

# 日本樱花根癌病病原菌的鉴定及其防治

倪大炜 沈 杰

张炳欣

(浙江省森林病虫害防治检疫站 杭州 310004)

(浙江农业大学植保系 杭州 310029)

**摘要** 从浙江省的慈溪、奉化、嵊州等地的日本樱花苗圃内,采集到具有典型症状的日本樱花根癌病植株。经分离纯化及在指示植物番茄、向日葵幼苗的致病性测定,共分离到致病性病原菌株 11 株,经形态学、生理生化学特征鉴定及菌体可溶性蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,确定引起日本樱花根癌病的病原细菌为根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)生物型 1,经平皿拮抗和盆栽试验表明,生防菌 K84 能够明显抑制致病菌株的致癌能力。

**关键词** 日本樱花,根癌病,根癌土壤杆菌

**分类号** S432.6 **文献标识码** B **文章编号** ISSN-0253-2654(1999)-01-11-14

## IDENTIFICATION OF PLANT PATHOGENIC BACTERIUM FROM CROWN GALL OF JAPANESE CHERRY (*PRUNUS XYROLOEUSIS*) AND CONTROL TECHNOLOGY

Ni Dawei, Sheng Jie

(The Forest pest control and quarantine station of Zhejiang province, Hangzhou 310004)

Zhang Bingxin

(Department of plant protection of Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, 310029)

**Abstract** 11 plant pathogenic strains were isolated from the crown gall of Japanese cherry (*Prunus xyroloensis*) in Japanese cherry growing areas, such as Chixing, fenhua and Shenzhou counties of Zhejiang province. Ten of them were identified as *Agrobacterium tumefaciens* biotype 1 based on their morphological, physiological and biochemical characterizations and bacterial protein SDS-PAGE test. The plate antagonistic assay and the pot biocontrol test indicated that the isolated strains of *A. tumefaciens* biotype 1 were sensitive to the well-known antagonistic bacterium, K84 strain. The K84 strain could inhibit the tumor production by the pathogenic strains.

**Key words** Japanese cherry, Crown gall, *A. tumefaciens*

日本樱花(*Prunus xyroloensis*)又名东京樱花、樱花,原产日本,为一著名的观花乔木。每年日本樱花树苗进入我国境内的数量逐年上升,随之而来的便是检疫性病虫害的传入,其中就有日本樱花根癌病<sup>[1,2]</sup>。据调查,近年来该病在浙江省重点花木产地慈溪、奉化、嵊州等地的日本樱花苗圃内时有发生,并严重影响到蔷薇

科花卉如月季、玫瑰等的正常生长,给当地花农造成极大的经济损失<sup>[3]</sup>。本文将日本樱花根癌病作为研究对象,拟对引起该病病原菌进行鉴定,并提出相应有效的防治方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料的分离和收集

在浙江省慈溪、奉化、嵊州等地的苗圃内,采集到发生根癌病的日本樱花病植株5株,运用MW选择性培养基,从9个冠瘿组织及其根围土壤中分离病原细菌。挑选在MW培养基上菌落为圆型凸起、半透明、稍带粘性的目标菌落在YEM、NA培养基上进行纯化。所有试验菌株均针刺接种于番茄、向日葵幼苗以证明其的致病性<sup>[4]</sup>。

标准菌株由国家动植物检疫局和上海农科院植保所提供,分别为*A. tumefaciens* 1/1/4、1/1/9,生物型1;*A. radiobacter* K84,生物型2;*A. tumefaciens* 1/1/7、1/1/11,生物型3。

### 1.2 试验菌株的形态和培养性状<sup>[5]</sup>

试验菌株菌体细胞形态特征采用负染法,在电镜下观察,革兰氏染色、在NA、D-1、KB培养基上的培养形状、好氧性试验、芽孢形成及产生H<sub>2</sub>S试验等项目按照常规方法操作。

### 1.3 生理生化试验<sup>[6]</sup>

主要生理生化试验方法按Kerr and Panagopoulos 鉴定生物型的标准和方法进行。主要测定项目有:35℃生长,耐盐性生长,产3-酮基乳糖,从赤藓糖、松三糖、纤维二糖、D-乳糖、乙醇产酸,从丙二酸钠、酒石酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠产碱等项目。所有测定都在28℃恒温箱中进行。

### 1.4 试验菌株的蛋白电泳<sup>[7]</sup>

用试验菌株与标准菌株共同进行菌体全细胞可溶性蛋白的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。可溶性蛋白的提取方法基本参照Kerster, SDS-PAGE电泳时所需的试剂及操作步骤均参考常规方法染色和脱色。

### 1.5 生防菌*A. radiobacter* K84对试验菌株的防治效果试验

1.5.1 K84对试验菌株的拮抗试验:将250mlMW培养基灭菌冷却至45~50℃时,加入1.0ml试验菌株菌悬液(10<sup>9</sup>~10<sup>10</sup>个/ml)混匀,制成平板后,将生防菌K84点接在MW培养基

中央(重复三次),48h后测量抑菌圈直径。

1.5.2 盆栽试验:分别将生防菌K84与试验菌株制成10<sup>9</sup>~10<sup>10</sup>个/ml菌悬液,然后将试验菌株与K84以1:1及1:2的比例混匀,注射接种在向日葵幼苗茎部(重复三次),并以无菌生理水为空白对照。接种7d后开始观察结果。

## 2 结果

### 2.1 形态和培养形状

从具有典型症状的日本樱花病株的根围土、根部和分枝的冠瘿组织中分离病原细菌,经对指示植物(向日葵、番茄)幼苗的致病性试验,共得到11株病原菌株,其中5株菌株来自根部的冠瘿组织,3株菌株来自根围土壤中,3株菌株来自分枝的冠瘿组织中。

试验表明具有致病性的11株试验菌株都是革兰氏阴性,在YDC、NA培养基上产生圆形、光滑、有光泽、边缘整齐的白色菌落,KB培养基上不产生荧光,严格好氧,不产生芽孢,菌体细胞杆状,大小为1.60~2.30×0.5~0.67μm,周生鞭毛1~4根。

### 2.2 生理生化反应

11株试验菌株生理生化反应测定结果表明,不同来源的10株菌株反应一致,与标准菌株1/1/4、1/1/9的生理生化特征表现相似,在下列特征中表现为阳性:35℃生长,2%NaCl耐盐性生长,产3-酮基乳糖,柠檬酸铁铵产褐色表膜,氧化酶的产生,石蕊牛奶的反应,从松三糖、纤维二糖、D-乳糖、乙醇产酸,从乙酸盐产碱。而在利用L-酪氨酸,从赤藓糖产酸,利用丙二酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐产碱的反应中呈阴性。而试验菌株AT-17的生理生化特性与其余的试验菌株不同,与标准菌株K84的特性部分相似,两者不同之处在于:AT-17菌株能在柠檬酸铁铵试验中产生部分褐色表膜,能利用D-乳糖,部分利用纤维二糖,不利用酒石酸盐产碱,在YEM培养基上生长不良,在改良523斜面上菌苔粘性较强,呈黄绿色。

### 2.3 蛋白电泳

选用4株试验菌株和标准菌株进行菌体全

表1 K84菌株抑制试验菌株对指示植物(向日葵)致癌能力的试验

菌株	AS-14		AS-14		AT-13		AT-13		AT-19		对照 (无菌水)
	AS-14	+K84 (1:1)	+K84 (1:2)	AT-13	+K84 (1:1)	+K84 (1:2)	AT-19	+K84 (1:1)	+K84 (1:2)		
最大瘤 直径(mm)	9.72	4.42	4.01	10.80	8.12	3.84	8.84	6.78	5.00	1.80	
最大瘤* 鲜重(g)	4.38	2.91	1.91	6.29	3.79	3.01	5.70	3.34	2.40	0.81	

\*主茎长度10mm

细胞可溶性蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)。根据蛋白电泳条带(图1)分析,可见试验菌株 AS-14、AR-14、AT-19与标准菌株 1/1/4(生物型 1)具有相似的基本条带。而试验菌株 AT-17与标准菌株 K84 的蛋白谱带存在部分差异。标准菌株 1/1/11(生物型 3)与其余

试验菌株存在较大差异,这与生理生化反应结果相一致。

### 2.4 生防菌 K84 对试验菌株的防治效果试验

将具有致病性的 11 株试验菌株与生防菌 K84 进行平板拮抗试验,测定菌株 K84 对试验菌株的拮抗效果。结果表明,生防菌 K84 对 10 株试验菌株有明显的拮抗效果,抑菌圈在 9~19mm,仅菌株 AT-17 对 K84 不敏感。根据盆栽试验(表 1)结果,生防菌 K84 与测定的试验菌株分别按一定的比例混合后接种向日葵幼苗,试验菌株的致癌能力明显减弱,产生的癌瘤明显缩小,瘤的鲜重显著下降,而且产生癌瘤的时间推后 7~10d。表 1 中还表明,生防菌 K84 与试验菌株的比例以 2:1 的效果好于 1:1,但相互间的差异并不明显。

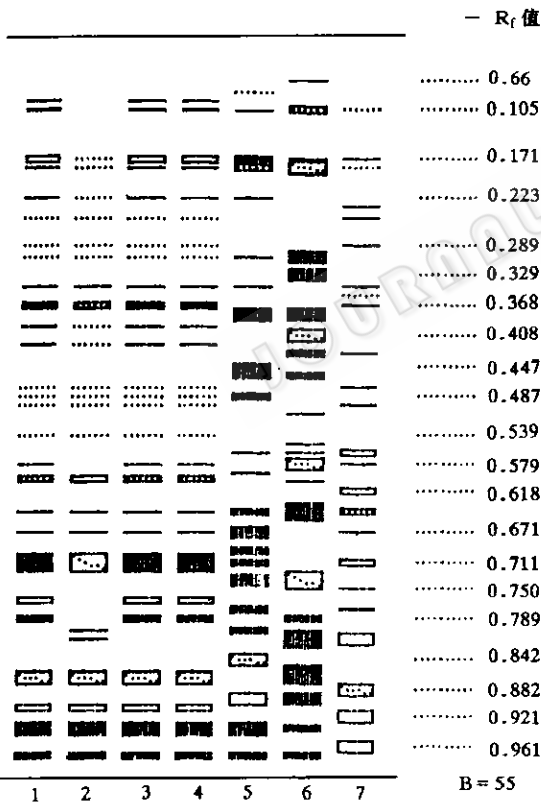


图1 日本樱花根癌土壤杆菌的全细胞可溶性蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

1. 标准菌株 1/1/4(生物型 1), 2. 可疑菌株 AR-14, 3. 可疑菌株 AS-14, 4. 可疑菌株 AT-19, 5. 标准菌株 K84(生物型 2), 6. 可疑菌株 AT-17, 7. 标准菌株 1/1/11(生物型 3)

## 3 讨论

### 3.1 日本樱花根癌病原细菌的鉴定

随着日本樱花种苗的进口,日本樱花根癌病的截获情况时有报道,在北京、内蒙、浙江等地的苗圃内也有所发生,给当地苗木生产造成较大的经济损失<sup>[1,2]</sup>。由于根癌土壤杆菌寄生范围广,给果树、花卉造成危害大。因此,根癌病是一种应该控制的危险性病害。本文从浙江省的重点花卉生产地区采集到的日本樱花根癌病植株中,共分离到具有致病性的病原细菌菌株 11 株,经形态学观察、生理生化反应及菌体蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 的测定,对照《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[8]</sup>和 Kerr and Panagopoulos<sup>[6]</sup>区别生物型的标准,结果引起日本樱花根癌病的病原细菌主要为 A.

*tumefaciens* 生物型 1, 未分离到生物型 3 的 *A. tumefaciens*。Xie Xuemei 等 (1994) 报道引起日本樱花根癌病的病原细菌主要为 *A. tumefaciens* 生物型 2, 少量是生物型 1<sup>[2]</sup>, 这说明根癌土壤杆菌生物型 1 和 2 能引起日本樱花根癌病的发生。至于病原细菌不同生物型在不同地区出现频率差异的原因, 还有待于进一步研究。菌株 AT-17 的生理生化特征与生物型 2 的 K84 存在部分差异, 它的分类地位有待于进一步研究。

### 3.2 日本樱花根癌病的防治措施

根癌土壤杆菌 *A. tumefaciens* 所引起的根癌病对农业生产尤其是果树生产造成了极大损失, 引起各国植病学家对该病的高度重视。1972 年 Kerr 首次在澳大利亚报道利用 *A. radiobacter* K84 菌株可以有效地防治核果类果树和玫瑰根癌病的发生<sup>[9]</sup>。国内也有人成功地将 K84 菌株用于桃、苹果、啤酒花等植物上根癌病的防治, 效果较为明显<sup>[1]</sup>。本文通过平板拮抗试验和盆栽试验表明, *A. radiobacter* K84 菌株能有效地抑制引起日本樱花根癌病 *A.*

*tumefaciens* 生物型 1 的致癌能力。但拮抗菌 K84 如何在日本樱花根部定殖及处理的最佳时间、浓度, 还有待于进一步的研究和论证。

### 参 考 文 献

- [1] 马德钦, 张洪胜, 梁卫东. 微生物学通报, 1995, 22(4): 238~242.
- [2] Xie Xuemei, You Jifeng. Plant pathology and biotechnology, in: Proceedings of 2nd Hangzhou International Symposium on Plant Pathology, 1994, 124.
- [3] 沈 杰, 杨牡丹, 王琼瑜等. 植物检疫, 1998, 12(2): 98~100
- [4] 任欣正, 罗灿辉, 杨国平等. 植物病理学报, 1990, 20(3): 195~200.
- [5] Shaad N W. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacterial (2nd ed.), APS press, 1988.
- [6] Kerr A, Panagopoulos C G. Phytopath Z, 1977, 90: 172~179.
- [7] Kersters K. Methods in phytobacteriology, Klement Z et al. ed, Akademiai Kiado press, 1990, 191~198.
- [8] R E 布坎南, NE 吉本斯等编, 伯杰氏细菌鉴定手册 (第八版): 北京: 科学出版社 1984, 345~348.
- [9] Kerr A. Plant Disease, 1980, 64(1): 25~30.