

苦楝顶枯病类细菌的分离培养 及其致病性研究*

沙业雄** 王庄 张景宁

(林学系)

提 要

电镜观察表明,苦楝顶枯病病株木质部导管存在大量类细菌(Bacteria—Like organisms),从以改良Bc—ZE培养基分离获得该菌,把它接种苦楝实生健苗,90~100天表现黄化顶枯症状,发病率达84%,从发病株重新分离到类细菌。酶联免疫吸附法检测苦楝病株和类细菌培养液均呈正反应。从病树捕捉小绿叶蝉, (*Empoasca* sp) 进行超薄切片电镜观察,在食囊部位发现类细菌,以该叶蝉若虫接种苦楝苗,45天左右表现症状,传病率为89%。

前 言

苦楝(*Melia azedarach* L.)是我国南方各省用材和绿化树种。近年,苦楝顶枯病普遍发生,苦楝受害后表现叶黄化皱缩变小,节间缩短,枝条顶梢枯死,出现大量枯枝,严重的整株枯死。广东、浙江、福建、江西、江苏、安徽、湖南等地均有发生。金开璇等报道^[1]该病可能与类细菌(Bacteria—Like organisms)有关。为证明该病的病原性,我们进行了本课题的研究。

据报道,植物病原类细菌在普通植物病原细菌培养基不能生长^{[1][13]},过去许多试图以合成培养基从病株或传病介体分离培养这类病原都遭失败^{[7][8]},至今,寄生于植物韧皮部的类细菌还未能人工培养^[6],但寄生于植物木质部的类细菌有报道可人工培养,如Davis等(1978)^[3]以JD-1等三种合成培养基从葡萄皮尔斯病株及传病介体中分离到类细菌,并证明了病原性。最近,国外学者陆续从李叶灼病等十二种植物黄化型病害中分离培养到类细菌,且大多数完成了柯赫氏法则^{[4][10][11][13][14]}。

我国对植物类细菌病害研究仍处于电镜观察研究阶段,对病原类细菌的分离培养及应用酶联免疫吸附法诊断这类病害仍是一个空白。本文首次报道苦楝顶枯病原类细菌分离培养成功,并完成了柯赫氏法则。

*本文经范怀忠、陆大京、梁子超、黎毓干、黄自然等教授审阅并提出宝贵意见,华南农业大学电镜室协助电镜拍摄,酶联免疫吸附法得到黄自然教授的热情指导和帮助,在此一并表示诚挚的感谢!

**本文作者为沙业雄硕士研究生论文,现在广东省微生物研究所工作。

1986年1月28日收稿

材 料 与 方 法

取表现小枝顶端枯死、节间缩短、叶黄化皱缩变小的苦楝病株叶柄及叶脉作材料,健株同一部位作对照,切成约5~10毫米长的小块,经1.5%次氯酸钠消毒后漂洗三次,加少许0.1M pH6.8磷酸盐缓冲液研磨,取上清液接种于改良BC—ZE培养基,置28°C恒温箱培养。

改良BC—ZE培养基在Raju采用的BC—ZE培养基^[1]基础上增加牛血清、硫酸铁、焦磷酸钠,取消焦磷酸铁,以PPLO肉汁代替蒸馏水而成,其配方如下:25%酵母提取液40毫升、 K_2HPO_4 1.0克、 KH_2PO_4 1.0克、 $MgSO_4$ 0.2克、 $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ 0.12克、 $FeSO_4$ 0.12克、可溶性淀粉2.0克、葡萄糖4.0克、L—半胱氨酸0.5克、纯化琼脂17.0克、牛血清20毫升、PPLO肉汁940毫升, pH值调至6.8。以BC—ZE培养基、植物病原细菌通用培养基、PD₂培养基^[4]、加4000单位/毫升青霉素钾的改良BC—ZE培养基作比较试验。

把经转移2~3次、培养8天左右的类细菌液针注射接种苦楝实生健苗,从茎基至茎尖分五个部位依次接种,隔7天重复接种一次,共三次,以清水注射作对照。

按Raju的方法制备抗血清,酶联免疫吸附法采用分子筛层析法提纯抗体免疫球蛋白(IgG),以简易戊二醛二步法^[2]酶标记抗体,3,3'-二胺基联苯胺四盐酸作底物,应用双抗体夹心法进行反应。

从苦楝病健株捕捉3~4龄小绿叶蝉(*Empasca sp*)若虫分别作传病和对照试验,50~60头/株接种于半年实生苦楝健苗,外罩网纱,隔10天重复接种一次,接种积累数为100~120头/株。

结 果 与 分 析

(一) 植物组织的电镜观察

对来源于不同林地的5株苦楝病株组织进行电镜观察,在叶脉木质部导管发现大量类细菌,管胞及薄壁细胞亦有类细菌存在(图1),菌体形态为短杆状、球形或椭圆形,大小为 $0.16 \sim 0.5 \times 0.52 \sim 1.2 \mu m$,壁厚 $17 \sim 20 \mu m$,由一外膜、一中间电子透亮带层和一肽聚糖内层组成,胞内原生质中分布着纤丝状的类DNA链和颗粒状的核糖体。健株无此病原。由此我们认为类细菌可能是苦楝顶枯病的病原。

(二) 植物病原的分离培养

在改良BC—ZE液体培养基中,病株培养2~3天略有混浊及微量沉淀出现, pH值有所下降,7天后混浊明显, pH值下降到6.5以下,相差显微镜(OLYMPUS VANOX)检查发现大量短杆状菌,把这含菌液以6000 r.p.m.离心30分钟,4%琼脂包埋其沉淀物进行超薄切片电镜观察,可见到许多短杆状类细菌,其形态大小结构与病株存在的类细菌一致(图2)。健株液培无混浊和沉淀现象, pH值不改变,镜检未发现类细菌。

在改良BC—ZE固体培养基中,病株接种的5天后出现结构致密的小菌落,14天生长菌落直径为 $20 \sim 45 \mu m$,40天菌落可达 $66 \sim 78 \mu m$,菌落白色,圆形或卵形,半球状

凸生于表面，小菌落常2~3个聚生（图3）。扫描电镜下可清楚观察到类细菌菌落的细微结构（图4），菌落中不规则地分布着短杆状类细菌，大小为 $0.16\sim 0.3\times 0.45\sim 0.9\mu\text{m}$ ，与病株木质部存在的类细菌形态大小均一致。BC—ZE培养基可分离到类细菌，但生长速度较慢，且菌落较少。病株接种的PD₂培养基，仅见有稀少的松散沉淀物，并无完整的菌落形成。病株接种的植物病原细菌通用培养基及加青霉素的改良BC—ZE培养基无菌落生长。健株接种上述五种培养基均无菌落形成。对来自不同林地的5株病株和5株健株进行24次病原分离培养，21次试验获得上述结果，分离成功率达87%。液体与固体培养结果的重复性及培养类细菌与病株木质部存在的类细菌形态大小结构的一致性，表明了从病株分离培养类细菌是苦楝顶枯病株木质部寄生的类细菌。

（三）致病性研究

1983年11月下旬以类细菌培养物针注射接种4株半年实生苦楝健苗，清水注射5株健苗作对照，100天左右，接种的4株苦楝苗叶黄化变小，顶芽逐渐坏死出现枯枝，植株矮化，萌芽期推迟等症状，对照苗生长正常。1984年3月下旬以类细菌培养物接种90天苗龄的苦楝实生健苗25株，磷酸缓冲液注射10株健苗作对照，90天左右共有21株接种类细菌的试验苗表现黄化叶卷缩变小，叶表面粗糙，主脉周围失绿透明，严重的落叶，顶芽生长受阻，随着病情加重，顶芽逐步坏死形成枯枝，节间缩短，植株表现出矮化的症状，4株试验苗症状不明显，回接发病率为84%。对照苗均无症状表现，生长正常。取上述二批接种表现症状的试验苗10株和无症状的对照苗5株分别在改良BC—ZE培养基中进行重新分离培养，8、16、24天后观察，病株接种的培养基出现类细菌菌落，镜检到的短杆状类细菌与从自然感病株分离到的一致，而健株接种的则无菌落形成，镜检没有类细菌。上述实验满足了柯赫氏法则，从而证实了我们从苦楝病株观察和分离培养类细菌是苦楝顶枯病病原。

（四）血清学研究

1. 凝集反应：在试管凝集反应中，苦楝类细菌抗血清与抗原类细菌液凝集反应明显。抗血清效价达1280。载玻片凝集反应结果（表1）表明，类细菌抗血清与类细菌培养物，苦楝病株提取液均发生凝集反应，健株无凝集反应。

2. 酶联免疫吸附法：经测定，本试验酶标记抗体（IgG）其克分子比值为1.33，最适包被抗体浓度是4微克/毫升，最适酶标记抗体浓度为1微克/毫升。由表1可知，5个类细菌培养液样品和22个病株提取液样品作抗原的其反应吸收值均在0.3以上，呈正反应，而健株提取液和磷酸缓冲液作待测样品的其反应吸收值均在0.075以下，为负反应。这表明了病株和类细菌培养液，均含有可与类细菌抗血清产生特异性反应的类细菌抗原，而健株和磷酸缓冲液则不存在这种抗原。

血清凝集反应和酶联免疫吸附法，检测病株及病培液呈正反应，进一步证实了苦楝病株分离培养类细菌是苦楝顶枯病病原。

（五）传病介体的初步鉴定

从苦楝病株捕取小绿叶蝉（*Empoasca* sp.）进行超薄切片电镜观察，发现在其食管部位存在着许多短杆状类细菌（图5），酶联免疫吸附法检测其提取液反应吸收值为

表 1 苦楝顶枯病病原类细菌血清学反应*

检测抗原	载玻片凝集反应	ELISA A_{492}	检测抗原	载玻片凝集反应	ELISA A_{492}
类细菌培养 1	+++	1.505	苦楝病株 16		0.305
2	+++	1.225	17		0.570
3	+++	1.300	18		0.330
4	+++	1.450	19		0.340
5	+++	1.300	20		0.530
苦楝病株 1	++	0.720	21		0.340
2	++	0.700	22		0.315
3	++	0.610	苦楝健株 1	-	0.013
4	++	0.470	2	-	0.070
5	++	0.780	3	-	0.005
6	++	0.550	4	-	0.035
7	++	0.570	5	-	0.010
8	++	0.470	6		0.035
9	++	0.600	7		0.075
10	++	0.530	8		0.005
11	++	0.500	9		0.070
12	++	0.430	10		0.060
13		0.580	小绿叶蝉		0.350
14		0.340	PBS液 1		0.001
15		0.480	PBS液 2		0.0005

*ELISA酶联免疫吸附法; A_{492} 492nm波长的光密度值(反应吸收值); +++凝集很明显, ++部分凝集; +凝集很少; -没有凝集; PBS液磷酸盐缓冲液。

0.350, 呈正反应, 对照为负反应(表1)。把叶蝉接种于苦楝健苗, 45天后表现症状, 15株试验苗有13株苗叶黄化皱缩变小, 顶芽生长受阻, 逐渐枯萎坏死, 植株表现不同程度的矮化, 叶蝉传病率为86%。从健株捕捉小绿叶蝉进行电镜观察没发现存在类细菌, 以它接种的10株苦楝苗生长正常。结果表明, 小绿叶蝉是苦楝顶枯病病原类细菌的传病介体。

讨 论

本实验表明, 苦楝顶枯病株木质部存在大量短杆状类细菌, 其形态结构与有关报道^{[1][9]}的类细菌相类似; 从表现黄化顶枯症状的病株中分离到类细菌, 把它回接苦楝健苗可产生同样的黄化顶枯症状, 这与文献报道^{[3][10][11]}寄生于木质部的类细菌常引起植物黄化卷缩、顶梢枯死等典型类细菌症状是基本吻合的; 从回接发病株重新分离到上述类细菌, 证明了类细菌是苦楝顶枯病病原, 而血清凝集反应和酶联免疫吸附法检测病株呈正反应进一步证实了此结论。

叶蝉是类细菌最常见的传病介体^[9], 类细菌常在叶蝉的食囊中发现^[12]。我们的

观察表明,在带病小绿叶蝉的食蜜部位发现类细菌,酶联免疫吸附法检测叶蝉提取液呈正反应,该叶蝉可传病苦楝引起黄化顶枯等症状,与自然发病及人工回接的症状一致。因此我们认为小绿叶蝉(*Empoasca sp.*)是苦楝顶枯病原类细菌的传病介体。

Davis等人^{[4][8]}认为,牛血清白蛋白在培养类细菌中起到解毒作用。我们在实验中发现,在加入一定量牛血清的培养基中,苦楝类细菌菌落大小及生长速率有所提高,这表明牛血清对苦楝类细菌可能亦具有解毒作用。有人报道^[4],在仅有PPLO肉汁一成分的培养基中,葡萄皮尔斯病原类细菌可形成一薄层细丝状物。我们在培养基中加入PPLO肉汁,对苦楝类细菌生长有明显的促进作用,看来它可能提供类细菌生长所需的某种营养成分。

在改良BC-ZE培养基中,苦楝类细菌液培7天混浊明显,菌落圆形或卵形,培养40天菌落生长面积仍有增长。这结果表明苦楝类细菌的培养性状与其它寄主的类细菌培养性状^{[8][14]}基本一致,改良BC-ZE培养基是较适宜苦楝类细菌生长的。

本实验除改良BC-ZE培养基外,还选用BC-ZE培养基、植物病原细菌通用培养基、PD₂培养基、加入4000单位/毫升青霉素钾的改良BC-ZE培养基进行分离培养,但结果表明后三种培养都不适宜苦楝类细菌的生长,BC-ZE培养基中类细菌虽可生长,但生长较慢且菌落较少。这揭示了苦楝类细菌是不同于普通植物病原细菌的,适宜其它类细菌生长的PD₂培养基并不适于苦楝类细菌生长,BC-ZE培养基不是苦楝类细菌的最适培养基,表明不同寄主的类细菌对养分要求是有所差异的,苦楝类细菌对青霉素是敏感的。

在接种试验中,针注射接种和昆虫接种的苦楝发病潜育期有所差异。由于针注射接种始于3月下旬,而昆虫传病则是6月上旬进行,两者所处气温差异较大。因而我们认为气温可能是影响其潜育期长短的主要因素之一。

从上述整个试验来看,虽然苦楝顶枯病的病原性及传病介体已基本上证明,但在以后的工作中有必要对该病病原类细菌的生理生化特性及寄主范围、传病介体的种类及其生活史、病害的发生与流行规律及防治措施等作进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 金开旋等:苦楝丛枝病类细菌(BLO)类菌质体(MLO)的电镜观察,《林业科学》,18(4):1982422~423。
- [2] 骆加里等:辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体的简易方法,《生物化学与生物物理学报》,13(1)1981:1-7。
- [8] Davis, M. J.; Purcell, A. H.; Thomson, S. V. 1978. Pierce's disease of grapevines: Isolation of the causal bacterium. Science 199: 75-77.
- [4] Davis, M. J.; Purcell, A. H.; and Thomson, S. V. 1980. Isolation medium for the pierce's disease bacterium. Phytopathology 70: 4225-429.
- [5] Davis, M. J.; Thomson, S. V.; and Purcell, A. H. 1980. Etiological role of the xylem-limited bacterium causing pierce's disease in almond leaf scorch. Phytopathology 70: 472-475.

- [6] Davis, M. J; French, W. J; Schaad, N. 1981. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. *Current Microbiology* 6 : 309-314 .
- [7] Davis, M. J; et al. 1983. Periwinkle wilt bacteria: Axenic culture, pathogenicity, and relationship to other gram-negative xylem-inhabiting bacteria. *Phytopathology* 73 : 1510-1515.
- [8] French, W. J; Christie, R. G; and Stassi, D. L. 1977. Recovery of rickettsia-like bacteria by vacuum infiltration of peach tissues affected with phony disease. *Phytopathology* 67 : 945-948.
- [9] Hopkins, D.L. 1977. Disease caused by leafhopper-borne, rickettsia-like bacteria. *Ann. Rev. phytopathol.* 17 : 277-294.
- [10] Hopkins, D.L. 1983. Gram-negative, xylem-limited bacteria in plant disease. *phytopathology* 73 : 347-350.
- [11] Raju, B.C; Wells, J.M; Nyland, G; Bransky, R.H; and Lowe, S.K. 1982. plum leaf scald: Isolation, culture and pathogenicity of the causal agent. *Phytopathology* 72 : 1460-1466.
- [12] Timmer, L.W; Bransky, R.H; Lee, R.F; and Raju, B.C. 1983A fastidious, xylem-limited bacterium infecting raweod. *Phytopathology* 73 : 975-979.
- [13] Wells, J.M; Raju, B.C; Nyland, G; and Lowe, S.K. 1981. Medium for isolation and growth of bacteria associated with plum leaf scald and phony peach disease. *Apple. Environ. Microbiol.* 42 : 357-363.
- [14] Wells, J.M; Raju, B.C; and Nyland, G. 1983. Isolation, culture and pathogenicity of the bacterium causing phony disease of peach. *Phytopathology* 73 : 859-862,

STUDIES ON ISOLATION, CULTURE AND PATHOGENICITY OF DIEBACK OF CHINABERRY CAUSED BY BACTERIA-LIKE ORGANISM

Sha Yehsiung Wang Chuang Zhang Jingning

(Department of Forestry)

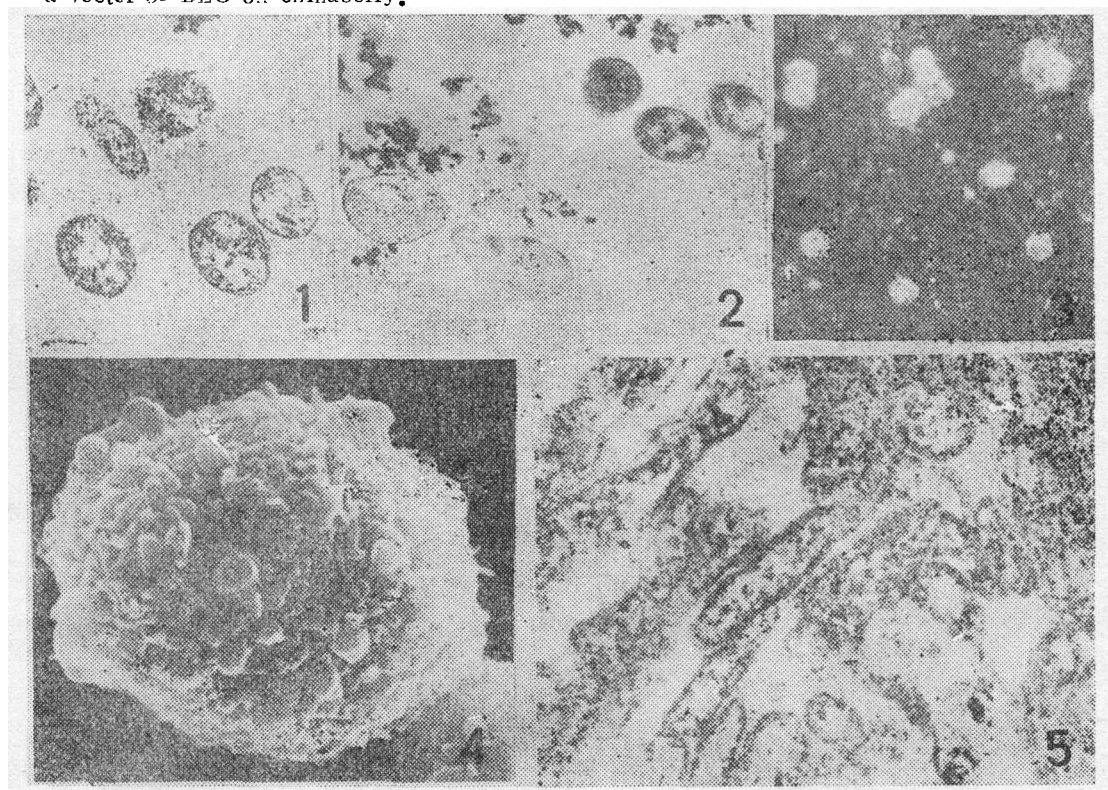
ABSTRACT

In order to prove pathogenicity of dieback of chinaberry (*Melia Azedarach* L.), we isolated, cultured bacteria-like organism (BLO) from diseased plants and identified the vector of BLO.

The BLO was observed in the tracheary elements of diseased plants by electronic microscope. The cells were usually rod-shaped, 0.16 to 0.5 μm wide and 0.52 to 1.2 μm long. They were usually surrounded by a well-defined cell wall with a thickness of about 17 to 20 nm. The BLO was consistently isolated on the improved BC-ZE agar or broth medium from diseased plants, but not from healthy one. Colonies were small, white and were generally circular or ovoid in shape. They reached 20 to 45 μm in diameter after 14 days. A little turbidity and deposition were seen and pH value were

decreased in improved BC-ZE broth medium after 2 days culture. The BLO were observed in the broth or solid medium and were consistent with that were observed in tracheary elements of diseased plants. Eighty-four percent of chinaberry seedlings inoculated with isolates developed symptoms within 3-3.5 months. Symptoms of infected-chinaberry exhibited yellowing, decrease in size of leaf, dieback and stunting. The same BLO was readily reisolated from the above plans. Antiserum prepared against chinaberry BLO had homologous titer of 1230 and agglutinated with BLO cultures or extracts of diseased tissues in Slide agglutination test. The BLO cultures and extracts from diseased tissues reacted positively with homologous antiserum in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). While extracts of healthy tissues reacted negatively with the antiserum in the above test. The BLO were observed in the cibarium of the leafhopper (*Empoasca sp.*), which were collected from diseased plants, by electronic microscope. Antiserum prepared against BLO reacted positively with extracts of leafhoppers in the ELISA. Eighty-seven percent of chinaberry seedlings, inocubated with leafhoppers (*Empoasca sp.*), showed symptoms after about 45 days.

This result suggested that evidence of the pathogenicity of the dieback of chinaberry caused by bacteria-like organism was established. The leafhopper (*Empoasca sp.*) was a vector of BLO on chinaberry.



图版 1. 苦楝顶枯病株叶脉木质部导管中的类细菌 (32715x); 2. 在改良BC—ZE培养基培养8天的苦楝类细菌 (琼脂包裹超薄切片32715x); 3. 在改良BC—ZE培养基培养16天的苦楝类细菌落 (相差显微镜暗视野镜头观察150x); 4. 扫描电镜下的苦楝类细菌菌落 (7000x); 5. 小绿叶蝉 (*Empoasca sp.*) 电镜观察, 示食囊部位中的类细菌 (56965x)。