

应用土壤杆菌防治植物冠瘿病

马德钦 张洪胜* 梁卫东*

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

植物冠瘿病 (crown gall disease) 是由土壤细菌根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 所引起, 病菌从根部伤口侵入植物细胞后, 在植物的根、根茎交界部位, 甚至茎部均能产生瘤状肿块。由于多数植物发生在根部, 因此亦称根癌病。它的发生与动物癌瘤相似, 有时亦称肿瘤 (tumors)。患根癌病植物的根部对营养和水分吸收差, 植株生长不良, 果实产量低, 严重的甚至死亡、毁园。

DeCleene 和 DeLey^[1] 曾报道根癌土壤杆菌可侵染 93 个科 331 属 643 种的双子叶植物及少数裸子植物。但是, 该病在葡萄类、浆果类、核果类、梨果类、坚果类果树, 玫瑰和其它观赏植物最易发生。是一种世界性病害, 造成重大经济损失。如南非、欧洲和美国的葡萄、澳洲和西班牙的杏和桃、西班牙、意大利的玫瑰、美国的苹果、桃等都严重发生。1980 年 Kennedy 报道^[2], 美国由于原核植物病原细菌所造成的作物损失中, 果树和葡萄的冠瘿病排列为最重要的病害。1976 年加州损失 2.3 千万美元。在东欧, 损失达收成的 75—80%^[3]。我国冠瘿病

的发生及造成经济损失情况还不十分清楚。据掌握的资料, 葡萄冠瘿病在北方十三个省市均有发生, 在辽宁、北京、内蒙有许多葡萄园, 病害亦十分严重, 100% 植株患病, 减产 30%, 甚至毁园^[4-5]。樱桃根癌病在山东、北京、大连、河北, 尤其在山东一些地区严重。桃树根癌在上海、江苏、福建、北京、河北、大连等地亦很普遍^[6-8]。啤酒花冠瘿病主要在山东、浙江和新疆^[9-11], 樱花冠瘿病发生在北京、内蒙等地^[12,13], 其中多是从日本传入。毛白杨冠瘿病在北京、河南、唐山的苗圃为害^[14]。冠瘿病严重发生的果园和苗圃, 发病率通常可达 30—80% 以上, 带来较大的经济损失。此外, 河北的山楂, 山西的梨, 山东的苹果, 东北的甜菜, 以及核桃、海棠, 也发现冠瘿病, 只是还不如其它果树严重。随着带病果树苗木的调运, 很可能使病害传播。因此, 本文着重介绍该病害发生的基本知识及生物防治的进展情况。

1 根癌土壤杆菌与植物冠瘿病

* 烟台市大樱桃研究中心, 山东烟台 264001

1994-07-11 收稿

根癌土壤杆菌的致瘤能力是由其 Ti 质粒所决定。致瘤基因都集中在 Ti 质粒的 T-DNA 区内。病原菌感染植物时, T-DNA 转移到植物细胞并与染色体 DNA 整合, T-DNA 上编码的生长素和细胞分裂素生物合成基因 (tms 和 tmr 基因) 的表达, 使细胞分裂失控, 肿瘤般过度生长。编码冠瘿碱 (opines) 合成的基因表达, 使冠瘿瘤内合成正常植物细胞所没有的冠瘿碱类物质。冠瘿碱亦可作为入侵土壤杆菌的营养使用。编码冠瘿碱分解代谢基因亦在 Ti 质粒上。含不同类型 Ti 质粒的根癌土壤杆菌, 诱导的冠瘿瘤合成的冠瘿碱也不同, 从而把 Ti 质粒分类型。Ti 质粒有两个主要类群是: 胭脂碱/农杆菌素碱 A (nopaline/agrocinopine A) 型和章鱼碱/农杆菌碱 (octopine/agropine) 型。

根据对碳源的利用和其它生理生化试验指标, 土壤杆菌可以分为三个生物变种, 或生物型。生物型是由病原菌的染色体所决定。不同生物型的土壤杆菌来源于不同植物寄主, 其特性有很大差别。如葡萄冠瘿病主要由生物 3 型章鱼碱 Ti 质粒的根癌土壤杆菌所发生。核果类冠瘿病主要由生物 2 型胭脂碱/农杆菌素碱 A Ti 质粒病原菌, 玫瑰冠瘿病主要由生物 1 型土壤杆菌所引起的。

2 冠瘿病的生物防治

1972 年澳大利亚阿德雷德 (Adelaide) 大学的 Kerr 教授从桃树冠瘿病株旁的土壤中分离到一株放射土壤杆菌 K84, 它属于生物 2 型, 对植物不致瘤, 能产农杆菌素 (agrocin) 抑制根癌土壤杆菌生长^[15]。此后, K84 菌株在世界各地用来防治冠瘿病, 获得不同程度的成功。虽然化学药剂及商品抗菌素对冠瘿病亦有一定的防治效果, 但 K84 菌株更为有效, 价钱又便宜。使用的方法很简单, 将植物材料 (种子或幼苗的根) 在播种或移栽前立即放在 K84 菌株悬浮液 (10^7 — 10^8 个细菌/ml) 中沾一下即可。从 1973 年起, K84 菌株在澳大利亚已制成商品出售, 现在世界上许多国家和地区在使用。

用 K84 菌株防治冠瘿病的研究报道很多,

Moore 曾作了详细评述^[16]。他列举了许多植物, 如蔷薇科、胡桃科、菊科、杨柳科等植物幼苗用 K84 菌株处理后, 对冠瘿病的防治很有效, 甚至可达 100%。在澳大利亚主要用来防治核果类的杏和蔷薇, 美国防治樱桃、澳大利亚、欧洲、北美等国用在园艺和观赏植物, 都是成功的。我国 1985 年引进 K84 菌株, 并先后在桃、樱桃、毛白杨、啤酒花、樱花冠瘿病的防治上效果明显^[6-14], 现在亦见有防治冠瘿病制剂的消息。

K84 菌株在冠瘿病的防治中的作用是防非治, 是作为一种预防措施使用, 控制病害发生达到消灭目的。因为植物一旦发生冠瘿病后, 表明病菌 Ti 质粒上的致瘤基因已整合进入植物细胞染色体和表达。并随着细胞分裂而不断复制, 这时用什么方法治疗都难奏效。此外, 它亦不能防治所有冠瘿病, 只对含胭脂碱 Ti 质粒的根癌土壤杆菌才有效果。对章鱼碱 Ti 质粒的, 及引起葡萄冠瘿病的生物 3 型根癌土壤杆菌无效。为此, 人们正在寻找新功能的生防菌株, 以弥补 K84 菌株之不足。

1983 年, Handson 报道从南非的桉树分离出一株已无致病性的生物 1 型根癌土壤杆菌 D286, 它能够产生抗菌素抑制章鱼碱型根癌土壤杆菌, 并称对各种生物型土壤杆菌均有防治作用^[17]。1986 年 Webster 等人从南非樱桃属植物分离到一株生物 2 型根癌土壤杆菌 J73。它能产生抗菌素防治葡萄冠瘿病。J73 现已消除了 Ti 质粒而无致病性, 很有发展前途。但上述菌株均未见有大田防治报道。在我国, 中国科学院微生物研究所与内蒙园艺科学研究所, 北京农业大学植保系合作, 从我国啤酒花及葡萄冠瘿中分离与筛选出不致瘤, 并能产抗菌素抑制生物 3 型葡萄根癌土壤杆菌生长的放射土壤杆菌 HLB-2^[18-20], MI15^[21, 22] (均为生物 1 型) 及 E26 (生物 3 型)^[22, 23], 经过 1000 多亩大田试验证明对葡萄冠瘿病的防治效果良好, 达 80—100%。美国温室与田间试验 HLB-2 和 E26 的防治效果同样明显^[24-27]。这是我国冠瘿瘤生物防治研究中的特色和创新。引起国外注意。

3 K84 菌株防治冠瘿病的机理

3.1 农杆菌素 84 产生的作用: K84 菌株的防治作用是它能产生一种称为农杆菌素 84 的抗菌素。对胭脂碱/农杆菌素碱 A 型 Ti 质粒的土壤杆菌有毒害, 这类土壤杆菌对苗圃和观赏植物为害也最严重。农杆菌素 84 在冠瘿瘤防治中的作用非常重要, 它的产生是由 K84 菌株的一个质粒, pAgk84 所编码, 它的化学结构类似腺嘌呤核苷酸, 只是带有两个替代基。又由于其结构与 agrocinospine A 很相似。能被胭脂碱/农杆菌素碱 A 型 Ti 质粒的根癌土壤杆菌通过农杆菌素碱透性酶所吸收。农杆菌素碱 A 能被病原菌正常利用。但农杆菌素 84 则不能, 是个“假冒”品, 被病原菌错误吸收利用后, 干扰了细胞 DNA 的复制, 使其受害。

3.2 K84 菌株的遗传背景: K84 菌株含有三个质粒, 最大的是隐性质粒, 它的功能尚不清楚。小一点的质粒叫 pAgk84b (或 pNOC), 大小约 173kb, 它的主要功能是分解代谢胭脂碱 (noc) 以及对 Ti 质粒不相容性^[26]。这样, 它能保护 K84 菌株以免通过接合转移获得 Ti 质粒, 变成既致瘤又对农杆菌素免疫的病原菌。具有 noc 功能亦可促进 K84 菌株群集在产生胭脂碱的冠瘿瘤上生长, 并分泌农杆菌素 84, 阻止病原细菌蔓延到其它侵染位点。最小一个质粒为农杆菌素质粒, pAgK84, 大小 48kb, 相当于 Ti 质粒的 1/4。它的功能是编码产生农杆菌

素, 对农杆菌素免疫和使该质粒转移^[27] (图 1)。在有胭脂碱存在时, 或有 pNOC 质粒存在时 pAgK84 转移到其它土壤杆菌的频率最高。

3.3 群集于根部的作用: K84 菌株的作用除产生农杆菌素外, 还能很好群集到植物根表面, 这是生物防治成功的另一重要因素。实验证明, pAgK84 只有存在于 K84 菌株 (生物 2 型) 的染色体背景时, 菌株才能最有效群集到杏苗的根部。如果把 pAgK84 质粒从 K84 菌株转移到生物 1 型土壤杆菌中, 此新菌株虽然有产生农杆菌素 84 的能力, 但群集在根上的能力差, 冠瘿病的防治效果就大不如 K84 菌株。因此, K84 菌株的染色体在生防过程中亦起重要作用。

4. 冠瘿病生物防治失败的可能原因

K84 菌株防治冠瘿病失败的原因, 大多数都与农杆菌素 84 的产生有关。

4.1 由于 pAgK84 质粒的转移原因: 在生物防治冠瘿瘤试验时, 往往将 K84 与病原菌以 1:1 高密度混合, 以致产素质粒, pAgK84 能从 K84 菌株接合转移到致瘤土壤杆菌中, 结果使病原菌既能抗农杆菌素 84, 又能致瘤。其转移频率估计在含胭脂碱的冠瘿附近较高, 远离冠瘿的根或土壤较低。这是人工实验的结果, 在自然界中的转移情况还不太清楚。

4.2 由于 Ti 质粒转移至 K84 菌株的原因: 这种转移的结果, 使 K84 菌株变成了能产生农杆菌素又对农杆菌素 84 免疫的致病菌, 但还没有资料证明转移的频率。很可能是非常低或不可能发生。因为 K84 菌株亦含有 pNOC 质粒, 它与 Ti 质粒是不相容的, 即不能共存于同一细胞中, 如果 K84 菌株要接受外来的 Ti 质粒, 它首先要丢失自己的 pNOC, 而 pNOC 本身在细胞中又相当稳定。

4.3 根癌土壤杆菌突变为对农杆菌素 84 抗性: 平皿试验得知, 对农杆菌素 84 敏感的土壤杆菌能以相当高频率突变为抗性菌株。抗性菌株中有一些丢失了 Ti 质粒, 无致瘤能力, 另一些仍有致病性, Ti 质粒仍存在。由于根癌土壤杆菌对农杆菌素 84 敏感性的基因是位于 Ti

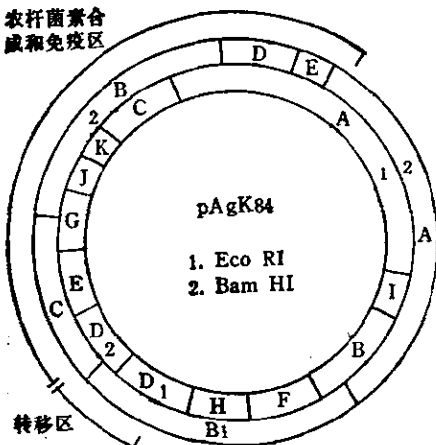


图 1 pAgK84 质粒的 EcoRI 和 BamHI 限制酶切图

质粒上,因此抗性突变可能因为质粒 DNA 缺失了一个片段,或是发生了点突变。现在还不知道这种抗性突变株是否会在土壤巾发生。如果发生了,并由此出现生防失效。则是很难克服的。有人建议把 K84 菌株与另一株产其它农杆菌素的土壤杆菌混合使用,可以降低病原菌自发抗性突变的频率。

5 K84 菌株转移缺失 (Tra⁻) 突变株——

K1026 菌株的构成

因为农杆菌素质粒 pAgK84 在生防过程中能接合转移至根癌土壤杆菌,因此,确保 K84 菌株生防效果的最好、最实际途径是对 K84 菌株加以改造,使 pAgK84 缺乏转移能力。

初期的着眼点是用转座子 Tn5 插入突变,令 pAgK84 的转移区功能缺失 (Tra⁻),而生防效果不变。但此法尚有缺点:(1) Tn5 的插入后使 K84 菌株增加了三种抗菌素抗性基因。(2)细菌在繁殖过程中 Tn5 仍可能会丢失,从而使 K84 菌株回复到 Tra⁺ 的亲代特性。因此,这种 K84 Tra⁻ 菌株不宜在生产中应用。

1988 年, Jones 等人通过遗传工程的限制酶切和重组 DNA 技术把 pAgK84 的 Tra 区两个 EcoRI 片段, D1 和 H 切除 (这两片段在 Tra 区位置,见图 1 所示)。即切去 5.9kb 长度,其中有 2.8kbDNA 属 D1,即转移区片段。而整个转移区是 3.5kb,结果使 Tra 区 80% 被切除。此后将此 Tra⁻ 质粒(名为 pAgK1026)再构成共整合质粒及引入自发突变丧失了 pAgK84 质粒的 K84 菌株,进行缺失标记交换(deletion-marker exchange)等步骤,使其与亲代菌株一样有相同的染色体背景,这个 K84 衍生株即 K1026^[2a]。pAgK84 切除了 EcoRID1 和 H 片段对它在土壤杆菌中的复制和稳定性不受影响。

6 K1026 菌株的特性及商业应用

为了把 K1026 菌株在生产上应用,曾与亲代菌株 K84 进行过详细比较:

(1) 产农杆菌素能力: 经体外试验,两菌株产农杆菌素能力没有差别。

(2) 农杆菌素质粒分析: 质粒的琼脂糖电泳表明, pAgK1026 质粒因切除了 5.9kb 片段,明显小于 pAgK84 质粒。这两个质粒用 EcoRI 限制酶消解时, pAgK1026 不含 D1 和 H 片段。也没发现有外来 DNA 残留在菌株内。

(3) 菌株质粒检测: 两菌株均含有三个质粒,即隐性质粒, pNOC 质粒和产素质粒 (pAgK84 和 pAgK1026)。

(4) 产素质粒稳定性: 含 pAgK84 和 pAgK1026 产素质粒菌株经多次继代培养,质粒没发现有自发丢失。是很稳定的。

(5) 产素质粒的转移性: K1026 与 K84 菌株分别与生物 1 型土壤杆菌交配 (mating), 证明 pAgK1026 是不能接合转移的,而 pAgK84 转移能力强,从而确认 K1026 是 K84 菌株的 Tra⁻ 突变株。

(6) 生物防治冠瘿病能力: 使用 K1026, K84 菌株和水,分别防治杏树 (almond) 幼苗的冠瘿病。观察到 K1026 和 K84 菌株防治效果都明显,互相没多大差别。属统计学误差范围。而水处理的发病率达 100%^[2a]。

上述比较结果证明, K1026 菌株除了其产农杆菌素质粒缺失了 5.9kb 的片段,使其不能接合转移 (Tra⁻) 到其它土壤杆菌,其它方面特性与亲代 K84 菌株没有区别。由于有这点优越性,现在已开始在生产中应用。据报道^[3a],它已经在澳大利亚和美国申请了注册。1988 年来此产品已在澳大利亚出售,商品名称 No-Gall™ (克瘿瘤),是一种含 K1026 菌的湿泥炭制剂。这是第一个作为商品出售的遗传工程菌。

目前我们亦引进了 K1026 菌株,期望不久的将来会在我国的冠瘿防治中发挥作用。

参 考 文 献

- [1] DeCleene M, DeLey J. Botanical Review, 1976, 42: 389—466.
- [2] Kennedy B, Alcom S M. Plant Disease, 1980, 64: 674—676.
- [3] Thomson J A. Trends in Biotechnology, 1986, 4 (8): 19—224.
- [4] 游积峰, 谢雪梅, 陈培民, 等. 植物保护学报, 1986, 13

- (3): 145—150.
- [5] 游积峰, 谢雪梅, 陈培民. 内蒙古园艺, 1982, 合刊: 7—11.
- [6] 张春明, 吴印青, 陈龙瑛, 等. 上海农业学报, 1988, 4(1): 37—42.
- [7] 王慧敏, 梁亚杰, 云涛, 等. 北京农业大学学报, 1991, 17(1): 91—94.
- [8] 杨国平, 生物防治通报, 1986, 2(1): 25.
- [9] 陈晓英, 相望年. 微生物学报, 1987, 27(1): 10—16.
- [10] 任欣正, 潘小玫, 方中达. 植物保护学报, 1986, 13(1): 45—50.
- [11] 郑继法, 丁兆龙, 潘德学. 山东农业大学学报, 1984, (1—2): 1—6.
- [12] 邱金亚. 植物检疫, 1987, (1): 59—60.
- [13] Xie Xuemei, You Jifeng, Ma Yu, *et al.* Plant Pathology and Biotechnology, Proceedings of 2nd Hangzhou International Symposium on Plant Pathology. 1994, 124.
- [14] 张静娟, 周娟, 相望年. 微生物学报, 1988, 28(1): 12—18.
- [15] New P B, Kerr A. J Appl Bacteriol, 1972, 35: 279—287.
- [16] Moore L W. Soil-Borne Plant Pathogens, Schippers B and Gams W (eds), Academic Press, 1977, 553—568.
- [17] Handson M, Askjaer L, Thomson J A, *et al.* Appl Envir Microbiol, 1983, 45: 1526—1532.
- [18] 陈晓英, 相望年. 微生物学报, 1986, 26(3): 193—199.
- [19] 陈晓英, 相望年. 植物病理学报, 1988, 18(2): 126—128.
- [20] 游积峰, 谢学梅, 陈培民, 等. 生物防治通报, 1990, 6(1): 35—37.
- [21] 游积峰, 谢学梅, 陈培民, 等. 植物病理学报, 1993, 23(2): 137—141.
- [22] 游积峰, 谢学梅, 陈培民, 等. 中国果树, 1993, (1): 10—12.
- [23] 梁亚杰, 赵家英, 马德钦, 等. 微生物学报, 1990, 30(3): 165—171.
- [24] Xin An Pu, Goodman R N. Am J Enol Vitis, 1993, 44(3): 249.
- [25] Xin An Pu, Goodman R N. Appl Envir Microbiol, 1993, 59(8): 2572—2577.
- [26] Clare B G Kerr A, Jones D A. Plasmid, 1990, 23: 126—137.
- [27] Farrand S K Slota J E, Shim J S, *et al.* Plasmid, 1985, 13: 106—117.
- [28] Jones D A *et al.* Mol Gen Genet, 1988, 212: 207—214.
- [29] Jones D A, Kerr A. Plant Disease, 1989, 73: 15—18.
- [30] Jones D A, Ryder M H, Clare B G, *et al.* The Biological Control of Crown Gall Using Agrobacterium Strains K84 and K1026. 1991, No. 42, Reprinted From FFTC Book Series.