

doi:10.11937/bfyy.20170373

甜瓜细菌性果斑病菌鉴定及杀菌剂毒力测定

刘丹丹, 刘畅

(沈阳化工大学 环境与安全工程学院, 辽宁 沈阳 110142)

摘要:以内蒙古发病甜瓜上分离的病原细菌为试材,采用形态学、生理生化测定和16S rRNA序列比对的方法,进行了病原菌的生物学鉴定,并通过离体试验和活体试验相结合的方法,研究了不同杀菌剂对致病菌的防治效果,以期为细菌性果斑病的防治提供参考依据。结果表明:试验菌株为西瓜食酸菌(*Acidovorax citrulli*),毒力测定结果显示,不同杀菌剂对西瓜食酸菌的毒力差异较大,同一杀菌剂在离体和活体试验中的结果也不相同,需要2种试验方法相结合,才能对药剂生物活性作出准确评价。

关键词:瓜类细菌性果斑病;甜瓜;杀菌剂;毒力测定;16S rRNA;化学防治

中图分类号:S 436.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)18-0006-05

甜瓜细菌性果斑病(bacterial fruit blotch)是由西瓜食酸菌(*Acidovorax citrulli*)引起的毁灭性病害,在内蒙古、黑龙江、辽宁、山东、新疆、广东、海南等地均有发生,已造成了巨大经济损失^[1-5]。*A. citrulli*可侵染甜瓜整个生长期。未经处理的带毒种子萌发后,病原菌从子叶侵入,引起幼苗发病。病菌也可通过伤口和气孔侵染成熟

植株,通过果皮皮孔侵染不到3周的幼果。此病害在高温高湿条件下易发生,初期植株表现为数量不等的病斑,随后叶片枯萎,后期果实腐烂。病菌主要通过种子带毒、风雨、昆虫以及农事作业传播。其寄主较广泛,包括甜瓜、西瓜、南瓜、黄瓜和西葫芦等作物。另外,该病菌的环境适应性较强,可在种子、土表越冬,造成来年的侵染源^[6-7]。化学防治仍是控制甜瓜细菌性果斑病的主要措施。常用抗生素和铜制剂类药剂,通过种子处理和植株喷雾相结合的方法防治甜瓜细菌性果斑病^[8]。该研究对从内蒙古地区采集的病原样本进行分离纯化,利用16S rRNA扩增和序列比对方法,对致病菌进行鉴定。并将该病菌作为防治对象,以抗

第一作者简介:刘丹丹(1981-),女,博士,讲师,现主要从事环境污染治理与修复及分子生物学与植物病害防治等研究工作。E-mail:liudandan.553@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31400481);辽宁省博士科研启动资助项目(20141086)。

收稿日期:2017-05-15

Abstract: In order to make clear difference of biological characteristics of *Trichoderma* PY2 resistant to iprodione and wild Y2 strain from loquat, the effects of medium, carbon and nitrogen source, pH, temperature and illumination on mycelial growth and sporulation quantity for PY2 and Y2 strains were studied by method of mycelial growth rate and cell count technique. The results showed that characteristic of generating spores was significantly different between PY2 and Y2. PY2 was more powerful than Y2 in ability of generating spores. The proper conditions of mycelial growth were mediums of PDA, CDA or BDA, glucose, yeast extract and pH 5, 6, 8, 9, 10, 15-28 °C, all dark or all light. The proper conditions of generating spores were medium of CDA, D-fructose, beef extract, pH 3, 25 °C and all light.

Keywords: *Trichoderma*; resistance to iprodione; biological characteristics

生素类、铜制剂类和丙烯酸酯类杀菌剂作为供试药剂,采用室内离体和活体试验结合的方法,进行杀菌剂对西瓜食酸菌的毒力测定,以期对细菌性果斑病的防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试病原菌为菌西瓜食酸菌(*Acidovorax citrulli*),采自内蒙古农田。

供试药剂:丙烯酸酯类杀菌剂 25%噁菌酯悬浮剂,抗生素类杀菌剂 73%硫酸链霉素可湿粉、30%土霉素可湿粉、10%新多氧霉素可湿粉、4%春雷霉素可湿粉、1.5%多抗霉素可湿粉,铜制剂类 77%硫酸铜钙可湿粉,均由沈阳化工研究院提供。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌分离纯化

从内蒙古农田采集疑似甜瓜细菌性果斑病发病果实,在实验室无菌条件下,参照方中达^[9]方法进行病菌分离。用手术刀片切取病健交界部位组织,用无菌水进行表面清洗,70%酒精表面消毒 20 s,5%次氯酸钠溶液消毒 1 min,无菌水冲洗 3 次。向消毒后的组织加入少量无菌水,捣碎并充分振荡,形成菌悬液。将菌悬液倍量系列稀释,取定量菌悬液涂布于 LB 平板表面,28℃避光培养 48 h 后,选择单菌落划线培养。

将分离的不同菌株分别转移到 5 mL LB 培养液中,28℃水浴条件下振荡培养 48 h,获得菌株培养液。选择健康甜瓜果实,表面经 70%酒精擦拭后,用接种针针刺形成伤口,接种 10 μ L 菌液于伤口内,28℃避光保湿培养 72 h。选取接种点发生腐烂的甜瓜组织,重新分离纯化获得致病细菌,并将其作为后续的研究材料。

1.2.2 病原菌形态学观察和生理生化鉴定

将重新分离的病原菌接种 LB 平板,培养并观察菌落形态。参照《植物病原细菌鉴定实验指导》^[10],对病原菌进行革兰氏染色、荧光反应、V-P 测定、过氧化氢酶、氧化酶、硝酸盐还原、明胶液化、淀粉水解、柠檬酸利用、丙二酸钠盐、甲基红、3%NaCl 和 5%NaCl 溶液等理化测定。为了准确观察试验结果,以常见的枯草芽孢杆菌(*Bacil-*

lus subtilis)为对照菌株,该菌株为实验室保存。

1.2.3 病原菌 16S rDNA 序列扩增与比对

采用 CTAB 法^[11]提取病菌染色体 DNA,以提取的总 DNA 为模板,采用 16S 通用引物 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') 和 1387r (5'-GGGCGCTGTGTACAAGGC-3'),进行特定序列 PCR 扩增^[12],引物由 TaKaRa 公司合成。

PCR 反应体系(20 μ L)包括:引物各 1 μ L,模板 0.5 μ L,寡核苷酸 2 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L, *Taq* buffer 2 μ L,双蒸水 13 μ L。反应条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,进行 30 个循环;72℃延伸 10 min;4℃稳定 5 min。序列扩增后,采用 0.8%琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色检查,并应用 TaKaRa 凝胶回收试剂盒对条带进行回收与纯化。纯化后的序列与 pMD19-T 载体连接,经 *E. coil* DH5 α 转化,用 X-gal 平板筛选白色转化子菌落。重组质粒交由测序公司测序,并利用 GenBank 数据库进行菌株 16S rRNA 序列的 Blast 比对。

1.2.4 离体毒力测定

离体试验采用带菌平板法。将培养至稳定生长期的致病菌液以 1/20(V/V)加入 LB 培养基中,混合均匀,并制成带菌平板。将供试药剂配制成浓度为 2 000、1 000、500、250、125、62.50、31.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,取 3 μ L 药液点滴于带菌平板表面,置于洁净工作台内风干,28℃培养箱中避光培养 36 h。每个处理设 3 次重复,并以点滴蒸馏水作为空白对照。

根据药液点滴位置是否出现透明抑菌圈来判断其抑菌活性。如果透明抑菌圈仅局限在药液点滴部位,表明药剂对西瓜食酸菌具有一定抑菌活性。如果透明抑菌圈由液滴所在位置向外延伸,表明药剂对西瓜食酸菌具有更高的抑菌活性。

1.2.5 活体防效测定

以红萝卜作为试材,选择离体试验中具有生物活性的药剂(25%噁菌酯悬浮剂、73%硫酸链霉素可湿粉、30%土霉素可湿粉)进行活体试验。选取健康红萝卜去皮,切割成 2.0 cm \times 2.0 cm \times 0.5 cm 的薄片。将供试药剂配制成浓度为 800、400、200、100、50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,将萝卜薄片用药液浸泡 30 s,晾干,放入垫有滤纸的 ϕ 9 cm 培养

皿中,滴加 20 μL 培养至稳定生长期的西瓜食酸菌菌液于萝卜片表面,将其放入 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中避光培养 24 h,并加入适量无菌水保湿。每处理 3 次重复,同时以蒸馏水作空白对照。待空白对照的萝卜薄片腐烂面积超过 50% 后,进行试验结果调查。根据萝卜片腐烂面积进行分级调查,计算病情指数和防治效果。分级标准、病情指数和防治效果计算方法见表 1。

表 1 甜瓜细菌性果斑病病情分级标准

Table 1 Disease classification standard of bacterial fruit blotch

分级 Grade	症状描述 Symptom description
0 级	未发病
1 级	病斑面积占总面积的 5% 以下
3 级	病斑面积占总面积的 6%~10%
5 级	病斑面积占整个叶面积的 11%~25%
7 级	病斑面积占整个叶面积的 26%~50%
9 级	病斑面积占整个叶面积的 50% 以上

表 2

病原菌理化性质测定结果

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain

项目 Item	试验菌株 Test strain	对照菌株 <i>Bacillus subtilis</i>
革兰氏染色 Gram stain	—	+
荧光反应 Fluorescence reaction	—	—
V-P 测定 V-P test	—	+
过氧化氢酶 Catalase	+	+
氧化酶 Oxidase	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	+
柠檬酸利用 Utilization of citrate acid	+	+
丙二酸钠盐利用 Utilization of sodium malonate	—	—
甲基红 Methyl red	—	+
3% NaCl 溶液 3% sodium chloride solution	+	+
5% NaCl 溶液 5% sodium chloride solution	—	+

注:“+”为阳性;“—”为阴性。

Note: ‘+’ positive; ‘—’ negative.

2.2 病原菌 16S rRNA 序列比对结果

对试验菌株进行 16S rRNA 序列扩增和测定,得到 1 179 bp 的片段。经同源性比对后,其碱基序列与西瓜食酸菌(*A. citrulli*)相关菌株的相似度达到 99%。

病情指数 = $\Sigma(\text{各级发病数} \times \text{相对级数值}) / (\text{调查总数} \times \text{最高级数值}) \times 100$ 。防治效果(%) = $(\text{空白对照病情指数} - \text{药剂处理病情指数}) / \text{空白对照病情指数} \times 100$ 。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 12.0 和 Excel 2007 软件进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 病原菌形态学观察和生理生化鉴定结果

由表 2 可知,病原菌在 LB 培养基培养 48 h 后,呈圆形、直径 1~2 mm,乳白色、半透明、光滑菌落。革兰氏染色、荧光反应、V-P 测定、丙二酸钠盐、甲基红、5% NaCl 溶液反应为阴性。过氧化氢酶、氧化酶、硝酸盐还原、明胶液化、淀粉水解、柠檬酸利用、3% NaCl 溶液则呈阳性。

2.3 离体毒力测定结果

由表 3 可知,25% 啉菌酯悬浮剂对试验菌株表现出抑菌活性,在 2 000、1 000、500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下,带菌平板上可观察到透明抑菌圈。抗生素类药剂中,硫酸链霉素和土霉素对西瓜食酸菌的

表 3
Table 3
供试药剂对试验菌株的离体活性测定
In vitro bioactivity of fungicides to test strain

药剂 Reagents	浓度 Concentration/(mg · L ⁻¹)						
	2 000	1 000	500	250	125	62. 50	31. 25
嘧菌酯 Azoxystrobin	+	+	+	—	—	—	—
硫酸链霉素 Streptomycin sulfate	++	+	+	+	+	+	+
土霉素 Oxytetracycline	++	+	+	+	+	+	—
新多氧霉素 Neomycin	—	—	—	—	—	—	—
春雷霉素 Chrysanthemum	+	—	—	—	—	—	—
多抗霉素 Polycamycin	—	—	—	—	—	—	—
硫酸铜钙 Calcium sulfate	—	—	—	—	—	—	—

注：“+”代表供试药剂对试验菌株具有抑菌活性；“++”代表供试药剂对试验菌株具有高抑菌活性，即在点滴部位周围出现辐射状透明圈。
Note: ‘+’ stands for antibacterial activity; ‘++’ stands for high bacteriostatic activity, around the drip site appears radial transparent circle.

抑菌活性较高，其中硫酸链霉素在 7 个供试浓度对病原细菌均有抑菌活性。

2.4 活体防效测定结果

根据离体试验结果，选择嘧菌酯、土霉素和硫酸链霉素进行活体测定。嘧菌酯在活体条件下不

能抑制西瓜食酸菌，在各剂量下均无法抑制萝卜切片上的病原菌侵染。由表 4 可知，土霉素和硫酸链霉素对西瓜食酸菌具有一定的防治效果，在最高浓度 800 mg · L⁻¹ 时，防效达到 92. 34% 和 94. 68%，EC₉₀ 分别为 132. 32、66. 99 mg · L⁻¹。

表 4
Table 4
土霉素和硫酸链霉素对试验菌株的防效
Control effect of oxytetracycline and streptomycin sulfate on test strain

药剂 Reagents	浓度 Concentration/(mg · L ⁻¹)	防效 Control effect/%	EC ₅₀ /(mg · L ⁻¹)	相关系数 Correlation coefficient	回归方程 Regression equation
土霉素 Oxytetracycline	800	92. 34	132. 32	0. 981	$y=1. 79+1. 52x$
	400	72. 64			
	200	58. 68			
	100	40. 44			
	50	29. 84			
硫酸链霉素 Streptomycin sulfate	800	94. 68	66. 99	0. 992	$y=2. 48+1. 38x$
	400	85. 46			
	200	72. 82			
	100	56. 44			
	50	46. 29			

3 结论与讨论

甜瓜细菌性果斑病是威胁瓜类生产的重要病害，其发生地区广，危害严重，传播迅速，一旦发生即成蔓延之势，难以防治。该病害最早在美国发现，1986 年我国首次有相关报道，此后许多学者对其进行了大量的研究^[13-19]，现已明确其病原为西瓜食酸菌(*A. citrulli*)，但针对该病原物和疫情的鉴定难度仍较大，监管困难，同时也缺乏有效的防治措施和药剂。

该研究从内蒙古地区采集病果样品，将分离

得到的细菌重新接种于健康甜瓜，获得一株可以引起甜瓜软腐的菌株，其发病症状与文献描述的甜瓜细菌性果斑病的症状完全一致。结合细菌形态学观察、生理生化特性和 16S rDNA 序列扩增和比对，对病原菌进行进一步鉴定，最终确定其为西瓜食酸菌。

试验选择丙烯酸酯类、抗生素类和铜制剂类共 7 种杀菌剂，通过离体毒力测定和活体防效试验相结合的方法，对杀菌剂的抑菌能力进行了测定。离体试验中，嘧菌酯、土霉素、硫酸链霉素、春雷霉素对西瓜食酸菌都表现出抑菌活性，但在活

体试验中,仅有土霉素和硫酸链霉素表现出抑菌活性。离体试验和活体试验结果有差异,表明药剂、病原物、作物之间存在非常复杂的相互作用关系,需要深入研究。

参考文献

- [1] 商明清,张德满,杨勤民,等. 山东省瓜类细菌性果斑病的发生与防控[J]. 植物检疫,2014(3):93-96.
- [2] 赵廷昌,赵洪海,王怀松. 山东省西瓜、甜瓜发生瓜类细菌性果斑病[J]. 植物保护,2009,35(5):170-171.
- [3] 安心,孙柏欣,刘志恒,等. 辽宁省西瓜发生瓜类细菌性果斑病[J]. 中国蔬菜,2013,1(23):22-23.
- [4] 王文博,刘东,张艳菊. 黑龙江省西瓜细菌性果斑病发生初报[J]. 中国蔬菜,2013(2):82-86.
- [5] 王晓青,杨扬,赵朔,等. 我国瓜类细菌性果斑病发生现状和综合防控策略[J]. 植物检疫,2012,26(5):79-82.
- [6] 张亮,王惠林,万秀琴,等. 不同甜瓜材料苗期细菌性果斑病抗性鉴定[J]. 北方园艺,2016(9):117-120.
- [7] 彭斌,古勤生. 西瓜嗜酸菌的土壤越冬存活和致病性测定[J]. 植物保护学报,2014,41(3):381-382.
- [8] 武芳. 瓜类细菌性果斑病的生物防治研究[D]. 南京:南京农业大学,2013.
- [9] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,1998.
- [10] 赵廷昌. 植物病原细菌鉴定实验指导[M]. 3版. 北京:中国农业科学技术出版社,2011.
- [11] HOT G J, KRIEG R N, SNEATH H A P, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- [12] MARCHESI J R, SATO T, WEIGHTMAN A J, et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1998, 64(2):795-799.
- [13] 阎莎莎,王铁霖,赵廷昌,等. 瓜类细菌性果斑病研究进展[J]. 植物检疫,2011,25(3):71-76.
- [14] 谢慧婷,李战彪,秦碧霞,等. 广西甜瓜细菌性果斑病病原鉴定及 16S rDNA 序列分析[J]. 南方农业学报,2016,47(10):1698-1703.
- [15] 吴丽媛,刘宝玉,王钰杰,等. 甜瓜细菌性果斑病生防菌株 BW-6 的筛选和鉴定[J]. 植物保护,2014,40(1):43-47.
- [16] 张学军,朱文军,王登明,等. 一种新种子处理剂对瓜类细菌性果斑病的防治效果[J]. 中国瓜菜,2011,24(4):14-17.
- [17] WANG Y, ZHOU Q, LI B, et al. Differentiation in MALDI-TOF MS and FTIR spectra between two closely related species *Acidovorax oryzae* and *Acidovorax citrulli*[J]. BMC Microbiology, 2012(12):182-188.
- [18] 王爽,杨礼哲,罗丰,等. 不同药剂处理对西甜瓜细菌性果斑病的抑菌效果初探[J]. 热带农业科学,2011,31(11):45-48.
- [19] 李俊阁,王惠林,张亮,等. 种子接种果斑病菌对不同甜瓜幼苗生长的影响[J]. 北方园艺,2015(12):103-110.

Identification of Bacterial Fruit Blotch and Toxicity Test of Fungicides

LIU Dandan, LIU Chang

(Department of Environmental and Safety Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang, Liaoning 110142)

Abstract: The pathogenic bacteria were isolated and purified from the melon of Inner Mongolia. The morphological, physiological and biochemical tests and 16S rRNA sequence alignment were used to identify the pathogens. The results showed that the effects of different fungicides on pathogenic bacteria were studied by the combination of *in vitro* and *in vivo* experiments, and the virulence was evaluated comprehensively. Identification result showed that the strain was *Acidovorax citrulli*. The results showed that the virulence of different fungicides to pathogens varied greatly, and the effect of the same fungicides *in vitro* and *in vivo* was different. Two methods were needed to evaluate the bioactivity of the fungicides.

Keywords: *Acidovorax citrulli*; melon; fungicide; toxicity test; 16S rRNA; chemical prevention