

杨树湿心材病致病细菌的分离、鉴定和侵染途径

宋春草¹ 王 奎¹ 梅 莉¹ 樊孝萍² 张 帅² 朱意洁¹

1. 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070; 2. 湖北省林科院石首杨树研究所, 石首 434400

摘要 采用常规的组织分离法从杨树湿心材病发病心材组织中分离到 10 个优势菌株, 将菌株分别回接健康杨树实生苗, 通过侵染症状、发病率和发病程度等测定致病性, 结果发现 2-16 号菌株能引起典型的湿心材症状, 即心材变色并腐烂。对 2-16 菌株形态特征、生理生化进行了分析, 2-16 菌株 16S rDNA 基因序列与胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜软腐亚种(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) NBRC 14082 菌株报告的序列相似度为 99%。采用 Mega5.0 软件以相近序列构建的进化树中, 2-16 菌株和 NBRC 14082 菌株聚在同一进化枝上。鉴定 2-16 号致病菌为胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜软腐亚种。以温室栽培的当年生中石 7 杨树实生苗为接种材料, 将 2-16 号致病菌分别通过 4 种方式进行侵染接种, 结果表明: 茎刻伤和茎注射 2-16 致病菌株均能引起杨树植株发病, 茎注射法发病率、病斑扩散长度和发病指数均高于茎刻伤法, 而叶接和灌根接种 2-16 致病菌株均不能使杨树感病, 表明茎部伤口感染是该致病菌侵染杨树的主要途径。

关键词 杨树; 湿心材; 致病菌; 果胶杆菌属

中图分类号 S 432.41 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)02-0015-07

杨树(*Populus* spp.)繁殖快、分布广、适应性强、用途广, 是我国最重要的短周期工业用材林和防护林造林树种之一, 可用于生态环境的改善和解决用材需求问题^[1]。湿心材病是一个世界性树木茎干病害, 为害包括杨树在内的多种树木^[2-3]。我国杨树湿心材病极其普遍, 对湖北、山东、河北、北京和辽宁等地的 20 多个杨树品种调查发现, 绝大多数品种的大树都有发病^[4]。湿心材病变组织含水率明显升高、颜色加深呈浅褐色或红棕色、抽提物变多、pH 值偏碱性, 这导致木材物化性质改变、质量降低、加工利用难度加大, 降低了木材利用价值从而造成巨大的经济损失^[5-7]。因此, 湿心材病是当前杨树生产上亟待解决的杨树病害问题。

自从 Neger^[8]发现 *Abies* 属的树木常有湿心材病现象以来, 研究者从森林病理学、生理学和解剖学等方面对湿心材病成因进行了研究。部分学者认为湿心材病现象与树木生长的土壤湿度有关^[9-12], 但越来越多的研究证据表明湿心材病的发生与微生物——特别是细菌侵染有关。如: Bernhard 等^[13], Schink 等^[14]的研究认为包括杨树在内的多个树种湿心材病的形成都有细菌的参与, 病理性的湿心材病是由微生物的活动产生的。姜笑梅等^[15]从 I-69 杨的湿心材病理组织中分离到 3 种欧文氏菌(*Erwinia* spp.)和一种芽孢杆菌(*Bacillus spharericus*)。郑华英等^[16]从杨树中分离到 3 种细菌(草生欧文氏杆菌 *Erwinia herbicola*、荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens*、杨柳欧文氏杆菌 *E. salicis*)和 1 种真菌(镰刀菌 *Fusarium* sp.), 室内外接种均能使受体产生湿心材病症状。这些研究表明病原细菌的侵入是导致杨树湿心材病的主要原因。以往研究表明导致杨树湿心材病的致病菌可能是多样的, 而且其主要致病菌以及致病菌的侵染途径还不清楚。因此, 有必要进一步研究以明确杨树湿心材病主要致病菌及其侵染途径, 为针对性地防治杨树湿心材病提供理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 研究地概况和研究材料

前期调查发现, 黑杨派中湿心材病的发病率最高。因此, 本研究中病菌分离所用发病组织取自湖北省石首市杨树研究所良木基地 7 个主栽黑杨派无性系(南林 895, 中潜 3 号, I-69, I-63, I-72, 中石 7,

收稿日期: 2016-03-31
基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31370627); 中央高校基本科研—交叉学科研究专项(2013JC010)
宋春草, 硕士研究生, 研究方向: 杨树病害。E-mail: 820018343@qq.com
通信作者: 梅 莉, 博士, 副教授。研究方向: 林木根系生理生态学。E-mail: meili@mail.hzau.edu.cn

华石 1), 采样树木树龄 6~7 a, 每个无性系选 3 株树分别采集病样。

为了避免扦插苗本身可能携带病菌的风险, 本研究中用温室栽培的当年生中石 7 杨树(*Populus deltoides* 'Harvard' × *Populus deltoides* 'Lux', 'zhongshi 7') 实生苗, 用于病菌回接研究。2013 年 5 月于石首杨树良木研究基地采集中石 7 种子。播种所用基质为育苗基质: 蛭石=1:2(体积比)。每盆等距播 3~5 粒种子, 待苗高长到 5~10 cm 时进行间苗移栽, 保证每盆 1 株, 按需浇水施肥培育。待苗高至 1 m 左右时, 接入分离纯化后的致病菌, 研究致病性和致病途径。

1.2 发病组织中细菌的分离及纯化

常规组织分离法采集分离病菌, 用酒精灯火焰现场消毒过的生长锥钻取木芯, 将具有典型湿心症状的木芯放入 75% 乙醇中消毒 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 再用 0.1% 氯化汞消毒 1~2 min, 最后用无菌水冲洗 3 次。以组织消毒后用无菌水冲洗的第 4 次冲洗液涂皿做对照, 3 d 后如有菌落生成, 表明表面消毒不彻底则弃去; 若对照皿中无菌落生成, 表明材料表面消毒成功可用于病菌分离, 然后用无菌剪刀剪取病健交界处组织, 剪碎并加入灭菌生理盐水充分振荡摇匀获得菌液, 30 min 后划线接种于哥伦比亚血平板培养基上分离纯化, 37 °C 培养, 目标是得到由单菌落分裂生长而来的菌落形态一致的细菌菌株。菌株经纯化后于 -70 °C 保存, 用于致病性测定和致病菌的鉴定。

1.3 分离纯化后的细菌对杨树苗致病性测定

待播种苗长到 1 m 高左右, 苗干半木质化时(8 月初), 选择生长健壮、长势一致的杨树播种苗分别接种分离纯化后的细菌, 用无菌注射器在距地表 0.2 m 苗茎处接种注入菌液, 接种深度达木质部, 每株苗注射 5 个伤口, 每个伤口注射菌液 1 mL。注射前在注射部位用 75% 乙醇消毒, 注射后用脱脂棉浸透菌液包裹在刻伤处, 再用封口膜密封固定防止水分散失。对照处理用同样方法注射和包裹无菌水, 每个菌种重复接种 10 株苗。接种 2 个月后, 将杨树苗茎在位于接种点上下高 10~15 cm 处截断, 然后经苗干髓心径向剖开, 取发病组织, 观察其症状是否与湿心材病一般典型症状一致。用常规组织分离法对回接苗发病组织进行细菌再分离(方法同本文“1.2”), 观察分离到菌株的菌落颜色、质地等外部形态特征, 并将再分离到的细菌 16S rDNA 序列

与原接种细菌比对, 以初步确定再分离菌株是否与接种菌株相同。

1.4 杨树湿心材病致病菌的鉴定

1) 致病菌形态鉴定。通过回接试验确定具有致病性的细菌, 对该菌落进行形态观察, 并进行革兰氏染色和透射电镜观察。具体方法参照文献[17]。

2) 生理生化鉴定。分析了 2-16 菌株的分解果胶能力、37 °C 生长能力、在 5% NaCl 培养液中生长情况、氧化酶反应、从蔗糖产生还原物质、唯一碳源利用等指标, 具体方法参照文献[17]。

3) 16S rDNA 片段的扩增和序列分析鉴定。取在 LB 培养液中 37 °C 200 r/min 培养 12~24 h 的菌液 1.5 mL, 采用细菌 DNA 提取试剂盒提取致病菌基因组 DNA(北京康为世纪生物科技有限公司)。

16S rDNA 序列扩增采用细菌通用引物 8F/1525R。序列 8F: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3', 1525R: 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'(由上海桑尼生物技术有限公司合成)。预计扩增片段大小为 1 500 bp。PCR 反应体系为 10×Lamp PCR Buffer 5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 4 μL, 10 μmol/L 8F、1525R 各 2 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL Promega) 0.5 μL, 模板 1 μL, 5×C-Solution³ 10 μL 最后加 ddH₂O 至终体积 50 μL。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s; 35 次循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。反应终止后, 取 PCR 产物 6 μL, 电泳检测结果, 然后将 PCR 产物送往上海桑尼生物技术有限公司测定。

将测序结果与 GenBank 中相关数据库进行相似性比对, 将 2-16 菌株 16S rDNA 与 GenBank 中的相近序列用 Clustal W 程序进行精确比对, 采用 Neighbor-Joining 法构建 2-16 菌株与相关菌株的系统进化树, 所选择的 Bootstrap 值为 1 000。

1.5 致病菌侵染途径研究及致病情况统计

分别采用叶片接种、茎部刻伤接种、茎部注射接种和灌根接种 4 种方式对盆栽当年生中石 7 实生苗进行接种。将甘油保存的致病菌菌株活化, 接种于 LB 培养基上, 37 °C 160 r/min 摇床培养 24 h 备用。

(1) 叶片接种: 每株选取中上部部位的叶片 3 枚, 用蘸有 75% 乙醇的脱脂棉对叶片进行消毒, 用刀片在酒精灯上灼烧消毒, 待酒精挥发后, 用灭菌的刀片蘸取菌液划伤叶片, 接种后用透明塑料薄膜套住叶片, 防止水分散失。(2) 茎部刻伤接种: 接种处表面消毒后, 用灭菌的刀片刻伤茎部至木质部, 伤口长度

4 mm左右,用浸透菌液的脱脂棉包裹在刻伤处,再用封口膜密封固定,防止水分散失。(3)茎部注射接种(方法同本文“1.2”)。(4)灌根接种:用灭菌的组培刀对杨树的树根进行断根处理,将菌液直接浇在根部,每株浇入菌液 50 mL。以上 4 种接种方式均用无菌培养基同样方法接种做为对照,每种方法分别接种对照和菌液各 10 株苗木。

接种 50 d 后对处理材料进行截干,将苗干带回实验室,自苗干中央纵向剖开,记录各处理湿心材病发病情况,调查髓部及边材产生湿心材病斑扩展长度,计算发病率和病情指数。

发病率=接种发病株数/接种株数×100%

病情指数以病斑扩展长度为标准分等级:0 级,症状不明显甚至无症状;1 级,病斑长<3 cm;2 级,病斑长 3~7 cm;3 级,病斑长 7~11 cm;4 级,病斑长 11~15 cm;5 级,病斑长 15~19 cm。6 级,病斑长≥19 cm。

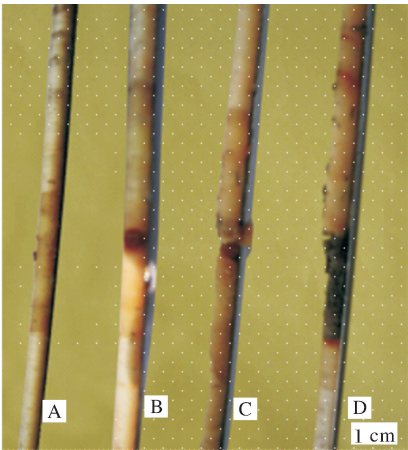
病情指数=100×Σ(各级病株数×各级代表值)/
(调查总株数×最高级代表值)

2 结果与分析

2.1 杨树湿心材病症状

通过对石首 7 种杨树无性系调查取样发现,不同程度的杨树湿心材病发生率达 100%。心材发病轻微者,树木心材呈水渍状;发病稍重者,出现红褐

色症状;严重发病者苗木髓心部伴有腐烂呈絮状、变黑甚至中空(图 1A、B、C、D)。



A. 病状轻微,心材呈水渍状 Mild illness, soaked heartwood;
B.心材变红棕色 Heartwood discoloration; C.心材腐烂呈絮状
Flocculent heartwood; D.心材腐烂变黑断裂 Heartwood decay,
blackened and fractured.

图 1 杨树湿心材病典型症状

Fig.1 The typical symptom of wet-heart wood
disease in *Populus* spp.

2.2 杨树湿心材病致病细菌分离及致病性测定

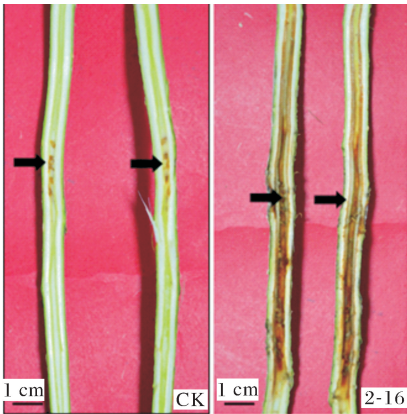
采用组织分离法从湖北石首采到的杨树湿心材病发病组织中分离纯化得到 10 个菌株,10 种菌形态观察结果皆为杆状或棒状,除 3-6 号菌株外,其余 9 个菌株皆为革兰氏阴性菌(表 1)。

表 1 杨树中分离出的 10 个细菌菌株形态特征

Table 1 Morphological characteristics of 10 bacterium strains separated from <i>Populus</i> spp.			
菌株编号 Strain No.	革兰氏染色 Gram stain	菌体形状 Thallus shape	菌落形态 Colony morphology
1-6	—	短杆状 Short rod	乳白色,表面光滑有光泽,边缘不齐 Ivory,smooth and glossy surface,irregular edge
1-2	—	棒状 Bar	白色,凸起,表面光滑 White,raised,smooth surface
2-9	—	杆状 Rod	乳黄色,菌落小,表面光滑 Cream,small colony,smooth surface
2-3	—	杆状 Rod	灰白色,乳状,稀薄,表面光滑 Offwhite,lactescent,thin,smooth surface
2-16	—	杆状 Rod	白色,表面光滑有光泽 White,smooth and glossy surface
12-1	—	棒状 Bar	乳白色,表面光滑 Ivory,smooth surface
3-6	+	杆状 Rod	蜡状平铺,边缘波状 Ceraceous,tiled,sinuate edge
3-7	—	杆状 Rod	乳白色,表面光滑,平整边缘 Ivory,smooth surface,flat edge
2-1	—	杆状 Rod	白色,稀薄,表面光滑 White,thin,smooth surface
2-11	—	杆状 Rod	乳白色,表面光滑,边缘平整 Ivory,smooth surface,flat edge

将分离到的 10 个菌株采用茎干注射法分别接种健康杨树苗,其中 2-16 号菌株能在健康一年生中石 7 实生杨树苗上引起典型的心材变色腐烂现象,回接后的致病症状见图 2。病斑自接种处分别向上、下两个方向扩散,其中病斑向上扩散较迅速,这

可能与病菌随水分养分向上运输扩散有关。对照(注射 LB 培养基)则只有刺伤处伤口愈合痕迹,没有腐烂现象(图 2)。在接种发病的杨树苗茎内均能分离到与接种菌菌落形态一致的菌株,证明 2-16 菌株是导致湿心材病变的主要致病菌。



→接种点 Inoculation point.

图 2 2-16 菌株回接杨树实生苗致病症状

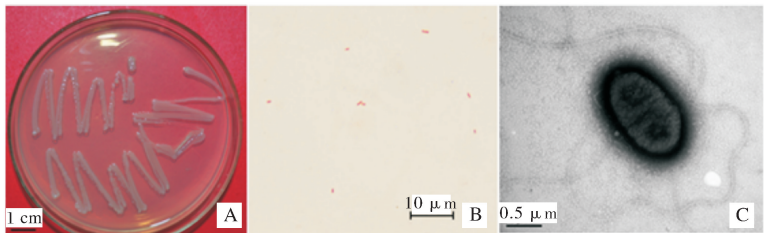
Fig.2 Symptoms of wet-heart wood caused by 2-16 in *Populus* seedlings

2.3 2-16 致病菌株的鉴定

1) 2-16 致病菌株形态和生理生化鉴定。2-16 菌株在 PDA 培养基上菌落为白色,带透明状,有光泽,表面光滑,质地均匀(图 3A);革兰氏染色阴性,油镜观察结果见图 3B;电镜观察表明,2-16 菌体呈短杆近球状,两端钝圆,无荚膜,无芽孢,大小 $0.3\sim 0.5\text{ }\mu\text{m}\times 0.7\text{ }\mu\text{m}$,周生鞭毛 $2\sim 6$ 根(图 3C)。2-16 菌株生理生化特征鉴定结果见表 2。

2)2-16 致病菌株的 16S rDNA 序列分析。以 2-16 菌株基因组 DNA 为模板进行 PCR,获得大约为 1.4 kb 的特异性片段。序列测定结果表明,片段长度为 1 412 bp,其序列已录入 GenBank(登陆序列号:KR021044)。

与 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中



A.在 PDA 上的菌落 Colony on PDA; B.油镜下菌体形态 Bacteria shape under oil microscope; C.电镜下的形态和鞭毛特征 Morphology and flagellation under electron microscope.

图 3 2-16 致病菌株形态特征

Fig.3 Morphology characteristics of 2-16 pathogenic bacterium strain

表 2 杨树湿心材病致病菌菌株 2-16 的主要生理生化特征

Table 2 Main bacteriological characteristics of 2-16 pathogenic bacteria strain

项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result
37℃生长 Grew at 37℃	+	棉子糖 D-Raffinose	+
5% NaCl 生长 Grew in 5% NaCl	+	α-D-乳糖 α-D-Lactose	+
果胶酶分解 Pectase	+	蜜二糖 D-Melibiose	+
氧化酶反应 Oxidase reaction	—	β-甲酰-D-葡萄糖苷 β-Methyl-D-glucoside	+
从蔗糖产生还原物质 Reducing substances from sucrose	—	D-水杨苷 D-Salicin	+
PDA 上产生蓝色素 Produce blue pigment on PDA	—	α-D-葡萄糖 α-D-Glucose	+
硝酸还原 Nitrate reduction	—	D-甘露糖 D-Mannose	+
产生 H ₂ S H ₂ S production	—	D-果糖 D-Fucose	—
产 3-羟基丁酮 VP reaction	—	水苏糖 Stachyose	+
甲基红实验 MR reaction	+	L-鼠李糖 L-Rhamnose	+
产生吲哚 Indole production	—	肌苷 Inosine	—
明胶液化 Gelatin liquefaction	—	D-山梨醇 D-Sorbitol	/
脲酶 Urease	—	D-阿拉伯醇 D-Arabitol	/
卵磷脂酶 Lecithinase	—	肌醇 Inositol	+
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine ammonia lyase	—	D-甘露醇 D-Mannitol	+
对红霉素敏感反应 Sensitive to erythromycin	—	甘油 Glycerol	+
葡萄糖氧化发酵 Fermentation of glucose oxidation	+	L-乳酸 L-Lactic acid	+
糊精 Dextrin	+	柠檬酸 Citric acid	+
D-麦芽糖 D-Maltose	/	丙二酸盐 Malonate	—
D-海藻糖 D-Trehalose	+	D-苹果酸 D-Malic acid	—
D-纤维二糖 D-Cellobiose	+	L-苹果酸 L-Malic acid	+
龙胆二糖 Gentiobiose	+	丙酸 Propionic acid	—

注 Note: + 阳性 Positive; — 阴性 Negative; / 不稳定 Unstable.

相似序列进行 Blast 比对,结果表明 2-16 菌株与 NBRC 14082 菌株(AB 6850554)报告的序列相似度为 99%。采用 Mega5.0 软件以相近序列构建进化树(图 4)。在进化树中,2-16 菌株和 NBRC 14082 菌株聚在同一进化枝上,证明 2-16 菌株是胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜软腐亚种。

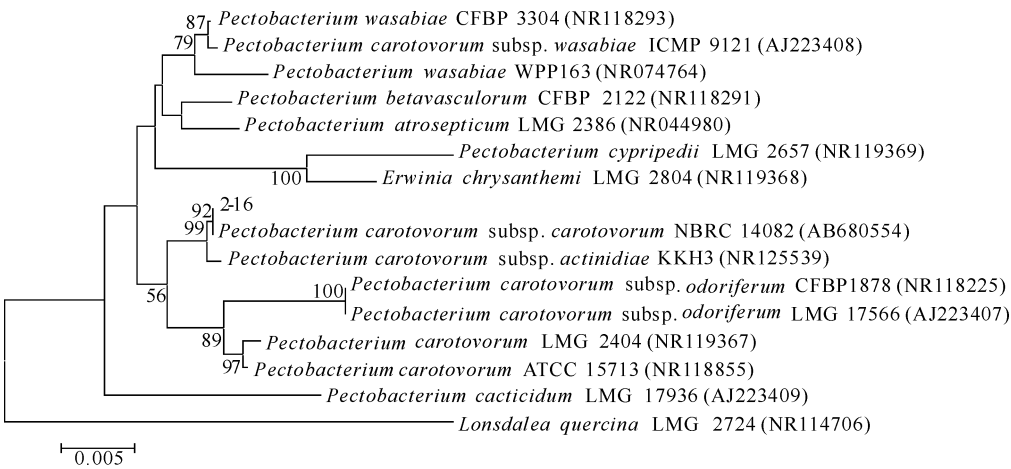


图 4 杨树湿心材病原菌 2-16 的 16S rDNA 序列系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of 2-16 pathogenic bacteria strain based on 16S rDNA

2.4 2-16 致病菌的侵染途径

通过比较不同方式接种结果(表 3)发现,茎刻伤和茎注射接种 2-16 致病菌株均能引起杨树植株发病,而叶片接种和灌根接种 2-16 致病菌株均不能致使杨树感病。茎注射法接种的杨树发病率、病斑扩散长度和病情指数均高于茎刻伤法。说明茎部伤口是 2-16 致病菌株侵染杨树并导致湿心材病的主要感病途径。

表 3 2-16 致病菌株不同接种方式发病情况 (n=10)

Table 3 Pathogenicity of 2-16 pathogenic bacteria strain in different inoculation patterns (n=10)

项目 Item	接种方式 Inoculation patterns			
	茎刻伤接种 Stem carving	茎注射接种 Stem injection	灌根接种 Root-irrigation	叶片接种 Inoculation on leaf
发病率/% Morbidity	80	100	0	0
病斑扩展情况 Scab expansion	沿伤口木质部条状纵向扩散,长度<10 cm,髓心无变色 Bar-shaped expansion along xylem, started from wound, less than 10 cm in length, no discoloration in pith	注射部位上下髓心和木质部明显变色,沿木质维管束和髓心向上下扩散 15~20 cm Significant discoloration in pith and xylem, expansion from injection point to top and bottom, 15-20 cm in length	无症状 Asymptomatic	无症状 Asymptomatic
发病指数 Disease index	36	88	/	/

3 讨 论

通过对肠杆菌科(Enterobacteriaceae)果胶杆菌属(*Pectobacterium*)的一些种类进行 16S rDNA 序列的比对分析,Hauben 等^[18]建议将菊欧文氏菌和胡萝卜软腐欧文氏菌的一些亚种归并入软腐果胶杆菌属(*Pectobacterium*)。本研究综合分析形态特征、生理生化特征和 16S rDNA 等,鉴定 2-16 号致病菌株为胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜软腐亚种

(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)。回接结果显示此菌具有很强的致病力,是引起杨树湿心材病的主要病原之一。Mosseler 等^[19]从杨树树干上分离出 *E. carotovora*,过敏反应结果表明 *E. carotovora* 具有植物病原细菌的致病性,进行接种试验表明该细菌都能够使杨树木质部变色、腐烂,这个症状和本研究中 2-16 菌株导致的杨树湿心材病症状非常相似,本研究中分离的 2-16 致病菌株和该细菌可能是同一种菌或者是其亚种。

关于杨树湿心材病致病菌的侵染途径,国内的一些学者认为病菌是从插穗的伤口或者虫伤和病斑侵入^[5]。国外一些学者也认为病原细菌、真菌是从树的创伤和裂缝处感染^[14,20-21]。本研究前期调查发现,杨树一年生扦插苗湿心材病发病率达 80% 以上,本研究所使用未经移栽的 1 年生和 2 年生杨树实生苗则没有湿心材病现象,这个结果进一步支持了伤口是主要侵染途径的观点。本试验结果中,茎部刻伤接种法和茎部注射接种法均可致病,可能因为这 2 种接种方法使致病菌直接接触木质部或髓心处,这是湿心材病发病部位,也可能是该病菌最适的繁殖部位。另外,在对柳树水痕病的研究中,也有学者推测叶片接触是柳欧文氏菌(*Brenneria salicis*)传播的一种重要途径^[22],而本研究中叶片接种法未能使植株染病。叶片接种法接种病菌后,接种伤口部位出现防御性干枯脱落现象,有效防止了病菌扩散,这很可能是叶片接种不致病的主要原因。也有研究者认为湿心材病致病菌能够从根部的伤口侵入^[5],但本研究截根接种菌液处理并未出现植株茎干湿心症状,这可能跟侵染时间不足或者土壤中存在其他抑制病菌扩散的因素有关。

总之,本研究表明病菌侵染是导致杨树湿心材病害发生的主要原因,而茎干伤口感染是湿心材病菌侵染杨树的主要途径。因此,在今后的杨树生产中,除了选育抗病品种外,可采用组织培养和播种育苗减少湿心材病的发病,采用截干扦插育苗时应注意保持插穗干净以及插穗和土壤的消毒处理。在杨树培育过程中,应注意减少导致茎干伤口的因素以降低湿心材病害的发生。另外,利用微生物之间的拮抗作用^[23],筛选湿心材病致病菌的拮抗菌,进行杨树湿心材病的生物防治值得今后深入研究与探讨。

参 考 文 献

- [1] 李永进,左海松,汤玉喜,等.洞庭湖区美洲黑杨湿心材化学特性及遗传变异[J].湖南林业科技,2011,38(6):30-32.
- [2] BERNHARD S, JAMES C W, GERGORY J Z. Microbiology of wetwood: importance of pectin degradation and *Clostridium* species in living trees[J]. Applied and environmental microbiology, 1981, 42(3): 526-532.
- [3] 安培钧. 毛白杨红心病对材性和利用的影响[J]. 陕西林业科技, 1979(Z1): 46-53.
- [4] 晁龙军, 曾大鹏, 孙福在, 等. 引起杨树湿心材的一种病原真菌—*Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg[J]. 林业科学, 1998, 34(5): 69-73.
- [5] 晁龙军, 龚益鸿, 郭先梅, 等. 湖北杨树湿心材发生及危害的调查研究[J]. 湖北林业科技, 1997(2): 13-15.
- [6] 祖勃荪. 国外对杨树湿心材的研究[J]. 林业科学, 2000, 36(5): 85-91.
- [7] JOHANSSON T, HJELM B. Frequency of false heartwood of stems of poplar growing on farmland in Sweden[J]. Forests, 2013, 4: 28-42.
- [8] NEGER F W. Das tannensterben in den sachsichen und anderen deutschen mittelgebirgen[J]. Thar Forest Jahrb, 1908, 58: 201-225.
- [9] WANG X Q, JIANG Z H, REN H Q. Distribution of wet heartwood in stems of *Populus xiaohei* from a spacing trial[J]. Scandinavian journal of forest research, 2008, 23: 38-45.
- [10] THULASIDAS P K, BHAT K M, OKUYAMA T. Heartwood colour variation in home garden teak (*Tectona Grandis*) from wet and dry localities of Kerala India[J]. Journal of tropical forest science, 2006, 18(1): 51-54.
- [11] KRAUSE C, REJEAN G. Wet heartwood distribution in the stem, stump, and root wood of black spruce in the Quebec Boreal Forest[J]. Canada northern journal of applied forestry, 2005, 22(1): 12-18.
- [12] KRAUSE C, REJEAN G. The relationship between site and tree characteristics and the presence of wet heartwood in black spruce in the boreal forest Quebec, Canada[J]. Canadian journal of forest research, 2006, 36(6): 1519-1526.
- [13] BERNHARD S, JAMES C W, ZEIKUS J G. Microbiology of wetwood: role of anerobic bacterial populations in living trees [J]. Journal of general microbiology, 1981, 123: 313-322
- [14] SCHINK B, WORD J C. Microaerobic and anaerobic bacterial activities involved in formation of wetwood and discoloured wood[J]. IAWA, 1984, 5(2): 105-109.
- [15] 姜笑梅, 张立飞, 徐邦兴. I-69 杨湿心材的发生、分布及材性研究[J]. 林业科学研究, 1993, 6(5): 480-486.
- [16] 郑华英, 戴雨生, 解春霞, 等. 杨树红心病的形成原因[J]. 南京林业大学学报, 2006, 30(2): 82-84.
- [17] 任欣正. 植物病原细菌的分类和鉴定[M]. 北京: 农业出版社, 1994.
- [18] HAUBEN L, MOORE E R, VAUTERIN L. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae[J]. Systematic and applied microbiology, 1998, 21(3): 384-397.
- [19] MOSSELER A J, HUBBES M. *Erwinia* spp. and a new canker disease of hybrid poplars in Ontario[J]. European journal of forest pathology, 1983, 13: 261-279.
- [20] PASSIALIS C, TSOUMIS G. Characteristics of discoloured and wetwood in fir[J]. IAWA, 1984, 5(2): 111-120.
- [21] BEADLE C, BARRY K, HARDIYANTO E, et al. Effect of pruning *Acacia mangium* on growth, form and heart rot[J]. Forest ecology and management, 2007, 238: 261-267.
- [22] MAES M, HUVENNE H, MESSENS E. *Brenneria salicis*, the

bacterium causing watermark disease in willow, resides as an endophyte in wood[J]. Environmental microbiology, 2009, 11(6):1453-1462. [23] BASHAM J T. Heart rot of black spruce in Ontario. II. The mycoflora in defective and normal wood of living trees[J]. Canadian journal of botany, 1973, 51(7):1379-1392.

Pathogen isolation, identification and infection characteristics
of wet-heartwood disease in poplar

SONG Chuncao¹ WANG Kui¹ MEI Li¹ FAN Xiaoping² ZHANG Shuai² ZHU Yijie¹

1.College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2.Shishou Research Institute of Poplar, Hubei Academy of Forestry, Shishou 434400, China

Abstract Ten dominant pathogenic strains were separated from wet-heartwood pathologic tissues of poplar varieties by tissue isolation in this research. Pathogenic strains were inoculated in healthy poplar seedlings by stem injection for pathogenic identification and then the symptom, morbidity and epidemic degree of seedlings were recorded. The results showed that pathogen 2-16 strain caused evident symptom (heartwood discoloration) after injection inoculation. The morphology, physiology, biochemistry of 2-16 pathogen strain were determined. The similarity of 16S rDNA sequence between 2-16 strains and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* NBRC 14082 (AB6850554) was 99%. The 2-16 strain and NBRC 14082 were clustered in the same clade in the phylogenetic tree built by Mega5.0. So the 2-16 strain was classified and identified as *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. In order to determine the major infection path, pathogen 2-16 strain were inoculated to Zhongshi 7 poplar seedlings by leaf infection, stem carving infection, stem injection and root-irrigation respectively. Both stem carving infection and stem injection with 2-16 strain caused wet-heartwood symptoms in poplar seedlings. The morbidity, length of scab and disease index were higher or longer in stem injected plants than in stem carve infected plants. There were no wet-heartwood symptoms in leaf infection and root-irrigation treatments. The results indicated that the 2-16 strain was mainly invaded by stem wound infection.

Keywords poplar; wetheartwood; pathogen; *Pectobacterium*

(责任编辑:边书京)