

# 北方杨树上冰核活性细菌的研究

曾大鹏 张永祥 晁龙军 汪来发 孙福在

**摘要** 从辽宁省、黑龙江省及北京市的杨树不同部位及干部溃疡类病害的病斑上分离到大量细菌。约有60%左右的菌株在-3.5~6℃具有冰核活性。其中,从树干冻伤部位分离的细菌数量最多,冰核活性细菌的比例也最高;由 *Dothiorella gregaria* Sacc. 引起的大型溃疡病病斑上也分离到较多的冰核活性细菌。用干部大型溃疡斑上分离到的1个冰核活性较强菌株 [*Erwinia herbicola* (Lohnis) Dye] 和叶部分离1个冰核活性强的菌株 (*Pseudomonas syringae* Van Hall), 在人工霜箱中测定,可使杨树干条的结冰温度从-4.6℃分别提高到-2.2℃和-1.7℃。初步调查研究的结果表明,北方杨树上普遍存在着冰核活性细菌,它们在引起杨树冻伤过程中起重要作用;在诱发某些干部溃疡病过程中也可能有重要影响。

**关键词** 杨树、冰核活性细菌、冻害

杨树 (*Populus* spp.) 是我国北方重要的造林树种。冻害发生十分严重,主要表现为干部冻伤(或冻裂)、枝条枯死、芽冻死及叶片霜冻等,是影响造林成活率、材积生长量和诱发某些枝干病害的主要原因之一。

近年来国内、外的研究<sup>[1~7]</sup>证明,在自然界和植物体上广泛存在一些冰核活性细菌 (Ice nucleation active bacteria, 简称 INA 细菌), 是引起植物产生霜冻的主要因素之一,可在-2~-5℃使植物细胞水结冰,而没有这种细菌存在的植物,由于植物细胞水具有过冷却作用 (supercooling), 在-7~-8℃低温下也不结冰。这一新发现,为研究和防治冻害及与冻害有关联的一些病害提供了新途径;并在人工降雨或降雪、冰库节能、食品保鲜、检疫以及某些害虫生物防治等方面已有成功的开发和利用。

国外有关 INA 细菌在林木上的专门研究极少<sup>[8]</sup>。此类细菌与果树树干冻伤之间的关系已在桃树<sup>[9]</sup>和梨树<sup>[10]</sup>上得到证明。迄今尚未发现它们定殖到针叶树上<sup>[11]</sup>。Haworth 和 Spiers<sup>[12]</sup>曾报道从杨树和柳树叶斑病和溃疡病中分离到一种 INA 细菌 (*P. syringae* pv. *syringae*), 但与杨、柳树冻伤及病害的关系并未明确。在国内,孙福在等<sup>[1,2]</sup>在10个省、市、自治区的45种植物上分离112个 INA 细菌菌株,分属于3个属的8个种(或变种)。但在杨树和其它林木上的 INA 细菌在国内尚未见报道。为此1992年以来,作者对辽宁、黑龙江省和北京市等地杨树上的 INA 细菌进行了初步调查研究,结果报道如下。

## 1 材料和方法

从杨树干部冻伤部位、冻死枝芽、大型及水泡型溃疡病 (*Dothiorella gregaria* Sacc.) 和烂皮病 (*Valsa sordida* Nit.) 的病斑上取样,用稀释法在 PDA 平板上分离细菌。挑取有代表性的

1994-03-30 收稿。

曾大鹏副研究员,晁龙军,汪来发(中国林业科学研究院森林保护研究所 北京 100091);张永祥,孙福在(中国农业科学院植物保护研究所)。

菌株,经纯化后稀释成  $10^7$ /mL 的含菌量,用 Vali 小滴冻结法<sup>[4,5]</sup>测定各菌株的冰核活性。

在初步鉴定细菌种类基础上,选 *Erwinia* 属和 *Pseudomonas* 属各 1 个冰核活性较强的菌株 LTD<sub>25</sub> 和 BJF<sub>32</sub>,制成  $10^7$ /mL 悬浮液接种美×青杨 [*P. pyramidalis* × *cathayana* cv. Gansu]。方法是将越冬的 1 年生干条采回,在室温(18 ℃左右)水培 1 周,截取离地表 0.5~1 m 处代表下段,1.5~2.0 m 处为上段。将干条表面洗刷干净,用 70%酒精表面处理,用手术刀切去 1/2 枝芽。用脱脂棉沾取菌液覆盖在芽上,然后用保鲜膜密封;对照用灭菌蒸馏水做同样处理。在室内保湿 4 d 后除去保鲜膜及棉花,在电脑控制的人工霜箱中测定接种点的结冰温度。

## 2 结果与分析

### 2.1 杨树不同部位的细菌分离及冰核活性测定

表 1 杨树不同部位的细菌分离及细菌冰核活性测定结果

取样部位	分离样本数 (个)	有细菌样本数 (个)	不同温度下有 INA 细菌的样本数(个)		
			-3.5 ℃	-4.5 ℃	-6 ℃
干部冻伤	9	9	0	6	0
大型溃疡病斑	22	17	1	4	8
水泡型溃疡病斑	11	5	0	0	1
烂皮病病斑	6	0	0	0	0
冬季死芽	4	4	0	1	0
叶片	1	1	1	0	0
总计	53	36	2	11	9

从表 1 可以看出:采自辽宁、黑龙江和北京等地杨树不同部位的 53 个样本中,有 36 个样本含有大量细菌,占 67.93%。这 36 个样本上的代表性菌株,经 Vali 小滴冻结法测定,在 -3.5~-6 ℃低温下显示有 INA 阳性菌株的样本为 22 个,占有细菌样本数的 61.11%。值得注意的是:干部冻伤的 9 个样本均含有大量细菌,其中有 6 个样本的代表菌株是活性较强的 INA 菌;分离的 22 个大型溃疡斑中,有 17 个样本含有大量细菌,占 77.27%,其中有 13 个样本的代表菌株显示了强弱不同的冰核活性,占 76.47%。从水泡型溃疡病斑上,约有一半样本分离到大量细菌,只有一个样本的代表菌株有较弱的冰核活性。6 个烂皮病样本中,细菌含量极少,未发现具有代表性的菌株。从叶片上得到了 1 个活性强的 INA 细菌。

经初步鉴定,在不同部位样本分离到的 INA 细菌,多数为 *Erwinia* 种群,少数为 *Pseudomonas* spp。从辽宁省铁岭市大型溃疡斑上分离的 LTD<sub>25</sub> 号菌,鉴定为 *E. herbicola* (Lohnis) Dye;从北京杨树叶片上得到的 BJF<sub>32</sub> 号菌,鉴定为 *P. syringae* van Hall。两者表现了最强的冰核活性,在 -3.5 ℃下即可结冰。

### 2.2 INA 细菌引致杨树干条冻伤的测定

图 1 表明:在人工霜箱中接种后第 4、5、8 d 测定,对照(CK)的下部干条结冰温度平均为 -4.8 ℃,上部平均为 -4.7 ℃,并无差异;而接种 BJF<sub>32</sub> 和 LTD<sub>25</sub> 的处理,第 4 天测定的最高结冰温度分别为 -1.7 ℃和 -2.2 ℃,比对照均有明显提高。在接种的下部干条上,BJF<sub>32</sub> 平均结冰温度为 -2.4 ℃,LTD<sub>25</sub> 的平均结冰温度为 -2.5 ℃;在接种的上部干条上,BJF<sub>32</sub> 平均结冰

温度为 $-3.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{LTD}_{25}$ 为 $-3.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。说明  $\text{BJF}_{32}$ 的冰核活性高于  $\text{LTD}_{25}$ ;而从接种部位来看,下部干条对同一 INA 细菌引起的冻伤要比上部干条较为敏感。

### 3 讨论

(1)从辽宁、黑龙江和北京市杨树上采集的样本中,约有 70% 含有大量细菌,其中 60% 左右样本的代表性菌株为 INA 细菌。这说明,北方杨树上 INA 细菌是相当普遍的。这些细菌的冰核活性以中等或中等偏上的为多。

以冰核活性较强的 *P. syringae* 菌株( $\text{BJF}_{32}$ 和 *E. herbicola* 菌株( $\text{LTD}_{25}$ )接种杨树干条,在人工霜箱中测定,比对照的结冰温度分别提高了  $2.9\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $2.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。这说明,某些 INA 细菌的存在与杨树的冻伤有直接关系。

(2)在杨树不同部位的样本中,干部冻伤部位的样本都有大量细菌,其  $2/3$  的代表株系为 INA 细菌,这是杨树冻伤与 INA 细菌有密切关系的又一个证据。由 *D. gregaria* 引起的大型溃疡斑中 76% 的样本含有大量细菌,其中绝大多数为 INA 细菌;而同一病原真菌引起的水泡型溃疡病的样本中,仅 50% 左右含有较多细菌,仅有 1 个菌株有较弱的冰核活性,大型溃疡斑的产生与 INA 细菌的关系值得今后进一步探讨。

(3)杨树干条下部比上部对 INA 细菌更为敏感,这与田间杨树冻伤多发生在干基部的现象是一致的。本试验中,对照干条的结冰温度平均为 $-4.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;而国外曾报道,当不存在 INA 细菌时,一般植物细胞水在 $-7\sim-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的低温下也不会结冰。这种差异可能与木本植物中含有某些冰核活性物质和微生物,因而提高了细胞的结冰温度有关<sup>[12~15]</sup>。即便如此,INA 细菌在本试验中还是显示了提高杨树干部结冰温度的效果。

接种 INA 细菌后,第 8 天杨树干部的结冰温度较第 4、5 天要高一些,这可能与细菌在接种点上需要有一个定殖过程,诱发植物细胞结冰的能力才能更强有关。

(4)冻害是我国北方杨树普遍而又严重的问题,往往又是某些溃疡病的诱因。因此,进一步研究 INA 细菌在造成杨树冻伤及诱发某些溃疡病过程中的作用,将有可能从 INA 细菌和病原微生物的双重角度为杨树冻害和溃疡类病害的综合治理提供科学依据。

### 参 考 文 献

- 1 孙福在,朱红,何礼远,等. 我国冰核活性细菌种类及其分布的初步研究. 中国农业科学,1989,22(2):93~94.
- 2 孙福在,何礼远. 冰核活性细菌与植物霜冻的研究. 植物保护,1989,(4):41~43.
- 3 孙福在,朱红,何礼远. 影响冰核细菌成冰活性的因素研究. 中国农业科学,1991,24(3):57~64.
- 4 Vali G. Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous freezing of supercooled liquids. J. Atmos. Sci.,1971,28:402~409.
- 5 Lindow S E, Arny D C, Upper C D. *Erwinia herbicola*: A bacterial ice-nucleus active in increasing frost injury to cron. Phytopathology,1978,63(3):523~527.
- 6 Lindow S E, Hirano S S, Barchet W R. Relationship between ice nucleation frequency of bacteria and frost injury. Plant

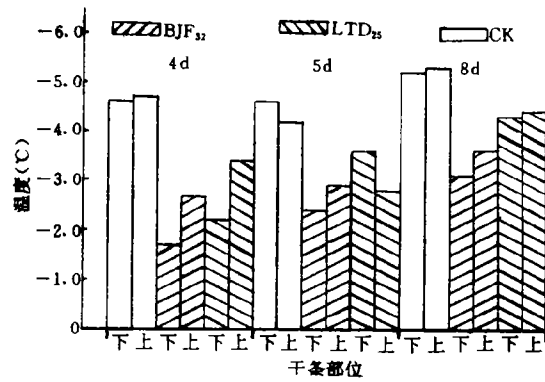


图 1 INA 细菌引致杨树干条冻伤的测定

- Physiol. ,1982,70(4):1090~1093.
- 7 Lindow S E. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* ,1983,21:363~384.
  - 8 Scortichini M, Belisario A, Motta E. Bacterial species in relation to forest tree decline. *J. of Arboriculture*, 1991, 17(9):246~249.
  - 9 Ward J C, Gonzales C F, English H. Ice nucleation by *Pseudomonas syringae* associated with canker production in peach. *Phytopathology*, 1981, 71(1):109.
  - 10 Haefele D, Lindow S E. Localization and quantification of ice nuclei and ice nucleation active bacteria associated with dormant and growing pear tissue. *Phytopathology*, 1982, 72(2):946.
  - 11 Lindow S E, Arny D C, Upper C D. Distribution of ice-nucleation active bacteria on plant in nature. *Applied Environmental Microbiology*, 1978, 36(6):831~838.
  - 12 Andrews P K, Proebsting E L, Gross D C. Differential thermal analysis and freezing injury of deacclimating peach and sweet cherry reproductive organs. *J. Am. Soc. Nortic. Sci.* ,1983, 108(5):755~759.
  - 13 Andrews P K, Proebsting E L, Jr. , et al. Ice nucleation and supercooling in freeze-sensitive peach and sweet cherry tissue. *J. Am. Soc. Nortic. Sci.* ,1986, 111(2):232~236.
  - 14 Ashworth E N, Anderson J A, Davis G A. Properties of icenuclei associated with peach trees. *J. Am. Soc. Nortic. Sci.* ,1985, 110(2):287~291.
  - 15 Proebsting E L, Jr. , Andrews P K, et al. Supercooling young developing fruit and floral buds in deciduous orchards. *Nortscienie*, 1982, 17:67~68.

## A Study on Ice Nucleation Active Bacteria in Northern Poplars

Zeng Dapeng Zhang Yongxiang Chao Longjun Wang Laifa Sun Fuzai

**Abstract** A number of bacteria had been isolated from different parts of poplar in Liaoning, Heilongjiang Province and Beijing City. About 60% of the bacteria strains showed ice nucleation activity under  $-3.5 \sim -6^{\circ}\text{C}$ . Among them, the majority of the bacteria were isolated from the frozen bark of the poplars and most of them were INA bacteria, which could also be isolated from large canker lesions caused by *Dotheorella gregaria* Sacc.

The overwintered one-year-old poplars were inoculated separately by *Pseudomonas syringae* isolated from the leaf or *Erwinia herbicola* isolated from large canker lesion. The freezing temperature of stems was tested under laboratorial simulation conditions. The stems inoculated by both of the INA bacteria suffered frost injury at  $-1.7^{\circ}\text{C}$  and  $-2.2^{\circ}\text{C}$  respectively, whereas the frozen state of the checks appeared at  $-4.6^{\circ}\text{C}$ .

The results showed that, INA bacteria were distributed widely in northern poplars. In the courses of frost injury, those INA bacteria exerted important effect on the formation of frozen barks. Probably they also have some influences in the formation of large canker lesions.

**Key words** poplar, INA bacteria, frozen injury

---

Zeng Dapeng, Associate Professor, Chao Longjun, Wang Laifa (The Research Institute of Forest Protection, CAF Beijing 100091); Zhang Yongxiang, Sun Fuzai (The Research Institute of Plant Protection, CAAS).