

西瓜细菌性果斑病菌在不同场所存活期的检测

李艳嫦¹ 孔静月¹ 吴九玲² 王琳³ 任小平³ 刘琼光¹

1. 华南农业大学资源环境学院, 广州 510642; 2. 广东省海丰县农业局, 海丰 516400;
3. 广东省农业厅植检站, 广州 510500

摘要 选择西瓜细菌性果斑病菌(*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, Aac)的抗利福平菌株 RifAac, 通过人工模拟接种试验, 采用选择性平板分离、菌落 PCR (Bio-PCR) 和常规 PCR 方法, 观察该病原细菌在西瓜种子、土壤、病残体和田水中的存活期。结果表明, 果斑病细菌在种子表面可存活 4~5 个月, 在田水中可存活 2 个月, 在不含植物残体的土壤中可存活 8 个月, 在含西瓜残体的土壤中可以存活 12 个月以上。

关键词 西瓜细菌性果斑病; 燕麦嗜酸菌西瓜亚种; 存活期; 菌落 PCR; 检测

中图分类号 S 432.4⁺2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)03-0332-05

西瓜细菌性果斑病是由燕麦嗜酸菌西瓜亚种 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, Aac) 引起的毁灭性病害, 其病原菌是我国和世界许多国家的进境植物检疫性有害生物之一^[1]。Aac 具有很强的破坏性, 主要侵染葫芦科植物的厚皮甜瓜、哈密瓜、西瓜、南瓜、黄瓜、丝瓜、蜜露洋香瓜和网纹洋香瓜等^[2]。20 世纪 80 年代后期, 西瓜细菌性果斑病多次在美国一些地方暴发, 造成了巨大的经济损失^[3-6]。我国在 20 世纪 90 年代也首次报道了西瓜细菌性果斑病, 随后在新疆、海南、内蒙古、北京、山东、吉林、福建、广东等地均有发生并呈上升趋势, 已导致西瓜和甜瓜减产, 甚至大面积绝收^[2,7]。

由于病菌主要通过葫芦科种子传播, 且病瓜种子带菌率较高, 故病原菌从被感染的种子传播到幼苗的几率很高^[8-10]。控制和消除病害的初侵染来源, 是植物病害防治的关键技术, 但目前对该病害的发生流行规律、病菌初侵染源的重要性等尚不清楚。有的研究者认为, 一些地方西瓜细菌性果斑病暴发, 其主要的接种源是受病菌污染的种子^[5]。然而, 有关病菌在种子上的存活期目前尚未有一致定论。此外, 来源于其他场所, 如土壤、病残体和田水中的病菌, 其存活期以及在病害发生和流行中的作用等也未见系统研究与报道。笔者对 Aac 在不同越冬场所的存活期进行了跟踪观察, 旨在为西瓜细菌性果斑病的检疫和病害的防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

西瓜细菌性果斑病菌野生菌株 Aac1 和抗利福平菌株 RifAac, 均由华南农业大学植物细菌研究室提供。

1.2 培养基

Aac 扩大培养培养基 (普通培养基): 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 7.4~7.8。

Aac 分离培养的培养基: 参照改良 ASCM 培养基^[11]并略作修改。KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ · 12H₂O 2 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, 酵母膏 10 g, MgSO₄ · 12H₂O 29 mg, CaCl₂ 51 mg, Na₂MoO₄ · 2H₂O 25 mg, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, 灭菌后每 1 L 培养基中加入溴甲酚紫 0.6 mL (15 mg/mL), 氨苄青霉素 20 mg, 新生霉素 10 mg, 放线菌酮 25 mg, 无水乙醇 10 mL, pH 7.0~7.2。

Aac 富集培养基 (普通液体培养基): 除不含琼脂外, 其成分与普通培养基相同。牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, 氯化钠 NaCl 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.4~7.8。

1.3 人工模拟接种

1) 健康种子。将新红宝西瓜品种的健康种子 (由广东省农业厅提供) 分成 3 等份, 每份 500 粒, 取

收稿日期: 2011-08-09

基金项目: 农业部公益性行业专项 (201003066-1) 和广东省植物防疫检疫研究专项 (4200-F09043)

李艳嫦, 硕士研究生。研究方向: 植物病原细菌学。E-mail: 397544112@qq.com

通讯作者: 刘琼光, 博士, 副教授。研究方向: 植物病原细菌学。E-mail: qgliu@scau.edu.cn

2 等份浸入 1×10^9 cfu/mL 的抗利福平 RifAac 菌液中 1 h, 在自然条下室内晾干后, 分别转入灭菌胶袋中, 1 份接菌的种子放置在室温下, 另 1 份接菌种子置于 4 °C 冰箱保存; 接无菌水的那份种子也置于 4 °C 冰箱保存, 作为阴性对照。定期分离和检测种子上 Aac 存活情况。

2) 土壤。将种植过水稻、番茄、烟草和塘泥等不同来源的普通土壤各 5 kg 均匀混在一起, 经 PCR 检测不带西瓜果斑病菌 Aac, 将混合土装入洁净盆钵中, 每盆装土 15 kg。设无病残体土壤和有病残体土壤(每盆埋入新红宝西瓜藤和瓜皮约 500 g)。将活化后并培养 48 h 的 RifAac 菌液, 调整菌液浓度约 1×10^9 cfu/mL, 2009 年 9 月 30 日进行人工接种。每盆接种 200 mL 菌液, 以不接菌为对照, 随后淋自来水使土壤保持湿润状态。

3) 田水。田水取自室内盆栽水稻盆钵中的水, 掺入自来水, 每盆 10 kg 田水, 接种 200 mL 菌液。

将接种后的盆钵置于露天开放的自然环境中, 期间定期浇自来水, 以保持土壤一定湿度。定期分离和检测土壤里 Aac 存活情况。

1.4 Aac 的分离

分别采用直接分离、菌落 PCR 和常规 PCR 3 种方法对人工接种的 Aac 进行检测, 若能直接分离出 Aac, 则不进行富集培养; 若不能直接分离出 Aac, 则进行富集培养后再分离, 获得的单菌落进行菌落 PCR(Bio-PCR); 若富集培养后无法再分离得到目标菌, 则提取样品 DNA 进行常规 PCR 检测。

定期分别取人工接种的种子 10 g、土壤 10 g 和水 10 mL, 研钵内碾碎后, 加入 100 mL 无菌水, 进行 10 倍梯度稀释, 各取 50 μ L 均匀涂布于含 100 μ g/mL 利福平的 ASCM 选择性平板上, 30 °C 下培养 3~4 d, 观察 RifAac 菌株生长情况。如果直接分离不到病菌, 则先将样品于 Aac 富集培养基培养 24 h 后, 再用选择性平板分离。将上述选择性平板

上获得的单菌落进一步 PCR 验证。

1.5 Aac 的 PCR 检测

菌落 PCR 和常规 PCR 采用 Aac 的特异引物分别为 WFB1 (5'-GACCAGCCACACTGGGAC-3') 和 WFB2 (5'-CTGCCGTACTCCAGCGAT-3')^[12], PCR 片段大小为 360 bp。

西瓜种子 DNA、土壤 DNA 和田水 DNA 的提取采用试剂盒方法进行, 试剂盒 PowerSoil™ DNA Isolation Kit 购自 MOBIO 公司。Taq Reaction Buffer 10 \times (2.5 U/ μ L), Taq DNA Polymerase (2.5 U/ μ L), dNTP Mixture (2.5 mmol/L), 购于天根生化科技有限公司。采用 25 μ L 的 PCR 反应体系: 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, dNTPs 2 μ L, WFB1 引物 1 μ L, WFB2 引物 1 μ L, 模板 1 μ L, Taq 酶 0.4 μ L, ddH₂O 17.1 μ L。反应条件: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 Aac 在种子上的存活期

采用人工接种抗利福平 RifAac 菌株, 每隔 1 个月左右对种子进行选择平板直接分离、Bio-PCR 以及提取种子 DNA 检测, 以确定种子中的 Aac 存活情况。RifAac 菌株在含利福平的改良 ASCM 培养基选择性平板上的菌落灰白色、圆形、光滑、隆起、不透明, 直径 1~2 mm。分离结果表明, 接种 90 d 后, 采用选择性平板能分离出 Aac(表 1), 接种 120 d 直接分离不到 Aac, 但富集培养后菌落 PCR 能检测到病菌(图 1), 150 d 后室温保存的种子 3 种方法都检测不出 Aac, 而低温保存的种子只有种子 DNA 能检测出(图 2), 180 d 后常规 PCR 检测不到 Aac, 说明在低温条件下保存种子中的病原细菌存活时间比室温长, 至少能存活 4 个月。

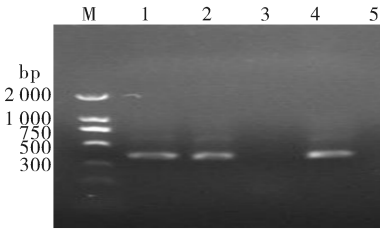
表 1 西瓜种子人工接种后不同时间 Aac 的分离和检测¹⁾

Table 1 Isolation and detection of Aac in different time from watermelon seed with RifAac inoculated

方法 Method	室温保存时间/d Time of preservation in room temperature						4 °C 保存时间/d Time of preservation in 4 °C					
	30	60	90	120	150	180	30	60	90	120	150	180
	直接分离 Direct isolation	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
菌落 PCR Bio-PCR	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
常规 PCR Routine PCR	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-

1) +: 能分离或检测出 Aac; -: 不能分离或检测出 Aac。

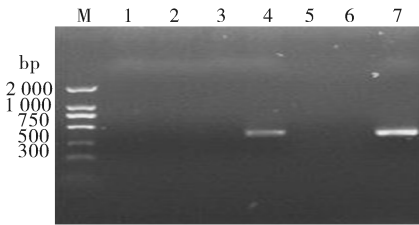
+: Aac could be isolated or detected; -: Aac could not be isolated or detected.



M:Marker; 1:室温保存种子; 2:4 °C 保存种子; 3:未接种种子; 4:阳性对照; 5:双蒸水。1:Seeds conserved in room temperature; 2:Seeds conserved in 4 °C; 3:Seeds with no Aac; 4:Positive; 5:ddH₂O.

图 1 接种 120 d 后菌落 PCR 检测西瓜种子 Aac

Fig. 1 Bio-PCR detection of Aac from watermelon seeds with RifAac inoculated after 120 d



M:Marker; 1:室温种子 Bio-PCR; 2:室温种子 DNA; 3:4 °C 种子菌落 PCR; 4:4 °C 种子 DNA; 5:未接种种子 DNA; 6:双蒸水; 7:阳性对照。1:Bio-PCR of Aac from seeds conserved in room temperature; 2:DNA of seeds conserved in room temperature; 3:Bio-PCR of Aac from seeds conserved in 4 °C; 4:DNA of seeds conserved in 4 °C; 5:Seeds without Aac; 6:ddH₂O; 7:Positive.

图 2 接种 150 d 后 PCR 检测西瓜种子 Aac

Fig. 2 PCR detection of Aac from watermelon seeds with RifAac inoculated after 150 d

2.2 Aac 在土壤和田水中的存活期

1) 分离检测。直接分离法从模拟接种土壤、病残体土壤和田水 3 种场所中分离,并在 ASCM 选择性培养基上获得的疑似单菌落,通过 PCR 检测验证,证实为 Aac 活菌。结果表明,田水中 1 个月后直接分离不到 Aac,2 个月后 Bio-PCR 能检测到,3 个月后,田水中 PCR 检测不到病菌。接种后 3 个月的病残体土壤和无残体土壤中都能分离到 Aac,4 个月 Bio-PCR 能检测到 Aac。

2) PCR 检测。由于 Aac 在自然环境中易受环境因素和其他微生物的影响,人工模拟接种后,Aac 在 3 个月后数量减少,用常规分离培养方法灵敏度有限,无法直接分离或富集分离出目标菌 Aac,因此,本试验进一步选用灵敏度更高的 PCR 检测方法,观察 Aac 在环境中的存活情况。

采用试剂盒方法提取土壤细菌总 DNA,用 Aac

特异性引物 PCR 检测不同场所中 Aac 的存活情况。从接种后的第 4 个月起,提取供试土壤 DNA 进行 PCR 检测。结果表明,接种后第 8 个月没有病残体的土壤中仍然检测到 Aac,在第 10 个月则检测不到;在接种含病残体的土壤中 12 个月之内均能检测到 Aac,表明 Aac 在病残体土壤中的存活期更长,至少可达 12 个月,带菌土壤中的 Aac 存活期可长达 8 个月(图 3)。

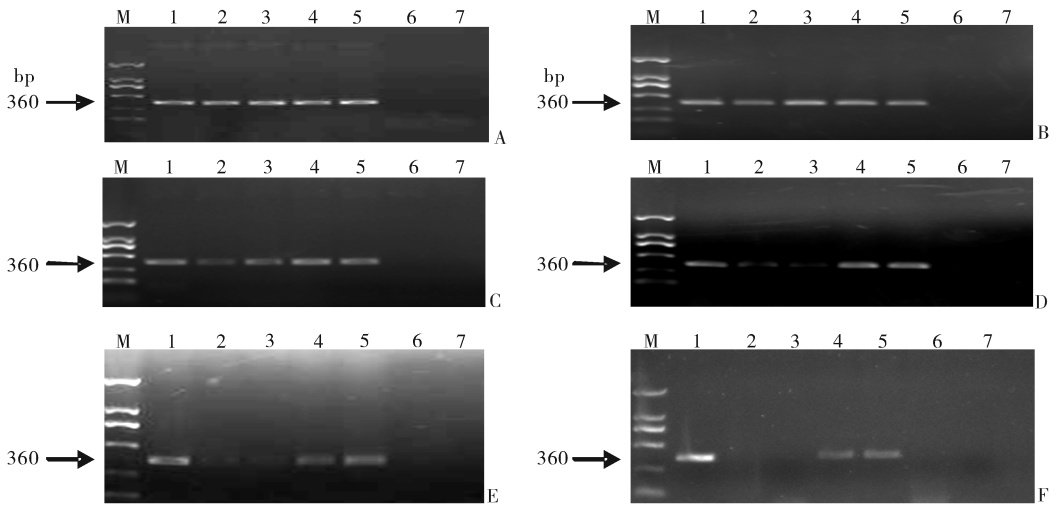
3 讨论

大量的研究表明,西瓜细菌性果斑病主要通过种子传播,因而病害防治的策略重点应在选用无病种子或种子处理^[13-14]。尽管如此,西瓜种子的药剂处理除了存在环境污染外,仍然不能完全清除种子上的病原菌^[14-16]。Shirakawa 等^[17]认为,如果西瓜种子中只要有 1 个菌落形成单位的 Aac,在适宜的环境条件下就可以导致幼苗的发病,因此明确病原细菌在种子上的存活期,对于指导种子处理具有重要参考价值。

本试验通过筛选抗利福平的 RifAac 菌株,人工接种西瓜种子,定期检测不同环境条件下病原菌在种子中的存活情况。结果表明,接种 30、60、90 d 后,直接分离、Bio-PCR 都能在西瓜种子中检测出 Aac,但接种 120 d 后,只有 Bio-PCR 和提取种子 DNA 的方法才能检测出 Aac,150 d 后室温和低温保存的种子 Bio-PCR 都检测不到 Aac,但低温保存的种子 DNA 能够用 PCR 检测出 Aac,说明 Aac 在种子上常温下至少可以存活 4 个月,4 °C 低温下至少可存活 5 个月。

然而,Shirakawa 等^[17]的研究结果表明,Aac 在种子中 4 °C 下可以存活更长时间,其原因可能是由于研究方法和取样的不同所致。Shirakawa 等观察的是田间感染了病菌的种子,病原细菌可能已经侵入到种子内部;本试验是通过人工接种,病菌可能都在种子表面,其存活期可能没有在种子内部时间长,这个推测尚需进一步研究证实。

此外,带菌的种子散落在田间后,长出的西瓜植株、残留在田间的染病瓜皮和田间可能带菌的葫芦科杂草等,都是感染下茬西瓜的重要菌源^[2],但该病菌是否可以在其他杂草或土壤中残存,其存活期的长短还不清楚。尽管有文献记载,病菌在埋土中的西瓜皮上可存活 8 个月,在病残体上可存活 24 个月^[18],但缺乏试验证明,目前尚未取得一致认同。



M: DNA marker; 1: 阳性对照; 2, 3: 无残体土壤; 4, 5: 有残体土壤; 6: 未接种土壤; 7: 双蒸水。A, B, C, D, E 和 F 分别为接种 4、6、8、10、11、12 个月后土壤。1: Positive; 2, 3: Soil without watermelon remains; 4, 5: Soil with watermelon remains; 6: Soil without Aac; 7: ddH₂O; A, B, C, D, E 和 F: Soil with Aac after 4, 6, 8, 10, 11 and 12 months respectively.

图3 接种后不同时间检测土壤 Aac

Fig. 3 PCR detection of Aac from soils with RifAac inoculated after in different times

本试验通过人工模拟接种,结合选择性分离、Bio-PCR 和常规 PCR 方法,观察了 Aac 在无植物残体土壤、含病残体土壤和田水中的存活情况。结果表明,Aac 在田水中只能存活 2 个月,在含病残体的土壤中可存活 12 个月。尽管病菌存活期时间的长短与病残体分解的程度有关,但本试验结果表明,Aac 在不含残体的土壤中存活期可达 8 个月。

西瓜细菌性果斑病初侵染源除了种子之外,还有土壤、病残体、其他杂草和寄主^[19]。采用不同越冬菌源的 Aac 和接菌方法进行致病力试验,结果表明病果浸出液、干病叶、湿病叶和带菌土壤越冬后的菌源都有致病力,且以带菌土壤和干存越冬病叶越冬的菌源致病力较强^[20]。

选择无病西瓜种子是西瓜果斑病防治的关键,生产上应根据实际情况,特别是对表面污染了病菌的西瓜种子,可选择合适的方法对种子进行灭菌处理。如果种子不作任何处理,则务必要确保西瓜种子中果斑病细菌已经死亡或无危害性。此外,深耕翻土、清除田间带菌残株、土壤消毒、土壤闲置或与非寄主作物轮作 12 个月以上,结合防止田间灌溉水污染等措施,均能有效降低西瓜细菌性果斑病的初侵染来源,控制西瓜果斑病的发生和流行。

因本试验采用人工模拟接种的方法,在不同接种体或场所上接种的病菌浓度和场所的放置环境与大田情况可能不同,故研究结果仅为西瓜果斑病的

防治提供参考。有关西瓜细菌性果斑病的其他初侵染来源,如杂草或其他植物等,还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 王叶筠. 西瓜甜瓜危险性病害——细菌性果腐病[J]. 中国西瓜甜瓜, 2003(6): 32-34.
- [2] 赵廷昌, 孙福在, 王兵万. 西瓜细菌性果斑病研究进展[J]. 植保技术与推广, 2001, 21(3): 37-38.
- [3] WALL G C, SANTOS V M, CRUZ F J, et al. Outbreak of watermelon fruit blotch in the Mariana Islands [J]. Plant Disease, 1990, 74: 80.
- [4] SOMODI G C, JONES J B, HOPKINS D L, et al. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida [J]. Plant Disease, 1991, 75: 1053-1056.
- [5] RANE K K, LATIN R X. Bacterial fruit blotch of watermelon: association of the pathogen with seed [J]. Plant Disease, 1992, 76: 509-512.
- [6] LATIN R X, HOPKINS D L. Bacterial fruit blotch of watermelon [J]. Plant Disease, 1995, 79: 761-765.
- [7] 任小平, 李小妮, 王琳, 等. 广东西瓜果斑病的病原鉴定[J]. 华南农业大学学报, 2010, 31(4): 40-43.
- [8] HOPKINS D L, THOMPSON C M. Seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in cucurbits [J]. Hort Sci, 2002, 37: 924-926.
- [9] KUCHARAK T, PEREZ Y, HODGE C. Transmission of watermelon fruit blotch bacterium from infested seed to seedlings (Abstr.) [J]. Phytopathology, 1993, 83: 466.
- [10] 任毓忠, 李晖, 李国英, 等. 哈密瓜种子带细菌性果斑病菌检测

- 技术的研究[J]. 植物检疫, 2004, 18(2): 65-68.
- [11] 回文广, 赵廷昌, SCHAAD N W, 等. 哈密瓜细菌性果斑病菌快速检测方法的建立[J]. 中国农业科学, 2007, 40(11): 2495-2501.
- [12] WALCOTT R R, LANGSTON D B, SANDERS F H, et al. Investigating intraspecific variation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using DNA fingerprinting and whole cell fatty acid analysis [J]. Bacteriology, 2000, 90(2): 191-196.
- [13] 赵廷昌, 孙福在, 王建荣, 等. 药剂处理种子防治哈密瓜细菌性果斑病[J]. 植物保护, 2003, 29(4): 50-53.
- [14] HOPKINS D L, THOMPSON C M, HILGREN J, et al. Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch and other seedborne diseases of watermelon [J]. Plant Disease, 2003, 87: 1495-1499.
- [15] HOPKINS D L. Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon [J]. Plant Disease, 1996, 80: 529-532.
- [16] FENG J, CHEN K, JIN K, et al. The effect of seed priming on viability of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and seed-associated saprophytes on watermelon seeds (Abstr.) [J]. Phytopathology, 2007, 97: 35.
- [17] SHIRAKAWA T, KOMIYA Y, ABIKO K. Population dynamics of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on infested seeds and on subsequent seedlings of watermelon [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 2003, 69: 102-106.
- [18] 邢东光. 西瓜细菌性果斑病发生与防治[J]. 北方园艺, 2002(3): 69.
- [19] 张祥林, 莫桂花. 西瓜细菌性果斑病[J]. 植物检疫, 1997, 11(4): 229-230.
- [20] 李明明, 申初成, 雷庆斌, 等. 细菌性果斑病菌源与接菌方法对西瓜致病力的影响[J]. 湖南农业科学, 2010(15): 80-82.

Detection on survival time in different places of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

LI Yan-chang¹ KONG Jing-yue¹ WU Jiu-ling² WANG Lin³
REN Xiao-ping³ LIU Qiong-guang¹

1. College of Resources and Environment, South China Agricultural University,
Guangzhou 510642, China;

2. Agricultural Bureau of Haifeng County, Guangdong Province, Haifeng 516400, China;

3. Plant Quarantine Station of Agricultural Bureau, Guangdong Province,
Guangzhou 510500, China

Abstract Bacterial fruit blotch (BFB) of cucurbits, caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac), is one of the most devastating diseases of watermelon and muskmelon. Fewer studies were done on its survival time in different places. In this study, the survival time of Aac inoculated with the anti-fampicin strain RifAac in seed, soil debit and water was investigated by isolation, bio-PCR and PCR. The results showed that Aac could survive in the watermelon seeds for 4-5 months, in the water for 2 months, in the soil for 8 months and within the soil with debris for longer than one year.

Key words bacterial fruit blotch; *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*; survival time; Bio-PCR; detection

(责任编辑:陈红叶)