

干热处理对南瓜种子发芽及 CGMMV 病毒活性的影响

杜忠佩¹, 陈星伊², 金卫杰^{2,3}, 李兰华¹, 张玉宝²

(1. 酒泉职业技术学院, 甘肃 酒泉 735000; 2. 中国科学院西北生态环境资源研究院, 甘肃 兰州 730000; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 黄瓜绿斑驳花叶病毒(CGMMV)可借助种子远距离传播,对葫芦科植物的生长和发展造成严重威胁。为有效防控黄瓜绿斑驳花叶病毒(CGMMV)在南瓜上的侵染,在保证南瓜种子发芽及子叶生长不受影响的同时能够有效降低黄瓜绿斑驳花叶病毒(CGMMV)的活性的前提下,寻找南瓜种子干热处理的最适温度和时间条件。我们对南瓜新种子和旧种子进行干热处理,比较了处理温度、持续时间及处理后保存时间对南瓜种子发芽率的影响,并采用实时荧光定量 RT-PCR 检测病毒的表达量。试验结果表明,处理温度和持续时间及其互作效应都对南瓜种子的发芽率有显著或极显著影响。恒温干热法处理南瓜新种子,处理时间为 72 h,处理温度为 80 °C 和 86 °C 时,种子发芽率不会显著降低,且 CGMMV 全部灭活。保存 1 a 的南瓜旧种子,用低于 80 °C 的温度处理 72 h,发芽率没有显著变化,但当处理温度为 86 °C 时,种子发芽率显著降低。变温干热法处理南瓜旧种子,由于累计处理时间长达 7 d,当变温中最高温度达到 72 °C 以上时,将显著影响南瓜种子的发芽。由此可见,干热处理种子是防治南瓜 CGMMV 病毒的有效方法之一。

关键词: 南瓜种子; 干热处理; 发芽率; 黄瓜绿斑驳花叶病毒(CGMMV); 病毒活性

中图分类号: S642.1

文献标志码: A

文章编号: 2097-2172(2023)09-0839-06

doi: 10.3969/j.issn.2097-2172.2023.09.010

Effects of Dry Heat Treatments on Pumpkin Seed Germination and CGMMV Virus Activity

DU Zhongpei¹, CHEN Xingyi², JIN Weijie^{2,3}, LI Lanhua¹, ZHANG Yubao²

(1. Jiuquan Vocational and Technical College, Jiuquan Gansu 735000, China; 2. Northwest Institute of Eco-environment and Resources, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou Gansu 730000, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Cucumber green mottled mosaic virus (CGMMV) can spread over long distances through seeds, posing a serious threat to the growth and development of cucurbitaceae plants. In order to effectively prevent and control the infection of the virus on pumpkins, the optimal temperature and time conditions were searched for dryheat treatment which would not only ensure the germination and cotyledon growth of pumpkin seeds but also reduce the activity of CGMMV. The effects of treatment temperature, duration, and storage time after treatment on the germination rate of pumpkin seeds were compared with new and old pumpkin seeds, and real-time fluorescence quantitative RT-PCR was used to detect the expression level of the virus. The results showed that the treatment temperature, duration, and their interaction effects had a significant and extremely significant impact on the germination rate of pumpkin seeds. When new pumpkin seeds were treated with thermostatic dry heat treatment for 72 hours at 80 °C or 86 °C, the germination rate of the seeds did not significantly decrease, and all CGMMV were inactivated. When the old pumpkin seeds stored for one year were treated at the temperature below 80 °C for 72 hours, the germination rate did not show significant changes. However, when the treatment temperature was 86 °C, the germination rate of old seeds was significantly decreased. When the alternate temperature dryheat method was used to treat old pumpkin seeds, it would significantly affect the germination of pumpkin seeds due to the cumulative treatment time up to 7 days while the highest temperature among alternate temperature reached above 72 °C. The experimental results indicated that dryheat treatment of seeds was one of the effective methods for controlling pumpkin CGMMV virus.

Key words: Pumpkin Seed; Dryheat treatment; Germination rate; Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV); Virus activity

收稿日期: 2023-07-27

基金项目: 酒泉市科技支撑计划A类(2022CA1009)。

作者简介: 杜忠佩(1965—), 男, 山东济宁人, 副教授, 主要从事农业设备工程教学研究和科研管理工作。Email: jqdzp@126.com。

通信作者: 张玉宝(1980—), 男, 甘肃平凉人, 研究员, 主要从事病毒学研究工作。Email: zyubao@lzb.ac.cn。

黄瓜绿斑驳花叶病毒(CGMMV)属于烟草花叶病毒属,正单链RNA病毒,是一种很稳定的病毒^[1]。该病毒对环境适应力极强、寄主广泛,对南瓜、西瓜和甜瓜等葫芦科植物的生长和发育造成严重威胁,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。2006年12月我国农业部颁布第788号公告^[2],将黄瓜绿斑驳花叶病毒列为全国检疫性的有害生物,严格控制该病毒的传入。

CGMMV主要通过带毒种子进行远距离传播,病毒粒子可以稳定存在于种子表皮与内种皮上,种子带毒是嫁接育苗环节扩散传播的最初毒源,砧木携带病毒,极易通过嫁接操作使该病害在苗床扩散传播蔓延到田间^[3],南瓜感染CGMMV病毒后,极易在田间扩散蔓延。因此,防止南瓜种子携带病毒,使用无毒健康种子是杜绝CGMMV病毒病发生的关键措施。干热处理是对带CGMMV病毒的种子进行杀毒处理的常用方法,该方法将带毒的干种子置于72℃以上的高温条件下一段时间,使病毒失去活性^[3],特别适合于较耐热的种子,也是一种生态友好型快速灭杀病毒的有效途径。有研究认为,杀灭CGMMV的有效温度为72℃,低于这个温度则没有效果^[4]。采用75℃处理3d,可以有效去除瓠瓜种子上的黄瓜绿斑花叶病毒^[5]。

不同的植物种子耐热性不同,利用干热处理方法杀灭种子病毒时,处理温度和时间的设置必须考虑对植物种子发芽率的影响。甘肃省酒泉市是全国著名的种子生产基地,生产的南瓜种子占全国供种量的80%,部分出口国外,因此对CGMMV病毒的杀毒处理显得尤为重要。而目前对南瓜种子进行干热处理使黄瓜绿斑驳花叶病毒失活的相关研究较少,缺乏系统的研究资料,无法对南瓜制种的种子公司进行有效指导。为此,我们通过试验,研究出南瓜种子干热处理的最适温度和时间条件,以确保南瓜种子发芽及子叶生长不受影响的同时能够大大降低黄瓜绿斑驳花叶病毒(CGMMV)的活性,从而黄瓜绿斑驳花叶病毒病的危害。

1 材料与方法

1.1 供试材料

指示南瓜品种为绿板栗南瓜爱碧斯。试验选用爱碧斯南瓜种子2份,其中1份为2022年当年

生产的新鲜种子,另1份为2021年生产、在室温条件下安全贮藏1a以上的种子。水分含量均为80g/kg,符合国家质量标准。种子为黄色种壳,种壳厚度介于西葫芦种子和西瓜种子之间,种壳的密度低于西葫芦和西瓜种子。

1.2 试验设计与方法

试验于2022年8月至2023年4月在酒泉职业技术学院进行。试验采用随机区组设计,每个处理均设温度与时间2个因素,每个处理设4个重复。分别以新种子(N,2022年生产)和旧种子(O,2021年生产)为处理对象。

1.2.1 恒温干热处理试验 共设4个温度水平,分别为CTe1,65℃;CTe2,72℃;CTe3,80℃;CTe4,86℃。设3个时间水平,分别为CTi1,60h;CTi2,72h;CTi3,96h。共计12个处理组合。以不进行干热处理的种子作为对照(CK)。

1.2.2 变温干热处理 试验设3个变温处理,每个变温处理有5个温度水平,分别为ATe1,30-50-65-50-30(℃);ATe2,35-50-72-50-35(℃);ATe3,40-60-80-60-40(℃)。设3个时间处理,每个时间处理也有5个时间水平,对应5个变温处理顺序,分别为ATi1,24-36-60-24-24(h);ATi2,24-24-72-24-24(h);ATi3,12-24-96-24-12(h)。共计9个处理组合。以不处理的种子作为对照(CK)。

干热处理在海精宏设备有限公司生产的型号为DHG-9123A的电热恒温鼓风干燥箱中进行,整个试验中恒温鼓风干燥箱内相对湿度在控制在15%~20%。

每个处理的新、旧种子量均为5kg。经干热处理后各处理的新、旧种子均分为5份,置于室温下保存备用。其中1份用于南瓜种子病毒检测,另外4份分别用于测定南瓜种子发芽率。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 发芽率 采用纸上发芽法,将经干热处理后1、7、30、90d的在室温下保存的南瓜新、旧种子在国产华普达250D型恒温光照培养箱中,在26℃的条件下进行发芽试验,4次重复,每重复各取新、旧种子100粒,8d后测定发芽率。试验过程按照GB/T3543.4农作物种子检验规程执行。

1.3.2 病毒检测 南瓜种子中黄瓜绿斑驳花叶病

毒(cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV)在中国科学院西北生态环境资源研究院皋兰生态与农业综合试验站实验室, 采用实时荧光定量 PCR 系统 (Mx3000P, Applied Biosystems, USA) 进行 SYBR Green I 实时荧光定量 (RT-PCR) 检测, 检测中使用 SYBR®Premix Ex Taq™II (TliRNaseH Plus, TaKaRa) 试剂盒, 采用两步法扩增技术^[6-7]。RT-qPCR 的反应体系为: 10 μL TB Green Premix Ex Taq II(TliRNaseH Plus) (2X), 0.8 μl PCR Forward Primer (10 μM), 0.8 μL PCR Reverse Primer (10 μM), 0.4 μL ROX Reference Dye II, 2 uL cDNA 和 6 μL RNA-free H₂O。两步法 PCR 扩增标准程序如下: 预变性 95 °C 30 sec → 95 °C 5 sec, 60 °C 34 sec, 循环 35 次。

1.4 数据处理和统计分析

1.4.1 种子发芽率的计算 种子发芽率是指在规定的条件和时间内正常发芽种子数的百分率, 采用下式计算。

$$\text{发芽率} = (\text{发芽期内发芽种子数} / \text{种子总数}) \times 100\%$$

1.4.2 病毒表达水平的计算 采用 2^{-ΔΔCt} 法对实时荧光定量 PCR 的结果进行计算, 获得病毒的相对表达量。其中 ΔΔCt = (处理组目的基因的 Ct 值 - 处理组内参基因的 Ct 值) - (未处理组目的基因的 Ct 值 - 未处理组内参基因的 Ct 值)^[8]。

Ct 是循环阈值 (cycle threshold 的缩写形式), 指在反转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 中扩增病毒 RNA 达到可检测水平所需的循环次数^[9]。病毒分离阳性率与 Ct 值呈负相关, 并且在 Ct 值 > 35 时分离阳性率即降为零^[10]。

1.4.3 数据分析 所有数据用 Excel 2016 进行初步整理归纳。利用 Excel 进行制图、SPSS26.0 进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 干热处理对南瓜种子发芽率的影响

2.1.1 恒温干热处理对种子发芽率的影响 恒温干热处理后 1 d 立即测定南瓜种子的发芽率, 对发芽率的方差分析结果表明, 处理温度和时间对南瓜新、旧种子的发芽率有极显著影响, 其交互作用对新、旧种子的发芽率分别有显著和极显著的

影响。

与对照相比, 处理时间为 60 h 和 72 h 时, 4 个处理温度对新种子的发芽率都没有显著影响, 且 4 个温度处理的种子发芽率也没有显著差异 (图 1)。但当处理时间延长至 96 h, 且温度高于 72 °C 时, 发芽率显著降低。说明长时间的高温处理, 南瓜新种子的发芽率会显著降低, 干热处理的时间最好不要超过 72 h。

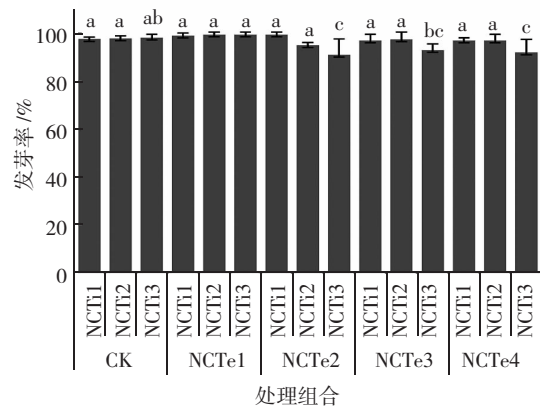


图 1 新种子恒温干热处理间种子发芽率比较

而旧种子对高温的敏感性比新种子高。从图 2 看出, 当处理温度达到 86 °C 时, 3 个不同处理时间的种子发芽率都显著低于对照和 3 个较低温度处理, 说明旧种子比新种子更不耐高温。当处理时间为 60 h 和 72 h 时, 65、72、80 °C 这 3 个处理温度的旧种子发芽率没有显著差异, 与对照相比也没有显著降低, 但当温度升高至 86 °C 时, 种子发芽率显著降低。因此, 干热法处理 1 a 以上的陈旧种子, 处理温度不高于 80 °C, 处理时间不超过 72 h。

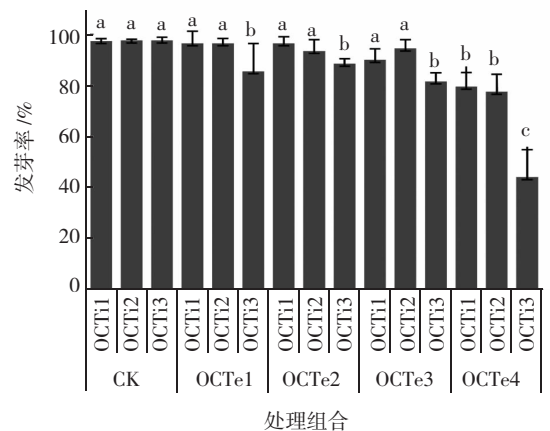


图 2 旧种子恒温干热处理间种子发芽率比较

2.1.2 变温干热处理对种子发芽率的影响 变温

干热处理后 1 d 立即测定南瓜种子的发芽率，对发芽率的方差分析结果表明，新南瓜种子变温处理的温度设计对种子发芽率有极显著影响，但变温处理对应的时间组合对种子发芽率的影响未达到显著水平，而两者交互作用对种子发芽率有极显著的影响。

在 ATe1[30-50-65-50-30(℃)]的变温处理下，3 种不同处理时间组合的种子发芽率与对照相比没有显著差异(图3)，在 ATe3[40-60-80-60-40(℃)]的变温处理下，3 种不同处理时间组合的种子发芽率都显著低于对照。ATe2[35-50-72-50-35(℃)]的变温处理下，除 ATi3[12-24-96-24-12(h)]的时间处理组合外，其他 2 种时间处理组合的发芽率也显著低于对照。

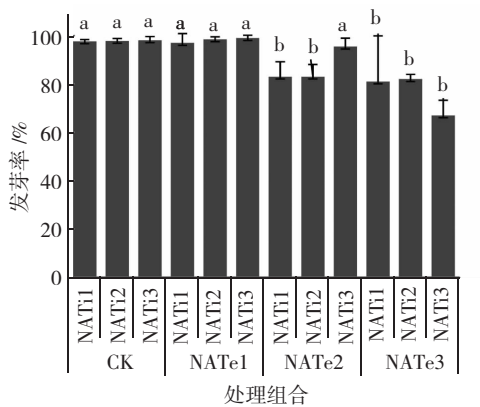


图3 新种子变温干热处理间种子发芽率比较

南瓜旧种子变温处理的不同温度设计、对应的时间组合和两者的交互作用都对种子发芽率有极显著影响。在所有对旧种子的变温处理中，除了变温处理 ATe1[30-50-65-50-30(℃)]和时间处理 ATi2[24-24-72-24-24(h)]的处理组合外，其

他所有变温处理组合的种子发芽率都显著低于对照(图4)。说明这种变温处理方式不适合南瓜旧种子的干热处理。

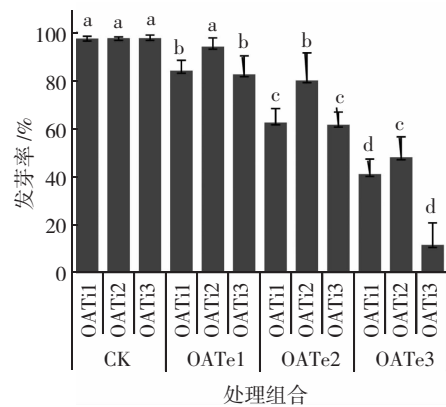


图4 旧种子变温干热处理间种子发芽率比较

2.2 种子干热法处理后保存时间对发芽率的影响

从图5和图6看出，南瓜种子在长时间的高温干热处理后，发芽率有显著降低，特别当处理温度高达 86℃、持续时间达到 96 h 的恒温处理或持续 6 d 的变温处理，都使南瓜种子发芽率明显降低，旧种子的降低幅度比新种子更大。但处理后随种子保存时间的延长，高温对种子的伤害有所修复，种子的发芽率有一定程度的升高。旧种子发芽率随保存时间的延长而升高的幅度高于新种子。如南瓜旧种子在 86℃高温处理 96 h 后，发芽率降低到 44.0%，保存 90 d 后，发芽率提高到 62.0%。而新种子相同条件处理后保存同样时间，发芽率从 92.0%仅升高到 94.5%。新种子经变温处理 ATe3[40-60-80-60-40(℃)]和时间处理 ATi3[12-24-96-24-12(h)]的处理组合，发芽率降低到 67.0%；但保存 90 d 以后，发芽率却升高到

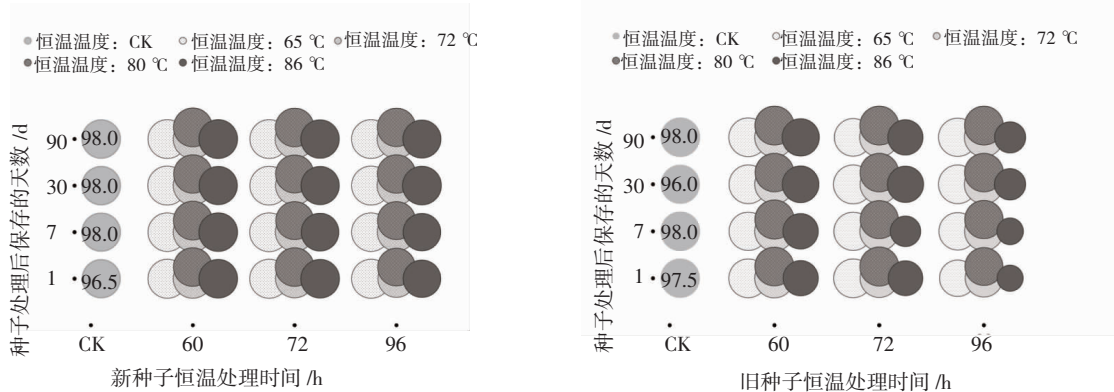


图5 恒温处理种子发芽率随保存天数的变化①

①气泡大小代表种子发芽率的高低

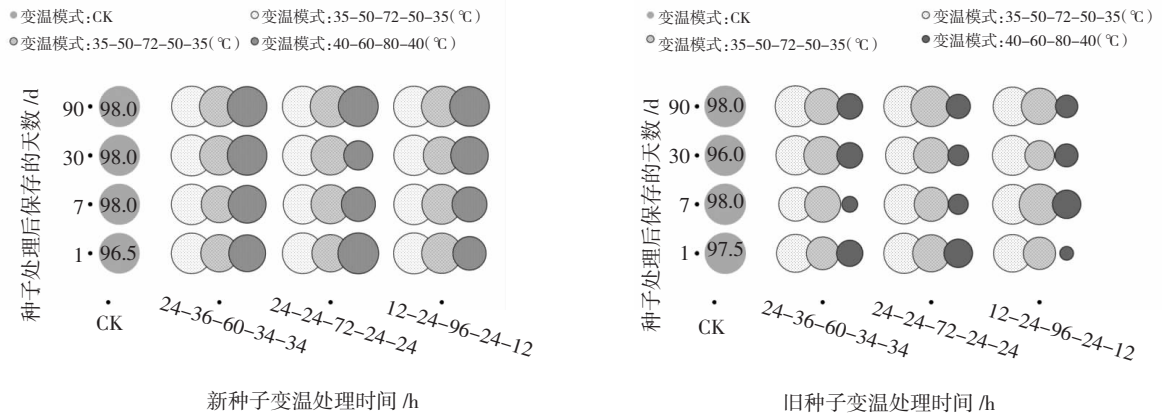


图 6 变温处理种子发芽率随保存天数的变化情况

93.0%。说明干热处理后对种子活力伤害越大, 较长时间的保存后, 发芽率升高幅度越大。但干热处理后种子受高温胁迫太严重, 发芽率降低幅度太大, 种子延长保存时间, 发芽率也很难恢复, 这种现象在不耐高温的旧种子变温处理中更加明显。旧种子较高温度的长时间变温处理后, 种子发芽率一直保持较低水平, 没有明显升高的趋势。

2.3 干热处理对南瓜种子黄瓜绿斑驳花叶病毒的灭活效果

对恒温干热处理和变温干热处理的南瓜新种子采用 RT-PCR 法进行 CGMMV 病毒检测 (图 7、图 8), 结果说明, 恒温干热处理时, 当处理温度高于 80 °C, 处理时间超过 72 h, 南瓜种子上的

CGMMV 全部灭活。采取变温处理时, 仅温度较低的 ATe1[30-50-65-50-30(°C)]的 3 个变温时长处理有少量病毒存活以外, 其他 2 个温度较高的变温时长处理的病毒全部失活。说明温度和时间控制适当, 采用干热处理法完全能杀灭南瓜种子的 CGMMV 病毒。

3 讨论与结论

大部分研究证实在 72 ~ 85 °C 的温度下处理葫芦科种子 72 h, 其携带的 CGMMV 病毒完全失活或钝化^[11-12]。本项研究表明, 带毒南瓜种子经 72 °C 干热处理 72 h, 绝大部分病毒灭活, 但仍能检出非常少的病毒存活。在 80 °C 温度下处理 72 h, 病毒才能全部失活。

不同的作物, 甚至相同作物的不同品种, 高温处理对种子的发芽率影响不同。干热处理对南瓜种子发芽率的影响研究较少, 黄芸萍等^[13]对 4 个南瓜砧木种子干热处理的结果表明, 当处理温度为 72 °C, 处理时间 72 h, 所有品种的种子发芽率与对照没有显著差别。但当温度提高至 75 °C 时, 处理 72 h 后, 有些品种的种子发芽率显著降低。宋顺华等^[12]研究发现, 68 ~ 80 °C 的温度处理种子 72 h 后, 不会影响其他葫芦种子的发芽势和发芽率, 但显著降低了南瓜种子的发芽势和发芽率。本研究结果显示, 当处理温度高达 86 °C, 处理时间 72 h, 南瓜新种子的发芽率仍没有显著降低。本研究的变温处理结果证明, 处理时间太长, 南瓜种子的发芽率严重降低。

有试验设计种子经干热处理后, 在不同温度下保存一段时间, 然后评价干热处理后的种子随保存时间延长, 发芽率和发芽势的变化情况, 结

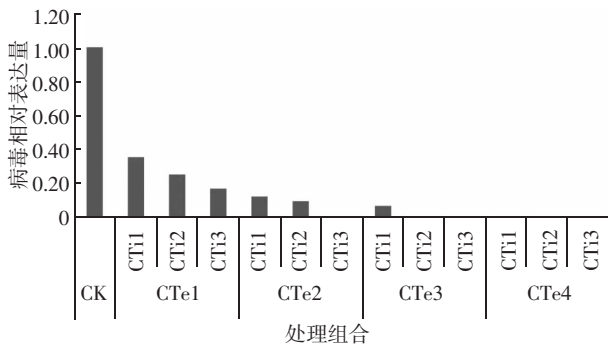


图 7 恒温处理前后种子 CGMMV 病毒相对含量

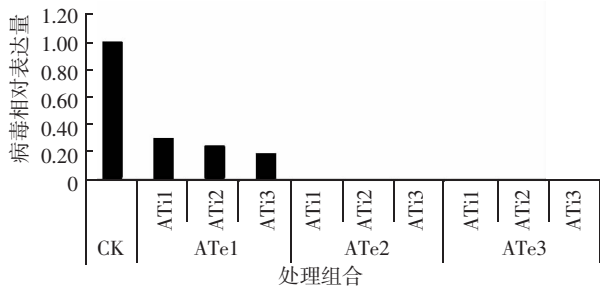


图 8 变温处理前后种子 CGMMV 病毒相对含量

果发现保存时间较短(30 d), 种子发芽率没有显著变化, 但保存时间超过 120 d 或 1 a, 发芽率显著降低^[12, 14]。本研究则发现对保存 1 a 的南瓜旧种子进行干热处理时, 较高温度处理后发芽率显著降低, 但保存 90 d 后, 发芽率有恢复至处理前的趋势。对这一同结果还需进一步的试验验证, 为干热处理种子提供更准确的数据支持。

试验结果表明, 处理温度和持续时间及其互作效应都对南瓜种子的发芽率有显著或极显著影响。恒温干热法处理南瓜新种子, 处理时间为 72 h, 处理温度为 80 °C 和 86 °C 时, 种子发芽率不会显著降低, 且 CGMMV 全部灭活。保存 1 a 的南瓜旧种子, 用低于 80 °C 的温度处理 72 h, 发芽率没有显著变化, 但当处理温度为 86 °C 时, 种子发芽率显著降低。变温干热法处理南瓜旧种子, 由于累计处理时间长达 7 d, 当变温中最高温度达到 72 °C 以上时, 将显著影响南瓜种子的发芽。由此可见, 干热处理种子是灭活南瓜 CGMMV 病毒的有效方法。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 中华人民共和国农业部种植业管理司. 中华人民共和国农业部第 788 号公告[EB/OL]. (2006-12-21)[2023-07-03]. https://www.moa.gov.cn/ztl/zwjy_1/200612/t20061225_745522.htm.
- [3] 宋顺华, 吴萍, 官国义, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病的发生及防控策略[J]. *北方园艺*, 2014(8): 105-108.
- [4] 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.
- [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] 刘美, 王毓洪, 彭斌, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒实时荧光定量 PCR 检测体系的建立[J]. *植物保护学报*, 2022, 49(4): 1063-1070.
- [7] 田沂民, 吴建祥, 陈磊, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒 SYBR Green I 实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立[J]. *农业生物技术学报*, 2022, 30(8): 1640-1648.
- [8] 韩祉君, 卢悦, 韩玉珠, 等. 马铃薯花粉特异性基因 StLAT52s 克隆、结构与功能及相对表达量分析[J/OL]. *吉林农业大学学报*: 1-12[2023-07-25]. <https://doi.org/10.13327/j.jjlau.2022.1707>.
- [9] 周敬民, 曾邦伟, 王敏, 等. Omicron 轻型患者发热特征及发热期核酸 Ct 值对核酸转阴时间的影响[J]. *福建医科大学学报*, 2023, 57(1): 22-26.
- [10] 郑焕英, 张官婷, 柯碧霞, 等. 新型冠状病毒荧光定量 PCR 的 Ct 值与病毒分离的结果分析[J]. *病毒学报*, 2023(1): 199-205.
- [11] 谢婷, 罗金燕, 陈磊, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒病防治方法的比较与展望[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2022, 48(3): 279-288.
- [12] 宋顺华, 官国义, 耿丽华, 等. 干热处理对葫芦科种子质量的影响及对黄瓜绿斑驳花叶病毒的防治效果[J]. *中国蔬菜*, 2018(2): 58-63.
- [13] 黄芸萍, 张华峰, 古斌权, 等. 南瓜砧木种子干热处理试验[J]. *浙江农业科学*, 2019, 60(5): 791-793.
- [14] 韦海忠, 吴新义, 吴晓花, 等. 干热和药剂处理对瓠瓜种子 CGMMV 的抑制效果[J]. *浙江农业科学*, 2017, 58(6): 942-944.