

毛晓红,于毅,张秀霞,等.春季西葫芦日光温室黄瓜花叶病毒病发生规律与防虫网的防控效果[J].江苏农业科学,2017,45(16):96-98.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.16.024

春季西葫芦日光温室黄瓜花叶病毒病发生规律 与防虫网的防控效果

毛晓红¹,于毅¹,张秀霞¹,刘永杰²,竺晓平²,国家进³,张安盛¹

(1. 山东省农业科学院植物保护研究所/山东省植物病毒学重点实验室,山东济南 250100;

2. 山东农业大学植物保护学院,山东泰安 271018; 3. 山东省蔬菜工程技术研究中心,山东潍坊 262702)

摘要:为探明西葫芦日光温室中黄瓜花叶病毒病发生规律和防虫网隔离瓜蚜对该病毒病的防控效果,于 2014、2015 年在山东济南地区开展田间定点调查和室内 PCR 检测试验。结果表明,在春季日光温室西葫芦生长期,西葫芦带毒植株 4 月中旬开始出现,之后带毒率逐渐上升,5 月下旬达 30% 左右。黄瓜花叶病毒病的发生与瓜蚜密度密切相关,瓜蚜密度达到一定程度后,出现西葫芦带毒植株,瓜蚜进入迅速增长后期后,西葫芦带毒株率亦呈上升趋势;春季日光温室中带毒瓜蚜在 4 月中旬开始出现,而后带毒率呈逐渐上升趋势,5 月下旬达 36.11%~45.56%。西葫芦生长期用 100 目防虫网隔离可降低西葫芦植株带毒率。该研究能为日光温室西葫芦病毒病科学防控提供理论依据。

关键词:黄瓜花叶病毒(CMV)病;发生规律;瓜蚜;种群动态;防虫网

中图分类号: S436.421.1⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)16-0096-03

黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus,简称 CMV)隶属雀麦花叶病毒科(Bromoviridae)黄瓜花叶病毒属(*Cucumovirus*),该病毒寄主范围广,可侵染包括葫芦科、茄科、十字花科、豆科在内的 1 000 多种寄主植物^[1-2]。寄主植物被侵染后表现为矮化、花叶、褪绿,同时还表现出斑驳、明脉及过敏性坏死等症状。自 1916 年 CMV 被首次确定为黄瓜花叶病病原以来,因其发生的普遍性和危害的严重性,已成为世界范围内重要的、研究较多的 RNA 病毒之一,位居世界第 4^[3-4]。黄瓜花叶病毒病在自然界主要由蚜虫以非持久性方式传播,如瓜蚜(*Aphis gossypii*)、桃蚜(*Myzus persicae*)等,此类蚜虫寄主范围广,在西葫芦植株及其他蔬菜上发生严重,为黄瓜花叶病毒病的传播提供了条件^[5]。目前,黄瓜花叶病毒病在山东省蔬菜主产区日光温室西葫芦上发生面积大、危害严重,对日光温室西葫芦的安全生产造成了重大影响。

目前国内外学者对黄瓜花叶病毒的研究,主要有病毒的生物学特性^[6]、株系分化^[7]、综合防控技术^[8-10]等,郑光宇研究了桃蚜对黄瓜花叶病毒新疆株的传播特性^[11],但关于瓜蚜对日光温室中黄瓜花叶病毒的传播未见报道。本研究对山东省春季西葫芦日光温室黄瓜花叶病毒病发生规律、发生规律与传毒介体瓜蚜种群动态的关系、西葫芦生长期罩防虫网隔离瓜蚜对病毒病的防控效果进行了分析,以期以西葫芦病毒病的科学防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地点为山东省济南市历城区董家镇张而村西葫芦日光温室,试验地面积均为 0.067 hm²,西葫芦品种为优美 F1。黄瓜花叶病毒病调查定植时间分别为 2014 年 3 月 4 日、2015 年 3 月 12 日、2015 年 9 月 4 日,株行距为 60 cm × 100 cm,长势良好。

1.2 试验仪器

TP600PCR 仪(日本 TaKaRa 公司);RXZ-280D-LED 光照培养箱(宁波江南仪器厂);5804R 低温冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);凝胶成像仪(美国 Alpha Innotech 公司);DYY-6C 电泳仪(北京市六一仪器厂);2.5~1 000 μL 移液器(德国 Eppendorf 公司);MDF-U4086S-80℃冰箱(日本 SANYO 公司);MLS-3020 高压灭菌锅(日本 SANYO 公司);HD-920 超净工作台(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);MDF-U4086S-80℃冰箱(日本 SANYO 公司)。

1.3 试验材料

植物 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,目录号:DP432];反转录试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,目录号:KR107];Taq PCR MasterMix[天根生化科技(北京)有限公司,目录号:KT201];TRIzol(美国 Invitrogen 公司);DL2000Marker(ProbeGene 公司);三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司);100 目防虫网(浙江省台州市路桥区德农防虫网厂,加工成 100 cm × 100 cm × 100 cm 防虫网罩,用于西葫芦生长期罩网)。

1.4 试验方法

1.4.1 西葫芦植株和瓜蚜体内黄瓜花叶病毒 PCR 检测 单头蚜虫 RNA 提取:将单头蚜虫置于 1.5 mL 离心管中,放入液氮中冷却,用微型小杵研磨均匀;加入 250 μL TRIzol 试剂,室温放置 5 min;加入 50 μL 三氯甲烷混合物[三氯甲烷:异戊

收稿日期:2016-03-26

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201303028)。

作者简介:毛晓红(1985—),女,山东烟台人,研究方向为蔬菜病毒防控。Tel:(0531)83178008;E-mail:315159613@qq.com。

通信作者:张安盛,硕士,研究员,主要从事蔬菜病虫害防控技术研究。Tel:(0531)83179542;E-mail:zhanganheng2003@163.com。

醇(体积比) = 24 : 1], 振荡混匀 3 min; 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min, 移上清至另一离心管中(约 125 μ L), 加入等体积异丙醇(-20 ℃预冷), 室温放置 10 min(夏天放于-20 ℃冰箱中预冷 30 min), 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 70% 预冷的乙醇(250 μ L) 洗涤, 4 ℃、12 000 r/min 离心 5 min, 待乙醇挥发后加入 8 μ L RNase - Free ddH₂O。

植物基因组 RNA 提取: 将西葫芦叶片在液氮中磨碎; 每 50 ~ 100 mg 组织加 1 mL 裂解液 RZ, 用匀浆仪进行匀浆处理; 将匀浆样品在室温中放置 5 min, 使得核酸蛋白复合物完全分离; 4 ℃、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 转入 1 个新的无 RNase 的离心管中。加入 200 μ L 三氯甲烷, 盖好管盖, 剧烈振荡 15 s, 室温放置 3 min; 4 ℃、12 000 r/min 离心 1 min, 缓慢加入 0.5 倍体积无水乙醇, 混匀(此时可能会出现沉淀); 将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱 CR3 中, 4 ℃、12 000 r/min 离心 30 s, 弃掉收集管中的废液, 将 CR3 放入收集管中, 向吸附柱 CR3 中加入 700 μ L 漂洗液 RW, 室温静置 2 min, 4 ℃、12 000 r/min 离心 30 s, 弃废液, 重复操作步骤, 将吸附柱放入 2 mL 收集管中, 4 ℃、12 000 r/min 离心 2 min, 去除残余液体, 将吸附柱 CR3 转入 1 个新的 1.5 mL 离心管中, 加 30 μ L RNase - Free ddH₂O, 室温放置 2 min, 4 ℃、12 000 r/min 离心 2 min, RNA 于 -80 ℃冻存。

反转录体系共 20 μ L: 模板 RNA 10 μ L、Random 1 μ L、dNTP 1 μ L、Mix 1 μ L、5 \times First - Stranf Buffer 4 μ L、RNase - free ddH₂O 3 μ L, 将所有试剂轻轻混匀后, 按照程序(25 ℃ 10 min, 42 ℃ 45 min, 85 ℃ 5 min) 进行反应。反应结束后 cDNA 于 -20 ℃冻存。

PCR 反应: 使用 CMV 特异引物(上游引物 5' - GATGGACAAATCTGAATCAACCAG - 3'; 下游引物 5' - AACTGGGAGCACCCAGATGTG - 3') 进行扩增, 反应体系为 10 μ L: cDNA 2 μ L, F 端、R 端引物各 0.5 μ L, 2 \times PCR MasterMix 5 μ L, ddH₂O 2 μ L。PCR 反应程序: 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 57 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 10 min。PCR 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。

1.4.2 春季日光温室西葫芦植株上黄瓜花叶病毒病发生规律与瓜蚜种群动态的关系 日光温室西葫芦植株黄瓜花叶病毒病调查时间分别为 2014 年、2015 年 3 月中旬至 5 月下旬

(3 月 12 日—5 月 26 日), 每 10 d 左右调查 1 次, 每年调查 8 次。调查方法: 在日光温室东、西两侧分别保留 2 行西葫芦作保护行, 将日光温室自东向西平均分为 5 个小区, 在每个小区的中间位置选取西葫芦 2 行, 在每行西葫芦的南、中、北各固定 2 株代表性西葫芦, 共固定 60 株西葫芦; 每次均调查固定西葫芦植株上、中部 5 张叶片上瓜蚜数量; 同时采集固定西葫芦植株的叶片和 30 ~ 40 头瓜蚜, 室内用 PCR 方法检测西葫芦植株、瓜蚜对黄瓜花叶病毒的带毒率。

1.5 日光温室西葫芦生长期罩防虫网对西葫芦病毒病的防控效果

试验时间为 2015 年 9 月上旬至 11 月中旬, 西葫芦定植时(2015 年 9 月 4 日) 用防虫网将供试西葫芦植株罩网隔离, 共罩防虫网罩 36 个, 1 个防虫网罩对应西葫芦苗 2 株。分别在西葫芦定植后 10、20、30、40 d 揭掉防虫网罩, 每个处理重复 3 次, 每次重复 3 个防虫网罩; 分别在揭防虫网罩后 5 min、10 d、20 d、30 d PCR 检测原先防虫网内西葫芦植株的带毒率。

2 结果与分析

2.1 春季西葫芦日光温室黄瓜病毒病发生与瓜蚜种群动态的关系

图 1 表明, 2014、2015 年 3 月中旬至 5 月下旬调查结果显示, 2 年中日光温室西葫芦瓜蚜种群动态、黄瓜花叶病毒病发生规律基本相似, 即单叶瓜蚜数量、西葫芦带毒株率整体均呈逐渐增长的趋势。2 年中西葫芦带毒植株均于 4 月中旬开始出现(病株率 3.33% ~ 5.00%), 而后西葫芦带毒株率逐渐提高, 到 5 月下旬达到高峰, 2014、2015 年带毒株率分别为 31.67%、30.00%; 2014、2015 年瓜蚜则分别于 4 月上旬、3 月下旬开始出现, 但此时瓜蚜数量较低, 平均蚜量分别为 2.17、0.21 头/张; 4 月中旬以后瓜蚜数量迅速增长, 5 月下旬达到最高值, 平均蚜量分别为 26.89、23.11 头/张。

从西葫芦病毒病发生与瓜蚜种群动态关系来看, 瓜蚜没有发生或发生数量较低时, 西葫芦植株不带毒; 随着瓜蚜数量的增长, 西葫芦带毒植株开始出现; 瓜蚜进入迅速增长后期后, 西葫芦带毒株率亦呈上升趋势, 西葫芦植株带毒率的提高与瓜蚜种群动态的增长密切相关。

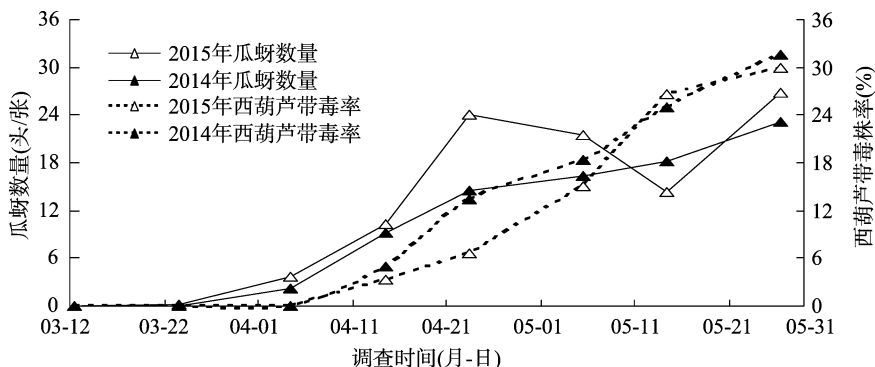


图1 春季日光温室西葫芦植株带毒率与瓜蚜种群动态的关系

2.2 西葫芦日光温室瓜蚜带毒率检测

室内检测结果显示, 春季日光温室西葫芦植株上, 瓜蚜对黄瓜花叶病毒的带毒率呈现逐渐上升趋势: 3 月下旬至 4 月

上旬, 日光温室瓜蚜带毒率为 0, 4 月中、下旬, 瓜蚜带毒率小幅度上升(2.22% ~ 13.89%), 5 月中旬至下旬, 瓜蚜带毒率迅速升高, 2014、2015 年 5 月下旬瓜蚜带毒率分别达

36.11%、45.56%(表1)。

表 1 春季日光温室西葫芦瓜蚜对黄瓜花叶病毒的带毒率				
调查时间	2014 年		2015 年	
	瓜蚜数量 (头/张)	瓜蚜带毒率 (%)	瓜蚜数量 (头/张)	瓜蚜带毒率 (%)
3 月中旬	0.00	0.00	0.00	0.00
3 月下旬	0.00	0.00	0.21	0.00
4 月上旬	2.17	0.00	3.66	0.00
4 月中旬	9.23	2.78	10.36	2.22
4 月下旬	14.54	13.89	24.01	7.78
5 月上旬	16.39	19.44	21.43	25.56
5 月中旬	18.19	27.77	14.37	32.22
5 月下旬	23.11	36.11	26.89	45.56

表 2 日光温室西葫芦生长期罩防虫网对黄瓜花叶病毒病的防控效果

罩网时间 (d)	西葫芦带毒株率(%)			
	揭网后 5 min	揭网后 10 d	揭网后 20 d	揭网后 30 d
40	0.00	0.00±0.00aA	0.00±0.00bA	16.67±0.00bB
30	0.00	0.00±0.00aA	16.67±9.62bA	83.33±9.62aA
20	0.00	0.00±0.00aA	100.00±0.00aA	100.00±0.00aA
10	0.00	16.67±9.62aA	100.00±0.00aA	100.00±0.00aA

注:同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著,不同大写字母表示在 0.01 水平上差异显著。

3 结论与讨论

本研究表明,春季日光温室西葫芦植株瓜蚜数量呈逐渐增长趋势,西葫芦植株对黄瓜花叶病毒的带毒率呈逐渐上升趋势,西葫芦黄瓜花叶病毒病的发生与瓜蚜种群动态密切相关,即蚜虫密度达到一定程度后,会导致西葫芦带毒植株的出现并且发病率持续上升。春季日光温室西葫芦植株带毒瓜蚜出现时间为 4 月中旬,之后带毒率逐渐上升;西葫芦带毒株率出现时间为 4 月中旬,带毒株率也呈上升趋势,进一步说明日光温室西葫芦病毒病的发生与带毒瓜蚜密切相关。

在日光温室西葫芦中,被黄瓜花叶病毒入侵的带毒瓜蚜取食健康西葫芦使西葫芦植株带毒,其他健康瓜蚜取食带毒西葫芦植株后又成为带毒瓜蚜,这些带毒瓜蚜取食过程中又引起其他健康西葫芦植株发病,这种恶性循环会导致日光温室西葫芦带毒率越来越高。因此,阻断外来瓜蚜入侵和杀灭日光温室内部已有的瓜蚜是防控西葫芦病毒病的关键。本研究表明,日光温室西葫芦生长期罩 100 目防虫网隔离瓜蚜,可有效降低西葫芦植株带毒率,西葫芦植株受带毒瓜蚜危害越晚,发病株率越低,进一步说明日光温室罩防虫网切断外来带毒瓜蚜的入侵,是防治日光温室西葫芦病毒病的有效措施之一。

本研究明确了日光温室西葫芦病毒病发生规律、发生规律与传毒介体瓜蚜种群的动态关系及西葫芦生长期罩防虫网隔离瓜蚜对病毒病的防控效果,为西葫芦病毒病的科学有效防治提供了理论依据。但要实现对日光温室西葫芦病毒病彻底有效的防治,尚须开展大量工作,须要加强对西葫芦抗病毒品种选育,以及对西葫芦病毒病、瓜蚜与寄主之间的互作关系,特别是瓜蚜对病毒病的传毒机制等的深入研究。

2.3 西葫芦生长期罩网隔离瓜蚜对西葫芦病毒病的控制效果

表 2 表明,日光温室西葫芦罩 100 目防虫网,罩防虫网时间越长,揭防虫网后相同时间内西葫芦发病率越低。揭防虫网后 5 min 采样检测,罩防虫网 40、30、20、10 d 处理西葫芦均未发病;揭防虫网后 10 d 采样检测,罩防虫网 40、30、20 d 处理的西葫芦均未发病,罩防虫网 10 d 处理的西葫芦发病率为 16.67%,但 4 个处理无显著差异;揭防虫网后 20 d 采样检测,罩防虫网 40 d 西葫芦仍未发病,30 d 处理的西葫芦发病率为 16.67%,显著低于罩防虫网 10、20 d 处理(西葫芦发病率 100.00%);揭防虫网后 30 d 采样检测,罩防虫网 40 d 西葫芦发病率为 16.67%,极显著低于罩防虫网 10、20、30 d 处理(西葫芦发病率 83.33%~100.00%)。

参考文献:

[1] Xu Z, Barnett O W. Identification of a cucumber mosaic virus strain from naturally infected peanuts in China[J]. Plant Disease, 1984, 68 (5): 386-389.

[2] 王海河, 林奇英, 谢联辉, 等. 黄瓜花叶病毒三个毒株对烟草细胞内防御酶系统及细胞膜通透性的影响[J]. 植物病理学报, 2001, 31(1): 43-49.

[3] Porter R H. A new mosaic disease of Cucumber[J]. Phytopathology, 1930, 20(1): 113.

[4] Studholme D J, Glover R H, Boonham N. Application of high-throughput DNA sequencing in phytopathology[J]. Annual review of phytopathology, 2011, 49: 87-105.

[5] Tien P, Wu G. Satellite RNA for the biocontrol of plant disease[J]. Advances in Virus Research, 1991, 39: 321-339.

[6] Daniels J, Campbell R N. Characterization of cucumber mosaic virus isolates from California[J]. Plant Disease, 1992, 76(12): 1245-1250.

[7] 李华平, 胡晋生, 范怀忠. 黄瓜花叶病毒的株系鉴定研究进展[J]. 中国病毒学, 1994, 9(3): 187-194.

[8] 赵伟, 张俊华. 黄瓜花叶病毒病诊断与防治技术[J]. 黑龙江科技信息, 2015(32): 275.

[9] 吴慧锦. 保护地黄瓜花叶病毒病的识别与防治[J]. 山西农业, 2001(2): 24.

[10] 岳玲. 黄瓜花叶病毒病的识别与防治[J]. 现代农业, 1992(8): 17.

[11] 郑光宇. 黄瓜花叶病毒新疆株的桃蚜传播特性[J]. 吉首大学学报(自然科学版), 2006, 27(3): 75-77, 105.