上。茎干颜色呈暗褐色, 基部腐烂, 韧皮部呈鱼鳞状。地上部维管组织呈红褐色。病株根环腐, 不长新根, 有白色菌丝。后期植株萎蔫、树皮脱落, 最后整株枯死。台湾^[7]、福建^[8]、云南^[9]等省份都陆续报道有枇杷根腐病发生, 损失率高达 40% 以上。且有逐渐加重之势, 制约着枇杷产业发展。化学防治对于土传病害收效甚微, 加上化学农药不符合绿色农业生产要求, 因此生物防治正日趋受到人们的重视。基于此, 该文从枇杷主干内生真菌中, 挑选对枇杷根腐病原菌抑制率高于 50% 的菌株, 对其进行生物学特性研究, 以期对枇杷工业发酵提供理论依据。

第一作者简介:鲁海菊(1978-), 女, 云南大理人, 博士, 副教授, 现主要从事亚热带植物真菌分类和真菌病害等研究工作。E-mail: luhaiju2011@126.com.

基金项目:红河学院博硕资助项目(XJ1B0912); 云南省大学生创新实验计划资助项目; “红河学院硕士点植物保护一级学科建设经费”资助项目; 云南省高校“农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室”建设资助项目。

收稿日期:2013-12-10

Occurrence and Control Measures of Cucumber Green Mottle Mosaic Virus

SONG Shun-hua, WU Ping, GONG Guo-yi, MENG Shu-chun, XING Bao-tian

(Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Key Laboratory of Urban Agriculture (North), Ministry of Agriculture, Beijing 100097)

Abstract: CGMMV is one of the important disease on cucurbits, the virus because of the seriousness of harm has aroused great attention in abroad. The biological characteristics, host ranges, spread ways, occurrence and distribution situation of cucumber green mottle mosaic virus, as well as detection methods and the advantages and disadvantages of these detection methods were reviewed in this paper, and the production of quality seeds, strengthening seed quarantine, reinforcing field management and chemical control had been provided.

Key words: cucumber green mottle mosaic virus; biological characteristics; detection methods; control measures