

木麻黄青枯病菌小种和菌系的鉴定*

梁子超 陈小华**

(林学系)

提 要

从华南沿海各病区采集的6个木麻黄青枯菌分离株,通过对寄主范围、浸润反应和色素形成的测定,均表现能侵染多种茄科植物,而不能侵染香蕉;浸润于烟叶上引致坏死反应;在含L-酪氨酸的培养基上产生大量黑素。因此,确认其属于青枯菌小种1。各分离株均能利用半乳糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇产酸,而对乳糖、麦芽糖和纤维二糖的利用能力则不同,分属于Hayward的生化型Ⅲ和Ⅵ。各分离株的其它细菌学特性也稍有差异。根据各分离株的致病性、菌落形态、生化反应和血清反应的差异,上述6个木麻黄青枯菌分离株可划分为三个菌系,SC—1、SC—2和SC—3。

木麻黄青枯病是由青枯菌 (*Pseudomonas solanacearum* E.F.Smith) 引起的一种严重的木麻黄病害。近十多年来,造成木麻黄的大量死亡,严重者死亡率可达90%以上,对华南沿海以木麻黄为主要结构树种的海岸防护林网有严重的威胁。

青枯病的防治非常困难,选育和推广抗病品种似乎是最好的办法^[2,3]。选育抗病品种之前应先了解清楚推广区内病原菌的小种和菌系,才能保证筛选出来的品种具有较稳定的抗性^{[2,2][2,3]}。

国际上对青枯菌小种和菌系的研究较多。青枯菌可依据其寄主范围分种为三个小种^[4]。菌系的划分则十分多样,主要依据是致病性、菌落形态、生化反应、血清学特性和溶原性等细菌学特性等^{[3][4][6][7]}。

国内对青枯菌小种和菌系的研究尚未有报道^[10],对木麻黄青枯菌的小种归属和菌系的划分亦无研究。为了抗病育种工作的需要,本试验从致病性、浸润反应、菌落特征、生化反应和血清学特性等几个方面,对木麻黄青枯菌的小种和菌系进行了鉴定。

材 料 与 方 法

本研究菌种的来源,是从广东沿海及福建东山岛的木麻黄青枯病株中分离的,3个对比的分离株是从其它经济作物上分离的(表1)。

* 本文经林学系答辩委员会陆大京研究员、王庄、黎毓千教授、岑炳沾讲师审议通过,并经王庄教授、黄场英付研究员审阅,一并表示感谢。

** 1978—1981年研究生

表 1 木麻黄青枯菌小种和菌系鉴别所用分离株的来源

分离号	分离寄主	分离地点	分离时间	分离者
ZJ-2	木麻黄	广东湛江 (Zhan Jiang)	1980.5	作者
DB-3	木麻黄	广东电白 (Dian Bai)	1980.8	作者
DB-4	木麻黄	同上	1980.11	作者
SP-2	木麻黄	广州石牌 (Shi Pai)	1980.6	作者
HL-1	木麻黄	广东惠来 (Hui Lai)	1980.8	作者
DS-2	木麻黄	福建东山 (Dong Shan)	1980.8	作者
CS-1	马铃薯	湖南长沙 (Chang Sha)	1980.6	罗宽
GZ-2	花生	广州 (Guang Zhou)	1980.5	李子仁
GD-1	番茄	广东 (Guang Dong)	1978	广东农科院植保所

以上分离株经接种确定其致病性后, 均保存于无菌蒸馏水中^[17], 并定期于TTC培养基^[15] (旦白胨1%, 葡萄糖1%, 水解乳旦白0.1%, 琼脂1.8%, 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑0.005%) 上划线观察, 以保证其致病力不致衰退。

(一) 小种 (Race) 的鉴定

1. 寄主范围: 木麻黄 (*Casuarina equisetifolia* L.) 取用感病母株一年生苗木的小枝, 用无性繁殖的方法进行繁殖, 成活后栽于花盆中, 5周后用Winstead和Kelman^[24]的切根淋菌法接种; 香蕉 (*Musa* AAA大种高把) 选取高度为15—30厘米的健康分蘖苗, 用Buddenhagen^[1]的方法, 向假茎内注射2毫升菌液; 马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.), 花生 (*Arachis hypogaea* L.) 番茄 (*Lycopersicon esculentum* L.), 茄子 (*Solanum melongena* L.) 和烟草 (*Nicotinia tabacum* L.) 等均采用常规方式育苗, 长至4—5片叶时用刺茎法^[24]接种。除香蕉只设2个重复, 每重复3株外, 其余均重复3次以上, 每重复5株以上。植株接种后置于恒温30°C, 相对湿度65—70%的温室中, 15天后统计发病结果。

2. 烟叶浸润反应: 按Lozano和Sequeira^[19]的方法, 用浓度为 10^8 细菌/毫升的菌液浸润生长7周左右的烟草叶片。为利于比较, 各分离株浸润在同一叶片上的不同地方。每次浸润5—10张叶片, 分别重复3—4次。浸润后的烟草植株保存于30°C的温室中, 每隔12小时观察记录一次叶片的反应, 到60小时作最后记录。

3. 黑素的产生: 在不含TTC盐的TTC基础培养基中加入0.1%的L-酪氨酸^[7], 接种后分别于24、48和72小时进行观察, 根据培养基变黑变褐的程度, 比较各分离株产生黑素的能力。

(二) 各种专化型 (Specific type) 的鉴定

1. 致病型: 用各分离株接种番茄, 花生, 烟草和茄子之后, 分别于第4、7、10和15日按以下病级标准记录各寄主的反应: 0 = 无症状; 1 = 1片叶萎蔫; 2 = 2片植株萎蔫; 3 = 3片植株萎蔫; 4 = 全株萎蔫死亡。然后再按平均病级为3.1—4.0者为高度致病, 1.5—3.0者为中等致病, 0.1—1.5者为轻度致病及0为完全无致病性的标准进行归类。

2. 菌落型: 用French和Segueira^[7]的方法将各分离株接种于TTC培养基上, 32°C生长48小时后观察菌落的形态特征, 以4个最大菌落的长轴的平均数作菌落直径。

3. 生化特性和生化型: 用Hayward^[14]的方法, 测定各分离株利用碳水化合物产酸、还原硝酸盐产气和产生亚硝酸盐的能力, 以及聚β-羟基丁酸盐和丙二酸盐的利用, 七叶灵苷和淀粉的水解, 明胶的消解, 过氧化氢酶的活性, 耐盐性, 产氨和产色素等特性。

各种生理生化特性测定中所使用的琼脂是汕头水产品加工厂出品的纯化琼脂。所使用的蛋白胨是武汉生物制品厂的产品。其它药剂均是化学纯以上级别的试剂。所有的试验均在32±0.5°C下进行, 均重复3次以上。

4. 血清反应和血清型: 用浓度为4×10⁹细菌/毫升的生理盐水细菌悬浮液作抗原, 加入0.3%的福尔马林, 冰箱保存。

选用3.5市斤以上的健康家兔, 按Mushin等^[20]的程序, 分别于第1、3、4、6、7和8日静脉注射0.2毫升抗原, 于第11日采血。抗血清凝集效价为2560—10240。血清反应采用常规的试管凝集和双向琼脂渗透法。用经120°C处理2小时的细菌悬浮液^[6]作抗原, 用培养基的生理盐水浸洗液作对照。

结 果

(一) 木麻黄青枯菌小种归属

1. 寄主范围: 各木麻黄青枯菌分离株和马铃薯、花生、番茄等3个经济作物青枯菌分离株, 在人工接种的条件下均能侵染木麻黄和全部与试的茄科植物, 但均不能侵染香蕉。

2. 烟叶浸润反应: 烟草叶片在浸润后36小时, 各木麻黄青枯菌分离株和3个经济作物的青枯菌分离株的所有浸润点均出现淡褐色斑点。随着时间的增加, 斑点的颜色逐渐加深, 面积稍为增大, 但受到较大的叶脉的限制。到60小时后, 斑点变成深褐色, 边缘有一个黄褐色的晕环。与Lozano和Sequeira^[19]所描述的坏死反应症状相同, 而与过敏反应及黄化反应的症状不同。

3. 黑素的产生: 在加入了0.1% L-酪氨酸的培养基上, 各木麻黄青枯菌分离株和3个其它经济作物青枯菌分离株在48小时内就产生大量的黑素, 使整个培养基均变为褐色。

根据国外的报道, 青枯菌的三个小种的差异是明显的: 小种1侵染大多数茄科植物^[3], 浸润于烟叶上产生坏死反应^[19], 在含L-酪氨酸的培养基上产生大量的黑素^[1]; 小种2只侵染香蕉^[3], 浸润于烟草上产生过敏反应^[19], 在酪氨酸培养基上不产生或只产生很少黑素^[1]; 小种3侵染番茄和马铃薯, 但不侵染茄子和大多数茄科寄主^[1], 在烟叶上只引起黄化斑^[19], 在酪氨酸培养基上只产生少量的黑素^[19]。木麻黄青枯菌各分离菌株均能侵染多种茄科植物而均不能侵染香蕉, 浸润于烟草上引起坏死反应和在培养基上产生大量黑素。因此, 木麻黄青枯菌是属于青枯菌小种1。

(二) 木麻黄青枯菌专化型和菌系 (Strain) 的划分

1. 致病型: 各木麻黄青枯菌分离株对番茄, 花生, 烟草和茄子的致病力稍有差异(表2), 并可划分为3个致病型: ZJ—2和DB—4分离株属致病型1, 对以上4种寄主的致病力均属中等; SP—2分离株属致病型2, 对番茄致病力强, 对烟草和茄子的致病力中等, 而对花生则完全无致病力; DB—3、HL—1和DS—2分离株属于致病型3, 对番茄和茄子的致病力强, 但对花生和烟草的致病力中等。三种经济作物青枯菌分离株分别划为致病型4和5。

表2 各分离株致病性的比较

分离株	致病型	接种后第15天的发病情况			
		番 茄	花 生	烟 草	茄 子
ZJ—2	1	M	M	M	M
DB—4		M	M	M	M
SP—2	2	H	O	M	M
DB—3	3	H	M	M	H
HL—1		H	M	M	H
DS—2		H	M	M	H
GZ—2	4	M	H	L	H
CS—1	5	H	L	L	H
GD—1		H	L	L	H
对 照		O	O	O	O

H = 高度致病 (平均病级为3.1—4.0)

M = 中等致病 (平均病级为1.5—3.0)

L = 轻度致病 (平均病级为0.1—1.5)

O = 完全无致病性

2. 菌落型: 在32°C以下, 在TTC平板上生长48小时后, 各木麻黄青枯菌分离株和其它经济作物的青枯菌分离株的菌落形态、颜色、质地等均很相似, 呈现不规则近圆形, 稍隆起, 乳白色, 中间稍红或淡红, 有粘质, 有较强的流动性。但菌落的大小则差异较大, DB—3、HL—1和DS—2分离株的菌落较小, 直径为1.0—2.5毫米, 而其它分离株的直径均为2.5—4.0毫米。

3. 生化型: 各分离株利用碳水化合物产酸的结果(表3)表明, 根据其对乳糖、麦芽糖和纤维二糖以及对半乳糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇的利用情况, 各分离株可分别归入Hayward^[12]的生化型Ⅲ和Ⅵ。如再考虑其利用木糖和半乳糖能力的不同, 还可进一步将其分为4个亚型: Ⅲ₁型分离株包括SP—2和GD—1, 属Hayward^[12]的生化型Ⅲ, 利用木糖和半乳糖的能力都较强; Ⅲ₂型分离株包括DB—3、HL—1和DS—2, 也属生化型Ⅲ, 利用半乳糖能力较强, 但利用木糖的能力较弱; Ⅵ₁型分离株包括ZJ—2、DB—4和GZ—2, 属生化型Ⅵ, 不利用木糖, 利用半乳糖能力较弱; Ⅵ₂型分离菌株包括CS—1, 也属生化型Ⅵ, 不利用木糖, 利用半乳糖利用能力强。

表 3 各分离株利用碳水化合物产酸的能力的比较

分 离 株	生 化 型	生 化 亚 型	利 用 产 酸 能 力							
			葡 果 蔗 甘	糖 糖 油	乳 麦 芽 糖 纤维二糖	半乳糖醇 山梨糖醇 甘露糖醇	阿拉伯糖 山梨糖 水杨苷	水 糖	半 乳 糖	
SP— 2	Ⅱ	Ⅱ ₁	+	+	+	+	—	+	+	
GD—1			+	+	+	+	—	+	+	
DB—3		Ⅱ ₂	+	+	+	+	—	+	+	
HL—1			+	+	+	+	—	+	+	
DS—2			+	+	+	+	—	+	+	
ZJ— 2	Ⅳ	Ⅳ ₁	+	+	—	+	+	—	—	+
DB—4			+	+	—	+	+	—	—	+
GZ—2			+	+	—	+	+	—	—	+
CS— 1		Ⅳ ₂	+	+	—	+	+	—	—	+

• + + 在 2 至 7 日内使指示剂变黄；+ 在 8—14 日内使指示剂变黄；— 在 35 日内指示剂不变。

各木麻黄青枯菌分离株和 3 个其它经济作物的青枯菌分离株的其它生化特性均很一致，并与 Hayward^[13] 所列的特性相吻合。

4. 血清型：各分离株在交互凝集反应中，除了与本身的抗血清产生明显的凝集反应外，均能与其它分离株的抗血清产生明显的相互凝集反应。

双向琼脂渗透反应可将各木麻黄和 3 个其它经济作物青枯菌分离株分为 4 个血清型。血清型 I 包括 ZJ—2、DB—3、DB—4、HL—1、DS—2 和 GZ—2 等分离株；血清型 II 有 SP—2 分离株；血清型 III 有 CS—1 分离株；血清型 VI 有 GD—1 分离株。所有 4 个血清型的分离株，在与本身的或同一型内其它分离株的抗血清反应时，除 II 型只产生 2 条沉淀带外，I、III 和 VI 型均产生 3 条沉淀带。各型分离株相互反应时，I、II 和 VI 型之间产生 2 条沉淀带，而 III 型与其它各型反应只产生一条沉淀带（图 1）。各分离株相互反应时产生的沉淀带的位置相近，相邻的沉淀带接合也良好，表明各血清型分离株之间的抗原结构既有相同亦有差异。

综合上述测定结果，将各分离株的各种专化型列出如表 4。可以看出 6 个木麻黄青枯菌分离株分为三个组，组内各分离株的特性比较一致和稳定，没有互相交叉的现象，组间的差异则比较明显。因此，我们将从华南地区木麻黄病株上分离到的 6 个分离株，初步划分为 3 个菌系，暂称为 SC—1、SC—2 和 SC—3。

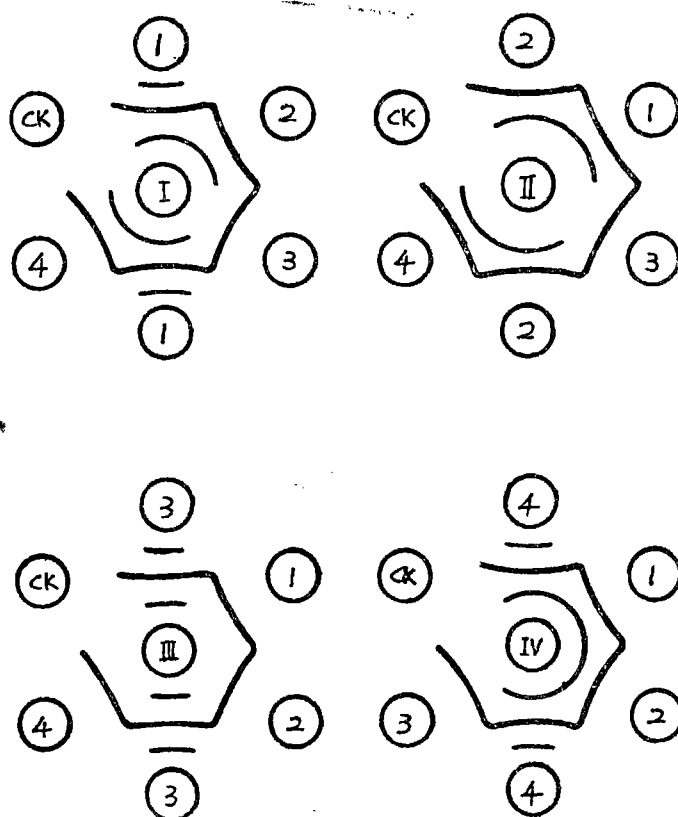


图1 双向琼脂渗透反应结果: 1、2、3、4组分离株分别与I、II、III、IV组抗血清反应, CK为加入等量的培养基浸洗液, 作为对照。

表4 各菌系特性的比较

菌系	分离株	来源	菌系的特性			
			致病型	菌落型	生化型	血清型
SC-1	DB-4	木麻黄	1	大	IV ₁	I
	ZJ-2	木麻黄				
SC-2	SP-2	木麻黄	2	大	III ₁	II
SC-3	DB-3	木麻黄	3	小	III ₂	I
	HL-1	木麻黄				
	DS-2	木麻黄				
SC-4	CS-1	马铃薯	5	大	IV ₂	III
SC-5	GZ-2	花生	4	大	IV ₁	I
SC-6	GD-1	番茄	5	大	III ₁	IV

讨 论

小种和菌系是人为的分类，划分的方法和依据不同，结果也就不同。目前，青枯菌小种的划分是比较明确的了^{[3][4][10]}，但种系的划分则十分多变^[7]。虽然Buddenhagen和Kelman^[4]在1964年曾提出过一个鉴别青枯菌菌系的假想的程序，但绝大多数的工作者仍然是单纯依据致病性^{[1][2][17][21]}，菌落特征^[7]或血清学特性^{[8][11][18]}来鉴定和划分青枯菌的菌系，综合考虑两个以上特性的人都很少^{[7][8]}。根据本研究的结果，致病性、菌落形态、生化特性和血清学特性均用可反映出木麻黄青枯菌的三个菌系在某些方面的差异（表4），但这几个特性互相间都没有明显的相关，因此，本试验以致病性为主，综合考虑其它的几种特性进行菌系的划分。

木麻黄青枯菌的三个菌系的地理分布不是一致的，如SC—3 既存在于粤西的电白，也存在于闽南的东山，另外在同一林地中也可存在不止一个的菌系，如电白林区就同时有SC—1 和SC—3。这与Okabe和Goto^[4]在日本所得的结果是一致的。由于适当的感病品种的系列和病原菌致病性的系列尚未建立起来，木麻黄不同品种对这3个木麻黄青枯菌菌系的抗性尚未清楚，木麻黄抗病品种的筛选至少也应通过这三个菌系的严格的接种检查。

木麻黄青枯菌分离株与3个参加比较的其它经济作物的青枯菌分离株均属小种1的范畴，但菌系的特性有一定的差异（表4）。由于3个经济作物的青枯菌分离株均能不同程度地侵染木麻黄，进行木麻黄抗青枯病品种筛选时，也应考虑到其它经济作物青枯菌的菌系。

引 用 文 献

- [1] Buddenhagen, I. W. 1960. Strains of *Pseudomonas solanacearum* in indigenous host in banana plantations of Costa Rica, and their relationship to bacterial wilt of banana. *Phytopathol.* 50: 660-664.
- [2] Buddenhagen, I. W., T. A. Elsasser, 1962 An insect-spread bacterial wilt epiphytotic of bluggoe banana. *Nature* 94: 164-165
- [3] Buddenhagen, I. W., L. Sequeira, A. Kelman 1962 Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathol.* 52: 726 (Abstr.)
- [4] Buddenhagen, I. W., A. Kelman 1964 Biological and physiological aspect of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2: 203-230.
- [5] Coleno, A., L. Hingand, B. Rat 1976 Some aspects of the serology of *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith. In Proc. First Int. Planning Conf. and Workshop on the Ecology and Control of Bacterial Wilt

- Caused by *Pseudomonas solanacearum*, ed. L. Siqueira, A. Kelman pp. 110-119 Raoeigh, N. C. 166 pp.
- [6] Digat, B., M. Cambra 1976 Specificity of antigen in *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith and application of serology for studying bacterial wilt. See Ref. 6, pp. 38-57.
- [7] French, E. R., L. Sequeira 1970 Strains of *Pseudomonas solanacearum* from central and south America : a comparative study. *Phytopathol.* 60 : 506-512.
- [8] Gnanamanickam, S. S., T. S., Lokeswari, K. R. Nandini 1979 Bacterial wilt of banana in Southern India. *Plant Dis. Repr.* 63: 525-528
- [9] Granada, G. A., L. Sequeira 1975 Characteristics of Colombian isolates of *Pseudomonas solanacearum* from tobacco. *Phytopathol.* 65 : 1004-1009.
- [10] Harrison, D. E. 1961 Bacterial wilt of potatoes I. field symptoms of the disease and studies on the causal organism *Pseudomonas solanacearum* variety *asiaticum*. *Austr. J. Agric. Res.* 12: 854-871.
- [11] Harrison, D. E., H. Freeman 1961 Bacterial wilt of potatoes II. serological relationship of two strain of *Pseudomonas solanacearum* and a culture of *Corynebacterium sepebonicum*. *Austr. J. Agric. Res.* 12: 872-877.
- [12] Hayward, A. C. 1964 Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Appl. Bact.* 27 : 265-277.
- [13] Hayward, A. C. 1976 Systematics and relationships of *Pseudomonas solanacearum*. See Ref. 6, pp. 6-21.
- [14] Hayward, A. C. 1976 Some techniques of importance in the identification of *Pseudomonas solanacearum*. See Ref. 6, pp. 136-142.
- [15] Kelman, A. 1954 The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathol.* 44 : 693-695.
- [16] Kelman, A., J. R. Cook 1977 Plant pathology in the People's Republic of China. *Ann. Rev. Phytopathol.* 15: 409-429.
- [17] Kelman, A., L. H. Person 1961 Strains of *Pseudomonas solanacearum* differing in pathogenicity to tobacco and peanut. *Phytopathol.* 51 : 158-161.
- [18] Koiima, E. S., I. W. Buddenhagen 1969 Antigenic relationship of strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathol.* 59: 1035-1036 (Abstr.)
- [19] Lozano, J. C., L. Sequeira 1970 Differentiation of races of *Pseudomonas*

- solanacearum* by a leaf infiltration technique. *Phytopathol.* 60: 833-838
- [20] Mushin, R., J. Naylor, N. Lahovary 1959 Studies on plant pathogenic bacteria II, serology. *Austr. J. Biol. Sci.* 12: 233-246.
- [21] Qunion, V. I., Aragaki and M. Ishii 1964 Pathogenicity and serological relationship of three strains of *Pseudomonas solanacearum* in Hawaii. *Phytopathol.* 54: 1096-1099.
- [22] Robinson, R. A. 1980 New concepts in breeding for disease resistance. *Ann. Rev. phytopathol.* 18: 189-210.
- [23] Thurston, H. D. 1976 Breeding for resistance to bacterial wilt. See *Rsf.* 6, pp. 150-155.
- [24] Winstead, N., A. Kelman 1952 Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathol.* 42: 628-634.

STRAINS OF *PSEUDOMONAS SOLANACEARUM* FROM BEEF WOOD IN SOUTH CHINA

Liang Zichao

Chen Xiaohua

(Department of Forestry)

ABSTRACT

The characteristics of pathogenicity, colony, biochemistry and serology of six isolates of *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith isolated from beef wood (*Casaurina equisetifolia*) on the coast of South China were tested. The results of the host range, infiltration and melanin formation revealed that all of these isolates belonged to Buddenhagen's race 1. Based on the pathogenical, cultural, biochemical and serological characteristics of these isolates, three strains were proposed.