

西瓜细菌性果斑病菌检测技术研究进展

郭立新

(北仑出入境检验检疫局 浙江 宁波 315800)

摘要:西瓜细菌性果斑病菌能引起西瓜果斑病和哈密瓜果斑病等,由于病菌危害果实而成为一种毁灭性病害,常给生产带来严重损失。对于该细菌病害,较为可行的控制措施是实行检疫控制其扩展,而这有赖于准确、快速、灵敏的检测技术的应用。该文章较为系统地综述了国内外西瓜细菌性果斑病菌的分布与危害、生物学特性及检测方法等方面的研究进展。

关键词:西瓜细菌性果斑病菌; 检测技术; 研究进展

中图分类号:S 436.42 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)07-0181-04

西瓜细菌性果斑病菌最早于 1969 年由 Crall 和 Schenck^[1] 在美国佛罗里达州发现,他们没有对病原菌进行鉴定,只是描述了病害的症状,1978 年 Schaad 等^[2] 将其鉴定为类产碱假单孢菌西瓜亚种 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*), 1992 年, Willems 等^[3] 根据该病原菌的分子杂交结果,将其更名为燕麦食酸菌西瓜亚种 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)。

西瓜细菌性果斑病菌是造成西瓜毁灭性病害的一种病原菌,属于我国限制入境的检疫性有害生物。尽管化学药剂处理能够降低发病种子上西瓜细菌性果斑病菌的种群数量,但是却难以完全清除病菌^[4]。因此,控制该病的一项重要措施就是实施检疫,杜绝病害的传播扩散,而这有赖于高效、灵敏、快捷的检测技术的发展。该文章旨在通过对病害分布与危害、生物学特性和检测技术的回顾与总结,为防止西瓜细菌性果斑病菌在我国大范围传播与发生,以及口岸实际检测提供参考。

1 分布与症状

西瓜细菌性果斑病菌可使西瓜果实表面产生病斑甚至腐烂,降低其商品和食用价值。由于此病害通过种子长距离传播,其流行速度较快。自该病害首次报道以来,已蔓延扩散于世界许多地区,包括亚洲的中国、韩国、马来西亚、日本、印度尼西亚、马来西亚、泰国,欧洲的以色列、土耳其、希腊、比利时、匈牙利,拉丁美洲的巴西,北美洲的美国,大洋洲的澳大利亚等国家和地区^[1-9]。除西瓜外,该病菌能侵染葫芦科作物及番茄、胡椒、茄子等,其自然发病寄主有西瓜、甜瓜、罗马甜瓜、网纹甜瓜、香瓜、黄瓜、南瓜,能引起多种瓜类果斑病的发生^[4, 10]。

西瓜细菌性果斑病从苗期到成株期均可发生,病菌可危害叶片、茎及果实。其中西瓜的幼苗期和果实期最容易受到侵染。病菌侵染西瓜子叶,造成水渍状病斑,并沿主脉逐渐发展为黑褐色坏死病斑。在真叶上形成不明显的褐色小斑,周围有黄色晕圈。在叶面上初期呈水渍状斑,后随病斑扩大,最终呈黑褐色不规则较大条状枯斑,病斑皱缩易碎。果实受到侵染时,首先在表皮出现水渍状针尖大小的水渍状小点,潮湿情况下不断向果肉深层扩展,造成果肉变成水渍状,果皮开裂症状,病斑处往往有褐色、黏稠的菌脓溢出^[10-11]。

2 生物学特性

西瓜细菌性果斑病菌是革兰氏阴性菌,菌体呈短杆状,平均大小一般为 $0.5\ \mu\text{m} \times 1.7\ \mu\text{m}$, 依赖单根极生鞭毛进行活动。病菌可在多种细菌培养基上生长,在 KB 培养基上,经过 48 h 生长后,菌落通常呈乳白色,圆形、隆起、光滑、不透明,不产生扩散性荧光。病菌生长最高温度 $42\ ^\circ\text{C}$, 最低 $4\ ^\circ\text{C}$, 最适生长温度为 $33 \sim 35\ ^\circ\text{C}$ 。为好氧呼吸、氧化产酸。在生理生化性状上表现为不能利用肌醇、甘露醇、山梨醇、奎尼酸、葫芦巴碱,能利用乳酸铵、 β -丙氨酸。果聚糖反应、七叶苷水解和明胶液化阴性,氧化酶反应和硝酸盐还原反应均为阳性^[2, 10-12]。Walcott 等^[13-15] 根据致病性测试、DNA 指纹图谱分析和全细胞脂肪酸分析,发现西瓜细菌性果斑病菌至少可被划分为 2 个类群:类群 1 主要包括模式菌株 ATCC 29625 和不是来源于西瓜的葫芦科作物,类群 2 主要包括典型的西瓜细菌性果斑病菌。Feng 等^[16] 根据西瓜细菌性果斑病菌和 *Acidovorax* 全基因组序列之间的单核苷酸多态性差异以及部分代表不同生化功能的 14 个看家基因,筛选出 *gmc*、*ugpB*、*pilT*、*lepA*、*trpB*、*gltA*、*phaC* 7 个基因设计相应引物,对来自多个国家的 94 株菌株进行扩增测序及序列分型研究,结果表明,94 株菌株存在 10 个分

作者简介:郭立新(1976-),女,硕士,工程师,研究方向为植物检疫,现主要从事进出口商品检验检疫工作。

收稿日期:2011-01-18

型,所有菌株分为两大类群,其中一类群主要集中在中国地区及美国 Georgia,另一类群包含中国地区少数菌株和其它世界各地菌株。因此,根据中国菌株的分群,可以推测这两大类群菌株很有可能都被引入中国并造成危害。

3 检测方法

西瓜果斑病属于难治疗病害,一旦果实发病,很难使用药剂进行控制。鉴于受其危害种子带菌率较高的特点,目前较为可行的控制措施是实行检疫,控制其扩展。因此,建立高效灵敏的检测技术,成为解决种苗检疫、控制病害等基本问题的前提。目前关于该病菌的检测方法主要包括细菌常规方法、血清学方法、分子生物学方法、血清学结合分子生物学方法等4类技术。

3.1 细菌常规方法

国内张祥林等^[2]报道对西瓜细菌性果斑病菌的检测可采用金氏B培养基或NA培养基上划线培养,进行菌落形状观察、病菌生理生化特性测定及其致病性测定等方法。华南热带农业大学张荣意、吉林农业大学金岩、中国农科院植保所赵廷昌等^[11, 17-18]分别对西瓜、哈密瓜上的西瓜细菌性果斑病菌进行了上述相关方面的研究。任毓忠等^[9]对新疆农10师181团和183团哈密瓜病瓜种子进行育苗检测、培养特性和生理生化反应,结果显示病瓜种子携带西瓜细菌性果斑病菌的概率分别为71.4%和66.7%。同时任毓忠还采用分离培养法对病瓜种子、种皮、种胚进行检测,发现病原菌主要附着在种表和种皮上,种仁的带菌量较低^[19]。尽管细菌常规检测法比较直观,但工作量大,周期长。育苗检测虽可从幼苗的发病情况直接计算种子的带菌率,但需要一定的空间,结果受环境条件的影响较大。分离培养检测法非常准确,但比较复杂,所需的时间也较长。

3.2 血清学方法

随着生物技术的进步,血清学方法被广泛应用于病原菌的检测。该方法利用抗体与相应抗原结合的特性,检测材料中病菌存在与否。王政等^[20]利用西瓜细菌性果斑病菌的抗血清进行了载玻片凝集反应、试管凝集反应、琼胶双向扩散和免疫分离法等试验。结果表明,载玻片凝集反应和试管凝集反应不能用来直接测定种子抽提液中的病原菌;琼胶双向扩散不能用来检测种子中的潜伏细菌;免疫分离法可用来检测种子中的潜伏细菌,灵敏度为102~103 cfu/mL。冯建军等^[8]采用免疫凝聚试纸条对病菌进行检测发现,该方法灵敏度为106 cfu/mL,具有简便、快速、易操作特点,适用于田间快速检测和病害诊断。熊亮斌等^[21]采用改良 DAS-Dot-ELISA 对西瓜细菌性果斑病菌进行了检测,结果表明该方法可快速、经济的检测西瓜细菌性果斑病菌,灵敏度达 1.9×10^5 cfu/mL。血清学方法较细菌常规检测法简

单易行,但血清学方法中应用最为广泛且简单、灵敏的双抗体夹心酶联免疫吸附法(DAS-ELISA)和免疫荧光染色法未见用于检测西瓜细菌性果斑病菌。

3.3 分子生物学方法

3.3.1 普通PCR技术 20世纪80年代中期以后,分子生物学技术得到了快速的发展,为西瓜细菌性果斑病菌的检测提供了前所未有的新方法。Mullis等在1985年创立的PCR方法已成为分子生物学及其相关领域的经典试验方法,可在短时间内扩增出数百万个特异DNA序列的拷贝。Walcott R R等^[7]根据西瓜细菌性果斑病菌AAC 94-85分离物16S rDNA序列设计引物(WFB1和WFB2)扩增西瓜种子中的*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, 119个阳性样品均扩增到了目的条带,但由于此引物特异性较差,其它病菌,如:*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *Acidovorax avenae* subsp. *konjaci*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattketae*, *Comomonas acidovorans*, *Acidovorax* sp. From Calathea sp. 也均被扩增出相同大小的片断。2004~2005年,国内任毓忠等^[19, 22]利用引物WFB1和WFB2对哈密瓜带菌种子进行PCR检测,研究结果显示只要有2粒病瓜种子就可检测到目的条带。可见,该PCR检测法灵敏度较高,但特异性较差,限制了此方法的推广。随后张祥林等^[23]在对西瓜细菌性果斑病菌及相关菌株的16S rDNA序列进行同源性和系统演化关系分析的基础上,设计了针对西瓜细菌性果斑病菌的特异性引物BFB64/65,检测灵敏度为107 cfu/mL。需要注意的是在使用普通PCR方法对种子进行检测过程中,种子中杂质会抑制PCR反应并造成假阴性结果^[7]。

3.3.2 实时荧光PCR方法 实时荧光PCR方法由于其无可替代的优势,现已被广泛应用。该技术利用荧光探针实时监测目的基因的扩增,实现PCR扩增与探针检测同时进行,整个检测过程完全闭管,不需PCR后处理,不需电泳、溴化乙锭染胶,减少了检测步骤,节省了时间,消除了PCR产物的污染,消除了溴化乙锭对人体的毒害。伍永明、冯建军等先后应用TaqMan探针实时荧光PCR方法对西瓜细菌性果斑病菌进行了检测,其检测灵敏度分别为105 cfu/mL和103~104 cfu/mL。与其它方法相比,采用实时荧光PCR,检测灵敏度和特异性均有较大程度提高。

3.3.3 Bio-PCR 在实时荧光PCR扩增基础上,Feng等^[24]人利用含抗生素的琼脂平板富集西瓜细菌性果斑病菌后,结合实时荧光定量PCR技术建立了Bio-PCR检测体系,对西瓜细菌性果斑病菌检测灵敏度可至1 cfu/mL,较实时荧光PCR方法检测灵敏度进一步得以增加。

3.4 血清学结合分子生物学方法

医学免疫学及动物医学免疫学的不断发展促进了血清学技术用于植物病原细菌的检测研究,特别是血清学技术与各种 PCR 为基础的检测技术相结合,大大提高了检测的灵敏度。

3.4.1 免疫磁性分离-PCR 法 免疫磁性分离-PCR 法(IMS-PCR)是近年来发展的新技术,它将免疫磁性分离法与 PCR 法结合起来,提高了检测的特异性和灵敏度。Walcott R R^[7] 应用 IMS-PCR 法对西瓜种子中的西瓜细菌性果斑病菌进行了检测,其灵敏度为 10 cfu/ mL,比直接 PCR 高 100 倍 而且不受 PCR 抑制因子的影响。免疫磁性分离-PCR 法对目的菌进行二步检测,即:血清的作用和 PCR 作用,这样在保证检测速度的情况下,提高了检测的可靠性^[25]。但由于免疫磁性微球制备麻烦,目前该方法用于病原菌的检测报道不多。

3.4.2 磁珠捕获杂交实时荧光 PCR 技术 磁珠捕获杂交是近年来新兴的一项技术,它有助于完全发挥 PCR 检测技术的潜能。其主要过程包括利用生物素标记的单链核苷酸探针,结合到辣根过氧化物酶包被的磁珠上,以便从粗样品提取液中与单链目标 DNA 片段杂交结合。杂交到探针上的靶标核酸能够通过磁力浓缩富集,而非靶标片段和 PCR 抑制物则可通过洗脱加以去除,经过溶解后,富集的靶标 DNA 可以用于实时荧光 PCR 检测。Ha 等采用此方法对西瓜细菌性果斑病菌和瓜蔓枯病菌进行了双重实时荧光 PCR 检测,对西瓜细菌性果斑病菌最低检测限量可达 10 cfu/ mL,其灵敏性和特异性与其它检测方法相比均有大幅度提高,但其操作过程较为繁琐。

4 展望

西瓜细菌性果斑病菌由于其危害性较强而引起了世界各地研究者的广泛关注,对其快速检测技术的研究是控制其危害的主要技术手段。目前检测西瓜细菌性果斑病菌的方法有细菌常规方法、血清学方法、分子生物学方法以及血清学结合分子生物学等方法。细菌常规方法在早期该病害研究中起到了一定作用,但操作相对粗放,精确度低,耗时长,灵敏度差,易漏检无明显病症的种子。血清学方法要求较好的前期研究储备,具耗时费力的缺陷。基于 PCR 的分子生物学检测方法是目前实际应用中使用较多的方法,可快速检测病菌,但易受种子成分抑制而出现假阴性结果。血清学结合分子生物学方法大大提高了检测灵敏度和特异性,但其实际应用对仪器以及操作人员技术水平有着较高要求,直接应用于实践尚存在一定困难。目前对该类有害生物检测技术的发展方向总的来说,正朝着更加灵敏、准确、快速的反向在发展,在实际应用中应根据实际情况加以合理使用。

参考文献

[1] Crall J M, and Schenck N C. Bacterial Fruit Rot of Watermelon in Florida[J] . Plant Disease Report, 1969, 53: 74-75.
[2] Sdaad N W, Sowell G J, Goth R W, et al. *Pseudomonas pseudoalcaligenes subsp. citrulli subsp. nov*[J] . International Journal of Systematic Bacteriology, 1978 28(1): 117-125.
[3] Willems Goor A 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(1): 107-119.
[4] Burdman S, Kots N, Kritzman G, et al. Molecular, Physiological, and Host-Range Characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Isolates from Watermelon and Melon in Israel[J] . Plant Disease 2005 89(12): 1339-1347.
[5] Ha Y, Fessehaie A, Ling K S, et al. Simultaneous Detection of *Acidovorax avenae* subsp. “*citrulli* and *Didymella bryoniae* in Cucurbit Seedlots Using Magnetic Capture Hybridization and Real-Time Polymerase Chain Reaction[J] . Phytopathology, 2009 99(6): 666-678.
[6] Holvea M C, Karafla C D, Glynos P E, et al. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Newly Reported to Cause Bacterial Fruit Blotch of Watermelon in Greece[J] . Plant Pathology, 2009, 59(4): 797-797.
[7] Walcott R R and 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.
[8] 冯建军, 许勇, 李健强, 等. 免疫凝集试纸条和 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测西瓜细菌性果斑病菌比较研究[J] . 植物病理学报 2006, 36(2): 102-108.
[9] Palkovics L, Petr6czy M, Ken6sz B, et al. First Report of Bacterial Fruit Blotch of Watermelon Caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Hungary[J] . Plant Disease 2008, 92(5): 834-834.
[10] 张昕, 李国英, 任毓忠. 新疆哈密瓜上两种病原细菌比较鉴定及其田间消长动态的研究[J] . 中国农业科学, 2002, 35(7): 888-893.
[11] 赵廷昌, 孙福在, 王兵万, 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.
[12] 张祥林, 莫桂花. 西瓜细菌性果斑病[J] . 植物检疫 1997 11(4): 229-230.
[13] OBrien R G, Martin H L. Bacterial blotch of melons caused by strains of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. [J] . Australian Journal of Experimental Agriculture 1999, 39(4): 479-485.
[14] Somodi G G, 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.
[15] Walcott R R, Fessehaie A, Castro A C. Differences in Pathogenicity between Two Genetically Distinct Groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on Cucurbit Hosts[J] . Journal of Phytopathology, 2004, 152(5): 277-285.
[16] Feng J, Shuenzel E L, Li J, et al. Multilocus Sequence Typing Reveals Two Evolutionary Lineages of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*[J] . Phytopathology, 2009 99(8): 913-920.
[17] 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.
[18] 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.

“合村并建”背景下的德州花卉产业发展思路

薛玉剑

(德州学院农学系, 山东 德州 253023)

摘要: 在分析德州花卉业现状的基础上, 依据德州发展花卉业的优势, 结合“合村并建”工作实际, 提出了今后德州花卉业的发展思路。

关键词: 花卉; 花卉业; 德州; 合村并建

中图分类号: S 68(252) **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2011)07-0184-03

近年来, 山东省德州市委、市政府在认真研究落实党的十七大精神和借鉴外地成功经验的基础上, 制定出台了《关于推进全市村庄合并和农村社区建设的意见》, 成立了农村综合改革推进委员会, 在先期 17 个乡镇试点的基础上, 全面启动了“合村并建”农村社区的建设工作。“合村并建”为德州科学确定农业产业发展布局, 构建完善的基础设施网络体系提供了更有利的条件。而如何结合“合村并建”工作的开展, 理清德州花卉业今后的布局与发展思路, 进一步做大做强德州花卉产业, 壮

大农村经济与增加农民收入, 进而更好的推动“合村并建”工作的深入开展, 有着重要的现实意义。

1 德州目前花卉业的生产经营现状

从 20 世纪 80 年代末至今, 德州花卉业经历了起步、高速发展、停滞与优化复苏 4 个阶段。生产经营规模、方式、效益、行情, 生产经营者的数量、身份, 花卉的品种、档次、价格都有了明显变化。以德城区为例, 生产经营者由 4 家国营专业单位发展到现在的集体、私人企业近百家; 发展方向有生产经营型与完全经营型 2 种, 而依完全经营型居多; 花卉品种有传统乡土品种和南方观叶耐荫品种 2 类, 以南方品种和山东省其它地区产品为主; 花卉价格经历了由低到高、到大幅度降低、再到逐步平稳的过程。目前, 德州花卉业总体状况表现为小而全、大而散、多而乱, 市场产品自给率低。如鲜切花、绿

作者简介: 薛玉剑(1963-), 男, 山东济南人, 本科, 副教授, 现主要从事园林植物栽培教学与研究工作。

基金项目: 德州学院重点资助项目(318015)。

收稿日期: 2011-02-14

[19] 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.

[20] 王政, 胡俊, 哈密瓜细菌性果斑病种子带菌血清学检测技术的初探[J]. 内蒙古农业大学学报, 2005, 26(1): 20-23.

[21] 熊亮斌, 刘簪, 王天昌, 等. 改良 DAS-Dot-ELISA 检测西瓜细菌性果斑病菌[J]. 微生物学通报, 2010, 37(10): 1551-1556.

[22] 任毓忠, 李晖, 李国英, 等. 哈密瓜细菌性果斑病种子带菌的 PCR 检

测[J]. 新疆农业科学, 2004, 41(5): 329-332.

[23] 张祥林, 伍永明, 王翀, 等. 西瓜细菌性果斑病菌的 16S rDNA 序列分析及特异性引物的设计[J]. 植物病理学报, 2007, 37(3): 225-231.

[24] Zhao T, Feng J J, Secher A, et al. An Improved Assay for detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon and melon seed [J]. Seed Science and Technology, 2009, 37(2): 337-349.

[25] 张卉, 赵廷昌, 李景富, 等. PCR 技术检测种植病细菌研究进展[J]. 植物检疫, 2003, 17(6): 358-362.

Advances in Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

GUO Li-xin

(Beilun Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Ningbo, Zhejiang 315800)

Abstract: Bacterial fruit blotch, caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, is a serious disease of cucurbit plants. *A. avenae* subsp. *citrulli* can be highly destructive under favorable conditions. Chemical treatments fail to eradicate the bacterium. Therefore, the main strategy for combating bacterial fruit blotch is the quarantine prior to planting. So, accurate, rapid and sensitive detection method is principal step to prevent and control the disease. The distribution, symptoms, biology characteristics and several methods for detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* were reviewed in this paper.

Key words: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*; detection method; advance