

中国毛白杨根癌土壤杆菌的类型和对土壤杆菌素敏感性的研究

张静娟 周娟 相望年

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从我国北方 8 个毛白杨根癌病发病苗圃分离到根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 8 株。经质粒型、生物型、寄主范围和对土壤杆菌素 agrocin 84 和 D286 的敏感性测定, 证明 5 株系 nopaline 质粒型, 其中生物 I 型 2 株, 生物 II 型 2 株, I—II 中间型 1 株, 3 株系 agropine 质粒型, 其中生物 I 型 2 株, 生物 II 型 1 株。所有分离菌株均系宽寄主群, 其中 1 株经回接能侵染单子叶植物美人蕉 (*Canna indica*), 水仙 (*Narcissus*) 和吊兰 (*Chlorophytum*)。分离菌株中, 5 株 nopaline 质粒型菌株对土壤杆菌素 84 敏感, 3 株 agropine 质粒和 3 株生物 I 型 nopaline 质粒菌株对土壤杆菌素 D286 敏感。在温室中, 合并使用两种土壤杆菌素产生菌——放射土壤杆菌 (*A. radiobacter*) K84 和 D286 的菌体悬浮液, 预浸毛白杨和向日葵幼苗根部或与致病的毛白杨根癌土壤杆菌共接种枝茎, 降低根癌病诱发率达 94% 以上。表明放射土壤杆菌 K84 和 D286 可以控制毛白杨根癌病。

关键词 根癌土壤杆菌; 中国毛白杨根癌病; 土壤杆菌素

根癌病又称冠瘿病 (crown gall disease), 是我国北方毛白杨的一种常见病。近来, 在北京郊区、河北、河南等地各苗圃, 发现毛白杨幼苗的发病率迅速上升。张锡津和作者曾对这一病害的病原细菌——根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的生物学特性进行了初步研究^[1,2], 但有关这一病害的生物防治的报道很少。

近十年来, 在其他植物根癌病的生物防治方面已有较大进展, 例如用放射土壤杆菌 (*A. radiobacter*) K84 预防桃、李、杏、樱桃、苹果和柳等树苗的根癌病都有较好效果^[3-6]。K84 菌株的防病机制, 主要由于它所产生的土壤杆菌素 agrocin, 作用根癌土壤杆菌 Ti 质粒的特定基因, 抑制其生长^[5,7,8]。但是, 土壤杆菌素 84 的抑菌对象仅限于 nopaline 质粒型的根癌土壤杆菌, 对其他两种质粒型的根癌土壤杆菌无抑制

作用^[5,9]。在不同地区, 可能由于病原菌株的生物学特性、寄主品种等的差异, 土壤杆菌素 84 的防治效果很不一致, 有时甚至完全无效^[3,4]。1983 年, Hendson 等^[10]从南非的桉树根癌中分离到一株根癌土壤杆菌 D286 菌株, 它对三种质粒型的生物 I 型菌株有抑制作用。已知引起我国毛白杨根癌病的根癌土壤杆菌有 nopaline 和 agropine 两种质粒类型^[2]。因此, 调查不同地理分布的毛白杨根癌土壤杆菌的类型和对土壤杆菌素的敏感性反应, 对进一步探讨这一病害的防治及其机制是很有意义的。本文报道从我国北方一些地区的毛白杨根癌中分离的根癌土壤杆菌类型及其对土壤杆菌素 84、D286 敏感性反应的初步结果。

本文于 1986 年 1 月 22 日收到。

承周坚同志协助部分感染工作; 赵小平同志拍摄彩色照片, 特此致谢。

表1 8株毛白杨根瘤土壤杆菌的生物型和质粒型特征
Table 1 Characteristics in biotype and plasmid type of 8 strains of *A. tumefaciens* from poplar

菌株 Strains	采集地点 Collection locality	选择培养基 Selection media		石蕊牛奶 Litmus milk	柠檬酸盐 Citrate	乳酸盐 Lactate	酒石酸盐 Tartrate	赤鲜醇 Erythritol	生物型 Biotype	瘤组织中的 Opine in tumor
		Clark	New & Kerr							
Pt-12	北京东北旺苗圃 3 队	+	-	碱 alk	+	+	-	-	1	agr
Pt-14	北京东北旺苗圃 4 队	-	+	酸 acid	-	-	+	+	2	nop
Pt-25	北京大兴县苗圃	+	-	碱 alk	-*	-*	-	-	1-2	nop
Pt-26	北京福泉苗圃	+	-	碱 alk	+	+	-	-	1	nop
Pt-28	北京桑地苗圃	-	+	酸 acid	-	-	+	+	2	nop
Pt-29	北京西南郊苗圃	+	-	碱 alk	+	+	-	-	1	agr
Pt-31	河南农大林站	+	-	碱 alk	+	+	-	-	1	nop
Pt-34	河北唐山苗圃	-	+	酸 acid	-	-	+	+	2	agr

注：+ 阳性 positives - 阴性 negatives * 与典型特征反应不一致 anomaly。

材料和方法

(一) 菌株

1. 毛白杨根癌土壤杆菌菌株及来源: 见表1。

2. 土壤杆菌素产生菌: K84系美国俄勒冈州立大学 L. W. Moor 教授赠送; D286系美国麻省理工学院 T. A. Thomson 博士赠送。

(二) 培养基

1. 分离培养基: YEM^[11]。

2. 土壤杆菌生物型选择培养基: 按前文^[2]。

3. 土壤杆菌一般生长培养基: YEM 和 YEB^[12]。

4. 土壤杆菌素产生菌生长培养基: AT 基本培养基^[13]和 YEM。

(三) 特殊试剂

nopaline 为 Calbiochem-Behring 公司产品。agropine 按 Guyon 等人^[13]方法从毛白杨 agropine 冠瘿瘤提取。

(四) 菌株的分离和鉴定

按前文的方法^[2]。

(五) 毛白杨根癌土壤杆菌对土壤杆菌素敏感性的测定

按 Stonier^[14]和 Mayr-Harting 等人^[15]的两种方法测定。

(六) 植物接种试验

1. 指示植物: 毛白杨(*Populus tomatosa*), 试管苗由中国科学院植物研究所陈维伦同志赠送种苗, 按文献^[16]方法繁殖, 高3—5cm; 室外生长的毛白杨幼枝高0.5m左右。美人蕉(*Canna indica* var. *flava* Roxb), 室外生长高25—30cm。落地生根(*Bryophyllum pinnatum*), 烟草(*Nicotiana tabacum* var. *xanthi* NC), 向日葵(*Helianthus annuus*), 蕃茄(*Lycopersion esculentum*), 马铃薯(*Solanum tuberosum*), 豌豆(*Pisum sativum* L.), 菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.), 水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis* Roem), 吊兰(*Chlorophytum chinese* Bur. et Franch) 等均为5—10cm高的温室盆栽幼苗。

2. 测定寄主范围的接种方法: 按前文^[2]。

3. 测定土壤杆菌素对根癌土壤杆菌致瘤抑制作用的接种方法: 参照 Spier^[17]的浸根法与

Htay 和 Kerr^[18]的与致病菌共接种枝茎方法。将产素菌 K84 和 D286 分别培养到生长量 A540nm 值为 1.0—1.3, 经 10,000r/min 离心 10 分钟收集细胞, 用灭菌生理盐水制成 $2-3 \times 10^9$ 个细胞/ml 的悬浮液, 等体积混合制成产素菌混合液; 将 8 株致病的毛白杨根癌土壤杆菌以等体积混合成与产素菌悬液相当的浓度, 作为致病菌混悬液。取在砾石中培养 7—10 天的向日葵幼苗 50 株, 浸入上述制备的产素菌混悬液, 30 分钟后取出晾干, 再浸入致病菌混悬液, 30 分钟后取出移入装有灭菌土壤的花盆, 25℃ 温室培育; 或将上述制备的产素菌和致病菌等浓度混合, 用灭菌注射器注射向日葵和毛白杨试管苗茎部; 或用解剖刀割伤室外栽植的毛白杨幼枝, 棉花蘸取涂布伤口。每组处理接种 10 株, 每株 3 个接种点。对照组单独接种致病菌混合液。

结 果

(一) 不同地理分布的毛白杨根癌病原菌的生物型和质粒型特征鉴定

将由北京东北旺、温泉、桑地、西南郊、河北、河南等地 7 个苗圃 8 个区域采集的 8 个毛白杨根癌病标本, 按前文^[2]方法分离鉴定, 结果列表 1。

由表 1 可以看出, 同一寄主由于地区分布的不同, 引起根癌病的病原细菌的生物型和质粒型不完全相同。8 株分离菌株中, 5 株为 nopaline 质粒型, 其中生物 I 型 2 株, 生物 II 型 2 株, 生物 I—II 中间型 1 株; 3 株为 agropine 质粒型, 其中生物 I 型 2 株, 生物 II 型 1 株。

(二) 毛白杨根癌土壤杆菌寄主范围测定

按前文^[2]方法, 将 8 株分离菌株分别接种毛白杨、落地生根、向日葵、蕃茄、烟草、马铃薯、豌豆、菜豆、美人蕉、水仙、吊兰等 11 种植物, 1 月后观察致瘤和 opine 合成。结果证明, 8 株毛白杨根癌土壤杆菌都能侵染毛白杨、落地生根、向日葵、蕃茄、烟草、马铃薯、豌豆、菜豆等 8 种被试植物。

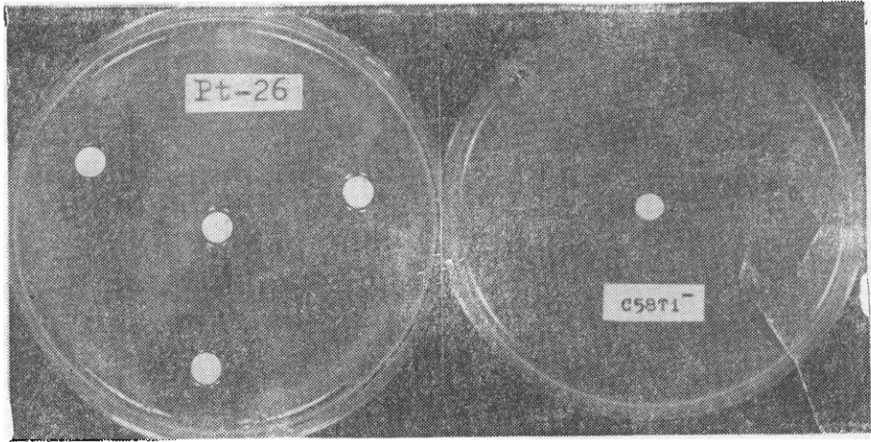


图1 土壤杆菌素对敏感菌株的生长抑制作用

左: 抑制生长; 右: 不抑制生长

Fig. 1 Growth inhibition of sensitive strains by agrocin

L: Inhibition; R: Non-inhibition

表2 毛白杨根癌土壤杆菌对土壤杆菌素 84 和 D286 的敏感性

Table 2 Sensitivity of *A. tumefaciens* from poplar to agrocin 84 and D286

菌株 Strain	采集地点 Collection locality	生物型 Biotype	质粒型 Plasmid type	土壤杆菌素敏感性 Sensitivity to agrocin	
				84	D286
Pt-12	北京东北旺苗圃 3 队	I	agr	R	S
Pt-14	北京东北旺苗圃 4 队	II	nop	S	R
Pt-25	北京大兴县苗圃	I—II	nop	S	S
Pt-26	北京温泉苗圃	I	nop	S	S
Pt-28	北京桑地苗圃	II	nop	S	R
Pt-29	北京西南郊苗圃	I	agr	R	S
Pt-31	河南农大林站	I	nop	S	S
Pt-34	河北唐山苗圃	II	agr	R	S
C58	参考用菌株	I	nop	S	S

注: S 敏感 Sensitive; R 抗性 Resistant。

表3 合并接种 K84 和 D286 对毛白杨根癌土壤杆菌致瘤的抑制作用

Table 3 Gall inhibition on plantlets by inoculating strains K84 and D286

处理 Treatment	浸根向日葵幼苗 Dipped sunflower seedlings	共接种毛白杨试管苗 Coinoculated sterile poplarlets	共接种毛白杨插条 Coinoculated poplar cuttings	共接种向日葵幼苗 Coinoculated sunflower seedling
结瘤株比率 Rate of galled plantlets	2/50	1/30	2/30	0/30

其中 1 株生物 I—II 中间型 nopaline 质粒菌株 Pt-25, 还能侵染单子叶植物美人蕉、水仙和吊兰, 但接种部位没有肿瘤形

成, 仅呈略微的膨大。所有接种部位测到了相应的 opine 类物质。表明这些毛白杨根癌土壤杆菌具有较宽的寄主范围。



图2 土壤杆菌素产生菌悬液预浸向日葵幼苗根部对根瘤诱发的抑制作用

Fig. 2 Gall inhibition on sunflower seedling by dipping the roots in the cells suspension of agrocin-producing strains

左: 浸过的向日葵 L: Dipped sunflower
右: 未浸的向日葵 R: Undipped sunflower

(三) 毛白杨根瘤土壤杆菌对土壤杆菌素 84 和 D286 的敏感性测定

用 Stonier 和 Mayr-Harting 两种方法鉴别 8 株分离菌株对土壤杆菌素 84 和 D286 的敏感性反应。结果表明,两种方法测定的结果一致,5 株 nopaline 质粒菌株对土壤杆菌素 84 敏感(图1),3 株 agropine 质粒和 3 株生物 I 型 nopaline 质粒菌株对 D286 敏感,详见表 2。两种方法比较,Mayr-Harting 液体法测定结果的稳定性不高,有时代谢产物中出现刺激根瘤土壤杆菌生长的反应,而且过程繁琐,Stonier 法测定结果比较稳定。

(四) 土壤杆菌素 84 和 D286 对毛白杨根瘤土壤杆菌致瘤的抑制作用

将产素菌 K84 和 D286,按材料和方法中描述的方法,分别预浸移植苗根部和与致病菌共接种植株枝茎,60 天观察结

果。结果表明,向日葵与毛白杨上的结果接近,没有反映出寄主的差异性;浸根处理与共接种枝茎的效果接近,抑制植株致瘤的效果在 94—97% 之间,没有反应出土壤因素的作用(表 3,图 2 及图版 I-3)。

讨 论

用土壤杆菌素 84 预防一些植物(如桃、李、杏、樱桃、苹果和柳等树)根瘤病的发生虽然已有报道,但效果仅限于 nopaline 质粒型根瘤土壤杆菌引起的根瘤病。对其他两种质粒型菌株引起的根瘤病则无效。而且对不同地区可能由于病原菌株的生物学特性和寄主专异性等方面的差异,其效果很不一致^[3-5,9]。虽然 D286 能抑制三种质粒型菌株,但对某一些菌株没有作用^[10,19,20]。因此,调查不同地区的毛白杨根瘤病原的类型和对土壤杆菌素的反应,对有效预防我国毛白杨根瘤病的发生和探讨土壤杆菌素作用根瘤土壤杆菌的机制都是很有意义的。

通过对我国北方 8 个苗圃的毛白杨根瘤土壤杆菌的调查,发现同一寄主由于地理分布不同,在生物型和质粒类型上有差别,如表 1 所示有 nopaline、agropine 两种质粒类型和生物 I、II 型及 I—II 中间型。而且对土壤杆菌素 84 和 D286 的反应也不完全相同,84 抑制其中 5 个苗圃的 nopaline 型病原,D286 抑制其他 6 个苗圃的 agropine 质粒型和生物 I 型的 nopaline 质粒病原(表 2)。根据上述差别,我们设计了合并使用两种土壤杆菌素处理的方法,分别在温室盆栽向日葵、毛白杨试管苗和室外插条上以浸根和共接种枝茎方式作用 8 株毛白杨根瘤土壤杆菌混合病原。60 天以后的观察结果证明,上述两种植株的根瘤诱发率明显下降,详见表 3。因此,我们认为,在我国北方各毛白杨根瘤病发

病地区,在未进行病原类型鉴定的情况下,可以合并使用两种土壤杆菌素产生菌株 K84 和 D286; 为了保证生防菌株在生态平衡中的优势,适当提高 K84 和 D286 的浓度,以提高生物防治效果。

参 考 文 献

- [1] 张锡津: 林业科技通讯, **3**: 22—24, 1980。
 [2] 张静娟等: 微生物学报, **24**: 369—375, 1984。
 [3] Moore, L. W.: In *Biology and Control of Soil Borne Plant Pathogens*. ed. Schippers, B., Gams, W., New York: Academic Press, pp. 553—568, 1978。
 [4] Moore, L. W.: *Ann. Rev. Phytopathol.*, **17**: 163—179, 1979。
 [5] Kerr, A. and M. E. Tate: *Microbiol. Sci.*, **1**: 1—4, 1984。
 [6] Du Plessis, H. J. et al.: *Plant Dis.*, **69**: 302—304, 1985。
 [7] Kerr, A. and K. Htay: *Physiol. Plant Pathol.*, **4**: 37—44, 1974。
 [8] Ellis, J. G. and P. J. Murphy: *Mol. Gen.*

- Genet.*, **181**: 36—43, 1981。
 [9] Engler, G. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **138**: 345—349, 1975。
 [10] Hendson, M. et al.: *Appl. Envir. Microbiol.*, **45**: 1526—1532, 1983。
 [11] Kado, C. L. and S. T. Liu: *J. Bacteriol.*, **145**: 1365—1373, 1981。
 [12] Zaenen, I. et al.: *J. Mol. Biol.*, **86**: 109—127, 1974。
 [13] Guyon, P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**: 2695—2697, 1980。
 [14] Stonier, T.: *J. Bacteriol.*, **79**: 889—898, 1960。
 [15] Mayr-Harting, A. et al.: In *Methods of Microbiology*. Vol. 7A, ed. Norris, J. R. and D. W. Ribbons, Academic Press, Inc., New York, pp. 315—422, 1972。
 [16] 陈维伦等: 植物学集刊, **1**: 135—139, 1983。
 [17] Spiers, A. G.: *N. Z. J. Agric. Res.*, **23**: 139—142, 1980。
 [18] Htay, K. and A. Kerr: *J. Bacteriol.*, **37**: 525—530, 1974。
 [19] Webster, J. et al.: *Appl. Microbiol.*, **52**: 217—219, 1986。
 [20] 陈晓英、相望年: 微生物学报, **26**: 193—199, 1986。

STUDIES ON THE TYPES OF *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* FROM POPLARS IN CHINA AND THEIR SENSITIVITY TO AGROCINS

Zhang Jingjuan Zhou Juan Xiang Wangnian

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

8 strains of *Agrobacterium tumefaciens* were isolated and identified from 8 poplar nurseries in north China. 5 strains are nopaline plasmid type (2 strains are biotype I, 2 strains are biotype II, 1 strain is biotype I—II) and 3 strains are agropine plasmid type (2 strains are biotype I, 1 strain is biotype II). All these strains are broad host range group. One of which infects *Canna indica*, *Narcissus* and *Chlorophytum* of monocots by reinoculation. The results of sensitivity tests of these strains to agrocin on medium show that 5 strains of nopaline plasmid type are sensitive to agrocin 84, 3 strains biotype I of nopaline plasmid and 3 strains agropine plasmid type

are sensitive to agrocin D286. The efficiency in reducing gall formation on sunflower seedlings and poplarlets was over 94% in the greenhouse, when either dipping the seedlings roots or coinoculating on the stems using strains (*A. radiobacter*)K84 and D286 in combination with a mixture of pathogenic *A. tumefaciens* from poplars. It is possible that gall disease on poplars can be controlled by (*A. radiobacter*)K84 and D286.

Key words

Agrobacterium tumefaciens; Poplar gall; Agrocin

图 版 说 明

Explanation of plates

1. K84 和 D286 与 8 株毛白杨根癌土壤杆菌混合液共接种毛白杨试管苗对冠瘿形成的抑制作用。左：共接种 K84、D286 和病原；右：接种病原。2. K84 和 D286 与 8 株毛白杨根癌土壤杆菌混合液共接种室外毛白杨插条对冠瘿形成的抑制作用。3. 单独接种毛白杨根癌土壤杆菌的室外毛白杨插条的致瘤。

1. Inhibition of galling on sterile poplarlet by coinoculating strains K84 and D286 combined with a mixture of eight pathogenic strains. L: Coinoculated by K84, D286 and pathogens; R: Inoculated by pathogens. 2. Inhibition of galling on the outside poplar cutting by coinoculating strains K84 and D286 with a mixture of eight pathogenic strains. 3. Galling on the outside poplar cutting inoculated by a mixture of eight pathogenic strains.

JOURNALS.IM.AC.CN