

广西上思县桉树青枯病原菌致病性的研究

邓兆峰, 方丽英, 吕成群, 黄宝灵* (1. 广西大学林学院, 广西南宁 530004; 2. 广西区林业局, 广西南宁 530022)

摘要 [目的] 为林业生产防治青枯病提供理论指导。[方法] 从广西上思县2种发病症状的桉树病株根上收集青枯病病原菌, 按柯赫原则研究其致病性。[结果] 2种症状的90%以上分离物的菌落形态完全相同, 分离培养证实均是与自然界的青枯病菌。人工培养基上培养的慢性型青枯病菌部分菌株发生变异, 致病性减弱甚至丧失, 急性型青枯病菌的菌株致病性未减弱。接种试验表明, 急性型症状病株上分离所得青枯病病原菌致病力强于慢性型症状的病原菌, 桉树苗木死亡率高, 发病时间早, 发病程度也有一定差异。[结论] 2种症状分离到的病原菌都为青枯病菌, 均有明显致病性, 急性型病原菌致病力强于慢性型, 筛选出4个致病力较强的菌株。

关键词 桉树青枯病; 病原菌; 接种试验; 致病性

中图分类号 S763.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)03-01101-02

Studies on the Pathogenicity of Eucalyptus bacterial Wilt Pathogens in Shangsi County of Guangxi Province

DENG Zhao-feng et al (College of Forestry, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004)

Abstract [Objective] The study aimed to provide theoretical guidance for controlling bacterial wilt in forestry production. [Method] Eucalyptus bacterial wilt pathogens were collected from roots of diseased eucalyptus plants with 2 kinds of disease symptoms in Shangsi County Guangxi Province, and their pathogenicities were studied according to Kohn's rule. [Result] The colony morphologies of more than 90% of isolates from 2 kinds of symptoms were completely same, and isolation and culture experiments validated that they were identical with natural bacterial wilt pathogens. The mutation occurred on part bacterial strains of chronic bacterial wilt pathogens cultured on artificial medium, with pathogenicity weakening and even losing. The pathogenicity of bacterial strain of emergent bacterial wilt pathogens didn't weaken. Inoculation experiment showed that the pathogenicity of bacterial wilt pathogens isolated from diseased plant with emergent symptom was stronger than that of pathogens from chronic symptom. The seedlings mortality of Eucalyptus was high and the disease occurrence was early with the diseased degrees with some difference. [Conclusion] The pathogens isolated from both the 2 symptoms were pathogens of bacterial wilt and had obvious pathogenicity. The pathogenicity of emergent pathogens was stronger than that of chronic pathogens and 4 bacterial strains with stronger pathogenicity were selected out.

Key words Eucalyptus bacterial wilt; Pathogenic germs; Inoculation test; Pathogenicity

桉树(*Eucalyptus* spp.)原产地为澳大利亚和印度尼西亚附近的少数岛屿,近年来作为重要的速生商品树,在我国南方大面积种植,但桉树青枯病危害较严重。桉树青枯病是由青枯假单胞杆菌(*Pseudomonas solanacearum*)引起的一种系统性维管束细菌病害^[1],近年来在华南地区发生日趋严重,在流行年份,感病桉树品种(系)当年新造幼林发病率20%~40%,高感桉树品种(系)达60%以上^[2],严重威胁着桉树产业的持续发展。由于该病病原复杂,给生产防治带来较大的困难,因此,笔者研究其病原菌,以期防治提供理论指导。

1 内容与方法

1.1 采样地概况、采样方法及发病情况

1.1.1 采样地概况。采样地位于广西南部的上思县公正乡,桉树林为广林巨尾桉9号无性系1年生幼林,造林当年于夏、秋两度发生青枯病危害。

1.1.2 采样方法。选择发病季节和发病症状不同的两块样地进行调查采样。采样时间为2006年10月。按照病害分级法进行采样,即除了级外每个级别的发病植株都要采样。因为该病原菌由根部侵染,因此采集感病植株的根作为样本。分级标准:级,植株完全健康无病;级,出现梢部萎蔫;级,出现枯梢达1/3;级,出现枯梢达2/3;级,枯梢达2/3以上或全株枯死。

1.1.3 发病情况。按典型症状可分为急性型和慢性型两种。急性型表现为地上大部分或整株的枝、叶几天内失水萎蔫,失去正常光泽,但叶片仍保持青绿,稍卷曲而不易脱落,短期内植株枯死,枯死后一段时间叶片发黄脱落。该类型从发病到整株死亡只需1~3周。慢性型则地上部分枝叶出现

萎蔫或枝枯,或整株叶褪去正常绿色而显暗淡失水状,一般可从当年秋季开始发病维持至翌年夏季才整株枯死^[3],从发病到死亡需3~6个月或植株不会死亡。经对上思县公正乡受青枯病危害的广林巨尾桉9号无性系1年生幼林观测,初步确定样地1为急性型发病区;样地2为慢性型发病区。两样地青枯病发病既有大面积发生,也有零星分布。

1.2 供试病原菌

1.2.1 分离培养基。分离培养用PDA培养基[马铃薯(去皮)200g,琼脂20g,葡萄糖20g,水1000ml]^[4]。

1.2.2 病原菌的分离。在超净工作台内,用刀片将病根切成3~4cm长的小段,斜面平整,无菌水洗净,无菌纸吸干水分。将根的小段放入无菌培养皿中,待细菌菌液从切口处渗出后,用接种环蘸取少量菌液在PDA培养基上划线,然后置28℃恒温箱中培养^[5]。待长出菌落后,进行逐次划线培养,直到获得纯化菌株。将纯化菌种保存在无菌水中待用。

1.3 病原菌致病性的初步测定 青枯病细菌易发生变异,在人工培养基上培养后,其致病性会减弱甚至完全丧失。Kelnan于1953年发现在含TTC的培养基上,菌落的形状和颜色与致病性的强弱有关,可用来选择致病性强的菌系。

将稀释的青枯病病原菌悬浮液在含TTC的Kelnan培养基蛋白胨10g,葡萄糖10g,干酪素1g,琼脂18g,蒸馏水1000ml,TTC 0.05g^[6]平板上划线,36℃条件下培养36h后观察。每个菌株划3个平板,即为3个重复。致病性的菌落,形状不规则,带粘性,白色,中央浅粉红色;非致病性的菌落,很小,圆形,乳黄或深红色,边缘颜色较浅^[6]。

1.4 病原菌对苗木致病性的测定

1.4.1 接种试验。供试青枯病菌为分离纯化后所选的有致病力的菌株,在721型分光光度计波长650nm下用McFarland云度计将菌液调至 1.2×10^8 个/ml细菌浓度^[7];供试苗木为广林巨尾桉9号(GLG9)扦插幼苗,苗龄2个月,苗高20~25

基金项目 广西自然科学基金项目(桂科基0448005)。

作者简介 邓兆峰(1981-),男,山东泰安人,硕士研究生,研究方向:速生林培育理论与技术。* 通讯作者,博士,研究员,Email: hnboln@126.com。

收稿日期 2007-07-19

cm, 苗木生长健壮, 无病虫。

桉树幼苗的青枯病菌接种采用伤根接种法^[6], 先用消毒利刀均匀地在处理苗根部切除数刀, 然后3株为一处理, 重复4次, 进行水培, 在每处理水培液中加入15 ml 青枯菌液, 随后置于通风、光线充足的室内或走廊上, 在25~28℃条件下进行逐日观测(30 d), 并记录发病情况。桉树幼苗青枯病发病症状应为: 幼苗发病初期一般产生萎蔫, 随后出现枯叶, 幼苗迅速枯死, 病株根部出现坏死, 呈水渍状, 有臭味, 横切后出现乳黄色溢脓, 皮层和木质部均可出现上述症状^[11]。

1.4.2 病原菌侵染苗木的检验。发病苗木观测, 除观测苗木生长及发病症状外, 还进行幼茎或根系的维管束检查及病部的显微观察, 确定接种苗是否感病。同时对感病苗木进行病原菌的再分离培养, 与自然采集的染病树根作比较。

实验室内备好接种环、无菌水、PDA培养基、接种后的染病植株(茎或根)、自然采集的染病树根。将两种组织分离所得的病原菌用接种环在PDA培养基上划线, 放入28℃的恒温箱中培养, 观察比较菌落形态、染色反应等。

2 结果与分析

2.1 病原菌的获得 2006年10月, 采集两个不同样地的桉树病株, 从其根部进行病原菌的分离培养。结果表明: 90%以上的分离物, 经培养发现菌落形态完全相同。菌落表面先是光滑乳白色、粘稠状, 然后变成污白色到深褐色。少量产生其他菌的菌落。将两样地青枯病分离物编号为: -1-1、-1-1、-1-1、-1-2; -2-1、-2-2、-2-1、-2-2、-2-1、-2-2、-2-1、-2-2。(其中、、代表发病植株的级别, 中间的1、2为样地号, 第三位数字为分离所得的同一样地的菌株号)。其中在样地1的级病株上未分离得到病原菌。

2.2 病原菌的致病性

2.2.1 病原菌致病性的初步测定结果。由表1可见, 样地1的4个菌株都具有致病性, 在培养的过程中未发生变异, 其致病性未减弱, 说明这些菌株相对较稳定, 属于急性型青枯病菌。样地2的-2-1菌株可能在培养过程中发生变异丧失致病性, -2-1与-2-1两个菌株部分丧失致病性。说明样地2的菌株不照样地1的稳定, 属于慢性型青枯病菌。尽管如此, 在样地2不同发病级别的样本中, 都同时获得了有致病性的菌株(-2-2, -2-2, -2-1, -2-2, -2-2), 说明样地2病原菌具多样性和复杂性, 也说明慢性型青枯病致病症状的多样性和复杂性。

2.2.2 病原菌对苗木致病性的测定结果。经观察(表2), 接种病原菌的幼苗发病症状与桉树幼苗青枯病发病症状一致。巨尾桉广9幼苗截根接种青枯病菌的发病天数普遍较早, 为2~4 d, 最早发病仅需2 d。不仅发病天数短, 死亡率也较高。而未接种的对照苗木生长正常。其中, 接种样地1的青枯病原菌的苗木发病时间普遍比样地2的菌株早, 多为2 d, 而样地2的多为3 d, -2-1为4 d; 苗木死亡率也以接种样地1的青枯病原菌为高, 在75.0%~91.7%, 其中菌株-1-1的致苗死亡率达91.7%, 是供试菌株中致病性最强的。而样地2的病原菌的致苗死亡率普遍较低, 致病性分化较大, 其中-2-1菌株的死亡率最低, 致病性最弱, 致苗死亡率只有50.0%。

此结果与病原菌致病性的初步测定结果一致。样地1与样地2病原菌都有致病性, 发病程度有一定的差异, 可能属于不同的青枯小种。

表1 两样地病原菌的致病性

Table 1 Pathogenicity of pathogenic germs from two sampling sites.

菌株号 No. of strain	重复一 Repeat 1	重复二 Repeat 2	重复三 Repeat 3
-1-1	-	-	-
-1-1	-	-	-
-1-1	-	-	-
-1-2	-	-	-
-2-1	+++	+	+
-2-2	-	-	-
-2-1	-	-	+++
-2-2	-	-	-
-2-1	-	-	-
-2-2	-	-	-
-2-1	+++	-	+++
-2-2	-	-	-

注: “-”表示菌落为白色, 中央为浅粉红色具有致病性; “+”表示菌落乳黄或深红色, 为无致病性的菌落, 其中“+”越多表示颜色越深。

Note: “-” indicates white colony, pink in center, with pathogenicity; “+” indicate milk yellow or carmine colony, without pathogenicity, more “+” means deeper color.

表2 广林巨尾桉9号截根接种青枯病病原菌结果

Table 2 Results of inoculating pathogenic germs of bacterial wilt on Eucalyptus by cutting root

菌株代号 No. of strain	调查株数 No. of plants investigated	最早发病天数 Days from first disease	死亡株数 No. of dead plants	死亡率 Mortality rate
-1-1	12	3	9	75.0
-1-1	12	2	10	83.3
-1-1	12	2	11	91.7
-1-2	12	2	10	83.3
-2-2	12	3	9	75.0
-2-2	12	3	8	66.7
-2-1	12	4	6	50.0
-2-2	12	3	8	66.7
-2-2	12	2	10	83.3
CK	12	-	0	0

2.2.3 病原菌侵染苗木的检验结果。对接种后感病的植株病根进行分离培养与自然感病(CK)的病根分离培养比较, 其菌落的形状均为圆形, 边缘整齐, 表面凸起光滑, 不透明、粘稠, 颜色完全相同, 先为乳白色, 然后逐渐变为浅褐色, 最后变为褐色, 革兰氏染色均为阴性, 说明接种后染病病根所分离出的病原菌与自然感病病根的病原菌相同, 证明了供试的青枯病病原菌是造成桉树青枯病害的病原菌。

3 结论

广西上思县桉树青枯病的病害症状有急性型和慢性型两种, 其发生分布和危害程度有明显区别。两种症状的病原菌经分离、接种试验及再分离培养试验都证实为青枯病原菌。将分离获得的青枯病原菌菌株在含TTC的Kelman培养基

(下转第1113页)

表1 不同浓度乙醇提取物对枸杞蚜虫的杀虫活性 %

Table 1 Insecticidal activity of different ethanol extracts concentration on wolfberry aphid

浓度 ng/ml	24 h		48 h	
	死亡率	校正死亡率	死亡率	校正死亡率
Concentration	Mortality	Corrected mortality	Mortality	Corrected mortality
50.000	92.67	92.47	96.67	96.38
25.000	71.33	70.54	82.00	80.43
12.500	46.67	45.21	58.00	54.35
6.250	28.67	26.71	41.33	36.23
3.125	16.67	14.38	24.00	17.39
CK	2.67	-	8.00	-

注:每处理30头,重复5次。下表同。

Nte: The number in each treatment is 30, and 5 repeats. The same as below.

由表1可见,乙醇提取物对枸杞蚜虫有较好的杀虫效果。随着浓度的增大和时间的延长,枸杞蚜虫的校正死亡率都在升高;浓度为50.00 ng/ml,48 h校正死亡率可达96.38%,毒力回归方程为: $y = 2.220x + 2.859$, $LC_{50} = 9.21$ ng/ml, $r = 0.9907$ 。

2.2 不同萃取物对枸杞蚜虫的杀虫活性 将“1.2.1”所得萃取物各称取0.1 g,用50%丙酮配成4 ng/ml的供试浓度,采用“1.2.2”的方法进行杀虫活性测试,结果见表2。

表2 不同萃取物对枸杞蚜虫的杀虫活性 %

Table 2 Insecticidal activity of different extracts on wolfberry aphid

萃取物 Extract	24 h		48 h	
	死亡率	校正死亡率	死亡率	校正死亡率
	Mortality	Corrected mortality	Mortality	Corrected mortality
石油醚萃取物 Petroleum ether extract	93.33	93.15	96.67	96.38
氯仿萃取物 Chloroform extract	42.00	40.41	53.33	49.27
乙酸乙酯萃取物 Ethyl acetate extract	22.67	20.54	29.33	23.18
正丁醇萃取物 Butanol extract	84.67	84.25	90.67	89.86
水萃取物 Water extract	16.00	13.70	26.67	20.29
CK	2.67	-	8.00	-

(上接第1102页)

上培养证实:部分菌株在培养过程中发生了变异,其致病性减弱甚至丧失。病原接种试验证实:接种急性型症状病株上分离所得青枯病病原菌的桉树苗木死亡率普遍高于接种慢性型青枯病病原菌的。急性型症状的病原菌致病力强于慢性型症状的病原菌,筛选出4个致病力较强的菌株(-1-1、-1-1、-1-2、-2-2),其中-1-1菌株的致病力最强。

林雪坚等^[8]从广东不同地区,不同桉树品种上分离的青枯病原细菌经鉴定为青枯假胞菌,属青枯小种1号、生物型号,不同菌株毒性差异的测定结果表明都有致病性,发病程度无明显差异。而吴光金等^[9]从广东、广西、海南桉树青枯病流行区采集病菌进行病菌生理小种和生物型的鉴定后认为,广东省的桉树青枯病菌主要是小种1号,广西和海南除小种1号外还有小种2号和3号;生物型主要归属于生物型号,生物型、号较少;除、号外,还发现有一些尚难归入Hayward的5个生物型中其他的生物型。说明广西的桉

表2表明,各萃取物对枸杞蚜虫的杀虫活性存在显著差异,杀虫活性由大到小依次为:石油醚萃取物>正丁醇萃取物>氯仿萃取物>乙酸乙酯萃取物>水萃取物。其中石油醚萃取物的杀虫效果最高,48 h的校正死亡率可达96.38%;而水萃取物的杀虫效果最低,48 h的校正死亡率为20.29%。这说明穗花马先蒿的杀虫活性部分主要是酯溶性的弱极性物质,具体成分有待进一步研究。

3 结论与讨论

(1) 该试验采用冷浸和超声提取相结合的方法,以95%的乙醇作提取剂,料液比为1:10,提取穗花马先蒿杀虫活性成分,得率为15.30%。

(2) 穗花马先蒿乙醇提取物对枸杞蚜虫具有较好的杀虫活性, LC_{50} 为9.21 ng/ml。

(3) 通过比较不同极性萃取物的活性得出,穗花马先蒿的杀虫活性成分主要是酯溶性的弱极性物质,且主要分布在石油醚所在极性范围内,这为穗花马先蒿活性成分的进一步分离纯化研究提供了理论依据。

(4) 目前对穗花马先蒿的研究主要集中在药理活性,而该研究发现其对枸杞蚜虫具有较好杀虫效果。这为进一步研究和利用穗花马先蒿,从中寻找出高活性的杀虫物质,将其开发成新型的植物源农药具有参考价值。

参考文献

- [1] 洪波,王坚,钱永德,等.宁夏枸杞蚜虫抗药性测定及防治试验[J].宁夏农学院学报,2000,21(4):30-34.
- [2] 王元兰,何平,曹福祥.苦楝果乙醇提取物对卫矛尺蠖生物活性的影响[J].安徽农业科学,2006,34(9):1837-1838.
- [3] 彭跃峰,鲁红学,刘铁铮.紫茉莉茎提取物及其萃取物对菜粉蝶幼虫的生物活性[J].安徽农业科学,2007,35(13):3986-3988.
- [4] 邢世瑞.宁夏-中药志[M].银川:宁夏人民出版社,1991.
- [5] JIA ZHONGJIAN, LIU ZIMIN, WANG CHANGZENG. Phenylpropanoid and iridoid glycosides from *Pedicularis spicata* [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(11): 3745-3747.
- [6] 关放,于兰,杨云.马先蒿属植物的研究进展[J].西北药学杂志,2006,21(3):142-143.
- [7] 汤丽梅,李保同.茛菪酮对蚜虫生物活性的研究[J].热带作物学报,2002,23(4):85-88.

树青枯病原菌具有多样性和复杂性。该试验虽未对供试的青枯病原菌进行生理小种和生物型的鉴定,但从试验结果可知,广西的桉树青枯菌种群组成较复杂。因此,建议生产单位在进行桉树青枯病防治时,应充分了解各桉树栽培区病菌的毒性差异,有针对性地进行综合防治。

参考文献

- [1] 祁述雄.中国桉树[M].2版.北京:中国林业出版社,2002:228.
- [2] 伍慧雄,王胜坤,孙思.桉树青枯病的发生与防治[J].广东林业科技,2006,22(3):53.
- [3] 蒙美琼,文凤芝,黄金义,等.桉树青枯病的研究[J].广西植保,1996,9(2):10.
- [4] 周德庆.微生物学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1986:277.
- [5] V K MCHAN.青枯病的分离和鉴定[J].国外农学:油料作物,1996(1):51.
- [6] 方中达.植病研究方法[M].北京:农业出版社,1979:83,228,361.
- [7] 莫非,莫晓勇.桉树无性系抗青枯病性能的测选初报[J].热带林业,2003,31(3):10-12.
- [8] 林雪坚,吴光金,石明旺,等.桉树青枯病病原菌的研究[J].湖南林业科技,1993,20(2):6-10.
- [9] 吴光金,林雪坚,李冬,等.桉树青枯病流行区病菌小种和生物型的鉴定[J].中南林学院学报,2004,24(1):27-29.