

文章编号: 1001-1498(2007)04-0569-07

## 我国桉树青枯病研究进展

吴志华<sup>1</sup>, 谢耀坚<sup>\*</sup>, 罗联峰<sup>2</sup>, 张维耀<sup>1</sup>

(1. 国家林业局桉树研究开发中心, 广东 湛江 524022; 2. 国家林业局桉树研究开发中心永安分中心, 福建 永安 366000)

**摘要:**桉树青枯病害是危害桉树生产的主要病害, 近年来桉树青枯病的流行和发生对我国南方桉树产业造成很大经济损失。本文对当今主要桉树青枯病病害特点, 青枯病的发生和流行因素, 青枯假单胞杆菌对寄主桉树的致病机制及对抗病的差异和抗病机理等研究成果和现状作一概述, 并就存在的问题提出相应的建议。

**关键词:**桉树; 青枯病菌; 发生流行; 防治

中图分类号: S792.39

文献标识码: A

### Advances in Research on Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum* in *Eucalyptus* spp. in China

WU Zhi-hua<sup>1</sup>, XIE Yao-jian<sup>1</sup>, LUO Lian-feng<sup>2</sup>, ZHANG Wei-yao<sup>1</sup>

(1. China Eucalypt Research Center, Zhanjiang 524022, Guangdong, China;

2. Yongan Branch of China Eucalypt Research Center, Yongan 366000, Fujian, China)

**Abstract:** Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is a primary disease to *Eucalyptus*. The occurrence in *Eucalyptus* has brought great damages in south provinces of China. This paper reviewed the advancement involved in *Ralstonia solanacearum* colony characters, the symptom and characteristics of the wilt, the mechanism of pathogenesis induced by the bacteria and resistance expressed by the host trees, and the variations in resistance among tree species, clones and virulence among pathogen isolates, and the host-pathogen interactions. The current wilt control measures and some important aspects of research proposed for the future were suggested.

**Key words:** eucalypt, *Ralstonia solanacearum*, occurrence and epidemic, control

桉树 (*Eucalyptus* spp.) 因生态适应性广、速生、抗逆性强、木材多用途等优点, 已被世界热带、亚热带地区广泛引种栽培; 据估计全世界桉树人工林面积 1 500 万  $\text{hm}^2$ 。我国桉树栽培历史长、树种多。许多树种都适宜在广东、广西、海南、云南、江西、湖南等省栽培, 成为生态林、造纸林的速生丰产优良树种。随着桉树不同树种广泛栽培, 特别是 1985 年后, 广东、广西、海南大面积引种尾叶桉 (*E. urophylla* S. T. Blake)、巨尾桉 (*E. grandis* Hill ex Maiden  $\times$  E.

*urophylla* S. T. Blake) 后, 青枯病日趋严重。后来成为灾害性的流行病。这类病害的病原细菌即青枯病菌 [*Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi *et al.* 1996, 又名 *Pseudomonas solanacearum* (Smith, 1896) Smith, 1914, *Burkholderia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi *et al.*, 1993 或 *Bacillus solanacearum* (Smith, 1896)], 系从根或根茎部沿维管束侵入蔓延造成的系统性病害, 病情不严重时病株难以发现, 给防治带来很大难度。随着速生桉树林

收稿日期: 2005-12-23

基金项目: “十五” 国家科技攻关项目“南方主要速生阔叶树种新品种选育及培育技术 (2002BA515B02)”

作者简介: 吴志华 (1974—), 男, 湖南涟源人, 硕士, 工程师, 从事植物逆境生理生化等工作。

\* 通讯作者。

栽培面积的扩大,病害发生面积和分布范围的增加,将严重限制华南桉树的发展,造成很大的经济损失。本文对当今桉树青枯病的研究成果作一系统综述,以利我国桉树生产的发展。

## 1 桉树青枯病菌形态、生理生化特征

非荧光迁移性、好氧,革兰氏阴性杆菌。病菌在 PDA 平面培养基上表现:菌落圆形,边缘整齐,表面突起光滑、不透明,粘稠,先为乳白色,然后逐渐变为浅褐色,时间长后变为褐色。病菌菌体短杆状,两端钝圆形,大小为  $1.1 \sim 1.7 \times 0.3 \sim 0.6 \mu\text{m}$ ,  $1 \sim 2$  根端生鞭毛。以尼罗蓝 (Nile Blue A) 染色后在显微镜下可观察到聚羟基丁酸酯颗粒 (poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, PHB)。病菌生长温度,最低  $4 \sim 6$ ,最适  $32 \sim 35$ ,最高  $40 \sim 41$ 。病菌生长最适 pH 值  $6.8 \sim 7.2$ 。病菌能利用蔗糖,乳糖,甘露糖,甘油。指示剂由绿变黄,对照不变色。蔗糖利用不明显,指示剂开始变色较慢,而甘露醇,果糖,乳糖反应明显,连续 60 d 不产生气体。病菌能液化明胶,第 3 日液化区呈圆形,直径  $0.2 \text{ cm}$ , 60 d 全部液化。能还原硝酸盐,不能产生吡啶,但能产生氨。甲基红,乙酰甲基甲醇反应为阴性。不能水解淀粉,石蕊牛乳变红色。

## 2 青枯病菌学名演变和生物型测定

1864 年在印度尼西亚种植的烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 上首次发现,以后在中美洲和美国的佛罗里达州也相继发现此病<sup>[1]</sup>,是一种分布宽地域和极具有广泛性寄主的世界性细菌病害 (超过 40 多个科 450 多个植物品种),如番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill), 土豆 (*Solanum tuberosum* L.), 烟草 (*Nicotiana tabacum* L.), 茄子 (*Solanum melongena* L.), 豆科 (Leguminosae) 植物 [花生 (*Arachis hypogaea* L.), 法国豆 (*Phaseolus vulgaris* L.)], 还包括少数单子叶植物 [主要是蕉类 (*Musa* spp.), 生姜 (*Zingiber officinale* Roscoe) 和几个树种和灌木 [桉树, 木麻黄 (*Casuarina equisetifolia* L.), 橄榄树 (*Olea europaea* L.), 桑树 (*Morus alba* L.), 木薯 (*Manihot esculenta* Crantz)], 甚至拟南芥菜 [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]<sup>[2]</sup>。1896 年美国的 Erwin Smith 将该病的病原命名为青枯假单胞杆菌或茄青枯菌 (*Pseudomonas solanacearum* Smith)。该菌的表型和基因型多样性,一般来说,根据感染宿主类型分为五大类,

根据生化特性分为六个生物型,通常认为生物型归属于生理小种 3<sup>[2]</sup>。以 RFLP 分析,分为起源亚洲和美洲两大类<sup>[3]</sup>,前者主要是生物型 1 和 2,后者为生物型 3 和 N2。1992 年 Yabuuchi 等根据 DNA-DNA, DNA-RNA 分子杂交和同源性分析的结果,将其更名为 *Burkholderia solanacearum* 菌<sup>[4]</sup>。Yabuuchi 等<sup>[5]</sup> 1995 年建立新属 *Ralstonia* 属,并根据表型特征、脂肪酸图谱, rRNA-DNA 分子杂交和 16s rRNA 序列分析的结果,再次将青枯病菌更名为 *Ralstonia solanacearum* Smith。1988 年,吴清平等<sup>[6]</sup> 将我国桉树青枯病菌鉴定为青枯假单胞杆菌 (*Pseudomonas solanacearum* Smith), 属生理小种 1 号,生物型 1。1993 年,林雪坚等<sup>[7]</sup> 对从不同地区、不同桉树品种上分离的青枯病菌进行了分类鉴定,其结果与吴清平等报道的相同。1990 年, Dianese 等<sup>[8]</sup> 测定了桉树青枯病菌的 9 个菌株对番茄、辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 和茄子的致病性,发现所有菌株均可以侵染番茄和茄子,属于生理小种 1 号;但却不能酸化纤维二糖、己六醇、乳糖、麦芽糖、甘露醇和山梨醇等 6 种 C 源,属于生物型 1<sup>[8]</sup>。1997 年南非 Natal 省首次发生桉树青枯病,根据该病原菌的形态特征、染色反应结果以及培养特性,病原被鉴定为 *Ralstonia solanacearum* (Smith), 其生理小种及生物型的测定与吴清平等报道一致<sup>[9]</sup>。2000 年 Roux 等<sup>[10]</sup> 也报道了刚果的桉树青枯病,其病原属生物型 1。

吴光金等<sup>[11]</sup> 对广东、广西、海南桉树青枯病流行区病菌标样 51 个菌株进行病菌和生物型的鉴定。发现 3 个省 (区) 的桉树青枯病菌主要是小种 1 号;在广西、海南的菌株中,还有小种 2 号和 3 号病菌;生物型主要归属 1 号, 2 号和 3 号出现频率较少;有的菌株生物型鉴定结果难归入 Hayward 的 5 个生物型中,可能有其他生物型 (表 1)。

表 1 桉树青枯菌生物型及分布情况

生物型	寄主种类	病害流行区类型	分布地区
	尾叶桉	重病区	广东省湛江市、吴川市、海南省
	尾叶桉、巨尾桉、雷林 1 号	各类病区	广东省、广西区、海南省
	尾叶桉、8051、巨尾桉	一般病区	广东省雷州市、广西、其他
(其他)	尾叶桉、巨尾桉	重病区	广东省

由于在亚热带和热带的青枯病具有很强的地域性,以及青枯病能适应一些当地气候而发生变异等缘故,使一些报道往往不一致,但一般来说澳大利亚

和亚洲青枯病菌株属于生理小种 1 号,生物型 ,而南美洲桉树青枯病多属于小种 1 号,生物型 。

### 3 青枯病菌与植物互作机制

根据革兰氏阴性病原物表面上或分泌的与寄主的互作的蛋白质因子 (factors),分泌途径分为 I 至 N 类型,*Ralstonia solanacearum* 属于分泌蛋白型细菌 (proteobacteria) 的 III 类型<sup>[12,13]</sup>。III 类蛋白分泌类型是引起植物防御过敏反应 (hypersensitive response, HR) 所必须的。而 HR 表现的一个典型特征为受病原物感染的部位细胞迅速出现坏死,死亡的组织迅速水解,阻断了病原物的营养供应,同时这过程中引起氧化迸发 (oxidative burst),引起  $O_2$  和  $H_2O_2$  的积累,产生强氧化信号使细胞内  $Ca^{2+}$  水平提高, $Ca^{2+}$  和  $H_2O_2$  作为信号分子直接或间接激发蛋白激酶介导的一个主动死亡。在这死亡过程中氧化迸发产生的活性氧如  $H_2O_2$  和  $O_2$  既能有效地直接杀灭侵袭的病菌,同时参与细胞壁木质化及有关蛋白质与细胞壁的交联,强化细胞阻断病原物进一步侵袭;另外与其他抗病信号分子一起启动防御基因表达,如使植保素 (phytoalexin)、病程相关蛋白质 (pathogenesis-related proteins, PRP)、抗氧化体系等形成,结果使植物具有系统获得性抗性 (system acquired resistance, SAR)。这是植物抗病品种的一个显著特征。

细菌病原物对宿主植物中的敏感植物具有致病性和对抗性植物引起的 HR 反应取决于其 hp (hypersensitive response and pathogenicity, hp) 基因,这是广泛作为植物致病蛋白分泌中第 III 类型的一个主要特征。不过能引起一些植物发生 HR 或致病的一些类蛋白的激发子 (elicitors),其分泌作用方式属于胞外分泌,例如 *Erwinia amylovora* (Burrill, 1882) Winslow *et al*, 1920 和 *Pseudomonas syringae* 的 hp 基因发生编码突变菌株,对宿主无致病力,其编码的蛋白质分泌类似于第 II 类型的蛋白,它能侵染非寄主植物组织,引起植物发生 HR<sup>[14,15]</sup>。是否病原物侵染植物引起感病或引起明显的 HR 还很大程度取决于寄主相应的主要抗病基因与病原物的无毒基因 avr (avirulence gene)。avr 基因突变往往会引起以前对其有抗性的植株感病,同样转入 R 基因至感病植物中会提高其抗性。抗性植物表现出抗病是由于寄主植物单个的显性抗病基因与病原物的无毒基因互作表现出不亲和性缘故,即病原的无毒 avr 基

因编码的蛋白质产物作为配体直接与植物抗病 R 基因编码的受体蛋白相结合,两蛋白相互作用激活细胞中的信号级联放大途径,使植物发生 HR,最后表现出抗病防卫反应 (即基因对基因学说<sup>[16]</sup>)。

### 4 桉树青枯病的分布与宿主

青枯病主要分布于热带、亚热带及温带适宜地区。在国外, Sudo 等于 1983 年首先对巴西 Minas Gerais 州的桉树青枯病做了报道。此病在澳大利亚<sup>[17]</sup>、南非<sup>[19]</sup>、委内瑞拉<sup>[18]</sup>、印度尼西亚、马来西亚、马来群岛、缅甸<sup>[19]</sup>、刚果和乌干达等国<sup>[10,20]</sup> 也被陆续报道。在巴西,青枯病主要危害粗皮桉 (*E. pellita* F. Muell)、尾叶桉、巨桉 (*E. grandis* W. Hill ex Maiden) 和迈索尔桉 (Mysore gum/Mysore hybrid) (*E. tereticomis* Smith) 等树种,粗皮桉 6 至 15 个月生幼树的死亡率达 17%<sup>[18]</sup>。在南非,此病只危害巨桉和赤桉 (*E. camaldulensis* Dehnh) 的杂交无性系 (*E. grandis* × *E. camaldulensis*)。在刚果,主要危害尾巨桉 (*E. urophylla* × *E. grandis*) 和尾叶桉与粗皮桉的杂交无性系 (*E. urophylla* × *E. pellita*) 的无性系,而在乌干达,则只危害 2 年生以下的巨桉幼树<sup>[10,20]</sup>。

在我国桉树青枯病最早于 1982 年广西柳桉 (*E. saligna* Smith) 和巨桉等幼树上发现<sup>[21]</sup>,此后,在广东、云南、海南、福建和台湾等省区也相继发生<sup>[22]</sup>。此病在广东、广西和海南时有发生和流行。吴清平等 1988 年报道青枯病对桉树幼树致死率达到 10%<sup>[23]</sup>,而 1999 年报道桉树在青枯病流行区域,发病率达到 20% ~ 40%,而重病区则高达 90% 以上,发病累计面积已近 10 万  $hm^2$ <sup>[24]</sup>,其中以栽培面积最大的巨尾桉和尾叶桉发病最严重。

桉树对青枯病的抗性由多因素决定,常见的一些桉树对青枯病的抗性情况如下:

高抗性品种有赤桉、窿缘桉 (*E. exserta* F. Muell), 柠檬桉 (*E. citriodora* W. J. Hooker), 刚果桉 (*E. abl* 或 *E. tereticomis* Smith<sup>[25]</sup>), 雷林 33 (*E. leichou* 33), 窿缘桉 83002 (*E. exserta* F. Muell 83002), 刚果 12 号桉 A2 (*E. abl* 12 A2), 刚果桉 12 号桉 A5 (*E. abl* 12 A5), 刚果 12 号桉 W4 (*E. abl* 12 W4) 等 10 个树种和无性系; 中抗型的有雷林 1 号 (*E. leichou* No. 1), 尾叶桉 1 号 (*E. urophylla* S. T. Blake No. 1); 敏感品种有柳桉, 尾叶桉, 雷林 8051 (*E. leichou* 8051), 巨桉, 巨尾桉, 尾叶桉 2 号 (*E. urophylla* S. T. Blake No. 2), 刚果 12 号桉, 赤桉 1392 (*E. ca-*

*maldulensis* Dehnh 1392), 弹丸桉 (*E. pilularis* Smith), 小果灰桉 (*E. ppopinqua* Deane et Maiden), 树脂桉 (*E. resinifera* Smith), 粗皮桉, 细叶桉 (*E. teriticomis* Smith), 多枝桉 (*E. viminalis* Labill), 毛皮桉与巨桉的杂交种 (*E. macarthurii* Deane et Maiden  $\times$  *E. grandis*)。

## 5 桉树青枯病的症状和发病规律

病菌在土壤中主要通过根部自然孔口或伤口侵入,沿输导组织繁殖扩展,使病部变褐坏死,叶片失水萎蔫,根系腐烂变黑,坏死的根茎有发酵味,横切后经保湿数分钟即出现黄褐色或乳白色细菌溢脓。重病株根茎部至树干韧皮部出现褐色坏死(老茎、根表现更明显)。整个感病期间,桉树生长势弱,叶片黄化或变紫,后期大量脱落,出现偏枯或整株枯萎死亡。

一般来说,桉树种植 3~4 a 时才出现细菌枯萎,但其中约 18 个月桉树幼树时病情最严重,感染的幼树上病症表现更快,在巴西当幼苗移栽 2 个月后就表现出来,6 个月时症状显著。一般感病株移栽 15 个月后全部枯死。对 2~4 年生染病桉树调查发现根部腐烂,加之病菌对次生组织进一步的侵袭,更易遭风刮断和受白蚁攻击。

桉树青枯病发病或流行主要有以下几个原因:

### (1) 栽培条件

桉树青枯菌是一种典型的土壤生息细菌,在土壤中可存活 3 a 以上<sup>[26]</sup>,因此,病区的土壤和垃圾肥以及病株残体是青枯病病菌的重要来源。原先为木麻黄 (*Casuarina* spp.) 青枯病发生或流行区,或栽培过易感染青枯病菌的烟草、番茄等作物,均会导致土壤病菌积累数量多、诱发出病害。栽培密度不适均可引起病害发生。

### (2) 土壤养分

土壤养分不足导致青枯病的发作<sup>[27,28]</sup>,可能因青枯病菌侵袭过程中会分泌能分解细胞壁的蛋白酶,同时病菌侵染木质部后往往易在导管里形成“粘液”,阻塞水分输导,一些营养物质可有效地抑制这类酶的降解作用,或能防止和削弱病菌形成粘液;另外充足的养分能增强植株系统抗性,加强植株对病菌的防御,有利于植株恢复。

### (3) 气象因子

一般来说,高温多湿的环境易发病。在华南地区,4—11月,温度适宜,雨量充沛,台风等均可导致

青枯病菌在土壤中生长繁殖和传播,一般来说高温多雨的 6—8 月为发病高峰期,9—10 月病树枯死期。

### (4) 树种、种源和树龄

与其他病害一样,不同树种间,同一树种不同种源间的感病程度,由于其生理、生态等原因的差异而在不同地区表现出的抗病性也不大相同。近些年来大面积推广速生、对青枯病敏感的单一的尾叶桉和巨尾桉树种有助于病菌传播。目前生产中使用的大多数抗病桉树无性系,通过组培连续扩繁,抗病遗传性状会逐渐消失。一些抗病无性系在组培苗工厂使用 3 a 后对青枯病的抗性就明显降低,不同无性系的抗病性衰退速度不同<sup>[29]</sup>。

## 6 桉树青枯病的防治和控制

### 6.1 加强抗病品种或品系选育研究

由于桉树青枯病是以根部传染为主的一种维管束病害,地面化学防治效果不明显,选育和推广抗病品种是防治青枯病流行的根本策略。沈文生等<sup>[30]</sup>选育出的多个抗青枯病的无性系,在两广大量推广,均未发现青枯病。吴光金等<sup>[31]</sup>在桉树抗青枯病树种和无性系的鉴定中发现,桉树树种和无性系抗青枯病特性存在着明显的差异,并选育出赤桉、窿缘桉、柠檬桉、刚果桉等 10 个高抗型树种和无性系。Dianese<sup>[8]</sup> 1985 年对巴西 6 种桉树的 18 个品系进行了抗青枯病的筛选实验,得出剥桉 (*E. deglupta* Blume)、粗皮桉和迈索尔桉 4 个品系对桉树青枯病有很强的抗性,林间接种后发病率为零,不同树种和地理种源的桉树对青枯病的抗性有显著差异。

### 6.2 非生物防治

迄今为止,还没有一种农药可有效地控制青枯病的发生。用茶麸水加波尔多液加其它措施,对刚感病病株分期施药处理,有一定防治效果。但由于林木面积较大,施药花工费事,用药量大,成本也较高并造成环境污染,推广困难<sup>[32]</sup>。一般来说,一发现有少量的植株发生青枯病时,应及时将病株挖除,集中烧毁,病穴及其周围土壤用 1:100 倍福尔马林液或含 1% 有效氯漂白粉液消毒,进行消毒时要使消毒液充分渗透到土层中彻底杀灭病原细菌。

### 6.3 生物防治

生物防治是通过其它生物的作用来减少病原物的生存和活动,从而减轻病害发生的方法。目前,对于植物病害,使用最多的生物防治试剂是各种微生

物(包括真菌、细菌、噬菌体和病毒)及其它们的代谢产物。由于生物防治具有经济、安全、有效期长且无公害等特点,因此有着广阔应用前景。主要是利用以下几方面原理:

#### (1)拮抗作用

利用生防菌,如一些无毒青枯病菌株、假单胞杆菌(*Pseudomonas* spp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)、链霉菌(*Streptomyces* spp.)等,分泌的各种抗生素或可降解病原物的酶,直接作用于病原菌,杀死病菌或抑制其生长和繁殖。Ran 利用荧光假单胞杆菌 *Pseudomonas fluorescens* WCS374r, WCS417r 和 CHA0r 菌株和转抗生素基因的恶臭假单胞杆菌 *Pseudomonas putida* WCS358: phI 菌株进行桉树青枯病防治试验。结果发现,通过浸根, WCS417r 可以降低幼苗发病率 30% ~ 45%, 而转基因菌株减少苗木发病率 24% ~ 28%。同时还发现,细菌产生的嗜铁素可以诱导桉树抵御青枯病<sup>[33]</sup>。通过从自然界直接分离或对有毒菌株诱变或遗传改造获得无毒青枯病菌株产细菌素进行生物防治。董春等<sup>[34]</sup>报道对我国南方 15 种寄主植物的 135 个青枯菌株的产细菌素能力进行了测定,结果表明,能产生细菌素的菌株有 59 个,占总数的 43.7%。这些菌株产生的细菌素的专化性不同,其中番茄菌株 Tm3、烟草菌株 Tb30、桑树菌株 M1 和桉树菌株 Eu1 都有较强的抑菌能力和较广的抑菌谱。

#### (2)隔离病菌的侵染位点或营养竞争

利用专化外生菌根菌和桉树根系共同建立的互惠共生体系,提高了桉树利用土壤资源的能力,菌根能产生多种植物激素和生长调节物质,调控植物生理活动,促进桉树健康地生长,提高桉树的抗病性,同时共生菌在根际土壤大量繁殖,抢占了有利的物理学和生物学位点,对病原菌侵染造成物理隔离或生态排斥效应,使病原菌无法接近侵染位点。

弓明钦等<sup>[24]</sup>测定了外生菌根菌(*ectomycorrhiza*, EM/ECM)对青枯病菌的拮抗活性,结果表明,8 个菌株对青枯病菌均有不同程度的抑菌效果:桉树苗菌根化后人工接种青枯病菌可降低发病率 40% ~ 73%;菌根化苗在重病区造林,发病率降低 20% ~ 39%。对尾叶桉和巨尾桉两种幼苗进行青枯病菌的人工接种结果表明:AM (*vesicular arbuscular mycorrhiza*, AM/VAM 丛枝菌根菌)菌根苗比无菌根苗的发病率降低 10% ~ 40%, 而幼树的高生长可增加 12% ~ 39%; AM 菌对青枯病的防治效果优于外生

菌根(即 ECM)的效果,其中以 AM6008 和 AM9004 菌株的效果最好,而 AM3006 的效果较差;大田试验结果表明,经 AM 菌根化的幼苗对青枯病的抗病作用较强,发病率可下降 10.0% ~ 17.5%<sup>[35]</sup>。但 Molina 等报道<sup>[36]</sup>,菌根对不同植物具有专化性。

#### (3)诱导抗病

利用诱导因子诱发植物自身的免疫反应(主要是防御基因响应),提高抗病能力,减轻发病程度,从而控制疾病蔓延的防治病害的策略。植物病原物之间互作是以两者间的相互识别开始的,因此任何启动防御反应机制的外源物质(非生物因子和生物因子)均可增强植物的系统抗性。冉隆贤等<sup>[37]</sup>对尾叶桉幼苗以 1 ~ 5 mmol 的水杨酸淋根处理,发现可以诱导桉树苗显著地增强对青枯病的抗性,其中以 5 mmol 最佳。

### 6.4 利用抗青枯病的分子作用机制与转基因

中国农科院植保所采用转座子 Tn5 诱变 *P. solanacearum*, 获得了世界首例植物青枯菌胞外蛋白输出缺失突变体(简称 eep 突变体)。该突变体在缺失了多种胞外蛋白外输功能后,也失去了对寄主的致病力。eep 突变体接种到植物体内后,在局部范围内有一定的定殖能力。温室和田间小区生防试验中,该突变体在 30 d 以内有一定防治效果<sup>[38]</sup>。

目前转基因比较熟悉的属几丁质酶基因和 -1,3 葡聚糖酶基因,分别编码几丁质酶(EC3.2.1.14)和 -1,3 葡聚糖酶(EC3.2.1.39)。这两种酶广泛存在于植物体内,是目前报道最多的两种病程相关蛋白,催化水解侵入病菌的新生细胞壁的几丁质酶和 -1,3 葡聚糖,同时会产生广谱性抗性。张景宁等<sup>[39]</sup>报道,柞蚕杀菌肽对桉树青枯假单胞杆菌有杀灭作用。邵志芳等<sup>[40]</sup>将柞蚕抗菌肽 D 基因转化尾叶桉叶盘,并整合到基因组中,获得了转基因尾叶桉苗。接种青枯菌后存活率比对照组明显提高,且发病较慢,说明转基因桉树能提高对青枯病的抗性。还有一些转 BO 基因(一个从细菌分离出的编码质子泵蛋白基因)、PAP 基因[来源于美洲商陆(*Phytolacca acinosa* Roxb)的抗病毒蛋白的基因,去掉 C 末端数个序列,对植物无毒]和 GO(编码葡萄糖氧化酶的基因)报道,发现能诱导植株的防御反应,提高抗性。但目前有关桉树这方面的报道还没有。但是转基因技术本身存在着如基因沉默(gene silencing)、基因丢失、难以获得高效的表达和稳定的遗传体系,转基因植株与其他亲缘种之间的基因流动

会造成基因逃逸带来危害等问题,决定了转基因植物植株的应用和推广仍需一段时间。

### 6.5 改变耕作、改善栽培措施和加强检疫

提倡采用合理轮作、间作,清洁林地,尽可能与其他树种混交或与禾本科(Gramineae)作物轮作 4~5 a,整地时可适当施用石灰等碱性肥料,降低土壤酸度以抑制病原细菌生长,增施钾肥和硝酸钙代替铵类氮肥可有效地抑制青枯病的繁衍。加强林地管理等措施来减少病菌侵染源,控制传播途径和提高桉树自身的抗性,对 3 年生以内的林分要加强管理,定期观察,尤其是沿海地区,台风后发现零星病株要及时连根挖除和烧毁,并对土壤消毒。完善管理,使用不带病菌的土壤和土壤混合物培育无病苗木,最好采用无土基质苗,强化检疫防止病害扩散及病苗上山,对出圃前的苗木进行检疫,有效地阻止青枯病的发展和蔓延。

## 7 问题与展望

尽管桉树青枯病发生普遍,危害性大,病原菌与寄主交互作用关系复杂而且防治困难。但从根本上解决这一问题,除了采用对付土传性细菌等一般管理办法外,如加强育种关、推广抗青枯病品种、育苗过程中采取防止苗期感染的预防措施、沿海台风后受伤桉树防青枯病感染处理、严重桉树青枯病发病区病株的清除和品种改种、改变改善收获、耕作栽培措施、采用促进杀灭或抑制病菌的方法(太阳照射、化学试剂或生物制剂处理)和材料,有必要加强以下几个方面基础研究和应用:

(1) 进一步加强桉树青枯病害发生及流行规律的研究

深入研究桉树青枯病害的发生、发展、流行规律及其与当地生物、环境间的关系机制,明确影响青枯病暴发的主要因子,研究桉树生长期间病害流行的气象等指标,建立健全和完善青枯病病害的预测模型。

(2) 加强高新技术在青枯病害预测预报上的研究应用

探索 RAPD、ELISA 等新技术在病害检测、预报上的应用,提高青枯病害测报的准确性和时效性。利用现代信息技术,结合桉树青枯病的发生预测模型,建立桉树病害防治专家系统,同时建立病害发生防治数据库,提供及时准确的服务。

(3) 加强生物技术的研究与应用

一是从分子水平探明青枯病变化、繁殖、抗性等机制,研究桉树、病害和生物天敌(如抗青枯病菌的根际微生物)三个不同互作机理,有效地探讨对天敌保护与利用的生态学基础,及高效天敌的引进和本地天敌的改造、扩繁技术。二是土壤成分、有机质等肥料质量、组成和青枯病菌的互作关系,明确其中物理化学的变化过程。三是开发新型无公害的生物农药,如:微生物(细菌、真菌、病毒等)农药,植物源农药等。四是加强桉树转基因工程技术的研究与应用,培育出优质、多抗的桉树新品种。如作者根据诱导型启动子的保守系列,设计出引物克隆青枯病诱导型启动子。并将细菌诱导型启动子与植物过敏反应促进蛋白基因(Pflp 和 Hap,台湾植物研究所冯腾永教授提供)一起构建出多价融合基因,并转入尾叶桉,初步研究表明转基因植株有着较广的强抗病力(未发表资料)。

(4) 加强抗性的研究与推广

由于青枯病的寄主范围广,青枯病菌在南方土壤中普遍存在,对大面积带菌林地进行土壤消毒从经济与技术水平上来看是不现实的,决定了桉树青枯病的防治有其特殊性和困难性,培育抗病品种是防治青枯病的根本途径。但由于初始投入大、育种周期长、病原菌变异等原因,有必要加强以下三个方面研究应用:一是加强抗原的鉴定与筛选等基础研究;二是传统育种技术与现代生物技术相结合,通过新技术应用加快强抗病桉树新品种的选育步伐;三是对自育和引进的新品种应加快试验、示范与推广应用。

### 参考文献:

- [1] Buddenhagen IW, Kelman A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* [J]. Annual Review of Phytopathology, 1964, 2: 203 ~ 230
- [2] Stéphane G, Christian B. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome [J]. Molecular Plant Pathology, 2002, 3 ( 3 ): 111 ~ 118
- [3] Cook D, Barlow E, Sequeira L. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 1989, 2: 113 ~ 121
- [4] Yabuuchi E, Kosako Y, et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group to the new genus with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. [J]. Journal of Microbiology and Immunology, 1992, 36: 1 251 ~ 1 275
- [5] Yabuuchi E, Kosako Y. Validation of the published names and new

- combinations previously effectively published outside the IJSB [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46: 625 ~ 626
- [6] 吴清平, 梁子超. 桉树青枯病病原鉴定和致病力测定 [J]. 华南农业大学学报, 1988, 9(3): 59 ~ 67
- [7] 林雪坚, 吴光金, 石明旺, 等. 桉树青枯病病原菌的研究 [J]. 湖南林业科技, 1993, 20(2): 6 ~ 10
- [8] Dianese J C, Dristig M C G, Cruz A P, et al. Susceptibility to wilt associated with *Pseudomonas solanacearum* among six species of *Eucalyptus* growing in equatorial Brazil [J]. Australian Plant Pathology, 1990, 19: 71 ~ 76
- [9] Coutinho T A, Roux J, Riedel K H, et al. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on eucalypts in South Africa [J]. Journal of Forest Pathology, 2000, 30(4): 205 ~ 210
- [10] Roux J, Wingfield M J, Coutinho T A, et al. Diseases of Plantation *Eucalyptus* in the Republic of Congo [J]. South African Journal of Science, 2000, 96(8): 454 ~ 456
- [11] 吴光金, 林雪坚, 李冬, 等. 桉树青枯病流行区病菌小种和生物型的鉴定 [J]. 中南林学院学报, 2004, 24(1): 27 ~ 29
- [12] Bonas U. Hrp genes of phytopathogenic bacteria [J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 1994, 192: 79 ~ 98
- [13] Coburn J. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S [J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 1992, 175: 133 ~ 143
- [14] He S Y, Huang H C, A Colmer. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* hrp pnpss: a protein that is secreted via the hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants [J]. Cell, 1993, 73: 1 255 ~ 1 266
- [15] Wei Z M, R J Laby, Zumoff C H, et al. Hrp, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora* [J]. Science, 1992, 257: 85 ~ 88
- [16] Flor H H. Current status of the gene-for-gene concept [J]. Annual Review of Phytopathology, 1971, 9: 275 ~ 296
- [17] Akiew E, Trevor P R. Management of bacterial wilt of tobacco [A]. In: Hayward A C, Hartman G L. Bacterial Wilt the Disease and Its Causative Agent *Pseudomonas solanacearum* [M]. CAB International Wallingford, 1994: 179 ~ 198
- [18] Hodges C S, Geary T F, Cordell C E. The occurrence of *Diaporthe cubensis* on *Eucalyptus* in Florida, Hawaii, and Puerto Rico [J]. Plant Disease Reporter, 1979, 63: 216 ~ 220
- [19] Lee S S. Pathology of tropical hardwood plantations in South-east Asia [J]. New Zealand Journal of Forestry Science, 2003, 33(3): 321 ~ 335
- [20] Roux J, Coutinho T A, Mujuni Byabashaija D, et al. Diseases of plantation *Eucalyptus* in Uganda [J]. South African Journal of Science, 2001, 97(1, 2): 16 ~ 18
- [21] 曹季丹. 巴西柳桉、巨桉青枯病调查初报 [J]. 广西林业科技, 1982(4): 30 ~ 31
- [22] 李伟东. 桉树青枯病在海南发病现状及防治措施 [J]. 海南林业科技, 1992(3): 21 ~ 22
- [23] Wu Q P, Liang Z C. Identification and pathogenic tests of the causal organism of the bacterial wilt of *Eucalyptus* [J]. Journal of China Agricultural University, 1988a, 9: 59 ~ 67
- [24] 弓明钦, 陈羽, 王凤珍, 等. 外生菌根对桉树青枯病的防治效应 [J]. 林业科学研究, 1999, 12(4): 339 ~ 345
- [25] Grégoire N, Jean M M, Jean B. Congo: rapport de pays pour la conférence technique internationale de la FAO sur les ressources phyto-génétiques [R]. Leipzig, Germany, 1996: 1 ~ 52
- [26] 张民兴, 吴光金, 林雪坚, 等. 桉树青枯病发病规律的研究 [J]. 中南林学院学报, 1996, 16(2): 28 ~ 32
- [27] Berga Lenaga, Siriril D, Ebanyat P. Effect of soil amendments on bacterial wilt incidence and yield of potatoes in southwestern Uganda [J]. African Crop Science Journal, 2001, 9(1): 267 ~ 278
- [28] Giller K E, Cadish G, Ehaliotis C, et al. Building soil nitrogen capital in Africa [A]. In: Buresh R J, Sanchez P A, Calhoun F. Replenishing Soil Fertility in Africa [M]. Soil Science Society of America Special Publication No. 51 Madison Wisconsin, USA, 1997: 151 ~ 192
- [29] 施仲美, 奚富生, 何贵整, 等. 桉树品系对青枯病抗性及其稳定性的研究 [J]. 广西林业科学, 2000(3): 1 ~ 6
- [30] 沈文生, 黄乃秀. 桉树抗青枯病的筛选技术 [J]. 广西植保, 2000, 13(4): 34 ~ 36
- [31] 吴光金, 林雪坚, 石明旺, 等. 桉树抗青枯病树种和无性系的鉴定 [J]. 中南林学院学报, 2003, 23(4): 32 ~ 34
- [32] 何学友. 我国林木青枯病研究概况 [J]. 森林病虫害通讯, 1997(1): 43 ~ 46
- [33] Ran L X. Suppression of Bacterial Wilt in *Eucalyptus* and Bacterial Speck in *Arabidopsis* by Fluorescent *Pseudomonas* spp. Strains: Conditions and Mechanisms [M]. Utrecht University, Utrecht The Netherlands ISBN: 90-393-3118-9, 2002: 1 ~ 142
- [34] 董春, 范怀忠. 植物青枯病菌细菌素的产生、性质及其利用 [J]. 微生物通报, 2000, 27(4): 302 ~ 304
- [35] 弓明钦, 陈羽, 王凤珍. AM 菌根化的两种桉树苗对青枯病的抗性研究 [J]. 林业科学研究, 2004, 17(4): 441 ~ 446
- [36] Molina R, Massicotte H, Trappe J M. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community ecological consequences and practical implications [A]. In: Allen M F. Mycorrhizal Functioning and Integrative Plant Fungal Process [C]. New York: Chapman and Hall, 1992: 357 ~ 423
- [37] 冉隆贤, 谷文众, 吴光金. 水杨酸诱导桉树抗青枯病的作用及相关酶活性变化 [J]. 林业科学研究, 2004, 17(1): 12 ~ 18
- [38] 康耀卫, 毛国璋, 吕常胜. 利用转座子 Tn5 诱变植物青枯菌获得胞外蛋白分泌缺失突变株 [J]. 植物保护学报, 1995, 22(3): 287 ~ 288
- [39] 张景宁, 张清杰, 黄自然, 等. 柞蚕杀菌肽对桉树青枯病假单胞杆菌的杀菌作用 [J]. 华南农业大学学报, 1995, 16(1): 97 ~ 102
- [40] 邵志芳, 陈伟元, 罗焕亮, 等. 柞蚕抗菌肽 D 基因转入桉树培育抗青枯病株系的研究 [J]. 林业科学, 2002, 38(2): 92 ~ 98