



瓠瓜果斑病症状及其病原菌的鉴定

罗 群¹ 李艳敏² 林 钗³ 孙 超⁴ 高其康⁴ 楼兵干^{1*}

(1. 浙江大学生物技术研究所, 农业农村部作物病虫分子生物学重点实验室, 杭州 310058; 2. 浙江省植保检疫与农药管理总站, 杭州 310020; 3. 浙江省农业教育培训中心, 杭州 310029; 4. 浙江大学农生环测试中心, 杭州 310058)

摘要: 为有效防控瓠瓜果斑病, 自浙江省象山县田间采集具有典型果斑病症状的瓠瓜样本, 对其进行病原菌分离、形态观察、致病性测定及分子生物学鉴定, 并利用特异性引物 PL1/PL2 PCR 扩增和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 技术对其病原菌进行亚群鉴定。结果表明: 瓠瓜果斑病田间典型症状是发病叶片和果实上病斑由水渍状小斑点逐渐发展为伴有黄色晕圈的褐色不规则病斑, 果实腐烂、有臭味。通过菌体形态和培养特性观察、PCR 鉴定、16S rDNA 序列分析和 7 个看家基因的系统发育分析将其病原菌鉴定为西瓜噬酸菌 *Acidovorax citrulli*。从瓠瓜上分离的菌株均属于西瓜噬酸菌亚群 I, 从西瓜上分离的菌株均属于西瓜噬酸菌亚群 II。

关键词: 瓠瓜; 西瓜噬酸菌; 16S rDNA; 看家基因; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

Symptoms of fruit blotch in bottle gourd and identification of its pathogen

Luo Qun¹ Li Yanmin² Lin Chai³ Sun Chao⁴ Gao Qikang⁴ Lou Binggan^{1*}

(1. Key Laboratory of Molecular Biology of Crop Pathogens and Insects, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China; 2. Zhejiang General Station of Plant Protection Quarantine and Agrochemicals Management, Hangzhou 310020, Zhejiang Province, China; 3. Zhejiang Agricultural Education & Training Center, Hangzhou 310029, Zhejiang Province, China; 4. Analysis Center of Agrobiological and Environmental Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China)

Abstract: Aiming to effectively prevent and control fruit blotch of bottle gourd (*Lagenaria siceraria*), samples of bottle gourd with typical symptoms of fruit blotch were collected from fields in Xiangshan County, Zhejiang Province, pathogen was isolated from these samples, and then morphological observation, pathogenicity test and molecular biological identification were carried out. The group of pathogens were also identified via PCR amplification with specific primers PL1/PL2 and matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) technology. The results showed that the typical symptoms of the disease included spots on the infected leaves and fruits, which gradually developed from small water-like spots into brown irregular spots with yellow halos, and caused the fruit to rot and smell bad. Bacterial morphology, culture characteristics, PCR identification, 16S rDNA sequencing and phylogenetic analysis based on seven housekeeping genes confirmed that the pathogen was *Acidovorax citrulli*. All the strains isolated from bottle gourd were *A. citrulli* group I while those from watermelon belonged to *A. citrulli* group II.

Key words: bottle gourd; *Acidovorax citrulli*; 16S rDNA; housekeeping gene; MALDI-TOF-MS

基金项目: 浙江省“三农六方”农业科技协作项目(CTZB-F160728AWZ-SNY1-3), 杭州市重点科技发展计划(20172015A09)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: bglou@zju.edu.cn

收稿日期: 2020-06-06

瓠瓜 *Lagenaria siceraria* 是长江以南夏季主要蔬菜之一。2018年秋季,浙江省瓠瓜果斑病普查时发现象山县蔬菜种植基地的瓠瓜发生果斑病,病株果实、叶片均被感染,果肉呈水渍状褐色腐烂,株发病率达50%以上,给瓜农造成严重经济损失。瓠瓜果斑病是一种毁灭性的种传细菌病害,其病原菌为西瓜噬酸菌 *Acidovorax citrulli* (Schaad et al., 2008), 严重危害西瓜、甜瓜和哈密瓜等葫芦科作物(赵廷昌等, 2001a)。该病最早在美国被发现,于1998年首次在我国海南省西瓜种植区发生(张荣意等, 1998), 随后在国内逐步扩散且逐年加重。目前,我国新疆、辽宁和安徽等多个省(区)的西瓜、甜瓜、哈密瓜和南瓜等作物上已发生细菌性果斑病(赵廷昌等, 2001b; Tian et al., 2013; 于海博等, 2019)。不同病原菌的防控措施不同,因此,明确瓠瓜果斑病病原菌对其防控至关重要。

目前,常采用菌落形态与培养性状观察、革兰氏染色、生理生化反应及致病性测定等常规鉴定方法对瓠瓜细菌性果斑病病原菌种属进行鉴定。随着分子生物学技术的发展,特异性引物 SEQID4^m/SEQ-ID5 (Schaad et al., 1999)、BX-L1/BX-S-R2 (Bahar et al., 2008) 以及基于多基因序列的多位点序列分析 (multilocus sequence analysis, MLSA) 技术(沈肖玲等, 2018) 被用于果斑病病原菌的鉴定。Yan et al. (2013) 利用脉冲场凝胶电泳 (pulse field gel electrophoresis, PFGE) 和多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST) 技术将 118 株西瓜噬酸菌主要分为亚群 I 和亚群 II, 亚群 I 主要分离自甜瓜, 亚群 II 主要分离自西瓜。Zhong et al. (2016) 基于亚群 II 菌株 AAC00-1 的 *pilL* 基因序列设计了 1 对 PCR 特异性引物 PL1/PL2, 该引物特异性较好, 能快速区分出西瓜噬酸菌亚群 I 和亚群 II 菌株。近年来, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 (matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 被成功用于病原微生物的鉴定与分型中, 为不同亚群菌株的区分提供了一种新方法。每种微生物都有其独特的蛋白质特征指纹图谱, MALDI-TOF-MS 是一种基于蛋白质特征指纹图谱的软电离质谱, 其将微生物的质谱与专用数据库的标准谱图进行匹配, 进而实现快速鉴定(赵苏瑛和李岷, 2013)。该技术目前在果斑病菌的鉴定上应用较少。此外, 亚群 I 菌株对多种杀菌剂的敏感性显著低于亚群 II 菌株(王雪等, 2012), 因此, 对果斑病菌亚群的鉴定是有效防控该病害的前提。

为保障浙江省瓠瓜产业持续健康发展, 本研究自浙江省象山县瓠瓜果斑病病株上取样, 对其病原菌进行分离、致病性测定、菌体形态和培养特性观察、特异性引物 PCR 鉴定、16S rDNA 序列分析和 7 个看家基因的系统发育分析, 并采用特异性引物 PL1/PL2 PCR 扩增和 MALDI-TOF-MS 技术对其病原菌进行亚群鉴定, 以明确该病的发病症状及其病原菌种类, 以期为田间瓠瓜果斑病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株和植物: 菌株 QT0801、QT0806、QT0808、QT0812 和 QT0815 自浙江省青田县瓠瓜果斑病病株上分离, 经系统鉴定均为西瓜噬酸菌; 西瓜噬酸菌菌株 xj112 由南京农业大学胡白石教授馈赠; 西瓜噬酸菌菌株 pslb116 和 tw21 由中国农业科学院赵廷昌教授馈赠。极早生瓠瓜种子, 自浙江省蔬菜种子公司购买; 本氏烟种子, 由本实验室留种保存, 将其培养至 4~6 叶期供试; 马铃薯和瓠瓜果实在杭州市菜市场购买。

LB (Luria-Bertani) 培养基: 胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、氯化钠 10 g、琼脂粉 15 g、蒸馏水 1 L, pH 7.0~7.2。

试剂和仪器: 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; Green Taq Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。XP Cyclor 基因扩增仪, 杭州博日科技有限公司; SPX-358 型智能生化培养箱, 宁波江南仪器厂制造; EB-28BI 光学显微镜, 厦门麦克奥迪光学仪器有限公司; ChemiDoc MP 凝胶成像系统和 PowerPac Basic 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; UltrafleXtreme 型质谱仪, 美国布鲁克·道尔顿公司; Hitachi H-7650 型透射电镜, 日本日立公司。

1.2 方法

1.2.1 瓠瓜果斑病症状的田间观察

2018年9—10月对浙江省象山县大徐镇大磊头村瓠瓜基地的发病瓠瓜植株进行观察, 观察幼叶、成熟叶和果实的果斑病症状并拍照记录, 取叶片病健交界处组织带回实验室, 于光学显微镜下观察。

1.2.2 样品采集和病原菌分离纯化

2018年9月自浙江省象山县大徐镇大磊头村蔬菜基地采集具有疑似瓠瓜果斑病症状的瓠瓜叶片、果实样本各 20 份, 装入干净采样袋带回实验室分离。采用平板划线分离法在 LB 培养基上对采集的

疑似样本进行分离,置于28℃生化培养箱于黑暗条件下培养48 h,待单菌落长出,挑取单菌落分别纯化,并于4℃保存备用。

1.2.3 分离菌株的致病性测定

将经检测无果斑病菌的极早生瓠瓜种子用1%次氯酸钠表面消毒15 min,无菌水冲洗后晾干。进口泥炭混合蛭石、珍珠岩和土按照4:2:1质量比混匀,混匀后作为幼苗基质放入消毒的50孔育苗穴盘中,每穴播种1粒种子,播50穴,共3次重复,将育苗穴盘置于浙江大学生物技术研究所植物生长室中,温度为25~28℃,相对湿度70%以上,播前浇足水,播后每3 d浇1次,待真叶长到4~6叶时接种。将1.2.2分离菌株和菌株QT0801分别制成浓度为 1×10^8 CFU/mL的菌悬液,采用喷雾法将其分别接种到瓠瓜叶片和离体果实上,置于25~28℃植物生长室中,套袋保湿,分别于接种48 h和72 h后观察叶片和果实的发病症状。同时,将瓠瓜上分离得到的菌株XS0901和西瓜上分离得到的菌株QT0801分别同时接种到瓠瓜幼苗上,以比较来自不同寄主的菌株对同一寄主的致病性,15 d后调查瓠瓜叶片的发病情况并计算病情指数(符启位等,2017)。病级划分标准:0级,叶片无病斑;1级,病斑较少,病斑面积占整叶面积5%以下;3级,病斑较多,病斑面积占整叶面积5%~30%;5级,病斑开始融合,病斑面积占整叶面积30%~50%;7级,病斑很多或融合成大斑,病斑面积占整叶面积50%以上,叶片未焦枯死亡;9级,病斑大面积融合,病斑面积占整个面积50%以上,叶片常焦枯死亡。病情指数= Σ (各级病叶数 \times 该级代表值)/(调查总叶数 \times 发病最高级代表值) \times 100。取接种后瓠瓜叶片和果实病健交界处大小为5 mm \times 5 mm的组织再次分离病原菌。挑选经分离纯化和致病性验证的代表菌株用于后续病原菌鉴定。

1.2.4 瓠瓜果斑病菌的生理特性测定

烟草过敏反应测定:将1.2.3代表菌株分别制成浓度为 1×10^8 CFU/mL的菌悬液,采用浸润法将其接种至4~6叶期的本氏烟叶片背面,置于28℃植物生长室中培养,24 h后观察过敏反应。

马铃薯腐败试验:选取新鲜干净、无病的马铃薯消毒后切成大小为5 cm \times 5 cm、厚度约0.5 cm的薯片,将浓度为 1×10^8 CFU/mL的代表菌株的菌悬液分别涂抹至马铃薯切片上,覆上保鲜膜,置于28℃生化培养箱内保湿培养,24 h后观察发病情况。

形态特征观察:挑取1.2.3代表菌株单菌落于LB培养基上划线,置于28℃生化培养箱中暗培养

48 h后,观察单菌落的形态特征,并于透射电镜下观察病原菌菌体大小和鞭毛形态并拍照。采用革兰氏鉴别染色法对病原菌进行染色观察。

1.2.5 瓠瓜果斑病菌的PCR扩增鉴定

取1.2.3所有代表菌株和阳性对照菌株QT0801,将单菌落置于10 μ L无菌水中混匀,制成菌液。参考Schaad et al.(1999)、Bahar et al.(2008)和瓜类果斑病检疫鉴定方法(GB/T 36822—2018)选用SEQID4^m/SEQID5和BX-L1/BX-S-R2两对特异性引物进行PCR扩增,引物序列如表1所示。20 μ L PCR反应体系:Green Taq Mix 10 μ L、dd H₂O 8 μ L、10 μ mol/L上下游引物各0.5 μ L、菌液模板1 μ L。引物SEQID4^m/SEQID5 PCR反应程序:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,53℃退火30 s,72℃延伸30 s,35个循环;72℃再延伸5 min。引物BX-L1/BX-S-R2 PCR反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,68.1℃退火30 s,72℃延伸30 s,35个循环;72℃再延伸8 min。取6 μ L PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶进行电泳检测,于凝胶成像系统拍照,扩增产物送杭州擎科生物科技有限公司测序,将测序结果利用NCBI官网的BLAST在线工具进行比对分析。引物合成与扩增产物测序均送至杭州擎科生物科技有限公司。

1.2.6 瓠瓜果斑病菌16S rDNA序列分析

采用16S rDNA通用引物27F/1492R对1.2.3代表菌株、阴性对照菌株QT0801、QT0806、QT0808、QT0812和QT0815以及西瓜噬酸菌菌株xj112、pslb116和tw21的16S rDNA序列进行PCR扩增,引物序列如表1所示。扩增反应体系同1.2.5。扩增反应程序:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,32个循环;72℃再延伸5 min。经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后测序。所获得的序列通过BLAST与GenBank数据库中已知核酸序列进行同源性对比。在GenBank中下载噬酸菌属中代表种及相关果斑病菌菌株的16S rDNA序列,采用MEGA 6.0软件通过邻接法构建系统发育树,重复次数为1 000(聂峰杰等,2019)。

1.2.7 7个看家基因的多重序列系统发育分析

所有菌株同1.2.6。利用*spi*、*adk*、*pilT*、*ugpB*、*glnA*、*glyA*和*gltA*七个看家基因所对应的引物分别对菌株进行PCR扩增,引物序列如表1所示。PCR反应体系及程序同1.2.6。经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后测序。将测序结果利用NCBI官网的BLAST在线工具进行同源性比对,将测序所获得的序列分别基于7个基因位点利用MEGA 6.0软件采用邻接

法构建系统发育树,1 000次重复。同时,利用DNA-MAN 5.0软件进行多序列比对,用SequenceMatrix 1.7.8软件联合7个基因位点序列(沈肖玲等,2018)

基于多重序列采用邻接法构建系统发育树,1 000次重复。

表1 本研究所用引物序列
Table 1 Primers used in this study

扩增基因 Amplified gene	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	PCR扩增产物长度 PCR amplification product length/bp
16S-23S ITS	SEQID4 ^m	5'-GTCATTACTGAATTTCAACA-3'	246
	SEQID5	5'-CCTCCACCAACCAATACGCT-3'	
Specific Box-PCR product	BX-L1	5'-CAGCTGGGAGCGATCTTCAT-3'	279
	BX-S-R2	5'-GCGTCAGGAGGGTGAGTAGCA-3'	
16S rDNA	27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	1 397
	1492R	5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	
<i>spi</i>	<i>spi1</i>	5'-GGGCATCGCCAAGGTGGA-3'	441
	<i>spi2</i>	5'-CGCCCAGATGCTCGTCGTA-3'	
<i>adk</i>	<i>adk1</i>	5'-GTTGGCCGATCGTTCT-3'	467
	<i>adk2</i>	5'-TCCGCAGATCTCCACCG-3'	
<i>pilT</i>	<i>pilT1</i>	5'-GAGTACATCTGCGCCACCTT-3'	438
	<i>pilT2</i>	5'-GAATACGGGCACATCCTGAC-3'	
<i>ugpB</i>	<i>ugpB1</i>	5'-TGAAGGAAATCTCGTCTGTC-3'	480
	<i>ugpB2</i>	5'-CTTGACGTCGTTGCTGAAGA-3'	
<i>glnA</i>	<i>glnA1</i>	5'-CCGTGGCCTGGTGTTTCAT-3'	470
	<i>glnA2</i>	5'-GGAGTCAGGGAAACGCTTGTG-3'	
<i>glyA</i>	<i>glyA1</i>	5'-AACCAAGCCGATCCCGAAGT-3'	546
	<i>glyA2</i>	5'-GGCGATGTCCACCCAGAAG-3'	
<i>gltA</i>	<i>gltA1</i>	5'-GAAGTCCACGTTCGGGTAGA-3'	520
	<i>gltA2</i>	5'-TACATGTACCCGCAGAACCA-3'	
<i>pilL</i>	PL1	5'-GTCCGAGCGTACGTTGAG-3'	332
	PL2	5'-ACGGCACCTGACCCGTTG-3'	

1.2.8 基于特异性引物PL1/PL2的亚群鉴定

所用菌株同1.2.6。参照Zhong et al.(2016)设计的PCR特异性引物PL1/PL2对菌株进行西瓜噬酸菌亚群鉴定,引物序列如表1所示。能扩增出大小为332 bp特异性目的条带的菌株是西瓜噬酸菌亚群II,若不能扩增出特异性目的条带的菌株则为亚群I。PCR反应体系同1.2.5。PCR反应程序:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,25个循环;72℃再延伸10 min。

1.2.9 基于MALDI-TOF-MS技术的亚群鉴定

所用菌株同1.2.6。参照钱扬会等(2019)使用MALDI-TOF-MS技术对菌株进行鉴定。将各菌株在LB培养基上于28℃生化培养箱中暗培养48 h,挑取单菌落直接涂抹到质谱专用靶板上,吸取肉桂酸基质溶液1 μL覆盖样本,自然晾干后,放入UltrafleXtreme型质谱仪中进行检测。利用Bruker MALDI Biotyper数据库中已有西瓜噬酸菌亚群I和亚群II菌株相关信息对所测菌株进行数据库匹配鉴定。当2.300≤分值<3.000时,完全可靠地鉴定到种,当2.000≤分值<2.3000时,鉴定到种,当分值当1.700≤分值<2.000时,鉴定到属,当0.000≤分值<1.700时,

鉴定结果不可用。

2 结果与分析

2.1 瓠瓜果斑病的田间症状

瓠瓜果斑病在瓠瓜苗期、生长期及挂果期均可发生,能危害子叶、真叶和果实。受害瓠瓜子叶病斑通常呈水渍状,暗棕色,周围伴有黄色晕圈,沿叶脉逐渐发展为黑褐色坏死病斑,随着病情的发展,子叶逐渐腐烂而死,随后感染真叶;受害瓠瓜真叶有水渍状病斑,后期伴有黄色晕圈,并逐渐沿叶脉发展为棕褐色、不规则、中型至大型病斑,发病后期逐渐干枯;受害瓠瓜果实发病初期产生水渍状的圆形小斑点,后期发展为圆形或卵圆形、略凹陷病斑,呈暗绿色水渍状并伴有淡黄色晕圈(图1-A),有时几个病斑融合在一起,水渍状病斑更加明显,病健交界处组织于光学显微镜下可见喷菌现象,湿度大时常溢出黏稠的琥珀色菌脓,从而再侵染;在病斑处切开果实,果肉呈水渍状褐色腐烂,并伴有一股刺鼻的酸臭味。

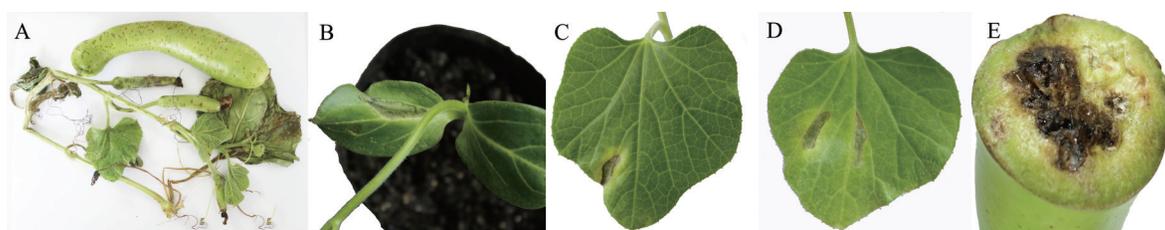
2.2 瓠瓜果斑病菌的致病性

采用喷雾法将各菌株菌悬液分别接种到瓠瓜子叶、真叶和果实表面,接种48 h后,在瓠瓜子叶叶脉

附近(图1-B)、真叶叶缘(图1-C)和真叶叶脉间(图1-D)出现水渍状病斑,果皮上有呈水渍状、针尖大小的褐点斑;接种72 h后,子叶和真叶表面病斑均出现浅黄色晕圈,果实表面病斑处分泌琥珀色菌脓(图1-E),切开果实后,果肉变褐腐烂伴有酸臭味。同时,将自瓠瓜和西瓜上分离到的菌株分别接种到瓠瓜幼苗上,接种72 h后,两者的病情指数分别为77.04和55.56。表明来自不同寄主的菌株对瓠瓜的致病性存在差异,自瓠瓜上分离的菌株XS0901对瓠瓜的致病性强于自西瓜上分离的菌株QT0801。致病性测定结果表明,在条件适宜时病原菌从侵入

到出现症状不超过4 d,均出现与田间自然发病一致的症状,从病健交界处分离到与接种菌株一致的病原菌。

基于致病性测定结果,自田间发病的瓠瓜植株上共分离纯化得到20株菌株,其中菌株XS0901~XS0908自瓠瓜叶片中分离得到,菌株XS0909~XS0920自瓠瓜果实中分离得到,取XS0901、XS0902、XS0904、XS0906、XS0907、XS0908、XS0910、XS0912、XS0913、XS0915、XS0918和XS0920这12株菌进行后续试验。



A: 瓠瓜果斑病田间症状; B: 瓠瓜子叶从叶脉间发病; C: 瓠瓜真叶从叶缘发病; D: 瓠瓜真叶从叶脉间发病; E: 瓠瓜果实发病症状。A: Symptoms of fruit blotch of bottle gourd in the field; B: symptoms start from leaf veins of cotyledons; C: symptoms start from leaf margins of true leaves; D: symptoms start from leaf veins of true leaves; E: symptoms on bottle gourd fruit.

图1 瓠瓜果斑病的田间症状及致病性测定结果

Fig. 1 Symptoms of fruit blotch on bottle gourd in the field and pathogenicity results

2.3 瓠瓜果斑病原菌的生理特性

将12株代表菌株接种到健康本氏烟叶片背面24 h后,烟草叶片接种部位均出现过敏性枯斑反应,并伴有浅黄色晕圈(图2)。



图2 烟草叶片接种12株代表菌株24 h后表现出典型的过敏反应

Fig. 2 Tobacco leaf showing typical hypersensitive response 24 h after inoculation with 12 representative strains

12株代表菌株菌悬液涂抹至健康马铃薯切片横切面上24 h后,马铃薯切片未发生变色腐败。在LB培养基上,12株代表菌株的菌落形态特征一致;培养24 h后,菌落对光呈透明且有光泽的针状小点,培养48 h后,菌落呈圆形,乳白色,表面凸起,边缘光

滑整齐,菌落直径大小约1~2 mm(图3-A)。革兰氏染色呈阴性反应,菌体短杆状,大小约为 $2.20\ \mu\text{m} \times 0.86\ \mu\text{m}$,有1根极生鞭毛,鞭毛长4.0~5.0 μm (图3-B)。

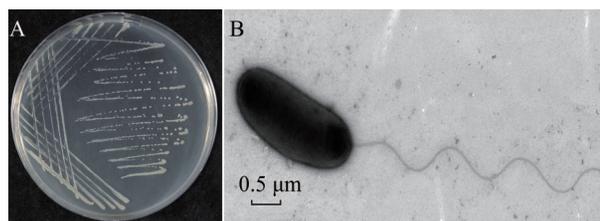


图3 XS0901菌株在LB培养基上培养3 d后的单菌落(A)及透射电镜下鞭毛形态(B)

Fig. 3 Single colony of XS0901 strain cultured on LB medium for three days (A) and the flagella morphology under transmission electron microscope (B)

2.4 两对特异性引物PCR扩增鉴定结果

12株代表菌株和菌株QT0801经瓜类果斑病特异性引物SEQID4^m/SEQID5和BX-L1/BX-S-R2PCR扩增后,分别获得长度为246 bp和279 bp的2个目标片段。通过BLAST比对,这13株菌株与多株西瓜噬酸菌AAC00-1(GenBank登录号为CP000512.1)的序列同源性为100.00%,说明引起瓠瓜果斑病的

病原菌为西瓜噬酸菌 *A. citrullii*。

2.5 瓠瓜果斑病菌 16S rDNA 序列分析

20 株供试菌株经 16S rDNA 通用引物 27F/1492R PCR 扩增后, 均获得了长度为 1 397 bp 的目标片段。同源性比对结果显示, 这 20 株供试菌株与已报道的西瓜噬酸菌各菌株 16S rDNA 的同源性均达 99% 以上。其中菌株 XS0901、XS0902、XS0904、XS0906、XS0907、XS0908、XS0910、XS0912、XS0913、XS0915、XS0918 和 XS0920 均与 GenBank 中已报道的西瓜噬酸菌菌株 XJ-5 (GenBank 登录号 KJ210343.1) 和 pslb-25 (GenBank 登录号为 KJ210350.1) 同源性分别达到 100.00% 和 99.86%。同时基于 16S rDNA 序列构建的系统发育树显示, 自瓠瓜上分离的 12 株代表菌株聚为一支, 亲缘关系最近, 且与新疆维吾尔自治区的西瓜噬酸菌 XJ-5 菌株和内蒙古自治区西瓜噬酸菌 pslb-25、pslb116 菌株处于同一分支, 而自西瓜上分离的 QT0801、QT0806、QT0808、QT0812 和 QT0815 五株西瓜噬酸菌菌株与海南省西瓜噬酸菌 LS-2 和郑州市西瓜噬酸菌 ZZ-1 菌株处于另一分支, 表明来自瓠瓜上分离的菌株可能与新疆维吾尔自治区及内蒙古自治区菌株的亲缘关系较近。

2.6 7 个看家基因的多重序列系统发育分析

经相同基因位点对应的引物扩增后, 20 株供试

菌株均获得相同长度的片段, 经 *spi*、*adk*、*pilT*、*ugpB*、*glnA*、*glyA* 和 *gltA* 七个基因位点对应的引物 PCR 扩增后, 分别得到长度为 441、467、438、480、470、546 和 520 bp 的目标片段。BLAST 比对结果显示, XS0901、XS0902、XS0904、XS0906、XS0907、XS0908、XS0910、XS0912、XS0913、XS0915、XS0918 和 XS0920 这 12 株菌株在 7 个基因位点上的序列均与西瓜噬酸菌标准菌株 AAC00-1 (GenBank 登录号为 CP000512.1) 相关序列的相似性大于 99.00%, 且多数基因的同源性达到 100.00%。

多重序列系统发育树结果显示, 自瓠瓜上分离的 XS0901、XS0902、XS0904、XS0906、XS0907、XS0908、XS0910、XS0912、XS0913、XS0915、XS0918 和 XS0920 这 12 株菌株聚为一支, 且均与西瓜噬酸菌菌株 pslb116 位于同一分支上, 自举置信度为 100%; 自西瓜上分离的西瓜噬酸菌菌株 QT0801、QT0806、QT0808、QT0812 和 QT0815 五株菌株则聚在另一分支, 亲缘关系较近(图 4)。基于 7 个不同基因序列构建的 7 个系统发育树结果与合并序列构建的多重序列系统发育树结果基本一致。自瓠瓜上分离的菌株和自西瓜上分离的菌株均与噬酸菌属的西瓜噬酸菌亲缘关系较近, 与噬酸菌属其他种的亲缘关系较远, 故将自瓠瓜分离的 12 株菌确定为西瓜噬酸菌 *A. citrullii*。

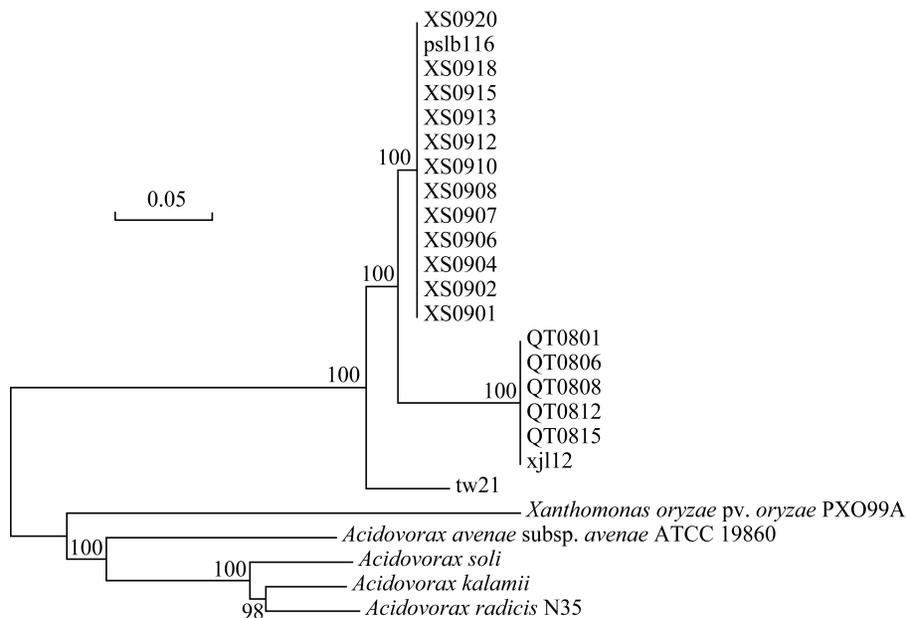


图 4 基于 7 个看家基因序列采用邻接法构建 20 株供试菌株与相关菌株的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic trees of 20 tested strains and related strains constructed using the neighbor-joining method based on seven housekeep gene sequences

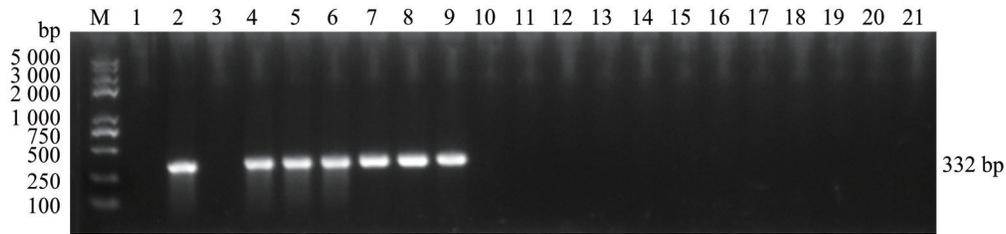
2.7 基于特异性引物 PL1/PL2 的亚群鉴定结果

经西瓜噬酸菌亚群 I 和亚群 II 的特异性引物

PL1/PL2 扩增后, 自瓠瓜上分离的 12 株菌株 XS0901、XS0902、XS0904、XS0906、XS0907、XS0908、

XS0910、XS0912、XS0913、XS0915、XS0918、XS0920与pslb116菌株均未扩增出条带,故将其鉴定为西瓜噬酸菌亚群I;自西瓜上分离的5株菌QT0801、

QT0806、QT0808、QT0812、QT0815和xjl12、tw21菌株均扩增出大小为332 bp的特异性目标条带(图5),故将其鉴定为西瓜噬酸菌亚群II。



M: DL 5000 marker; 1: 阴性对照; 2~9: 西瓜噬酸菌菌株 xjl12、pslb116、tw21、QT0801、QT0806、QT0808、QT0812 和 QT0815; 10~21: 供试菌株 XS0901、XS0902、XS0904、XS0906、XS0907、XS0908、XS0910、XS0912、XS0913、XS0915、XS0918 和 XS0920。M: DL 5000 marker; 1: negative control; 2~9: *Acidovorax citrulli* strains xjl12, pslb116, tw21, QT0801, QT0806, QT0808, QT0812 and QT0815, respectively; 10~21: strains XS0901, XS0902, XS0904, XS0906, XS0907, XS0908, XS0910, XS0912, XS0913, XS0915, XS0918 and XS0920, respectively.

图5 基于特异性引物 PL1/PL2 的西瓜噬酸菌亚群 PCR 扩增结果

Fig. 5 PCR products using specific primers PL1/PL2 with bacterial strains in *Acidovorax citrulli* group

2.8 基于MALDI-TOF-MS技术的亚群鉴定结果

自瓠瓜上分离的12株菌株XS0901、XS0902、XS0904、XS0906、XS0907、XS0908、XS0910、XS0912、XS0913、XS0915、XS0918、XS0920均与数据库中西瓜噬酸菌亚群I菌株在在同一离子质荷比处的蛋白峰极为相似,12株菌株分值介于2.516~2.665之间,均小于2.700,与西瓜噬酸菌菌株pslb116的分值2.683很接近,本文仅列出菌株XS0901的质谱峰图(图6)。

自西瓜上分离的5株西瓜噬酸菌菌株QT0801、QT0806、QT0808、QT0812、QT0815与数据库中西瓜噬酸菌亚群II信息高度匹配,分值介于2.676~2.735之间,多数大于2.700,与西瓜噬酸菌菌株xjl12和tw21分值很接近,其分别为2.708和2.737。所有测试菌株的鉴定分值均在2.300~3.000之间(表2),说明鉴定结果完全可靠。

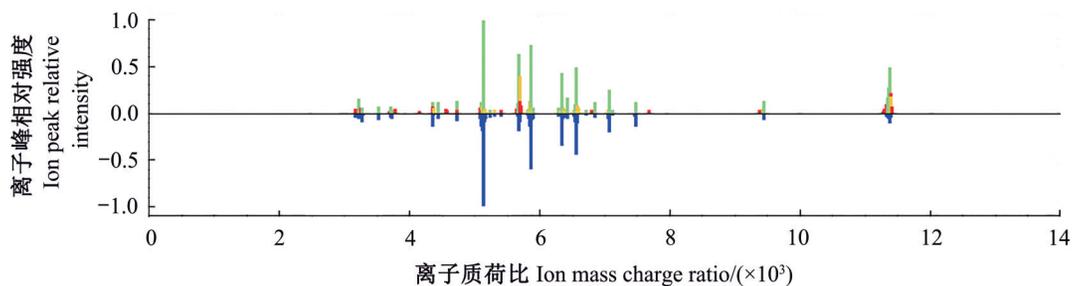


图6 自瓠瓜上分离的菌株XS0901(x轴上)与数据库中西瓜噬酸菌亚群I(x轴下)的质谱峰

Fig. 6 Mass spectrum peak of the strain XS0901 obtained from bottle gourd (x axis upper) and the map for *Acidovorax citrulli* group I stored in the database (x axis lower)

3 讨论

瓜类果斑病是近年来我国瓜类上发生较严重的检疫性细菌病害,在瓜类整个生育期均可发生,该病较多发生在西瓜和甜瓜上,其次是在哈密瓜和南瓜上,本研究首次发现在瓠瓜上发生。本研究结果发现瓠瓜子叶和真叶染病初期病斑呈水渍状,沿叶脉逐渐发展为伴有黄色晕圈的不规则褐色坏死病斑,与赵廷昌等(2001a)和魏林等(2020)报道的西甜瓜果斑病症状一致。致病性试验结果表明,瓠瓜真叶被侵染后可在叶缘或者叶脉间出现水渍状病斑,但多数在叶缘产生病斑后沿叶脉发展,叶脉附近先产生病斑的症状较少。在相同接种天数下,瓠瓜子叶发病症状比真叶严重,果实上无龟裂症状,瓜肉由中心开始腐烂变褐,且在整个生育期中,仅有瓠瓜果实受害后会产生刺鼻的酸臭味,与田间观察结果是一致的。

表2 20株供试菌株的MALDI-TOF-MS鉴定结果

Table 2 MALDI-TOF-MS identification results of 20 tested strains

菌株 Strain	分值 Score value	鉴定结果 Identity result	菌株 Strain	分值 Score value	系统鉴定 Identity result
XS0918	2.564	西瓜噬酸菌亚群I <i>A. citrulli</i> group I	XS0901	2.599	西瓜噬酸菌亚群I <i>A. citrulli</i> group I
XS0920	2.646	西瓜噬酸菌亚群I <i>A. citrulli</i> group I	XS0902	2.618	西瓜噬酸菌亚群I <i>A. citrulli</i> group I
QT0801	2.718	西瓜噬酸菌亚群II <i>A. citrulli</i> group II	XS0904	2.665	西瓜噬酸菌亚群I <i>A. citrulli</i> group I
QT0806	2.704	西瓜噬酸菌亚群II <i>A. citrulli</i> group II	XS0906	2.584	西瓜噬酸菌亚群I <i>A. citrulli</i> group I
QT0808	2.735	西瓜噬酸菌亚群II <i>A. citrulli</i> group II	XS0907	2.623	西瓜噬酸菌亚群I <i>A. citrulli</i> group I
QT0812	2.705	西瓜噬酸菌亚群II <i>A. citrulli</i> group II	XS0908	2.661	西瓜噬酸菌亚群I <i>A. citrulli</i> group I
QT0815	2.676	西瓜噬酸菌亚群II <i>A. citrulli</i> group II	XS0910	2.625	西瓜噬酸菌亚群I <i>A. citrulli</i> group I
xjl12	2.708	西瓜噬酸菌亚群II <i>A. citrulli</i> group II	XS0912	2.516	西瓜噬酸菌亚群I <i>A. citrulli</i> group I
pslb116	2.683	西瓜噬酸菌亚群I <i>A. citrulli</i> group I	XS0913	2.633	西瓜噬酸菌亚群I <i>A. citrulli</i> group I
tw21	2.737	西瓜噬酸菌亚群II <i>A. citrulli</i> group II	XS0915	2.626	西瓜噬酸菌亚群I <i>A. citrulli</i> group I

采用多位点序列分析法既可对病原菌进行鉴定(沈肖玲等,2018)也可对病原菌进行分型,如王丽(2016)采用此方法将来自不同地点的37株马铃薯青枯病菌 *Pseudomonas solanacearum* 菌株分为2个群体;于少帅等(2017)采用此方法将植原体不同组间或亚组间株系清晰地区分开,揭示其遗传变异和系统发育关系。本研究将多位点序列分析技术用于瓠瓜果斑病病原菌的鉴定,发现自西瓜上分离的菌株未与西瓜噬酸菌菌株 tw21 聚为一支,而从亚群鉴定结果来看,自西瓜上分离的菌株与西瓜噬酸菌菌株 tw21 均为亚群II菌株。总的来看,多位点序列分析技术不适用于亚群的鉴定,必须结合多种方法才能对病原菌种属及亚群进行准确鉴定。西瓜噬酸菌常用分型方法是PFGE和MLST,这2种技术的重复性和准确性较高,但操作繁琐且费时。Zhong et al. (2016)设计的PL1/PL2 PCR 特异性引物能快速特异性鉴定出西瓜噬酸菌亚群,但西瓜噬酸菌种群具有丰富的遗传多样性,其菌株的分类并不是绝对的,不能排除某些特殊菌株存在的可能性。近年来,MALDI-TOF-MS作为一种新型软电离质谱,因其受培养条件的影响小,蛋白指纹图谱稳定性好,通常可鉴定到种或亚种水平,在病原微生物鉴定和分型领域中有非常广阔的应用前景(袁璐和伍勇,2013;秦娟秀和李敏,2015)。刘铭等(2019)就曾应用PFGE、MLST和MALDI-TOF-MS方法对克罗诺杆菌 *Cronobacter* 进行分型研究,并对这3种方法进行比较分析,结果表明MALDI-TOF-MS法快速、准确、分辨率较高,可反映出某些PFGE和MLST所不能区分的细微差异。本研究基于特异性引物PL1/PL2的PCR技术,结合MALDI-TOF-MS技术对病原菌进行亚群鉴定,此方法不仅简单便捷,1 d内即

可完成检测,而且结果的重复性和准确性也很高。

尽管目前对果斑病菌亚群鉴定的研究方法有多种,但尚无统一的标准。因此,为了更有效地防治该病害,采用尽可能多的试验菌株在亚群鉴定方法上进行比较分析,并制定统一标准。此外基于16S rDNA序列分析表明,引起浙江省瓠瓜果斑病的菌株(亚群I)与新疆维吾尔自治区及内蒙古自治区的菌株亲缘关系最近,从溯源上分析浙江省的病原菌可能来源于新疆维吾尔自治区或内蒙古自治区。因此,更有效地阻断瓜类果斑病菌的传播、进一步加强产地检疫与种子种苗的调运检疫迫在眉睫。

参 考 文 献 (References)

- Bahar O, Efrat M, Hadar E, Dutta B, Walcott RR, Burdman S. 2008. New subspecies-specific polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Acidovorax avenae*. *Plant Pathology*, 57(4): 754-763
- Fu QW, Wang S, Xiao CL, Liu Y, Li QJ, Luo F, Han XY, Kong XY. 2017. Identification on resistance of different varieties of watermelon at seedling stage to bacterial fruit blotch. *Journal of Changjiang Vegetables*, (22): 76-79 (in Chinese) [符启位, 王爽, 肖春雷, 刘勇, 李秋洁, 罗丰, 韩晓燕, 孔祥义. 2017. 西瓜不同品种苗期对细菌性果斑病的抗性鉴定. *长江蔬菜*, (22): 76-79]
- Liu M, Shi YW, Liu H, Li J, Liu LZ, Hu GC. 2019. Subtyping *Cronobacter* with PFGE, MLST, and MALDI-TOF-MS. *Journal of Pathogen Biology*, 14(3): 323-329 (in Chinese) [刘铭, 时玉雯, 刘辉, 李健, 刘岚铮, 胡光春. 2019. 应用PFGE、MLST和MALDI-TOF-MS方法对克罗诺杆菌分型的研究. *中国病原生物学杂志*, 14(3): 323-329]
- Nie FJ, Chen YC, Gong L, Gan XY, Xu LM, Song YX. 2019. Biological characterization and identification of the pathogens of potato scab in northwestern China. *Journal of Plant Protection*, 46(3): 611-617 (in Chinese) [聂峰杰, 陈虞超, 巩楠, 甘晓燕, 徐利敏, 宋玉霞. 2019. 西北地区马铃薯疮痂病病原菌鉴定及其生物学

- 特性. 植物保护学报, 46(3): 611-617]
- Qian YH, Li YJ, Ding YW, Zhao QY. 2019. Application of MALDI-TOF-MS to the study of the self-built database of *Shigella boydii*. Laboratory Medicine and Clinic, 16(10): 1348-1350 (in Chinese) [钱扬会, 李艳君, 丁毅伟, 赵强元. 2019. 应用MALDI-TOF-MS自建鲍氏志贺菌蛋白指纹图谱数据库的研究. 检验医学与临床, 16(10): 1348-1350]
- Qin JX, Li M. 2015. Application of MALDI-TOF MS technology in the typing of pathogenic microorganisms. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 38(6): 367-369 (in Chinese) [秦娟秀, 李敏. 2015. MALDI-TOF MS 指纹图谱技术在病原微生物分型中的应用前景. 中华检验医学杂志, 38(6): 367-369]
- Schaad NW, Postnikova E, Sechler A, Claflin LE, Vidaver AK, Jones JB, Agarkova I, Ignatov A, Dickstein E, Ramundo BA. 2008. Re-classification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology, 31(6/7/8): 434-446
- Schaad NW, Song WY, Hatziloukas E. 1999. PCR primers for detection of plant pathogenic species and subspecies of *Acidovorax*: US6146834. 2000-11-14
- Shen XL, Lin C, Qian JT, Qiu ZL, Chen JB, Sun C, Yi JP, Lou BG. 2018. Characterization of stem and root rot symptoms of sweet potato and the causal pathogen of the disease. Acta Phytopathologica Sinica, 48(1): 25-34 (in Chinese) [沈肖玲, 林钊, 钱俊婷, 仇智灵, 陈江彬, 孙超, 易建平, 楼兵干. 2018. 甘薯茎腐病症状及其病原鉴定. 植物病理学报, 48(1): 25-34]
- Tian YL, Zhao YQ, Hu BS, Liu FQ. 2013. First report of seedling blight of watermelon caused by *Acidovorax citrulli* transmitted from rootstock of pumpkin in China. Plant Disease, 97(3): 420
- Wang L. 2016. Pathogenicity and genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* causing potato brown rot in China. Master thesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese) [王丽. 2016. 中国马铃薯青枯菌致病力和遗传多样性研究. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学]
- Wang X, Gao J, Zhang J, Dong CL, Bai QR, Yang LN. 2012. Virulence evaluation of 63 bactericides to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on watermelon and muskmelon. Journal of Jilin Agricultural University, 34(6): 612-617 (in Chinese) [王雪, 高洁, 张静, 董春玲, 白庆荣, 杨丽娜. 2012. 63种杀菌剂对西瓜、甜瓜细菌性果斑病菌的室内毒力测定. 吉林农业大学学报, 34(6): 612-617]
- Wei L, Liang ZH, Tang YY, Gao Y. 2020. Characteristics and green control measures of bacterial fruit spot in watermelon and melon. Journal of Changjiang Vegetables, (3): 49-50 (in Chinese) [魏林, 梁志怀, 唐炎英, 高阳. 2020. 西甜瓜细菌性果斑病为害特点及其绿色防治措施. 长江蔬菜, (3): 49-50]
- Yan SS, Yang YW, Wang TL, Zhao TC, Schaad NW. 2013. Genetic diversity analysis of *Acidovorax citrulli* in China. European Journal of Plant Pathology, 136(1): 171-181
- Yu HB, Bi XY, Xia B, An MN, Xia ZH, Wu YH. 2019. Identification of the pathogen causing bacterial fruit blotch of watermelon and melon in Liaoning. Journal of Shenyang Agricultural University, 50(3): 345-350 (in Chinese) [于海博, 毕馨月, 夏博, 安梦楠, 夏子豪, 吴元华. 2019. 辽宁西瓜和甜瓜细菌性果斑病的病原鉴定. 沈阳农业大学学报, 50(3): 345-350]
- Yu SS, Li Y, Ren ZG, Song CS, Lin CL, Piao CG, Tian GZ. 2017. Multilocus sequence analysis for revealing finer genetic variation and phylogenetic interrelatedness of phytoplasma strains in 16SrI group in China. Scientia Silvae Sinicae, 53(3): 105-118 (in Chinese) [于少帅, 李永, 任争光, 宋传生, 林彩丽, 朴春根, 田国忠. 2017. 多位点序列分析揭示我国16SrI组植原体不同株系间遗传变异和系统发育关系. 林业科学, 53(3): 105-118]
- Yuan L, Wu Y. 2013. Advances in the application of matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in the identification of clinical pathogenic microorganisms. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 33(2): 148-151 (in Chinese) [袁璐, 伍勇. 2013. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱在临床病原微生物鉴定中的应用进展. 中华微生物学和免疫学杂志, 33(2): 148-151]
- Zhang RY, Tan ZQ, Wen YT, Zhang HM, Jian RM. 1998. Description and identification of the causal organism of bacterial fruit blotch of watermelon. Chinese Journal of Tropical Crops, 19(1): 70-76 (in Chinese) [张荣意, 谭志琼, 文衍堂, 张惠梅, 简日明. 1998. 西瓜细菌性果斑病症状描述和病原菌鉴定. 热带作物学报, 19(1): 70-76]
- Zhao SY, Li M. 2013. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. Journal of Modern Laboratory Medicine, 28(5): 110-112 (in Chinese) [赵苏瑛, 李岷. 2013. MALDI-TOF质谱分析在临床微生物实验室的应用. 现代检验医学杂志, 28(5): 110-112]
- Zhao TC, Sun FZ, Wang BW. 2001a. Review on the research of bacterial fruit blotch in watermelon. Plant Protection Technology and Extension, 21(3): 37-38, 36 (in Chinese) [赵廷昌, 孙福在, 王兵万. 2001a. 西瓜细菌性果斑病研究进展. 植保技术与推广, 21(3): 37-38, 36]
- Zhao TC, Sun FZ, Wang BW, Hui WG. 2001b. Pathogen identification of Hami melon bacterial fruit blotch. Acta Phytopathologica Sinica, 31(4): 357-364 (in Chinese) [赵廷昌, 孙福在, 王兵万, 回文广. 2001b. 哈密瓜细菌性果斑病病原菌鉴定. 植物病理学报, 31(4): 357-364]
- Zhong J, Lin ZY, Ma YM, Gao BD, Liu HQ, Zhao TC, Schaad NW. 2016. Rapid discrimination between groups I and II of *Acidovorax citrulli* using a primer pair specific to a *pilL* gene. Journal of Phytopathology, 164(7/8): 558-562

(责任编辑:张俊芳)