

新疆石河子及新湖籽用西葫芦病毒病分子检测

任琛荣, 郝小军, 都业娟, 向本春

(石河子大学 农学院, 新疆绿洲农业病虫害治理与植保资源利用自治区普通高校重点实验室, 新疆 石河子 832003)

摘 要:以新疆石河子以及新湖总场籽用西葫芦为研究对象,通过观察田间症状并采用 RT-PCR 方法,研究了籽用西葫芦发病情况。结果表明:籽用西葫芦病毒病田间症状主要表现为花叶型、黄化型、畸形和蕨叶型 4 类,其中花叶型最普遍。检测出的病毒主要有黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)、小西葫芦黄瓜花叶病毒(zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)、西瓜花叶病毒(watermelon mosaic virus, WMV)和番木瓜环斑病毒(papaya ringspot virus, PRSV-W),4 种病毒的总检出率分别为 33.3%、84.8%、75.8%和 21.2%;其中,样品受 2 种及以上病毒复合侵染检出率达 66.7%,主要以 ZYMV+CMV、ZYMV+WMV、ZYMV+CMV+WMV+PRSV-W 复合侵染为主。

关键词:籽用西葫芦;病毒病;病毒种类;复合侵染

中图分类号:S 642.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)01-0102-05

籽用西葫芦是一种专门收籽的葫芦科南瓜属作物,由于其籽粒含有丰富的维生素 C、钙、铁、钾、锌、蛋白质、胡萝卜素^[1]、葫芦巴碱、葫芦籽油、葫芦籽精华等营养物质和植物性蜡,而越来越受到国内外人们的青睐。我国甘肃、新疆、内蒙古、吉林、山西、云南等地均有种植。其中,新疆籽用西葫芦的种植面积已达 4.6 万 hm²。随着种植面积的不断扩大,病毒病已成为制约籽用西葫芦发展的主要因素之一,严重影响籽用西葫芦的品质和产量。据报道,侵染葫芦科作物的植物病毒有 80 多种,主要有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)以及南瓜花叶病毒(squash mosaic virus, SqMV)等^[2]。这些病毒多单独或复合侵染葫芦科作物,造成严重的经济损失^[3]。目前,对于葫芦科作物病毒病的研究主要集中在菜用西葫芦或其它瓜类作物,关于籽用西葫芦病毒病的检测尚鲜见报道^[4]。因此,现针对新疆石河子以及新湖总场籽用西葫芦病毒病进行研究,观察田间症状并通过 RT-PCR 方法检测田间种植的籽用西葫芦发病情况,同时通过分子检测查明病原的复合侵染情况,以期为当地籽用西葫芦病毒病的防治提供理论依据。

第一作者简介:任琛荣(1990-),女,甘肃静宁人,硕士研究生,研究方向为植物病毒及其病害。E-mail:15699335916@163.com.

责任作者:向本春(1958-),男,四川宜汉人,教授,博士生导师,研究方向为植物病毒及其病害。E-mail:XBC@shzu.edu.cn.

基金项目:兵团农作物病害安全防控创新团队资助项目(2101802CX7155)。

收稿日期:2015-09-24

1 材料与方法

1.1 试验材料

2014 年 8 月中下旬从石河子周边地区、新湖总场部分连队采集疑似被病毒感染,且症状明显的籽用西葫芦叶片,分别装在不同的干净自封袋中,标明采集编号、时间、地点、品种及样品病害症状,保存于-60℃低温冰箱中备用。

供试病样 33 份,其中采自石河子周边地区 12 份,新湖总场 21 份。

主要试剂:RNA 提取试剂 Trizol (Takara 公司);反转录试剂盒(Thermo 公司);Taq DNA 聚合酶、dNTPs、Taq PCR Mix、琼脂糖凝胶回收试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司);2 000 bp DNA Marker(全式金生物);其它化学试剂均为国产分析纯级试剂。大肠杆菌 DH5 α 菌株为新疆绿洲农业病虫害治理与植保资源利用自治区普通高校重点实验室保存。

1.2 试验方法

1.2.1 引物合成 根据已报道葫芦科植物病毒的 CP 基因特异性片段,设计并合成 7 对特异性引物(表 1),由北京华大科技有限公司合成。

1.2.2 植物组织总 RNA 的提取 采用改良 Trizol 法^[9]提取总 RNA。

1.2.3 RT-PCR 反应 cDNA 第一链的合成:以 5 μ L 总 RNA 为模板,1 μ L oligo(dT)₁₈ 为引物,6 μ L 无核酸酶的高纯水轻轻混匀,短暂离心,65℃孵育 5 min,冰上冷却,离心后加 4 μ L 5 \times 第一链反应缓冲液,1 μ L RiboLock™ RNA 酶抑制剂,2 μ L 10 mmol/L dNTP Mix,Revert Aid™ M-MnLV 逆转录酶,轻轻混匀,离心,42℃孵育 60 min,70℃加热 5 min,终止反应。 -60℃保

表 1 RT-PCR 扩增病毒基因组
特异性片段的引物

Table 1 Primers for amplification segments of
virus genomes by RT-PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Sequence(5'→3')	产物长度 Length of product/bp	参考文献 Reference
CMV-F	TATGATAAGAAGCTTGTTCGCG	486	[5]
CMV-R	GCGTAAGCTGGATGGACAA		
ZYMV-F	ATGCAGAGGCACCATACAT	283	[6]
ZYMV-R	TACTGCATTGTGTTTCACACC		
WMV-F	CCAGTGGCAAAGGTGATA	485	[3]
WMV-R	TGCTGCGTCTGAGAAATG		
SqMV-F	GCGAATTTTGTACGGCATG	648	[7]
SqMV-R	GTCTGGAAAGCCCAACTGGA		
TMV-F	GGTCGTTCCCAATTATGCTAT	810	
TMV-R	CACCGTTGCGTCTCTACTCT		
PRSV-W-F	GCGCAGAAGCATATATTGCAAA	512	[8]
PRSV-W-R	CTCTCATTTCTAAGAGGCTCGAATA		
CGMMV-F	TGGTGCTACTGTTGCTCTGGTTG	452	
CGMMV-R	TTGGAGGTTTAGAATGCCGCTTA		

存备用。以合成的 cDNA 第一链为模板进行 PCR。25 μ L 反应体系中,cDNA 1 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,Taq PCR Mix 12.5 μ L,加 ddH₂O 至终体积为 25 μ L。PCR 扩增条件为 94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,51℃ (PRSV-W)、52℃ (WMV)、53℃ (SqMV)、55℃

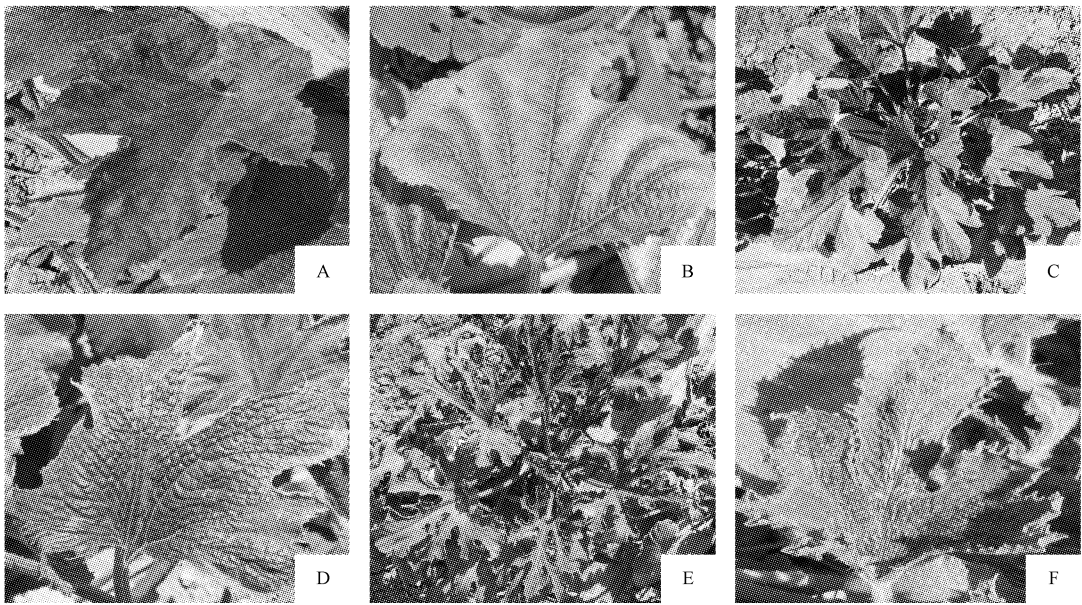
(ZYMV 和 CGMMV)退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。反应结束后,PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,用凝胶成像系统观察结果并照相。

1. 2. 4 序列测定及分析 RT-PCR 产物用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收后连接 pMD18-T 载体,并转化至大肠杆菌 DH5 α 菌株,挑取单一白色菌落培养,通过 PCR 扩增筛选鉴定阳性克隆,送至北京华大基因生物公司进行测序。

2 结果与分析

2. 1 籽用西葫芦田间发病症状

石河子和新湖总场籽用西葫芦病毒病害田间症状多为几种病毒复合侵染形成,表现复杂多样。根据调查,田间主要有四大类病毒症状:1)花叶型,叶面深绿疱斑,深绿浅绿相间斑驳(图 1A);2)黄化型,整株植株叶脉加粗,叶肉沿叶脉褪绿,黄化,至后期叶缘坏死(图 1B);3)畸形,茎节缩短,植株矮化(图 1C);叶片增厚皱缩,沿叶缘坏死(图 1D);叶片深叶裂,有疱斑,至后期植株叶片完全退化为叶脉(俗称鸡爪叶)(图 1E);4)蕨叶型,整株叶脉突出而叶肉少的细长叶片(图 1F)。



注:A. 斑驳花叶;B. 明脉;C. 植株矮化;D. 皱缩叶;E. 鸡爪叶;F. 蕨叶。

Note: A. mosaic; B. yellowing; C. dwarfed plant; D. shrunken leaves; E. fern leaves; F. deeply lobed leaves.

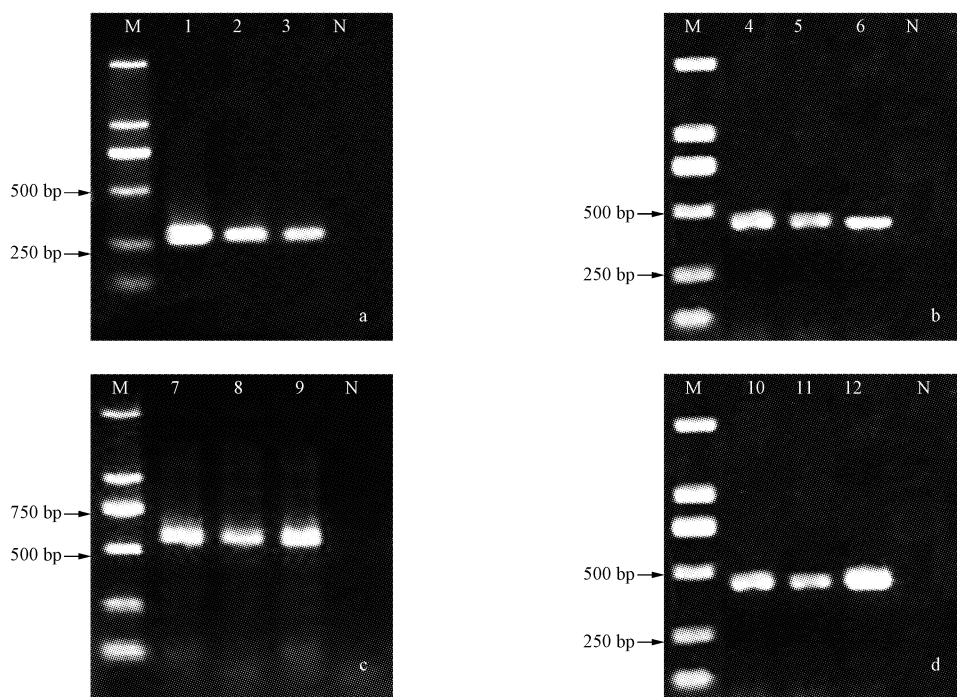
图 1 籽用西葫芦病毒病症状

Fig. 1 Symptom of virus diseases on seed zucchini

2. 2 病毒种类分子检测

2. 2. 1 RT-PCR 检测病毒种类 RT-PCR 扩增后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 2。用 ZYMV 特异性引物扩增出 280 bp 左右的条带(图 2a),CMV 引物扩增出 485 bp 左右的条带(图 2b),PRSV-W 引物扩增到

512 bp 左右的条带(图 2c),WMV 特异性引物扩增出 486 bp 左右的条带(图 2d),每种病毒特异性引物扩增获得的片段大小均与预期结果相同。以健康叶片作阴性对照。所有样品均未扩增出 ZYMV、CMV、PRSV-W、WMV 的预期片段。



注:a. ZYMV 检测;b. CMV 检测;c. PRSV-W 检测;d. WMV 检测;M. DNA Marker(2 000 bp);N. 阴性对照;1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 为样品编号。

Note:a. detection of ZYMV;b. detection of CMV;c. detection of PRSV-W;d. detection of WMV;M. DNA Marker (2 000 bp);N. negative control;1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 were sample numbers.

图2 新疆石河子及新湖地区部分籽用西葫芦病毒病原的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 2 RT-PCR amplification of seed zucchini viruses in Shihezi and Xinhu region of Xinjiang Province

2.2.2 各种病原病毒检出率 通过设计特异性引物对2个地区采集的33份籽用西葫芦疑似病样进行RT-PCR检测。由表2可知,石河子周边与新湖总场病毒的总检出率分别为100.0%和95.2%,主要有CMV、ZYMV、WMV和PRSV-W4种病毒,在2个地区的检出率分别为100.0%、100.0%、80.0%、60.0%和19.0%、80.1%、66.7%、9.5%。其中,ZYMV、WMV在4种病毒中总检出率较高,分别为84.8%和75.8%,说明石河子

和新湖总场侵染籽用西葫芦的病毒以小西葫芦黄花叶病毒(ZYMV)和西瓜花叶病毒(WMV)为主。相同地区不同品种的籽用西葫芦,同一病毒的检出率也差别较大。例如,石河子周边“金丰”和“虎牌2号”2个西葫芦品种带CMV检出率分别为100.0%和28.6%;PRSV-W为60.0%和28.6%。不同地区、不同品种各病毒的检出率虽然存在差异,但检测结果显示ZYMV和WMV总体侵染率仍然较高。

表2

各地不同品种病原病毒的检出率

Table 2

Detection rates of various pathogenic viruses in different regions and varieties

%

样品采集地 Location	各地病毒总检出率 Total detection rates of viruses in different regions	各病毒检出率 Detection rate of various viruses			
		CMV	ZYMV	WMV	PRSV-W
石河子周边地区(品种“金丰”)Shihezi region (‘Jinfeng’)	100.0	100.0	100.0	80.0	60.0
石河子周边地区(品种“虎牌2号”)Shihezi region (‘TigerII’)	100.0	28.6	85.7	100.0	28.6
新湖总场 Xinhu region	95.2	19.0	80.1	66.7	9.5
总计 In total	97.1	33.3	84.8	75.8	21.2

2.2.3 各种病原病毒的复合侵染率 检测结果显示,石河子周边和新湖总场籽用西葫芦普遍存在复合侵染现象,供试的33份籽用西葫芦样品中,2种及以上病毒复合侵染样品占供试样品的66.7%。供试样品共检测出5种不同的复合侵染类型(表3),不同地区、不同品种间的主要复合侵染类型也存在差异。石河子周边地区主要复合侵染类型为CMV+ZYMV+WMV+PRSV-W,而新湖总场主要复合侵染类型则是ZYMV+

WMV;品种“金丰”的主要复合侵染类型为CMV+ZYMV+WMV+PRSV-W,而品种“虎牌2号”则是ZYMV+WMV。相同地区不同品种复合侵染率也有一定差异,如石河子周边地区中,“金丰”的复合侵染率为100%,而“虎牌2号”是85.8%。总体检测结果显示,2个地区籽用西葫芦复合侵染类型主要为ZYMV+WMV、CMV+ZYMV以及CMV+ZYMV+WMV+PRSV-W。

表 3
Table 3
Complex infection rates of various pathogenic viruses

%

样品采集地 Location	复合侵染率 Complex infection rates				
	CMV+ZYMV	ZYMV+WMV	CMV+ZYMV+WMV	ZYMV+WMV+PRSV-W	CMV+ZYMV+WMV+PRSV-W
石河子周边地区(品种“金丰”) Shihezi region (‘Jinfeng’)	20.0	0	20.0	0	60.0
石河子周边地区(品种“虎牌 2 号”) Shihezi region (‘TigerII’)	0	42.9	14.3	14.3	14.3
新湖总场 Xinhu region	0	33.3	9.5	0	9.5
总计 In total	3.0	30.3	12.1	3.0	18.2

3 结论与讨论

该研究利用 CMV、ZYMV、WMV、SqMV、TMV、PRSV 和 CGMMV 共 7 种葫芦科常见病毒特异性引物,对新疆石河子周边以及新湖总场 33 个籽用西葫芦疑似病样进行了 RT-PCR 分子检测,结果为 97.1%以上样品都被病毒侵染,初步确定侵染并危害石河子以及新湖总场籽用西葫芦的病毒主要为 CMV、ZYMV、WMV 和 PRSV-W,这些病毒以复合侵染为主,2 种及以上复合侵染率为 66.7%。这 4 种病毒寄主范围广泛,且均为种传病毒,严重影响籽用西葫芦的产量和品质,具有一定的检疫重要性^[2,10-11]。自 20 世纪 80 年代开始,在新疆报道的侵染葫芦科作物的病毒有 CMV、WMV、ZYMV、SqMV、PRSV-W 以及烟草坏死病毒(TNV),主要为害瓜类^[12-13]。2008 年,刘卫荣等^[4,14]对新疆石河子周边丝瓜、甜瓜以及黄瓜等葫芦科作物病毒病分子鉴定为 WMV、ZYMV、PRSV-W,并未对籽用西葫芦病毒病进行检测。该研究对石河子周边以及新湖总场籽用西葫芦首次检测出了 WMV、ZYMV、PRSV-W 以及 CMV,并且这 4 种病毒可以复合侵染籽用西葫芦,以期为初步建立一套完整的籽用西葫芦分子检测技术体系奠定基础。同时对籽用西葫芦病毒病的防治、种质资源推广、籽用西葫芦抗病育种等研究具有重要意义。

参考文献

[1] 吴会昌. 我国西葫芦育种的现状、问题与对策[J]. 北方园艺, 2006 (2):48-49.
[2] 林石明,廖富荣,陈青,等. 葫芦科作物种传病毒及其检疫重要性[J]. 植物检疫, 2012, 26(1):52-61.

[3] 王威麟,张昊,于祥泉,等. 侵染西瓜的 5 种病毒 ZYMV、WMV、TMV、SqMV 和 CMV 的多重 RT-PCR 检测体系的建立与检测应用[J]. 植物病理学报, 2010, 40(1):27-32.
[4] 刘卫荣,向本春,韩盛. 新疆小西葫芦黄化花叶病毒的分子鉴定与序列分析[J]. 西北农业学报, 2008, 17(4):223-228.
[5] SINGH Z, JONES R A C, JONES M G K. Identification of cucumber mosaic virus subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR[J]. Plant Disease, 1995, 79(7):713-716.
[6] 张永江. 一步法 RT-PCR 检测小西葫芦黄化花叶病毒[J]. 植物检疫, 2005, 19(3):141-142.
[7] 文朝慧. 利用 RT-PCR 方法检测甜瓜种子中南瓜花叶病毒[J]. 植物保护, 2010, 36(3):130-133.
[8] ADKINS S, WEBB S E, BAKER C A, et al. Squash vein yellow virus detection using nested polymerase chain reaction demonstrates that the cucurbit weed *Momordica charantia* is a reservoir host [J]. Plant Disease, 2008, 92 (7):1119-1123.
[9] 刘娟娟. 石河子加工辣椒病毒病的调查与研究[D]. 石河子:石河子大学, 2014.
[10] FLETCHER J D, WALLACE A R, ROGERS B T. Potyviruses in New Zealand buttercup squash (*Cucurbits maxima* Duch.) — yield and quality effects of ZYMV and WMV 2 virus infections[J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 2000, 28(1):17-26.
[11] SIMMONS H E, HOLMES E C, GILDOW F E, et al. Experimental verification of seed transmission of zucchini yellow mosaic virus[J]. Plant Disease, 2011, 95(6):751-754.
[12] 黄传贤,覃秉益,奚仲兴,等. 从新疆哈密瓜分离到的烟草坏死病毒及其理化性质的研究[J]. 植物病理学报, 1984, 14(3):153-158.
[13] 郑光宇,董涛. 在新疆发生的小西葫芦黄化花叶病毒的研究初报[J]. 植物病理学报, 1991, 21(1):72.
[14] 刘卫荣. 北疆葫芦科作物 *Potyvirus* 属病毒种类的分子鉴定与遗传分化研究[D]. 石河子:石河子大学, 2008.

Molecular Detection of Seed Zucchini Virus Diseases in
Shihezi and Xinhu Region in Xinjiang

REN Chenrong, HAO Xiaojun, DU Yejuan, XIANG Benchun

(College of Agriculture, Shihezi University/Key Laboratory at University of Xinjiang Uygur Autonomous Region for Oasis Agricultural Pest Management and Plant Protection Resource Utilization, Shihezi, Xinjiang 832003)

Abstract: In order to understand the occurrence of seed zucchini virus diseases in Shihezi and Xinhu region in Xinjiang, seed zucchini virus diseases were investigated regularly in the field by RT-PCR and observation. The results showed that there were four symptom types of virus diseases which were mosaic, yellow, malformation and fern leaves, but the mosaic

热水处理对鲜切石榴籽粒贮藏品质、抗氧化能力及微生物变化的影响

王 琼, 初丽君, 王 敏, 寇莉萍

(西北农林科技大学 食品学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:以石榴为试材,采用热处理法,研究了不同处理条件对保鲜期间鲜切石榴籽粒贮藏品质、抗氧化能力及微生物变化的影响。结果表明:鲜切石榴籽粒经过 40℃ 10 min、45℃ 6 min、50℃ 4 min 的热处理,其中 50℃ 4 min 的热处理能够提高石榴籽粒可溶性固形物含量,减轻石榴籽粒贮藏期间的质量损失,提高石榴籽粒的抗氧化活性,抑制霉菌酵母的生长繁殖,使得石榴籽粒保持较好的感官品质,延缓石榴籽粒的衰老进程。

关键词:热处理;鲜切石榴籽粒;贮藏

中图分类号:S 665.409⁺.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)01-0106-05

石榴(*Punica granatum*)属石榴科石榴属多年生落的落叶果树、灌木或小乔木,别名安石榴、若榴、丹若等^[1]。石榴籽粒中含有丰富的营养物质,包括黄酮、鞣质、生物碱、有机酸和多元酚等;其中多元酚是一种有效的天然抗氧化剂,具有延缓衰老、预防粥样硬化、减缓癌变进程的作用。此外,石榴中所含维生素 C 含量是苹果、梨的 1~2 倍^[2]。

在中国,石榴一般以鲜果的形式食用,但是石榴在采摘运输过程中,果皮容易出现机械损伤,从而造成不同程度的果皮褐变,且随着货架期的延长,石榴褐变程度逐渐加大,极大程度上影响了石榴的商品价值,但是其内部籽粒仍旧完好无损,仍旧保持较好的外观及食用品质。因此,对石榴进行鲜切加工很有必要。鲜切水果是指新鲜水果经分级、清洗、去皮、修整、切分、包装等处理后,加工成供消费者及餐饮业立即食用的产品。目前鲜切技术已广泛应用于黄瓜、苹果^[3]、番茄、柑橘、胡萝卜

等果蔬中,而对石榴籽粒进行鲜切加工的研究却鲜有报道。经过鲜切后的石榴籽粒容易受外界环境的影响,不易保存,因此,对鲜切石榴籽粒进行贮藏前的处理很有必要。

热处理是指将贮藏前的果蔬置于适当温度下处理一段时间,目的是杀死或抑制某些病原菌的活力,减少贮藏过程中冷害的发生,降低腐烂率,达到保鲜并延长果蔬贮藏时间的效果^[4-5]。热处理因其无毒、无害、无化学残留的独特优势,已广泛应用于四季桔、苹果、草莓、黄瓜、桃等果蔬中。常见的热处理技术有热蒸汽法、热水法、热空气法^[6]。该试验采用热水法研究了不同处理条件对鲜切石榴籽粒品质的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为陕西省临潼区净皮甜石榴,产自临潼区代王镇某石榴园。当天采摘后运输至实验室,在 6℃ 预冷 3 d 后,挑选大小一致、无机械损伤、无病虫害的完全成熟的果实,将挑选后的果实放入 4℃ 的冷库中储存。选取在冷库中贮存 66 d 后的完整、无腐烂、无破损,褐变面积大体一致的石榴作为试验材料。

供试仪器:WHY 手持糖度计(泉州光学仪器厂),DDSJ-308A 电导率仪(上海精密科学仪器有限公司);

第一作者简介:王琼(1991-),女,硕士研究生,研究方向为果蔬贮藏与加工。E-mail:wangqiong187@139.com

责任作者:寇莉萍(1972-),女,博士,副教授,研究方向为果蔬贮藏与加工。E-mail:kouliping@nwsuaf.edu.cn

收稿日期:2015-09-24

symptom was the most common in seed zucchini planting areas. The four viruses were detected by PCR which was cucumber mosaic virus (CMV), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), watermelon mosaic virus (WMV) and papaya ringspot virus (PRSV-W). The total detection rate of CMV, ZYMV, WMV and PRSV-W were 33.3%, 84.8%, 75.8% and 21.2%, respectively. In the field, all of the samples were infected with 2 or more viruses with the rate of 66.7%, and the mixed infection of ZYMV and other viruses (CMV, WMV, CMV+WMV+PRSV-W) were the crucial problem in seed zucchini.

Keywords: seed zucchini; molecular detection; virus disease; mixed infection