

西瓜种子带菌对幼苗细菌性果斑病发生和侵染途径的影响

高玉红¹, 闫生辉¹, 邓黎黎²

(1. 郑州职业技术学院 生物工程系, 河南 郑州 450121; 2. 河南省生物工程研究中心, 河南 郑州 450000)

摘要:以西瓜品种“绿之秀”的种子为试材,采用人工接种的方法,研究了细菌性果斑病(bacterial fruit blotch, BFB)病原菌燕麦嗜酸菌西瓜亚种(*Acidovorax avenae* ssp. *citrulli*, Aac)的流行因素、种传方式及其在西瓜幼苗的定植情况,并调查了西瓜病果种子不同部位带菌情况。结果表明:发生 BFB 的西瓜病果采得的种子不完全带菌,种壳和种仁均可带菌,而且种壳带菌率明显高于种仁带菌率;接种菌液量和空气相对湿度是影响 BFB 发生的重要因素;Aac 在西瓜幼苗生长过程中先侵染幼苗子叶,随后沿叶脉侵入下胚轴,侵染过程中有一定的潜伏期,最终引起幼苗下胚轴发病,但不侵染西瓜幼苗的根部。

关键词:西瓜;种子;细菌性果斑病;种传病害;流行因素;侵染途径

中图分类号:S 436.5 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)05-0141-04

细菌性果斑病(bacterial fruit blotch, BFB)是一种种子带菌所引起的多种瓜类作物的重病害,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^[1]。Aac 主要危害植株的叶片和果实,在苗期和成株期均可发病,苗期发病引起幼苗大面积死亡;成株期发病,危害瓜类的果实,使其失去商品价值^[2]。

西瓜是我国重要的经济作物,随农业结构调整,种植面积不断扩大,呈现园区式发展。近年来,制种基地连年的种植、种子消毒不严格及检验不规范等加快了细菌性果斑病的流行发生,该病害已成为我国西瓜、甜瓜毁灭性种传病害,在新疆、海南、内蒙古、北京、山东、吉林、福建、河南等地均有发生并呈上升趋势,对西瓜产业构成重大威胁^[3-4]。目前,对西瓜细菌性果斑病的研究多集中在病原菌分离和鉴定、病原检测、综合防治等方面^[5-8],但对种子带 Aac 的传病途径及流行因素的相关报道较少。现通过细菌性果斑病病原菌对西瓜幼苗侵染过程的研究,探明种子带 Aac 引起幼苗发病的规律,以期从侵染途径上为有效防治细菌性果斑病提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试西瓜品种“绿之秀”由河南省豫艺科技发展有限公司选育。供试菌株燕麦嗜酸菌西瓜亚种(Aac)菌株 Pslb86,由中国农业科学院植物保护研究所赵廷昌研究员提供。

1.2 试验方法

1.2.1 种子带 Aac 分离 2013 年从太康县西瓜 BFB 发生较重西瓜田随机取 3 个西瓜,采种晾干。将供试种子用 75% 酒精消毒 2 min,用灭菌解剖刀切将种子剥离后检验不同部位(种仁及种壳)带菌情况。

1.2.2 Aac 菌液配制 参考 DUTTA 等^[9]的方法。将 Pslb86 株在 KBA 平板上培养后,挑取单菌落,制备成 1×10^8 cfu/mL 的悬浮母液,再用 $0.1 \times$ PBS 缓冲液将其稀释成 1×10^3 、 1×10^5 、 1×10^7 cfu/mL 的悬浮液,备用。

1.2.3 Aac 接种量与病害发生关系 参考王晓东^[10]的方法,将种子用 5% NaClO 消毒后,在 Aac 各浓度菌悬液中浸泡 1 h,清洗后在 30℃ 恒温培养箱中催芽 48 h,播种在穴盘中,置于日温为 25~30℃,夜温为 18~24℃ 的温室中进行育苗。以无菌水为对照,每个处理 50 粒种子,3 次重复。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。

1.2.4 空气湿度与病害发生关系 将消毒的种子在 1×10^5 cfu/mL Aac 菌悬液中浸泡 1 h,清洗后在 30℃ 恒温培养箱中催芽,露白后播种在穴盘中,置于日温为 25~

第一作者简介:高玉红(1979-),女,河南尉氏人,硕士,副教授,现主要从事植物病虫害的教学与研究等工作。E-mail:Gaoyuhong2008@163.com

基金项目:河南省财政专项资助项目(20137911)。

收稿日期:2015-12-14

30℃,夜温为 18~24℃ 的温室中进行育苗,并设置空气湿度为低湿 35%~45%(L),中湿 55%~65%(M),高湿 85%~95%(H) 3 个处理,每个处理 3 次重复。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。病害分级参考金岩^[11]的方法:0 级,不发病;1 级,病斑面积<5%;2 级,病斑面积 5%~20%;3 级,病斑面积 21%~40%;4 级,病斑面积 41%~60%;5 级,病斑面积>60%。病情指数=Σ(该级病叶数×该级代表值)/(调查叶片数×发病最高级数代表值)×100。

1.2.5 Aac 在西瓜幼苗中侵染观察与病菌分离 带菌种子播种后,4、6、8、10 d 观察幼苗的发病情况和发病部,并取子叶下胚轴 0~3、3~6 cm 部位和根部进行 Aac 的分离。将病组织在含有氨苄青霉素(1 mg/mL)和黄连素(20 mg/mL)的培养基上培养 48 h,统计 Aac 菌落数量。

1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 和 DPS 7.05 软件进行分析、制表。

2 结果与分析

2.1 受害植株西瓜种子带菌情况

由表 1 可知,受病害侵染的西瓜采得种子、种壳、种仁的带菌率分别为 54.6%、48.0%和 18.6%。结果表明,发生 BFB 的西瓜采得种子并不完全带菌,种壳和种仁均可带菌,而且种壳带菌率明显高于种仁。

表 1 供试西瓜种子不同部位带菌情况

Table 1 Results of Aac-carrying in different parts of watermelon seeds

部位 Part	分离总粒数 Total grain number/个	带菌粒数 Bacteria carrying number/个	带菌率 Bacteria carrying rate /%
种子 Seed	185	101	54.6
种壳 Seed shell	150	72	48.0
种仁 Seed embryo	150	28	18.6

2.2 接菌量与病害发生关系

Aac 菌株 Pslb86 不同接种量浸泡处理对西瓜幼苗 BFB 发病率及病情指数明显不同(表 2)。在菌液接种浓度为 1×10^3 、 1×10^5 cfu/mL 时,接种后第 6 天开始发病,随着浸种菌体浓度的增加,苗期发病率和病情指数均呈上升趋势,其中,第 8 天以前发病率和病情指数上升较快,第 8 天时趋于平缓。在接种后 12 d,幼苗发病率分别达到 55.3%、94.3%、98.7%,病情指数为 37.6、65.1、91.2。

表 4

种子带 Aac 对西瓜幼苗侵染过程

Table 4 The infection process of Aac in watermelon seeds

时间 Time/d	子叶 Cotyledons		下胚轴 Hypocotyls						根 Root	
			上端 0~3 cm Top 0—3 cm		下端 3~6 cm Bottom 3—6 cm					
	病原 Pathogen	症状 Symptoms	病原 Pathogen	症状 Symptoms	病原 Pathogen	症状 Symptoms	病原 Pathogen	症状 Symptoms	病原 Pathogen	症状 Symptoms
4	Y	n	N	n	N	n	N	n	N	n
6	Y	v	Y	n	N	n	N	n	N	n
8	Y	v	Y	v	N	n	N	n	N	n
10	Y	v	Y	v	Y	v	N	n	N	n

注:“Y”和“N” 分别表示分离到病原菌和未分离到病原菌;“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。

Note: ‘Y’ and ‘N’ indicated pathogens isolated and no-pathogens isolated, respectively; ‘v’ and ‘n’ indicated presence of water-soaked lesion and absence of water-soaked, respectively.

表 2 不同接菌量对西瓜苗期的发病率和病情指数的影响

Table 2 Effect of different inoculated-pathogen quantities on incidence and index in watermelon seedling stage

时间 Time/d	发病率 Incidence of BFB/%			病情指数 Disease index		
	1×10^3 cfu/mL	1×10^5 cfu/mL	1×10^7 cfu/mL	1×10^3 cfu/mL	1×10^5 cfu/mL	1×10^7 cfu/mL
4	0.0	0.0	31.2	0.0	0.0	10.0
6	2.4	21.6	58.7	1.4	11.3	37.8
8	41.7	78.9	92.4	24.7	52.2	80.6
10	44.6	82.3	94.6	28.4	60.8	86.9
12	55.3	94.3	98.7	37.6	65.1	91.2

2.3 空气相对湿度与病害发生关系

在接菌量相同的条件下,不同空气相对湿度对幼苗发生 BFB 的发生有明显影响。由表 3 可知,低湿条件下,4~10 d,幼苗均不发病,接种后 12 d,幼苗的发病率和病情指数分别为 5.3%和 3.6。在中湿、高湿度条件下,苗期发病率和病情指数均呈上升趋势,其中,4~10 d 时上升速度较慢,10~12 d 时上升较快。播种后 12 d,中湿度处理幼苗发病率达到 43.7%,病情指数为 37.3;高湿度处理幼苗发病率可达到 78.7%,病情指数为 59.8。结果表明,空气相对湿度也是影响西瓜幼苗发病的重要因素,在实际生产中,可通过降低空气相对湿度预防西瓜 BFB 的发生。

2.4 种传细菌性果斑病的侵染过程

由表 4 可知,接种后 4 d,子叶开始出现水渍状病斑,并可分离到 Aac,下胚轴健康且未分离到 Aac。随幼苗生长至接种后 6 d,子叶出现典型水渍状病斑,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;生长至第 8 天,下胚轴距子叶 0~3 cm 部分出现水

表 3 空气相对湿度对西瓜苗期的发病率和病情指数的影响

Table 3 Effect of relative air humidity on disease incidence and index in watermelon seedling stage

时间 Time/d	发病率 Incidence of BFB/%			病情指数 Disease index		
	L	M	H	L	M	H
4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6	0.0	12.8	27.6	0.0	5.7	8.4
8	0.0	21.2	30.8	0.0	14.7	18.6
10	0.0	32.8	44.4	0.0	22.5	29.7
12	5.3	43.7	78.7	3.6	37.3	59.8

渍状病斑,并可也分离到 Aac,但下胚轴距子叶 3~6 cm 未出现病斑,也为分离到 Aac;生长至第 10 天,下胚轴距子叶 3~6 cm 开始出现病斑,且能分离到 Aac;在幼苗生长 10 d 内,根部均未出现症状,也未分离到 Aac。

3 结论与讨论

细菌性果斑病在田间可为害西瓜的果实、叶片和嫩茎,引起叶片萎蔫和果实腐烂,同时导致种子带菌。该研究结果显示,受病害侵染的西瓜采得种子并不完全带菌,这与廖富荣等^[12]的研究结果相似,从病果上收集的种子,其幼苗的发病率为 7%~100%;通过对种壳和种仁病原菌分离,种壳和种仁均可带菌,种壳带菌率明显高于种仁带菌率,表明西瓜细菌性果斑病菌可以附着在种子表面或侵入种子胚乳内,种壳是该病原菌侵染的主要部位,这与赵廷昌等^[13]的研究结果相同。种仁的带菌率可能与采种西瓜植株的受害程度有一定的相关性,但二者之间的具体函数关系还有待于进一步研究。

接种体的数量是病原物能够侵入成功的因素之一^[14]。该试验对不同接种浓度与幼苗发病情况进行了研究,结果表明,不同浓度的 Aac 菌株 Pslb86 接种处理均可使幼苗发生 BFB。随着浸种菌体浓度的增加,发病率和病情指数均呈上升趋势,且前期发病率和病情指数上升较快,后期趋于缓慢。黄俊霞^[15]的研究认为,种子带菌率与幼苗的发病率具有明显的线性关系,这与该研究结果略有不同,可能与接菌量与种子实际带菌率有一定差异所致。因此,还需进一步加大接菌量与种子带菌率关系的量化研究,为用田间发病情况来评估种子带菌率检测结果提供依据。同时,这一研究结果也表明种子带菌量可作为 BFB 流行发生的一个重要因素,对种子进行严格消毒处理在实际生产中是十分必要的。

任何病害的发生都需要有一定的环境条件。该试验在不同相对空气湿度条件下,探讨了 Aac 菌株 Pslb86 浸种对西瓜幼苗发生 BFB 的影响。结果表明,低相对湿度条件下,西瓜幼苗表现为轻微发病或不发病。高湿度条件加速 BFB 的流行发生。因此,在西瓜育苗过程中,可通过降低空气相对湿度控制 BFB 病害的发生。但该病害的流行发生是多种环境因素综合作用的结果,该研究仅对空气相对湿度对该病害发生的影响进行了研究,具有一定的局限性,还需进一步开展多种环境条件对该病害交互制约作用,以为田间西瓜细菌性果斑病物理防治打下基础。

该试验通过对 Aac 西瓜幼苗不同部位危害症状观

察和病原菌进行分离,发现 Aac 首先侵染幼苗子叶,并迅速表现症状;随着幼苗的生长,病菌向下胚轴侵染,病原菌侵染下胚轴后,有一定的潜伏期,在适宜的环境条件下,可使下胚轴发病,并沿下胚轴发展。这与高天一等^[16]利用砧木带菌对西瓜幼苗侵染过程的研究结果相同。但该试验过程中未见病原菌侵染幼苗根部,这可能与幼苗生长的时间较短,或西瓜幼苗根部对 Aac 病原免疫有关,但其具体原因还有待进一步研究。该研究采用西瓜幼苗不同部位病害的症状观察和病原菌分离来探讨病原菌的侵染过程,试验结果的精确度不高,建议利用 PCR 和 GFP 标记技术进一步精确定位在植株病组织内定殖位点。

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] 赵仁君,周志成,冯孝立,等. 瓜类细菌性果斑病的防治与健康种子生产[J]. 中国蔬菜, 2008(1): 38-39.
- [3] 党选民,李建国,曹振木,等. 海南省西瓜生产现状及发展对策[J]. 中国瓜菜, 2005(5): 51-52.
- [4] 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.
- [5] 高天一,杨龙,张静,等. 湖北省西瓜细菌性果斑病原鉴定[C]. 中国植物病理学会 2011 年学术论文集, 2011.
- [6] 回文广,赵廷昌, SCHAAD N W, 等. 哈密瓜细菌性果斑病菌快速检测方法的建立[J]. 中国农业科学, 2007, 40(11): 2495-2501.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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, 2009.
- [11] 金岩. 西瓜细菌性果斑病研究[D]. 长春:吉林农业大学, 2003.
- [12] 廖富荣,林石明,方志鹏,等. 进境西瓜种子中西瓜细菌性果斑病菌的检测鉴定[J]. 植物保护, 2010, 36(6): 135-138.
- [13] 赵廷昌,回文广,王建荣,等. 哈密瓜细菌性果斑病种子带菌检测方法的研究[C]. 中国植物病理学会 2005 年学术年会暨植物病理学报创刊 50 周年纪念会论文集, 2005.
- [14] 谢联辉. 普通植物病理学[M]. 北京:中国科学技术出版社, 2003.
- [15] 黄俊霞. 内蒙古地区哈密瓜细菌性果斑病发病规律的初步研究[D]. 北京:中国农业大学, 2009.
- [16] 高天一,潘宏,别之龙,等. 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[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(5): 36-39.

Effect of Watermelon Seeds Pathogen on Occurrence and Infection Pathway of Bacterial Fruit Blotch Disease

GAO Yuhong¹, YAN Shenghui¹, DENG Lili²

(1. Department of Biological Engineering, Zhengzhou Vocational Technology College, Zhengzhou, Henan 450121; 2. Henan Bio-engineering Research Center, Zhengzhou, Henan 450000)

百合鳞茎青霉病防治药剂筛选

杨迎东¹, 冯秀丽¹, 王伟东¹, 胡新颖¹, 白一光¹, 明军²

(1. 辽宁省农业科学院 花卉研究所, 辽宁 沈阳 110161; 2. 中国农业科学院 蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘 要:以易感病的切花百合品种“西伯利亚”鳞茎为试材, 采用单因素随机试验方法, 研究了 30% 醚菌酯水剂(0.67 g/L)、8.5% 高锰酸钾水剂(1.33 g/L)、50% 咪鲜胺锰盐粉剂(0.67 g/L)、25% 咪鲜胺粉剂(1.00 g/L)、25% 噻菌酯水剂(0.67 g/L)、99.9% 高锰酸钾(0.33 g/L)、25% 甲霜·霜霉威粉剂(1.67 g/L)等 7 种药剂对百合鳞茎青霉病的防治效果。结果表明:50% 咪鲜胺锰盐粉剂 0.67 g/L 溶液浸泡鳞茎 20 min, 百合鳞茎的感病率、病情指数最低, 防治有效率达 61.40%, 健康根系数量最多, 与其它处理差异极显著;25% 咪鲜胺粉剂 1.00 g/L 溶液处理在感病率、相对防治效果等 2 项指标与其它处理差异极显著, 防治效果仅次于 50% 咪鲜胺锰盐粉剂 0.67 g/L 溶液处理。其余 5 种药剂处理虽然个别指标与对照差异显著, 但综合防治效果不理想。因此, 选用 50% 咪鲜胺锰盐粉剂(0.67 g/L)溶液在百合冷藏前进行浸泡处理, 对百合鳞茎青霉病防治效果最好。

关键词:百合; 鳞茎; 青霉病; 药剂防治

中图分类号:S 436.8⁺1 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)05-0144-04

百合(*Lilium* spp.)属百合科百合属多年生球根植物, 其花型美观、香味浓郁, 素有“云裳仙子”之称, 作为鲜切花深受世界各国消费者喜爱。农业部 2013 年数据显示, 2011 年我国百合种植面积约 8 000 hm², 产值超过 50 亿元人民币, 百合已成为中国产值最高的鲜切花卉。

鳞茎贮藏是百合生产中的重要环节, 青霉病是百合鳞茎贮藏期间的重要病害。该病主要危害储存库内的鳞茎, 病原菌通过鳞茎组织上的伤口侵入, 在百合鳞片上产生褐色下陷的病斑, 周围黑色, 病健部有明显分界。低温贮藏期腐烂缓慢, 在腐烂的鳞片上, 孢子成团

状时, 呈典型的青绿色, 内部鳞片逐渐腐烂, 最后引起鳞茎干腐。病菌最终侵入鳞茎的基盘, 使鳞茎失去价值或使植株生长迟缓, 严重时引起整批鳞茎腐烂, 造成巨大的经济损失^[1-2]。据统计, 百合鳞茎在贮藏期间青霉病平均感染率在 50% 以上, 严重的达到 100%。如何有效防治鳞茎青霉腐烂病已经成为百合切花生产的重要技术问题。百合鳞茎在贮藏过程中极易受病菌侵染造成腐烂变质。贮藏期主要病害有百合青霉腐烂病 *Penicillium cyclopium* P. Mrymbifenun、百合炭疽病 *Colletotrichum lilincearum*、百合镰刀菌枯萎病 *Fusarium azysporum* F. Solani 和黑根霉软腐病 *Rhizopus nigeicans*^[3]。百合鳞茎青霉病主要由圆弧青霉(*Penicillium cyclopium* West.)和簇状青霉(*P. corymbiferum* West.)引起, 病原菌为半知菌亚门, 丝胞目, 青霉属真菌^[4-5]。尚巧霞等^[6]对百合鳞茎腐烂病病原菌进行分离鉴定, 认为

第一作者简介:杨迎东(1973-), 男, 硕士, 副研究员, 现主要从事球宿根花卉鲜切花栽培和种球繁育等研究工作。E-mail: yangyingdong2011@163.com.

基金项目:辽宁省农村科技特派团资助项目(2014215031)。

收稿日期:2015-12-14

Abstract: Taking the seeds of ‘Lyu Zhi Xiu’ as materials, using artificial inoculation method, the epidemic factors, seed transmission pattern, colonization in watermelon seedlings of Aac (*Acidovorax avenae* ssp. *citruli*) from BFB (bacterial fruit blotch) were researched and the infection in different parts of seeds was investigated. The results showed that not all of the seeds from diseased watermelon had Aac, and both seed shell and seed embryo carried Aac, Aac-carrying rate of the shell was obviously higher than that of embryo. Both inoculated-pathogen quantities and relative air humidity were the important factors effecting occurrence of bacterial fruit blotch disease, and the Aac infected the cotyledons firstly, then infected the hypocotyls, in the process of which there was the latency of Aac, in the end caused the disease of the hypocotyls, but the Aac didn’t infect the root of watermelon seedlings.

Keywords: watermelon; seed; bacterial fruit blotch disease; seed-borne disease; epidemic factors; infection pathway