

猕猴桃细菌性叶枯病病原菌和发生规律研究^{*}

宋晓斌, 张学武, 黄 健

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 对猕猴桃细菌性叶枯病的症状进行了描述, 并研究了病原菌的形态特征、生理生化特性、侵染循环、传播途径和发病因素。结果表明, 该细菌在许多理化特性上与猕猴桃细菌性溃疡病的病原细菌有相同之处, 但在形态特征上与溃疡病病原细菌有着明显的差异, 该病的病原细菌应该为丁香假单胞杆菌丁香致病变种, 该病的发生与品种、气候和管理水平有一定的关系。

[关键词] 猕猴桃; 细菌性; 叶枯病

[中图分类号] S436.634.1⁺9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)05-0073-04

猕猴桃细菌性叶枯病是新发现的猕猴桃病害, 最初发现于陕西杨陵杨村乡猕猴桃示范园, 以后在该地各猕猴桃园均有不同程度的发生, 今后有可能会发展为猕猴桃的主要病害, 给猕猴桃产业造成损失。为了能够控制该病的发生和蔓延, 从1997年开始对该病的病原菌和病害的发生规律进行了研究, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 叶枯病的症状观察

自1997年5月中旬开始, 在杨村乡猕猴桃示范园选择发病叶片定期进行症状观察, 并进行症状描述。

1.2 病原菌的分离培养和观察

1997年5月中旬, 在秦美猕猴桃 (*A. chinensis* L. var. *Qinmei*) 患病叶片上选择病、健组织相交的部分取材, 于实验室无菌操作间将所取材料用无菌水清洗后, 用70 mL/L乙醇处理1 min, 再用1 g/kg的新洁尔灭进行表面消毒, 用无菌水冲洗干净后, 再用刀片切取1 mm³的组织块, 放在滴有无菌水的载玻片上, 置于日产的Olympus BH型光学显微镜下观察喷菌现象, 并记录结果, 而后用接种环把观察过的悬浮液涂于PDA培养基上, 在27℃下恒温培养, 24 h后观察培养结果。将不同植株叶片上所分离培养的特征一致的優勢菌落编号, 并将菌株扩繁至4套, 以备生理测定使用。

用培养24 h的细菌制作菌体观察玻片。鞭毛、荚膜、芽孢染色按文献[1]的方法进行, 用显微镜观察。将培养24 h的菌落连同培养基切成2.5 mm × 2.5 mm × 2.5 mm的方块, 在体积分数40%的戊二醛液中固定4 h, 然后置PBS液中缓冲浸渍15 min, 弃去PBS液, 分别在50, 60, 70, 80, 90 mL/L的乙醇中各脱水15 min, 最后在100 mL/L的乙醇中脱水20 min。而后置菌块于载栏中, 在普通干燥器中干燥24 h, 再于临界点干燥器中干燥30 min, 取出粘台并喷金, 于扫描电镜下观察记录。

1.3 致病性测定

1998年5月中旬, 用先一年分离纯化的病原菌分别在美味猕猴桃 (*A. chinensis* L. var. *Delicious* F. et Ferguson A. R.), 海沃德 (*A. chinensis* cv. "Hayward"), 亚特 (*A. chinensis* cv. "Yate"), 秦香 (*A. chinensis* cv. "Qinxiang"), 桑 (*Morus alba*), 桃 (*Prunus persica*), 李 (*Prunus salicina*) 以及烟草叶片上接种, 采用擦伤喷菌悬液法接种, 菌悬液浓度为 4.32×10^6 mL⁻¹, 每个品种接种9片叶子, 在自然条件下, 观察接种叶片的发病情况。结合田间调查结果推断病原菌对不同品种的浸染能力, 以确定该病原菌的寄主范围和HR测定的致病性。

1.4 病原细菌的理化特性测定

分别配制SNA、King's B、NDA培养基, 并用事先准备好的一套菌系进行接种, 27℃下培养2~4 d, 观察菌落形态、颜色, 并在紫外灯下观察是否有蓝绿色荧光产生, 以判断病原细菌所在属。按LOPAT

* [收稿日期] 2003-02-24

[基金项目] 西北农林科技大学2001年度重点基金项目

[作者简介] 宋晓斌(1962-), 男, 陕西武功人, 副研究员, 主要从事林木病害研究。

实验要求^[2], 制备果聚糖产生(L)、氧化酶反应(O)、马铃薯软腐(P)、精氨酸双解酶反应(A)所需要的培养基和种植烟草过敏试验(T)所用的烟草植株, 并用另一套备好的菌系分别进行L、O、P、A、T测试, 同时用另外一套菌系做2-酮葡萄糖酸产生(2-K)、蛋黄反应(E)、硝酸盐还原(N)和蔗糖产酸(Ac)的补充试验, 以确定病原细菌的种。另进行单糖、多糖利用试验, 产气产酸试验, 产H₂S试验, 淀粉水解试验, 根据试验结果判断病原细菌的分类地位。对照菌为 *Pseudomonas syringae* p.v. *actinidiae* Takikawa,

从罹细菌性溃疡病的猕猴桃枝蔓上分离。

1.5 发病规律调查

根据田间调查病害的发生与猕猴桃园栽植品种、气候和管理水平之间的关系, 研究病害发生的规律。病害的分级见表1, 病情指数按下式计算。

$$\text{感病指数} = \frac{\sum_{i=1}^4 x_i y_i}{X_{\max} \sum_{i=1}^4 y_i} \times 100$$

式中, x_i 为病级代表; y_i 为 x_i 对应病级的调查数。

表1 猕猴桃细菌性叶枯病的分级标准

Table 1 Standard of classification on withered leaf on kiwifruit

病级 Grade	病级代表值(x) Volume of grade	病斑面积占叶片 面积的百分率X/% Percent of the infected spot area in area of leaf	参考指标 Reference items
I	0	$X = 0$	叶片无病斑 Health
II	1	$0 < X \leq 15$	1~3个病斑, 病斑不交合 1-3 single infected spots
III	2	$15 < X \leq 30$	4~6个病斑, 有病斑交合 Some of 4-6 infected spots join
IV	3	$30 < X \leq 45$	6个以上病斑, 有3个以上交合 More than 6 spots, over 3 spots join
V	4	$X > 45$	多数病斑交合, 近半叶片枯死 More of spots join, near 1/2 leaf withered

2 结果与分析

2.1 叶枯病的症状

从5月中旬开始, 在叶片上出现直径0.3 mm大的水渍状斑点, 下旬发展为形状不规则的病斑, 病斑受叶脉限制呈现为多角状, 随着时间的推移, 病斑中心开始枯死, 呈深褐色, 病斑周围与健康部分相接处仍然为水渍状。随着病斑的扩大, 叶子中部大部分组织枯死, 但叶片不脱落。轻时则个别叶片表现出局部枯死症状, 重时大部分叶片干枯死亡。

2.2 病原菌的形态特征

病健相接处组织在显微镜下有明显的喷菌现象, 经过分离纯化的菌株在PDA培养基上培养, 菌落为乳白色, 边缘整齐, 表面光滑有光泽。在光学显微镜下菌体为杆状, 稍弯曲, 两端钝圆, 无荚膜和芽孢。在扫描电镜下, 可清晰地看到病原细菌呈杆状, 在菌落中菌体丝状连接, 单个菌体大小为(1.0~1.3) μm $\times$ (3.0~4.2) μm , 由于培养时间不足和在电镜观察时没有进行专门的鞭毛染色, 多数看不到鞭毛, 只能看见在菌体的两端部鞭毛着生处的窝状凹陷, 有些菌体鞭毛隐约可见(图1)。

2.3 病原菌的致病性、侵染循环及传播途径

用所分离的猕猴桃细菌性叶枯病的病原菌, 对4个品种各9个叶片接种, 从其结果可以看出, 接种

第3天开始, 叶片陆续表现出水渍状病斑, 到第7天, 接种病原菌的猕猴桃叶片均有水渍状产生, 症状表现早的叶片上的病斑组织枯死, 其中最先和最后出现症状的品种都是秦美, 病斑大而严重, 在亚特上表现的症状轻, 在海沃德和秦香上表现症状介于秦美和亚特之间。这表明所分离的病原细菌对猕猴桃具有侵染能力, 潜育期在72 h以上。在桑、桃、李上不表现出叶枯病的症状, 可在烟草上出现过敏反应, 表明桑、桃、李不是该病原菌的寄主。该病原菌的其他寄主范围还有待于进一步研究。



图1 猕猴桃叶枯病病原细菌

Fig 1 Pathological bacterium of withered leaf on kiwifruit

根据田间观察, 该病在夏季雨后气温升高时出现明显的发病高峰, 且发病的叶片相对集中在最先表现症状的叶片周围, 可以初步判断病原菌是靠雨水进行传播的。从芽中分离的与该病原菌形态相似菌体及该病病原菌的血清学测定结果说明, 病原菌可以在芽中越冬, 随着叶芽萌发和气温的升高, 病原菌进行初侵染, 以后随着降雨传播进行再侵染。

2 4 病原菌的理化性质

病原菌的理化特性试验结果表明(表 2), 菌株在 PDA 培养基上的菌落为乳白色, 圆形光滑, 边缘整齐; 在 SNA 培养基上, 菌落形态均为白色, 半球形, 光滑而粘稠, 为典型的 levan 菌落; 在 King'B 培

养基上为灰白色, 平台状, 并具可弥散的黄绿色素, 在紫外灯下可看到蓝绿色的荧光; 在 NDA 培养基上菌落形态均为灰白色, 平台状奶油样。可以初步判断, 猕猴桃细菌性溃疡病病原菌可能为假单胞杆菌属的 I a 组或 IVa 组。同时这 9 个菌株以及对照在 L O P A T 试验中按照 L, O, P, A, T 的顺序, 它们的测试结果均为“+ - - - +”, 可以推断病原菌为假单胞杆菌中的 I a 组细菌。补充的 2-酮葡萄糖酸盐的产生、蛋黄反应、硝酸盐还原和蔗糖产酸 4 项试验表明, 病原菌和对照的测试结果均为“- - - +”, 因此, 可以断定病原菌为丁香假单胞杆菌。

表 2 病原菌鉴定测试
Table 2 Test for pathogen

测试内容 Item of test	L O P A T 试验					补充试验 Supplementary test			
	L	O	P	A	T	2-K	E	N	A c
病原菌 Pathogen	+	-	-	-	+	-	-	-	+
对照 CK	+	-	-	-	+	-	-	-	+

表 3 病原菌的理化特性测试结果

Table 3 The physiological and biochemical characters of pathogen

测试内容 Items of test	测定结果 Results	
	病原菌 Pathogen	对照菌 CK
碳 水 化 合 物 利 用 Carbohydrate utilization	葡萄糖 Glucose	+
	蔗糖 Sucrose	+
	半乳糖 Galactose	+
	乳糖 Lactose	+
	阿拉伯糖 Arabinose	+
	木糖 Xylose	+
	淀粉 Amylose	-
	纤维素 Cellulose	-
其 他 碳 源 利 用 Other source carbon utilization	壳聚糖 Chitosan	-
	甘露聚糖 Mannan	-
	甘露醇 Mannitol	+
	肌醇 Inositol	+
酶 反 应 Enzyme reaction	过氧酶 Peroxisome	-
	尿酶 Urease	-
	果 胶 酶 Pectate lyase	-
		√
硝酸还原 Nitrate reduction	-	-
产 H ₂ S Produce H ₂ S	-	-
利用柠檬酸钠产碱 Base from citric acid	√	+
L 酒石酸利用 Tartaric acid (L) utilization	-	-
苯甲酸利用 Benzoic acid utilization	-	-
高丝氨酸 Homoserine utilization	-	-
41 下生长 Growth under 41	-	-

注“-”：阴性反应; “+”：阳性反应; “√”：反应不明显。
Note: “-”：Negative; “+”：Positive; “√”：The reaction is not obvious

进一步的生理生化试验结果(表 3)说明, 病原菌能够利用的碳源有葡萄糖、蔗糖、半乳糖、乳糖、阿

拉伯糖、肌醇、甘露醇等, 在利用这些 C 源时均可以产酸, 但不产气; 不能利用木糖、淀粉、纤维素、壳聚糖、甘露聚糖, 不发生过氧化物酶、尿酶、果胶酶反应。不发生硝化反应, 不产生 H₂S, 但可产生果聚糖, 病原菌除了肌醇利用、果胶酶反应、柠檬酸盐产碱几个特性不同外, 其余与对照菌相同。除此之外, 病原菌和对照菌两者之间在形态特征上存在着明显的差异, 如果要归于猕猴桃致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Takikawa) 显然不合适。根据形态特征和生理生化特性与对照菌的差异, 作者认为该病的病原菌归于丁香假单胞杆菌致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) 较为合适^[1, 3~5]。

2 5 发病因素

2 5 1 发病与品种 不同品种发病严重程度调查结果见表 4。从表 4 可以看出, 秦美猕猴桃细菌性叶枯病发病率为 17. 9%, 感病指数为 10. 1; 亚特发病率为 4. 8%, 感病指数为 2. 2; 秦香发病率为 9. 8%, 感病指数为 5. 0; 海沃德发病率为 6. 3%, 感病指数为 3. 2, 调查结果与接种测试结果一致。表明秦美品种较易感病, 亚特比较抗病, 海沃德和秦香处于二者之间。

表 4 不同品种猕猴桃细菌性叶枯病发生调查

Table 4 Investigation of the withered leaf on different varieties of kiwifruit

品种 Variety	不同病级叶片数 Number of leaf in every grade					发病率/% Rate of infection	感病指数 Index of infection
	I	II	III	IV	V		
秦美 A. cv. "Qinmei"	235	11	15	10	6	17.9	10.1
亚特 A. cv. "Yate"	208	5	2	3	0	4.8	2.23
秦香 A. cv. "Qinxiang"	224	9	5	6	2	9.8	5.0
海沃德 A. cv. "Hayward"	238	6	4	4	1	6.3	3.2

2.5.2 发病与气候 猕猴桃细菌性叶枯病的发生与气候有直接关系。调查发现,5月中旬至7月下旬的降雨量对病害的发生和传播极为有利,而8月份以后的降雨对叶枯病的发生影响不十分明显。

2.5.3 发病与管理水平 管理水平的好坏直接关系到猕猴桃植株的健康水平,一般管理好的猕猴桃园树体健壮,叶片肥厚,对猕猴桃病原细菌的侵入直接起到一个机械阻挡的作用,管理差的猕猴桃园树势弱,抵抗力差,有利于细菌的侵入。

3 结论与讨论

细菌性叶枯病是新发现的猕猴桃病害,其病原

菌在许多理化特性上与猕猴桃溃疡病病原细菌有相同之处,但细菌性叶枯病病原菌不能利用木糖,而猕猴桃溃疡病病原菌能够利用木糖。在形态特征上,细菌性叶枯病病原菌大小为 $(1.0 \sim 1.3) \mu\text{m} \times (3.0 \sim 4.2) \mu\text{m}$,而溃疡病病原菌大小为 $(0.7 \sim 1.5) \mu\text{m} \times (1.6 \sim 2.9) \mu\text{m}$ ^[2],两者之间差异很大。因此,作者认为把该病原菌归为猕猴桃致病变种显然不太合理,而作为丁香致病变种比较合适。该病的发生在几个猕猴桃品种间存在着明显的差异,其发生与气候和管理水平有一定的关系,夏季多雨湿润气候有利于该病的发生,管理好的猕猴桃园发病轻。由于该病的病原菌为细菌,建议在防治时应用抗菌素。

[参考文献]

- [1] 任欣正. 植物病原细菌的分类和鉴定[M]. 北京: 农业出版社, 1994: 1-142.
- [2] 中国农业百科全书总编辑委员会. 中国农业百科全书(植物病理学卷)[M]. 北京: 农业出版社, 1996: 242-244.
- [3] 宋晓斌, 张星耀, 王培新, 等. 陕西猕猴桃溃疡病病原细菌的研究[J]. 林业科学研究, 2000, 13(专辑): 42-46.
- [4] 忘忠肃, 糖显富, 刘少基. 猕猴桃细菌性溃疡病(*Actinidia bacterial canker*)病原细菌鉴定[J]. 西南农业大学学报, 1992, 14(6): 500-503.
- [5] Takikawa Y, Serizawa S, Ichikawa T, et al. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: The causal bacterium of kiwifruit in Japan[J]. Ann Phytopath Soc Japan, 1989, 55: 437-444.

Studies on pathogen and occurrence factors of the bacterial withered leaf on kiwifruit

SONG Xiao-bin, ZHANG Xue-wu, HUANG Jian

(College of Forestry, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract This paper dealt with isolation and cultivation of the pathogen of bacterial withered leaf on kiwifruit, described symptom, and studied the morphological, physiological and biochemical characters, infecting cycle, host range, spreading way of bacterial of withered leaf disease in kiwifruit. The results show that bacterium of withered leaf is similar to bacterium of canker disease on kiwifruit at physiological and biochemical characters, but there are morphological differences between the two pathogens. The results concluded that the pathogen of bacterial withered leaf on kiwifruit should be *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. There are close relations between occurrence of the disease and varieties, climate and managing level.

Key words: kiwifruit; bacterial; withered leaf