

## 我国啤酒花根癌土壤杆菌的初步研究

陈晓英 相望年

(中国科学院微生物研究所, 北京)

1983—1984年, 对北京、浙江、山东等地啤酒花种植地区的啤酒花冠瘿病发病情况进行了调查, 并采集、分离到啤酒花根癌土壤杆菌 16 株<sup>\*</sup>。对其生物型、质粒类型、寄主范围和对土壤杆菌素 84(agrocin 84) 的敏感性进行了测定。证明所测菌株都属于土壤杆菌生物 I 型菌, 质粒类型为胭脂碱型(nopaline), 具有较广的寄主范围, 其中 11 株菌对土壤杆菌素 84 敏感, 5 株菌不敏感。对 10 株菌的质粒进行了检测。在琼脂糖凝胶电泳图上表明, 所有菌株都含一个与 pTic58 大小相同的质粒, 此外, 大多数菌株还含有 1—3 个隐蔽质粒。

**关键词** 啤酒花根癌土壤杆菌; 生物型; 质粒类型; 胭脂碱

根癌土壤杆菌 (*Bacterium tumefaciens* Smith and Town.) 是 1907 年美国科学家 E. F. Smith 和 Townsend 从雏菊的冠瘿中分离到的一个杆菌新种, 该菌除侵染雏菊外还能侵染桃树、蔷薇、啤酒花、甜菜和白杨等, 引起冠瘿病<sup>[1]</sup>。Hoerner 把一株从啤酒花冠瘿中分离到的菌株接种 48 科、94 属、210 种植物, 有 37 科、71 属、157 种植物感病, 棉花、橄榄、矮牵牛没有接种成功<sup>[2]</sup>。1976 年, De Cleene 与 De Ley 以更大规模测定根癌土壤杆菌的寄主范围, 他们采用包括啤酒花根癌土壤杆菌的 4 株土壤杆菌接种 138 科、588 属、1193 种植物, 证明可以侵染 93 科、331 属、643 种植物<sup>[3]</sup>。

近些年的研究证明, 从不同寄主、地区分离的菌株在营养要求、生化性状、寄主范围和毒力等方面表现明显差异, 我们在葡萄和毛白杨等根癌土壤杆菌方面的研究也证实了这些现象<sup>[4-7]</sup>。啤酒花冠瘿病是一种常见的并造成较大经济损失的病害, 对这一病原菌的生物特性及其防治研究还很少报道。1983—1984 年我们对北京、山东、浙江等地的啤酒花冠瘿病发病率进行了调查, 采集了大批标本, 并对从北京、山

东、浙江、新疆分离到的 16 株啤酒花根癌土壤杆菌的生物型、质粒类型、寄主范围和对土壤杆菌素 84(agrocin 84) 的敏感性进行了研究, 对其中 10 个菌株进行了质粒检测。

## 材 料 和 方 法

### (一) 实验菌株

1. 啤酒花根癌土壤杆菌菌株及分离地区: HS-1、HS-2、HS-3、HS-4、HS-5、HS-6 系自山东; HB-1、HB-2 系自北京; HH-1、HH-2、HH-3、HH-4、HH-5、HH-6 和 HH-7 系自浙江; 48-1 系自新疆石河子, 由南京农学院植保系赠送。

2. 放射土壤杆菌 K84 菌株由 L. Moore 赠送。

3. 参考用各种生物型根癌土壤杆菌菌株: C58 为生物 I 型菌, 质粒类型 nopaline; 702 为生物 II 型菌, 质粒类型 nopaline; 308 为生物 III 型菌, 质粒类型 octopine。

所有菌株均保存在 YEM 培养基斜面上。

### (二) 培养基

1. 分离培养基: 甘露醇培养基 (YEM)<sup>[8]</sup>;

本文于 1985 年 10 月 19 日收到。

<sup>\*</sup> 其中一株由南京农学院植保系赠送。

乳糖培养基<sup>[7]</sup>。

2. 生物型专一培养基: Schroth 培养基<sup>[11]</sup>; Kado 与 Heskett 培养基<sup>[9]</sup>, New 与 Kerr 培养基<sup>[10]</sup>。

3. 常规培养基: YEB 培养基。

### (三) 菌株分离方法

从啤酒花根部采集新鲜冠瘿, 冲洗干净, 75% 乙醇浸泡 1 分钟, 无菌水冲洗 3 遍以上, 切取冠瘿表皮下组织 2g 左右, 将其用无菌研钵和少量无菌水研碎, 置无菌试管中过夜, 用接种环沾取少量上清液在 YEM 培养基和 DYL 培养基上划线分离, 28℃ 培养两天, 挑取圆形、半透明、凸起的单菌落, 经纯化后转接到 YEM 斜面上培养, 以备鉴定。

### (四) 接种试验

1. 指示植物: 向日葵 (*Helianthus annuus*); 烟草 (*Nicotiana tabacum* var. *Xanthi* NC); 曼陀罗 (*Datura stramonium*); 番茄 (*Lycopersicon esculentum*); 大麻 (*Cannabis sativa*), 桑 (*Morus* spp.), 落地生根 (*Bryophyllum pinnatum*), 葡萄 (*Vitis Vinifera*), 马铃薯 (*Solanum tuberosum*), 胡萝卜 (*Daucus carota*), 啤酒花 (*Humulus lupulus*)。

2. 接种方法: 将实验菌株接种到 YEB 液体培养基中, 28℃ 振荡培养 14—16 小时, 用注射器接种于当年生啤酒花幼茎上, 10 天后观察结果。寄主范围测定: 向日葵、大麻、曼陀罗、番茄用未长出真叶的幼苗, 烟草和落地生根用 5—8cm 高的小苗, 桑和葡萄用当年新出的嫩枝条。接种方法同上, 均在温室进行, 10 天后观察结果。马铃薯、胡萝卜取新鲜块茎或块根, 表面消毒后用直径 1.5cm 打孔器打成圆柱, 在无菌条件下切成 0.3cm 厚的小圆片, 将小圆片放入铺有 0.5cm 厚 0.5% 水琼脂的培养皿内, 每皿放 3—5 个, 将实验菌株涂在圆片上, 培养皿用胶带封好, 25℃ 培养 30 天观察结果。

### (五) 生物型测定

将实验菌株接种在生物型选择性培养基上, 28℃ 培养 48 小时后观察菌株生长情况, 进行初步定型。Schroth 培养基、Kado 与 Heskett 培养基为 I 型专一性培养基, II 型、III 型土壤杆菌不能生长。New 与 Kerr 培养基是 II 型培养基, I 型, III 型菌不能生长。

将初步定型的菌株接种于酪氨酸、柠檬酸、柠檬酸铁氨、赤藓醇等碳源培养基上, 观察其对不同碳源的利用情况并测定实验菌株的 3-酮基乳糖产生; 石蕊牛奶反应、NaCl 浓度耐受性及氧化酶反应的情况, 基本方法参考文献[11]。

### (六) 冠瘿中的 opine 测定

啤酒花及其他寄主植物冠瘿中的 aopaline 和 octopine 的测定: 将冠瘿组织的汁液直接点在层析纸上, 采用 Otten 和 Schilperoot 的电泳和染色方法进行<sup>[12]</sup>。

### (七) 质粒检测

按 Kado 与 Liu 的快速方法和 Birnboim 与 Doly 的碱法进行<sup>[13-14]</sup>。

### (八) 对土壤杆菌素 84 敏感性的测定

放射土壤杆菌 K 84 的培养和土壤杆菌素 84 的制备按 Süle 和 Kado 的方法进行<sup>[15]</sup>。测定时将实验菌株接种于 YEB 液体培养基中, 28℃ 培养 16 小时左右, 取 0.5ml 菌液与 10ml 含 0.5% 琼脂的 YEB 培养基混合, 并倒于铺有 10ml 2% 水琼脂的培养皿中, 用直径为 0.6cm 的无菌滤纸圆片浸渍土壤杆菌素 84 粗制品液, 放于培养皿中央, 28℃ 培养 24 小时, 观察抑菌圈产生情况。

## 结 果

### (一) 山东、浙江、北京啤酒花冠瘿病的发病情况与冠瘿标本的采集

我们于 1983 年 4 月在北京、7 月在山东, 1984 年 4 月在浙江对 14 个啤酒花种植场、人民公社生产大队啤酒花冠瘿病的发病情况进行了调查, 结果发现: 凡啤酒花种植在 3 年以上的产区均有冠瘿病发生 (图 1)。山东泰安市发病尤为严重, 发病率 50—70%, 青岛、莱西两地为 30—50%, 北京、浙江发病较轻, 一般不超过 5%。

冠瘿一般生长在啤酒花植株根部, 紧靠土壤表层下边地上茎和地下茎交接处。7 月份可见到当年生长的冠瘿, 从中能比较容易地分离到菌株。冠瘿开始生长时为灰白色或淡白色小瘤, 以后逐渐增大, 颜色变黄色或浅褐色, 再变成褐色, 质地由肉质

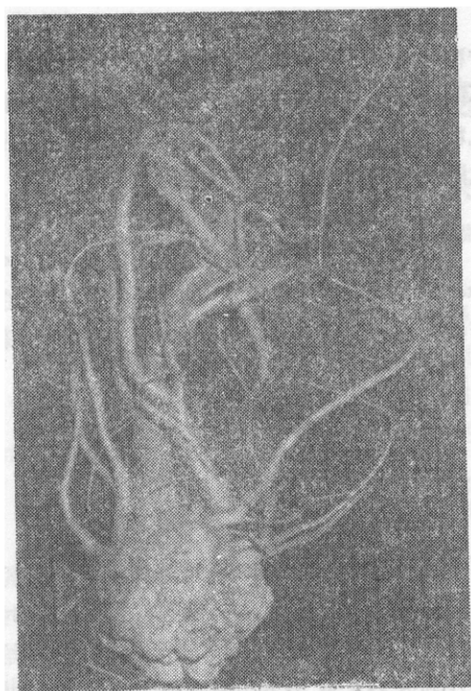


图1 啤酒花冠瘿

Fig. 1 Crown gall of hop

变松软,导致植株根部松软脆弱,植株长势逐渐衰弱,严重的导致全株枯死。

## (二) 啤酒花根癌土壤杆菌生物型的鉴定

根据《伯杰细菌鉴定手册》第八版,将来自各地的啤酒花冠瘿中分离出的菌株进行鉴定,将属于根癌土壤杆菌的16个菌株进行生物型鉴定。结果证明:从各地分离的啤酒花根癌土壤杆菌在各种选择性培养基和不同碳源培养基中的生长情况和各项生理生化鉴别特征基本一致(表1),均属于土壤杆菌生物I型菌株。在生物型鉴定中以C58、702、308做为参考菌株。

## (三) 啤酒花根癌土壤杆菌 Ti 质粒的质粒类型

根据不同根癌土壤杆菌诱导冠瘿中所产生的 opine 种类,可以把根癌土壤杆菌的质粒分为四类,即 octopine I 型、octopine II 型、nopaline 型和 agropine 型。参照 Otten 和 Schilperoot 的方法,我们从采自

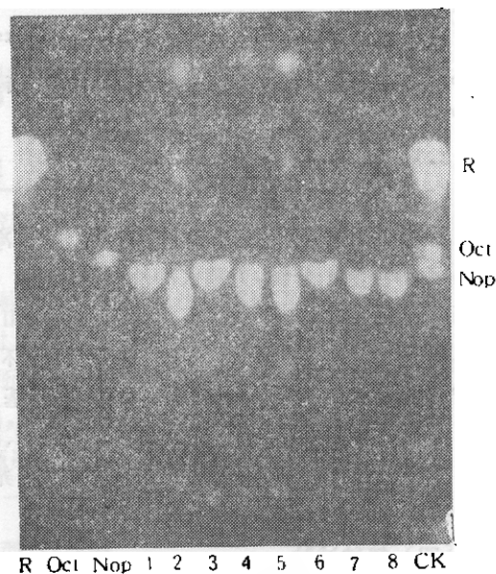


图2 HS-1 菌株感染8种植物产生的冠瘿中的 opine 的测定

Fig. 2 Opine in the crown gall of eight kinds of plants induced by strain HS-1

1. 向日葵 *Helianthus annuus*; 2. 烟草 *Nicotiana tabacum*; 3. 落地生根 *Bryophyllum pinnatum*; 4. 大麻 *Cannabis sativa*; 5. 桑 *Morus* spp; 6. 曼陀罗 *Datura stramonium*; 7. 马铃薯 *Solanum tuberosum*; 8. 番茄 *Lycopersicon esculentum*

北京、山东、浙江的啤酒花冠瘿中测到有 opine 的存在,经与 nopaline、octopine 标准品比较,证明属于 nopaline。从这些冠瘿中分离到的15个菌株和48-1菌株分别接种到健康的啤酒花植株上,60天后取下冠瘿,用同样方法测定 opine,证明也是 nopaline。最后将 HS-1 菌株接种在向日葵、大麻、桑树、落地生根、曼陀罗、烟草、马铃薯、番茄等8种植物上,分别测定冠瘿中的 opine,证明都是 nopaline (图2)。

## (四) 啤酒花根癌土壤杆菌寄主范围和致癌性的测定

用人工接种方法,将16株实验菌株分别接种于向日葵、落地生根、曼陀罗、烟草、番茄、桑树、大麻、啤酒花、葡萄、马铃薯和胡萝卜十一种植物上,观察其致病情况。结

表 1 啤酒花根癌土壤杆菌生物型特征

Table 1 The characteristic of biotype of *Agrobacterium tumefaciens* of hop

| 菌株 Strain                            |                                    | 啤酒花根癌土壤杆菌 <i>A. tumefaciens</i> of Hop |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 标准菌株<br>Standard strain |     |     |     |
|--------------------------------------|------------------------------------|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------------------|-----|-----|-----|
| 结果 Result                            | 试验 Test                            | HS-1                                   | HS-2 | HS-3 | HS-4 | HS-5 | HS-6 | HB-1 | HB-2 | HH-1 | HH-2 | HH-3 | HH-4 | HH-5 | HH-6 | HH-7 | 48-1                    | C58 | 702 | 308 |
| 3-酮基乳糖产生<br>3-ketolactose production | 石蕊牛奶反应<br>Litmus milk*             | +                                      | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +                       | +   | +   | +   |
|                                      | 在 3% NaCl 上生长<br>Growth in 3% NaCl | +                                      | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +                       | +   | +   | +   |
|                                      | 酪氨酸利用<br>Tyrosine utilization      | -                                      | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -                       | -   | -   | -   |
|                                      | 柠檬酸利用<br>Citrate utilization       | -                                      | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -                       | -   | +   | -   |
|                                      | 氧化酶反应<br>Reaction of oxydase       | +                                      | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +                       | +   | +   | +   |
| 柠檬酸铁氧<br>Ferric ammonium citrate     | +                                  | +                                      | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +                       | +   | -   | -   |
| 赤藓醇产酸<br>Acid from erythritol        | -                                  | -                                      | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -                       | -   | +   | -   |
| Schroth medium                       |                                    | +                                      | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +                       | +   | -   | -   |
| Kado and Heskett medium              |                                    | +                                      | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +                       | +   | -   | -   |
| New and Kerr medium                  |                                    | -                                      | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -                       | -   | +   | -   |

\*+: 碱 Alkali

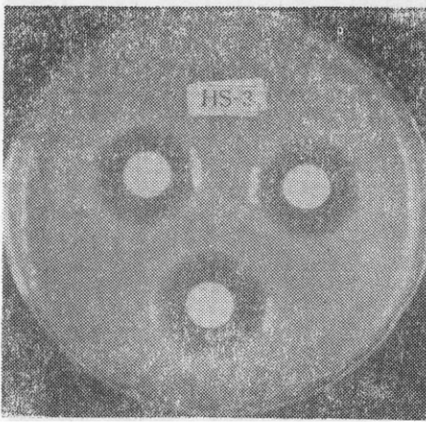


图3 啤酒花根癌土壤杆菌对土壤杆菌素84的敏感性

Fig. 3 Sensitivity of *Agrobacterium tumefaciens* of hop to agrocin 84

Strains HS-1, HS-2, HS-3, HS-4, HS-5, HS-6, HB-1, HB-2, HH-1, HH-2, 48-1 have the same result.

果证明 15 株菌能侵染除葡萄外的 10 种植物, HS-3 菌株可侵染所有十一种植物。表明这些啤酒花根癌土壤杆菌菌株具有较宽的寄主范围, 但在葡萄上, 表现出不同的致病性。

#### (五) 啤酒花根癌土壤杆菌对土壤杆菌素 84 的敏感性

土壤杆菌素 84 是由放射土壤杆菌(*A. radiobacter*) 菌株 K 84 产生的一种核酸类细菌素<sup>[16]</sup>, 它能抑制 nopaline 质粒型的根癌土壤杆菌, 但对 octopine 和 agropine 质粒型的根癌土壤杆菌、已消除质粒而无致瘤性的根癌土壤杆菌以及放射土壤杆菌都没有抑制作用<sup>[17,18]</sup>。本实验所用的 16 株啤酒花根癌土壤杆菌都是 nopaline 质粒型菌株, 它们对土壤杆菌素 84 的敏感性, 经测定结果证明: HS-1、HS-2、HS-3、HS-4、HS-5、HS-6、HB-1、HB-2、HH-1、HH-2 和 48-1 菌株对土壤杆菌素 84 敏感(图 3), HH-3、HH-4、HH-5、HH-6、HH-7 表现为抗性, 表明同属 nopaline 质粒型的菌株对土壤杆菌素 84 的敏感性不同。

#### (六) 啤酒花根癌土壤杆菌的质粒检测

用 Kado 快速提取质粒法和 Birnboim 与 Doly 的碱法对 HB-1、HB-2、HS-1、HS-3、HS-4、HS-5、HH-1、HH-2、HH-3 和 48-1 等 10 个菌株进行了质粒检测, 以

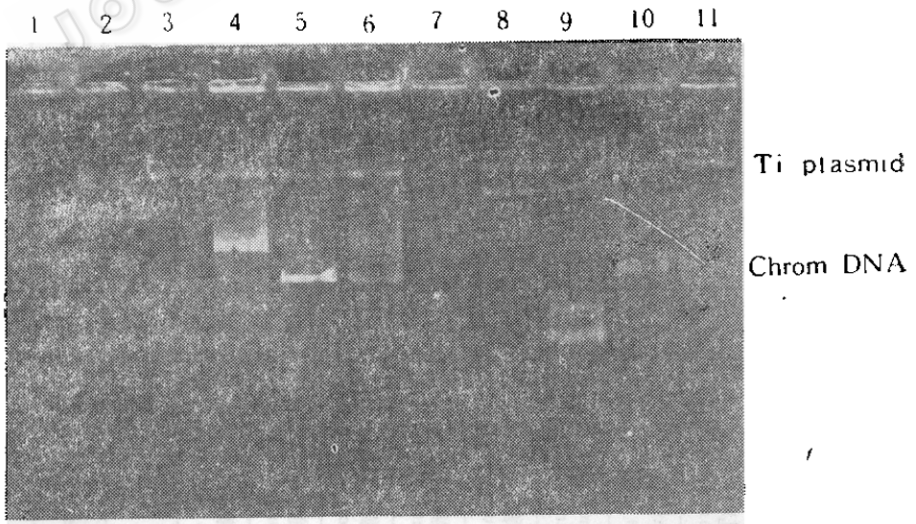


图4 啤酒花根癌土壤杆菌的质粒检测

Fig. 4 Test of plasmid in *A. tumefaciens* of hop

1. HB-1; 2. HB-2; 3. HS-1; 4. HS-3; 5. HS-4; 6. HS-5; 7. 48-1; 8. HH-3; 9. HH-1; 10. HH-2; 11. C58

C58 为对照菌。结果发现所有实验菌中至少含有一个质粒与 pTiC58 大小相等( $128 \times 10^6$  道尔顿),大多数菌含一个以上的质粒(图 4)。推测与 pTiC58 大小相等的质粒为 Ti 质粒,其余为隐蔽质粒。菌株 HS-1、HS-4、HH-2 和 48-1 经多次提取只发现一个质粒;HB-1 和 HB-2 各含两个大小相近的质粒,稍大者与 pTiC58 相等;HH-1 含 4 个质粒,最大者与 pTiC58 相等;HS-5 含一个与 pTiC58 大小相等的质粒,另外在靠近染色体带处出现一浅带,这是另一质粒还是 Ti 质粒提取中的破碎片段有待进一步证实。

## 讨 论

啤酒花冠瘿病是研究较早的植物细菌病害,我国也有报道<sup>[19]</sup>。但对于不同地区的发病情况、病原菌生理生化、寄主范围和质粒类型等特性的系统研究还未见报道。我们对从不同地区分离收集的 16 株啤酒花土壤杆菌进行了研究,这对于此病的防治和对根癌土壤杆菌生物学基础研究都有较重要的意义。

所实验的 16 株啤酒花根癌土壤杆菌菌株均属生物 I 型菌。由于目前土壤杆菌属的分种仍以致病性作为一个重要标志,而致病性是由质粒决定的。所以,这种分类尚存不足之处。而生物型的划分则以菌株的生理生化特性为主要性状,没考虑由质粒决定的致病性。根癌土壤杆菌的致病性由 Ti 质粒决定,根据在冠瘿中产生的 opine 种类将 Ti 质粒分成不同类型。实验证明:啤酒花根癌土壤杆菌的质粒类型为 nopaline。生物型和质粒类型的一致性可能是啤酒花根癌土壤杆菌的特性,这与我们自国内各地葡萄和毛白杨冠瘿分离到的根癌土壤杆菌存在三种生物型和两种质粒类型的现象显然不同。

由放射土壤杆菌 K 84 菌株产生的土壤杆菌素 84 对含 nopaline 型 Ti 质粒的菌株有抑制作用,因此可用来防治一些果树、花木的冠瘿病。我们所分离到的啤酒花根癌土壤杆菌都为 nopaline 质粒类型,但对土壤杆菌素 84 的敏感性不同,这一现象有待进一步研究。

人工接种的结果证明:啤酒花根癌土壤杆菌的寄主范围较宽,但也不完全一致,尤其是对葡萄的致病性有差别,除 HS-3 菌株外所有啤酒花根癌土壤杆菌对葡萄均无致病性。早年 Hoerner 也报道了啤酒花根癌土壤杆菌对葡萄属植物致病性的差别<sup>[2,20]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Smith, E. F. and C. O. Townsend: *Science*, **25**: 671—673, 1907.
- [2] Hoerner, G. R.: *Plant Dis. Rept.*, **29**: 98—109, 1945.
- [3] De Cleene, M. and J. De Ley: *Bot. Rev.*, **42**: 389—466, 1976.
- [4] 张静娟等: *微生物学报*, **24**: 369—375, 1984.
- [5] 马德欣等: *微生物学报*, **25**: 45—53, 1985.
- [6] Perry, K. L. and C. I. Kado: *J. Bacteriol.*, **151**: 343—350, 1982.
- [7] 王均等: *云南植物研究*, **3**: 441—448, 1981.
- [8] Schroth, M. N. et al.: *Phytopathology*, **55**: 645—647, 1965.
- [9] Kado, C. I. and M. G. Heskett: *Phytopathology*, **60**: 969—976, 1970.
- [10] New, P. B. and A. Kerr: *J. Appl. Bacteriol.*, **34**: 233—236, 1971.
- [11] Schaad, N. W.: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Bacteriol. Comm. Am. Phytopathol. Soc. St. Paul. Minn., p. 17—25, 1980.
- [12] Otten, L. A. B. M. and R. A. Schilperoort: *Biochim. Biophys. Acta*, **527**: 497—500, 1978.
- [13] Kado, C. I. and S. T. Liu: *J. Bacteriol.*, **145**: 1365—1373, 1981.
- [14] Birnboim, H. C. and J. Doly: *Nucl. Acids Res.*, **7**: 1513—1523, 1979.
- [15] Süle, S. and C. I. Kado: *Physiol. Plant Pathol.*, **17**: 347—356, 1980.
- [16] Roberts, W. P. et al.: *Nature*, **265**: 379—381, 1977.
- [17] Kerr, A.: *Plant Dis.*, **64**: 24—30, 1980.
- [18] Kerr, A. and M. E. Tate: *Microbiol. Sci.*, **1**:

1—4, 1984.

[19] 罗友文等: 植物保护学报, 11: 57—62, 1984。

[20] Hoerner, G. R.: *Phytopathology*, 24: 688—690, 1934.

## STUDIES ON *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* ISOLATED FROM HOPS IN CHINA

Chen Xiaoying    Xiang Wangnian

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

In 1983 and 1984, surveys were made of crown gall disease of hop in hop growing districts in Beijing, Shandong and Zhejiang provinces. 16\* strains of *A. tumefaciens* of hop were isolated. Their biotype, plasmid type, host range and sensitivity to agrocin 84 were tested. All these 16 strains belong to biotype 1 with nopaline type plasmid. They have wide host range. 11 strains were sensitive to agrocin 84, while 5 were insensitive. In addition to a Ti

plasmid with a molecular weight corresponding to pTiC58, they also harboured one to three cryptic plasmids as shown in agarose gel electrophoresis in 10 strains tested.

### Key words

*Agrobacterium tumefaciens* of hop; Biotype; Plasmid type; Nopaline

\* One strain was sent by Nanjing Agricultural College.