

新疆哈密瓜细菌性斑点病离体叶片 种子带菌检测及致病力分化

王爱英¹, 李国英^{2*}, 曾 义², 张 昕²

(1. 石河子大学绿洲农业生态重点实验室, 新疆石河子 832003; 2. 石河子大学农学院, 新疆石河子 832003)

摘 要: 应用甜瓜离体叶片检测甜瓜种子的带菌情况, 分别采用不同的缓冲液和不同的接菌方法进行检测, 发现 PBS 缓冲液富集病原菌效果好, 注射接种效率高。同时, 离体叶片是菌株致病力分化初步检测较好的材料, 从田间分离所得菌株来看, 黄瓜细菌性角斑和西瓜果腐菌株致病力均被分化为强、中、弱, 而且从种子上分离的病原菌的致病力弱。

关键词: 哈密瓜; 离体叶片; 种子检测; 致病力分化

中图分类号: S436.421.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2007)04-0216-04

Detection of *Acidovorax* in Melon Seed and Pathogenic Differentiation Using in Vitro Leaf in Xinjiang

WANG Ai-ying¹, LI Guo-ying^{2*}, ZENG Yi² and ZHANG Xin²

(1. Key Laboratory of Oasis Ecology Agriculture of Xinjiang Bingtuan, Shihezi University, Shihezi Xinjiang 832003, China; 2. Agriculture Department Shihezi University, Shihezi Xinjiang 832003, China)

Abstract: The different buffer solution separately examination the ratio of melon seed's disease-carrying using leaf in vitro was conducted. The result showed that PBS buffer solution which had better effect to enrich bacteria. And the injection vaccination efficiency is high. The leaf is better material in vitro for pathogenic differentiation. *Pseudomonas syringae* pv. *Lachryman* and *Acidovorax avenae* subsp. *citrularae* are compartmentalized as strong, middle and weak in pathogenic differentiation, disease germ's pathogenesis strength is weak separated from the seed.

Key words: Melon; Leaf in vitro; Detection in melon seed; Pathogenic differentiation

细菌性病害大都可经种子传播^[1,2]。甜瓜细菌性斑点病属于种子带菌, 常规检测的精度低、难度大。由于从种子上分离植物病原细菌相当困难, 其结果也常变化不定。Sharon 等 1982 年报道寄生离体叶片用于检测番茄斑叶病菌(*Pseudomonas tomato*)和辣椒斑点病菌(*Xanthomonas vesicatoria*), Rardhana 和 Cirenoto 1985 年运用类似的方法鉴定桃细菌性穿孔细菌(*Xanthomonas pruni*), 病菌在离体叶片上的表现症状和在自然病叶上相同^[3,4]。免疫放射分析方法具有灵敏度高、稳定性好、快速、特异性较强等优点,

但有时会发生交叉反应, 出现假阳性现象^[5]。王汉荣, 孙漱沅等运用离体浓缩接种方法为水稻细菌性条斑病菌的检测提供了一种可靠、简便而又快速的种子带菌检测方法^[6]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试的离体叶片与种子 离体叶片采自温室所育的甜瓜品种 86-1 出苗 15~20 d 左右的健康子叶; 阿勒泰地区 86-1 病瓜的种子。

1.1.2 标准菌株 标准菌株黄瓜细菌性角斑病

收稿日期: 2006-05-31 修回日期: 2007-03-05

基金项目: 新疆生产建设兵团课题基金(编号: NKB00SDXNK02NY)。

作者简介: 王爱英, (1972-), 女, 山东人, 硕士, 讲师, 主要从事植物病理与生物技术研究。

* 通讯作者: 李国英(1941-), 男, 教授, 新疆植物保护学会副理事长, 主要从事植物病害的研究工作。

菌 psl-8(*Pseudomonas syringae* pv. *Lachryman* Smith and Bryan, psl)和西瓜细菌性果腐病 Aac-14(*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Willems, Goor, Thienmans, Gillis, Kersters & Ley, Aac)由中国农科院植保所提供。其他菌株的来源见表 1、表 2。

1.1.3 其他供试材料 0.5%水琼脂,KBA 培养基,无菌水,PBS 缓冲液,0.85%的生理盐水,5 mL 一次性注射器,毛笔,喷壶。

表 1 2000~2001 年采集的西瓜
细菌性果腐病菌菌株
Table 1 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*
strains in 2000~2001

菌株 Bacterial strain	采集地点 Collection site	采集时间 Collection time	部位 Location	品种 Breed
14	148 团	2000. 8	果实	金龙花
15	105 团	2000. 7	果实	皇后
18	哈管局	2001. 3	果实	金密果
19	石河子蔬菜所	2001. 3	子叶	8601
16	103 团	2001. 7	瓜蔓	87-1
183	土墩子	2001. 8	打瓜果实	
189	102 团	2001. 7	果实	86-1
201	红旗农场	2001. 8	叶片	87-1
202	红旗农场	2001. 8	叶片	87-1
214	奇台	2001. 8	叶片	金龙花
211	148 团	2001. 8	果实	早金
3sz	阿勒泰	2001. 9	种子	86-1
1-1	阿勒泰	2001. 9	种子	86-1

表 2 2000~2001 年采集的
黄瓜细菌性角斑病菌
Table 2 *Pseudomonas syringae* pv.
Lachryman strains in 2000 ~2001

菌株 Bacterial strain	采集地点 Collection site	采集时间 Collection time	部位 Location	品种 Breed
10	121 团	2000. 6	瓜蔓	
56	102 团	2001. 6	幼果	早金
80	103 团	2001. 6	幼果	早金
85	103 团	2001. 6	叶片	红太后
90	103 团	2001. 6	叶片	春蕾
95	103 团	2001. 6	幼蔓	早金
144	103 团	2001. 7	叶片	87-1
147	103 团	2001. 7	叶片	86-1
198	103 团	2001. 7	瓜籽	春蕾
P2-a	103 团	2001. 7	叶	
P③-1	105 团	2001. 7	叶	

1. 2 方法

1.2.1 标准菌株的制备 将 KBA 斜面培养 24

h 的黄瓜细菌性角斑菌 psl-8 和西瓜细菌性果腐病原菌 Aac-14,每管用 3 mL 无菌水将菌苔洗下,吸取 1 mL 菌悬液移入另一离心管或试管中,对照比浊计用无菌水将菌悬液稀释为 30×10^8 CFU/ mL、 15×10^8 CFU/mL、 9×10^8 CFU/mL、 9×10^5 CFU/mL、 9×10^4 CFU/mL、 9×10^3 CFU/mL、 9×10^2 CFU/mL、 4×10^4 CFU/mL、 4×10^3 CFU/mL 等浓度梯度。同时,依次用这些稀释菌液进行注射接种,以无菌水作为对照。

1.2.2 离体子叶不同接种方法和有效浓度的测定 取温室培育 15 d 左右新鲜完整健康的甜瓜子叶,子叶表面用 75%酒精轻轻擦拭消毒(注意不要划伤),分别对 9×10^8 CFU/mL 的菌悬液采用注射(0.5 mL)、喷雾、毛笔摩擦 3 种方法接种新鲜甜瓜子叶,接种后的叶片叶面朝下置于水琼脂平板的培养皿中,并在 28℃下黑暗培养 48h(注意保湿),观察症状。若出现症状,做细菌溢光镜观察并划线分离纯化保存菌株。

标准菌株所配置的不同稀释度的菌悬液采取注射的方法对离体子叶进行接种。

1.2.3 离体叶片种子带菌检测 取 30 粒病瓜种子,表面用 70%酒精消毒 2 min,分别浸泡在 PBS 缓冲液、无菌水、0.85%生理盐水中,将浸泡液加入 2~3 滴吐温 20,放置于 4℃冰箱中,3 h 后以此浸提液注射接种用。子叶表面经 70%酒精消毒,用注射器吸取种子浸提液 0.5 mL,沿主叶脉注射,叶背朝上放置于 0.5%的水琼脂平板上,28℃下黑暗培养,48 h 后观察结果。

1.2.4 菌株离体叶片的致病性测定 取健康完好的叶片,表面用 70%酒精进行消毒。将所分离得到的菌株(表 1、2)培养 24 h 后,用无菌水配置成 4×10^7 CFU/mL 菌悬液,2 mL 注射器吸取 0.5 mL 的菌悬液沿主叶脉注射于离体叶片中。之后将叶背朝上放置于 0.5%的水琼脂平板上,28℃温箱中黑暗培养。36 h、48 h 后观察叶片的发病情况,并测量病斑的大小。利用 Statistics 软件中不加权算术平均法进行聚类分析,建立 UP-GMA 树^[7]。

2 结果与分析

2.1 不同浸提液注射接种试验结果

表 3 表明,PBS 缓冲液浸提病种的浸提液注射子叶接种后 48 h 显示症状,出现症状比较明显,有利于种子病原菌的富集,无菌水浸提尽管可

得到较多的致病菌,但致病结果并不理想。分离出现症状的叶片,可得到病原菌的纯培养。

2.2 离体子叶接种病原菌试验结果

采用3种不同接种方法接种。以注射法接种,子叶叶片上出现的症状最早,注射48h就可以显症,症状明显,比较容易观察到结果。次为喷雾接种。摩擦接种由于接菌量分散,起始的接菌量不大,出现的症状较晚甚至不表现症状,喷雾接种出始的接菌量较大,而且集中,叶片的发病症状较为严重(表4)。

表3 不同浸提液注射接种试验
Table 3 Experiment of different leaching solution injection vaccination

重复 Repeat	对照 (无菌水) CK (Sterile water)	无菌水 浸提 Sterile water digestion	PBS缓冲 液浸提 PBS buffer solution digestion	生理盐 水浸提 Normal saline digestion
1	—	++	+++	+
2	—	+++	+++	+
3	—	++	+++	++

注:+,在接种点,叶肉稍微有些褪绿,边缘黄化;+:沿接种点,病菌的侵染开始扩展;+++;沿接种点,病情扩展,叶肉已经凹陷或已腐烂;++++;叶片腐烂菌脓出现。—:接菌后未反应。

表4 离体叶片不同接种方法检测的结果
Table 4 Result of different vaccination method in vitro leaves

菌株 Bacterial strain	接种方法 Methods of inoculate	接种叶片数 Number of leaves inoculated	发病叶片数 Number of leaves infected	发病率/% Incidence	发病程度 Morbidity degree
黄瓜细菌性角斑 <i>Pseudomonas syringae</i>	注射 Injection	4	4	100	+++
	摩擦 Friction	4	1	25	+
	喷雾 Spraying	4	3	75	++
果腐病菌 <i>Acidovorax avenae</i>	注射 Injection	5	5	100	+++
	摩擦 Friction	5	1	20	+
	喷雾 Spraying	5	4	80	++

注:分级标准同表3。

表5 黄瓜细菌性角斑病原菌 psl-8 不同菌量接种甜瓜离体子叶
Table 5 Cucumber bacterial spot pathogen psl-8 with different fungus amount inoculated in vitro cotyledon of melon

注射液浓度/(CFU·mL ⁻¹) Inject thickness		30×10 ⁸	15×10 ⁸	9×10 ⁸	9×10 ⁵	4×10 ⁵	9×10 ⁴	4×10 ⁴	9×10 ³	4×10 ³	9×10 ²	对照 CK
早金	症状 Symptom	+++	+++	++	++	++	++	+	+	—	—	—
Zaojin	细菌溢 Bacterium overflows	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	分离致病菌 Separate pathogenic bacteria	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
86-1	症状 Symptom	+++++	++++	+++	+++	+++	++	++	++	—	+	—
	细菌溢 Bacterium overflows	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—
	分离致病菌 Separate pathogenic bacteria	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—

表6 西瓜细菌性果腐病菌 Aac-14 不同浓度接种甜瓜离体子叶
Table 6 Result on in vitro cotyledon of melon inoculated by bacterial fruit rotten of different density Aac-14 of germ

注射液浓度/(CFU·mL ⁻¹) Inject thickness		30×10 ⁸	15×10 ⁸	9×10 ⁸	9×10 ⁵	4×10 ⁵	9×10 ⁴	4×10 ⁴	9×10 ³	4×10 ³	9×10 ²	对照 CK
早金	症状 Symptom	+++++	++++	+++	+++	+++	++	+	+	—	—	—
Zaojin	细菌溢 Bacterium overflows	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	分离致病菌 Separate pathogenic bacteria	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
86-1	症状 Symptom	+++++	++++	+++	+++	+++	++	++	++	+	—	—
	细菌溢 Bacterium overflows	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	分离致病菌 Separate pathogenic bacteria	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—

注:分级同表3。

2.3 不同菌量接种甜瓜离体子叶检测结果

从表 5、6 可以得出,黄瓜细菌性角斑病菌 psl-8 接种“早金”离体子叶病菌的有效浓度为 4×10^5 CFU/ mL,接种“86-1”的离体子叶病菌的有效浓度为 4×10^4 CFU/ mL,而西瓜细菌性果腐病菌 Aac-14 接种“早金”离体子叶病菌的有效浓度为 4×10^4 CFU/ mL,接种“86-1”的离体子叶

病菌的有效浓度为 4×10^3 CFU/ mL(有效浓度以最低浓度发病程度达“++”)。接种“早金”发病的潜育期较长,且发病程度轻;接种“86-1”潜育期短,且发病程度较重。这与“早金”的抗病性强于 86-1 有关。发病子叶进行光镜细菌溢观察,均出现细菌溢,并可分离到致病菌。

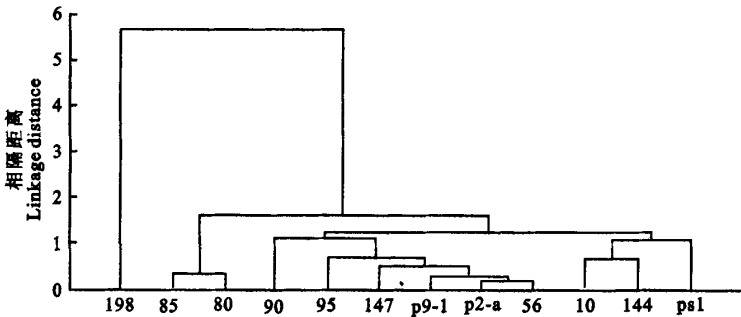


图 1 黄瓜细菌性角斑病菌离体子叶接种树状聚类图

Fig. 1 Tree diagram on cotyledon inoculated in vitro by cucumber bacterial spot germ

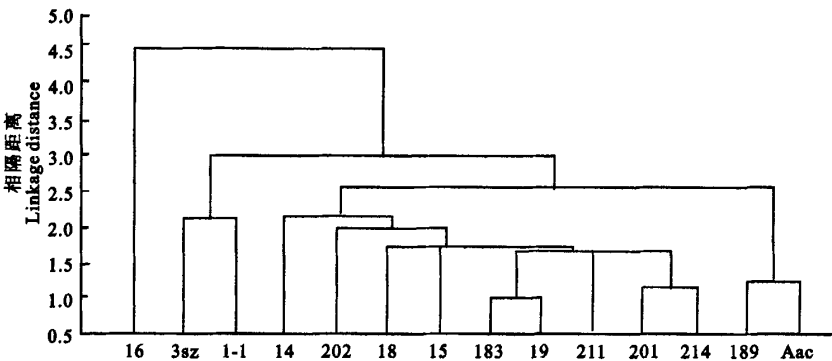


图 2 果腐病原菌离体子叶接种树状聚类

Fig. 2 Tree diagram on cotyledon inoculated in vitro by water-melon bacterial fruit rotten germ

2.4 离体叶片接菌的致病力分化

从图 1 可以看出:黄瓜细菌性角斑菌也可分为 3 个类群,198 号单独为一个类群,为强致病型;144、psl、10、90、p⑨-1、147、95、56、p②-a 号为一个类群,为较强致病型;而 85、80 等为弱致病型。由图 2 可得:以距离为 3 的水平划分,得到 3 个子类群,16 号单独为一个类群;Aac、189、214、201、211、19、183、15、18 号等为一个类群;而 1-1、3sz 为一个类群。所归的类群基本与温室幼苗喷雾接种聚类分析一致,并且果腐病原菌的致病力强于黄瓜细菌性角斑病菌,种子分离出的致病菌两种接种方法测得致病力均低。

3 结论与讨论

3.1 甜瓜细菌性斑点病菌离体叶片检测种子带菌,PBS 缓冲液浸提带菌种子后注射离体子叶,显症时间早,症状明显,控制一定的接菌初始量,且在 48 h 内产生菌脓。可用于检测带菌率较低的甜瓜种子,灵敏度较高。

3.2 甜瓜细菌性斑点病离体叶片检测法,能够把发病的关键条件(湿度、温度、光照、苗龄及嫩绿程度)调节到最佳状态,而且使这些条件保持恒定。所以离体叶片检测不受自然条件的影响,即使在寒冬只要在温室育好少量的苗,就能够进行种子检测。

(下转第 222 页)

表 3 美洲斑潜蝇危害造成的棉株被害率在田间的水平分布
Table 3 The level distribution of damage rate of cottons by *Liriomyza sativae*
Blanchard in cotton field (arithmetic mean)

	1	2	3	4	5	均值
田边	25%	22.8%	28.9%	26.2%	31.8%	26.94 A
田中间	20.8%	18.9%	24.5%	21.7%	26.4%	22.46 A

3 结论与讨论

3.1 聚集度指标分析结果表明,美洲斑潜蝇幼虫潜道空间分布图式为随机分布型。其原因可能是棉田内美洲斑潜蝇种群密度较低,个体间互不影响。另外,除了 C 指数外, I 指数、 M^* / n 平均拥挤度和 IC 指数均无置信区间判别公式,由于 C 指数在各田块的变化规律与其他 3 个指标规律一致,随机分布的判断应该一致。另外,进一步用 Iwao 回归模式测定结果表明,其分布型为随机分布。

3.2 美洲斑潜蝇在棉株上的垂直分布随着虫口密度的增大、棉株生育期的变化,分布叶位随之增高。但在棉株各生育期及不同虫口密度下,均主要分布在棉株中下部。根据该分布特性,建议

化学防治时侧重喷洒中下部叶片。

3.3 据张原等^[4]报道,美洲斑潜蝇为害特性表现为田边重于田中间。但经本试验对调查数据进行方差分析研究结果表明,田边与田中间为害差别不显著,没有明显的边际效应。

参考文献:

- [1] 康 乐. 斑潜蝇的生态学及持续控制[M]. 北京: 科学出版社, 1996
- [2] 李洪奎, 宋健科. 美洲斑潜蝇分布型研究[J]. 山东农业大学学报, 1999, 30(2): 151~153
- [3] 丁岩钦. 昆虫数学生态学[M]. 北京: 科学出版社, 1994. 22~25.
- [4] 秦厚国, 叶正襄. 美洲斑潜蝇研究[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 2002.

(上接第 219 页)

3.3 离体检测法具有直观可靠、简便、稳定、快速等优点。无病、患其他病害或携带丧失活力的细菌性斑点病菌的种子均不会误诊。

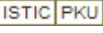
3.4 被测种子量的多少决定了菌量的多少,它直接关系到症状的产生和田间病害的流行,所以该方法在实际应用中,取样量的多少是一个重要的问题。特别是病种收获后次年播种前,取多少量才合适,这涉及到细菌性斑点病种子带菌最低的容许限量(即带菌阈)。

3.5 从致病力结果的聚类分析可以看出,其致病菌之间的致病力存在一定差异。据此可将供试菌株按致病性分为强、中、弱 3 种不同的致病类型。就我们所采集菌株的来源,其地域性差异小,可能与此种病害刚刚从新疆流行起来,病原菌的变异小有关。试验中发现,直接从种子上分离的菌株,致病力明显较低,其原因有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Rane K K, Lation R X. Bacterial fruit blotch of watermelon; Association of the pathogen with seed [J]. Plant Disease, 1992, 76 (5): 509~512.
- [2] Latin R, Tikhonova I, Rane K. Factors affecting the survival and spread of *Acidovorax avenae* subsp. *citrullii* Watermelon transplant production facilities [J]. Phytopathology, 1995, (85): 1413~1417.
- [3] Sharn E, Okom Y, Henis. Journal of applied Bacteriology [J]. 1982, 53: 371~378.
- [4] Wang Gongjin, Zhu Xiandai, Chen Yuling, et al. Application of immunoradiometric assay in rice seed inspection for *Xanthomonas campestris* pv. *Aryzicola* [J]. IRRN, Phytopathology, 1990, 15(1): 21~22.
- [5] Kohnlm, Restche D M, Bailey S R, et al. Restriction fragment length polymorphisms in the nuclear and mitochondrial DNA of *Sclerotinia* species [J]. Phytopathology, 1988, 78: 1047~1051.
- [6] Schaad N W. Inoculum thresholds of seed borne pathogen [J]. Bacteria, 1988, 78(6): 872~874.
- [7] 田新莉, 赵宗胜, 李国英, 等. 新疆棉花枯黄病的 RAPD 分析 [J]. 西北农业学报, 2002, 11(4): 4~8.

新疆哈密瓜细菌性斑点病离体叶片种子带菌检测及致病力分
化

作者: [王爱英](#), [李国英](#), [曾义](#), [张昕](#), [WANG Ai-ying](#), [LI Guo-ying](#), [ZENG Yi](#), [ZHANG Xin](#)
作者单位: [王爱英, WANG Ai-ying\(石河子大学绿洲农业生态重点实验室, 新疆石河子, 832003\)](#), [李国英](#), [曾义, 张昕, LI Guo-ying, ZENG Yi, ZHANG Xin\(石河子大学农学院, 新疆石河子, 832003\)](#)
刊名: [西北农业学报](#) 
英文刊名: [ACTA AGRICULTURAE BOREALI-OccIDENTALIS SINICA](#)
年, 卷(期): 2007, 16 (4)
被引用次数: 2次

参考文献(7条)

1. [Rane K K;Lation R X](#) Bacterial fruit blotch of watermelon:Association of the pathogen with seed 1992 (05)
2. [Latin R;Tikhonova I;Rane K](#) Factors affecting the survival and spread of *Acidovorax avenae* subsp. *citrullii* Watermelon transplant production facilities 1995 (85)
3. [Sharn E;Okom Y Henis](#) [查看详情](#) 1982
4. [Wang Gongjin;Zhu Xiandai;Chen Yuling](#) Application of immunoradiometric assay in rice seed inspection for *Xanthomonas campestris* pv. *Aryzicola* 1990 (01)
5. [Kohnlm Restche D M;Bailey S R](#) Restriction fragment lengh polymenphisms in the nuclear and mito chondrial DNA of *Sclerotinia species* 1988
6. [Schaad N W](#) Inoculums thresholds of seed borne pathogen 1988 (06)
7. [田新莉, 赵宗胜, 李国英, 张莉](#) 新疆棉花枯萎病菌的RAPD分析[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2002 (4)

本文读者也读过(10条)

1. [杜义英, 李军虎, 秦建国, 滕慧颖](#) 种子企业如何做好室内种子检测工作[期刊论文]-[中国种业](#)2009 (6)
2. [田平芳, 张志铭, 谭天伟](#) 赤豆(*Phaseolus angularis* Wight)种子带菌检验[期刊论文]-[种子](#)2004, 23 (10)
3. [罗宽, 戴良英, 廖晓兰, 黎定军](#) 杂交稻种子带菌及保活剂处理与生活力的关系[期刊论文]-[湖南农业大学学报\(自然科学版\)](#)2002, 28 (4)
4. [徐秉良](#) 孜然芹根腐病病原鉴定及种子带菌测定[期刊论文]-[甘肃农业大学学报](#)2002, 37 (2)
5. [淡红梅, 李静, 李晔, 李先恩, 李健强, DAN Hong-mei, LI Jing, LI Xi, LI Xian-en, LI Jian-qiang](#) 牛膝种子带菌检测 and 药剂消毒处理效果研究[期刊论文]-[时珍国医国药](#)2007, 18 (1)
6. [刘西莉, 牡丽丹, 王红梅, 陈君, 丁万隆](#) 红花种子带菌检测及药剂消毒处理[期刊论文]-[植物保护](#)2003, 29 (6)
7. [陈新地](#) 西瓜细菌性果斑病菌的PCR检测[学位论文]2010
8. [杨峻, 刘西莉, 王慧敏, 李健强, 张龙](#) 五种豆科林草种子带菌检测及药剂消毒处理效果[期刊论文]-[种子](#)2002 (1)
9. [雷海清, 蒋招林, 郑小玲, 汪文波](#) 不同处理方法对种子带菌及发芽的影响[期刊论文]-[中国水土保持](#)2009 (5)
10. [刘飞, 伍晓丽, 李隆云, 秦松云, LIU Fei, WU Xiao-li, LI Long-yun, QIN Song-yun](#) 大黄种子带菌检测及药剂消毒处理研究[期刊论文]-[西南大学学报\(自然科学版\)](#) 2007, 29 (10)

引证文献(2条)

1. [杜爽, 王轩, 张岩](#) 论我国种子检验[期刊论文]-[北京农业](#) 2012 (24)
2. [成雪峰, 张凤云](#) 种子检验技术的现状与展望[期刊论文]-[种子](#) 2009 (08)

引用本文格式: [王爱英](#), [李国英](#), [曾义](#), [张昕](#), [WANG Ai-ying](#), [LI Guo-ying](#), [ZENG Yi](#), [ZHANG Xin](#) [新疆哈密瓜细菌性斑点病离体叶片种子带菌检测及致病力分化](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2007 (4)