

葫芦种子带菌对幼苗细菌性果斑病发生 和侵染途径的影响

高天一 潘宏 别之龙 李国庆

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 采用葫芦砧木种子人工接种燕麦嗜酸菌西瓜亚种(*Acidovorax avenae* ssp. *citrulli*, Aac)的方法, 观察由 Aac 经种传方式对葫芦砧木苗期发病的影响和 Aac 在葫芦砧木苗期的定殖情况, 并在温室条件下分析种子中不同带菌量与葫芦砧木幼苗细菌性果斑病发病的关系。结果表明: Aac 在随着葫芦砧木幼苗生长过程中先侵染幼苗子叶, 随后沿叶脉侵入下胚轴并定殖于下胚轴的韧皮部和木质部中, 继而引起幼苗下胚轴发病; 随着砧木种子带菌浓度的提高, 幼苗发病率和病情指数也越高。

关键词 葫芦砧木; 细菌性果斑病; 种传病害; 侵染途径

中图分类号 S 432.4⁺2; S 642 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)05-0036-04

细菌性果斑病(bacterial fruit blotch, BFB)是多种瓜类作物的重要病害, 病害主要侵染源为种子带菌^[1]。在中国, BFB 是一种检疫性病害, 其病原菌为燕麦嗜酸菌西瓜亚种(*Acidovorax avenae* ssp. *citrulli*, Aac), 属革兰氏阴性菌。Aac 可在植株的叶片、茎部和果实等部位引起病害, 尤其以苗期及果实期危害最严重^[2]。苗期发病可导致整株幼苗死亡, 而在果实上发病则造成减产, 甚至绝收。该病害在高温高湿的环境下发病十分迅速, 迄今为止在世界范围内还没有完全免疫 BFB 的葫芦科作物品种^[3]。BFB 在中国新疆、内蒙古、海南、湖北、河南等许多地区均有发生, 并给瓜类生产造成极大的经济损失^[4]。

近几年来, 随着育苗工厂集约化的迅速发展, 西甜瓜嫁接育苗技术已广泛运用于大型的育苗工厂中。该技术在防治西甜瓜枯萎病等多种土传病害上具有很好的效果, 但育苗工厂中育苗的密集性和适宜 Aac 存活与生长的高温高湿环境, 也为细菌性果斑病在嫁接育苗过程中的存活和大规模爆发提供了有利条件。目前, 对工厂化育苗中细菌性果斑病苗期的侵染途径研究较少。笔者分析了葫芦砧木种子中不同 Aac 带菌量与砧木苗期细菌性果斑病发生的关系, 旨在明确细菌性果斑病通过种子带菌引起苗

期发病的侵染途径, 为嫁接苗工厂化育苗生产和有效防治细菌性果斑病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试砧木葫芦种子品种为京欣砧 1 号, 由北京京研益农科技发展中心提供; 燕麦嗜酸菌西瓜亚种(Aac)菌株 Pslb96 由中国农业科学院植物保护研究所赵廷昌研究员惠赠。试验固体培养基为 KBA 培养基(蛋白胨 20 g、硫酸镁 1.5 g、磷酸氢二钾 1.5 g、甘油 10 g、蒸馏水 1 000 mL、琼脂 20 g、pH 7.0~7.4), 液体培养基为 KB(无琼脂 KBA 培养基)。育苗基质为有机营养土, 由镇江培蕾基质科技发展公司生产。

1.2 Aac 菌液配制

参考 Dutta 等的方法^[5]配制 Aac 不同浓度菌液。将 Pslb96 株划线接种在 KBA 平板上, 置于 28 °C 培养箱内, 培养 2 d 后挑取单菌落, 接种在 KB 培养液中, 在 30 °C 下摇培(250 r/min)过夜。将菌液于 6 000 r/min 离心 5 min。弃上清后, 菌体用 0.1 × PBS 缓冲液重新悬浮。用分光光度计测定菌悬液的吸光值(D_{600}), 并用 PBS 缓冲液将菌悬液的 D_{600} 值调节至 0.3 (菌体浓度约为 1×10^8 cfu/mL)。

收稿日期: 2013-11-14

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201003066)和国家西甜瓜产业技术体系项目(CARS-26-16)

高天一, 博士研究生。研究方向: 瓜类病害防控。E-mail: tonyent@sina.com

通信作者: 李国庆, 博士, 教授。研究方向: 植物病原微生物。E-mail: guoqingli@hzau.edu.cn

最后用 $0.1 \times \text{PBS}$ 缓冲液将菌悬液的浓度分别调节至 1×10^3 、 1×10^5 、 1×10^7 cfu/mL。

1.3 Aac 接种与病害调查

参考王晓东的方法^[6]用不同浓度的菌悬液处理葫芦砧木种子。砧木种子用 5% NaClO 消毒 5 min, 随后用无菌水中浸洗 3 次, 并将其浸泡在各浓度 Aac 菌悬液中 1 h。以浸泡在无菌水中的种子作为对照, 各处理 48 粒种子。最后将清洗后的种子在室温下晾干过夜, 在 30 °C 恒温培养箱中催芽 72 h, 将葫芦砧木种子播种在穴盘内的基质中, 每穴 1 粒种子。将穴盘置于日温为 28~32 °C, 夜温为 20~22 °C 的温室中(无补光措施)进行育苗。分别在接种后 4、6、8、10、12 d 逐株检查幼苗发病情况, 统计发病率与病情指数。病害等级分级标准参考金岩的方法^[7]并略加修改, 即按照病斑面积占总子叶面积百分比进行分级: 0 级, 不发病; 1、2、3、4、5 级, 病斑面积分别为 < 5%、5%~20%、20%~40%、41%~60%、> 60%。各处理重复 3 次。

1.4 Aac 侵染观察与病菌分离

用浓度为 1×10^7 cfu/mL 的 Pslb96 菌液浸泡葫芦砧木种子 1 h, 并将种子播种在穴盘中, 在温室播种后连续观察幼苗的发病情况和发病部位, 再分别在播种 4、6、8、10 d 后取子叶下胚轴 0~3 cm 和 3~6 cm 处进行 Aac 的分离。将幼苗的不同部位在 5% 的 NaClO 溶液中表面消毒 3 min, 用无菌水冲洗 3 次后, 将病组织浸入无菌水中并捣碎, 静置 20 min 使组织中病菌释放入水中^[8]。然后将组织悬液进行梯度稀释, 涂布于含有氨苄青霉素(1 mg/mL)和黄连素(20 mg/mL)的选择性培养基上, 28 °C 下培养 48 h。统计类似 Aac 菌落数量。为验证分离的细菌是 Aac, 在平板上挑取疑似 Aac 单菌落 5 个, 接种在含氨苄青霉素(1 mg/mL)和黄连素(20 mg/mL)的 KB 培养基中摇培过夜, 菌液用 Aac 特异性引物 WFB1 和 WFB2 进行 PCR 扩增以确定目标菌是否为 Aac^[9]。

1.5 Aac 在葫芦幼苗中定殖的观察

取下胚轴有明显细菌性果斑病病症的砧木幼苗, 将其下胚轴发病部位剪下, 并进行 FAA 固定, 梯度乙醇脱水, 石蜡渗透包埋、切片、去蜡、蕃红固绿染色、二甲苯透明、香脂封固, 最后制成石蜡切片。石蜡切片的操作参考方中达的方法^[10]。制成的石蜡切片在微分干涉显微镜下进行观察, 明确样品中 Aac 在砧木下胚轴中的定殖部位。

2 结果与分析

2.1 Aac 接种量对葫芦苗期 BFB 发生的影响

试验结果表明, 在相同的高温高湿育苗环境条件下, Aac 菌株 Pslb96 不同接种量浸泡处理均可引起葫芦幼苗发生 BFB, 且处理间发病率及病情指数均存在显著差异。随着浸种菌体浓度的增加, 在播种后不同时间观察葫芦苗期发病率和病情指数均呈上升趋势, 4~8 d 时发病率和病情指数上升较快, 8~12 d 时趋于缓慢(图 1)。在播种后 12 d, 当 Pslb96 浸种浓度为 1×10^3 cfu/mL 时, 葫芦幼苗发病率达到 55%, 病情指数为 37; 当 Pslb96 浸种浓度为 1×10^7 cfu/mL 时, 葫芦幼苗发病率可达到 99%, 病情指数为 90。

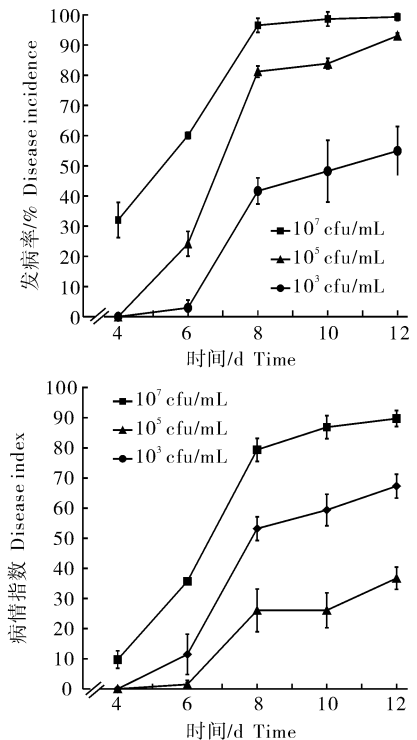


图 1 不同浓度菌液浸种后葫芦苗期的发病率和病情指数
Fig. 1 Disease incidence and disease index of BFB on gourd rootstock seedlings treated with different concentrations of bacteria

2.2 葫芦苗期 Aac 的侵染过程

对葫芦幼苗 BFB 症状出现的动态观察结果表明, BFB 在高温高湿的育苗环境条件下发展迅速。病害发生初期子叶有轻微水渍状病斑, 随着葫芦砧木幼苗的生长, 细菌性果斑病开始由发病子叶逐渐向叶基部进行扩展, 并侵染幼苗下胚轴(图 2)。

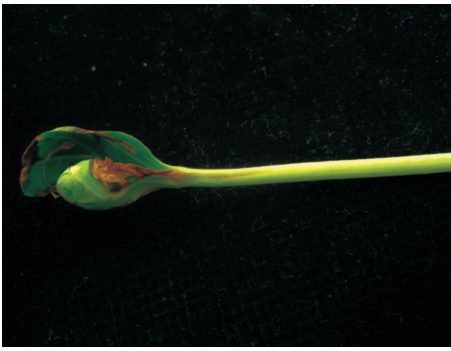


图 2 Aac 在葫芦子叶沿叶柄向下扩散

Fig. 2 Aac on a cotyledon of a gourd rootstock seedling transferred downwards through the petiole

Aac 病原菌分离试验结果表明, Pslb96 浸种后, 随着葫芦种子的萌发及幼苗的生长至 4 d 时, 子叶开始出现水渍状病斑且可在葫芦砧木幼苗子叶中分离到 Aac, 下胚轴健康且未分离到 Aac (表 1)。浸种后 6 d, 子叶出现典型细菌性果斑病水渍状病斑, 下胚轴未表现症状, 但可在下胚轴距子叶 0~3 cm 处分离到 Aac; 浸种后 8 d, 除子叶外, 在下胚轴距子叶 0~3 cm 部分出现水渍状病斑并可也分离到 Aac; 浸种后 10 d, 子叶、下胚轴距子叶 0~3 cm 部分及下胚轴距子叶 3~6 cm 部分均出现典型水渍状病症和黄褐色病斑并可分离到 Aac。

表 1 细菌性果斑病菌在葫芦砧木幼苗中的分布动态¹⁾

Table 1 The dynamic distribution of bacterial fruit blotch in gourd rootstocks

时间/d Time	子叶 Cotyledons		下胚轴上端 0~3 cm Hypocotyls top 0-3 cm		下胚轴下端 3~6 cm Hypocotyls bottom 3-6 cm	
	分离 Isolation	症状 Symptoms	分离 Isolation	症状 Symptoms	分离 Isolation	症状 Symptoms
4	阳性 Positive	n	阴性 Negative	n	阴性 Negative	n
6	阳性 Positive	v	阳性 Positive	n	阴性 Negative	n
8	阳性 Positive	v	阳性 Positive	v	阴性 Negative	n
10	阳性 Positive	v	阳性 Positive	v	阳性 Positive	v

1) “v”和“n”分别表示可观察水渍状病斑和观察不到水渍状病斑。“v”and “n” indicates presence of water-soaked lesion and absence of water-soaked lesion.

2.3 Aac 在葫芦砧木苗期下胚轴的定殖

发病砧木幼苗下胚轴组织横截面的石蜡切片染色观察结果表明, Aac 定殖于下胚轴维管束的木质部和韧皮部中, 而下胚轴薄壁组织中未观察到 Aac 的存在 (图 3)。

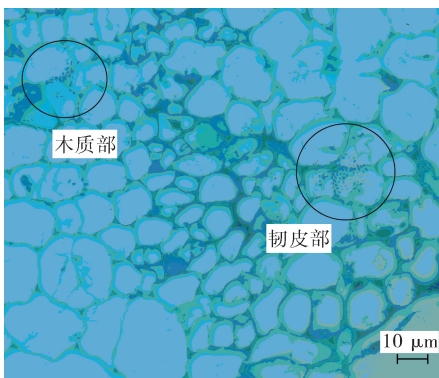


图 3 Aac 定殖于下胚轴维管束木质部和韧皮部

Fig. 3 Aac colonized in the xylem and phloem vascular of the rootstock hypocotyl

带菌量有密切关系。在相同的育苗环境中, 种子内部 Aac 含量越多, 葫芦砧木幼苗的发病率和病情指数越高, 所造成的危害越严重。而且, 在较低的 Aac 带菌量下 (10^3 cfu/mL), 12 d 后细菌性果斑病发病率依然可达到 50% 以上, 病情指数达到 30 以上。此外, 随着时间的推移, 砧木苗期的发病会愈发严重, 甚至造成砧木的死亡。因此, 对于细菌性果斑病发生严重的育苗工厂, 砧木种子严格的消毒处理是非常有必要的, 否则会对工厂化大规模育苗造成极大的经济损失。到目前为止, 关于西瓜细菌性果斑病侵染方面的研究还不够完善和深入。Walcott 等^[12]的研究表明西瓜细菌性果斑病可以在花期侵染花瓣而产生带菌但无病症的果实, 且果实中的种子内可以检测到 Aac 的存在。Lessl 等^[13]证明 Aac 在适宜的环境条件下可以迅速定殖在西瓜雌花的柱头上, 并可通过输导组织侵染子房。Dutta 等^[5]曾解剖被 Aac 感染的西瓜病果中的种子, 发现 Aac 在种子的种皮、种壳和胚中均可定殖。但是, 关于西瓜细菌性果斑病菌在葫芦科作物苗期的侵染, 特别是关于工厂化育苗中细菌性果斑病对砧木的侵染还鲜有报道。本试验通过对 Aac 在病组织内定殖位点的观察及对砧木幼苗不同部位 Aac 病原菌进行分

3 讨论

病原物能够侵入成功的影响因素之一是接种体的数量。病原物需要有一定的数量才能引起侵染和发病^[11]。本研究结果表明, 砧木用葫芦幼苗期细菌性果斑病发生的严重程度与其种子含有 Aac 的

离,发现 Aac 以种传途径作为初侵染来源时,病菌可随着砧木苗期的发育进行侵染。研究表明,Aac 侵染后首先在幼苗子叶表现症状,环境条件适宜时发病迅速,随着幼苗的生长,病菌可沿子叶向下胚轴侵染,并使下胚轴发病。通过对下胚轴发病组织的切片观察表明,Aac 定殖于葫芦砧木幼苗下胚轴维管束组织的木质部和韧皮部中造成系统性侵染。在育苗工厂高温高湿的环境中,葫芦作为嫁接砧木,如果忽视子叶上轻微的病斑,病害很容易扩展至下胚轴造成整株死亡,对育苗工厂造成极大的经济损失。但是,砧木嫁接后是否能将病菌传染给西瓜接穗,尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] HOPKINS D L, THOMPSON C M. Seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in cucurbits [J]. Hort Science, 2002, 37: 924-926.
- [2] FRANKLE W G, HOPKINS D L. Ingress of the watermelon fruit blotch bacterium into fruit [J]. Plant Disease, 1993, 77: 1090-1092.
- [3] DUTTA B, SCHERM H, GITAITIS R D, et al. *Acidovorax citrulli* seed inoculum load affects seedling transmission and spread of bacterial fruit blotch of watermelon under greenhouse conditions [J]. Plant Disease, 2012, 96: 705-711.
- [4] 高天一, 杨龙, 张静, 等. 湖北省西瓜细菌性果斑病病原鉴定 [C]//郭泽建, 侯明生. 中国植物病理学会 2011 年学术论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2011: 233.
- [5] DUTTA B, AVCI U, HAHN M G, et al. Localization of *Acidovorax citrulli* in infested watermelon seeds is influenced by the pathway of bacterial invasion [J]. Phytopathology, 2012, 102: 461-468.
- [6] 王晓东. 防治哈密瓜细菌性果斑病拮抗酵母菌的筛选及生防机理研究[D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2009.
- [7] 金岩. 西瓜细菌性果斑病研究[D]. 长春: 吉林农业大学图书馆, 2003.
- [8] RANE K K, LATIN R X. Bacterial fruit blotch of watermelon: association of the pathogen with seed [J]. Plant Disease, 1992, 76: 509-512.
- [9] 王笑. 我国西瓜果斑病的发生概况及种子带菌检测的研究 [D]. 杭州: 浙江大学图书馆, 2007.
- [10] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 91-109.
- [11] 谢联辉. 普通植物病理学[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [12] WALCOTT R R, GITAITIS R D, CASTRO A C. Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* [J]. Phytopathology, 2003, 93: 528-534.
- [13] LESSL J T, FESSEHAIE A, WALCOTT R R. Colonization of female watermelon blossoms by *Acidovorax avenae* ssp. *citrulli* and the relationship between blossom inoculum dosage and seed infestation [J]. Journal of Phytopathology, 2007, 155: 114-121.

Influence of occurrence and infection pathway on cucurbit seeds pathogen for seedling bacterial fruit blotch

GAO Tian-yi PAN Hong BIE Zhi-long LI Guo-qing

State Key Laboratory of Agriculture Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The bacterial fruit blotch (BFB) caused by *Acidovorax avenae* ssp. *citrulli* (Aac) is a sort of devastating seed-borne quarantine disease of cucurbits. The impact of seed infection was investigated to the disease severity of cucurbit rootstock seedling and the infection process of Aac during seedling stage through artificially inculcating cucurbit seeds with Aac. In greenhouse condition, the relationship between different carrier amount of bacteria and the disease level of BFB was established. The results indicate that during the seed-borne infection process, the Aac infected the cotyledons firstly, then infected the hypocotyls and colonized in the xylem and phloem, caused the disease of the hypocotyls. Moreover, the higher amount of bacteria the seeds carried, the higher disease rate and index the young seedling was.

Key words cucurbit rootstock; bacterial fruit blotch; seed-borne disease; infection pathway