

## 金瓜和白瓜花叶病毒病原的初步鉴定\*

陈晓斌<sup>1</sup>, 顾振芳<sup>1</sup>, 代光辉<sup>1\*\*</sup>, 黄丹枫<sup>1</sup>, 朱宗南<sup>2</sup>, 陈中<sup>2</sup>

(1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101; 2. 上海崇明县农业技术推广中心, 上海 202150)

Identification of the Pathogen of Mosaic Disease in *Cucurbita pepo* L. var. *ovifera*  
and *Cucumis melo* L. var. *conomon*CHEN Xiao-bin<sup>1</sup>, GU Zhen-fang<sup>1</sup>, DAI Guang-hui<sup>1\*\*</sup>, HUANG Dan-feng<sup>1</sup>, ZHU Zong-nan<sup>2</sup>, CHEN Zhong<sup>2</sup>

(1. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China; 2. Center of Agricultural Technology Extension, Congming County, Shanghai 202150, China)

**Abstract:** The mosaic disease samples of *Cucurbita pepo* L. var. *ovifera* and *Cucumis melo* L. var. *conomon* were collected in greenhouse and field at various sites in Congming Island. After host bioassay, electron microscopy (EM) observation, DAS-ELISA testing and molecular detection, the results showed that the pathogen of mosaic virus in *C. pepo* L. var. *ovifera* and *C. melo* L. var. *conomon* is Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV).

**Key words:** *Cucurbita pepo* L. var. *ovifera*; *Cucumis melo* L. var. *conomon*; Mosaic virus; Pathogen identification; Zucchini yellow mosaic virus.

**关键词:** 金瓜; 白瓜; 花叶病毒; 病原鉴定; 小西葫芦黄化花叶病毒

**中图分类号:** S432.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1003-5125 (2003) 03-0292-03

崇明是上海出口蔬菜生产基地之一,也是国家级的绿色食品园区之一,具有生产绿色蔬菜商品的生态环境和资源优势。特色出口蔬菜金瓜 (*Cucurbita pepo* L. var. *ovifera*)、白瓜 (*Cucumis melo* L. var. *conomon*, 又名盐渍菜瓜) 1997~1999 统计病毒病发病率为 23%,被感染的金瓜、白瓜田间通常症状相当严重,产量明显下降,而且由于感病植株的果实畸形,果色发生变化,因此无法进入市场,成为影响出口蔬菜产量和品质的限制因子。因此,对金瓜和白瓜病毒病进行系统研究,搞清其发病规律,进而探索出有效的病害控制技术已经是刻不容缓,对病原的鉴定,则是最为重要和关键的基础工作。本文报道了经鉴别寄主生物学测定、电镜负染观察和超薄切片观察、酶联免疫 (ELISA) 测定和分子检测等对金瓜和白瓜病毒病病原的鉴定结果。

## 1 材料和方法

## 1.1 材料

分别在崇明现代种苗园艺场、崇明合兴园艺场、汲浜园艺场等地采集金瓜、白瓜花叶病毒病显症叶片标本。

## 1.2 鉴别寄主生物学测定

采用常规汁液摩擦接种方法<sup>[1]</sup>。选取的鉴别寄主为三生烟 (*Nicotiana tabacum* Samsun NN)、珊西烟 (*N. tabacum* Xanthi NN)、心叶烟 (*N. glutinosa*)、莧色藜 (*Chenopodium amaranticolor*)、西葫芦和甜瓜幼苗,接种一周后观察系统和枯斑症状。

## 1.3 电镜观察

3%磷钨酸负染观察病毒粒体形态,病叶组织超薄切片制备和电镜观察参考林均安<sup>[2]</sup>的方法。

收稿日期: 2002-11-08, 修回日期: 2002-12-05

\* 基金项目: 上海市委重点科技攻关项目资助“崇明主要出口蔬菜病害生物控制研究”子项目 (003113010)

作者简介: 陈晓斌, 博士, 副教授。

\*\* 通讯作者: 代光辉 (1964-), 教授, 植物病理和植物化学研究。Correspondence author.

#### 1.4 酶联免疫 (ELISA) 测定 CMV

参考薛朝阳等<sup>[3]</sup>的方法, 双抗夹心酶联免疫 (DAS-ELISA) 测定 CMV: 选取阳性对照 (CMV 提纯病毒和 CMV 显症叶片), 阴性对照 (PBS-T 病毒提取缓冲液和对应的健康叶片), 测定金瓜和白瓜病叶中的 CMV。CMV 抗血清由浙江大学生物技术研究提供。

#### 1.5 分子检测<sup>[4]</sup>

选取白瓜 (崇明现代种苗园艺场, 崇明合兴园艺场) 和金瓜 (汲浜园艺场, 崇明现代种苗园艺场) 显症叶片提取植物总 RNA, 根据报道<sup>[7]</sup>的小西葫芦黄化花叶病毒 (Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV) 的 CP 基因特异序列设计了一对引物, 通过 RT-PCR 扩增目的片段, 核酸斑点杂交检测金瓜、白瓜中的 ZYMV。对样品为接种 ZYMV 和 CMV 后的显症西葫芦病叶。

## 2 结果与分析

### 2.1 鉴别寄主生物学测定结果

鉴别寄主温室测定结果, 莧色藜上局部褪绿斑, 无系统症状; 西葫芦和甜瓜幼苗上述症状基本相同, 表现为局部褪绿斑, 系统明脉, 黄化花叶, 叶片畸形, 矮化, 局部坏死; 三生烟、珊西烟、心叶烟上接种一周后未见到系统和枯斑症状。

### 2.2 电镜观察结果

负染观察和超薄切片观察, 病毒为弯曲的线状粒子, 无包膜, 典型的病毒粒子长度为 750nm, 宽 11nm, 粒子螺旋结构模糊, 而大部分马铃薯 Y 病毒组成员具明显的螺旋结构; 系统感染的组织中



图 1 白瓜病叶超薄切片观察

示风轮状内含体(↓)和聚集的病毒粒子(↑) (10 000×)

Fig.1 EM observation of sections of *C. melo* L. var. *conomon*  
Typical pinwheel-like inclusion bodies (↓) diagnostic of viruses and flexuous thread virus particles (↑) in *C. melo* L. var. *conomon* (10 000×).

有风轮状内含体 (图 1, 图 2), 它们由片状的风轮组成, 叶子浸出液中很容易见到有特殊条纹的内含体碎片。内含体和细胞器病变是同时发展的, 发病初期的叶片内内含体数量少, 个体小, 显症叶片内含体数量多, 个体增大, 在细胞中占据较大空间。发病后期很容易看到束状体结构, 基部与膨大的内质网相连。叶绿体、线粒体和内质网等细胞器经过膨大、膜破裂到最后解体。金瓜和白瓜观察结果基本一致 (图 1, 图 2, 图 3)。

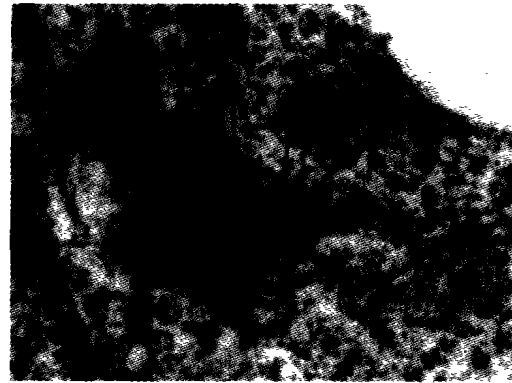


图 2 金瓜病叶超薄切片观察

示风轮状内含体 (↓) (13 500×)

Fig.2 EM observation of sections of *C. pepo* L. var. *ovifera*  
Typical pinwheel-like inclusion bodies (↓) diagnostic of viruses in *C. pepo* L. var. *ovifera* (13 500×)



图 3 金瓜显症病叶超薄切片观察

示束状体 (↑)、不规则内含体和细胞器大部分解体 (15 000×)

Fig.3 EM observation of sections of *C. pepo* L. var. *ovifera*  
Cylindrical (↑) and irregular inclusion bodies, collapsed membranous bodies (15 600×).

### 2.3 ELISA 测定 CMV

酶联免疫测定时供试金瓜、白瓜样品所测得的 OD 值与阴性对照 (PBS-T 病毒提取缓冲液和对应的健康叶片) 相近, 远远低于阳性对照 (CMV 提

纯病毒和 CMV 显症叶片), 说明没有 CMV 侵染。两次 ELISA 检测所的结果一致。

#### 2.4 核酸斑点杂交检测结果

以带毒植物总 RNA 为模板, 以 ZYMV 的 CP 基因特异序列设计引物通过 RT-PCR 扩增, PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳并回收纯化, RNA 点杂交结果如图 4 所示。除接种 CMV 后的西葫芦对照样品无杂交信号外, 其余均为阳性反应。说明选取样品崇明现代种苗园艺场、崇明合兴园艺场和汲浜园艺场的金瓜、白瓜均带有 ZYMV。

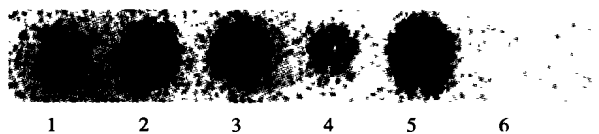


图 4 RNA 点杂交结果

1, 白瓜, 崇明现代种苗园艺场; 2, 白瓜, 崇明合兴园艺场; 3, 金瓜, 汲浜园艺场; 4, 金瓜, 崇明现代种苗园艺场; 5, 西葫芦, 接种 ZYMV; 6, 西葫芦, 接种 CMV。

Fig.4 RNA dot blot detection of ZYMV

1, *C.melo* L.var.conomon from modern seed and nursery horticulture farming of Chongming; 2, *C.melo* L.var.conomon from horticulture farming of Chongming, Hexing; 3, *C.pepo* L. var. ovifera from horticulture farming of Xibang; 4, *C.pepo* L. var.ovifera, from modern seed and nursery horticulture farming of Chongming; 5, Zucchini infected by ZYMV; 6, Zucchini infected by CMV.

### 3 讨论

侵染瓜类的病毒种类国内报道的有以下几种<sup>[5]</sup>: 黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV), 西瓜花叶病毒-2 (*Watermelon mosaic virus-2*, WMV-2), 香甜瓜叶脉坏死病毒 (*Muskmelon vein necrosis virus*, MuVNV), 南瓜花叶病毒 (*Squash mosaic virus*, SMV) 和烟草坏死病毒 (*Tobacco necrosis virus*, TNV)。本研究经鉴别寄主生物学测定、电镜负染观察和超薄切片观察、酶联免疫测定和分子检测, 综合试验结果初步表明, 引起崇明主要特色出口蔬菜金瓜、白瓜病毒病的病原初步鉴定

为一种病毒, 即 Desbiez C 和 Lecoq H<sup>[6]</sup> 报道的小西葫芦黄化花叶病毒 (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV)。

瓜类病毒病原中, 黄瓜花叶病毒分布极广, 而且常常与其它病毒形成复合侵染, 加重危害。在对崇明金瓜、白瓜病毒病原检测过程中, 我们比较注意考虑 CMV。但从鉴别寄主检测、电镜观察 (包括病毒粒体的提纯后观察) 和 DAS-ELISA 检测的结果显示, 无论是崇明现代种苗园艺场、崇明合兴园艺场、汲浜园艺场等地采集的金瓜还是白瓜标本, 均未检测到 CMV。因此初步认为无 CMV 复合侵染的可能。

ZYMV 可由蚜虫以非持久性方式传播, 这一点可以从崇明栽培的金瓜、白瓜常常温室入口处最先感病 (或发病最重) 直至整栋大棚严重发生这一症状特征得到佐证。

**致谢:** 在本研究进行过程中得到浙江大学生物技术研究所周雪平教授、蒋军喜博士和浙江大学分析测试中心洪健教授的帮助, 在此表示感谢。

### 参考文献

- [1] 田波, 裴美云. 植物病毒研究方法 (上) [M]. 北京: 科学出版社, 1987, 505.
- [2] 林均安, 高锦梁, 洪健. 实验生物电子显微术 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1989.
- [3] 薛朝阳, 周雪平, 石银鹿, 等. 利用 DAS-ELISA 进行番茄花叶病毒的田间检测 [J]. 植物病理学报, 1998, 29 (2): 157-162.
- [4] 吴兴泉, 吴祖建, 谢联辉, 等. 核酸斑点杂交检测马铃薯 X 病毒 [J]. 福建农业大学学报, 2001, 30 (增刊): 191-193.
- [5] 刘树生, 曹若彬, 朱国念. 蔬菜病虫害防治手册 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995, 347.
- [6] Desbiez C, Lecoq H. Zucchini yellow mosaic virus [J]. Plant Pathology, 1997, 46: 809-829.
- [7] Provvidenti R, Gonsalves D. Occurrence of zucchini yellow mosaic virus in cucurbits from Connecticut, New York, Florida and California [J]. Plant Dis, 1984, 68: 443-446.