

广东西瓜果斑病的病原鉴定

任小平¹, 李小妮¹, 王琳¹, 孙嘉祥¹, 吴九玲², 刘琼光³

(1 广东省植物检疫站, 广东 广州 510500; 2 海丰县植物检疫站, 广东 海丰 516400;

3 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642)

摘要:在反季节种植的西瓜上发现1种新细菌病害,其症状与西瓜果斑病菌相似,通过病原菌的分离纯化,接种试验,菌体形态观察,染色反应、培养性状和生理生化特性测定,以及细菌的16S rDNA基因序列分析,确认该病原细菌为燕麦嗜酸菌西瓜亚种 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*.

关键词:西瓜; 果斑病菌; 病原鉴定; 燕麦嗜酸菌西瓜亚种

中图分类号:S432.42

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2010)04-0040-04

Identification for Pathogen of Bacterial Fruit Blotch of Watermelon in Guangdong Province

REN Xiao-ping¹, LI Xiao-ni¹, WANG Lin¹, SUN Jia-xiang¹, WU Jiu-ling², LIU Qiong-guang³

(1 Station of Plant Quarantine in Guanydong Province, Guangzhou 510500, China; 2 Station of Plant Quarantine in Haifeng County, Haifeng 516400, China; 3 College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A pathogenic bacterium causing fruit blotch of watermelon in the planting areas in Guangdong Province in 2008 was identified. The pathogenic bacterium was isolated and its morphological, inoculation tests, staining, physiological and biochemical characteristics, as well as the pathogenicity and the 16S rDNA sequence were tested. The results showed that the pathogen from watermelon was identified as *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*.

Key words: watermelon; bacterial fruit blotch; pathogen identification; *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

西瓜果斑病菌(Bacterial fruit blotch)是西瓜、甜瓜等瓜类作物上的一种重要细菌性病害^[1],1989年首次在美国的商品西瓜生产田中暴发流行,1995年蔓延至美国的15个州,重病区能使80%的西瓜不能上市销售,引起了社会的广泛关注^[2-3].该病是由燕麦嗜酸菌西瓜亚种 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* 引起,其寄主植物主要包括西瓜、厚皮甜瓜、南瓜、黄瓜、西葫芦、蜜瓜等葫芦科植物,已列为我国国内和进境植物检疫性有害生物^[4].1986年开始不断有人发现和报道该病在我国大陆的发生和为害情况^[5-7],近年来我国的西瓜、甜瓜等瓜类种子生产发展很快,

从境外引进西瓜、甜瓜等品种和数量也逐年增加,该病传入并扩散的风险日益增大,在吉林^[8]和福建^[9]等地有报道.近期在广东省反季节种植的西瓜上发现了一种细菌性病害,危害严重,给当地西瓜种植者造成了重大的经济损失,本文对该病害进行了病原菌的鉴定,为病害的检疫和防治提供依据.

1 材料与方法

1.1 标本来源及病菌分离

疑似携带有西瓜果斑病菌的西瓜(新红宝),采自广东省海丰县西瓜种植地.用 ϕ 为75%的酒精消

收稿日期:2009-09-01

作者简介:任小平(1973—),男,高级农艺师;通信作者:刘琼光(1964—),男,副教授,E-mail:qgliu@scau.edu.cn

基金项目:广东省植物防疫检疫研究专项“瓜类果斑病菌的检测技术及种传机制研究”(4200-F09043)

毒病果,在病健交界处切取 2 cm 左右的方块,在 1 mL 无菌水中捣碎,捣碎液在 NA 培养基平板上划线,30 ℃ 培养 48 ~ 72 h. 从中挑取形态特征典型的单菌落,纯化后,4 ℃ 冰箱保存备用.

1.2 致病性测定

将分离得到的细菌培养 24 h,用无菌水调整菌悬液浓度为 1×10^8 CFU/mL,用于接种西瓜幼苗和果实. 接种方法:摩擦接种到健康的西瓜和黄瓜植株的子叶和真叶上,30 ℃ 条件下,塑料薄膜保湿 24 h,5 d 后观察症状;西瓜果实接种采用针刺法接种到健康西瓜上,30 ℃ 条件下保湿 24 h,2 d 后观察发病症状^[2],以针刺法接种无菌水作为对照.

1.3 病原菌鉴定

1.3.1 细菌的形态染色试验 革兰氏染色按结晶紫、番红染色法进行^[10]. 鞭毛染色按银盐染色法进行^[10].

1.3.2 细菌的生理生化鉴定 参照 Schaad 等^[11]方法进行.

1.3.3 燕麦嗜酸菌西瓜亚种特异引物 PCR 鉴定

细菌 DNA 的提取采用 CATB 常规方法^[12],将提取的 DNA 用作 PCR 模板. 采用检测燕麦嗜酸菌西瓜亚种的特异引物^[13]. 上游引物 WFB1:5' - GACCAGCCACACTGGGAC - 3'; 下游引物 WFB2:5' - CTGCCGTACTCCAGCGAT - 3'. 扩增目的片断为 360 bp.

25 μ L 反应体系:10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L,2.5 mmol/L dNTP 2 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L,上、下游引物各 1 μ L,模板 DNA 1 μ L,5 U/ μ L TaqDNA 聚合酶 0.2 μ L,加双蒸水补足到总体积为 25 μ L. 反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 40 s,55 ℃ 退火 30 s;72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;72 ℃ 保温 10 min,最后 4 ℃ 保存.

1.3.4 细菌 16S rDNA 序列分析 采用细菌的 16S rDNA 通用引物^[14] PCR 扩增待测细菌的 16S rDNA,其引物序列为:

27F:5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3';

1492R:5' - GGTACCTTGTTACGACTT - 3'.

PCR 反应体系(50 μ L):10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, MgCl₂(20 mmol/L)5 μ L,dNTPs(10 mmol/L)1 μ L,引物 27F(5 pmol/L)和引物 1492R(5 pmol/L)各 1 μ L,模板 DNA(约 100 ng/ μ L)1 μ L,TaqDNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.5 μ L,双蒸水 35.5 μ L.

反应程序为:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 45 s,55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 保持 7 min,最后在 4 ℃ 下保存. 扩增产物回收纯化后,送广州英骏基因公司测序.

2 结果与分析

2.1 田间西瓜果斑病症状

田间发生典型症状位于朝向阳面的西瓜果实表皮,先出现水渍状小斑点,随后扩大成为不规则的大型橄榄色水渍状斑块,后期受感染的果皮常龟裂,内部腐烂,严重影响西瓜的商品价值(图 1). 病斑上常有粘稠、褐色的菌脓溢出.



图 1 西瓜细菌性果斑病在田间西瓜上的症状

Fig. 1 The symptom of bacterial fruit blotch on field watermelon

2.2 病原菌接种和致病性测定

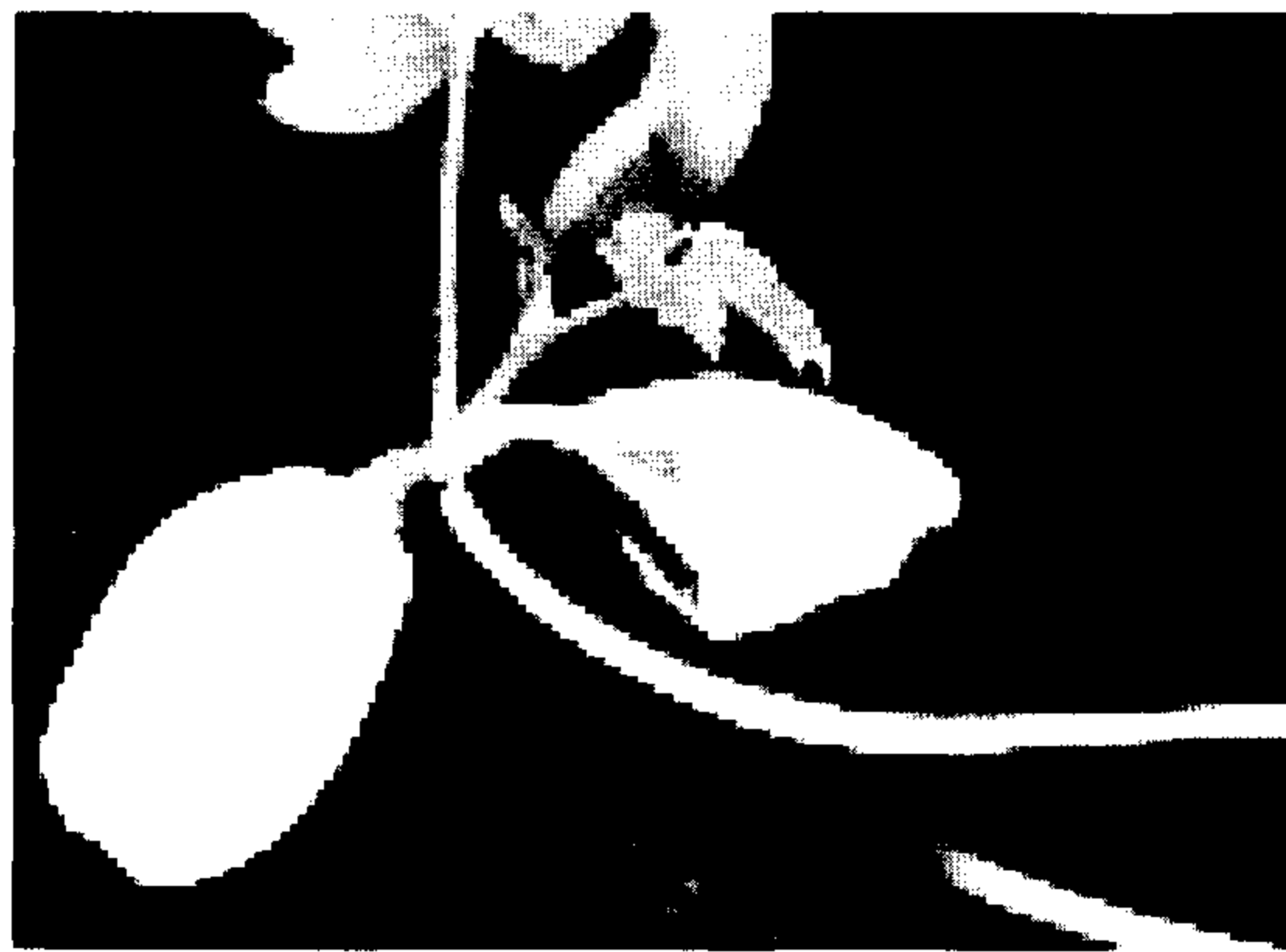
从发病西瓜果实上分离到 3 个可疑单菌落,经致病性测定有 1 个菌株具有致病性. 病菌可侵染危害西瓜和黄瓜的子叶和真叶,引起叶片坏死斑,症状因寄主不同而有差异. 细菌接种到西瓜子叶上,呈现褐色水浸状病斑,病斑很快坏死(图 2a);在黄瓜子叶上形成有黄色晕圈的水浸状病斑,病斑很快坏死呈现白色;在西瓜和黄瓜真叶上都形成很小的病斑;在果实表面上形成大面积橄榄色水渍状斑块,接种后 5 d,果皮变色,果实腐烂(图 2b). 结果说明,细菌在室内接种所表现的症状与田间症状一致,初步表明,已经分离纯化到病原细菌.

2.3 病原细菌鉴定

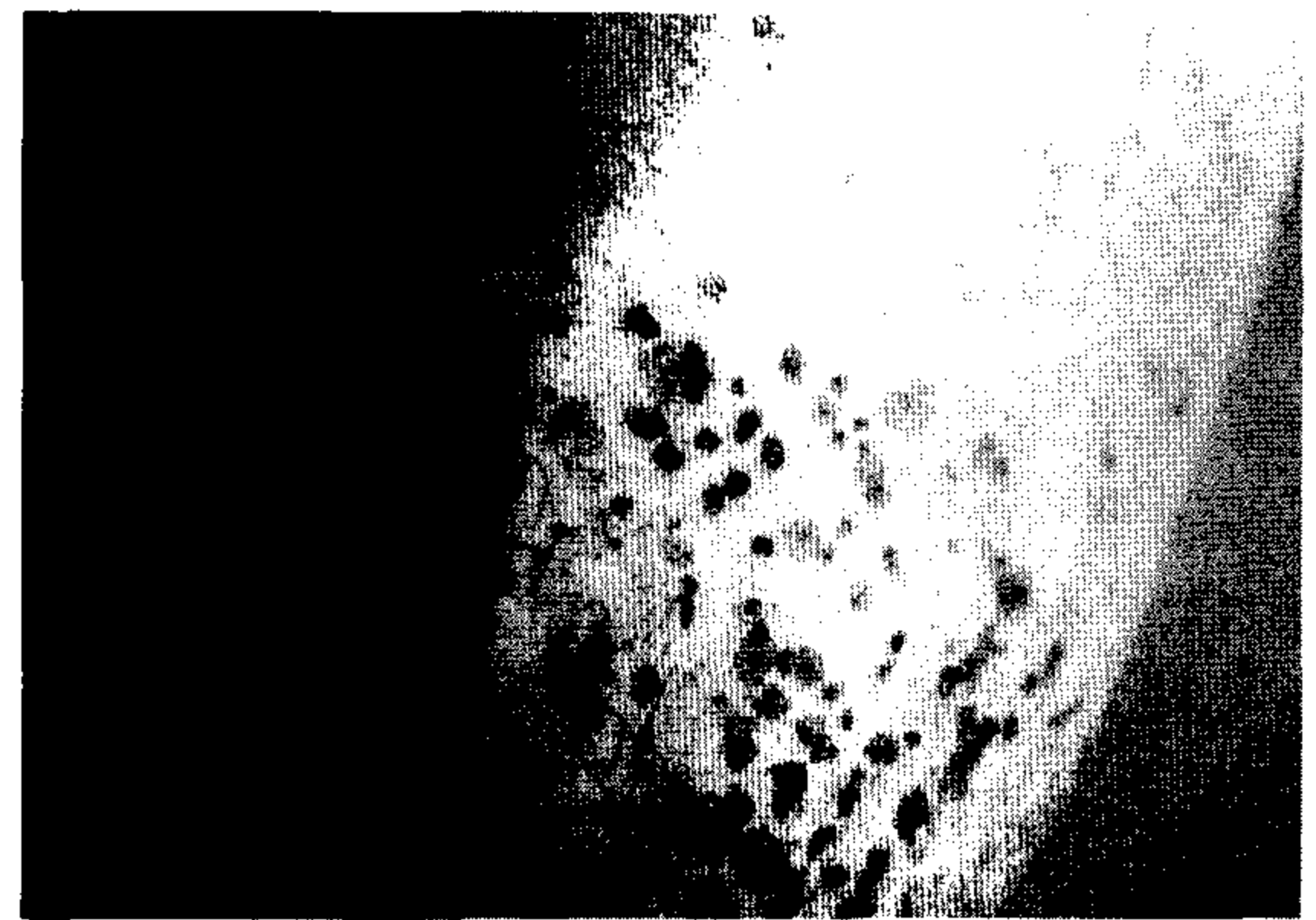
2.3.1 培养性状 待测菌株在 KB 培养基上于 30 ℃ 培养 24 ~ 48 h,菌落圆形、滑、隆起、不透明,呈乳白色,菌落直径 1 ~ 2 mm,在 YDC 培养基上菌落为白色,耐盐性为 3%,41 ℃ 能生长.

2.3.2 病原细菌的形态和染色反应 待测菌株的菌体呈短杆状,革兰氏染色呈阴性,鞭毛一根极生.

2.3.3 生理生化性状 对部分生理生化性状的测定结果见表 1. 从表 1 可见,待测菌株与标准菌株的测试结果一致,都不产生荧光,不水解淀粉和果胶,甲基红测定为阴性,不产生吲哚;能利用吐温 80、石蕊牛乳产碱胨化,氧化酶、硝酸盐还原、明胶液化等测定结果均为阳性.



a 子叶



b 果实

图2 病原菌接种在西瓜子叶和果实叶上的症状

Fig. 2 The symptom of pathogen inoculation on the watermelon cotyledon and fruit

表1 病原菌生理生化测定¹⁾

Tab. 1 Physiological and biochemical determination of pathogen

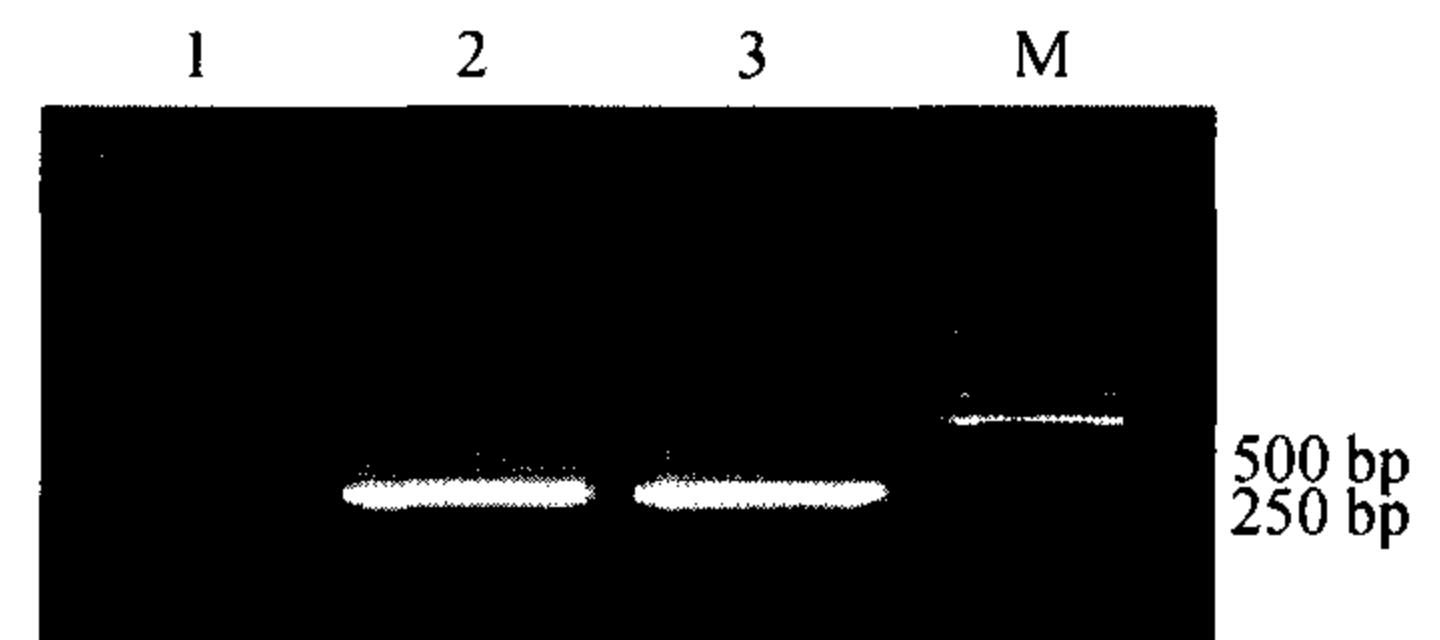
测定项目	待测菌株	参照菌(阳性对照)
KB 培养基产荧光	-	-
YDC 培养基上菌落颜色	白色	白色
3% KOH 试验	+	+
氧化酶活性	+	+
41 °C 生长情况	+	+
3% 耐盐性	+	+
吐温 80 的利用	+	+
葡萄糖氧化发酵	+	+
硝酸盐还原	+	+
明胶液化	+	+
石蕊牛乳酪化、产碱	+	+
淀粉水解	-	-
吲哚产生	-	-
果胶水解	-	-
甲基红试验	-	-

1) “+” 阳性反应或利用,“-” 阴性反应或不利用.

2.3.4 燕麦嗜酸菌西瓜亚种特异引物 PCR 鉴定

将分离的待测细菌 DNA 用燕麦嗜酸菌西瓜亚种的特异引物 WFB1 和 WFB2 PCR 检测,产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,结果出现 360 bp 的特异性目的条带(图 3),初步表明分离的待测细菌可能为燕麦嗜酸菌西瓜亚种.

2.3.5 细菌 16S rRNA 序列分析 用细菌 16S rRNA 通用引物扩增上述待测细菌的 16S rDNA,扩增产物纯化后送广州英骏基因公司测序,序列结果见图 4.



1: 清水对照; 2: 待测样品; 3: 阳性对照; M: DNA Mark.

图3 燕麦嗜酸菌西瓜亚种特异性引物 PCR 扩增结果

Fig. 3 The PCR result of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* with specific primer

```

1 ttacggttag gctacctact tctggcagaa cccgctccca tgggtgtgacg ggcgggtgtg
61 acaagaccgg ggaacgtatt caccgagaca ttctgatccg cgattactag cgattccgac
121 ttacgcagc cgagttgcag actgcgatcc ggactacgac tggctttatg ggattagctc
181 cccctcggg gttggcaacc ctctgtacca gccattgat gacgtgtgta gccccaccta
241 taagggccat gaggactga cgtcatcccc acctctctcc gttttgtcac cggcagtcce
301 attagagtgc cctttcgtag caactaatgg caagggttgc gctcgttgcg ggacttaacc
361 caacatctca cgacacgagc tgacgacagc catgcagcac ctgtgttacg gttctctttc
421 gagcactcct ctatctctaa aggattccgt acatgtcaaa ggtgggtaag gtttttcgag
481 ttgatcgaa ttaaaccaca tcatccaccg ctgtgctggg tccccgtcaa ttctttgag
541 ttcaacctt gcgccctgac tccccaggcg gtcaactca cgcgttagct tcgttactga
601 gtcagtgaag acccaacaac cagttgacat cgtttagggc gttgactacc agggatctca
661 atcctgtttg ctccccacgc tttcgtgcat gaggcgtcag acaggcccag gggattgcct
721 tcgccatcgg tttctctccg catactctac catttactg ctacacgagg aattccatcc
781 ccctctgccg tactccagcg atgcagtcac aatgcagtt cccaggttga gcccggggat
841 ttacatctg tcttacatca cgccttgcgc acgctttacg cccagtaatt cegattaacg
901 cttgaccct acgtattacc gcggtcgtg gcacgtagt agccggtgct tattcttacg
961 gtaccgtcat gacccccctt tattagaaga aggcttttcg ttccgtacaa aagcagttta
1021 caaccgaag gccttcatcc tgcacgagcg atggctggat caggcttgcg cccattgtcc
1081 aaaattcccc actgctgctt cccgtaggag tctgggcccgt gtctcagtc cagtgtggct
1141 ggtcgtctc tcagaccagc tacagatcgt aggcttggta agcctttacc ccaccaacta
1201 cctaactgc catcgccgc tccgttcgag caaggccttg cgttccccctg ctttcatcca
1261 tagatcttat gcggtattag caaagcttcc gcctcgttat cccccacgat cgggcacggt
1321 ccgatgtatt actcaccctg tcgccactcg tcagatccg aagacctgtt accgttca

```

图4 待测病原菌 16S rDNA 序列

Fig. 4 The sequences 16S rDNA of pathogen

将测序结果在国际互联网基因库(GeneBank)上 BLAST 搜索,结果表明,待测细菌 16S rDNA 序列与

基因库中燕麦嗜酸菌西瓜亚种的 16S rDNA (基因编号 CP000512.1) 序列的相似性达 100%, 此外, 与基因库中其他多个燕麦嗜酸菌西瓜亚种的 16S rDNA 序列同源性达 99%, 表明, 本研究分离自西瓜上的细菌是燕麦嗜酸菌 *Acidovorax avenae*.

3 讨论

在广东省海丰县西瓜上发现的细菌性病害, 通过病菌分离纯化, 致病性测定、染色反应、生理生化测定等系列传统鉴定试验, 初步表明与国内外报道的西瓜果斑病菌鉴定结果相符^[7-9]. PCR 分子检测具有燕麦嗜酸菌西瓜亚种特异的 DNA 片段, 大小为 360 bp 左右. 该细菌的 16S rDNA 序列分析也表明, 与基因库中燕麦嗜酸菌西瓜亚种的 16S rDNA 序列相似性达 99% ~ 100%, 根据目前在 16S rDNA 基因上的分类规则, 该片段碱基相差 3% 以内为同一种. 假单胞菌科中的嗜酸菌属 *Acidovora* 中危害植物的仅有燕麦嗜酸菌 *Acidovorax avenae* 和魔芋细菌性叶斑病菌 *Acidovorax konjaci* 2 个种, 其中燕麦嗜酸菌包括 3 个亚种, 为害西瓜等瓜类作物的为燕麦嗜酸菌西瓜亚种^[15].

综合上述研究结果, 本研究认为, 广东省海丰县西瓜上发现的细菌病害诊断为西瓜果斑病, 其病原细菌为燕麦嗜酸菌西瓜亚种, 关于该病原细菌的致病型及寄主范围, 有待于进一步研究.

有关瓜类作物的果斑病, 近年来, 在我国不少省份已有报道发生^[5-9], 本文报道广东发现西瓜细菌性果斑病, 这对加强该病害的检疫和防控具有重要的价值和实际意义.

参考文献:

- [1] SCHAAD N W, POSTNIKOVA E, RANDHAWA P. Emergence of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a crop threatening disease of watermelon and melon [M] // IACOBELLIS N, SALAN C, WTEVEN W H, et al. *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003: 573-581.
- [2] SOMODIG C, JONES J B, HOPKINS D L, et al. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida [J]. *Plant Disease*, 1991, 75(10): 1053-1056.
- [3] LATIN R X, HOPKINS D L. Bacterial fruit blotch of watermelon [J]. *Plant Disease*, 1995, 79(8): 761-765.
- [4] 全国农业技术推广服务中心. 植物检疫性有害生物图鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 416-418.
- [5] 张祥林, 莫桂花. 西瓜细菌性果斑病 [J]. *植物检疫*, 1997, 11(4): 229-230.
- [6] 张荣意, 谭志琼, 文衍堂, 等. 西瓜细菌性果斑病症状描述和病原菌鉴定 [J]. *热带作物学报*, 1998, 19(1): 70-76.
- [7] 赵廷昌, 孙福在, 王万兵, 等. 哈密瓜细菌性果斑病病原菌鉴定 [J]. *植物病理学报*, 2001, 31(4): 357-364.
- [8] 金岩, 张俊杰, 吴燕华, 等. 西瓜细菌性果斑病的发生与病原菌鉴定 [J]. *吉林农业大学学报*, 2004, 26(3): 263-266.
- [9] 蔡学清, 黄月英, 杨建珍, 等. 福建省西瓜细菌性果斑病的病原鉴定 [J]. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2005, 34(4): 434-437.
- [10] 方中达. 植病研究方法 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 156-211.
- [11] SCHAAD N W, JONES J B, CHUN W. *Plant Pathogenic Bacteria* [M]. Minnesota: APS PRESS, 2001.
- [12] AUSUBEL M F, BRENT R, KINGSTON R E, 等. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998: 39.
- [13] WALCOTT R R, GITAITIS R D. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction [J]. *Plant Disease*, 2000, 84(4): 470-474.
- [14] 滕齐辉, 曹慧, 崔中利, 等. 太湖地区典型菜地土壤微生物 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析 [J]. *生物多样性*, 2006, 14(4): 345-351.
- [15] WILLEMS A, GOOR M, THIELEMANS S, et al. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci* [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1992, 42: 7-119.

【责任编辑 周志红】