

杨树水泡型溃疡病的病原菌鉴定

向玉英 花晓梅

赵经周

(中国林业科学院林业研究所, 北京) (黑龙江省森林保护研究所, 嫩江)

从杨树水泡型溃疡病斑上分离出真菌, 在室内和自然情况下作接种试验, 终于接种成功, 产生与自然病斑相同的典型症状。此真菌经鉴定有性阶段为 *Botryosphaeria dothidea*, 其子座直径为 2—7 毫米; 子囊腔大小为 $116.4—175.0 \times 107.0—165.0$ 微米; 子囊大小为 $49.0—68.0 \times 11.0—21.3$ 微米; 子囊孢子单孢, 无色, 倒卵形, 大小为 $15.0—19.4 \times 7.0—11.0$ 微米。无性阶段为 *Dothiorella gregaria*, 其分生孢子器暗色, 球形, 大小为 $97—233.0 \times 97—184.3$ 微米; 分生孢子单孢, 无色、棱形, 大小为 $19.4—29.1 \times 5.0—7.0$ 微米。

用杨树水泡型溃疡病病斑上分离出的多种细菌, 经多次在杨树上接种, 均未成功。细菌经初步鉴定为欧氏杆菌 (*Erwinia*)、和假单胞杆菌 (*Pseudomonas*) 属, 经烟草叶片过敏反应测定, 不产生枯斑, 也不诱发烟草的坏死, 因此认为此二种细菌为杨树水泡型病斑上的腐生菌。

杨树为我国主要速生树种, 种类多, 分布广。但近年来受杨树溃疡病威胁较大, 蔓延较快, 55 年在北京市某苗圃首次发现, 后来在河北、河南、辽宁、陕西、江苏等省陆续发生, 如 59 年秋辽宁省仅沈阳等地发现, 而 1977 年 9 月在赤峰市及盖县等地病害普遍发生, 发病率高达 96.9—100%, 感病指数为 68.7—95.8%。因此, 溃疡病已为林业生产带来极大危害, 是一个迫切需要解决的问题。

以前一直总误认为致病菌与国外杨树细菌溃疡病相同, 病原为丁香假单胞杆菌杨生理型 (*Pseudomonas syringae* f. sp. *populea* Sabet)。近年来, 观察到我国杨树溃疡病的症状与国外报道症状不同^[2,3], 在分离过程中发现除细菌外, 经常见到有一种真菌。用细菌接种, 均未成功。为此, 对溃疡病的致病菌产生了怀疑, 认为有必要对病原菌重新鉴定, 以确定溃疡病的致病菌, 从而指导该病的防治。1976—1977 年在以往研究的基础上, 作了大量的、系统的分离和接种,

把分离出的真菌、细菌同时进行了室内外接种试验, 终于用真菌接种成功。

一、病害症状

本病于四月开始发生, 五月底至六月为发病高峰, 七、八月病势减缓, 九月再次出现高峰, 十月以后逐渐停止发展。病斑多发生于主干和粗枝树皮上, 发病初期在皮孔附近出现不明显的水渍状或水泡 (见图 1), 圆形或略圆形, 大小不等, 直径约 0.5—15 公分, 随后水泡破裂, 流出淡褐色液体, 遇空气而成为赤褐色, 并把病斑周围染成黑褐色, 最后病部干缩下陷, 中央有一纵裂小缝。严重受害的树木, 树皮上病斑累累, 病疤密集, 相互联结, 使树皮养份不能输送, 植株逐渐死亡。有的病斑第二年可以继续扩大和为害, 后期病斑上有黑色针头状小点。一般光皮树种症状明显, 粗皮树种仅在树皮下变呈褐色腐烂, 流出赤

本文于 1978 年 3 月 18 日收到。

* 本研究是在俞大绂教授指导下进行的。

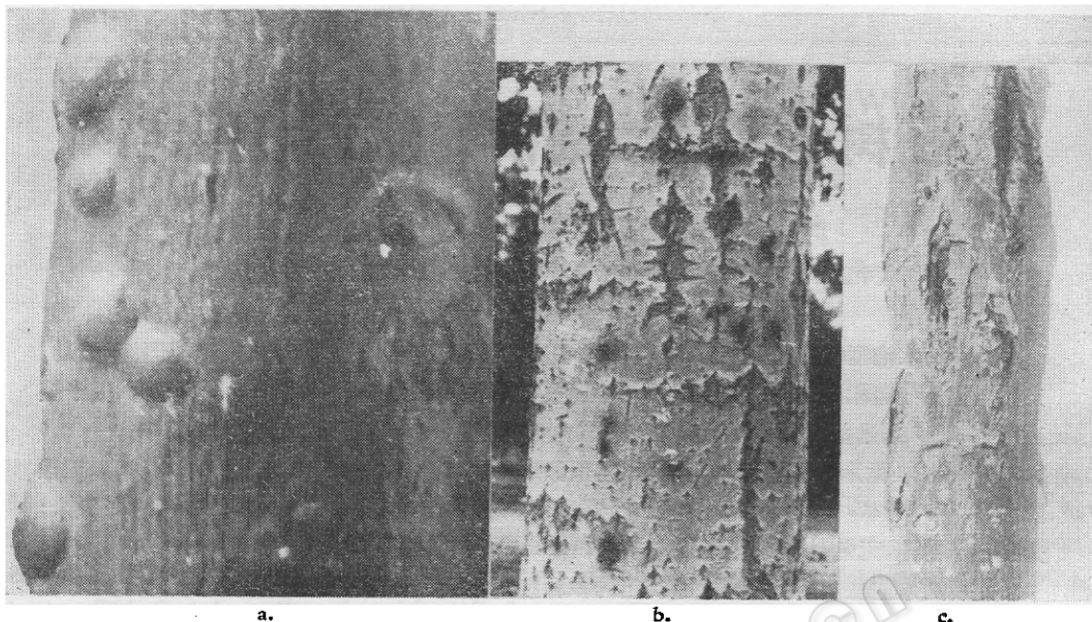


图1 杨树水泡型溃疡病症状

a. 水泡型初期; b. 水泡破裂; c. 溃疡型后期。

褐色液体,不形成水泡状。

二、发病组织的显微检查

将初期发病组织,选择新鲜的,挑取内部病组织,并略带健康组织的病块,放入载玻片中央的无菌水滴中,用解剖针将病块挑破,盖上清洁玻片,静置十分钟,在低倍镜下观察有无云雾状的细菌溢出。从春季发病开始,陆续作了多次观察,始终未发现明显的云雾状细菌从病组织中涌现出来。另外将病组织分层解剖作切片,见水泡状病斑内有菌丝出现,并在水泡表皮下见有紫褐色小点,似孢子器初形成。

三、病原菌的确定

(一) 分离

将不同类型和不同时期的病组织采用二种方法分离:一个病组织消毒后,一半以 PDA 培养基进行组织分离,另一半以 NBA (牛肉汁) 培养基作平板稀释法。

分离消毒是采用 75% 酒精棉花擦病

斑表面,然后以灭菌小刀削去表面组织,用灭菌镊子将内部病组织取至培养皿灭菌水中捣碎,静置十分钟,以此作稀释法分离;将消毒后的病组织小块取至 PDA 培养皿中,作组织法分离。另外也采用了 0.1% 浓度升汞水消毒,将病组织消毒 1—2 分钟左右,灭菌水冲洗三次,再放入培养基中培养,此二种消毒方法均易获得病组织中的真菌和细菌。将分离后的培养皿,放入 28℃ 温箱中培养 3—5 天后,记载病菌出现的种类和数量。

从三月五日至九月底,陆续分离,其结果见表 1。

另外进行的稀释法分离,共 163 次,其中细菌(淡蓝小点菌落和淡黄小点菌落)出现 150 次,真菌(*Dothiorella gregaria*)出现 44 次,真菌和细菌混合的出现 18 次,杂菌出现 15 次,无菌出现 36 次。

根据以上分离结果,看出杨树溃疡病病源的主要菌为真菌(*Dothiorella gregaria* 以下均同)和细菌(淡蓝小点菌落和淡黄小

表 1 杨树溃疡病各类病斑分离结果

病斑类型	分离次数	分离组织块数	组织分离法出现菌落数				无菌组织块数
			真菌 (<i>Dothiorella gregaria</i>)	细菌淡蓝小点 淡黄小点	真菌和 细菌混合	其他杂菌	
初期病斑	40	118	65	8	0	9	41
当年病斑	106	349	112	32	4	44	157
上年旧病斑	17	147	56	18	7	9	57
总计	163	619	233	58	11	62	255

点菌落)。从分离过程中看来,真菌从始至终出现的种类一致,而且出现的机会也很多,细菌出现的种类不太一致,春季淡蓝小点菌落较多,秋季淡黄小点菌落较多,数量也很不一致,在同一类型病组织中,时有时无。

(二) 接种

为确定本病的致病菌,将分离培养的主要真菌和细菌,从四月中旬开始,在室内外分别进行了接种试验、接种树种为易感病品种北京杨 (*P. pekinensis*),树龄 2—3 年生,植株胸径为 3—5 公分左右。

接种菌种: (1) 将分离出的主要真菌、细菌,用菌丝块或细菌菌落(悬浮液)接入树皮内。(2) 用室内接种斑上长出的孢子,配成每视野约 50 个孢子悬浮液接种在树皮上。(3) 将病斑组织(水泡水、病斑),直接接树皮伤口内。菌种分别以单菌或混合菌使用。

接种方法: (1) 刺伤: 在用 75% 酒精消毒的皮孔上用小钉刺一小孔,将菌接入孔内。(2) 烫伤: 用一小钉在酒精灯上烧热在皮孔上钻一小孔,将菌接入。(3) 皮孔: 植株自然孔口,将菌接入孔口。(4) 注射: 以注射器,将菌液注入皮孔内。

室外接种: 在杨树主干上,选好光滑无伤之表皮或皮孔,用 75% 酒精消毒,然后在无伤表皮或刺伤皮孔上,或自然皮孔上,将培养好的菌丝块,或配成的孢子或细菌悬浮液放入接种点,菌接好后,在接种处

放蘸无菌水的消毒脱脂棉,再用湿的棉花片和纱布包扎,最外层用塑料布包好,保湿半月左右。对照不接菌同法处理,待一个半月后检查接种结果。

室内接种: 挑选生长健壮无病植株,直径约 3—5 公分,将主干截取成 30 公分长,上端以蜡封口,在上选接种点,将菌接于皮孔或皮孔刺伤点上,并在上放蘸无菌水小棉球,然后置于室温玻璃钟罩内,保湿半月,插入水中培养观察,待一个半月后检查接种结果见表 2。

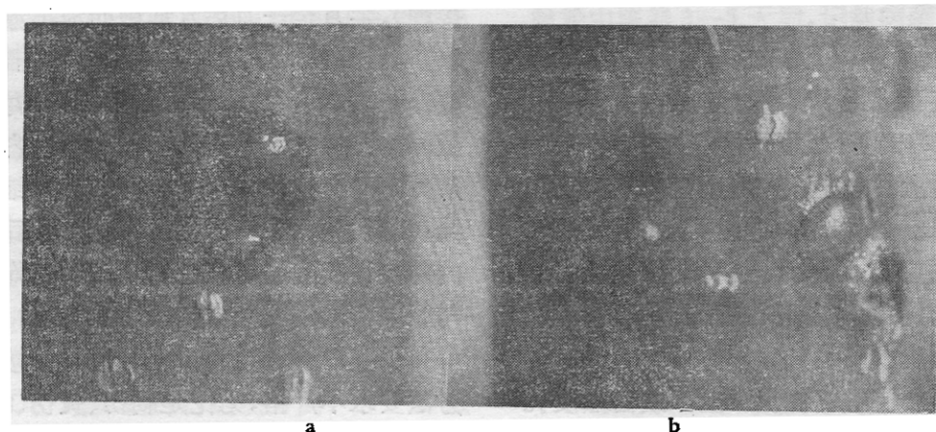
从表 2 室内外接种结果说明,用真菌的菌丝块或孢子造成伤口或直接接于树皮上,均能使植株发病,室内发病率一般较室外高。室内感染的症状是组织变成浅褐色至黑褐色斑块,一个月内在其病斑中央形成孢子器和孢子。室外发病症状是先成褐斑,在高温高湿的九月形成水泡(六月接种),半月至一月后水泡破而流出赤褐色水,与自然情况下产生的症状相同(图 2)。室外在高温高湿条件下潜育期约三月,但低温、湿度小潜育期相应增长。室内一般条件下潜育期约二个月。用真菌加细菌与纯真菌的菌丝或孢子接种的症状相同。室内外接种长出的病斑进行再分离,均得到与原来相同的真菌。

从室内接种结果看出,用真菌接种的方法要求不严格,无论是刺伤、烫伤、注射、皮孔和无伤表皮,均能接种成功。但接种时要求的环境条件,特别是温、湿度较严

表2 杨树溃疡病接种结果

菌种		发病情况 接种方法	室内接种				室外接种			
			接种次数	接种数	发病数	发病率(%)	接种次数	接种数	发病数	发病率(%)
<i>Dothiorella gregaria</i>	丝	刺伤	10	92	87	94.6	8	137	16	11.7
		皮孔	2	18	8	44.4	4	65	0	0
		烫伤	2	10	6	60.0				
		注射	2	16	16	100.0	1	9	0	0
	孢子	刺伤	6	63	31	49.2	7	131	42	32.1
		皮孔	2	31	17	54.8	4	71	20	28.2
		烫伤	2	21	4	18.1				
		无伤表皮	2	28	8	28.6	2	46	27	58.7
真菌 (<i>Dothiorella gregaria</i>) + 细菌		刺伤	9	83	30	37.5	7	328	77	23.2
		皮孔	2	15	4	26.7	2	35	35	100.0
		注射	2	21	18	85.7				
细菌 (淡蓝小点 淡黄小点)		刺伤	8	97	2	2.1	8	26.4	5	1.9
		皮孔	2	10	0	0				
		烫伤	1	8	0	0				
		注射	3	26	1	0.4				
对照		刺伤	28	86	2*	2.4	11	134	0	0
		皮孔	3	15	0	0	3	28	0	0
		烫伤	3	12	0	0	1	6	0	0
		注射	8	22	0	0	5	65	0	0

* 稍有小面积色变,可能是自然变色。

图2 *Douthiorella gregaria* 人工接种症状

a. 分生孢子接皮孔——水泡型症状。 b. 菌丝接刺伤皮孔——水泡型症状。

表 3 细菌致病力过敏性测定

菌种代号	菌 种 来 源	接种次数	接种数	枯斑数	过敏反应*	症 状
10	淡蓝点菌落(新病斑分离出)	2	25	0	—	无变化
14	淡黄点菌落(水泡水分离出)	2	30	0	—	无变化
20	蓝色荧光菌(新病斑分离出)	2	22	0	—	无变化
u ₁	淡蓝点菌落(室外接种再分离)	2	44	0	—	无变化
19	淡蓝点菌落(室内接种再分离)	2	26	0	—	无变化
4	淡蓝点菌落(室内接种再分离)	2	30	0	—	无变化
对照	无菌水	2	31	0	—	无变化

* “—”表示阴性, 负反应。

格, 室外有的接种未发病, 可能是接种时外界条件不适合。

从接种表上还看出细菌有少量的感染, 把感染的病斑进行了再分离和接种, 发现有真菌出现, 将细菌重复接种和再接种, 均未发病, 这可能是真菌自然感染的原因。为了验证分离到的细菌是寄生菌还是腐生菌^[1], 测定了细菌致病力, 方法是将杨树溃疡病分离出的细菌, 在烟草叶片上测定, 取盆栽烟草植株中部叶片, 在叶背的侧脉附近, 以细菌悬浮液(培养 24 小时的斜面管细菌, 每管放 2 毫升无菌水), 用注射器将菌液注入叶肉上, 每隔一个叶脉接种一个菌株, 在同一张叶片上比较不同细菌上种的致病力, 并以接无菌水为对照, 接种后以玻璃钟罩保湿, 24 小时后检查接种点有无枯斑产生, 结果见表 3。

从表 3 看出, 杨树溃疡病中所分离的多种细菌, 在指示植物过敏性反应中, 均不能诱发烟草叶片细胞的坏死, 也无枯斑出现, 因此证明这些细菌为腐生性, 所以在接种过程中均未感染和引起杨树溃疡病的发生。

(三) 病原菌种的鉴定

将室内外接种上的真菌, 进行人工培养和自然病斑子实体的观察和鉴定。

(1) 生长特性: 真菌在 PDA 和 NBA 培养基均能生长, 但在 PDA 上生长较好, 初期菌落白色, 有发达的气生菌丝, 呈绒毛

状至棉絮状。二天以后菌落逐渐变为灰白色, 最后为黑色, 菌落初期有明显的灰黑色轮纹。在马铃薯斜面上生长一个月后形成黑色孢子器, 二个月后孢子器内形成分生孢子, 如六月份转入 PDA 斜面, 在九月份检查均长出子囊和子囊孢子。在消毒杨树枝条上能产生大量灰黑色分生孢子器和子囊腔。

(2) 形态特征: 此菌能为害杨树(*Populus L.*)、胡桃(*Juglans regia L.*)、苹果(*Malus pumila Mill*)等。将此三种树上的相似病斑进行分离, 从菌丝的生长特性到分生孢子器的形成, 三者相似。在杨树上春季发生的病斑, 秋季才形成分生孢子器, 秋季病斑在翌年春季形成分生孢子器。分生孢子器暗色球形, 生于寄主表皮下, 后外露, 单生或集生(图版 I-16), 分生孢子器大小为 $97-233.0 \times 97-184.3$ 微米, 有明显的子座(图版 I-1c), 后期突破表皮孔外露; 分生孢子梗短, 不分枝; 分生孢子椭圆形或梭形(图版 I-1a), 单孢, 无色, 具云纹(孢子中有纵形无色条纹), 大小为 $19.4-29.1 \times 5.0-7.0$ 微米, 根据以上分生孢子形状、大小及子座等特点, 认为无性阶段为 *Dothiorrella gregaria* Sacc.

有性阶段: 杨树溃疡病病斑上于秋季形成较分生孢子器稍大的黑色粒状物, 即为病菌的有性阶段, 此菌的形态特征为子座埋生于表皮下, 后突破表皮外露, 黑色近

圆形,子座单生直径为 0.2—0.4 毫米,集生为 2—7 毫米,子囊腔埋生于子座,散生或簇生,呈洋梨形(图版 I-2c),黑褐色,具有乳头状孔口,子囊腔大小为 $116.4-175.0 \times 107.0-165.0$ 微米;子囊棒形,具有短柄,壁为双层透明,顶壁稍厚,易于消解,大小为 $49.0-68.0 \times 11.0-21.3$ 微米,含孢子 8 个(图版 I-2b),双列,子囊间有假侧丝;子囊孢子单孢,无色,倒卵形至椭圆形(图版 I-2a),大小为 $15.0-19.4 \times 7.0-11.0$ 微米。

从病斑上分离长出的分生孢子和菌丝,以及接种病斑再分离的真菌培养约半年,均能长出与自然情况相同的子囊和子囊孢子。

根据以上病菌形态特征和 *Botryosphaeria* 属各种的描述,认为本病有性世代为 *Botryosphaeria dothidea* (Moug. ex Fr.) Ces. et de Not. 同物并名为 *Botryosphaeria ribis* Gross. et Dugg.

四、讨 论

1. 分离所得的真菌,经多次室内外人工接种,仅 *Dothiorella gregaria* 或 *Botryosphaeria dothidea* 能接种成功,并产生典型症状。

2. 分离所得细菌,种类繁多。分离培养出现较一致的为淡蓝小点菌落和淡黄小点菌落,经初步鉴定为欧氏杆菌(*Erwinia*)和假单孢杆菌(*Pseudomonas*)。用这两种细菌经多次人工接种在杨树,一直没有呈现任何症状。同时进行烟草叶片测定,此二种细菌均不产生枯斑反应,也不能诱发烟草坏死。因此,证明此二种细菌为杨树溃疡病病斑上的腐生菌。

3. 经研究和鉴定杨树溃疡病是由真菌有性阶段为 *Botryosphaeria dothidea*, 其同物并名为 *Botryosphaeria ribis*, 无性阶段为

Dothiorella gregaria 所引起。有性阶段秋季在病斑上形成,十月中旬子囊孢子大部释放。用无性世代的菌丝在消毒的杨树皮上或 PDA 培养基上培养半年时间易产生与野外相同的子囊和子囊孢子。

Botryosphaeria dothidea 子座单生为 0.2—0.4 毫米,集生为 2—7 毫米;子囊腔埋生于子座内,呈洋梨形,大小为 $116.4-175.0 \times 107.0-165.0$ 微米;子囊棒形,具短柄,壁为双层,顶壁稍厚,含孢子 8 个,双列,子囊间有假侧丝,大小为 $49.0-68.0 \times 11.0-21.3$ 微米,子囊孢子单孢,无色,倒卵形,大小为 $15.0-19.4 \times 7.0-11.0$ 微米。

Dothiorella gregaria 在寄主表皮下形成分生孢子器,暗色,球形,单生或集中,大小为 $97-233.0 \times 9.7-184.3$ 微米;分生孢子单孢,无色,梭形,大小为 $19.4-29.1 \times 5.0-7.0$ 微米。

4. 综述研究,证明我国杨树水泡型溃疡病与国外杨树细菌性溃疡病完全不同,不是由 *Pseudomonas syringae* 所引起,二者不能混为一谈。因此在确定病原的基础上,今后对尚未清楚的问题,需作进一步的研究。

5. 本病防治:(1) 选用抗病品种是防治该病根本有效的措施,据观察不同的品种,抗病性有很大差异,因此发挥品种本身抗病能力,选用抗病品种,从调查中看出 I-214 (*P. X euramericana* cv. 'I-214')、日本白杨(*P. euramericana* cv. 'Japan')沙蓝杨(*P. X euramericana* cv. 'sacrau79')毛白杨(*P. tomentosa*)等均为抗病品种,应淘汰青杨(*P. cathayana*)、马氏杨(*P. maximowiczii*)、美青(*P. pekinsis*)、箭杆杨(*P. nigra* var. *thevestina*)等感病品种。(2) 苗带病是传病的重要途径,在生产中初造林的植株,发病较多,另外从室内苗木诱发病

害试验,证明杨树苗木是带病的,因此,从苗木入手防治病害也是重要环节。在苗圃中发病严重的植株,应严格控制,不要外运,就地烧毁。并严格实行苗木消毒,以杜绝病害的传播。(3) 该病可通过孢子进行传播,从孢子捕捉中,观察到各时期均有不同程度的孢子飞散,九月初释放较多。另外用孢子作人工接种也易发病,因此证明孢子是可以传播病害的,故各种防治措施最好在孢子飞散前后进行较为有利。以上

仅是初步的试验,目前在确定病原的基础上,正在进一步研究防治措施。

参 考 文 献

- [1] Király, Z. and Klemen, Z.: Methods in plant. 林传光译: 植物病理学方法, 科学出版社, P133—134, 1976 年。
- [2] FAO 1968 Poplars in forestry and land use 133—139.
- [3] Sabet, K. A. & Dowson W. J.: *Ann. Biol.*, **39**: 609—616, 1952.

THE IDENTIFICATION OF THE CAUSAL ORGANISM OF THE BLISTER-TYPE CANKER ON POPLAR

Xiang Yu-ying Hua Xiao-mei

(Institute of Forest Sinica, Academy of Forest Sinica, Beijing)

Zhao Jing-zhou

(Heiloungjiang Institute of Forest Protect, Nenjiang)

A fungus isolated from the blister-type patches on poplars has succeeded in inoculation both in laboratory or in the field tests. Repeated inoculations on poplars with different bacteria inoculum isolated from the same patches are failed. The perfect stage of the fungus has identified as *Botryosphaeria dothidea*: stromas 2—7 mm in diameter; ascocarps $116.4\text{--}175.0 \times 175.0\text{--}165.0 \mu\text{m}$; asci $49.0\text{--}68.0 \times 11.0\text{--}21.3 \mu\text{m}$; ascospores 1-

celled, hyaline, abovoid, $15.0\text{--}19.4 \times 7.0\text{--}11.0 \mu\text{m}$. The imperfect stage of the fungus is *Dothiorella gregaria*; conidia 1-celled, hyaline, ovoid to fusoid, $19.4\text{--}29.1 \times 29.1\text{--}5.0 \mu\text{m}$ in size.

The bacteria isolated from the patches have identified as *Erwinia* and *Pseudomonas*. Since they do not produce necrosis in the reaction tests, they are assumed as saprophytes rather than parasites.