

E26 防治植物根癌病的效果及其稳定性初步研究

梁志宏 王慧敏 王建辉

(中国农业大学植保学院)

摘要 选取不致病的葡萄土壤杆菌 (*Agrobacterium vitis*) E26 菌株, 以 HLB-2 和 K84 菌株做对照, 对不同来源的 36 株根癌菌进行室内及温室条件下的抑菌及防治效果试验。结果表明: 室内抑菌检测中, E26 的抑菌谱要广于 HLB-2 和 K84, 对 36 株根癌菌中的 30 株有拮抗作用, 抑菌率为 83.3%。在温室防治检测中, 生防菌与根癌菌 1:1 混合接种指示植物向日葵时, E26 对 85.7% 的供试菌株有防治效果; 与对照生防菌相比, 尤以防治葡萄根癌病最为有效。单菌落传代研究表明: E26 后代菌株与初始菌株在产素及生长速度方面均无显著差异, 表明 E26 菌株细菌素的产生是一个比较稳定的性状。

关键词 生物防治; 根癌病; 细菌素

分类号 S432.42

Preliminary Study on Effectiveness and the Stability of E26 on Controlling Crown Gall Disease

Liang Zhihong Wang Huimin Wang Jianhui

(College of Plant Protection, CAU)

Abstract Nonpathogenic strain E26 isolated from the crown gall of grapevines was used in the study for the control effectiveness on crown gall diseases. Plating and greenhouse tests revealed that E26 could control 83.3% and 85.7% of the tested strains respectively, which suggested that E26 was an effective strain to control crown gall, especially for grapevine crown galls. Agrocin assay by transferring strain E26 on plates indicated that agrocin production of E26 is a stable property.

Key words biocontrol; crown gall; bacteriocin

根癌病是土壤杆菌 (*Agrobacterium* spp.) 引起的细菌病害, 在世界范围均有发生。根癌菌可侵染 93 科 331 属 643 种高等植物, 其中绝大多数为双子叶植物, 少数裸子植物, 个别也有单子叶植物^[1]。被侵染致病的植株营养吸收差, 生长不良, 严重的不结果, 甚至死亡, 带来巨大的经济损失。1980 年葡萄根癌病被列为美国最重要的原核生物所致病害, 我国葡萄感病品种发病率也高达 30%~100%, 根癌病是葡萄高产稳产的严重障碍之一。多年的研究表明, 使用生防菌防治根癌病是相对有效的方法, K84 菌株防治核果类果树根癌病就是一个典型例子^[2,3], 但 K84 菌株对葡萄根癌病无防效。我国自行分离的生防菌 E26 来源于葡萄, 属于 *A. vitis* 种内菌株, 初步试验表明对葡萄根癌病有较明显的防效。

作者对生防菌株 E26 防治根癌病, 特别是葡萄根癌病的效果以及防效稳定性进行了研

收稿日期: 2000-06-27

北京市自然科学基金资助项目 (6982015)

梁志宏, 北京圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区), 100094

究, 以期为 E26 菌株在根癌病防治中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

生防菌 HLB-2 (*A. tumefaciens*)^[4] 由中国科学院微生物研究所马德钦先生提供; K84 (*A. rhizogenes*)^[3] 和 E26 (*A. vitis*)^[5] 本研究室提供。

根癌菌 C58, AC11, B6S3, K27, A4 和 K308 由中国科学院微生物研究所马德钦先生提供; 其他 30 株菌株源于本研究室。

表 1 供试根癌菌来源及特征

<i>A. tumefaciens</i>			<i>A. rhizogenes</i>			<i>A. vitis</i>		
菌株号	寄主	质粒	菌株号	寄主	质粒	菌株号	寄主	质粒
C58	樱桃	Nop	K27	桃树	Nop	K308	葡萄	Oct
AC11	苹果	Nop	A4	苹果	Agr	G2(3)	葡萄	Oct
B6S3	番茄	Oct	BYH18-4	樱花	Oct	G11(3)	葡萄	Oct
MG10-1	玫瑰		NL5-2	茉莉	Nop	G7(2)	葡萄	Oct
MG11-1	玫瑰		NL12-2	茉莉	Nop	MB-2	葡萄	Oct
MG14-2	玫瑰		MG6-1	玫瑰	Nop	L15-1	葡萄	Oct
CY4	樱桃	Nop	MG12-1	玫瑰		M123-1	葡萄	Oct
CY31	樱桃	Nop	GBT3-4	桃树	Nop	C115-1	葡萄	Oct
CY32	樱桃	Nop	GBT5-6	桃树	Nop	MB26-1	葡萄	Oct
Pt12	白杨	Agr	B5	樱桃	Nop	GL9-1	葡萄	Oct
Y5-1	樱桃	Nop	D2	樱桃	Nop	L17-1	葡萄	Oct
M14-6	葡萄	Oct	B1	樱桃	Nop	MB28-6	葡萄	Oct

Nop-nopaline 胭脂碱; Oct-octopine 章鱼碱; Agr-agropine 农杆菌。

1.1.2 指示植物 向日葵苗(1~2对真叶), 株高 5~10 cm。

1.1.3 培养基 改良 523 培养基(保存用); MW 培养基(选择性培养基); 培养基 G、改良 AB (产素培养基); 水琼脂培养基(检测细菌素用)。

1.2 方法

1.2.1 菌种保存 原始菌株冻存于甘油管内。试验前用改良 523 斜面培养基活化。

1.2.2 室内平板上抑制根癌菌效果检测 按照 Stonier 的双层培养基法^[6]。生防菌点种在产素培养基上, 28℃ 培养 48 h; 用氯仿蒸气杀死生防菌株; 把培养好的根癌菌株分别制成悬液, 终浓度约 10^9 cfu·mL⁻¹。取 0.1 mL 菌悬液加入 3 mL 的 50 软琼脂中, 迅速混合, 立即倒入长有生防菌的平板上, 使之覆盖成均匀薄层, 28℃ 培养 10 h。观察抑菌圈并检测大小。

1.2.3 温室防治根癌病效果检测 将 3 株生防菌、36 株根癌菌分别制成菌悬液, 终浓度约 10^8 cfu·mL⁻¹。生防菌悬液与根癌菌悬液按体积 1:1 分别混合, 共 108 个处理。用灭菌大头针在向日葵根茎部刺微伤(所有接种部位一致), 以灭菌脱脂棉蘸取混合液包裹伤口, 同时以根癌菌单独接种、生防菌单独接种和无菌水接种作对照。每一处理接种 3 个植株。2 周后观察结瘤情况。

1.2.4 传代法检测 E26 菌株后代生长速度 划线法选择单菌落后代, 记录培养第 96 h 的单菌落直径。依次传代 20 次(N 1, N 2, ..., N 20)。

1.2.5 E26 菌株后代产素能力稳定性检测 仍按照 Stonier 的双层培养基法, 选择根癌菌 M 123-1 为指示菌检测 1.2.4 中每次传代菌落的抑菌圈。

2 结果

2.1 室内抑菌及温室防治效果

2.1.1 室内平板上抑制根癌菌效果 由表 2 可知, 与对照菌株相比, E26 菌株产生的细菌素对 3 个种内的根癌菌抑菌效果均最好: 对供试 *A. vitis* 种内的 100% 根癌菌菌株有抑制作用, 对 *A. rhizogenes* 种内根癌菌菌株抑制率为 83.3%, 好于对 *A. tumefaciens* 种内根癌菌的抑制率 66.7%; HLB-2 的抑菌率分别为 75%, 75% 和 58.3%; K84 的抑菌率分别为 0, 75% 和 50%。E26 对所有来源于葡萄上的供试菌株都有抑制作用。

根癌菌含有不同冠瘿碱质粒类型(表 1), E26 菌株抑制所有 *A. vitis* 种内含有章鱼碱质粒类型的根癌菌, 也可以抑制 *A. rhizogenes* 种内含有章鱼碱质粒类型的根癌菌(BYH 18-4 菌株), HLB-2 菌株可抑制 *A. vitis* 种内含有章鱼碱质粒类型的大部分根癌菌, 而 K84 菌株对含有章鱼碱质粒类型的根癌菌无抑菌作用; 对含有胭脂碱质粒的根癌菌而言, E26 和 K84 的抑菌效果好于 HLB-2 菌株。

表 2 3 株生防菌平板抑制供试根癌菌的抑菌效果

根癌菌	生防菌			根癌菌	生防菌			根癌菌	生防菌			<i>d</i> /mm
	HLB-2	K84	E26		HLB-2	K84	E26		HLB-2	K84	E26	
<i>A. tumefaciens</i>				<i>A. rhizogenes</i>				<i>A. vitis</i>				
C58	-	42.7	11.5	K27	-	14.3	24.3	K308	21.3	-	17.2	
AC11	20.7	56.0	-	A4	16.7	12.7	-	G2(3)	16.3	-	14.2	
B6S3	20.3	-	-	BYH 18-4	20.5	-	16.0	G11(3)	16.5	-	13.5	
M G10-1	23.7	54.0	20.7	NL 12-2	13.7	-	18.7	G7(2)	-	-	13.8	
M G11-1	20.0	-	19.0	NL 5-2	12.5	16.7	12.3	M B-2	18.2	-	11.3	
M G14-2	-	-	-	M G12-1	13.0	-	18.3	L 15-1	15.2	-	9.3	
CY4	17.0	-	22.7	M G6-1	-	9.2	-	M 123-1	10.3	-	26.0	
CY31	-	26	12.7	HBT 3-4	17.5	14.0	19.8	C 115-1	-	-	13.0	
CY32	24	13.3	13.3	HBT 5-6	18.7	12.3	20.0	MB26-1	18.7	-	8.7	
PT12	-	-	-	B5	16.0	22.0	19.0	GL 9-1	16.2	-	13.8	
Y5-1	-	32.3	17.3	D2	13.2	17.3	15.0	L 17-1	-	-	9.3	
M 14-6	22.0	-	17.5	B1	-	17.0	21.8	MB28-6	15.5	-	12.8	
抑菌率 $\varphi\%$	58.3	50	66.7		75	75	83.3		75	0	100	

注: - 表示无抑菌圈, 即生防菌对根癌菌无抑菌作用;

$\varphi\%$ 表示(种内被抑制根癌菌菌株数/种内供试根癌菌菌株数) × 100%。

2.1.2 温室防治根癌病效果 表 3 中 E26 菌株在温室的防治效果优于对照生防菌, 对 *Agrobacterium* 属内 35 株供试菌株中的 30 株根癌菌有防效, 总防治率为 85.7%。在种的水平上, E26 分别防治 *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* 和 *A. vitis* 种内 90.9%, 83.3% 和 83.3% 的供试菌株, 使其侵染向日葵后不结瘤或肿瘤变小; HLB-2 的防治率分别为 36.4%, 50% 和 58.3%; K84 的防治率分别为 72.7%, 83.3% 和 8.3%。对于来自葡萄的根癌菌, E26 效果最

好,而 K84 对源于葡萄的根癌菌几乎无防效。

在温室防治试验中, E26 对含有章鱼碱质粒类型的根癌菌(14 株)大部分有防治效果(12 株), 明显优于对照菌株(K84 为 2 株, HLB-2 为 8 株)。E26 对含有胭脂碱质粒的根癌菌防治效果也高于 K84 和 HLB-2 菌株。

表 3 生防菌与根癌菌等体积混合在温室向日葵上的防治效果

根癌菌	生防菌			根癌菌	生防菌			根癌菌	生防菌		
	HLB-2	K84	E26		HLB-2	K84	E26		HLB-2	K84	E26
<i>A. tumefaciens</i>				<i>A. rhizogenes</i>				<i>A. vitis</i>			
C58	R	S	S	K27	R	S	S	K308	S	R	S*
AC11	R	S	S	A4	R	S	S	G2(3)	S	R	S*
B6S3	S*	R	S	BYH18-4	R	S	S	G11(3)	S*	R	S
MG10-1	S*	S*	S*	NL12-2	S	S	S	G7(2)	R	R	S*
MG11-1	R	R	S	NL5-2	S	S	S	MB-2	S*	R	S
MG14-2	R	S	R	MG12-1	R	R	R	L15-1	S	R	R
CY4	R	S*	S*	MG6-1	R	S	R	M123-1	S*	R	S*
CY31	S*	S*	S*	HBT3-4	R	S*	S	CI15-1	R	R	S*
CY32	S*	R	S*	HBT5-6	S*	S	S*	MB26-1	S*	R	S*
PT12	R	S*	S*	B5	S*	S	S	GL9-1	R	S*	S*
Y5-1	R	S	S*	D2	S	S	S*	L17-1	R	R	S*
M14-6	-	-	-	B1	S*	R	S	MB28-6	R	R	S*
抑菌率 $\varphi\%$	36.4	72.7	90.9		50	83.3	83.3		58.3	8.3	83.3

注: R—无防效; S—有明显防效, 不结瘤; S*—有一定防效, 肿瘤比对照明显小;

$\varphi\%$ 表示(种内被防治根癌菌菌株数/种内供试根癌菌菌株数) \times 100%。

2.2 E26 菌株单菌落传代后部分性状的稳定性

2.2.1 E26 菌株后代菌落形态 在 MW 培养基上, 菌落圆形, 灰白色, 光滑, 突起。N1~N20 菌落形态没有变化。

2.2.2 E26 后代菌株产细菌素抑制根癌菌(M123-1)的作用 N1~N20 均产生抑菌圈, 抑菌圈最大 27 mm, 最小 15 mm。但是该差异与传代次数间没有相关性。

2.2.3 E26 后代菌株生长速度 在 MW 培养基上, 单菌落直径最大是 2.6 mm, 最小是 1.6 mm; 由表 4 可以看出, 不同传代次数菌落直径在 $\alpha=0.05$ 水平差异显著。但是, 经多重比较发现 N2~N20 后代与 N1 代菌落生长速度之间无显著差异。

表 4 E26 后代菌株在 MW 培养基上单菌落大小

96 h

传代次数	d/mm	显著性分析	传代次数	d/mm	显著性分析
N1	1.9	abcd	N11	1.9	abcd
N2	2.0	abc	N12	2.2	ab
N3	2.1	abc	N13	1.7	cd
N4	2.2	a	N14	1.7	cd
N5	2.0	abc	N15	1.8	cd
N6	2.3	a	N16	1.7	cd
N7	2.1	abc	N17	1.9	abcd
N8	2.0	abc	N18	1.8	cd
N9	1.8	cd	N19	1.6	d
N10	1.9	abcd	N20	1.8	cd

显著性分析为 $\alpha=0.05$ 水平新复极差比较。

3 讨论

本研究有 75.2% 处理结果表现平板抑菌与温室防效一致(比较表 2、表 3), 24.8% 的处理结果不一致。E26 菌株对葡萄根癌菌的抑菌与防治结果一致性达到 83.3%, 有个别菌株例外, 如平板上 E26 对葡萄根癌菌 L15-1 有抑菌作用, 温室中却对其无防治效果, HLB-2 与 K84 菌株也有类似的现象, 表明细菌素是防治根癌病的机制之一, 但却不是惟一因素。

分析生防菌株对根癌菌的作用范围, 相对于 HLB-2 和 K84 菌株, E26 是最广谱的生防菌株。从种的水平分析, E26 菌株可以抑制 *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* 和 *A. vitis* 种内的根癌菌菌株, 对 *A. vitis* 种内根癌菌的平板抑菌和温室防治效果均最好, 可能由于该菌株是从葡萄上分离得到的原因; K84 菌株对发根土壤杆菌种内根癌菌防治十分有效, 尤其对桃树等核果类植物防效较好, 就有同样的原因。从质粒类型分析, 对含章鱼碱质粒的根癌菌 E26 菌株作用效果最好, HLB-2 也有较好的效果, K84 菌株在平板上对含章鱼碱质粒的根癌菌无抑菌作用, 温室防治效果也极微弱, 对含胭脂碱质粒的根癌菌, 3 株生防菌差异不大, E26 和 K84 相对较好。因此, 在选用生防菌株时, 应考虑寄主植物和根癌菌的类型。

3 株生防菌与 36 株根癌菌悬液等体积分别混合接种指示植物向日葵, K84 和 HLB-2 对某些根癌菌的防治效率高于 E26 菌株, 例如, 表 3 显示对于 *A. vitis* 种内的根癌菌, 尽管 E26 的防效为 83.3%, 高于 HLB-2 的 75%, 但是, HLB-2 菌株使该种内根癌菌不结瘤(表中用 S 表示)的菌株数要高于 E26, 因此, 建议生物防治中可适当增大 E26 菌株的比例, 以期在发挥其抑菌范围广优势的基础上, 增加抑菌强度。

采用连续传代的方法检测产细菌素性状的变化, 可以初步确定产素的稳定性^[2]。E26 菌株单菌落传代 20 次, N1~N20 后代中均产生抑菌圈, 表明 E26 菌株产生细菌素的性状是比较稳定的。E26 后代生长速度与 N1 代相比无显著差异。

E26 是防效很好且抑菌谱较广的生防菌株, 尤其是防治葡萄根癌病的理想生防菌, 而且可以较长时间稳定使用。本研究为 E26 菌株的菌种保存及生物防治的后效评估提供了一定的依据。

参 考 文 献

- 1 Conner A, Dommisse EM. Monocotyledonous plants as hosts for agrobacterium. J Int J Plant Sci, 1992, 153(4): 550~ 555
- 2 马德钦 应用土壤杆菌 K84 和 K1026 菌株生物防治植物冠瘿病 微生物学通报, 1995, 22(4): 238~ 242
- 3 Kerr A. Biological control of crown gall: seed inoculation. J Appl Bact, 1972, 35: 493~ 497
- 4 陈晓英, 相望年 放射土壤杆菌 HLB-2 菌株抑制葡萄根癌土壤杆菌和冠瘿形成的研究 微生物学报, 1986, 26(3): 193~ 199
- 5 梁亚杰, 马德钦, 狄原渤 应用生物 3 型放射土壤杆菌防治葡萄冠瘿瘤形成的研究 微生物学报, 1990, 30(3): 165~ 171
- 6 Stonier T. *Agrobacterium tumefaciens* Conn: II. Production of an antibiotic substance J Bacteriol, 1960, 79: 889~ 898