

土壤杆菌 K1026 对樱桃冠瘿病病原菌的抑制作用及田间防治效果

魏艳丽¹, Ryder Maarten², 李纪顺¹, 扈进冬¹,
李红梅¹, 李金萍³, 杨合同^{1*}

(1. 山东省科学院生态研究所, 山东省应用微生物重点实验室, 济南 250014;
2. 澳大利亚阿德莱德大学农业食品葡萄酒学院, 阿德莱德 5064; 3. 山东省科学院, 济南 250014)

摘要 由致病性根癌土壤杆菌 *Agrobacterium* spp. 侵染引起的根癌病对樱桃等果树生产造成严重的影响。利用双层平板、胡萝卜圆盘法和接种指示植物番茄等方法验证了澳洲生防菌株 K1026 对 2 种不同原生物型樱桃冠瘿病病原菌的抑制作用;检测了不同接种时间对病原菌侵染产生瘤状组织的影响,结果显示提前或者在病原菌接种后 20 h 内接种 K1026 可抑制胡萝卜产生瘤状组织;研究了 K1026 对大樱桃根癌病的作用机制是产生土壤杆菌素和竞争附着位点;田间试验表明 K1026 蘸根处理,对‘中国樱桃’株系冠瘿病的防治效果达 81.61%,使发病率降低至 18.13%。

关键词 冠瘿病; 土壤杆菌 K1026; 土壤杆菌素; 生物防治; 田间试验

中图分类号: S 436.629 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.05.007

Suppression of the pathogen of cherry crown gall disease by *Agrobacterium rhizogenes* K1026 and its control effects in the field

Wei Yanli¹, Ryder Maarten², Li Jishun¹, Hu Jindong¹,
Li Hongmei¹, Li Jinping³, Yang Hetong¹

(1. Institute of Ecology, Shandong Academy of Sciences, Shandong Provincial Key Laboratory of Applied Microbiology, Ji'nan 250014, China; 2. School of Agriculture, Food and Wine, University of Adelaide, Adelaide 5064, Australia; 3. Shandong Academy of Sciences, Ji'nan 250014, China)

Abstract Crown gall, caused by pathogenic *Agrobacterium* spp., is a serious problem in the production of cherry. *Agrobacterium rhizogenes* strain K1026 was introduced from Australia, and has shown a high efficiency in bio-control of crown gall disease. This research verified the control action of K1026 against two different species (biovars) of crown gall pathogens by three different methods: double layer inhibition test on agar medium, carrot root disc bioassay and tomato stem inoculation. In addition, this study reported the effect of different K1026 inoculation times on tumour formation by pathogenic strains in the carrot disc bioassay. The results showed that K1026 could inhibit the generation of tumor tissues on carrot discs when inoculated up to 24 h after addition of the pathogen. The mechanisms of action of K1026 included the production of agrocin antibiotics (agrocin 84 and agrocin 434) and competition for adsorption and infection sites on the plant tissue. In field trials, strain K1026 demonstrated a mean inhibition of crown gall disease of cherry rootstock ‘Chinese Cherry’ of up to 81.61%, and the incidence of crown gall disease dropped substantially to 18.13%. These results suggest that *A. rhizogenes* K1026 can be used for biocontrol of cherry crown gall disease in the field in China.

Key words crown gall disease; *Agrobacterium rhizogenes* K1026; agrocin; biological control; field trial

植物冠瘿病又称为根癌病,是由根癌土壤杆菌 *Agrobacterium* spp. 引起的一种细菌性病害^[1],其

寄主范围广,达 59 科 142 属 300 余种,可危害核果类、浆果类、梨果类、坚果类等果树及观赏植物根茎

收稿日期: 2017-02-06

修订日期: 2017-03-08

基金项目: 山东省重点研发计划(2016GNC113010);山东省外专局“智惠山东”外国专家项目

* 通信作者 E-mail: yanght@sdas.org

部,使植株地上部分发育受阻,直接影响果树生产,造成重大经济损失^[2]。

引起植物根癌病的病原菌主要有 *A. tumefaciens*(原生物 I 型),*A. rhizogenes*(原生物 II 型),*A. vitis*(原生物 III 型),根据它们 Ti 质粒产生的生物碱类型又可以分为胭脂碱型、章鱼碱型和土壤杆菌素碱型等三种类型^[3]。植物根癌病的生物防治与病原菌的种类和 Ti 质粒类型密切相关,生防菌产生有抑菌活性的土壤杆菌素是它的作用机制之一,但并不是唯一的^[4]。如生防菌 *Agrobacterium rhizogenes* K1026 可产生土壤杆菌素 A84 和 A434^[4],可以抑制多种致病性土壤杆菌,但对引起葡萄根癌病的原生物 III 型病原菌并没有抑制作用。鉴于引起植物根癌病的病原菌复杂的致病和生防机制,目前已对重要的寄主植物,如葡萄、樱花、树莓^[5]、樱桃、桃树的病原菌类型进行调查并分离获得了相应的生防菌株。

樱桃 *Cerasus pseudocerasus* 是山东泰安地区的主栽果树之一,根癌病对其生长造成严重的影响,部分苗圃的发病率接近 100%。在前期研究中,本研究室发现引起山东泰安地区食用大樱桃根癌病的病原菌主要为原生物 I 型和 II 型,Ti 质粒类型为胭脂碱型。本文研究了遗传工程菌 *A. rhizogenes* K1026 菌株对大樱桃不同原生物类型病原菌的抑制作用,及存在的可能生防机制,并通过田间试验进行验证,为生防菌株 K1026 在山东泰安地区的应用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 供试菌株及植物

1.1.1 供试菌株

生物防治菌株 K1026 由澳大利亚阿德莱德大学 Ryder Maarten 教授提供,属于非致病性发根土壤杆菌 *Agrobacterium rhizogenes*。

病原菌 C31-32 由本实验室分离自食用大樱桃根癌组织,属胭脂碱型 Ti 质粒,原生物 I 型土壤杆菌 *A. tumefaciens*。

病原菌 C31-8 由本实验室分离自食用大樱桃根癌组织,属胭脂碱型 Ti 质粒,原生物 II 型土壤杆菌 *A. rhizogenes*。

1.1.2 供试植物

供试胡萝卜根茎购买自菜市场,品种为‘春红二号’;供试番茄品种为‘佳粉 15 号’;田间试验所用的一年生樱桃苗木为‘中国樱桃’株系。

1.2 培养基

YMA 培养基:K₂HPO₄ 0.5 g/L、CaCl₂ 0.2 g/L、NaCl 0.2 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/L、酵母浸粉 1 g/L、甘露醇 10 g/L、微量元素(1 000×)2 mL,蒸馏水定容至 1 000 mL,pH 7.2~7.4,琼脂 15 g,121℃ 灭菌 20 min 后备用。其中微量元素(1 000×)的配方为:FeCl₃ 5 g/L、MnCl₂ 0.1 g/L、ZnCl₂ 0.5 g/L。

产素培养基(Stonier's 培养基)^[6]:CaSO₄ · 2H₂O 0.1 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g、NaCl 0.2 g、NH₄NO₃ 2.7 g、柠檬酸钾 10 g、谷氨酸钠 2 g、NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.3 g、K₂HPO₄ · 3H₂O 1.15 g、YMA 培养基中微量元素(1 000×)1 mL、蒸馏水定容至 1 000 mL,调整 pH 7.2,琼脂 15 g,121℃ 灭菌 20 min,倒平板前加入抽滤灭菌的生物素,使终浓度达到 0.2 mg/L。

1.3 方法

1.3.1 平板法检测 K1026 产生的土壤杆菌素对樱桃根癌病原菌的抑制作用

参照 Stonier 的方法^[6],将活化的 K1026 菌株点接在产素培养基平皿中心,28℃ 培养 2 d 后用灭菌棉棒拭去菌苔,用三氯甲烷熏蒸 5 min,杀死生长的 K1026 菌株。

挑取 YMA 平板上培养 24 h 的病原菌 C31-8 和 C31-32,分别用无菌水制备成 OD₆₀₀ = 0.3 左右的菌悬液,取 1 mL 与 4 mL 含 0.6% 琼脂的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液充分混匀后,倾倒至上述培养皿内,使覆盖成均匀的薄层,每个病原菌重复 3 次,置 28℃ 培养 3~7 d,观察抑制圈的出现情况。

1.3.2 胡萝卜圆盘法检测 K1026 对樱桃根癌病原菌的抑制作用

选择新鲜、无损伤的胡萝卜根茎,用自来水清洗干净,用 70% 乙醇擦洗后火焰干燥,横切成 5 mm 厚的圆片,用干净的手术刀片切除胡萝卜圆片外周部分,放在铺有水琼脂的培养皿内,靠近根端的一面朝上。

挑取在 YMA 培养基上生长 24 h 的病原菌 C31-8、C31-32 和生防菌 K1026,分别用无菌水制备成 OD₆₀₀ = 0.3 左右的菌悬液,各吸取 30 μL 涂于胡萝卜圆盘上。设 4 个处理,分别为单独接种病原菌,病原菌和 K1026 菌悬液按 1:5 的体积比例混合后接种。每个处理重复接种 2~3 个胡萝卜片,同时设无菌水对照,25℃ 保湿两周左右观察结果。

1.3.3 番茄接种 K1026 对根癌病原菌 C31-8 的抑制作用

取生长 50 d 左右的健康番茄植株,利用针刺法

接种,每株番茄各取 3 个不同的分枝进行处理。先用 75%乙醇表面消毒,用无菌注射针头轻刺番茄茎部 10 针左右,造成微小创伤。将分别在 YMA 培养基上生长 24 h 的病原菌 C31-8 和生防菌 K1026,用无菌水制备成 $OD_{600}=0.3$ 左右的菌悬液,用无菌棉蘸取菌悬浮液包裹于创伤处 48 h,设 3 个处理,分别为只接种病原菌,病原菌和生防菌 K1026 菌悬液按 1:5 的体积比例混合后接种,以及无菌水对照。每个分枝连续处理 5 个点作为重复,21 d 后调查创伤处根癌组织的产生情况。

1.3.4 不同接种时间对病原菌瘤状组织产生的影响

利用胡萝卜切片法检测,挑取分别在 YMA 培养基上生长 24 h 的病原菌和生防菌 K1026,用无菌水制备成 $OD_{600}=0.3$ 左右的菌悬液,分别于病原菌接种前 2 h、接种后 0、12、24、36、48、72 h 接种。每片胡萝卜接种病原菌悬液 20 μL ,接种新鲜制备的 K1026 菌悬液 40 μL ,每个处理设 3 个重复。26℃ 保湿培养 2 周,小心切下瘤状组织并称重。

1.3.5 生防菌株 K1026 对中国樱桃冠瘿病田间防治试验

田间试验于 2016 年 3 月 21 日至 11 月 30 日在山东省泰安市岱岳区樱桃育苗地进行,土壤类型为棕壤,pH 6.34,经检测土壤中总氮、磷、钾和有机质的含量分别为 1.35、1.24、1.9 和 22.4 g/kg。试验地块有连续 5 年的‘中国樱桃’育苗史,冠瘿病发病 4 年,试验在严重发病地块进行。用无菌水洗下在 YMA 培养基上生长 24~48 h 的生防菌 K1026,与无菌草炭充分混匀,调整有效活菌数 2×10^9 cfu/g,制备成 K1026 草炭制剂。试验设 K1026 草炭制剂和清水对照 2 种处理,小区面积 4.5 m^2 ,每小区定植 15 株樱桃苗,每处理重复 8 次,随机区组排列。

试验用苗为‘中国樱桃’一年生健康实生苗,处理前修剪根部,造成伤口利于土壤杆菌侵染,采用蘸根法。用纯净水将 K1026 草炭制剂 100 g 稀释至 5 L,将根部分别浸入 K1026 溶液和清水中 30 s,按株行距 40 cm 定植于小区中,浇水,其他常规管理同大田。

11 月 30 日调查结果时首先统计各小区苗木成活率,然后小心挖出完整植株,用清水清洗干净后统计有根癌组织和没有根癌组织的苗木数量,最后用锋利的刀子取下根癌组织,再次清洗、晾干后称量根癌组织的重量。计算无瘤植株比率、平均每株瘤重和防治效果。

防治效果(%)=(对照平均每株瘤重-处理平

均每株瘤重)/对照平均每株瘤重 $\times 100$ 。

试验数据用 DPS 6.50 统计软件处理,并采用 LSD 法检测处理间差异显著性。

2 结果分析

2.1 生防菌 K1026 产生的土壤杆菌素对根癌病原菌的抑制作用

K1026 在产素培养基上培养 48 h 后可产生大量土壤杆菌素 A84^[7],抑制病原菌的生长,被测 2 株病原菌接种后均在 K1026 接种点附近产生明显的抑菌圈。C31-32 培养 24 h 后产生的抑菌圈直径范围为 55~60 mm,边缘清晰;而 C31-8 抑菌圈出现较晚,48 h 后才在 K1026 接种点附近观测到两个同心抑菌圈(图 1),一个直径约 40 mm 左右,边缘模糊,另一个直径大于 70 mm,边缘清晰。

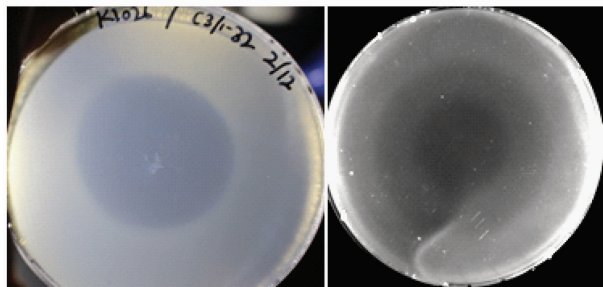


图 1 待测病原菌 C31-32(左)和 C31-8(右)对土壤杆菌素的敏感性

Fig. 1 Sensitivities of pathogenic agrobacteria C31-32(left) and C31-8(right) to agrocin production by K1026

2.2 K1026 对病原菌侵染产生瘤状组织的影响

胡萝卜切片接种病原菌 2 周后,在次生木质部周围均可以产生乳黄色的瘤状组织,而接种病原菌和生防菌 K1026 混合悬液的处理,则没有瘤状组织产生(图 2)。



a: 接种 C31-8; b: 接种 C31-8+K1026
a: Symptom after inoculation with C31-8; b: Symptom after inoculation with C31-8 and K1026

图 2 K1026 对病原菌侵染产生瘤状组织的影响

Fig. 2 Effects of K1026 on tumor tissues caused by pathogenic agrobacteria on carrot discs

以番茄为指示植物,检测生防菌株 K1026 对病原菌的抑制作用。结果显示,番茄茎部接种病原菌 C31-8,2 周后针刺部位肿大产生不规则瘤状组织;

病原菌和生防菌 K1026 混合接种,针刺部位与无菌水对照相比没有瘤状组织产生(图 3)。



a: 接种C31-8; b: 接种C31-8+K1026; c: 无菌水对照
a: Symptom after inoculation with C31-8; b: Symptom after inoculation with C31-8 and K1026; c: Water only

图 3 K1026 对病原菌侵染番茄茎引起的瘤状组织的影响

Fig. 3 Effects of K1026 on tumor tissues caused by pathogenic agrobacteria on tomato stems

2.3 K1026 不同接种时间对病原菌侵染产生瘤状组织的影响

接种 K1026 可显著减少瘤状组织的发生(表 1),与只接种病原菌 C31-32 的处理相比,提前接种 K1026 对瘤状组织减少率为 95.52%;同时接种生防菌和病原菌瘤状组织减少率为 89.22%。接种病原菌后再接种生防菌 K1026 也可影响瘤状组织的产生,但间隔时间越长胡萝卜切片产生的瘤状组织越多,即 K1026 对病原菌的抑制效果越低,间隔 48 h 后接种 K1026,瘤状组织减少率为 56.90%,说明 K1026 对冠瘿病的防治以预防为主,但也存在其他防治机制。

2.4 生防菌株 K1026 对‘中国樱桃’冠瘿病田间防治效果

K1026 对‘中国樱桃’一年生苗的田间防治试验分为 2 个处理,8 个重复。结果 K1026 蘸根处理后定植于含有病原菌的土壤中,8 个月后调查,无瘤健康植株比率提高至 81.87%(见图 4),冠瘿病发病率从 54.29%降低至 18.13%。

提前接种 K1026 也可减少瘤状组织大小,从而降低植株感病程度。与清水对照相比,瘤重减少率(即防治效果)可达 81.61%。

3 讨论

K1026 可产生土壤杆菌素 A84 和 A434,对于含有胭脂碱类型 Ti 质粒的土壤杆菌具有明显的抑制作用^[7]。本试验选用的两株病原菌分离自山东泰安大樱桃根癌组织,分属于原生物 I 型和 II 型,含有胭脂碱类型 Ti 质粒。通过双层平板、胡萝卜切片和接种指示植物番茄等 3 种不同的方法检测 K1026 对病原菌的抑制作用结果是一致的。证明 K1026 能明显抑制两株病原菌的生长,其抑制作用除产生土壤杆菌素外,还可以通过营养竞争和定殖侵染位点起作用。

利用 Stonier 的双层平板法 Pulawska 等^[8]测定了 409 株致瘤菌对土壤杆菌素 A84 的敏感性,发现约 41%的菌株可产生不同大小的抑菌圈。本试验的 2 株病原菌经测定也可产生两种不同形式的抑菌圈,C31-32 与模式菌株 C58 相似^[9],产生的抑菌圈直径约 55~60 mm,边缘清晰,推测是由于土壤杆菌

表 1 K1026 不同接种时间对胡萝卜瘤状组织产生的影响¹⁾

Table 1 Effects of K1026 inoculation time on tumour tissue formation by pathogenic *Agrobacterium* C31-32

处理时间/h Treatment time	平均瘤重/g Fresh weight of tumour per carrot	瘤状组织减少率/% Reduction of tumour tissue formation
-2	(0.006 5±0.002 5)d	95.52
0	(0.015 5±0.001 6)d	89.22
12	(0.024 0±0.001 4)c	83.35
24	(0.034 0±0.006 4)bc	76.36
48	(0.062 0±0.001 3)b	56.90
C31-32 only	(0.143 9±0.012 3)a	—

1) -2 表示接种病原菌前 2 h 接种生防菌 K1026; 0、12、24 和 48 分别表示病原菌接种后用生防菌处理的时间。同列数据后不同小写字母表示经 LSD 检验在 0.05 水平差异显著。
-2 represents pre-inoculation of K1026, 2 h before inoculation of the pathogen; 0, 12, 24 and 48 h are different times of addition of biocontrol bacteria K1026 after pathogen inoculation. Different letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level.

素 A84 的抑制作用;而 C31-8 可以产生两个同心抑菌圈,一个边缘清晰直径大于 60 mm,另一个直径为

40 mm 左右,边缘模糊,推测是由于 K1026 产生的土壤杆菌素 A434 的作用。

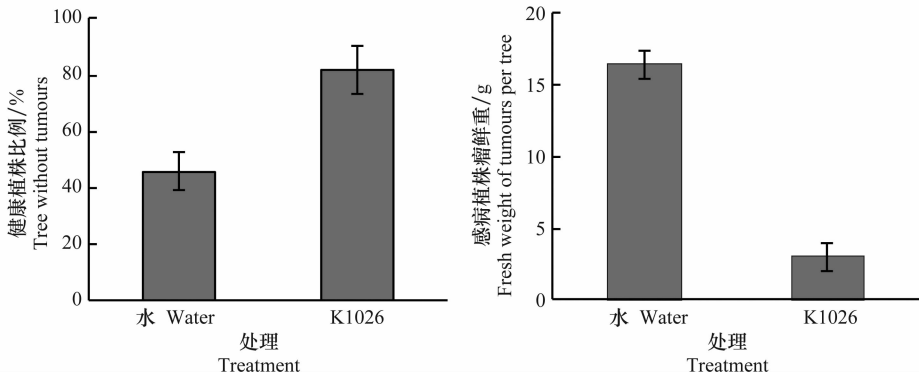


图 4 K1026 制剂对‘中国樱桃’冠瘿病结瘤及根癌组织大小的影响

Fig. 4 Inhibitory effects of K1026 on incidence of crown gall disease and fresh weight of tumours in ‘Chinese cherry’ rootstock in the field

土壤杆菌对受伤植株产生的分泌物有趋化性,致病菌可以附着到植物细胞表面,在伤口部位存活超过 16 h,将遗传信息片段导入植物创伤中,使正常的植物细胞转化成肿瘤细胞,进而形成冠瘿瘤^[10]。致病及无致病土壤杆菌互相竞争有限的附着位点,这种竞争作用是 K1026 的另一个生防机制。本试验研究了接种病原菌前后不同时间用 K1026 处理对病原菌的抑制作用,发现于接种病原菌前 2 h 和同时接种处理,瘤重减少率分别为 96.77%和 82.23%,接种病原菌 24 h 后再接种 K1026,防治效果急剧下降,其生防效果只能依靠产生的土壤杆菌素实现。

以上结果表明提前接种 K1026,可较好地抑制病原菌的侵染。因此,在田间试验过程中采取健康植株蘸根处理,通过修剪根系人为制造伤口,易于 K1026 进入植物组织,与致病菌竞争附着位点而达到 81.61%的防治效果,降低发病率至 18.13%。说明生防菌株 K1026 可用于樱桃等核果类果树根癌病的生物防治。

参考文献

[1] 李淑平,张福兴,孙庆田,等. 樱桃根癌病研究进展[J]. 烟台果树, 2010(2): 7-9.
[2] Kerr A. Biological control of crown gall [J]. Australasian Plant Pathology, 2016, 45(1): 15-18.
[3] Lindström K, Young J P W. International committee on sys-

tematics of prokaryotes subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61 (12): 3089-3093.
[4] Clare B G, Kerr A, Jones D A. Characteristics of the nopaline catabolic plasmid in *Agrobacterium* strains K84 and K1026 used for biological control of crown gall disease [J]. Plasmid, 1990, 23(2): 126-137.
[5] Kuzmanović N, Prokić A, Ivanović M, et al. Genetic diversity of tumorigenic bacteria associated with crown gall disease of raspberry in Serbia [J]. European Journal Plant Pathology, 2015, 142: 701-713.
[6] Stonier T. *Agrobacterium tumefaciens* Conn. II. Production of an antibiotic substance [J]. Journal of Bacteriology, 1960, 79: 889-898.
[7] Kim J G, Park Y K, Kim S U, et al. Bases of biocontrol: sequence predicts synthesis and mode of action of agrocin 84, the Trojan Horse antibiotic that controls crown gall [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103: 8846-8851.
[8] Puławskaa J, Warabiedaa W, Ismail E. Identification and characterization of bacteria isolated from crown galls on stone fruits in Poland [J]. Plant Pathology, 2016, 65(5): 1034-1043.
[9] Cooksey D A. A spontaneous insertion in the agrocin sensitivity region of the Ti-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* C58 [J]. Plasmid, 1986, 16(3): 222-224.
[10] Wang Hongyan, Wang Huimin, Wang Jianhui, et al. The pathogen of crown gall disease on flowing cherry and its sensitivity to strain K1026 [J]. European Journal of Plant Pathology, 2000, 106: 475-479.

(责任编辑: 田 喆)