

我国葡萄根癌土壤杆菌的生化型与质粒类型的初步研究

马德钦 林应锐 周娟 相望年

(中国科学院微生物研究所, 北京)

游积峰 谢雪梅 陈培民

(内蒙古自治区园艺科学研究所, 呼和浩特)

从我国内蒙古、辽宁、吉林、北京、山东等地采集的 49 份葡萄冠瘿标本中, 分离到根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 67 株, 经鉴定有生化 I 型 21 株, 生化 II 型 4 株, 生化 III 型 42 株。葡萄根癌土壤杆菌中以生化 III 型占优势。生化 III 型有 97%、生化 I 型有 24% 的菌株能使葡萄或向日葵致瘤。鉴定了 28 株生化 I 型和生化 III 型菌株所致冠瘿中的 opines, 其中有 2 株生化 III 型菌株合成 nopaline, 3 株生化 III 型菌株合成精氨酸, 其余菌株合成 octopine。

葡萄根癌土壤杆菌三种生化型菌株, 对放射土壤杆菌产生的土壤杆菌素 84 (agrocin 84) 均不敏感。

有些生化 III 型菌株在马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基培养时, 能产生黑色素。

关键词 中国北方葡萄根癌土壤杆菌; 生化型; 质粒类型

葡萄根癌病及其病原菌根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的研究虽早有报道, 但近来由于从葡萄冠瘿中分离出生化 III 型菌株而受到人们注意, 对它们的研究日渐增多。

关于土壤杆菌的分类, 1970 年 Keane 等^[1], 1972 年 White^[2] 根据生化试验、血清类型、蛋白质电泳图谱及 DNA 的同源性等, 将土壤杆菌分成两种生化型 (biotype) 即生化 I 型与生化 II 型。1973 年 Kersters 等^[3] 根据数值分类分析, 将土壤杆菌分成两个主要簇, 这与 Keane 所报告的两生化型是一致的。这种生化型的区分一直为人们所沿用。自 1977 年 Kerr 等^[4] 和以后 Süle^[5] 等报道了从葡萄冠瘿中分离出的土壤杆菌, 在许多生理生化特征上与生化 I 型或生化 II 型菌株有区别, 而定为生化

III 型。此外, 有些生化 III 型菌株有严格的寄主特异性, 只能使葡萄或少数其他植物致瘤。现有许多报道从欧洲、澳大利亚、美国^[5-8]、南非^[9]、亚洲等地区分离到葡萄根癌土壤杆菌, 都是属于生化 III 型。

近年来, 在生化 III 型葡萄根癌土壤杆菌的寄主特异性; Ti 质粒在决定寄主范围所起的作用^[10, 11] 及与生化 I 型生化 II 型 Ti 质粒的同源性^[12] 等方面的研究都引起人们的重视。

由于各种葡萄根癌土壤杆菌的寄主范围很不同; 生化 III 型与生化 I 型、生化 II 型菌株的 Ti 质粒的物理图谱与功能也有差异; 葡萄根癌病在种植葡萄的许多国家和我国都造成经济损失, 需要研究不同地

本文于 1984 年 5 月 24 日收到。

理来源的葡萄根癌菌的各种特性。本文报告在 1982—1983 年从内蒙古自治区, 辽宁、吉林、山东省、北京市等地采集的大量葡萄根癌病标本, 分离菌株, 进行生化型及其质粒类型鉴定的初步结果。

材料和方法

(一) 菌株

对照用的各种生化型根癌土壤杆菌菌株及其来源见表 1。

表 1 实验对比用的土壤杆菌寄主及来源

Table 1 Agrobacterium strains, original hosts and sources

菌株 Strain	寄主 Host	来源 Source
生化 I 型 Biotype I		
C58	樱桃	中科院植物所吴玉华
B6S3	蕃茄	同上
K198		A. Kerr
PBZ5B	毛白杨	本组
HS35-1	啤酒花	本组
生化 II 型 Biotype II		
K84	土壤	L. Moore
K27	桃树	A. Kerr
702	樱桃	中科院上海植生所
生化 III 型 Biotype III		
K308	葡萄	A. Kerr

(二) 培养基

(1) 分离葡萄根癌土壤杆菌用的 MW 培养基, 是从 White^[13] 培养基改良的: 甘露醇 10g, NaNO₃ 5g, KH₂PO₄ 0.3g, NaCl 0.2g, MgSO₄ · 7H₂O 0.1g, 生物素 100 μg, Fe-EDTA 溶液 2ml (FeSO₄ · 7H₂O 278mg, Na₂-EDTA 372 mg, 水 100ml), 0.1% 结晶紫溶液 2ml, 琼脂 15g, 水 1000ml, pH7.0。

(2) 常规培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA) 斜面。

(3) 菌种保藏培养基: 用 YEM 斜面。

(4) 其他筛选培养基: Patel^[14], Schroth 等^[15], New-Kerr^[17], Kado 等的 D1^[14] 及 DIM^[15], Clark^[16], Brisbane 等的 1A, 2E 及 3AN^[17] 培养基。

(三) 菌株分离方法

从葡萄根茎部或蔓上(图版 1-1)采取的新鲜冠瘿, 洗去表面土粒, 刮去表皮腐烂部分, 切一小块, 在 75% 乙醇中浸 1 分钟, 再用 3% 次氯酸钠溶液消毒 25 分钟, 无菌水冲洗, 在消毒研钵磨碎后置冰箱过夜。取上层清液用无菌水 10 倍连续稀释, 将稀释液涂布在含 MW 培养基的平皿上, 28℃ 培养 5—8 天。根癌土壤杆菌菌落为小的圆形凸起, 半透明, 稍带粘性。在这种培养基上三种生化型都能生长。挑取同一菌落分别接种到 Schroth, New-Kerr 及 MW 平皿上培养, 可以初步区分出各种生化型菌株。

(四) 生化型的测定

基本按 Kerr 与 Panagopoulos 所用的主要性状和方法^[4]进行测定(见表 2): 2% NaCl 中的生长^[19], 石蕊牛奶反应^[20], 产 3-酮基乳糖^[21], 从赤藓醇、7-醇、松二糖产酸^[4], 从丙二酸盐、丙酸盐、酒石酸盐、粘液酸产碱^[4], 利用柠檬酸盐^[22]等项。

(五) 致病性试验

供试植物为温室盆栽的玫瑰香葡萄 (Muscat Hamburg), 向日葵 (*Helianthus annuus*)。葡萄嫩枝长至 30 cm, 向日葵 3—6cm 高时接种。用接种环挑取在 PDA 斜面培养 2 天的菌种, 点在供试植物茎上, 接种点上用针刺(向日葵)或刀划(葡萄)伤表皮, 造成伤口, 以便细菌侵入。接种后用石蜡膜包好葡萄的伤口, 温室培养, 24 小时内保持相对湿度 70—80%。7、15、30 天后观察结果。

(六) Opines 的测定

章鱼碱 (octopine) 及胭脂碱 (nopaline) 的测定, 是挤取冠瘿组织的液汁(必要时可加适量的生理盐水)直接点在层析滤纸上, 采用 Otten^[24] 的条件进行纸上电泳测定。试验表明, 直接挤取冠瘿液在滤纸上电泳鉴定 octopine 和 nopaline, 比较简便迅速, 结果明显。

Agropine 的测定按照本试验室所用的方法^[17]。

(七) 对 *A. radiobacter* K84 菌株产生的

agrocin 84 (土壤杆菌素 84) 的敏感性

按 Stonier^[21] 的方法测定。

结 果

(一) 生化型的测定

从各地分离的葡萄根癌土壤杆菌中, 挑选在选择性培养基上初步分型的代表菌

株, 包括生化 I 型 21 株, 生化 II 型 4 株, 生化 III 型 42 株, 按表 2 的项目试验。从表 2 结果可见, 所分离的生化 II 型菌株, 各项生理生化鉴别特征基本上与参考菌株一致。生化 I 型菌株, 对丙酸盐、酒石酸盐利用上变化较大, 也有 10 株在 35℃ 不生长。但是, 所有菌株都能在 Schroth 培养

表 2 从葡萄根癌分离的 67 株根癌土壤杆菌的生化型特征

Table 2 Biotype characterization of 67 strains of *A. tumefaciens* isolated from grapevine

试 验 Test	生化型特征 ¹⁾ Biotype characteristic			“+”反应菌株的比例 ²⁾ Proportion of positive response			菌 株 ³⁾ Strain
	I 型	II 型	III 型	I 型	II 型	III 型	
产 3-酮基乳糖 3-Ketolactose production	+	-	-	21/21	0/4	0/42	LI6-4, MI12-2
2% NaCl 生长 Growth in 2% NaCl	+	V ⁻	+	21/21	0/4	38/42	
35℃ 生长 Growth at 35℃	+	V ⁻	+	10/21	0/4	38/42	
利用柠檬酸盐 Citrate utilization	-	+		1/21	4/4	42/42	
石蕊牛奶 Litmus milk	碱	酸	碱	碱→弱还原	酸	碱→还原	
反 应 reaction				褐	红	白	
颜 色 colour							
产 酸 Acid from							
赤藓醇 Erythritol	-	+	-	0/21	4/4	0/42	
乙 醇 Ethanol	+	-	-	21/21	0/4	2/42	
松三糖 Melezitose	+	-	-	21/21	0/4	0/42	
产 碱 Alkali from							
丙二酸盐 Malonate	V ⁻	V ⁺	+	1/21	4/4	42/42	
酒石酸盐 Tartrate	V ⁺	+	+	19/21	4/4	41/42	MB26-15
丙酸盐 Propionate	V	-	-	4/21	0/4	2/42	MI12-2, MB26-1
粘液酸 Mucic acid	-	+	-	0/21	4/4	4/42	MS32-1, MI22-1 W118-1
选择性培养基生长 Growth on selective media							
Schroth (1965)	+	-	-	21/21	0/4	0/42	
New-Kerr (1971)	-	+	-	0/21	4/4	0/42	

1) 引自 L. W. Moore 的资料 [19] 2) 横线上数字为“+”反应菌株 3) 与典型特征反应不一致菌株 4) V 表示反应有变化

基上生长;产生 3-酮基乳糖;从乙醇、松三糖产酸。生化 III 型菌株在两种选择性培养基上均不生长,也不能从赤藓醇、乙醇(只有 2 株例外)、松三糖产酸,不产 3-酮基乳糖,能从石蕊牛奶产碱等特点,与报道的特征一致。我们认为,这 42 株菌属于生化 III 型。它们具有不同于生化 I,生化 II 型菌株的生理,生化特征。但也有少数生化 III 型菌株在某些生理生化特征上与生化 III 型参考菌株不尽一致。

(二) 筛选培养基的比较

文献报道,分离葡萄根癌菌的培养基有营养琼脂(NA)^[4],改良 New-Kerr (NKS)^[8]等。最近,Brabant 和 Kerr^[21]报告有专为生化 III 型生长的培养基。我们用的是三种生化型都能生长的 MW(见材料和方法)。为选择合适的培养基,本实验用生化 I 型、生化 III 型菌株各 10 株,生化 II 型菌株 8 株,观察在 11 种筛选培养基的生长和菌落的形态。从表 3 结果见到, Schroth 培养基只能使生化 I 型菌株生长。在我们的试验中,注意到 Schroth 培养基对某些 I 型菌株生长不佳,后来减去培养基中的 Na_2SeO_3 及小蘗碱,其他成分不变,菌株生长良好,对鉴别菌株不受影响。

所用的几种培养基中,只有 MW, Patel 和 DIM 能使三种生化型都生长,其他只适合个别生化型。但 Patel 培养基对个别生化 III 型菌株生长差。DIM 培养基的选择性不高,菌落小,而且所需药品较贵。MW 培养基对于革兰氏阴性细菌及假单胞菌都不能生长,因此可以排除很多杂菌的污染。此外,根癌土壤杆菌的生长较慢,需 4—6 天才长出直径 5mm 左右的菌落,而其他杂菌出现较早,从菌落的形态上也易与杂菌区分。生化 I 型菌落较大,有很多粘液,生化 II 型,生化 III 型菌株

较小,没有粘液,容易辨认。因此, MW 培养基的效果较好。把从 MW 培养基分离的根癌土壤杆菌菌落转接到 PDA 斜面培养,由于三种生化型菌株表现不同,培养 4 天,生化 I 型有很多粘液,生长好,生化 III 型菌株无粘液,生化 II 液菌株生长差,甚至不长。这样,可以初步区分这三种生化型。Clark 培养基对根癌土壤杆菌生长不佳,不适宜作筛选用。

(三) 三种生化型和致病菌株率

从我国各地采集来的 49 个葡萄根癌病标本,经平皿分离(见材料与方法)共得到三种生化型菌 67 株。其中生化 I 型 21 株,生化 II 型 4 株,生化 III 型 42 株(表 4),分别占总分离株的 31%、0.6% 和 63%。

所分离的 49 个根癌标本中,分别有 10 个、4 个和 22 个分离到生化 I、生化 II 和生化 III 型菌株,有 13 个根癌同时分离出生化 I 型与生化 II 型菌株(本文未列表),但还没有发现三种生化型共同存在一个瘤中。这些标本以生化 III 型菌最多,占根癌数 71%。

通过人工接种植物致病试验,有 97% 生化 III 型菌株,24% 生化 I 型菌株和 1 株生化 II 型菌株能使玫瑰香品种葡萄或向日葵致病(表 4,图版 I-2a),但生化 III 型菌株的致病力强,生化 I 型致病力弱(图版 I-2b、2c)。生化 II 型更弱。

(四) 植物冠瘿中 opines 的合成及葡萄根癌土壤杆菌的 Ti 质粒类型

由根癌土壤杆菌侵染形成的植物冠瘿中能合成一类称为 opine 的特殊化合物(即碱性氨基酸,例如精氨酸和赖氨酸的衍生物),土壤杆菌对它致瘤所合成的 opine 也能降解代谢,即利用作为碳源和氮源。土壤杆菌的这两种能力都是由它所含的 Ti 质粒所决定的。某一类型 Ti 质粒所诱

表 3 28 株根腐土壤杆菌在筛选培养基上的生长比较*
Table 3 Growth of 28 strains of *A. tumefaciens* on 10 selective media

培养基 Medium	生化 I 型 Biotype I		生化 II 型 Biotype II		生化 III 型 Biotype III	
	菌落形态 Colony	生长株数 No. strain growing on	菌落形态 Colony	生长株数 No. strain growing on	菌落形态 Colony	生长株数 No. strain growing on
MW	直径 5-6mm, 凸起, 半透明, 有较多粘液	10	与 III 型相似	8	直径 4mm, 半透明, 有光泽, 少粘液	10
Patel (1926)	直径 5mm, 灰白	10	直径 4mm, 浅蓝	8	直径 3-4mm, 浅蓝	8
Kado-Heskett D1 (1976)	蓝色	10	黄 绿	2	黄色, 比生化 I 型小	10
DIM (1982)	直径 4mm, 半透明	10	同生化 I 型	8	同生化 I 型	10
Clark (1969)	菌落小, 生长差	10	生长差	2	生长差	0
Schroth et al. (1965)	直径 4mm, 半透明, 白色, 有粘液	10	不生长	0	不生长	0
Brisbane-Kerr 1A (1983)	直径 4mm	10	不生长	0	不生长	0
PDA	直径 4mm, 产粘液	10	生长差, 菌落小	5	菌落光滑, 无粘液	10
New-Kerr (1971)	不生长	0	直径 4mm	8	不生长	0
Brisbane-Kerr 2E (1983)	不生长	0	直径 4mm	8	不生长	0
Brisbane-Kerr 3AN (1983)	直径 3mm, 红, 扁平	2	不生长	0	直径 3mm, 红, 扁平	10

* 培养 6 天结果。所用菌株除表 1 外, 还增加: 生化 I 型: M4-6, C110-1, M21-1, T37, AC11, 生化 II 型: PL37-2, PL37-7, MS36-1, MS36-9, GI39-4, 生化 III 型: M13-2, L45-1, M14-1, M121-1, MB26-1, MB27-1, MB28-6, MS33-10, LI645, 除 T37, AC11 外, 上述菌株均为本组分离并鉴定。

表 4 从不同地区葡萄根癌分离的土壤杆菌及对植物致病菌株数

Table 4 Virulence of 3 biotypes of *A. tumefaciens* isolated from grapevine

来源 Source	根癌数(个) No. tumor	生化 I 型 Biotype I			生化 II 型 Biotype II			生化 III 型 Biotype III		
		菌株	致病株	致病株%	菌株	致病株	致病株%	菌株	致病株	致病株%
内蒙古	26	13	3		0	0		25	24	
北京市	10	4	1		2	1		8	8	
山东	5	1	1		2	0		3	3	
辽宁	6	1	0		0	0		6	6	
吉林	2	2	0		0	0		0	0	
总计	49	21	5	24	4	1	25	42	41	97

导的植物冠瘿瘤中,就合成某一类型的 opine。因此,按照细菌诱导的瘤中合成的 opine,类型可以区分 Ti 质粒类别。已知 Ti 质粒的类型主要有三类,即 octopine 型, nopaline 型和 agropine 型。通过在合成培养基上测定土壤杆菌对不同的 opine 利用或测定其侵染形成的冠瘿瘤所含的 opine 便可作出判断。

本试验用分离到的生化 III 型与生化 I 型葡萄根癌土壤杆菌,感染葡萄致瘤,然后测定瘤中所含的 opine。经测定的 28 个瘤样品中,只有 BS33-4, BS33-10 两菌株感染的瘤产生胭脂碱, LI645 等三菌株只产生精氨酸(图版 I-3)。其余均产章鱼碱。虽然试验菌株来自不同地区和不同的葡萄品种,其生化型也不同,但其质粒大多数属于 octopine 型(表 5)。

(五) 葡萄根癌土壤杆菌对土壤杆菌素 84 的敏感性

试验 3 所分离的三种生化型葡萄根癌土壤杆菌对放射土壤杆菌 (*A. radiobacter* K84) 所产 agrocin 84 的反应,证明是不敏感的。

(六) 产黑色素的生化 III 型菌株

在所分离的生化 III 型菌株中,有些菌株培养在 PDA 斜面时,两个月后细胞变为黑色。在 YEM 斜面也是这样,但

较慢。当培养在含 0.1% 酪氨酸的 PDA 斜面,菌株 LI645, CH15-1, TI11-3, WI18-1, MI23-1 等 4 天后即变黑。黑色素大部积累在细胞内。其他生化 III 型及所有生化 I 型菌株,都不产生黑色素。这种产黑色素菌株的特性尚待进一步研究。

讨 论

葡萄根癌病在我国发生的情况最近几年已有报道^[26,25],但还没有见到分离出根癌病原细菌及关于它的生化型,质粒类型的报告。我们从内蒙古、吉林、北京采集了大量葡萄冠瘿,从 49 个标本中分离出 67 株根癌土壤杆菌,包括三种生化型(也称生物型),两种质粒类型。约有 71% 的冠瘿分离出生化 III 型菌株,约有 20% 分离出生化 I 型菌株。有些根癌中却同时分离出两种生化型。生化 III 型菌株不仅在数量上占大多数,且对葡萄的致病力也最强^[25]。

在 Ti 质粒类型上,从葡萄分离的大部分菌株都是 octopine 型,仅有从山东烟台分离的两个菌株是 nopaline 型。值得注意的是,有三株菌在葡萄及向日葵诱导的冠瘿中,没有测出 octopine, nopaline, 或 agropine。我国的毛白杨冠瘿分离的根癌土壤杆菌发现有 nopaline 型及 agropine 型质粒^[27]。至于精氨酸在瘤组织形成与这三株

表 5 28 株葡萄根癌土壤杆菌的质粒类型、生化型与植物寄主的关系

Table 5 Characterization of biotype, plasmid type and host range of 28 *A. tumefaciens* isolated from different cultivars of grapevine

菌株 Strains	地区来源 Locality	寄主葡萄品种 Cultivars of grapevine	生化型 Biotype	寄主范围* Host range	诱导冠瘿 Opine 合成 Opine in tumors	质粒类型 Plasmid type
MI35-1, MI4-1	内蒙古	玫瑰香 Musca: Hamburg	3	窄	Oct	Oct
MI12-3, MI14-5 MI22-1	内蒙古	玫瑰香 Muscat Hamburg	3	宽	Oct	Oct
MI23-1	内蒙古	玫瑰香 Muscat Hamburg	3	宽	Arg	
MI4-6	内蒙古	玫瑰香 Muscat Hamburg	1	窄	Oct	Oct
LI5-1, LI7-6 LI8-2	内蒙古	龙眼	3	窄	Oct	Oct
LI645	内蒙古	龙眼	3	宽	Arg	
GI9-1	内蒙古	巨丰	3	窄	Oct	Oct
TI11-3	内蒙古	无核白 Thompsons Seedless	3	宽	Oct	Oct
CI15-1	内蒙古	卡托巴 Catawba	3	宽	Oct	Oct
BI16-2	内蒙古	白香蕉	1	宽	Oct	Oct
WI18-5	内蒙古	白马奶	3	宽	Oct	Oct
MB26-1, MB27-3 MB28-2, MB31-5	北京市	玫瑰香 Muscat Hamburg	3	宽	Oct	Oct
MB30-5	北京市	玫瑰香 Muscat Hamburg	3	窄	Oct	Oct
QB45-1	北京市	葡萄园皇后 Queen of vineyard	3	宽	Oct	Oct
AB46	北京市	亚历山大玫瑰 Muscat of Alexandria	3	宽	Oct	Oct
MS32-6	山东	玫瑰香 Muscat Hamburg	3	宽	Oct	Oct
BS33-4, BS33-10	山东	白雅 Баян-ширий	3	宽	Nop	Nop
ML41-2	辽宁	玫瑰香 Muscat Hamburg	3	宽	Arg	
GL42	辽宁	巨丰	3	宽	Oct	Oct

* 寄主范围另见报告。Oct = Octopine, Nop = Nopaline, Arg = Arginine

菌的功能有何关系,值得进一步研究。

试验也表明,生化 III 型菌株在生理生化鉴定特征,尤其对葡萄的致病性方面^[28],与生化 I 型,生化 II 型根癌土壤杆菌有区别,这结果与国外的报道相似。因此,作者认为将生化 III 型作为土壤杆菌的一个生化型是恰当的。

在本研究中,使用 MW 培养基分离生化 III 型根癌土壤杆菌,效果很好。所

分离的菌株中,有 10 多株能产生黑色素。关于根癌土壤杆菌这方面的特性还未见报道。此外,本试验有个别生化 III 型菌株在某些生理生化鉴定特征与参考菌株也有些差别。

参 考 文 献

- [1] Keane, P. J. et al.: *Aust. J. Biol. Sci.*, 23: 585—595, 1970.

- [2] White, L. O.: *J. Gen. Microbiol.*, **72**: 565—574, 1972.
- [3] Kersters, K. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **78**: 227—239, 1973.
- [4] Kerr, A. and C. G. Panagopoulos: *Phytopathol. Z.*, **90**: 172—179, 1977.
- [5] Süle, S.: *J. Appl. Bacteriol.*, **44**: 207—213, 1978.
- [6] Panagopoulos, C. G. et al.: Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathol. Bacteria, Angers, France, 1978, pp. 221—338.
- [7] Perry, K. L. and C. I. Kado: *J. Bacteriol.*, **151**: 343—350, 1982.
- [8] Burr, T. J. and B. H. Katz: *Phytopathology*, **73**: 163—165, 1983.
- [9] Loubser, J. T.: *Plant Dis. Rep.*, **62**: 730—731, 1978.
- [10] Thomashow, M. F., V. C. Knauf and E. W. Nester: *J. Bacteriol.*, **146**: 484—493, 1981.
- [11] Thomashow, M. F. et al.: *Nature*, **283**: 794—796, 1980.
- [12] Knauf, V. C., C. G. Panagopoulos and E. W. Nester: *J. Bacteriol.*, **153**: 1535—1542, 1983.
- [13] White, F. F. and E. W. Nester: *J. Bacteriol.*, **144**: 710—720, 1980.
- [14] Patel, M. K.: *Phytopathology*, **16**: 577, 1926.
- [15] 游积峰等: 内蒙古园艺, 合刊, 7—11页, 1982.
- [16] Schroth, M. N. et al.: *Phytopathology*, **55**: 645—647, 1965.
- [17] New, P. B. and A. Kerr: *J. Appl. Bacteriol.*, **34**: 233—236, 1971.
- [18] Kado, C. I. and M. G. Heskett: *Phytopathology*, **60**: 969—976, 1970.
- [19] Moore, L. W., A. Anderson and C. I. Kado: Agrobacterium. in: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. N. W. Schaad, ed. Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN. 1980 pp. 17—25.
- [20] Clark, A. G.: *J. Appl. Bacteriol.*, **32**: 348—351, 1969.
- [21] Brisbane, P. G. and A. Kerr: *J. Appl. Bacteriol.*, **54**: 425—431, 1983.
- [22] 中国科学院微生物研究所细菌分类组: «一般细菌常用鉴定方法», 科学出版社, 1978年。
- [23] Bernærts, M. J. and J. De Ley: *Nature*, **197**: 406—407, 1963.
- [24] Otten, L. A. B. M. and R. A. Schilpercoort: *Biochim. Biophys. Acta*, **527**: 497—500, 1978.
- [25] Stonier, T.: *J. Bacteriol.* **79**: 889—898, 1960.
- [26] 冯标: 葡萄科技, **2**: 14—19, 1981.
- [27] 张静娟等: 微生物学报, **24**(4): 369—375, 1984.
- [28] 游积峰等: 待发表。

图 版 说 明

Explanation of plates

1 自然感染的葡萄根癌病, 冠瘿长在根部

Crown galls of grapevine collected in a vineyard, galls formed on the root

2a 生化 III 型菌株 MB28-3 对向日葵的致瘤

Crown galls on sunflower seedlings induced by biotype 3 strain MB28-3

2b 生化 III 型菌株 MS32-1 对玫瑰香葡萄的致瘤

Crown galls on grapevine (Muscat Hamburg) induced by biotype 3 strain MS32-1

2c 生化 I 型菌株 MI4-6 对玫瑰香葡萄的致瘤

Crown galls on grapevine (Muscat Hamburg) induced by biotype 1 strain MI4-6

3 生化 III 型菌株对葡萄诱导瘤组织产生的 Opines 电泳图

Paper electrophoresis graphs of opines from crown gall of grapevine induced by biotype 3 strains

Arg = arginine, Nop = nopaline, Oct = octopine ON = Oct + Nop A. 起始点 (Start point)

1. AT. BS33-7(Nop). 2. AT. BS33-10 (Nop) 3. AT. AB46-4 (Oct) 4. AT. ML41-5 (Arg)

5. AT. GL42-5 (Oct) 6. AT. LI645 (Arg) 7. AT. MI3-2(Oct)

BIOTYPE AND PLASMID TYPE OF *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* ISOLATED FROM THE CROWN GALL OF GRAPEVINE IN NORTH CHINA

Ma Deqin Lin Yingrui Zhou Juan Xiang Wangnian

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

You Jifeng Xie Xuemei Chen Peimin

(*Nei Mongol Autonomous Region Institute of Sciences, Huhhot*)

Sixty-seven isolates of *Agrobacterium tumefaciens* were isolated and identified from 49 grapevine crown gall specimens collected in Beijing, Nei Mongol Autonomous Region, Jilin, Liaoning and Shandong provinces during 1982—1983. On the basis of physiological and biochemical tests these strains could be assigned into 3 biotypes, and the number of strains of each biotype was biotype I, 21, biotype II, 4, and biotype III, 42, strains. It is apparent that biotype III was the predominant biotype of *A. tumefaciens* on the grapevine. Ninety-seven percent of biotype III strains and 24% of biotype I strains were pathogenic on the grapevine or sunflower seedlings, producing typical galls. By identifying the opines synthesized in the galls on grapevine seedlings incited by 28 biotype

III strains, it was found that 23 strains induced octopine galls, and 2 strains induced nopaline galls, but only arginine was detected in the galls inoculated with strains MI23-1, LI645 and ML41-2. All biotype III *A. tumefaciens* tested were insensitive to agrocin-84 produced by *A. radiobacter* K84 when assayed by Stonier's method. Some biotype III strains, LI 645, TI11-3, MI12-3, CI15-1, WI18-1, MI22-1 and MI23-2, produced a characteristic melanin-like pigment on potato dextrose agar slant supplemented with 0.1% tyrosine incubated at 28°C after 5 days.

Key words

Agrobacterium tumefaciens on grapevine in North China; Biotype; plasmid type