

桑青枯病病原细菌的鉴定

赖文姜 曾宪铭 谭炳安 吴国信
陈俊英 关炜熹 范怀忠

(植保系 蚕桑系)

摘 要

根据对桑青枯病原细菌的个体形态、培养性状、生理特性、生化反应、血清学特性、寄主范围等方面的试验研究结果,我们认为该菌与花生青枯病菌和番茄青枯病菌(青枯假单胞菌, *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith) 基本相同。从寄主范围还可以认为桑青枯病菌属于青枯假单胞菌小种 1 (*Ps. Solanacearum* Race 1)。

桑青枯病又叫细菌性枯萎病,是桑树的一种新的毁灭性病害,目前只在我国广东省有发生的报导。1973年此病首先在广东省顺德县发现,当时的发病面积只有几亩,近年来迅速扩展蔓延,几乎遍及广东省所有桑区。据广东省1978年普查结果,发病面积达18310.6亩,占普查面积的10.07%;顺德县1976年发病面积只有5000亩,到1978年已发展到17000亩左右,占全县桑地面积的22.8%,而其中伦教公社的发病面积占该社的桑地面积的60.8%。由于本病发病急、来势猛、扩展蔓延快,已成为当前威胁广东省发展蚕桑生产的一个急待解决的问题。

在1978年至1979年间,我们从形态、生理、生化特性和寄主范围等方面进行了鉴定研究,初步证明桑青枯病是由 *Ps. Solanacearum* 引起的。由于该菌能够侵染茄子、烟草等茄科植物,初步认为桑青枯病菌应属于青枯菌小种 1。现把本病原菌的详细研究结果分述于下。

症 状

桑青枯病一般在4—11月间发病,7—10月高温期为发病盛期。

本病有明显的发病中心。一般先由个别植株开始,然后向周围扩展;也有同时出现多个发病中心的,则病害蔓延更快。无论是多年生的根刈桑,大树尾桑或是当年的定植桑和实生苗均能受害。桑苗及幼龄桑树被害后,叶片最初失去光泽,随后失水凋萎,表现青枯症状,死亡速度快;老龄桑树被害后,往往是桑枝的上,中部叶片的叶尖、叶缘先失水而青枯,或由黄变褐而干枯,然后逐步扩展至全叶,但死亡的速度较慢。发病株第二年若能恢复生长,则植株矮小,生长缓慢,枝细叶小,剖开茎部皮层,可见木质部

• 本实验的细菌形态的电镜观察,承广东省微生物研究所电镜室和本院电镜室协助进行,谨此致谢。

表面变褐色。病部切片在显微镜下观察，有大量的细菌从维管束冲出。地下部初期症状不明显，但剖开根部皮层，可见本质部有褐色条纹，随着病情进展可延及茎枝，严重时桑根木质部全部变为黑褐色。病根或病枝切口没有或很少分泌正常的白色乳汁（桑胶），而溢出污白色的细菌菌脓。久病的桑根，皮层腐烂脱落，本质部变黑腐朽。（图1）。

病原细菌的致病性试验

1977年10月从顺德县杏坛公社和本院桑园采集病株，进行病原细菌的分离、培养，均得到菌落呈污白色的细菌，分别编号为“顺德1号”菌株和“石牌1号”菌株。经纯化后，把这二个不同菌株的细菌接种于一年生健康桑苗上，各接种10株，并设有清水对照。“顺德1号”菌株是用浸根法接种，接种后把桑苗放在温度 $27-28^{\circ}\text{C}$ 和湿度75%左右条件下保温保湿，14天后表现典型的青枯症状，30天后检查，结果接种的10株桑苗全部发病，发病率为100%，清水对照的不发病；从接种病株上再分离出来的菌落，也是圆形污白色的，与原来分离出来的一致，说明此菌株是桑青枯病的病原菌。“石牌1号”菌株是用注射法接种，注射于桑苗嫩梢基部，接种后放在温度 27.8°C 和湿度78.4%条件下保温保湿，经7天后就开始表现青枯症状，14天后检查，结果接种的10株有8株发病，发病率为80%，清水对照的不发病；从病株维管束中亦分离出同样菌落的细菌，表明此菌株也是桑青枯病的病原菌。

为了查明其它桑区发生的青枯病其病原菌是否相同，又从顺德县伦教蚕种场和勒流公社、南海县、中山县、新会县、台山县、吴川县、化州县、增城县和广州市郊等主要病区各采集桑青枯病标样1—2个进行病原菌的分离、培养，都得到与上述同样的细菌菌落。这些不同地区来源的细菌的致病性，都经过接种试验证实。发病要求的温度在 30°C 左右，湿度在80%以上为适宜。

病原细菌的鉴定

（一）菌体形态和染色反应 供试的菌种为“顺德1号”菌株和“石牌1号”菌株。菌体形态和大小，以12—24小时的新鲜培养物在电镜下观察、摄影，随后量度菌体的大小，每一菌株量100个菌体。

革兰氏染色，芽胞染色，荚膜染色均采用常规方法。观察结果：菌体杆状，两端圆，大小为 $3.15-1.24 \times 1.18-0.45$ 微米，平均 1.90×0.80 微米，表面粗糙呈旋曲状（图2—1），极生鞭毛1—多条，多数生于一端，有时生于两端（图2—2）。无芽胞，无荚膜。革兰氏染色阴性反应。

（二）培养性状 供试的菌种，同上。培养性状主要观察细菌在马铃薯肉汁琼脂平面（含有马铃薯、牛肉膏、且白朊、酵母膏、蔗糖、琼脂），马铃薯柱斜面上菌落生长的形状、色泽等，同时亦观察细菌在肉汁琼培养液里的生长特性。结果如下：

供试的二个菌株在马铃薯肉汁琼脂培养基上生长良好，在 28°C 培养48小时后出现菌落。菌落直径2毫米左右，圆形污白色（大约一星期后变淡褐色，当菌落变深褐色

时便失去生活力), 表面湿润、光滑、稍隆起, 边缘整齐, 产生水溶性色素在培养基内扩散, 使培养基呈褐色。在马铃薯柱上生长可使薯块变褐, 一星期后菌落亦变黑褐色。在肉汁胨液体培养基(含牛肉膏、且白胨、酵母膏、蔗糖)中生长良好, 使培养液混浊, 但没有明显的菌膜。

(三) 生理生化特性

1. 生理特性测定: 供试的菌种同上, 生长温度测定, 使用马铃薯肉汁胨琼脂斜面培养基。测定的温度是 8°C 、 10°C 、 12°C ……直至 44°C , 培养72小时, 每隔24小时检查一次, 共检查三次。重复试验四次。试验结果, 两菌株的生长最适温度均为 $28-36^{\circ}\text{C}$, 最低为 10°C , 最高为 40°C 。

生长酸碱度: 使用肉汁胨液体培养基, 测定pH值, 范围由pH 3—pH 11, 培养72小时, 每隔24小时检查一次, 共检查三次。重复试验四次。试验结果: 两菌株的生长酸碱度范围都是pH 5—9, 最适为pH 7—8。

致死温度: 用毛细管法测定。将吸取细菌悬浮液的毛细管断口在酒精灯上封闭。把毛细管分别放在 51°C 、 52°C 、 53°C 、 54°C 和 55°C 不同温度的温水中处理10分钟, 随后将毛细管放入 $0.1\% \text{HgCl}_2$ 液中冷却和消毒, 再将多余的 HgCl_2 液自行流去, 然后将管口尖端剪断, 把菌液吹入培养基中培养。重复试验三次。试验结果。两菌株的致死温度均为 53°C 、10分钟。

2. 生化反应测定: 供试的菌种为“顺德1号”菌株, “石牌1号”菌株。并以番茄青枯病菌、花生青枯病菌(广东农科院提供)和水稻白叶枯病菌作为对照。用研究细菌生化反应的常用十多种培养基进行培养和测定, 在大约 30°C 温度下培养10天左右。测定细菌对碳素化合物的利用时, 采用组合培养基(成份是 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1.0克, KCl 0.2克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2克, 蒸馏水1000毫升)作为基础培养基。接种日期: 第一次于1978年5月; 第二、三次于1978年7月。接种后每隔2—4天检查一次, 共检查三次。

试验结果(表1)表明, 供试的两个菌株的生化反应是相同的, 能把硝酸盐还原为亚硝酸盐, 明胶不液化, 石蕊牛奶反应碱性, 石蕊被还原, 且白胨的分解能产生 H_2S , 但不产生氨和吲哚, 甲基红和VP反应阴性, 淀粉不水解, 柠檬酸盐能够利用; 果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、甘油能利用并产酸而不产气体; 阿拉伯糖、木糖、甘露醇轻度利用, 只产生微量酸; 棉子糖不能利用, 也不产生气体; 脂肪不分解, 接触酶反应阳性。试验结果还表明: 桑青枯病菌“顺德1号”和“石牌1号”两个菌株跟花生青枯病菌和番茄青枯病菌除在木糖、甘露醇的利用程度上有差别外, 其他反应都是相同的。

(四) 血清学反应试验 供试的菌种为“顺德1号”菌株, “石牌1号”菌株和番茄青枯病菌。试验按照常规方法进行, 先制备成“顺德1号”抗血清, “石牌1号”抗血清和“番茄青枯菌”抗血清。然后把该三种抗血清稀释液与桑青枯菌“顺德1号”抗原、“石牌1号”抗原和“番茄青枯菌”抗原进行交互凝集反应试验。

结果二个桑青枯菌抗血清固然能够跟其本身的抗原起明显的凝集反应, 亦能够跟番茄青枯菌抗原起明显的凝集反应, 反之亦然, 番茄青枯菌抗血清不但能够跟其本身的抗原

表 1 桑青枯病细菌和其他病原细菌的生化反应试验结果

测定菌株 测定次数 测定项目	桑 青 枯 石牌 1 号			桑 青 枯 顺德 1 号			花 生 青 枯			番 茄 青 枯			水 稻 白 叶 枯		
	第一次	第二次	第三次	第一次	第二次	第三次	第一次	第二次	第三次	第一次	第二次	第三次	第一次	第二次	第三次
果 糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+	/	+	+
葡 萄 糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+	/	+	+
阿拉伯糖	/	±	±	/	±	±	/	±	±	/	+	±	/	-	-
木 糖	/	+	±	/	+	±	/	+	±	/	+	+	/	-	-
蔗 糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+	±	±	±
甘 油	/	+	+	/	+	+	/	+	+	/	+	+	/	-	-
甘 露 醇	/	±	±	/	±	±	/	+	+	/	+	+	/	-	-
棉 子 糖	-	/	/	-	/	/	-	/	/	/	/	/	-	/	/
麦 芽 糖	+	/	/	+	/	/	+	/	/	/	/	/	-	/	/
接 触 酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+	+	+	+
M.R.反应	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-
V.P.反应	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-
石蕊牛奶	变碱 还原	同左	同左	变碱 还原	同左	同左	变碱 还原	同左	同左	/	变碱 还原	同左	变碱 还原	/	/
H ₂ S产生	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+	+	/	/
柠檬酸盐	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+	-	-	-
氨的产生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-
吲哚产生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-	/	/
淀粉水解	-	-	-	-	-	/	-	-	-	/	-	-	-	-	-
脂肪分解	-	/	/	-	/	/	-	/	/	/	/	/	-	/	/
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+	-	-	-
明胶液化	-	-	-	-	-	/	-	-	-	/	-	-	-	-	-

注: +表示阳性反应 -表示阴性反应;

产酸发酵: +表示产酸 -表示不产酸不产气 ±表示微量产酸

起明显的凝集反应,也同样能够跟桑青枯菌二个抗原起明显的凝集反应,说明它们之间抗原构结和亲缘关系是相同或接近的。

(五) 寄主范围试验

1. 人工接种试验: 供试作物有番茄 (*Lycopersicum esulentum*)、茄子 (*Solanum melongena*)、辣椒 (*Capsicum frutescens*)、马铃薯 (*Solanum btuerosum*)、烟 (*Nicotiana tabacum*)、花生 (*Arachis hypogaea*)、蚕豆 (*Vicia faba*)、豆角 (*Vigna sesquipedalis*)、菜豆 (*Phaseolus vulgaris*)、黄瓜 (*Cucumis sativus*)、丝瓜 (*Luffa acutangula*)、菜心 (*Brassica parachinensis*)、芥兰 (*Brassica albo—glabra*)、羌 (*Zingiber officinale*)、蓖麻 (*Ricinus communis*)、桑 (*Morus alba*)、甘蔗 (*Saccharum officinarum*) 和香蕉 (*Musa sapientum*) 等18种。除羌、桑、甘蔗、烟和香蕉的生长期较长外,其他作物的生长期为20—40天。

表2 人工接种和自然诱发试验结果

处理	作物 发病情况	桑	番茄	茄子	辣椒	马铃薯	烟	蓖麻	花生	蚕豆	菜豆	黄瓜	丝瓜	菜心	芥兰	莴苣	甘蔗	香蕉
		11/24	25/25	14/15	18/20	13/13	15/19	8/25	9/21	19/19	10/20	5/6	8/20	7/20	7/12	11/14	8/15	0/9
人工接种	桑青枯菌 (增城1号)																	
	番茄青枯菌	10/20	17/20	9/9	14/14	6/9	13/14	6/20	9/18	9/15	6/13	4/5	1/15	5/15	5/10	9/14	6/10	0/6
自然诱发	第一批	17/48	17/17	1/17	13/20	9/28	6/15	3/11	0/49	47/47	1/47	7/47	0/43	1/21	0/11	0/34	0/42	0/20
	第二批	/	36/44	0/47	2/48	/	/	0/42	0/40	2/50	/	/	0/36	/	0/50	0/30	/	/

注: 1. 表内数字, 分母表示接种总株数, 分子表示发病总株数。

2. 人工接种: 每次接种5株(甘蔗和香蕉只接种3株), 从分母数字可知重复接种的批次。对照用清水, 全部没有发病。

3. 自然诱发: 第一批作物于1979年9月28日调查(带*号者和第二批一起调查); 第二批作物于1979年12月1日调查。

供试菌种为桑青枯菌“增城1号”菌株(致病力较强)。以番茄青枯菌为对照菌,并设有清水对照。

接种方法采用针刺接种法^[1]。菌液浓度每毫升约为 1.5×10^7 个细菌。用注射针筒吸取菌液,滴在植株顶部第三片展开叶的叶腋中,然后针刺5—6点;香蕉的接种是在假茎基部注射多点。接种后温度保持在30°C左右,最高不超过35°C;湿度保持在80%以上。接种后,每隔7—10天检查一次,共检查3—4次。发病植株均用血清学玻片凝集反应^[5],鉴定其确是由青枯菌引起的。

试验结果(表2)表明,桑青枯菌在人工接种条件下能侵染番茄、茄子、辣椒、马铃薯、蚕豆、烟、花生、蓖麻、黄瓜、丝瓜、豆角、菜豆、菜心、芥兰,而不侵染甘蔗、香蕉和羌(在羌的接种点上有少量青枯菌涌出,但无症状表现)。

2. 自然诱发试验: 试验地在本学院历年严重发病的桑地,经多次犁耙均匀后备用。供试作物与人工接种的相同。其中的番茄、茄子、辣椒、烟、菜心、芥兰、桑、甘蔗和香蕉预先育好苗,然后移植于上述处理过的试验地;其他作物均用种子直接播种,种植时务使每种作物都均匀合理地分布于整个试验地。

植期: 第一批于1979年5月12日,第二批于1979年9月28日。第二批种植前将原第一批的桑、羌、香蕉和甘蔗留下,其它作物全部挖掉,挖后即把第二批作物种植于第一批该种作物迹地上。种植后,每7—10天检查一次,一直检查至1979年12月1日。发病植株均采回室内作血清学玻片凝集反应试验^[5]。试验结果(表2)表明,桑青枯菌在自然条件下侵染的作物大部分与人工接种的相同,可以侵染番茄、茄子、辣椒、马铃薯、蚕豆、烟、蓖麻、丝瓜、豆角、菜豆,而不侵染甘蔗、香蕉和羌;但和人工接种结果不同的是在自然条件下不侵染花生、黄瓜、菜心和芥兰。

讨论和结论

根据桑青枯病原菌的个体形态、培养性状、生理生化特性以及寄主范围等,按照伯吉氏细菌鉴定手册第七版^[2]和第八版^[7]内容进行查对检查,又考虑到该菌与番茄青枯菌在生理生化特性、血清学反应和寄主范围等方面基本上相同这种情况,可以确定桑青枯病是由*Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith引起的。

Buddenhagen等(1962)^[3],Buddenhagen和Kelman(1964)^[4]把青枯菌分为三个致病型:小种1侵染烟草等茄科植物和其他植物,小种2侵染香蕉(三倍体)和*Heliconias*,小种3侵染马铃薯。French等(1970)^[6]提出茄子作为小种1的鉴别寄主比烟草更好。根据室内外试验结果表明,桑青枯菌可以侵染烟草和茄子等多种茄科植物,因此可以认为桑青枯菌属于小种1。

根据寄主范围试验,人工接种的和自然诱发的结果有些不同,应以自然侵染谱为依据,即桑青枯菌能够侵染番茄、茄子、辣椒、马铃薯、蚕豆、烟、蓖麻、丝瓜、豆角、菜豆,而不侵染甘蔗、香蕉、花生、黄瓜、菜心、芥兰和羌。寄主范围试验还证明桑青枯菌极易侵染番茄、马铃薯、辣椒和蚕豆。因此,桑区的轮作、套作和间作等应该特别注意这一问题。

参 考 文 献

- [1] Winstead, N.N. and A. Kelman. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 42 (11):628-634.
- [2] Breed, R.S., et al. 1957 *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Seventh edition.
- [3] Buddenhagen, I.W., L. Sequeira and A. Kelman. 1962. Designation of race of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52(8):726 (Abstr.)
- [4] Buddenhagen, I. and A. Kelman. 1964. Biological and Physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopath.* 2:203-230.
- [5] Morton, D.J., P.D. Duke and S.F. Jenkins. 1965. Serological identification of *Pseudomonas solanacearum* in four *Solanacearum* host. *Phytopathology* 55(11):1191-1193.
- [6] French, E.R. and L. Sequeira. 1970. Strain of *Pseudomonas solanacearum* from central and south America, A comparative study. *Phytopathology* 60:506-512.
- [7] Buchanan R. F. and N E. Gibbons. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Eight edition.

IDENTIFICATION OF THE CAUSAL ORGANISM OF THE BACTERIAL WILT OF MULBERRY

Lai Wen-jiang Zeng Xian-ming Tan Bing-an
Wu Ko-shen Chan Choung-ying Guan Wei-xi
Faan Hwei-chung

(Department of Plant Protection and Department of Sericulture)

ABSTRACT

According to the studies on the morphology, cultural characteristics, physiological features, biochemical reactions, serological reactions and host ranges, the pathogen of mulberry bacterial wilt was shown to be virtually the same as the causative bacteria *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in peanut and tomato bacterial wilt. According to its host range it was further confirmed to belong to the Race 1 of *Ps. solanacearum*.

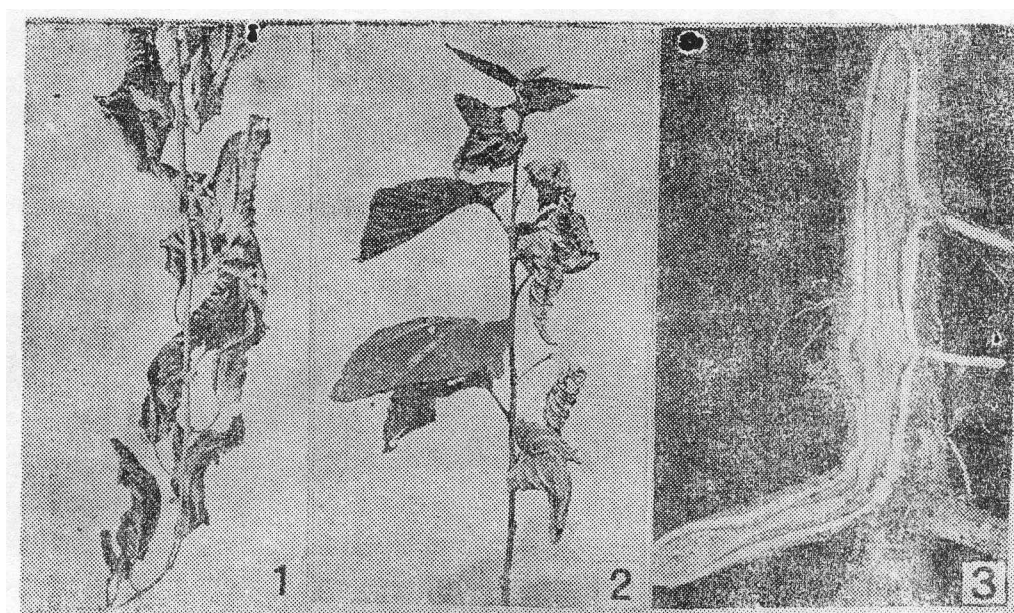


图1 桑青枯病症状

1. 桑枝上全部叶片青灰色凋萎 2. 桑枝上部分叶片黄褐色枯萎 3. 桑根纵切面维管束变褐色

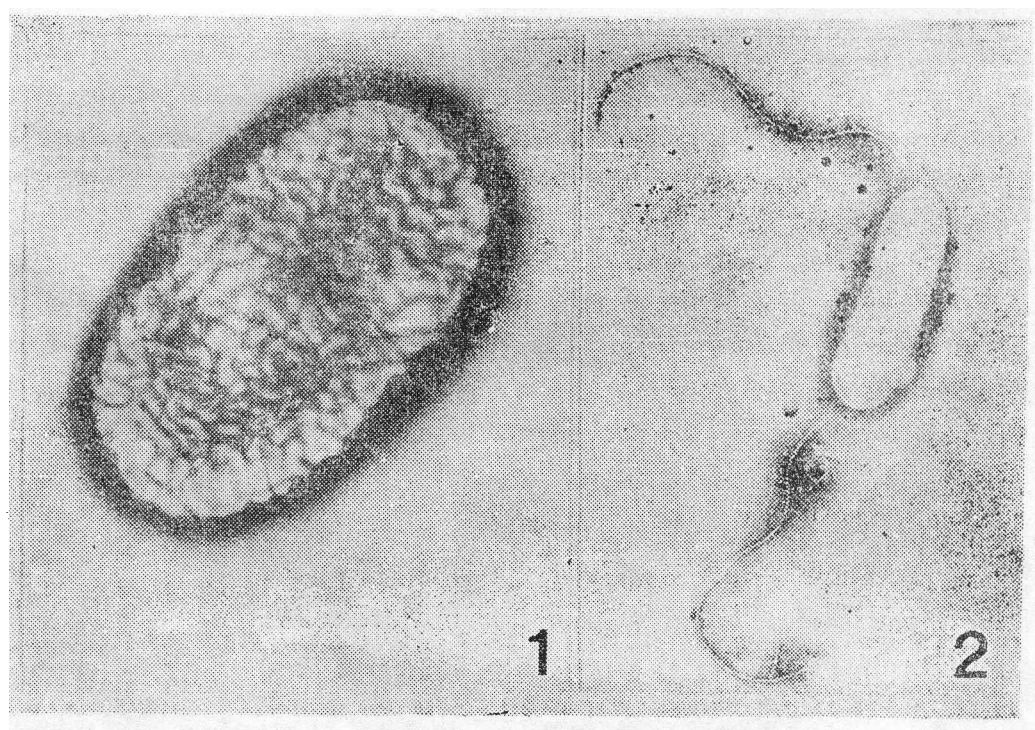


图2 桑青枯病原菌

1. 菌体形态，表面呈旋曲状。2. 示鞭毛