

放射土壤杆菌 HLB-2 菌株抑制葡萄根癌 土壤杆菌生长和冠瘿形成的研究

陈晓英 相望年

(中国科学院微生物研究所, 北京)

在山东莱西啤酒花冠瘿病发病严重地区, 从啤酒花冠瘿中分离到一株无致病性的土壤杆菌, 经鉴定为放射土壤杆菌 (*Agrobacterium radiobacter*) HLB-2, 属于生物 I 型。HLB-2 菌株在培养基上产生一种类似土壤杆菌素 84 的物质, 能抑制葡萄根癌土壤杆菌生物 III 型菌株的生长。在温室接种试验中, 可以完全抑制 16 株致病力不同的葡萄根癌土壤杆菌中的 14 株菌 (含 octopine 或 nopaline 质粒) 在向日葵幼苗和葡萄幼枝上诱发冠瘿病。在培养基上测定敏感性的结果和温室冠瘿病抑制试验的结果一致, 表明 HLB-2 菌株的防病机制可能是由于它所产生的土壤杆菌素。在对比试验中, K84 菌株和 D286 菌株对葡萄根癌土壤杆菌均无抑制作用。以上结果表明, HLB-2 菌株在葡萄冠瘿病的生物防治中有一定的实用价值。

关键词 放射土壤杆菌 HLB-2; 根癌土壤杆菌生物 III 型; 葡萄冠瘿; 土壤杆菌素类似物

植物冠瘿病是由根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 引起的一种常见植物细菌病害。病原菌通过伤口侵入植物组织, 并将所含 Ti 质粒上的一段 DNA 整合到植物细胞染色体 DNA 上, 从而引起植物细胞的无控增生^[1]。近十多年来, 在土壤杆菌 Ti 质粒的结构与功能、植物细胞的转化以及利用 Ti 质粒作为植物基因工程运载体的研究方面, 已有很大突破。在冠瘿病的生物防治方面, 也有新的进展。1972 年 New 和 Kerr 从澳大利亚南部桃园桃树冠瘿周围的土壤中, 分离到一株放射土壤杆菌 (*A. radiobacter*) K84, 对番茄、桃树等的冠瘿病有良好的防治效果^[2,3]。K84 菌株的防病机制, 主要由于它所产生的土壤杆菌素 84 (agrocin 84) 具有抑制某些根癌土壤杆菌的作用^[4]。土壤杆菌素 84 的抑菌对象仅限于含 nopaline 质粒的根癌土壤杆菌, 对其他质粒类型和生物 III 型的根癌土壤杆菌都无抑制作用, 因此, 对这些

菌株引起的冠瘿病无防病效果^[5-9]。1983 年 Henderson 等从南非桉树的冠瘿中分离到一株根癌土壤杆菌 (*A. tumefaciens*) D286, 该菌株对三种质粒的根癌土壤杆菌均有抑制作用, 但生物 III 型菌株对它并不敏感^[10]。最近我们从山东采集的啤酒花冠瘿中^[11], 分离到对葡萄根癌土壤杆菌 III 型菌株有抑制作用的一株放射土壤杆菌 (*A. radiobacter*) HLB-2。温室试验结果表明, 它具有应用的可能性。本文报道该菌株的分离鉴定及其所产生的土壤杆菌素对根癌土壤杆菌的抑制作用, 以及在向日葵、葡萄幼枝上抑制冠瘿形成等试验的结果。

材料和方法

(一) 菌株

1. 放射土壤杆菌 HLB-2:

本文于 1985 年 11 月 26 日收到。

承周坚同志帮助; 马德钦、张静娟同志提供试验菌株, 特此致谢。

1983 年 7 月从山东莱西啤酒花冠瘿中分离。

2. 土壤杆菌素产生菌:

(*A. radiobacter*) K84 菌株系美国俄勒岗州立大学 L. W. Moore 教授赠送。

A. tumefaciens D286 菌株系美国麻省理工学院 J. A. Thomson 博士赠送。

3. 葡萄根癌土壤杆菌:

除 K308 外均为本实验室从我国不同地区的葡萄上分离(表 1)^[12]。

K308 菌株系澳大利亚阿德雷德大学 A. Kerr 教授赠送。

4. 其他生物型和质粒类型的菌株:

C58 菌株: 质粒类型 *nopaline*, 生物 I 型菌株。B6 菌株: 质粒类型 *octopine*, 生物 I 型菌株。pt-12 菌株: 质粒类型 *agropine*, 生物 I 型菌株。702 菌株: 质粒类型 *nopaline*, 生物 II 型菌株^[13]。

(二) 培养基

YEM 培养基: 用于菌株培养和斜面保存。

YEB 培养基: 用于菌体培养和土壤杆菌素的产生。

(三) 土壤杆菌生物型的鉴定

基本方法参照参考文献[11]。

(四) 葡萄根癌土壤杆菌分别对土壤杆菌素 84、D286 和 HLB-2 敏感性的测定

1. 用 Stonier 的方法测定^[14]。

2. 将 K84、D286 和 HLB-2 菌株分别接种于 YEB 液体培养基中, 28℃ 振荡培养 4—5 天, 离心除去菌体(10,000 转/分, 10 分钟), 上清液经细菌过滤漏斗(G6)抽滤除菌备用。根癌土壤杆菌接种 YEB 液体培养基, 28℃ 振荡培养 24 小时, 取 0.5ml 菌液与 5ml 含 0.5% 琼脂的 YEB 培养基混合, 倒入铺有 10ml 2% 琼脂的平皿中, 将直径为 0.7cm 的钢圈放入平皿中, 钢圈内滴加制备的无菌滤液, 28℃ 培养 24—48 小时, 观察抑菌圈的产生。

(五) 在指示植物上测定 HLB-2、K84 和 D286 对根癌土壤杆菌的致癌抑制试验

1. 以向日葵作为指示植物, 将 HLB-2、K84、D286 和根癌土壤杆菌菌株分别接种于 YEB 液体培养基, 28℃ 振荡培养 24 小时, 离心收集菌体(10,000 转/分, 10 分钟)。称取各菌株菌体 1g (鲜重), 加 1ml 生理盐水制成菌悬液。将 HLB-2、K84 和 D286 菌悬液分别同各个根癌土壤杆菌

表 1 葡萄根癌土壤杆菌菌株来源和特性^[12]

Table 1 Origin and characters of strains of *A. tumefaciens* isolated from grapevine

菌 株 Strain	地区来源 Locality	葡 萄 品 种 Cultivar of grapevine	寄主范围 Host range	生 物 型 Biotype	质 粒 类 型 Plasmid type
M13-2	内 蒙 古	玫瑰香	窄	III	octopine
M14-1	内 蒙 古	玫瑰香	窄	III	octopine
M14-6	内 蒙 古	玫瑰香	窄	I	octopine
G19-1	内 蒙 古	巨 丰	窄	III	octopine
L15-1	内 蒙 古	龙 眼	窄	III	octopine
MB30-5	北 京	玫瑰香	窄	III	octopine
M122-1	内 蒙 古	玫瑰香	宽	III	octopine
M123-1	内 蒙 古	玫瑰香	宽	III	arginine*
L1645	内 蒙 古	龙 眼	宽	III	arginine*
T111-3	内 蒙 古	无核白	宽	III	octopine
CI15-1	内 蒙 古	卡托巴	宽	III	octopine
W118-5	内 蒙 古	白马奶	宽	III	octopine
MB26-1	北 京	玫瑰香	宽	III	octopine
MS32-6	山 东	白 雅	宽	III	octopine
BS33-10	山 东	玫瑰香	宽	III	nopaline
K308	澳大利亚	不 详	窄	III	octopine

* 未测出 opine (opine not detected)

菌悬液以等体积混合后,注射接种高 5—10 cm 的向日葵幼苗 10 株,在温室生长 10 天后观察发病情况,30 天观察结果。

2. 同法接种葡萄(玫瑰香)幼枝或幼苗。取新生的葡萄幼枝条,接种 10 个以上的接种点,分别于 30、50 天观察结果。

3. 将 HLB-2 菌悬液和 K308 菌悬液按 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 五种不同比例混合接种葡萄,30 天后观察结果。

结 果

(一) 放射土壤杆菌 HLB-2 的鉴定

按照 Moore 等人^[5]的方法对 HLB-2 的生理特性进行了检测。结果表明,HLB-2 在乳糖培养基上产生 3-酮基乳糖,在柠檬酸铁氨液体培养基上形成棕色膜,对

氯化钠的耐受浓度为 3%,氧化酶反应阳性,不能利用赤藓糖、酪氨酸和柠檬酸,因此它属于土壤杆菌生物 I 型菌。

(二) 不同根癌土壤杆菌菌株对土壤杆菌素 HLB-2、84 和 D286 的敏感性测定

从表 2 可以看出,所测试的 16 株葡萄根癌土壤杆菌,包括生物 III 型和生物 I 型菌,对土壤杆菌素 84 和 D286 均有抗性,其中 14 株菌对土壤杆菌素 HLB-2 敏感。根癌土壤杆菌 C58 和 702 菌株对土壤杆菌素 84 和 D286 敏感,但对土壤杆菌素 HLB-2 不敏感,B6 和 pt-12 菌株,对土壤

表 2 不同根癌土壤杆菌菌株对土壤杆菌素 HLB-2、84 和 D286 的敏感性
Table 2 Sensitivity of strains of *A. tumefaciens* to agrocin HLB-2, agrocin 84 and agrocin D286 in vitro

测试菌株 Strain <i>A. tumefaciens</i> tested	敏感性 Sensitivity		
	土壤杆菌素 HLB-2 Agrocin HLB-2	土壤杆菌素 84 Agrocin 84	土壤杆菌素 D286 Agrocin D286
MI3-2	S	R	R
MI4-1	S	R	R
MI4-6	S	R	R
GI9-1	S	R	R
LI5-1	S	R	R
MB30-5	S	R	R
MI22-1	R	R	R
MI23-1	S	R	R
LI645	S	R	R
TI11-3	S	R	R
CI15-1	R	R	R
WI18-5	S	R	R
MB26-1	S	R	R
MS32-6	S	R	R
BS33-10	S	R	R
K308	S	R	R
C58	R	S	S
702	R	S	S
B6	R	R	S
Pt-12	R	R	S

注: S(sensitive) 为敏感; R(resistant) 为抗性。

表 3 HLB-2、K84 和 D286 在向日葵上对不同根癌土壤杆菌菌株的致瘤抑制作用
Table 3 Prohibition of gall formation on sunflower induced by different strains of *A. tumefaciens* by HLB-2, K84 and D286

接种菌株 Strain of <i>A. tumefaciens</i> inoculated	混合接种的菌株 Strain with coinoculated		
	HLB-2	K84	D286
MI3-2	-	+	+
MI4-1	-	+	+
MI4-6	-	+	+
GI9-1	-	+	+
LI5-1	-	+	+
MB30-5	-	+	+
MI22-1	+	+	+
MI23-1	-	+	+
LI645	-	+	+
TI11-3	-	+	+
CI15-1	+	+	+
WI18-5	-	+	+
MB26-1	-	+	+
MS32-6	-	+	+
BS33-10	-	+	+
K308	-	+	+
C58	+	-	-*
702	+	-	-*
B6	+	+	-*
pt-12	+	+	-

注: +有瘤形成 (gall formation); -无瘤形成 (no gall formation); *有小瘤形成 (small gall)。

杆菌素 84 和土壤杆菌素 HLB-2 不敏感,但对土壤杆菌素 D286 敏感。

(三) HLB-2、K84 和 D286 对根癌土壤杆菌在指示植物上致瘤的抑制作用

1. HLB-2、K84 和 D286 在向日葵上对根癌土壤杆菌的致瘤抑制作用:

从表 3 可以看到,凡是对土壤杆菌素 HLB-2 敏感的根癌土壤杆菌,在向日葵上的致瘤能力均能被 HLB-2 抑制。反之,对

土壤杆菌素 HLB-2 表现为抗性的 MI22-1、CI15-1、C58、702、B6、pt-12 菌株,其致瘤能力不被抑制。同样对土壤杆菌素 84 或土壤杆菌素 D286 敏感的菌株,其致瘤能力也相应地被 K84 或 D286 所抑制,反之则无抑制作用。

2. HLB-2、K84 和 D286 在葡萄幼枝上对葡萄根癌土壤杆菌致瘤的抑制作用:

从表 4 可以看出, HLB-2、K84 和

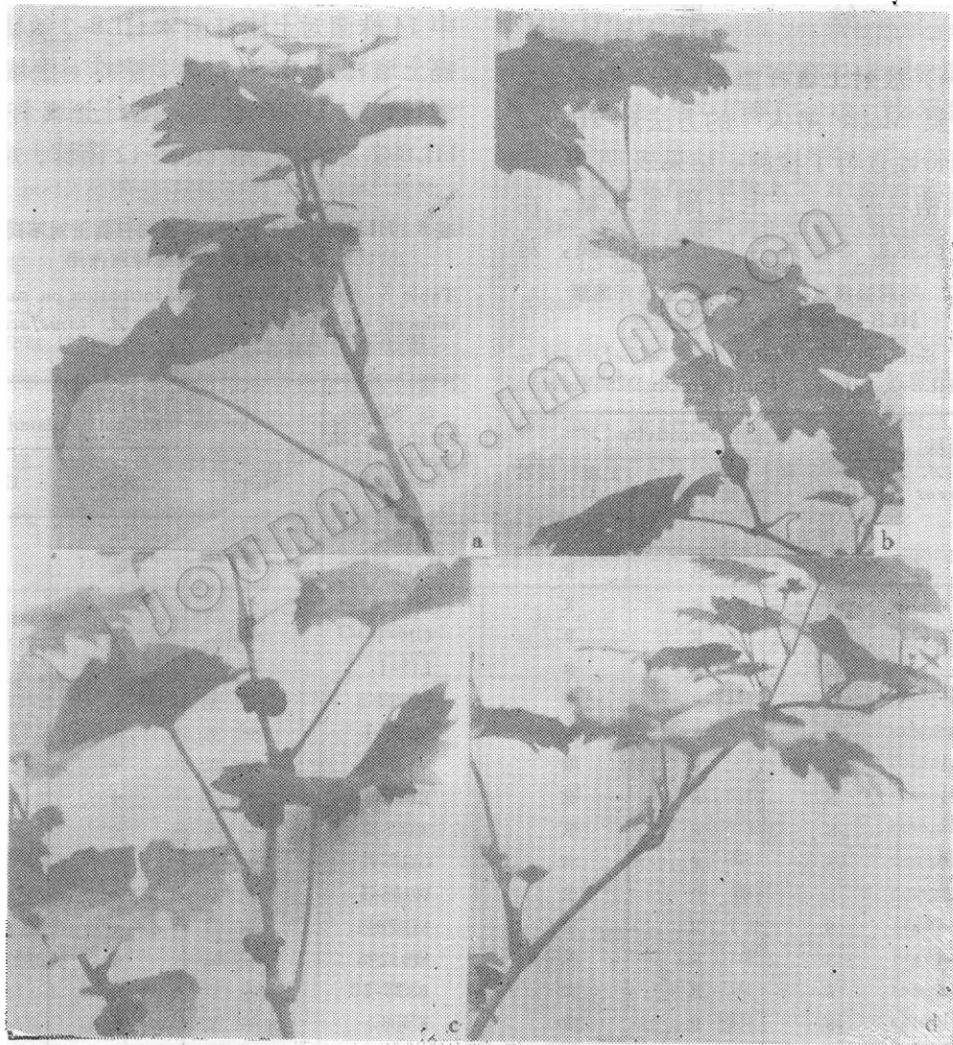


图 1 K84、D286 和 HLB-2 与根癌土壤杆菌 K308 混合接种葡萄对冠瘿形成的抑制

Fig. 1 Gall prohibition on grapevine by K84, D286 and HLB-2 when inoculated with *A. tumefaciens* K308

a. 接种 K308; b. 混合接种 K308 和 K84; c. 混合接种 K308 和 D286; d. 混合接种 K308 和 HLB-2。

a. Inoculated by K308; b. Inoculated by K308 and K84; c. Inoculated by K308 and D286; d. Inoculated by K308 and HLB-2.

表 4 HLB-2、K84 和 D286 在葡萄幼枝上对葡萄根癌土壤杆菌的致瘤抑制作用

Table 4 Prohibition of gall formation on grapevine induced by *A. tumefaciens* isolated from grapevine by HLB-2, K84 and D286

葡萄根癌土壤杆菌 <i>A. tumefaciens</i> isolated from grapevine	起抑制作用的菌株 Inhibiting strain	结 瘤 情 况 Gall formation		
		HLB-2	K84	D286
MI3-2	—	—	+	+
LI645	—	—	+	+
MI4-6	—	—	+	+
LI5-1	—	—	+	+
GI9-1	—	—	+	+
MB30-5	—	—	+	+
MS32-6	—	—	+	+
K308	—	—	+	+

注：同表 3。

D286 在葡萄幼枝上对葡萄根癌土壤杆菌的致瘤抑制作用结果与其在向日葵上的结果一致，K84 和 D286 对葡萄根癌土壤杆菌致瘤无抑制作用，HLB-2 则有较明显的抑制作用(图 1)。

3. 不同体积比例的 HLB-2 菌悬液和葡萄根癌土壤杆菌菌株 K308 菌悬液混合后，在葡萄幼枝上的致瘤情况：

当 HLB-2 与 K308 菌悬液的体积比例为 1:1、1:2、1:3 和 1:4 时，K308 的致瘤能力被抑制。当比例为 1:5 时，K308 的致瘤能力不完全被抑制，而在葡萄枝条上形成小瘤。这一结果表明，在混合接种时，HLB-2 菌株的用量与抑制 K308 菌株的致瘤作用有关系。与已报道的关于 K84、D286 的工作相比，1:4 的比例仍能有效，可见它的抑菌能力还是比较强的。

讨 论

土壤杆菌产生抗生物质的现象是 Stonier 首先报道的。他从 16 株土壤杆菌中发现根癌土壤杆菌 H100 和 T37 都产生

类似大肠杆菌素的物质，能抑制其他根癌土壤杆菌的生长。他将 H100 菌产生的抗生物物质称为 Agrobacteriocin^[14]。12 年后，New 和 Kerr 从澳大利亚南部桃树冠瘿周围的土壤中，分离到一株放射土壤杆菌 K84，当它与根癌土壤杆菌的菌体以 1:1 比例混合接种在番茄和桃树幼苗上时，几乎可以完全抑制冠瘿的产生^[3,4]。他们认为这是由于 K84 菌株所产生的一种被称为土壤杆菌素 84 (agrocin 84) 的杀菌物质杀死了根癌土壤杆菌。七十年代以后，澳大利亚、新西兰、加拿大、美国、意大利、希腊、匈牙利等国都已采用 K84 菌制剂，通过浸种或拌种的方式，防治桃、李、杏、樱桃、苹果和蔷薇的冠瘿病，收到很好的效果^[15]。现在 K84 菌株已被公认为植物土传细菌病害在生物防治方面第一个广泛应用的细菌制剂^[5]。

放射土壤杆菌 K84 防治植物冠瘿病的效果虽然很好，但它还有一定的局限性。即它只能防治由含 nopaline 质粒的根癌土壤杆菌所引起的冠瘿病，对含 octopine、agropine 质粒的菌株和生物 III 型菌株所引起的冠瘿病则没有效果。因为这些病原菌对 K84 菌株产生的土壤杆菌素 84 不敏感。Kerr 和 Panagopoulos 曾企图从希腊发病严重的果园土壤中，分离对抗土壤杆菌素 84 的希腊菌株和对生物 III 型菌株有抑制作用的新的土壤杆菌素产生菌，但未获成功^[16]。最近 Henderson 等从南非桉树 (*Eucalyptus*) 的冠瘿中分离到一株后来失去致病性的根癌土壤杆菌 D286^[10]，它所产生的土壤杆菌素对 nopaline、octopine 和 agropine 三种质粒的根癌土壤杆菌都有抑制作用，但对生物 III 型菌没有抑制作用。他们测定抑制冠瘿形成的试验材料是马铃薯块茎组织片，不是整株植物。我们用的测试植物是向日葵和葡萄幼枝，试验菌株大

多是从国内葡萄上分离的,这些葡萄根癌土壤杆菌有宽寄主型和窄寄主型,并与从澳大利亚分离的 K308 作了比较。

按照 Kerr 等的观点, K84 菌株的防病机制是由于土壤杆菌素 84 的作用^[5,6]。在培养基上的敏感性测定和植株冠瘿抑制试验的结果是吻合的。近年来文献报道有时两者结果不尽一致,甚至出现相反的情况。因此有些作者推论 K84 菌株的防病机制,除了土壤杆菌素的作用外,可能还有其他机制,例如病原菌侵入点的竞争等^[17-19]。从我们的实验看来,平皿测定和植株测定两者的结果基本上是一致的,因此认为 HLB-2 菌株的防病作用很可能也是由于它能产生类似土壤杆菌素的物质所引起的,这还有待于将该物质进行分离纯化并确定其理化性质和杀菌作用后,才能确定。

参 考 文 献

- [1] Nester, E. W. and T. Kosuge: *Annu. Rev. Microbiol.*, **35**: 531—567, 1981.
- [2] New, P. B. and A. Kerr: *J. Appl. Bacteriol.*, **35**: 279—287, 1972.
- [3] Kerr, A.: *J. Appl. Bacteriol.*, **35**: 493—497, 1972.
- [4] Kerr, A. and K. Htay: *Physiol. Pl. Pathol.*, **4**: 37—44, 1974.
- [5] Kerr, A.: *Plant Disease*, **64**: 24—30, 1980.
- [6] Kerr, A. and E. M. Tate: *Microbiological Sci.*, **1**: 1—4, 1984.
- [7] Engler, G. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **138**: 345—349, 1975.
- [8] Murphy, P. J. and W. P. Roberts: *J. Gen. Microbiol.*, **114**: 207—231, 1979.
- [9] Ellis, J. G. et al.: *Physiol. Plant Pathol.*, **15**: 311—319, 1979.
- [10] Hendson, M. et al.: *Appl. Environmental Microbiol.*, **45**: 1526—1532, 1983.
- [11] 陈晓英、相望年: 微生物学报, 排印中。
- [12] 马德钦等: 微生物学报, **25**: 45—53, 1985。
- [13] 张静娟等: 微生物学报, **24**: 367—375, 1984。
- [14] Stonier, T.: *J. Bacteriol.*, **79**: 889—898, 1960.
- [15] Moore, L. W. and G. Warren: *Annu. Rev. Phytopathol.*, **17**: 163—179, 1979.
- [16] Kerr, A. and C. G. Panagopoulos: *Phytopath. Z.*, **90**: 172—179, 1977.
- [17] Lippincott, B. B. et al.: *Plant Physiol.*, **59**: 388—390, 1977.
- [18] Cooksey, D. A. and L. W. Moore: *Phytopathology*, **70**: 506—509, 1980.
- [19] Cooksey, D. A. and L. W. Moore: *Phytopathology*, **72**: 919—921, 1982.

A STRAIN OF *AGROBACTERIUM RADIOBACTER* INHIBITS GROWTH AND GALL FORMATION BY BIOTYPE III STRAINS OF *A. TUMEFACIENS* FROM GRAPEVINE

Chen Xiaoying Xiang Wangnian

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

In the course of a study on the crown gall disease of hop (*Humulus lupulus* L.) in China, numerous strains of *Agrobacterium tumefaciens* and *A. radiobacter* were isolated from the gall and tested for pathogenicity and bacteriocin production. A strain of *A. radiobacter*, later designated as HLB-2, belonging to biotype I was found to produce an agrocin-like substance which inhibited biotype III strains of *A. tumefaciens* (harbouring nopaline or octopine plasmids) isolated from grapevine on YEB medium. Strain HLB-2 also prevents gall formation on sunflower seedlings and grapevine young shoots

in the greenhouse when it was coinoculated with pathogenic *A. tumefaciens* from grapevine in equal number of cells. In parallel tests, strain K84 and D2S6 failed to inhibit growth and prevent gall formation. The potential use of strain HLB-2 in the biological control of crown gall disease incited by biotype III strains of *A. tumefaciens* is briefly discussed.

Key words

Agrobacterium radiobacter HLB-2;
Agrobacterium tumefaciens biotype III;
Grapevine crown gall; Agrocin-like substance