

樱桃根癌土壤杆菌及其对土壤杆菌素 84 敏感性的研究*

王慧敏 隋新华 李健强

(中国农业大学植物病理学系 北京 100094)

戴秀玉 马德钦

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 从山东、河北、辽宁等地樱桃园的樱桃冠瘿瘤和土壤样品中分离到 46 株根癌土壤杆菌。经鉴定有 4 株是 *Agrobacterium tumefaciens* (原生物型 1), 其余 42 株是 *Arhizogenes* (原生物型 2)。这些菌株所诱导的冠瘿瘤中均合成胭脂碱(nopaline), 属胭脂碱型 Ti 质粒的根癌土壤杆菌, 并对放射土壤杆菌 K84 菌株所产生的土壤杆菌素 84 敏感。由于 K84 菌株对含胭脂碱 Ti 质粒的根癌土壤杆菌有很好的抑制效果, 因此, 用 K84 菌株防治樱桃根癌病是有应用前景的。

关键词 土壤杆菌, 樱桃, Ti 质粒, 土壤杆菌素 84

分类号 Q939[.96]

根癌病是一种世界性植物细菌病害, 由土壤病菌根癌土壤杆菌通过植物根或茎的伤口侵入后所形成的, 寄主相当广泛。由于其致病机制特殊, 即病菌含有致病基因的 DNA 片段与植物细胞染色体 DNA 结合, 并随细胞的分裂而不断复制, 致使被侵染的植物组织无控制地增生成为肿瘤, 因此目前还没有很好的化学治疗办法。利用不致病的放射土壤杆菌 K84 菌株防治根癌病是 70 年代发展起来的有效方法, 它是通过使用 K84 菌株, 保护植物的伤口, 并在伤口上定殖, 产生土壤杆菌素, 阻止和杀死入侵的根癌病菌。但是 K84 有一定的局限性, 它只对含有胭脂碱型 Ti 质粒的根癌土壤杆菌才有抑制作用, 对章鱼碱或农杆菌型菌株无效。因此在使用时, 必须先查明根癌中根癌病原细菌的类型, 才能制订针对性措施。

大樱桃在我国的栽培面积不断扩大, 然而根癌病十分严重, 有的果园发病率达 90% 以上, 严重影响大樱桃植株生长, 使樱桃产量和品质下降。为了对此病害开展生物防治, 本研究在病害调查基础上, 从不同地区采集代表性肿瘤和土壤, 进行了病原细菌的分离、鉴定, 并测定分离菌株对土壤杆菌素 84 的敏感性, 以期对大樱桃根癌病的生物防治提供理

* 北京市自然科学基金资助项目。

本文作者还有王建辉、刘继世。

收稿日期: 1996-12-13

论依据。

1 材料和方法

1.1 根癌样品的采集

1993~1995年从山东、河北和辽宁等地樱桃病株根部采集冠瘿瘤和根围土,置塑料袋内并放冰箱保存。

1.2 根癌病菌的分离

参照过去使用的方法^[1],用水将冠瘿瘤表面泥土冲洗干净,刮去四周腐烂表皮,露出白嫩组织,置75%酒精浸1min,再用8%次氯酸钠溶液表面消毒10min,无菌水漂洗干净后,取一小块置于小塑料离心管内,用不锈钢棒将其捣碎,再加少量无菌水混合,冰箱过夜。根围土的分离是取10g土加90ml灭菌水,振荡混匀,备用。吸取上清原液及其 10^{-1} 、 10^{-2} 稀释液0.05ml,置MW^[1]培养基平板上,用刮棒涂匀,28℃培养5~6d,挑取具有土壤杆菌特征的单菌落,再在MW平板上划线纯化三次,挑取单菌落移入YMA^[1]斜面培养,冰箱保存。

1.3 致病性试验

采用向日葵幼苗接种法测定,即将盆栽生长的健壮向日葵幼苗,待茎长20~30mm时用针刺法涂抹接种新鲜培养的测定菌菌苔,每株菌接种3~5株苗,接种后保持一定温湿度,10~20d观察记录致病结果。

1.4 质粒类型测定

根据根癌土壤杆菌诱导形成的冠瘿瘤中所合成的冠瘿碱(opine)类型确定不同根癌土壤杆菌Ti质粒的类型,本研究采用Otten电泳法^[2],取向日葵茎上生长约20d的冠瘿瘤1~2g,置小塑料离心管内,压出液汁,离心。上清液用毛细管点在新华3号滤纸上,吹干,同时以胭脂碱、章鱼碱和精氨酸标准品作对照。在甲酸:乙酸:水(5:15:80)溶剂中电泳1~2h,电压400V,晾干滤纸,再用菲醌-乙醇液染色,在紫外光检测仪下观察出现的荧光斑点,照相。

1.5 生理生化试验

按过去报道的方法进行菌系的鉴别,包括下列几项:在选择性培养基上生长;3-酮葡萄糖苷产生;生长温度的反应;石蕊牛奶反应;2%NaCl生长;从赤鲜糖醇、乙醇、松三糖产酸;从丙二酸等盐产碱等^[1,3~5]。

1.6 根癌土壤杆菌对土壤杆菌素84敏感性的测定

参照Stonier法^[6],将活化的K84菌株点种在含产素培养基的平皿上(产素培养基:葡萄糖5g,谷氨酸钠3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, 硫胺素(B_1)5mg,生物素100 μg , K_2HPO_4 3g, NaH_2PO_4 1g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g, 柠檬酸钠2g, 硫酸亚铁5mg, 琼脂10g, 水1000ml, 112℃灭菌30min。每皿接种3个点,28℃培养3~4d,用氯仿蒸气杀死生长的K84菌株。另外,在小试管中加入0.2ml无菌水,加入一小环在YMA斜面上培养48h的致瘤土壤杆菌,混合均匀,再倒入3ml溶化后冷到50℃的软YEB琼脂^[1],迅速混合,立即倒入上述培养皿内,使覆盖成均匀的薄层,28℃培养16~24h,观察抑制圈的出现。

2 结果

2.1 根癌土壤杆菌的分离

典型的根癌土壤杆菌菌落呈圆形凸起，灰白色有光泽，有胞外多糖粘液。将每份瘤样品在皿上出现的代表菌落挑出，共有 115 株，再经三次单菌落纯化后，再接种向日葵幼苗进行致病性试验，结果有 46 株菌能使向日葵致瘤(图 1)，确定它们是根癌土壤杆菌。其中来自山东的有 13 株(编号为 A、B、CY、D、Y)，来自河北的有 19 株(编号为 CC 和 CS)，来自辽宁的有 14 株(编号为 BC)。

2.2 Ti 质粒类型的鉴别

纸电泳结果观察到所有瘤均为合成胭脂碱(nopaline)，没有发现章鱼碱(octopine)和农杆菌(agropine)存在(图 2)。由此说明，樱桃上 46 株根癌土壤杆菌菌株均是胭脂碱型 Ti 质

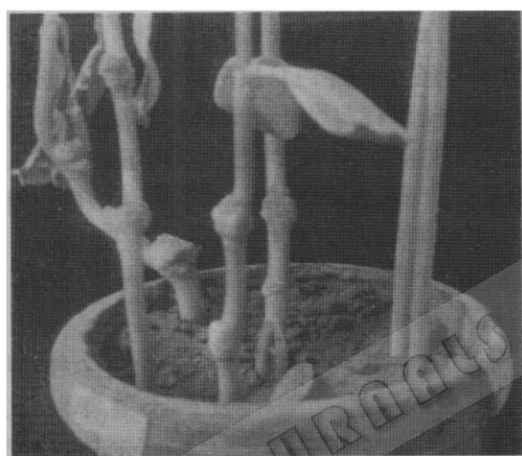


图 1 樱桃根癌土壤杆菌对向日葵幼苗的致瘤作用

1. 接种(菌株 CY1); 2. 对照。

Fig.1 Pathogenicities of *Agrobacterium* strains from cherry

1. Inoculated (strain CY1); 2. CK.

粒类型。

2.3 菌株鉴定

对 46 株向日葵致瘤的土壤杆菌进行了生理生化试验，并按照 Sawada 等人^[5]提出的土壤杆菌属及其种的分类系统及 Bouzar^[7]提出的修正方案进行鉴定。其中有 42 株能在 New-Kerr 选择性培养基上生长，不利用乳糖产生 3-酮葡萄糖苷，石蕊牛乳产酸，在 2%NaCl 或 35℃ 温度下不生长，能利用赤藓糖醇产酸，丙二酸盐和粘酸产碱，它们属于生物型 2(biotype 2)类群，按新分类系统定名为 *A. rhizogenes*，这些菌株有 A1, A2, B1, B3, B4, B5, BC1-2, BC2-2, BC10-1, BC14-1, BC16-1, BC17-1, BC18-1, BC34-2, BC37-2, BC40-1, BC44-1, BC50-1, BC61, BC66, CC2-1, CC2-2, CC2-3, CC3-2,

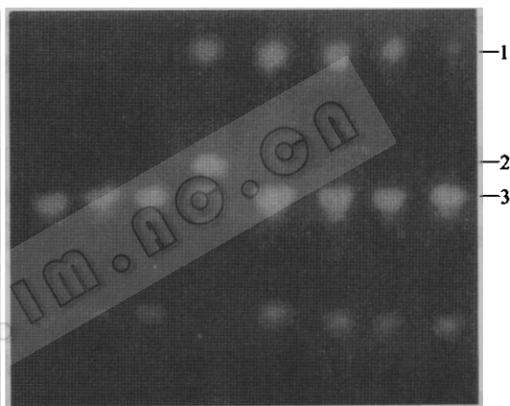


图 2 樱桃根癌土壤杆菌诱导的冠瘿瘤中冠瘿碱的纸电泳分析

左起: CY4, CY31, CY32, 标准样品, A1, B1, BC16-1, D2.

1. 精氨酸; 2. 章鱼碱; 3. 胭脂碱。

Fig.2 Paper electrophoreses of opines

Left to right: CY4, CY31, CY32, standard sample, A1, B1, BC16-1, D2.

1. Arginine; 2. Octopine; 3. Nopaline.

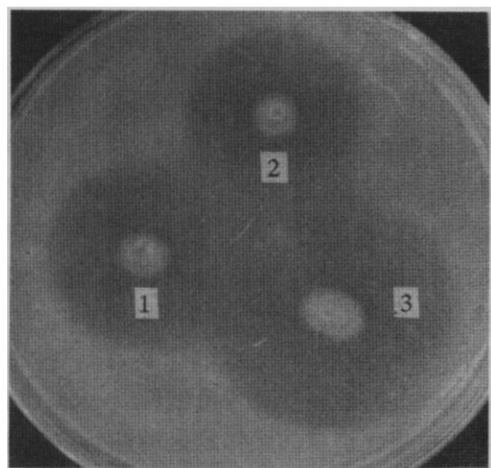


图3 樱桃根癌土壤杆菌对土壤杆菌素 84 的敏感性

Fig.3 Sensitivities of *Agrobacterium* strains to agrocin 84

1. CY1; 2. CY4; 3. BC2-2.

素 84 敏感性试验,观察到所有测试菌株在 K84 菌株接种点附近均出现有明显的抑制区(图 3),抑菌圈直径为 15~40mm,证明放射土壤杆菌 K84 菌株能明显抑制樱桃根癌土壤杆菌的生长。

3 讨论

关于土壤杆菌属中各个种的命名一直存有异议,也较为混乱,过去是分为 4 个种,即根癌土壤杆菌(*A. tumefaciens*),放射土壤杆菌(*A. radiobacter*),发根土壤杆菌(*A. rhizogenes*)和悬钩子土壤杆菌(*A. rubi*)^[8],种以下又分为不同生物型(biotype)或生物变种(biovar)。当时土壤杆菌属下种的划分主要依据土壤杆菌对植物的致病性和症状的特征,如根癌土壤杆菌在寄主植物上形成肿瘤,发根土壤杆菌则形成毛根,放射土壤杆菌是不致病的,而这些菌的致病性是由其所含的质粒(Ti 或 Ri)控制的,该质粒能通过种间接转移自行丢失或得到,因此致病性这一不稳定性状作为土壤杆菌属下种的分类依据是不合理的。1990 年 Ophel 和 Kerr^[4]提出将来自葡萄的属于生物 3 型的 *A. tumefaciens* 的菌株定为一个新种,称为葡萄根癌土壤杆菌(*A. vitis*),已得到公认。1993 年 Sawada 等人^[5]对土壤杆菌属代表菌株的 16s rRNA 进行了全序列测定及系统发育的分析,进一步对土壤杆菌的分类进行了修正,即本属中的原生物 1 型菌株定名为 *A. radiobacter*,生物 2 型菌株定名为 *A. rhizogenes*,取消众所周知的 *A. tumefaciens* 种名,把 *A. radiobacter* 作为本属的模式菌株。1994 年 Bouzar^[7]又对上述定名提出修正意见,认为本属的模式菌种应为 *A. tumefaciens*。据此,本研究采用 Sawada 和 Bouzar 所提出的分类方法,土壤杆菌属的四个种是: *A. tumefaciens* (原生物 1 型菌株), *A. rhizogenes* (原生物 2 型菌株), *A. vitis* (原生物 3 型菌株)和 *A. rubi* (只在悬钩子发现)。

用 K84 菌株生物防治根癌病的效果与根癌菌的类型有密切关系,因此应广泛深入查明防治对象是由什么类型的根癌土壤杆菌所引起的。所得到的 46 株根癌土壤杆菌绝大部

CC6-2, CC13-2, CC16-2, CC16-3, CC19-2, CC24-1, CC26, CS1-2, CS1-4, CS1-8, CS1-16, CS2-1, CS3-17, CS4-12, CY1, D2, D4, Y5-1。其他 4 株菌株(CY4, CY31, CY32, CY33)的主要特征是在 Schroth 选择性培养基上生长,从乳糖产生 3-酮葡萄糖苷,石蕊牛乳产碱,能在 2%NaCl 或 35℃ 温度下生长等,属于生物型 1(biotype 1)类群,按新分类系统定名为 *A. tumefaciens*。由此可见,本研究所采集的樱桃根癌中致瘤的土壤杆菌以 *A. rhizogenes*(生物型 2)占绝大多数。

2.4 对土壤杆菌素 84 的敏感性

经 Stonier 的双层平皿法测定 46 株致瘤的土壤杆菌对 K84 菌株产生的土壤杆菌

分属于 *A. rhizogenes*, 全部为胭脂碱型 Ti 质粒菌株, 对放射土壤杆菌 K84 产生的土壤杆菌素敏感, 这与国外报道的结果相符。由此看来, 大樱桃根癌病用 K84 菌株进行防治应该是有效的。

参 考 文 献

- [1] 马德钦, 林应锐, 周 娟等. 微生物学报, 1985, 25(1):45~53.
- [2] Otten L A B M, Schilperoort R A.. *Biochem Biophys Acta*, 1978, 527:497~500.
- [3] Moore L M, Anderson A, Kado C I. 土壤杆菌属(*Agrobacterium*). 见: Schaad N W 著(张克勤译). 植物病原细菌鉴定实验指导. 贵阳: 贵州人民出版社, 1986.28~43.
- [4] Ophel K, Kerr A. *Int J Syst Bacteriol*, 1990, 40:236~241.
- [5] Sawada H, Ieki H, Ogaizu H *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1993, 43(4):694~702.
- [6] Stonier T. *J Bacteriol*, 1960, 79:889~898.
- [7] Bouzar H. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44(2):373~374.
- [8] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A *et al.* *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Vol 1. Baltimore: The Williams and Wilkins Co, 1994. 74~130.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *AGROBACTERIUM* SPP. FROM CHERRY CROWN GALLS AND THEIR SENSITIVITIES TO AGROCIN 84

Wang Huimin Sui Xinhua Li Jianqiang

(Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Dai Xiuyu Ma Deqin

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080)

Abstract Crown galls were sampled from cherry yards of Shandong, Hebei, and Liaoning provinces. 46 pathogenic strains were isolated. Physiological and biochemical tests revealed that 4 strains were *Agrobacterium tumefaciens*(bio.1) and that the other 42 strains were *A. rhizogenes* (bio. 2), according to the classifications and nomenclatures of the genus *Agrobacterium* and the species revised by Sawada *et al* and Bouzar. The Ti plasmids of all strains were nopaline type. All strains were sensitive to agrocin 84, which suggested that crown gall disease of cherry could be controlled by K84 strain.

Key words *Agrobacterium* spp., Cherry, Ti plasmid, Agrocin 84