



西瓜甜瓜 细菌性果斑病 流行与防治研究

■ 赵廷昌 等 / 著

非外借

中国农业科学技术出版社

项目资助：

公益性行业（农业）科研专项“西甜瓜种传细菌性果斑病综合防控技术与示范”201003066

国家西甜瓜产业技术体系 CARS-26

北京市自然科学基金项目“寄主对西瓜噬酸菌不同亚组菌株响应机制的研究”6162023

中国农业科学院创新工程项目作物细菌病害流行与控制团队

西瓜甜瓜细菌性果斑病 流行与防治研究

■ 赵廷昌 等 / 著

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

西瓜甜瓜细菌性果斑病流行与防治研究 / 赵廷昌等著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2016. 12

ISBN 978 - 7 - 5116 - 2836 - 7

I. ①西… II. ①赵… III. ①西瓜 - 斑点病 - 防治②甜瓜 - 斑点病 - 防治
IV. ①S436. 5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 275578 号

责任编辑 姚 欢

责任校对 马广洋

出 版 者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82106636 (编辑室) (010) 82109702 (发行部)

(010) 82109709 (读者服务部)

传 真 (010) 82106631

网 址 <http://www.castp.cn>

经 销 者 各地新华书店

印 刷 者 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 787mm × 1 092mm 1/16

印 张 14. 25

字 数 400 千字

版 次 2016 年 12 月第 1 版 2016 年 12 月第 1 次印刷

定 价 50. 00 元

版权所有 · 翻印必究

《西瓜甜瓜细菌性果斑病流行与防治研究》

著者委员会

- | | |
|-----|----------------|
| 赵廷昌 | 中国农业科学院植物保护研究所 |
| 李健强 | 中国农业大学 |
| 吴 萍 | 北京市农林科学院 |
| 伊鸿平 | 新疆农业科学院哈密瓜研究中心 |
| 别之龙 | 华中农业大学 |
| 胡 俊 | 内蒙古农业大学 |
| 陈华民 | 中国农业科学院植物保护研究所 |
| 杨玉文 | 中国农业科学院植物保护研究所 |
| 赵文军 | 中国检验检疫科学院 |
| 罗来鑫 | 中国农业大学 |

前 言

西瓜和甜瓜在我国果蔬生产和消费中占据重要地位，是带动农民就业增收的高效园艺作物，也是满足城乡居民生活需求的重要时令水果。我国西瓜和甜瓜的种植面积和产量都位居世界前列，全国每年种植 3 000 万亩（1 亩 $\approx$ 667m²，全书同）左右，产量达 8 000 万 t 以上，产值达 2 200 多亿元。中国已成为世界西瓜甜瓜生产与消费的第一大国。

瓜类细菌性果斑病（bacterial fruit blotch）是发生在葫芦科植物上的一种严重的世界性病害，其病原菌为西瓜噬酸菌 *Acidovorax citrulli* = *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* = *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*。瓜类细菌性果斑病是一种典型的种传细菌性病害，可以侵染多种葫芦科作物，如西瓜、甜瓜、南瓜、黄瓜等，也可侵染其他植物，如萎叶等。瓜类细菌性果斑病已成为葫芦科作物上严重的世界性病害，给各国的西瓜、甜瓜种植业造成了极大的威胁。

该病最早在美国发生，1965 年，Webb 和 Goth 第一次从西瓜种子上分离到这种病原菌，但是并未引起人们的重视，直到 1989 年该病在美国大陆严重暴发，种植商品西瓜的各州都相继报道了该病害的发生。到 1995 年，瓜类细菌性果斑病在美国多个州蔓延，发病严重地区 80% 以上的西瓜不能上市销售。目前，果斑病已在美国多个州和澳大利亚、巴西、土耳其、日本、泰国、以色列、伊朗、匈牙利、希腊等多个国家发生。1988 年以来，中国也相继报道了该病害的发生。近年来瓜类细菌性果斑病也呈逐年上升的趋势，目前已在我国的海南、新疆、内蒙古、台湾、吉林、福建、山东、河北、湖北、广东等多个省（区）发生。

瓜类细菌性果斑病主要依靠种子进行传播，病菌可以附着在瓜种子表面，也可以侵入种子内部，带菌种子是该病的主要初侵染来源。病菌在土壤表面的病残体上越冬，也成为次年的初侵染来源，田间的次生瓜苗也是该病菌的寄主和初侵染来源。带菌种子萌发后病菌很快侵染子叶及真叶，引起幼苗发病。温室中，人工喷灌和移植条件下，病菌可迅速侵染邻近的幼苗，并导致病害大面积暴发。病叶和病果上的菌脓借雨水、风力、昆虫和农事操作等途径传播，成为再侵染来源。瓜类细菌性果斑病在高温高湿的环境下易发病，特别是炎热、强光及暴风雨后，病菌的繁殖和传播加速，人为传播也可促使该病流行。

瓜类细菌性果斑病是我国的检疫性病害，进口时应杜绝带菌种子进入。同时注意从无病区引种，生产的种子应进行种子带菌率测定。在种子生产方面，应使用无病菌的种子进行原种和商业种子生产，制种田必须与其他瓜类田自然隔离。发生或怀疑发生病害的田块不能采种，相邻地块发病而本身未发病的田块也不能采种。种子处理可

有效降低瓜类细菌性果斑病的发生。

目前,生产上防治细菌性病害的化学药剂主要为铜制剂和农用抗生素类。但是,果斑病菌菌株具有不同程度的抗铜性,效果多不理想,且田间大量施用含铜杀菌剂,使病菌的抗药性增强,因此,生产上需要有新型的环境友好型的化学农药来更好地防治该病害。生物防治方面,目前报道的对果斑病有防治效果的生防菌大多在实验室阶段,鲜有商品化的产品推广。虽然抗病品种是防治病害最根本最有效的措施,但是瓜类细菌性果斑病菌存在比较丰富的遗传多样性,为抗病品种的筛选增加了困难,迄今并没有发现对瓜类细菌性果斑病免疫或高抗的品种,培育抗病品种依然是当前研究的难点。

针对瓜类细菌性果斑病流行与防治中存在的诸多问题,本项目分为7个专题进行全面深入的研究,包括病菌生物学和病害流行规律、病菌致病机制、病菌检测技术、西瓜甜瓜种子生产中病害防治关键技术、西瓜甜瓜种子采后处理技术、西瓜甜瓜嫁接苗安全生产技术、病害综合防控关键技术集成与示范等。经过5年的努力,本项目取得了一定成果,有效地缓解了我国西瓜和甜瓜生产中瓜类细菌性果斑病的危害,为我国乃至世界西瓜和甜瓜产业的健康可持续发展提供技术支撑。

著 者

2016年11月

目 录

第一章 概 述	(1)
第二章 果斑病菌生物学和病害流行规律研究	(11)
一、果斑病菌种群结构和遗传多样性分析	(11)
(一) 采用多位点序列分型法 (MultiLocus sequence typing, MLST)	(11)
(二) <i>hrp</i> 基因簇上的基因序列差异	(13)
二、果斑病菌寄主范围和寄主抗性研究	(14)
(一) 果斑病菌寄主范围	(14)
(二) 寄主抗性研究	(15)
三、果斑病菌侵染规律及病害发生流行条件研究	(16)
(一) 证实 <i>hrcR</i> 基因功能的缺失不影响果斑病菌在寄主体内的定殖和 扩展	(16)
(二) 初步证实 <i>A. citrulli</i> 可以造成寄主系统性侵染	(18)
(三) 明确了高温有利于病原菌在甜瓜植株体内的定殖和扩展	(20)
四、田间病害初侵染来源及病菌传播扩散动态研究	(23)
(一) 明确来源于杂草及水稻上的噬酸菌可能成为田间初侵染来源	(23)
(二) 明确 T4SS 及 T6SS 的相关基因分别影响果斑病菌从种子到种苗的 传播	(24)
(三) 明确了 T2SS 对果斑病菌侵染定殖的影响	(32)
(四) 明确了果斑病菌侵染对西瓜子叶蛋白表达的影响	(36)
(五) 甜瓜细菌性果斑病病原菌花粉管传播途径研究	(37)
五、西瓜根部和叶部的侵染定殖及定殖动态	(38)
(一) 福建省果斑病病原菌的分离鉴定	(38)
(二) 绿色荧光蛋白基因标记果斑病菌	(38)
(三) 红色蛋白基因标记果斑病菌	(40)
(四) 标记菌株在西瓜体内的侵染过程	(41)
(五) 标记菌株在西瓜体内的定殖动态研究	(43)
六、不同管理模式对果斑病田间病害发生的影响研究	(45)
(一) 不同肥水管理对病害发生的影响	(45)
(二) 不同灌水模式对果斑病发生的影响	(46)
七、病菌在新疆昌吉和甘肃金塔两个地区的土壤中越冬研究	(47)
(一) 模拟土壤郑州越冬后西瓜噬酸菌的存活和致病性检测	(47)

(二) 两个制种基地带菌土壤越冬后的存活和致病性检测	(48)
八、西瓜甜瓜生物胁迫下用于基因表达分析的内参基因筛选	(49)
第三章 果斑病菌致病机制解析	(51)
一、果斑病菌群体感应基因的功能研究	(51)
(一) 群体感应基因 <i>luxR</i> 、 <i>luxI</i> 缺失突变体的构件及表型测定	(51)
(二) <i>luxR/luxI</i> 群体感应系统对相关毒性基因表达量的影响	(60)
(三) 群体感应信号物质的鉴定及功能研究	(61)
二、果斑病菌突变体库的构件及致病相关基因功能研究	(64)
(一) 果斑病菌 Tn5 突变体库的构建及相关基因的功能研究	(64)
(二) 果斑病菌果胶裂解酶 AcPel 蛋白结构和致病性研究	(70)
(三) 果斑病菌 III 型分泌系统及 <i>tatB</i> 基因的克隆与功能研究	(71)
(四) 一株西瓜果斑病菌的全基因组测序	(96)
第四章 瓜类细菌性果斑病菌检测技术	(98)
一、生物学特性	(98)
二、理化特性	(101)
三、温室试种检测法	(102)
四、免疫学检测技术	(103)
五、分子检测技术	(104)
(一) PCR 及实时荧光 PCR 检测	(104)
(二) 果斑病 LAMP 检测方法	(108)
(三) 果斑病菌交叉引物扩增技术	(111)
六、果斑病菌活体检测方法	(114)
(一) PMA 对活菌影响研究	(114)
(二) PMA 对死菌扩增的抑制作用研究	(115)
第五章 西瓜甜瓜种子生产中细菌性果斑病防治关键技术研究与应用	(117)
一、带菌亲本种子对后代种子带菌的影响研究	(117)
(一) 材料与方法	(117)
(二) 带菌亲本种子对制种地种子细菌性果斑病发生的关系	(118)
二、种田不同栽培密度、灌溉方式及采种技术、采种工具下西瓜甜瓜细菌性 果斑病发生情况及种子带菌率研究	(119)
(一) 材料与方法	(119)
(二) 种田不同栽培密度、不同灌溉方式及不同采种技术、采种工具下 西瓜甜瓜细菌性果斑病发生情况及种子带菌率研究	(121)
三、种子干热处理和种子化学处理效果评估	(121)
(一) 材料与方法	(121)
(二) 种子干热处理	(123)
四、几种种子处理剂对瓜类细菌性果斑病防治效果的研究	(125)

(一) 材料与方法	(125)
(二) 结果与分析	(125)
五、果斑病化学药剂防治试验研究	(128)
(一) 材料与方法	(128)
(二) 细菌性果斑病化学药剂防治研究	(129)
六、示范基地建设、应用推广及技术培训	(130)
(一) 出版发行西瓜甜瓜健康种子生产技术多媒影视专题片	(130)
(二) 标准化示范基地建设	(130)
(三) 西瓜甜瓜健康种子生产技术培训	(131)
第六章 西瓜甜瓜种子采后处理技术与示范	(133)
一、建立了湖南地区瓜类细菌性果斑病种子消毒评价体系	(134)
二、不同消毒处理方法对提高种子健康的效果研究	(134)
(一) 通过室内培养基杀菌试验和带菌种子消毒处理得到几种有效的种子 杀菌剂	(134)
(二) 干热灭菌处理提高种子健康	(137)
(三) 辐射处理提高种子健康	(140)
(四) 利用发芽率和发芽势评价种子处理安全性	(141)
(五) “四霉素”的筛选	(141)
(六) 自然带菌种子消毒方法筛选	(142)
(七) 建立了一种高效节水的种子处理方法	(143)
(八) 通过种子采收后发酵、快速干燥等处理提高种子健康	(143)
三、“1号杀菌剂”防治瓜类细菌性果斑病	(144)
(一) 抑菌效果	(144)
(二) 1号杀菌剂毒力分析	(145)
(三) 带菌种子处理	(145)
(四) 喷雾浓度试验结果	(148)
(五) 温室喷雾防治结果	(148)
(六) 应用1号杀菌剂控制西瓜甜瓜果斑病发生的研究结论和分析	(148)
四、1号杀菌剂对三倍体西瓜种子的消毒处理研究	(149)
(一) 药剂处理对种子发芽势的影响	(149)
(二) 药剂处理对种子根长的影响	(150)
(三) 带菌种子药剂处理后消毒效果	(150)
(四) 带菌西瓜种子药剂处理后成苗率及防治效果	(152)
五、建立了一种三倍体西瓜种子消毒技术	(153)
(一) 通过种子引发处理提高三倍体西瓜种子活力	(153)
(二) 建立了三倍体西瓜种子采后处理方法—有效杀菌剂与固体基质引发 结合	(153)
(三) 三倍体西瓜种子消毒技术的形成及初步田间种植试验效果	(156)

六、种子包衣处理提高种子健康	(156)
七、通过引发处理全面提高种子活力	(156)
(一) 建立了西瓜种子引发技术体系, 全面提高种子活力	(156)
(二) 西瓜种子引发效果可以保持二年以上	(157)
(三) 提高西瓜生产配套砧木种子引发技术的研究与应用	(158)
八、种子配套技术配套设备研制与应用	(160)
九、小结	(161)
第七章 西瓜甜瓜嫁接苗安全生产技术与示范	(163)
一、砧木和接穗种子带菌与嫁接苗细菌性果斑病发生关系的研究	(163)
(一) 带菌接穗种子与西瓜幼苗 BFB 发生的关系分析	(163)
(二) 带菌砧木种子与砧木幼苗 BFB 发生的关系分析	(164)
(三) 带菌砧木幼苗与西瓜嫁接苗 BFB 发生的关系分析	(165)
(四) 瓜类细菌性果斑病菌在葫芦幼苗中定殖的观察	(165)
(五) 用 GFP 标记菌株观察 BFB 病原菌 Ac 在砧木叶片的定殖	(166)
(六) BFB 在不同病害等级葫芦砧木中侵染情况	(166)
(七) 在嫁接后育苗管理中 BFB 带菌苗的传染情况	(167)
(八) 嫁接苗成活后 BFB 在接穗子叶的发生情况	(168)
(九) BFB 在不同病害等级西瓜接穗中侵染情况	(168)
(十) 在嫁接后环境管理中 BFB 带菌西瓜接穗的传染情况	(169)
(十一) 再侵染途径中 BFB 病菌对西瓜嫁接苗的影响	(169)
(十二) 再侵染途径中 BFB 病菌对西瓜嫁接苗发病率的影响	(170)
(十三) 西瓜甜瓜嫁接苗细菌性果斑病识别技术档案	(170)
二、带菌嫁接用具及育苗基质与西瓜嫁接苗 BFB 发生间的关系分析	(171)
(一) 竹签接菌浓度与西瓜嫁接苗 BFB 发生的关系	(171)
(二) 带菌竹签嫁接与西瓜嫁接苗 BFB 发生的关系	(172)
(三) 带菌育苗基质与西瓜幼苗 BFB 发生间的关系	(173)
三、不同嫁接方法与西瓜嫁接苗 BFB 发生间的关系	(173)
四、嫁接环境因子与西瓜甜瓜嫁接苗细菌性果斑病发生关系研究	(174)
(一) 不同温度环境中葫芦砧木发病情况试验	(174)
(二) 不同湿度条件下葫芦砧木发病情况试验	(175)
五、不同灌溉方式与西瓜甜瓜嫁接苗细菌性果斑病的发生关系研究	(177)
六、西瓜甜瓜嫁接苗细菌性果斑病的防治技术研究	(178)
(一) 化学药剂的室内抑菌和杀菌试验	(178)
(二) 带菌接穗种子药剂处理技术研究	(180)
(三) 带菌竹签、带菌基质的消毒技术研究	(181)
(四) 西瓜甜瓜嫁接苗化学药剂处理的田间小区试验	(183)
七、HACCP 体系在嫁接苗 BFB 综合防控中的应用	(183)
(一) 西瓜嫁接育苗生产工艺流程	(183)

(二) 西瓜嫁接育苗过程中 BFB 的危害识别及关键控制点的确定	(184)
(三) 西瓜嫁接育苗过程中 BFB 危害分析与识别	(184)
(四) 西瓜嫁接育苗过程中 BFB 防治的关键控制点	(185)
(五) 西瓜嫁接育苗过程中 BFB 防治的监管监控计划	(186)
(六) 嫁接育苗标准的制定与推广应用	(187)
八、举办了两次《全国西瓜甜瓜嫁接苗集约化生产观摩与研讨会》和《国际园艺学会第一届蔬菜嫁接研讨会》	(187)
九、小结	(188)
第八章 西瓜甜瓜细菌性果斑病综合防控关键技术集成与示范	(189)
一、细菌性果斑病的品种抗性监测	(189)
(一) 规范病情分级标准	(189)
(二) 栽培方式对病害发生的影响	(189)
(三) 病害发生动态及品种抗病性调查	(190)
(四) 设施甜瓜环境监测数据的采集	(191)
二、环境友好型药剂筛选	(191)
三、西瓜甜瓜细菌性果斑病防治新药剂——溴硝醇	(194)
(一) 活体组织法筛选防治甜瓜细菌性果斑病药剂	(194)
(二) 甜瓜细菌性果斑病活体盆栽药剂筛选	(194)
(三) 溴硝醇 80% 可溶性粉剂对甜瓜细菌性果斑病的防治效果	(195)
(四) 60% 溴硝醇可溶性粉剂对甜瓜细菌性果斑病的防治效果	(196)
(五) 种子处理技术	(197)
(六) 甜瓜细菌性果斑病种子处理剂开发	(199)
(七) 50% 溴硝醇湿拌种剂的示范推广	(199)
四、生防菌株的筛选	(200)
五、药剂浸种对果斑病发生的影响	(201)
六、诱抗剂对果斑病防治试验	(201)
七、果斑病菌抑菌化合物高通量筛选体系的构建	(203)
八、两种新型果斑病菌抑制剂	(203)
九、黑曲霉发酵液 Y-1 对 BFB 防效评估	(204)
(一) 黑曲霉发酵液平板抑菌效果评估	(204)
(二) 发酵液处理带菌葫芦种子不同时间后幼苗发病情况	(205)
(三) 黑曲霉发酵液诱导抗性研究	(206)
十、标准化综合防控技术的防控效果	(206)
十一、综合防控技术的集成	(207)
十二、综合防控技术的示范推广和专家评价	(207)
十三、小结	(209)
主要参考文献	(210)

第一章 概述

瓜类细菌性果斑病 (bacterial fruit blotch) 是发生在葫芦科植物上的一种严重的世界性病害, 其病原菌为西瓜噬酸菌 *Acidovorax citrulli* = *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* = *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*。瓜类细菌性果斑病是一种典型的种传细菌性病害, 可以侵染多种葫芦科作物, 如西瓜、甜瓜、南瓜、黄瓜等, 也可侵染其他植物, 如蓼叶等。瓜类细菌性果斑病已成为葫芦科作物上严重的世界性病害, 给各国的西瓜、甜瓜种植业造成了极大的威胁。

该病最早在美国发生, 1965 年, Webb 和 Goth 第一次从西瓜种子上分离到这种病原菌, 但是并未引起人们的重视, 直到 1989 年该病在美国大陆严重暴发, 种植商品西瓜的各州都相继报道了该病害的发生。到 1995 年, 瓜类细菌性果斑病在美国多个州蔓延, 发病严重地区 80% 以上的西瓜不能上市销售, 此病菌还可以侵染除西瓜外的多种葫芦科作物, 如甜瓜、南瓜、黄瓜等。目前, 果斑病已在美国多个州和澳大利亚、巴西、土耳其、日本、泰国、以色列、伊朗、匈牙利、希腊等多个国家发生。1988 年以来, 中国也相继报道了该病害的发生。近年来瓜类细菌性果斑病也呈逐年上升的趋势, 目前已在我国的海南、新疆、内蒙古、台湾、吉林、福建、山东、河北、湖北、广东等多个省 (区) 发生。我国的西瓜、甜瓜种植面积和产量都位居世界前列, 而且是西瓜、甜瓜的重要制种基地, 而瓜类细菌性果斑病的发生给当地的西瓜、甜瓜种植业造成了不同程度的影响, 已成为西瓜、甜瓜生产上亟待解决的重要问题。目前, 瓜类细菌性果斑病已被列入我国国家禁止进境的检疫性有害生物。

瓜类细菌性果斑病菌菌体短杆状, 革兰氏染色阴性, 不产生荧光, 严格好氧, 单根极生鞭毛。能在 41℃ 下生长, 不能在 4℃ 下生长。在 KB 培养基上呈现乳白色、圆形、光滑、全缘、隆起、不透明菌落, 菌落直径 1 ~ 2mm; 在 YDC 培养基上呈现黄褐色、凸起、边缘扩展为圆形的菌落, 菌落直径 3 ~ 4mm。利用葡萄糖和蔗糖作碳源结果不一致, 但可以利用 β -丙氨酸、柠檬酸盐、乙醇、乙醇胺、果糖、L-亮氨酸和 D-丝氨酸。烟草过敏反应结果不一致, 不产生精氨酸水解酶, 明胶液化力弱, 氧化酶和 2-酮葡萄糖酸试验阳性。果斑病菌在种子中的存活时间长, 抗逆能力强, 主要存活于种皮下的胚乳表层。存活了 34 年和 40 年的西瓜种子和甜瓜种子种植发芽后, 用 ELISA 检测发病叶片, 从结果为阳性的病组织中富集菌体, PCR 进一步鉴定了病原菌为果斑病菌, 可见果斑病菌抗干旱和衰老的能力非常强。

西瓜、甜瓜在生长期均可受瓜类细菌性果斑病菌侵染, 子叶、真叶和果实均可发病。初期在子叶下侧出现水浸状斑, 子叶张开时, 病斑变为暗棕色, 沿叶脉发展为黑褐色坏死斑, 随后侵染真叶, 在真叶上形成暗棕色, 有黄色晕圈的病斑, 沿叶脉发

展成不规则大斑。植株生长中期，叶片上病斑通常不显著，田间湿度大时，叶背面沿叶脉可见到水浸状斑点，病叶对整株影响不大，却是重要的果实感染来源。果实感病后，最初果皮上出现直径仅几毫米的水浸状凹陷斑点，随后病斑迅速扩展至几厘米，呈暗绿色或褐色，边缘不规则。病原菌可进入果肉，有时造成孔洞状伤害，有的病斑表皮龟裂，溢出透明、黏稠、琥珀色菌脓，严重时果实很快腐烂，并使种子带菌。

瓜类细菌性果斑病主要依靠种子进行传播，病菌可以附着在瓜种子表面，也可以侵入种子内部，带菌种子是该病的主要初侵染来源。病菌在土壤表面的病残体上越冬，也成为次年的初侵染来源，田间的次生瓜苗也是该病菌的寄主和初侵染来源。带菌种子萌发后病菌很快侵染子叶及真叶，引起幼苗发病。温室中，人工喷灌和移植条件下，病菌可迅速侵染邻近的幼苗，并导致病害大面积暴发。病叶和病果上的菌脓借雨水、风力、昆虫和农事操作等途径传播，成为再侵染来源。瓜类细菌性果斑病在高温高湿的环境下易发病，特别是炎热、强光及暴风雨后，病菌的繁殖和传播加速，人为传播也可促使该病流行。

瓜类细菌性果斑病的药剂防治效果多不理想，因此使用抗病品种是防治该病最根本最有效的措施，但是瓜类细菌性果斑病菌存在比较丰富的遗传多样性，为抗病品种的筛选增加了困难，迄今并没有发现对瓜类细菌性果斑病免疫或高抗的品种。

瓜类细菌性果斑病是我国的检疫性病害，进口时应杜绝带菌种子进入。同时注意从无病区引种，生产的种子应进行种子带菌率测定。种子生产方面，应使用无病菌的种子进行原种和商业种子生产，制种田必须与其他瓜类田自然隔离。发生或怀疑发生病害的田块不能采种，相邻地块发病而本身未发病的田块也不能采种。种子处理可有效降低瓜类细菌性果斑病的发生。

目前，防治瓜类细菌性果斑病的化学药剂主要为铜制剂和农用抗生素类，由于田间大量施用含铜杀菌剂，果斑病菌部分菌株有抗铜性，效果多不理想。生产上需要新型的友好型的化学农药来更好地防治该病害。生物防治方面，目前报道的对果斑病有防治效果的生防菌主要有酵母菌（*Pichia anomala*）、荧光假单胞菌（*Pseudomonas fluorescens*）工程菌株（染色体整合了2,4-二乙酰基间苯三酚）、葫芦科内生细菌中的部分芽孢杆菌（*Bacillus* spp.）等，但研究大多在实验室阶段，未有商品化的产品推广。虽然使用抗病品种是防治果斑病最根本最有效的措施，但是迄今并没有发现对果斑病免疫或高抗的品种。Hopkins等报道三倍体西瓜较二倍体抗病，且抗病性强的品种果皮坚硬，果皮颜色深，感病品种的果皮呈浅绿色。由于还没有开发出具有商业价值的抗果斑病品种，培育抗病品种依然是当前研究的难点。

针对瓜类细菌性果斑病防治中存在很多问题，项目组将项目分为7个专题进行全面深入的研究，包括病菌生物学和病害流行规律、病菌致病机制、病菌检测技术、西瓜甜瓜种子生产中病害防治关键技术、西瓜甜瓜种子采后处理技术、西瓜甜瓜嫁接苗安全生产技术、病害综合防控关键技术集成与示范等。

（一）果斑病菌生物学和病害流行规律研究

（1）果斑病菌种群结构和遗传多样性分析。采用多位点序列分型法对93株果斑病

菌进行了遗传多样性分析,结果表明存在两个克隆复合体 CC1 和 CC2,其中 CC1 包含了 5 个序列分型 (ST1、ST2、ST3、ST4、ST11),CC2 包含了 6 个序列分型 (ST5、ST6、ST7、ST8、ST9、ST10)。对不同来源菌株的分群结果显示,中国菌株大多数归属于 CC1 种群,而全球其他地区的菌株主要归属于 CC2 种群。基于 *hrp* 基因簇可变区分析,将 101 株供试果斑病分为 A、B、C 三种基因型,A 型菌株多分离自甜瓜,而 B 型菌株多分离自西瓜,A 型菌株和 B 型菌株的同源性为 90%,中国和美国的 A、B 型菌株具有 100% 的同源性。C 型菌株变异较大,可能为 A 和 B 的进化型。

(2) 果斑病菌寄主范围和寄主抗性研究。对我国主栽的 30 个西瓜品种和 18 个甜瓜品种在人工接种条件下进行了抗病性评价,结果显示,不同西瓜品种的病情指数为 3.70~81.48,甜瓜品种的病情指数为 12.50~100,显示出了不同品种病菌的不同抗性,但均未发现高抗品种。使用 10 株果斑病菌分别对葫芦、哈密瓜、南瓜、甜瓜、西瓜和香瓜进行喷雾接菌,结果表明不同类型的菌株在不同寄主上的致病力存在差异。

(3) 果斑病菌侵染规律及病害发生流行条件研究。证实 *hrcR* 基因功能的缺失不影响果斑病菌在寄主体内的定殖和扩展;初步证实瓜类细菌性果斑病是系统性病害;明确了温湿度对果斑病发生的影响,证明高温有利于病原菌在甜瓜植株体内的定殖和扩展。

(4) 田间病害初侵染来源及病菌传播扩散动态研究。明确来源于杂草及水稻上的噬酸菌可能成为西瓜果斑病菌的田间初侵染来源;实验初步证明了瓜类细菌性果斑病菌可以在杂草种子中存活,并可能再次导致寄主发病。明确了 T4SS 及 T6SS 的相关基因分别影响果斑病菌从种子到种苗的传播,明确了 T2SS 对果斑病菌侵染定殖的影响。证实果斑病菌在铜离子诱导下可进入 VBNC 状态,可能成为田间病害的初侵染来源。明确并验证了 III 型分泌系统与 Ac 致病性相关。首次从果斑病菌中检测到群体感应信号分子-AHL,并证明其对果斑菌的致病性具有调控作用。明确了果斑病菌侵染西瓜子叶后,寄主的 harpin-binding 蛋白、反转录转座子 Ty1-copia 蛋白(推定)等病程相关蛋白表达量增加,钙离子-ATP 酶结合蛋白等信号传递相关蛋白表达量发生变化。成功获得了能稳定高效表达 *GFP* 和 *RFP* 基因的果斑病菌工程菌株,用已经标记 *GFP* 和 *RFP* 基因的果斑病菌进行西瓜根部和叶部的侵染定殖及定殖动态研究。

(5) 不同管理模式对果斑病田间病害发生的影响研究。明确了果斑病在轮作地块的发病轻于连作地块,地势高地块轻于地势低地块,管理水平高的地块轻于管理水平低的地块,滴灌地块轻于串灌或漫灌地块。从施肥水平看,高氮低钾施肥处理叶发病率最高,平衡施肥处理发病最轻。证明可以通过调节肥水管理减轻果斑病的发生。

(二) 果斑病菌致病机制解析

(1) 克隆了病菌的群体感应基因,并研究了群体感应基因与致病性的关系。克隆果斑病菌 Aac-5 菌株群体感应相关 *LuxI*、*LuxR* 基因,构建了相关基因缺失的突变菌株。明确了果斑病菌中存在着 *LuxI*/*LuxR* 的群体感应信号,接受信号的 *LuxR* 单突变体可以检测到群体感应信号,而产生信号的 *LuxI* 单突变体和双突变体菌株则不能;目前已经通过 HPLC-MS 方法确定了果斑病菌 Aac-5 的群体感应信号物质为 N-3-氧-己酰高丝氨酸

内酯。突变体菌株的运动性和胞外多糖并没有显著差异；而突变体的生物膜形成能力则明显强于野生型菌株；生长速度也发生明显变化；西瓜、甜瓜、黄瓜上的致病性实验都表明，*LuxI*、*LuxR* 的单突变体和双突变体的致病性都明显弱于野生型菌株；突变体中病菌致病相关基因的表达也呈现不同程度的降低，这表明果斑病菌中群体感应信号与病菌致病力间存在着直接的关联性。

(2) 克隆果斑病菌的致病相关基因，并对其功能进行了验证。构建了 *Acidovorax citrulli* MH21 转座子 Tn5 随机突变体库，对突变体库进行了大量生测筛选，获得致病力下降突变体 300 余株。通过处理瓜种子及盆栽实验确认基因与致病性的关系，并对其部分致病性相关的功能基因进行了较详细的遗传功能研究，包括亮氨酸生物合成关键基因 (*leuB* 基因)、群体感应系统基因、AHL 信号降解酶编码基因 *aiiA*、gamma-谷氨酰基转移酶 *GGT1* 基因、*gidA* 基因、纤维素酶基因等。

果胶裂解酶 *AcPel* 蛋白结构和致病性研究。通过构建 *Acpel* 基因缺失突变体及其互补菌株，并且对二者的致病性进行检测，确定 *AcPel* 为该病菌的关键致病因子，并获得 *AcPel* 蛋白三维结构。果斑病菌 III 型分泌系统及 TAT 转运系统相关基因的克隆与功能研究。构建了瓜类细菌性果斑病菌 III 型分泌系统 *hrcN*、*hrpE*、*hrcJ* 基因以及 *tatB* 基因的缺失突变体及其互补菌株，对其致病性、致敏性、群体感应、生长曲线、运动性、胞外多糖和生物膜形成能力等进行了测定。同时用荧光定量 PCR 的方法对其他基因的表达量进行了分析。证实了上述基因对致病性具有重要的作用。

(三) 果斑病菌及种子带菌快速检测技术研究

1. 细菌性果斑病菌的快速检测技术研究

筛选和优化选择性培养基。根据国外报道的培养基成分，经过改进，配制成能够专一地培养哈密瓜果斑病菌的选择性培养基 ASCM。经过生长率和专一性测定，能够作为生产上分离、培养和富集哈密瓜果斑病菌的培养基。实验结果表明，ASCM 选择性培养基可以有针对性地富集果斑病菌，同时抑制其他杂菌的生长，供试哈密瓜果斑病菌在 ASCM 上可正常生长，而供试非靶标菌株均不能在此培养基上生长。

制备果斑病菌的抗血清。制备了哈密瓜果斑病菌的菌体抗原和菌体全蛋白抗原，并制得了效价较高，专一性较强的抗血清，提纯了免疫球蛋白 IgG。利用间接 ELISA 法进行了哈密瓜果斑病菌检测最小浓度的测定和种子带菌的模拟检测，最小检测浓度可达 3×10^5 CFU/ml。

胶体金试纸条检测方法的建立。制备了瓜类细菌性果斑病菌单克隆抗体，并利用其成功组装了胶体金检测试纸条。经验证该试纸条可特异性的检测出瓜类细菌性果斑病菌，检测灵敏度为 10^6 CFU/ml。将免疫胶体金试纸条检测与 PCR 方法结合，将检测样品为阳性的试纸条的检测条带直接进行 PCR 检测。免疫胶体金试纸条从蛋白层面上进行了初筛，同时对目标细菌进行了富集与纯化，在一定程度上去除了样品中的 PCR 聚合酶抑制物质，而后利用 PCR 进行核酸的检测，从核酸层面上验证试纸条检测的结果，两种技术相互验证，提高了检测的准确性，也简化了普通 PCR 的样品处理步骤，方便快速。

PCR 检测技术。利用 16S-23S rDNA ITS 序列, 设计并筛选出一对专一性较强的引物, 同时确定了 PCR 检测果斑病菌的方法, 测定了直接菌体 PCR 检测果斑病菌的最小浓度, 并模拟进行了种子带菌检测, 其检测精度均可达到 3×10^5 CFU/ml。另外, 设计合成了 Taq Man 水解探针, 确定了实时定量 PCR 检测哈密瓜果斑病菌的方法, 并模拟进行了种子带菌检测, 检测精度可达到 3×10^4 CFU/ml。

将免疫方法与 PCR 方法有机结合, 形成 IMS-PCR。此方法利用免疫吸附磁性分离的灵敏、专一、快速等特点, 达到了将哈密瓜果斑病菌快速富集, 同时去除种子残渣等杂质影响的目的, 将 PCR 检测的精度提高到了 3×10^2 CFU/ml。

将生物学、免疫学和分子生物学方法有机地结合, 即将 MOPS 分离病原菌、ASCM 培养基预富集、IMS- (实时定量) PCR 技术结合起来, 建立了哈密瓜果斑病菌快速检测的方法, 该方法避免了使用某一单项技术时产生的漏检和假阳性, 增加了检测的灵敏度和专一性, 提高检测的可行性。将此检测方法应用于模拟种子带菌检测时, 可检测到每千粒 (商品) 种子中的一粒带菌种子, 且信号仍较强。

LAMP 检测技术体系的构件和优化。针对瓜类细菌性果斑病菌的 *upgB* 基因的 6 个特定区域, 设计能识别这 6 个特定区域的 4 种特异性引物, 并对 $MgCl_2$ 、甜菜碱、反应时间、反应温度等 LAMP 反应条件进行优化。构建了瓜类细菌性果斑病的 LAMP 检测方法, 该方法特异性高, 能很好地将果斑病菌的几个近源种区分开来; 对菌液的灵敏度可达到 10^2 CFU/ml; 能够检测到人工接菌的单粒种子; 能够直接检测病叶的研磨液, 适宜在基层实验室和田间现场快速检测。

交叉扩增检测技术研究。利用交叉引物扩增 (Cross Priming Amplification) 结合封闭核酸试纸条建立了果斑病菌快速检测方法。通过恒温 $63^\circ C$ 条件进行扩增 40min 后直接将扩增管放入封闭式核酸试纸条检测装置, 5min 显示结果。适合于简易条件或现场使用。

果斑病菌活体检测方法的建立。首次将 DNA 染料结合 PCR 检测方法引入瓜类细菌性果斑病菌检测, 建立了叠氮溴化丙锭 (PMA) 与实时荧光 PCR 相结合的瓜类细菌性果斑病菌活体检测方法。通过用 PMA 对样品进行前处理, 使 PMA 与样品中死细胞的 DNA 分子共价交联, 从而抑制死菌 DNA 分子的 PCR 扩增, 特异性检测出样品中的活菌。该方法的建立为初步确定检测鉴别病菌活细胞提供了新方法, 克服了基于 DNA 分子检测手段不能鉴别死活细胞, 导致过高估计活细胞的数量, 甚至产生假阳性结果的弊端, 可以更有效地为该病害的预防控制提供可靠依据。

瓜类细菌性果斑病菌 Biolog 鉴定基准库的建立。本研究利用 Biolog 微生物鉴定系统对收集到的瓜类细菌性果斑病菌及其近似菌株 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*、*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*、*Acidovorax konjaci* 进行了鉴定, 并根据鉴定结果建立了一个含有这 4 种病原菌数据信息的自定义数据库, 该数据库含有大量来自不同地区不同分离物的瓜类细菌性果斑病菌及其近似菌株的信息, 其建立对于瓜类细菌性果斑病菌及其近似病菌的检测鉴定具有重要的理论和实践意义。

建立了基于基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI TOF MS) 对果斑病菌及其近似种的检测与鉴定方法; 建立了基于 Padlock 探针的西瓜噬酸菌检测技术研究, 和

Real-time PCR 的西瓜噬酸菌检测技术研究进行了比较研究。从选择性培养基和种子提取缓冲液的角度,对葫芦科种子携带果斑病菌 Bio-PCR 检测方法进行了改良。首次在国内外建立了果斑病菌的红外和蛋白质谱检测技术。

2. 西瓜甜瓜种子带细菌性果斑病菌的快速检测技术研究

种子样品前处理技术。经过实验证明, MOPS 分离液可用于哈密瓜果斑病菌的初步分离,其效果强于 PBS 缓冲液。

种子带菌检测技术。LAMP 快速检测技术能够检测到单粒种子是否带菌,同时能够直接检测病叶的研磨液,来判定是否为瓜类细菌性果斑病。采用 LAMP 快速检测技术对市场上的 77 份商品种子进行了检测,检测结果对种子消毒处理具有重要的指导意义。

检测试剂盒的研制。ELISA 检测试剂盒的研制。利用已制备的瓜类细菌性果斑病菌单克隆抗体及多克隆抗体组装了 TAS-ELISA 检测试剂盒,经验证该试剂盒除与 *Acidovorax avenae* 种下菌有轻微交叉反应外,与其他对照菌均无交叉反应,灵敏度可达 1×10^5 CFU/ml,对发病叶片可检测到 800 倍稀释液。因此,所建立的 TAS-ELISA 方法可比较特异检测细菌性果斑病菌,与国外同类产品相当,适合对该病菌进行普查、监测及病害流行学研究的快速诊断。利用交叉引物扩增试剂盒的研制。利用交叉引物扩增结合封闭核酸试纸条建立了果斑病菌快速检测方法。该方法组装的试剂盒所有检测试剂均可常温保存,只需要恒温装置(热水瓶也可),无需其他任何设备,适合于简易条件或现场使用,已经在实际生产中运用。实时荧光检测试剂盒的研制。通过比较已报道的瓜类细菌性果斑病菌的基因组与其近缘种之间的差异,找出特异性序列并设计引物探针,建立了瓜类细菌性果斑病菌实时荧光 PCR 检测方法。并利用该引物探针组装了瓜类细菌性果斑病菌实时荧光检测试剂盒,经验证该试剂盒能够特异性的检测出瓜类细菌性果斑病菌,与 *Acidovorax avenae* 种下其他菌及其他属的对照菌均无交叉反应,灵敏度可达 1×10^3 CFU/ml。

PCR 试剂固体化技术研究。利用真空冷冻干燥技术,通过对保护剂组分的选择,含量的调整优化、成型方式及冻干方式的选择与优化,制成了能常温保存的固体化 PCR 检测试剂。所研制的 PCR 固体小球的形状美观,在使用中直接加入 PCR 模板及水即可进行 PCR 反应。该固体化试剂可长时间室温保存,便于现场应用及远距离运输,解决了目前国内所用 PCR 试剂均为液体,需低温保藏而引发的问题,具有广阔的应用前景。

(四) 西瓜甜瓜健康种子生产技术与示范

(1) 细菌性果斑病菌在西瓜甜瓜良种生产与采种过程中侵染定殖的主要关键因子。通过对带菌亲本种子与制种地细菌性果斑病发生的关系研究;不同温度条件对细菌性果斑病发生的影响研究;制种田不同栽培密度、不同灌溉方式及不同采种技术、采种工具条件下西瓜甜瓜细菌性果斑病发生情况及种子带菌率研究;调查和分析不同采收消毒和干燥技术对细菌性果斑病等种传病害种子带菌的关系的研究;以及在西瓜甜瓜良种生产中细菌性果斑病菌防治研究;探明影响细菌性果斑病菌在西瓜甜瓜良种生产