

实验方法与技术

Experimental Method & Technology

多重 PCR 检测籽用西葫芦种子带毒及
热处理脱毒效果分析

任琛荣, 周登攀, 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, 石河子 832003)

摘要 为了明确籽用西葫芦种子携带病毒的情况,以籽用西葫芦种子为材料,采用多重 PCR 技术检测种子带毒率。同时为了筛选出有效脱除病毒的方法,通过相对定量法分析了不同温度湿热和干热处理对种子携带病毒的钝化效果。结果表明,从 7 个籽用西葫芦品种种子幼苗中均可检测到 CMV、ZYMV 及 WMV,其检出率分别为 67.1%、50.0% 和 72.3%,多个病毒的复合检出率为 66%。不同品种种子幼苗的病毒检出率有明显差异,其中‘粒丰 9 号’种子幼苗的病毒检出率最低,为 60%,而‘京丰 9 号’,‘瑞丰 9 号’,‘绿丰 9 号’及‘金葫 360’的病毒检出率均为 100%。8 种处理均能不同程度降低籽用西葫芦种子幼苗的带毒率,其中干热 60、70、75℃,湿热 75℃ 处理同时脱除 WMV、CMV 和 ZYMV 的效果最好。

关键词 籽用西葫芦; 种子; 带毒率; 种子处理

中图分类号: S 436.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.02.020

Detection of viruses in seeds of seed-zucchini and evaluation of
heat treatment on virus elimination

Ren Chenrong, Zhou Dengpan, Du Yejuan, Xiang Benchun

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

Abstract To determine whether seeds of seed-zucchini are infected by viruses and screen the efficient elimination method, the seed-borne virus rate was detected by multiplex RT-PCR, and virus elimination efficiency was evaluated by fluorescence real-time RT-PCR after moist and dry heat treatments under different temperatures. The result showed that CMV, ZYMV and WMV were detected from seedling of seed-zucchini, with the detection rates of 67.1%, 50.0% and 72.3%, respectively, while the composite detection rate was 66%. Different varieties of seed-zucchini seedling had different virus detection rates, the lowest ratio was 60% (‘Lifeng-9’) and the highest rate was 100% (‘Jingfeng-9’, ‘Ruifeng-9’, ‘Lvfen-9’ and ‘Jinhu360’). Wet and dry heat treatments had some influence on seed-borne virus rate. Dry heat treatments had the highest virus elimination rate for WMV, CMV and ZYMV at 60, 70 and 75℃, so did the wet heat treatment for the three viruses at 75℃.

Key words seed-zucchini; seeds; seed-borne virus rate; seed treatment

籽用西葫芦籽粒营养价值高,口感好,广受国内外人们的喜爱,成为近年来在新疆发展较快的新兴产业之一,且种植面积逐步扩大。近期调查发现,病毒病是籽用西葫芦生产种植中普遍发生的病害,引起植株叶片畸形,果实畸形坏死,产籽量低,甚至落花,落果,造成严重的经济损失,成为制约籽用西葫芦产业发展的重要障碍^[1]。籽用西葫芦属葫芦科作物。已报道的葫芦科作物种传病毒共有 11 种^[2],如黄瓜

花叶病毒 *Cucumber mosaic virus* (CMV)^[3]、西瓜花叶病毒 *Watermelon mosaic virus* (WMV)^[4]、小西葫芦黄花叶病毒 *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)^[3]、番木瓜环斑病毒西瓜株系 *Papaya ringspot virus-watermelon* (PRSV-W)^[5] 及黄瓜绿斑驳花叶病毒 *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV)^[6] 等。其中 CMV 是雀麦花叶病毒科 *Bromoviridae* 黄瓜花叶病毒属 *Cucumovirus* 的典型种,寄主范围广泛,能侵染 85

收稿日期: 2016-04-04 修订日期: 2016-06-03

基金项目: 兵团农作物病害安全防控创新团队(2101802CX7155)

* 通信作者 E-mail: XBC@shzu.edu.cn

科 1 000 多种植物^[7]。而 WMV、ZYMV 及 PRSV-W 均是马铃薯 Y 病毒属 *Potyvirus* 的成员,这 4 种病毒主要由瓜蚜、桃蚜等 75 种蚜虫传播,也可通过机械、种子等传播。目前,有关籽用西葫芦种子是否带毒,带何种病毒以及在何种热处理条件下能有效脱除种子携带的病毒等研究尚未见报道。加强种子带毒率检测,从源头阻断病毒病害的流行,蔓延,对籽用西葫芦产业的发展具有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 试验材料

种子样品来自石河子市面上农资公司所售的籽用西葫芦种子,品种分别为:‘芳新源’、‘京丰 9 号’、‘瑞丰 9 号’、‘粒丰 5 号’、‘粒丰 9 号’、‘绿丰 9 号’、‘金葫 360’。mRT-PCR 所用的阳性对照为本实验室保存的同时携带 ZYMV、CMV、WMV、PRSV-W 的西葫芦叶片。大肠杆菌 DH5 α 菌株为本实验室保存。

1.2 试验试剂

RNA 提取试剂 TRIzol 购自 TaKaRa 公司;反

转录试剂盒购自 Thermo 公司;Taq DNA 聚合酶、dNTPs、Taq PCR Mix、琼脂糖凝胶回收试剂盒等购自北京康为世纪生物科技有限公司;2000 bp DNA marker 购自全式金生物;荧光定量 SYBR Green I 购自 Invitrogen 生物技术有限公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 建立多重 PCR 反应体系

1.3.1.1 引物的设计和合成

根据 GenBank 上登录的各病毒序列,用 Primer Premier 5.0 引物设计软件分别设计以 18S rRNA 为内标的多重 PCR 引物和以 β actin 为内参的荧光定量特异性引物。表 1 中扩增长度为 242、372、449 和 571 bp 的引物分别为扩增 WMV、CMV、PRSV-W 和 ZYMV 的特异引物;将这 4 对引物和长度为 1 036 bp 的 18S rRNA 内标引物混合用于多重 PCR;长度为 115、151、115 bp 的引物和 92 bp 的 β actin 引物用于 WMV、CMV 和 ZYMV 的相对表达量测定。PCR 引物由北京华大科技有限公司合成。

表 1 扩增病毒和内标片段的特异性引物

Table 1 Specific primers for amplifying segments of ZYMV, PRSV-W, CMV, WMV and 18S rRNA

病毒和内标 Virus and internal control	编号 Code no.	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	扩增长度/ bp Product length
WMV	5'端引物	GGATGGGGAAGAGCAAGTTGAG	242
	3'端引物	CTTCTCTTGCCCTGTTTGGTGT	
	5'端引物	GAGTTTGGGTGATGATGGATGGG	115
	3'端引物	TCTGCTGCGTCTGAGAAATGGTG	
CMV	5'端引物	ATCAACCAGTGCTGGTCGTAAC	372
	3'端引物	GGAACTTTACGGACTGTCACCC	
	5'端引物	CGGATGCTAACTTTAGAGTCTTGTC	151
	3'端引物	GGTGGCTTTAGGGTAATAGATGTG	
PRSV-W	5'端引物	GTCAATGTTGGGACCAGTGGA	449
	3'端引物	CGCGCATGTATCTCTCAGTAG	
ZYMV	5'端引物	AACAGTAGCAGCTGTCACGAAG	571
	3'端引物	GCGGGCTCTTTCAGGAGTTT	
	5'端引物	ACGGTTGTTGTGAATCAGTGTCT	115
	3'端引物	GAGTTTTGTGGTTTATCCCCTTT	
18S rRNA	5'端引物	CTGAGAAACGGCTACCACAT	1 036
	3'端引物	CTGTTATTGCCTCAAACCTCC	
β actin	5'端引物	AATCCACGAACTACCTACAACCTCC	92
	3'端引物	TTGAACCACCACTGAGGACGATG	

1.3.1.2 优化多重 PCR 反应体系

针对影响多重 PCR 扩增效果的退火温度、Taq DNA 聚合酶浓度、dNTPs 浓度,在反转录条件不变的情况下,进行多重 PCR 反应体系的优化。优化某

一因素时,其他因素不变。退火温度:设 50、52、54、56、58、60、62、64℃ 8 个处理;Taq DNA 聚合酶浓度:设 0、0.5、1.0、1.5、2、2.5、3、4 U/ μ L 8 个处理;dNTPs 浓度:设 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L

8 个处理。

1.3.1.3 检测多重 PCR 的灵敏度

用蛋白核酸仪测定 CMV、ZYMV、WMV 和 PRSV-W 的核酸浓度,并用超纯水以 3^0 、 3^{-1} 、 3^{-2} 、 3^{-3} 、 3^{-4} 、 3^{-5} 、 3^{-6} 的稀释倍数进行病毒 RNA 的稀释,各浓度取 1 μ L 进行单重及多重 PCR 反应,检测其灵敏度。

1.3.2 籽用西葫芦种子带毒检测

1.3.2.1 籽用西葫芦幼苗的培育

从市面上随机抽取 7 个籽用西葫芦品种,每个品种取 50 粒种子,分别播于经 180℃, 8 h 高温灭菌的土中,室温下培养。待长至四叶期,每个品种随机取 30 株幼苗进行病毒检测。

1.3.2.2 多重 PCR 检测

采用 RNAiso Plus 试剂盒用改良 TRIzol 法提取植株总 RNA。

cDNA 第一链的合成:将 5 μ L 总 RNA 模板, 1 μ L oligo(dT)₁₈ 引物与 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×第一链反应缓冲液,1 μ L RiboLock™ RNA 酶抑制剂,2 μ L 10 mmol/L dNTPs Mix, 1 μ L 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℃ 保存备用。

采用多重 PCR,以 18S rRNA 为内标检测种子所带病毒^[9-11]。多重 PCR 反应:以 cDNA 第一链为模板进行 PCR。25 μ L 反应体系:cDNA 3 μ L, 10 μ mol/L 特异性引物,包括 18S rRNA 0.5 μ L、WMV 0.8 μ L、CMV 1 μ L、ZYMV 0.8 μ L 和 PRSV-W 1 μ L, 10×PCR buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.3 μ L,加 ddH₂O 至终体积为 25 μ L。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 62℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环;后 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,用凝胶成像系统观察结果并照相,统计检出率。检出率 (%) = (检出病毒种子数/抽检种子总数) × 100。

1.3.2.3 PCR 产物的克隆及测序

用凝胶回收试剂盒纯化目的片段,在 4℃ 连接至 pMD18-T 载体,转化到大肠杆菌感受态细胞中,经红白斑筛选,挑取阳性克隆,送至北京华大公司测序。

1.3.3 籽用西葫芦种子的热处理

1.3.3.1 热处理方法

湿热法:将 120 粒‘京丰 9 号’种子平均分为 4

份,每份 30 粒,分别在 60、65、70 和 75℃ 热水中处理 10 min,再放入灭菌水中浸泡 24 h,沥出晾干备用;

干热法:将 120 粒‘京丰 9 号’种子平均分为 4 份,每份 30 粒,先用烘箱 40℃ 加热 24 h,再将每份种子样品分别用 60、65、70 和 75℃ 加热 72 h,待种子温度降至室温备用。

将每种处理后的种子分别播于装有经过 180℃, 8 h 高温灭菌土的试验钵中,室温下培养。同时以室温,灭菌水浸泡的种子为对照处理。

1.3.3.2 分析热处理效果的方法

以多重 PCR 检测种子的热处理效果,方法同种子带毒检测,并统计脱毒效率。脱毒效率 (%) = (1 - 处理后的带毒率/对照带毒率) × 100。

以 β actin 为内参,用荧光定量 PCR 确定种子热处理后病毒的相对表达量。以未经热处理,室温灭菌水浸泡的种子为对照。每处理取 10 粒种子,重复 3 次,每个重复再重复 3 次上机检测。荧光定量 PCR 反应体系为 10 μ L,其中 SYBR premix Ex Taq™ 5 μ L, cDNA 1 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L,加 ddH₂O 至终体积为 10 μ L。荧光定量 PCR 扩增条件:94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环;后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。

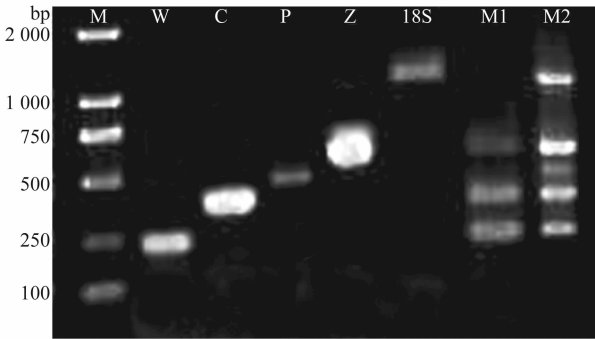
荧光定量数据用 Sigma Plot 12.5 软件分析,并用 SPSS 软件分析其差异显著性。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 反应体系的建立

2.1.1 多重 PCR 的特异性

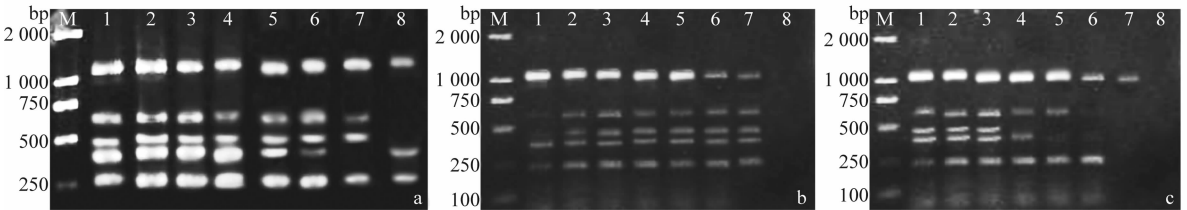
以经鉴定同时携带 CMV、ZYMV、WMV 和 PRSV-W 的籽用西葫芦叶片为阳性对照,无毒苗为阴性对照,分别进行单重和多重 PCR,结果(图 1)表明,分别以各病毒的特异引物进行单重 PCR 扩增,阳性对照可分别得到大小为 242、372、449、571 bp 的 WMV、CMV、PRSV-W、ZYMV 的目的条带,而将这 4 种病毒的特异引物和 18S rRNA 引物混合后进行多重 PCR,阳性对照仍可得到预期的目的条带,且条带的亮度及清晰度均较好,而阴性对照只扩增得到 1 036 bp 的 18S rRNA。用同一 RNA 进行 mRT-PCR 反应,得到的目的条带与 sRT-PCR 扩增条带大小一致,说明 mRT-PCR 能同时检测这 4 种病毒。



M: 2 000 bp DNA Marker; W, C, P, Z 分别为 WMV, CMV, PRSV-W, ZYMV 的单重 PCR; 18S: 多重 PCR 扩增阴性对照; M1: 无 18S rRNA 引物的多重 PCR 扩增 ZYMV, CMV, WMV; M2: 多重 PCR 扩增 ZYMV, CMV, WMV 和 PRSV-W M: 2 000 bp DNA Marker; W, C, P, Z indicate application result for WMV, CMV, PRSV-W and ZYMV by simplex PCR; 18S: Negative control of multiplex PCR; M1: Application result for ZYMV, CMV and WMV by multiplex PCR without primer of 18S rRNA; M2: Application result for ZYMV, CMV, WMV and PRSV-W by multiplex PCR

图 1 单重及多重 PCR 的特异性比较

Fig. 1 Comparison of specificity for multiplex PCR and simplex PCR



a: 退火温度, 1~8: 64、62、60、58、56、54、52、50℃; b: *Taq* DNA 聚合酶浓度, 1~8: 4、3、2.5、2、1.5、1.0、0.5、0 U/μL; c: dNTPs 浓度, 1~8: 1.0、0.8、0.6、0.4、0.3、0.2、0.1、0 mmol/L; M: DL2000 Marker

图 2 多重 PCR 主要参数的优化

Fig. 2 Optimization for the three main parameters of mRT-PCR

2.1.3 多重 PCR 的灵敏度

以 1 μL 稀释 3^0 、 3^{-1} 、 3^{-2} 、 3^{-3} 、 3^{-4} 、 3^{-5} 、 3^{-6} 倍的 RNA 为模板分别进行单重和多重 RT-PCR。进行单重 PCR 时, WMV、CMV、PRSV-W 和 ZYMV 的灵敏度分别为 3^{-5} 、 3^{-4} 、 3^{-2} 和 3^{-6} , 与多重 PCR 的扩增结果基本相符合(图 3)。说明多重 PCR 与单重 PCR 的灵敏度相同。

2.2 籽用西葫芦种子带毒检测

选取 7 个籽用西葫芦品种, 每个品种取 50 粒种子育苗至 4 叶期, 用多重 PCR 技术检测样品的带毒率及复合带毒率。结果(表 2)表明, 从新疆石河子市面上所售的 7 个籽用西葫芦品种的种子中均检测出 CMV、WMV 及 ZYMV, 且均未检测出 PRSV-W。不同品种种子病毒的检出率不同, 7 个品种中有 4 个品种种子的病毒检出率均为 100%, 检出率最低的品种为‘粒丰 9 号’, 为 60%。不同品种种子所带的主要病毒不同,

2.1.2 多重 PCR 反应体系的优化

退火温度优化结果(图 2a)显示, 54~64℃均可扩增出 5 条带, 且退火温度在 58~64℃范围内目的条带较清晰, 其中 62℃的目的条带最清晰, 明亮, 效果最好, 因此本试验选 62℃为最佳退火温度。

Taq DNA 聚合酶量优化结果(图 2b)显示, *Taq* DNA 聚合酶量在 0、0.5、1.0、1.5、2、2.5 和 3 U/μL 时均可扩增出 5 条目的条带, 但 *Taq* DNA 聚合酶量为 1.5 U/μL 时扩出的 5 条带比 1.0 U/μL 清晰, 且随着酶量的增加, 条带再没有明显变化, 因此本试验选 1.5 U/μL 为最佳 *Taq* DNA 聚合酶量。

dNTPs 浓度优化结果见图 2c, dNTPs 浓度在 0.6、0.8 和 1.0 mmol/L 时, 扩增出各条带较好, 且 0.8 mmol/L 的 dNTPs 浓度较 0.6 mmol/L 扩增的条带清晰, 与 1.0 mmol/L 扩增的条带没有明显变化, 因此选 0.8 mmol/L 为本试验的 dNTPs 浓度。

CMV 检出率最高的品种为‘绿丰 9 号’, 达 92%, 而‘粒丰 9 号’的检出率只有 50%; ZYMV 检出率最高的品种是‘瑞丰 9 号’, 为 80%, 最低检出率是‘粒丰 5 号’, 为 22%; CMV、ZYMV 和 WMV 的复合检出率在‘瑞丰 9 号’中最高, 为 60%, 在‘粒丰 5 号’中最低, 为 0。所有种子病毒的平均检出率为 86%, 其中 CMV 检出率为 67.1%, ZYMV 检出率为 50%, WMV 检出率为 72.3%, 而 2 种病毒复合检出率为 28%, 3 种病毒复合检出率为 38%。95.62% 检测为阳性的植株不表现任何病毒症状, 只有个别植株表现叶片畸形, 褪绿斑点症状。

2.3 温度处理对籽用西葫芦种子的影响

2.3.1 热处理对籽用西葫芦种子脱毒的影响

多重 PCR 检测结果表明, 不同温度湿热和干热处理都具有脱毒作用, 但干热处理比湿热处理效果更好, 其中, 65℃湿热处理脱毒效果最差, 75℃干热处理脱毒效果最好, 可达 96%。

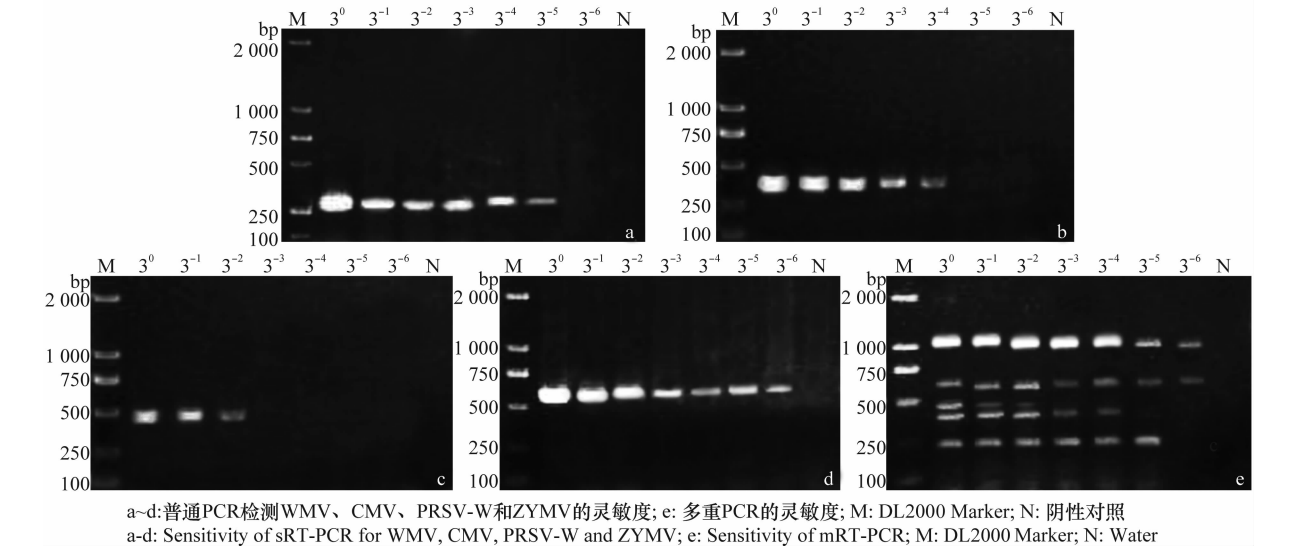


图 3 多重 PCR 灵敏度的测定

Fig. 3 Detection of mRT-PCR sensitivity

表 2 籽用西葫芦种子中各种病原病毒的检出率

Table 2 Detection rates of different viruses in seeds of seed-zucchini

品种 Variety	总检出率/% Total detection rate	各病毒检出率/% Virus detection rate			复合检出率/% Composite detection rate			
		CMV	ZYMV	WMV	CMV+ ZYMV	ZYMV+ WMV	CMV+ WMV	CMV+ ZYMV+ WMV
芳新源 Fangxinyuan	74.0	64.0	68.0	64.0	8.0	6.0	0	54.0
京丰 9 号 Jingfeng-9	100.0	78.0	56.0	100.0	0	0	22.0	56.0
瑞丰 9 号 Ruifeng-9	100.0	70.0	80.0	100.0	0	20.0	10.0	60.0
粒丰 5 号 Lifeng-5	68.0	56.0	22.0	12.0	12.0	0	12.0	0
粒丰 9 号 Lifeng-9	60.0	50.0	40.0	50.0	0	0	20.0	30.0
绿丰 9 号 Lvfang-9	100.0	92.0	54.0	90.0	0	0	46.0	46.0
金葫 360 Jinh360	100.0	60.0	30.0	90.0	0	10.0	30.0	20.0
均值 Average value	86.0	67.1	50.0	72.3	2.9	5.1	20.0	38.0

相对荧光定量 PCR 结果显示,从脱除病毒种类来看,8 种处理均能不同程度脱除种子携带的 CMV、ZYMV 以及 WMV。差异显著性分析结果表明:在 $P<0.05$ 时,热处理对 WMV 脱毒效果最为显著,对 CMV 的脱毒效果较差;在 8 种处理下,CMV 的相对表达量均显著下降;ZYMV 除 65℃湿热处理外,其他温度处理后病毒相对表达量均显著降低;WMV 相对表达量也显著降低,其中干热 60、70、75℃以及湿热 75℃处理和常温处理的对照相比差异最为显著(图 4)。

2.3.2 温度处理对种子发芽率及发芽势的影响

8 种处理均不同程度地降低籽用西葫芦种子的发芽率和发芽势,其中对发芽势的影响明显大于发芽率(图 5)。从发芽率看,播种 15 d 后,对照种子发芽率为 98%,60、65、70、75℃干热和湿热处理的种

子发芽率分别为 96%、95%、93%、92%和 97%、96%、94%、93%。可看出,随温度的升高,发芽率依次下降,干热 75℃处理较对照下降 6%。

从发芽势来说,播种 10 d 后,对照种子发芽势为 96%,60、65、70、75℃干热处理的发芽势为 92%、86%、72%、65%,60、65、70、75℃湿热处理种子的发芽势为 94%、90%、82%、73%。温度处理对发芽势的影响明显大于发芽率,其中 75℃干热处理对发芽势的影响最大,较对照处理下降 31%。

3 讨论

目前,多重 PCR 技术已广泛应用于食品^[12]、医学^[13]等领域。而用多重 PCR 检测葫芦科病毒的研究较少,特别是关于籽用西葫芦种子携带病毒的研究尚未见报道。籽用西葫芦病毒病在其种植

区均发生严重,尤其是在石河子等地,ZYMV、CMV、WMV 及 PRSV-W 是侵染籽用西葫芦的主要病毒^[1]。由于籽用西葫芦种子较难提取 RNA,本试验用灭过菌的土壤种植籽用西葫芦,待其长至四叶期进行病毒检测。由于种子至幼苗的成长周期中,土壤等都经过灭菌处理,因此,从幼苗中检测到的病毒基本可认为是种子中所带的病毒。本

试验对多重 PCR 反应体系进行了优化,确定了最佳退火温度为 62℃,Taq DNA 聚合酶浓度为 1.5 U/μL,dNTPs 浓度为 0.8 mmol/L,并且验证了多重 PCR 的灵敏度,建立了可靠的检测籽用西葫芦 ZYMV、CMV、WMV 及 PRSV-W 的多重 PCR 体系。可为生产中检测籽用西葫芦病毒病提供一套简单、快速、有效的方法。

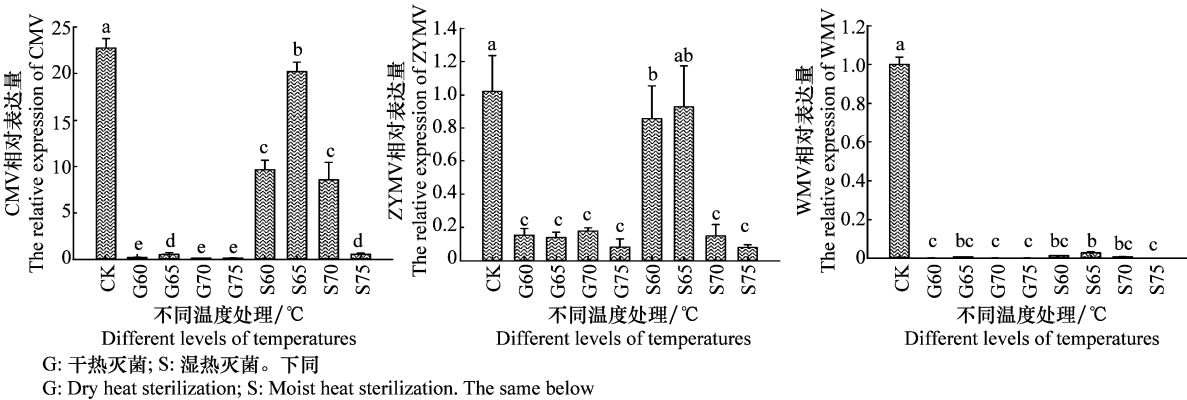


图 4 经不同温度处理后的种子中 CMV,ZYMV 和 WMV 的相对表达量(P<0.05)

Fig. 4 Relative expression level of CMV, ZYMV and WMV after seed treatment with different temperatures(P<0.05)

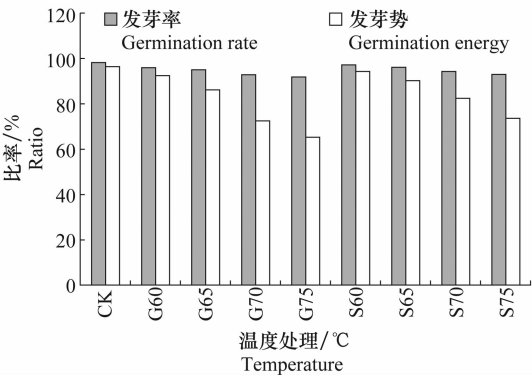


图 5 不同处理对种子发芽率及发芽势的影响

Fig. 5 The effect of different treatments on germination rate and germination energy of seeds

葫芦科植物种传病毒种类虽不多,但大多数具有很高的检疫重要性。葫芦科种子一旦带毒率过高,通过种子贸易及远距离调运等,在适宜的温湿度下可引起葫芦科病毒病的大暴发,最终造成严重的经济损失,因此加强种子带毒检测,从源头控制病毒病害的蔓延,对籽用西葫芦产业的安全生产具有重要意义。本试验采用建立的多重 PCR 技术,在 7 种籽用西葫芦种子中成功检测到其携带的 CMV、ZYMV 和 WMV。其中‘京丰 9 号’、‘瑞丰 9 号’、‘绿丰 9 号’和‘金葫 360’这 4 个品种的种子带毒率均为 100%,而‘粒丰 9 号’种子的带毒率仅 60%。说明不

同品种种子的带毒率不同。

由于生产实践中种子使用量大,实际操作人员专业技术有限,对种子直接进行脱毒处理是钝化病毒最简单有效的方法^[8, 14]。日本和韩国针对黄瓜绿斑驳花叶病毒采取以干热处理为主的综合防治措施,卓有成效^[15]。本试验采用 60、65、70 和 75℃ 4 个温度梯度干热和湿热处理籽用西葫芦种子,再用荧光定量 PCR 技术检测热处理后的种子中 CMV、ZYMV 及 WMV 的相对表达量。结果表明,在 40℃处理 24 h,70℃干热处理 72 h 条件下脱除 CMV 效果最好,ZYMV 在 75℃湿热处理 10 min,冷水处理 24 h 下的脱毒效果最好,而 WMV 则在 40℃处理 24 h,60℃干热处理 72 h 条件下脱毒效果最好。本研究利用热处理可有效脱除籽用西葫芦种子携带的病毒,从源头阻断病毒的发生,研究方法可为籽用西葫芦病毒病的防治提供一定参考。

参考文献

[1] 任琛荣,郝小军,都业娟,等. 新疆石河子及新湖籽用西葫芦病毒病分子检测[J]. 北方园艺, 2016(1): 102-106.
[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] Zitter T A, Hopkins D L, Thomas C E. Compendium of cucurbit diseases [M]. St Paul, MN: The American Phytopatho-

logical Society, 1996.

- [4] Fletcher J D, Wallace A R, Rogers B T. *Potyvirus* 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.
- [5] Ranebennur H. Diagnosis and management of *Papaya ring-spot virus* in cucurbits [D]. Dharwad: College of Agriculture, Dharwad University of Agricultural Sciences, 2005.
- [6] 吴会杰, 秦碧霞, 陈红运, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒西瓜、甜瓜种子的带毒率和传毒率[J]. 中国农业科学, 2011, 44(7): 1527-1532.
- [7] Roossinck M J. Pathogen profile *Cucumber mosaic virus*, a model for RNA virus evolution [J]. Molecular Plant Pathology, 2001, 2(2): 59-63.
- [8] Kim D H, Lee J M. Seed treatment for *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) in gourd (*Lagenaria siceraria*) seeds and its detection [J]. Journal of the Korean Society for Horti-

cultural Science, 2000, 41(1): 1-6.

- [9] 王冲, 陈集双, 洪健, 等. 以 18S rRNA 为内参照的多重 RT-PCR 检测 3 种百合病毒[J]. 植物病理学报, 2006, 36(3): 204-211.
- [10] 牛建新, 马兵钢, 何梅, 等. 库尔勒香梨主要病毒多重 RT-PCR 检测技术研究[J]. 植物病理学报, 2006, 36(1): 12-21.
- [11] 赵丽, 古勤生, 陈红运, 等. 葫芦科作物 3 种主要病毒的多重 RT-PCR 方法的建立[J]. 果树学报, 2008, 25(5): 703-707.
- [12] 何玮玲, 张驰, 杨静, 等. 食品中 4 种肉类成分多重 PCR 的快速鉴别方法[J]. 中国农业科学, 2012, 45(9): 1873-1880.
- [13] 李瑾, 毛乃颖, 秦萌, 等. GeXP 多重 PCR 技术同时检测 12 种常见呼吸道病毒[J]. 病毒学报, 2011, 27(6): 526-532.
- [14] Dawson W O, Kuhn C W. Kinetics of multiplication, inactivation, and particle-breakdown of *Cowpea chlorotic mottle virus* in cowpea [J]. Phytopathology, 1974, 64(7): 951-957.
- [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.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 116 页)

- [8] Schneider D. Insect antennae [J]. Annual Review of Entomology, 1964, 9(1): 103-122.
- [9] Zacharuk R Y. Ultrastructure and function of insect chemosensilla [J]. Annual Review of Entomology, 1980, 25(1): 27-47.
- [10] 马瑞燕, 杜家纬. 昆虫的触角感器[J]. 昆虫知识, 2000, 37(3): 179-183.
- [11] Bartlet E, Romani R, Williams I H, et al. Functional anatomy of sensory structures on the antennae of *Psylliodes chrysocephala* L. (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. International Journal of Insect Morphology and Embryology, 1999, 28(4): 291-300.
- [12] 胡江, 李义龙, 刘剑虹, 等. 麻点豹天牛成虫感器的扫描电镜研究[J]. 电子显微学报, 2001, 20(4): 499-500.
- [13] 程红, 严善春, 徐波, 等. 青杨脊虎天牛触角主要感器的超微结构及其分布[J]. 昆虫知识, 2008, 45(2): 223-232.
- [14] 孙飞, 李祥瑞, 刘小侠, 等. 松褐天牛六种类型的触角感器的超微结构[J]. 昆虫知识, 2010(2): 347-354.
- [15] 阎雄飞, 孙月琴, 刘永华, 等. 光肩星天牛触角感受器的环境扫描电镜观察[J]. 林业科学, 2010, 46(11): 104-109.
- [16] Liu Xinhai, Luo Youqing, Cao Chuanjian, et al. Scanning electron microscopy of antennal sensible of *Anoplistes halodendri halodendri* and *Anoplistes halodendri ephippium* (Coleoptera: Cerambycidae) [J]. Microscopy Research and Technique, 2012, 75(3): 367-373.
- [17] Merivee E, Ploomi A, Luik A, et al. Antennal sensilla of the ground beetle *Platynus dorsalis* (Pontoppidan, 1763) (Coleoptera, Carabidae) [J]. Microscopy Research and Technique, 2002, 55(5): 339-349.
- [18] Merivee E, Ploomi A, Rahi M, et al. Antennal sensilla of the ground beetle *Bembidion properans* Steph. (Coleoptera, Cara-

bidae) [J]. Micron, 2002, 33(5): 429-440.

- [19] 刘桂清, 田明义. 奇步甲触角感器电镜扫描观察和触角电位反应[J]. 华南农业大学学报, 2008, 29(2): 50-55.
- [20] 杨贵军, 张大治, 孙晶莹. 沟眶象触角感器的扫描电镜观察[J]. 昆虫知识, 2008, 45(6): 926-931.
- [21] 杨燕, 杨茂发, 杨再华, 等. 云南木蠹象触角感器的扫描电镜观察[J]. 林业科学, 2009, 45(2): 72-74.
- [22] Yan Shanchun, Meng Zhaojun, Peng Lu, et al. Antennal sensilla of the pine weevil *Pissodes nitidus* Roel. (Coleoptera: Curculionidae) [J]. Microscopy Research and Technique, 2011, 74(5): 389-396.
- [23] Bleeker M A, Smid H M, Aelst A C V, et al. Antennal sensilla of two parasitoid wasps: a comparative scanning electron microscopy study [J]. Microscopy Research and Technique, 2004, 63(5): 266-273.
- [24] Hu Fei, Zhang Guona, Wang Jinjun. Scanning electron microscopy studies of antennal sensilla of bruchid beetles, *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) [J]. Micron, 2009, 40(3): 320-326.
- [25] Chen Haibo, Zhang Zhen, Wang Hongbin, et al. Antennal morphology and sensilla ultrastructure of *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae), an invasive forest pest in China [J]. Micron, 2010, 41(7): 735-741.
- [26] Chen Li, Fadamiro H Y. Antennal sensilla of the decapitating phorid fly, *Pseudacteon tricuspis* (Diptera: Phoridae) [J]. Micron, 2008, 39(5): 517-525.
- [27] Chen Huhai, Zhao Yunxian, Kang Le. Antennal sensilla of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) in relation to food preferences and habits [J]. Journal of Biosciences, 2003, 28(6): 743-752.

(责任编辑: 田 喆)