

文章编号: 100F-1498(2002)05-0599-05

# 猕猴桃根癌病原与发病规律研究

宋晓斌, 张学武, 马松涛

(西北农林科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** 本文分离和培养了猕猴桃根癌病的病原菌; 研究和观察了病原菌的生理生化特性和病原菌的形态; 调查了猕猴桃根癌病的发生与树龄、土壤、品种和管理水平的关系。结果表明猕猴桃根癌病的病原菌为根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)。病害在碱性和粘重的土壤中发生严重, 在酸性土壤中不发病。管理水平高的栽培园病害发生轻, 管理水平低、地下害虫发生严重的栽培园发生较重。

**关键词:** 猕猴桃; 根癌病; 冠瘿病; 病原细菌; 发病规律

中图分类号: S763.113 S663.4

文献标识码: A

根癌病又称冠瘿病, 在核果类林木上比较常见<sup>[1]</sup>, 近年来, 在猕猴桃上发现了根癌病, 这是迄今为止发现的为数不多的浆果类藤本植物根癌病<sup>[2]</sup>。在学术和生产上有一定的研究价值。为此从1997年开始, 对猕猴桃的根癌病进行了调查和研究, 现将结果报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 分离培养和接种

1997年在陕西眉县园艺场调查猕猴桃病害时, 发现了猕猴桃根癌病, 罹病植株为秦美(*Actinidia deliciosa* C.F.Liang cv. "Qimmei")。取回病组织, 用自来水冲去表面泥土, 观察记录根部症状特征, 同时在病健相交处切取1小块组织, 以无菌水漂洗, 在70%的酒精中浸泡5 min, 再用1%的新洁尔灭进行表面消毒, 用无菌水冲洗干净后, 植于PDA培养基上, 置23℃下培养24 h, 而后观察菌落形态。所分离的菌落配制成 $3.1 \times 10^4$  个·mL<sup>-1</sup>的菌悬液, 用接种环在平面培养基上划“Z”形线, 培养24 h后观察菌落形态的一致性。

取菌悬液在猕猴桃植株根上擦伤涂抹接种, 接种的品种为秦美亚特(*A. deliciosa* cv. "Yate")、秦翠(*A. deliciosa* cv. "Qingcui"), 各品种接种3株, 在室温条件下, 置于直径为30 cm、底部有孔的玻璃缸中栽培, 15 d后开始观察根部是否结瘤。在秋季把根癌病的病组织用经过消毒的土壤埋于盆栽的健康植株根周围, 健康植株的根部作轻微的擦伤处理, 对植株进行日常管理, 翌年观察树冠的变化, 待树冠出现异常时观察植株根部的症状。根据试验结果推断病原菌的致病性和侵染循环规律。

### 1.2 病原菌和观察

用培养24 h的细菌制作菌体观察玻片。鞭毛、荚膜、芽孢染色分别按参考文献[3]进行,

收稿日期: 2001-08-10

基金项目: 陕西省林业厅研究课题“猕猴桃主要病害防治技术研究”(9710)资助

作者简介: 宋晓斌(1962), 男, 陕西武功人, 副研究员, 主要从事林木病害研究。

用 Olympus BH 型显微镜观察。把培养 24 h 的菌落连同培养基切成 2.5 mm × 2.5 mm × 2.5 mm 大的方块, 在 40% 的戊二醛液中固定 4 h, 然后置 PBS 液缓冲浸渍 15 min, 弃去 PBS 液, 然后分别在 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇中各脱水 15 min, 最后在 100% 的乙醇中脱水 20 min。而后置菌块于载栏中, 在普通干燥器中干燥 24 h, 再置于临界点干燥器中干燥 30 min, 取出粘台并喷金, 置于扫描电镜下观察记录。

### 1.3 病原菌的理化特性

把分离的菌株分别在 15.0、20.0、21.5、22.0、22.5、23.0、23.5、25.0、30.0、35.0 °C 温度下培养观察病原菌生长的温度范围; 同时做碳水化合物(包括葡萄糖、蔗糖、半乳糖、乳糖)产酸、过氧化氢酶、尿酶测试、淀粉和纤维素分解、硝酸盐利用、有机酸盐产碱试验, 用对照菌同时做以上内容试验。对照菌根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn) 由原陕西省林科所病理组从典型的桃树(*Amygdalus persical* L.) 根癌病病、健相交组织上分离而得, 同时完成鉴定; 利用猕猴桃根癌病原菌和对照菌分别制备血清, 并互相交替做凝集试验。

### 1.4 发病与相关因素调查

在发病程度不同的猕猴桃园中, 通过土壤剖面观察不同深度的土壤特性, 对比不同发病情况的土壤特征。包括土壤酸度、土壤结构、土壤成分, 分析研究发病与土壤之间的关系。同时调查不同品种之间发病率和程度的差异。病害按(表 1)

表 1 猕猴桃根癌病的分级标准

病级	病级代表值(x)	罹病侧根占总侧根数的百分率 X / %	地上部分参考指数
I	0	X = 0	新老叶片均正常
II	1	0 < X ≤ 15	个别小叶黄化
III	2	15 < X ≤ 30	叶、果小, 并伴缺素症
IV	3	30 < X ≤ 45	缺素症并伴萎蔫
V	4	X > 45	死亡

的标准进行分级, 感病指数的计算按下面公式进行。

$$\text{感病指数} = \frac{\sum_0^4 x y_i}{x_{\max} \cdot \sum y_i}$$

$x_i$  为病级代表值

$y_i$  为  $x_i$  对应病级的调查数。

## 2 结果与分析

### 2.1 症状

发病初期主要在侧根和主根上形成球形或近球形的多个瘤体, 乳白色至红白色, 表面光滑, 多个瘤体汇合后呈不规则根瘤, 并变为深褐色, 表面粗糙, 质地较硬。有些瘤体中间有裂痕。罹病植株根系吸收功能受阻, 叶片发黄, 叶子和果实均较小, 经过一段时间后, 植株因缺乏必要的营养而死亡。

### 2.2 病原菌形态特征

病原菌在 PDA 培养基上的菌落为乳白色, 表面光滑有光泽。在光学显微镜下菌体为短杆状, 具荚膜, 无芽孢。在扫描电镜下, 可清晰地看到病原细菌为短杆状, 有些近卵状, 大小为 1.2 ~ 5.0 μm × 1.0 ~ 1.6 μm, 多数无鞭毛, 有些菌体鞭毛清晰可见(见图 1), 鞭毛着生处凹陷呈窝状。

### 2.3 病原菌的致病性、侵染循环及传播途径

用所分离的猕猴桃根癌病的病原菌对 12 株猕猴桃根部接种, 结果从第 54 d 开始到第 98 d, 12 株猕猴桃的根部均有根癌病症状产生, 其中最先和最后现出病状的品种都是秦美, 表明所分离的病原细菌对猕猴桃具有侵染能力, 具有致病性, 一般潜育期在 54 d 以上。病残体接种后, 在第 2 a 的夏季植株的叶部出现退绿显现和不同程度的萎蔫现象, 地下根部有瘤产生, 可以判断猕猴桃根癌病病原细菌在瘤组织的皮层中存活和越冬, 树木死亡后, 病原菌在崩解的病残体和土壤中越冬, 在地温达到一定温度时可通过根部的伤口侵入<sup>[1]</sup>, 病菌在侵入猕猴桃根部以后, 寄主的发病机理与其它木本植物根癌病发病机理相似, 根癌病菌体中的 Ti 质粒的一段基因会整合到猕猴桃的基因组中, 从而使猕猴桃脱离正常的代谢途径, 使正常的细胞转变为具有无限增生的癌肿细胞<sup>[4]</sup>。流水和地下害虫都能传播病菌, 作业的创伤和害虫危害的伤口是病原菌侵入的必要条件<sup>[2]</sup>。

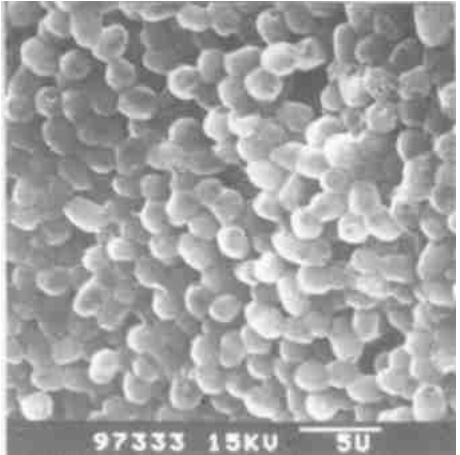


图 1 电镜下的猕猴桃根癌病病原细菌

### 2.4 病原菌的理化性质

病原菌的理化特性结果表明(见表 2), 猕猴桃根癌病的病原细菌能够利用碳水化合物产酸, 过氧化氢酶、尿酶测试均为阳性反应, 可以利用硝态氮, 能够利用柠檬酸钠产碱, 但不能分解淀粉和纤维素。温度测试表明(见表 3), 该病原菌在 35.0、15.0 °C 时能够生长, 22.5 °C 时生长最好。不同 pH 值条件下培养结果表明(见图 2), 该病原菌的最适 pH 值范围为 6.0 ~ 6.5。对照菌的理化特性与病原菌的一致。

表 2 病原菌的理化特性测试

测试内容	测定结果	
	根癌病病菌	对照菌
葡萄糖	+	+
蔗糖	+	+
半乳糖	+	+
乳糖	+	+
过氧化氢酶	+	+
尿酶	+	+
壳聚糖	-	-
甘露聚糖利用	-	-
水解淀粉	-	-
分解纤维素	-	-
硝酸铵	+	+
利用柠檬酸钠产碱	+	+

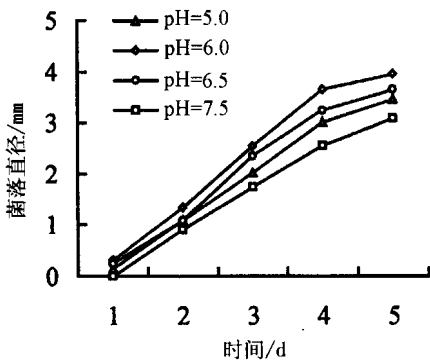


图 2 不同 pH 值菌落生长曲线

表3 病原菌在不同温度下生长比较(菌落大小)

mm

培养时间/h	温度/℃									
	15.0	20.0	21.5	22.0	22.5	23.0	23.5	25.0	30.0	35.0
24	-	-	-	0.15	0.31	0.24	-	-	-	-
48	0.53	0.71	0.81	1.04	1.54	1.08	0.87	0.72	0.59	0.51
72	1.01	1.36	1.63	1.92	2.40	1.97	1.69	1.38	1.06	0.87
96	1.59	2.08	2.34	3.46	3.65	3.15	2.46	2.22	1.64	1.36
108	2.28	2.17	2.81	3.78	3.92	3.86	3.28	2.85	2.44	1.82

## 2.5 血清学测试

以病原菌为抗原制备的血清点上对照菌的悬液, 40 min 后有凝集带产生。以对照菌为抗原制备的血清点上猕猴桃根癌病的病原菌后, 同样在 40 min 后产生了凝集带, 说明猕猴桃根癌病原细菌和对照菌是同一种细菌, 即根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Coon)。

## 2.6 发病因素

2.6.1 发病与土壤 不同土壤调查(见表4)表明, 在粘重的碱性土壤上所建的猕猴桃园, 根癌病的发生率为 5.8%, 感病指数为 3.6; 而在透气性好的酸性土壤上所建的猕猴桃园, 没有根癌病发生。说明碱性和粘重土壤有利于根癌病的发生, 酸性和透气性好的土壤对根癌病的发生有一定的抑制作用。这一结果与根癌病在核果类植物上发生特点相吻合<sup>[5]</sup>。

表4 不同土壤类型根癌病发生比较

调查地点	土壤类型	土壤 pH 值	各病级代表值对应株数					发病率/%	感病指数
			I	II	III	IV	V		
眉县园艺场	粘土	7.6	98	1	2	2	1	5.8	3.6
周至马召	褐土、石渣土	6.3	96	0	0	0	0	0	0
杨凌夏家沟	娄土	7.3	85	1	1	0	0	2.3	0.86

2.6.2 发病与树龄 对不同树龄猕猴桃园根癌病的发生情况调查结果(如图3)表明, 根癌病的发生与树龄有一定的关系, 树龄愈大根癌病的发生愈严重。这是因为随着树龄的增大, 猕猴桃根接触病原菌的机会也多, 感染根癌病的可能性也就越大。另外, 随着树龄的增大, 特别是进入盛果期以后, 猕猴桃的树体的树势也逐渐衰弱, 病原菌侵入成功率也会增高。

2.6.3 发病与品种 对秦美、亚特、秦翠几个品种根癌病的发生情况调查表明(见表5), 品种秦美、亚特和秦翠根癌病的发生率分别为 1.28%、1.43% 和 1.20%, 经过差异性检验表明, 在这 3 个品种之间, 根癌病的发生无

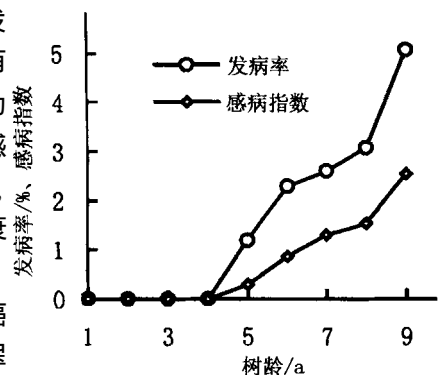


图3 根癌病的发生与树龄的关系

显著性差异。另外每个品种接种的 3 株均有根癌病症状出现, 这一结果也说明了在品种间, 猕猴桃根癌病的发生无明显的差异。这是因为无论什么品种都是以野生的中华猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch.) 的实生苗为砧木嫁接而成的, 接穗可能对砧木的抗病性无明显的影响。

2.6.4 发病与管理水平 通过对不同管理水平猕猴桃栽培园发病情况的调查发现,根癌病的发生与管理水平的高低有一定的关系,在耕作次数少、地下害虫发生轻的碱性土壤中,猕猴桃根癌病发生少,而在耕作次数多的碱性土壤中,猕猴桃发病相对较多。这是因为耕作次数多猕猴桃根受伤害的机会多,地下害虫多时根受害的机会也多,为根癌病病原菌的侵入创造了较多的机会。

### 3 小结

猕猴桃根癌病是由根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)引起的病害,生理生化方面的试验和病原菌的形态观察结果说明:猕猴桃根癌病的病原菌与其它核果类根癌病的病原菌相同,在有关根癌病的报道中核果类木本植物是主要的患病类群,作为藤本植物的猕猴桃患根癌病的报道甚少。该病的发生与土壤条件有很大的关系,碱性土壤和粘重土壤都有利于病害的发生,酸性土壤不利于发病,在目前栽植的几个品种之间根癌病的发生差异不明显,管理得比较好的栽培园根癌病的发生较轻,在频繁耕种和地下虫害发生严重的栽培园中,猕猴桃根癌病的发生相对较重。因此在建园和管理上都应该考虑根癌病的发生,避免在碱性土壤和特别粘重的土壤上建园,猕猴桃栽培园应该建在微酸性的土壤上,在管理上应该避免伤根和防治地下害虫。

#### 参考文献:

- [1] 中国农业百科全书总编辑委员会. 中国农业百科全书,植物病理学卷[M]. 北京:中国农业出版社,1996. 192-193
- [2] 林业部野生动物和森林植物保护司,林业部森林病虫害防治总站. 中国森林植物检疫对象[M]. 北京:中国林业出版社,1996. 129-138
- [3] 范秀容,沈萍. 微生物学实验[M]. 北京:人民教育出版社,1980. 20-24
- [4] 朱玉贤,李毅. 现代分子生物学[M]. 北京:高等教育出版社,1997. 441-448

## Studies on the Pathogen and Pathogenesis Regularity of Root Cancer in Kiwifruit

SONG Xiao-bin, ZHANG Xue-wu, MA Song-tao

(Forestry College, Northwest Science & Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, Shaanxi, China)

**Abstract:** This paper deals with isolation and cultivation of the pathogen of crown gall in kiwifruit, and studies the morphological, physiological, biochemical and serological characteristics of the pathogen. The relationship between occurrence of the disease and the ages of tree, soil, cultivars and the lever of management is investigated. The results show that the pathogen of crown gall is *Agrobacterium tumefaciens*, and the occurrence of the disease is severer in alkaline soil and clay than in acid soil, and severer in bad managed orchard than well-managed orchard.

**Key words:** kiwifruit; *Agrobacterium tumefaciens*; crown gall; pathogenic bacteria; pathogenesis regularity

表5 不同品种猕猴桃根癌病发生调查

品种	病级代表值对应的株数					发病率/ %	感病 指数
	I	II	III	IV	V		
秦美	77	0	1	-	-	1.28	0.64
亚特	69	1	0	0	0	1.43	0.36
秦翠	82	1	0	0	0	1.20	0.30