

# 蓝莓根癌病发生调查及病原鉴定\*

傅俊范<sup>1</sup>, 彭超<sup>1</sup>, 严雪瑞<sup>1</sup>, 周如军<sup>1</sup>, 代汉萍<sup>2</sup>

1. 沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110866

**摘要:** 对辽宁、吉林、山东及黑龙江省的部分蓝莓苗圃及生产园中蓝莓根癌病发生情况、症状特点及危害程度进行了调查, 结果表明蓝莓根癌病多见于苗圃及酸度不适的生产园中。同时在上述地区采集到 57 份蓝莓冠瘿瘤和 10 份土壤样品, 经过菌株分离、回接寄主后获得 19 株致病菌。通过菌落形态、菌体特征、生理生化及 16S rDNA 序列比对, 确定蓝莓根癌病是由根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 侵染所致。

**关键词:** 蓝莓; 根癌病; 病原菌鉴定; 16S rDNA 序列分析; 根癌土壤杆菌

中图分类号: S663.9; S436.639

文献标识码: A

文章编号: 1000-5684(2011)

DOI:

网络出版地址:

## Investigation and Identification of Blueberry Crown Gall

FU Jun-fan, PENG Chao<sup>1</sup>, YAN Xue-rui<sup>1</sup>, ZHOU Ru-jun<sup>1</sup>, DAI Han-ping<sup>2</sup>

1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

**Abstract:** The crown gall disease occurrence was investigated in different blueberry nurseries and fields located in Liaoning, Jilin, Shandong and Heilongjiang provinces. Fifty seven plant samples and ten soil samples were collected at the above areas. Nineteen of them showed pathogenicity through inoculating of healthy blueberry. The pathogen was identified as *Agrobacterium tumefaciens* by phenotypic features of the cells and colonies, biochemical characteristics and sequence analysis of 16S rDNA.

**Key words:** blueberry; crown gall disease; identification of pathogen; 16S rDNA sequence analysis; *Agrobacterium tumefaciens*

植物根癌病由土壤杆菌 (*Agrobacterium sp.*) 中的致病菌株引起, 是一种世界性的细菌病害, 在欧洲<sup>[1]</sup>、北美<sup>[2]</sup>及亚洲<sup>[3]</sup>的一些国家普遍发生。根癌病菌可侵染 93 科 331 属 643 种双子叶植物和少数裸子植物<sup>[4]</sup>。在我国, 随着蓝莓栽培面积的扩大和种植年限的增加, 根癌病在主要蓝莓产区普遍发生, 对蓝莓植株和种苗生产造成较大影响<sup>[5]</sup>。目前国内尚未见蓝莓根癌病的系统研究报道, 为此本课题组对其进行了初步发病调查和病原鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 病害调查

2009 年 4 月对辽宁沈阳、辽宁丹东、辽宁大连、吉林靖宇、山东泰安、黑龙江尚志的蓝莓苗圃及生产园进行了系统调查, 采取随机采样法, 统计发病情况。

### 1.2 病原菌分离和培养

1.2.1 标样来源 蓝莓根癌病标样采自辽宁沈阳、辽

宁丹东、辽宁大连、吉林靖宇、山东泰安蓝莓种植园, 采集到冠瘿瘤 57 份, 土样 10 份, 寄主品种为北陆、北村、美登、蓝丰。

1.2.2 培养基 参照赵小兰等<sup>[6]</sup>根癌菌分离方法, 分离、纯化病原菌使用 MW 培养基, 活化及保存病原菌用 YEB 培养基。

MW 培养基: 甘露醇 10.0g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3 g, NaNO<sub>3</sub> 5.0g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g, NaCl 2.0 g, 生物素 100 μg, 0.1 % Fe<sub>2</sub>EDTA 2 mL, 琼脂 20.0 g, 0.1 % 结晶紫 2.0 mL, 加蒸馏水至 1 000 mL, pH 7.0~7.2。

YEB 培养基: 酵母浸提物 1g, 牛肉浸膏 5 g, 蛋白胨 5g, 蔗糖 5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, 加蒸馏水至 1 L, 琼脂 15 g 或不添加, pH 7.8。

1.2.3 病原菌分离 冠瘿分离: 参照马德钦<sup>[7]</sup>的方法, 取蓝莓根癌瘤内部新鲜组织, 75 % 乙醇表面灭菌 1 min, 无菌水清洗 3 次, 置于已灭菌的 1.5 mL 离心管中, 加少量无菌水混合, 捣碎, 静置。取离心管中上清原液

\* 基金项目: 农业部、科技部公益性行业科研专项 (nyhyzx07-028), 辽宁省百千万人才工程项目 (20089211100), 辽宁省博士启动基金 (20081069)

作者简介: 傅俊范, 男, 博士, 教授, 从事药用植物病理学及真菌病害研究。

收稿日期: 2010-10-13

网络出版时间:

1.5mL, 按 1, 100, 1 000, 1 万倍梯度稀释,然后各取 120 μL 置于 MW 培养基平板上,用刮铲涂匀。28 °C 培养箱中培养 3~75 d。挑取表面光滑、圆形突起的典型根癌土壤杆菌菌落,置于 YEB 试管斜面上培养,28 °C 培养 3~75 d。

土样分离:称取土样0.5 g,加入20 mL无菌水中,涡旋振荡,静置,取上清液,按10, 100, 1 000, 1 万倍梯度稀释,然后各取120μL于MW培养基平板上,用刮铲涂匀。分离的菌株培养及保存方法同上。

### 1.3 致病性测定

将分离得到的菌株分别接种于YEB液体培养基中,在摇床上振荡培养过夜,然后制备浓度为 $1 \times 10^9$  cfu/mL的菌悬液。选取无菌培养的2年生蓝莓幼苗,于根部及根颈部针刺接种,以蘸取菌悬液的脱脂棉包裹伤口并保湿。以无菌水接种处理为阴性对照。每个处理接种5株蓝莓苗,接种后将苗置于28 °C、4000 lx光照条件下培养。3个月后观察肿瘤的生长情况。根据柯赫氏法则,对发病根部进行再分离,通过菌株生理生化特征判断分离得到的病菌是否与原接种菌株相同。

### 1.4 菌株种的鉴定

1.4.1 标准菌株 标准菌株为 IAM13129 (根癌土壤杆菌 *Agrobacterium tumefaciens*)、IAM13570 (发根土壤杆菌 *Agrobacterium rhizogenes*)、IAM13569 (悬钩子土壤杆菌 *Agrobacterium rubi*) 和 IAM14140 (葡萄土壤杆菌 *Agrobacterium vitis*)，购自北京普通微生物菌种保藏管理中心。

1.4.2 供试菌株生理生化(种)鉴定 将筛选出的致病菌株与标准菌株进行下列生理生化测验:革兰氏染色,35 °C生长,2%NaCl生长,3-酮基乳糖测验,甲基红反应,V-P反应,氧化酶反应,淀粉酶反应,柠檬酸铁铵营养液测验,柠檬酸盐利用测验,赤藓糖产酸,乙醇产酸,丙二酸盐产碱。参考《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[8]</sup>、N.W.Schaad方法<sup>[9]</sup>进行菌株种的鉴定。

1.4.3 供试菌株 16S rDNA 序列分析 根据致病性试验结果,采用细菌基因组 DNA 小提试剂盒对致病菌株进行 DNA 提取。16S rDNA 的 PCR 引物选用 *E.Coli*16S DNA 基因序列保守区域的序列,正向引物 P1: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGA ACG AAC GCT-3'。反向引物 P6: 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT TCA CCC C-3'。加入 PCR 反应其他成分,反应体系为 50μL。PCR 反应条件:94 °C 3 min;94 °C,30 s,55 °C,30 s,72 °C,1min,30 个循环;72 °C,5min。16S rDNA PCR 产物由南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。将测序后的序列在 NCBI

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中进行比对。

## 2 结果与分析

### 2.1 发病调查

2009年4月对辽宁、吉林和山东的蓝莓苗圃及生产园进行根癌病发病调查,结果发现蓝莓根癌病多见于苗圃及酸度不适的生产园中,蓝莓根癌病发病株率一般为0%~5.0%,在园内以聚集分布为主。该病原菌数量在土壤中逐年增加,发生呈逐年加重趋势。

田间调查发现,根癌发病早期,在苗木根部出现小的表面粗糙的白色或者肉色瘤状物隆起(图1)。根癌病发生后影响植株根系,造成植株发育不良,发育受阻。



图1 蓝莓根癌病瘤状物

Fig. 1. Root symptom of blueberry

### 2.2 蓝莓根癌组织中病原菌的分离

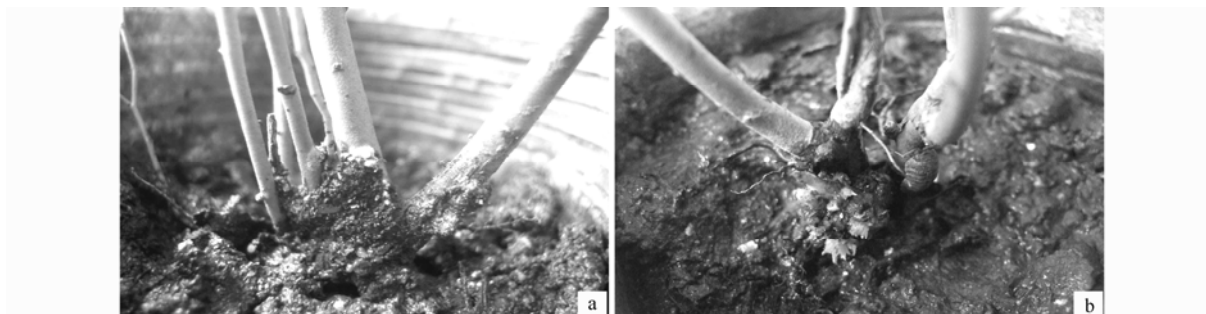
在土壤杆菌选择性培养基MW平板上,从采集的57份蓝莓植株冠瘿瘤和10份土样中分离得到42株分离物(表1),分离物具有典型的土壤杆菌菌落形态,菌落呈圆形突起,灰白色,边缘整齐。菌体杆状,鞭毛周生1~4根。纯化的菌株在YEB培养基斜面上活化培养后于4 °C冰箱中保存备用。

### 2.3 致病性回接检测

用分离获得的蓝莓根癌菌株,采用针刺涂抹法进行致病性检测。以病原菌株针刺接种2年生蓝莓(蓝丰)幼苗,培养20d后,在接种部位(根、根茎)长出不规则瘤状突起(图2-a),对照蓝莓植株的接种部位无瘤状突起。2个月后,瘤状突起逐渐增大,形成明显的冠瘿瘤(图2-b),对照蓝莓植株无肿瘤形成。对分离的42株蓝莓根癌病菌进行检测,其中19株蓝莓根癌菌株具有致病性(表1)。

表 1 供试蓝莓根癌病原菌株编号及致病性测定  
Table 1. Isolations and their pathogenicity test of blueberry

细菌菌株编号 Number	蓝莓品种或土样 Cultivar or soil sample	采集地点 Location	致病性 Pathogenicity
xjs055	北村	辽宁省大连市庄河市蓝莓园	有
xjs057	北村	辽宁省大连市庄河市蓝莓园	无
xjs060	北村	辽宁省大连市庄河市蓝莓园	无
xjs063	北村	辽宁省大连市庄河市蓝莓园	无
xjs064	北村	辽宁省大连市庄河市蓝莓园	无
xjs072	北陆	辽宁省丹东市宽甸县蓝莓园	有
xjs073	北陆	辽宁省丹东市宽甸县蓝莓园	无
xjs076	北陆	辽宁省丹东市宽甸县蓝莓园	无
xjs077	北陆	辽宁省丹东市宽甸县蓝莓园	无
xjs124	美登	黑龙江尚志市乌吉密乡蓝莓园	无
xjs127	美登	黑龙江尚志市乌吉密乡蓝莓园	无
xjs134	土样	辽宁省丹东市宽甸县蓝莓园	有
xjs135	土样	辽宁省大连市庄河市蓝莓园	无
xjs138	土样	辽宁省大连市庄河市蓝莓园	无
xjs148	土样	辽宁省大连市庄河市蓝莓园	无
xjs149	土样	辽宁省大连市庄河市蓝莓园	无
xjs192	北村	吉林省白山市靖宇县蓝莓园	有
xjs195	北村	吉林省白山市靖宇县蓝莓园	有
xjs203	北村	吉林省白山市靖宇县蓝莓园	有
xjs214	北村	吉林省白山市靖宇县蓝莓园	无
xjs216	北村	吉林省白山市靖宇县蓝莓园	无
xjs217	北村	吉林省白山市靖宇县蓝莓园	有
xjs219	北村	吉林省白山市靖宇县蓝莓园	无
xjs220	北村	吉林省白山市靖宇县蓝莓园	无
xjs224	北村	吉林省白山市靖宇县蓝莓园	有
xjs229	北村	吉林省白山市靖宇县蓝莓园	有
xjs230	北村	吉林省白山市靖宇县蓝莓园	有
xjs327	蓝丰	辽宁省沈阳市农业开发院	有
xjs328	蓝丰	辽宁省沈阳市农业开发院	无
xjs329	蓝丰	辽宁省沈阳市农业开发院	无
xjs377	蓝丰	辽宁省沈阳市农业开发院	有
xjs378	蓝丰	辽宁省沈阳市农业开发院	有
xjs379	蓝丰	辽宁省沈阳市农业开发院	有
xjs380	蓝丰	辽宁省沈阳市农业开发院	有
xjs381	蓝丰	辽宁省沈阳市农业开发院	有
xjs390	蓝丰	山东省泰安市山东果树研究所	无
xjs391	蓝丰	山东省泰安市山东果树研究所	有
xjs392	蓝丰	辽宁省沈阳市农业开发院	有
xjs393	蓝丰	辽宁省沈阳市农业开发院	有
xjs394	蓝丰	辽宁省沈阳市农业开发院	无
xjs395	蓝丰	辽宁省沈阳市农业开发院	无
xjs396	蓝丰	辽宁省沈阳市农业开发院	无



a. 20 d; b. 60 d

图2 蓝莓根癌病致病性回接结果

Fig. 2. Pathogenicity test on blueberry

2.4 菌株种（原生物型）的鉴定

2.4.1 供试菌株生理生化鉴定 对19株供试菌株和4株标准菌株进行的生理生化测验结果见表2，供试的19株菌株均能在35℃、2%NaCl条件下生长，3-酮乳糖、氧化酶反应、柠檬酸铁铵测验、乙醇产酸反应呈阳性，甲基红反应、V-P反应、淀粉水解、柠檬

酸盐利用、赤藓糖产酸、丙二酸盐产碱反应呈阴性。这与标准菌株IAM13129(*Agrobacterium tumefaciens*)生理生化反应一致。因此，基本确定蓝莓根癌根癌病的病原菌为根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)。

表2 蓝莓根癌菌生理生化测验结果

Table 2. Biochemical characters of test isolations from blueberry

测试项目 Item tested	供试菌株 Isolate tested	标准菌株 Reference isolate			
		IAM13129	IAM13570	IAM13569	IAM14140
革兰氏染色 Gram stain	G-	G-	G-	G-	G-
35℃生长 Growth of 35℃	+	+	-	+	+
2%NaCl Growth of 2%NaCl	+	+	-	+	-
3-酮乳糖 3-Ketolactose production	+	+	-	-	-
甲基红反应 Methyl red test	-	-	+	-	-
V-P反应 V. P test	-	-	-	-	-
氧化酶反应 Oxydase reaction	+	+	-	+	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	-	-	+	+	+
柠檬酸铁铵测验 Ammonium iron citrate test	+	+	-	-	-
柠檬酸盐利用 Utilization of citrate	-	-	+	-	+
赤藓糖产酸 Metabolized erythrose	-	-	+	+	-
乙醇产酸 Metabolized ethanol	+	+	-	-	-
丙二酸盐产碱 Metabolized malonate	-	-	+	+	+

注 Note: “+”.阳性反应 Positive; “-”.阴性反应 Negative; “G-”.革兰氏阴性反应 Gram-negative

2.4.2 菌株16S rDNA序列分析 以xjs327菌株的总DNA为模板，以16S通用引物进行PCR扩增，将PCR产物委托南京金斯瑞生物科技有限公司采用末端中止法进行正反方向测序，获得1336bp的序列。通过与GenBank中的核酸数据进行对比分析，结果表明xjs327 (GenBankHQ878443)的16S rDNA序列与根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) ATCC19358同源性达到100%，从分子生物学角度进一步证实了蓝莓根癌病菌菌株为根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)。

3 讨论

蓝莓根癌病是目前中国蓝莓产业中最主要的病害，极大地限制了蓝莓产业的发展。本研究从蓝莓根癌病组织中成功分离病原菌，并对其进行了鉴定，明确了蓝莓根癌病的病原菌为*Agrobacterium tumefaciens*。蓝莓根癌病菌分类地位的确定可为今后该病原菌的深入研究和有针对性地防治提供一定的理论依据。

目前在国内尚未见有关蓝莓根癌病病原生物学特性、发病规律和防治技术的系统研究报道。该病害侵染过程及侵染循环不详，生产中缺乏防治该病的理

论依据。为促进蓝莓种植产业的健康发展，应尽快开展有关蓝莓根癌病病原学、发病规律及防治技术的系统研究，为蓝莓根癌病的生物防治提供科学依据。

参考文献：

[1] Sule S. Biotypes of *Agrobacterium tumefaciens* in Hungary[J]. Bacteriol, 1978, 44: 207-213.

[2] Perry K L, Kado C I. Characteristics of Ti plasmids from broad-host-range and ecologically specific biotype 2 and 3 strains of *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Bacteriol, 1982, 151: 343-350.

[3] Lele V C, Durgapal J C, Agarwal D K, et al. Crown and root gall of grape (*Vitis vinifera*) in Andhra Pradesh[J]. Current Science, 1978, 47: 280.

[4] De Cleene M, Deley J. The host range of crown gall[J]. Bot Rev, 1976, 42: 389-466.

[5] 傅俊范, 严雪瑞, 李亚东. 小浆果病虫害防治原色图谱[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 66.

[6] 赵小兰, 赵梁军. 月季根癌病原菌分离及抗病资源初步筛选[J]. 植物保护, 2006, 32(6): 54-58.

[7] 马德钦, 林应锐, 周娟, 等. 我国啤酒花根癌土壤杆菌的初步研究[J]. 微生物学通报, 1985, 27(1): 37-42.

[8] R·E·布坎南, N·E·吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第9版. 北京: 科学出版社, 1994: 729-758.

[9] Schaad N W. 植物病原细菌鉴定实验指南[M]. 张克勤, 译. 贵阳: 贵州人民出版社, 1986: 28-40.