

北京郊区根癌土壤杆菌生物型及质粒类型的鉴定

张静娟 那淑敏 余茂勋 相望年

(中国科学院微生物研究所, 北京)

我们从北京郊区桃树、山桃树、梨树、毛白杨上采集到的 26 个冠瘿中, 分离并鉴定出 6 株根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)。通过对向日葵、蕃茄幼苗、落地生根的致瘤试验; 在乳糖培养基上 3-酮基乳糖的生成; 石蕊牛奶反应; 碳源利用; 在 Clark 和 New 与 Kerr 两种选择性培养基上的生长以及对向日葵、烟草冠瘿组织中 Opine 类物质种类的鉴定, 证明: 一、从桃树冠瘿中分离的根癌土壤杆菌 Pp-5、Pp-6 两株和从梨树冠瘿中分到的 Py-10 菌株均属生物 I 型, 质粒属 Nopaline 类型; 二、从山桃树冠瘿分到的 Pt-7 菌株属生物 I 型, 质粒为 Octopine 类型; 三、从北京东北旺毛白杨分到的 Pt-12 菌株属生物 I 型, 质粒为 Agropine 类型; 四、从大兴县毛白杨冠瘿分到的另一菌株 Pt-25 属生物 I—II 中间型, 质粒为 Nopaline 类型。

关键词 根癌土壤杆菌生物型; Ti 质粒类型; Opines; 毛白杨根癌病; 山桃根癌病。

根癌土壤杆菌 [*Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Town.) Conn]^[1] 是植物冠瘿病的病原细菌。从不同地区、寄主分离的一些菌株, 有时在营养要求、血清学、生化反应、寄主范围、毒力等方面表现明显差异。Panagopoulos^[2] 和 Keane^[3] 等根据这些差别, 将根癌土壤杆菌分为三种生物型: 生物 I 型、生物 II 型和生物 III 型。这一观点已得到很多学者的承认。这对我们研究根癌土壤杆菌的分类、生态、寄生性等都有一定意义。

自从 1974 年 Zaenen 等^[4]、Watson 等^[5] 发现根癌土壤杆菌中的 Ti 质粒和它的作用后, 近十年来关于 Ti 质粒结构与功能以及用 Ti 质粒作为植物基因工程运载体的研究, 引起人们的广泛兴趣和高度重视。可以说, Ti 质粒是目前植物基因工程中研究得最集中并且可能是最有前途的一种运载体。植物冠瘿中合成的一类特异化合物, 60 年代 Morel^[6,7] 等把它称为 Opine, 现已证明系由根癌土壤杆菌 Ti 质粒上的

基因编码指导合成的。这种在冠瘿中所合成的 Opine 族化合物, 不仅可用以鉴定 Ti 质粒的类型, 同时也是植物基因工程中可作为转化细胞的一种有用遗传标记。

根癌土壤杆菌的寄主范围很广, 根据 De Cleene 与 De Ley^[8] 温室接种试验, 它可以侵染隶属于 93 科 331 属的 643 种高等植物, 其中绝大多数是双子叶植物。在自然情况下, 桃、梨、苹果、杏、李等果树较易感病, 冠瘿病已是这些果树的常见病。在国内虽然对桃、樱桃、李、苹果等冠瘿病已有报道^[9,10], 但对这些病原细菌的生物学特性还缺乏系统的研究。本文报道 1982 年来我们从北京郊区桃树、山桃树、梨树、毛白杨的冠瘿中分离到的六株根癌土壤杆菌的生物型、质粒类型方面的初步研究结果。

本文于 1983 年 8 月 8 日收到。

本所蔡妙英、陈玉梅、马德钦、田颖川、周坚同志协助部分工作; 美国 John Innes 研究所 J. L. Firmin, 博士, 中国科学院遗传所李向辉, 植物所杜千有供给部分 Opine 标准样品, 在此一并致谢。

材料和方法

(一) 实验菌株和来源

1. 根癌土壤杆菌 Pp-5 和 Pp-6, 从桃树 (*Prunus persica*) 冠瘿中分离。采自北京东北义园和圆明园。

2. 根癌土壤杆菌 Pd-7, 从山桃 (*P. davidiana*) 冠瘿中分离。采自北京东北义园管理处。

3. 根癌土壤杆菌 Py-10, 从梨树 (*Pyrus* sp.) 冠瘿中分离。采自北京香山公园。

4. 根癌土壤杆菌 Pt-12 和 Pt-25, 从毛白杨 (*Populus tomentosa*) 冠瘿中分离。分别采自北京东北旺苗圃和大兴县苗圃。

5. 对照菌: C58, 已知含有 120×10^6 Ti 质粒的根癌土壤杆菌。由中国科学院植物研究所吴玉华同志赠给。

(二) 培养基

1. 分离培养基: 采用 Kado 与 Heskett 的 D₁ 培养基^[11]; 李英与王钧的 DYL 培养基^[12]。

2. 土壤杆菌生物型选择培养基: 采用 Clark 的生物 I 型选择培养基^[13]; New 与 Kerr II 型选择培养基^[14]。

3. 普通生长培养基: 采用 Zaenen 等人的 YEB 培养基^[4]; 李英与王钧的 DYL 培养基^[12]。液体培养用 YEB 培养基。

(三) 分离方法

将新采集的植物冠瘿, 用水洗去表面泥土, 再用 70% 乙醇表面消毒。取部分组织在无菌研钵中研碎, 加少量无菌水浸渍数小时, 取 10^{-4} 倍稀释液 0.1ml 涂在分离培养基皿上。28℃ 培养 3 天后, 根据根癌土壤杆菌在上述培养基上的菌落形态特征, 挑取单个菌落转移到普通培养基斜面。28℃ 培养 3 天后, 用无菌水制成每毫升约 10^9 个细胞的菌悬液, 在温室 (约 25℃) 接种向日葵、蕃茄、落地生根幼苗。再从上述植株所形成的冠瘿中分离细菌, 进行鉴定和其它试验。

(四) 接种试验

指示植物: 7—10 天的向日葵幼苗; 5—7 片真叶的蕃茄植株和落地生根幼苗。

接种物: 取在普通生长培养基斜面上, 于 28℃ 生长 3 天的培养物, 用无菌水制成 10^9 细胞/ml 的菌悬液。

接种方法: 用无菌注射器, 在植株茎部上中下三个不同部位刺伤。每种植物 1—3 株。对照用无菌水同样操作。连续观察三个月, 如未发病, 重复一次以决定细菌的致病性。

(五) 菌株的鉴定

1. 培养特征和生理生化特征: 除另行注明外, 一般试验采用土壤杆菌鉴定的常用方法^[15]。
3-酮基乳糖反应的测定采用 Bernaerts 和 De Ley 方法^[16]。乳酸盐和柠檬酸铁铵的利用实验根据 Kersters 法^[17]进行。赤藓糖醇和酒石酸钾利用试验参照 White 法^[18]进行。碳源利用的基本培养基为每升水中含 (g): 硫酸铵 2.0、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5、 K_2HPO_4 0.5、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1。碳源需过滤除菌后再加入。

2. 植物冠瘿瘤组织中 Opine 的测定: 采用本实验室修改的快速检测植物肿瘤组织中 Opine 的方法。简述如下:

(1) Octopine 和 nopaline 测定:

取待测试病瘤组织 0.1g, 在 Eppendorf 离心管中压碎, 离心取出汁液, 直接或通过减压浓缩后 (根据材料含水量决定浓缩步骤), 在 Whatman 1 号滤纸上进行电泳分离。电泳后用胍基特异的荧光显色试剂 (菲醌) 进行染色。用黄色或绿色滤光片在 246nm 波长的紫外灯下拍摄荧光斑点。电泳展开条件和显色参照 Otten 和 Schilperoort 测定 LpDH 活力的方法^[19]。

(2) Agropine 测定: 样品抽提和电泳分离过程同 Octopine 和 Nopaline。电泳后的显色参照 Trevelyan^[20] 等的硝酸银方法, 作了下列修改: 电泳后的纸谱通过新鲜配制的 1.7% AgNO_3 , 晾干后再通过 0.5N NaOH-乙醇溶液显色, 最后浸入 20% 硫代硫酸钠溶液除去本底氧化银。在室内自然光下拍摄棕褐色斑点。

测定中使用的参考样品: Octopine 为 Sigma 产品; Nopaline 为 Calbiochem-Behring Corp. 产品; Agropine 由 J. L. Firmin 实验室制备赠给。

3. Ti 质粒的分离和检测: 按照 Kado 和 Liu 的快速分离法^[21]。

结果和讨论

(一) 根癌土壤杆菌的分离与致病性

测定

我们从北京郊区桃树、山桃树、梨树和毛白杨上 26 个冠瘿中分离到一批根癌土壤杆菌, 通过对蕃茄幼苗致病测定、分离和接种, 得到六株纯化的根癌土壤杆菌 (Pp-5、Pp-6、Pd-7、Py-10、Pt-12、Pt-25), 作为进一步研究的材料(见图 1, 2)。

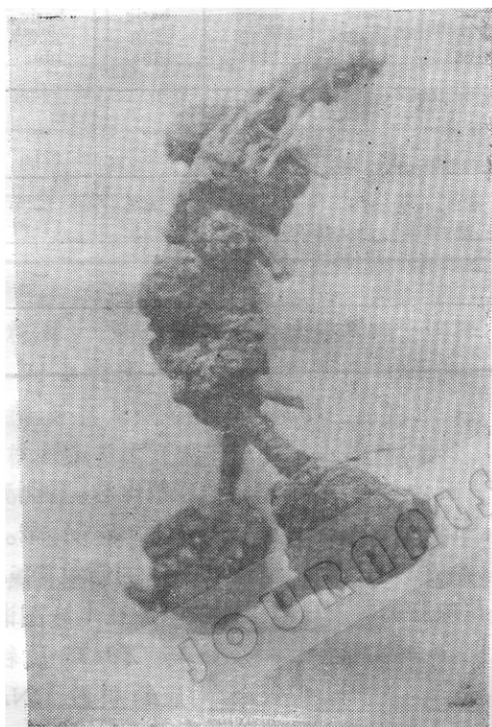


图 1 桃树地下根部的冠瘿瘤自然感染

Fig. 1 Crown gall tumors on underground roots of *Prunus persica* naturally infected

(二) 菌株的鉴定

1. 种的特征: 所试 6 株菌株都是好氧菌, 革兰氏阴性, 杆状, 细胞大小为 $0.5-0.7 \times 1.0-1.75 \mu\text{m}$ 。鞭毛侧生、能运动。不产孢子。菌落光滑, 无色, 粘性。在碳水化合物培养基上产生多糖粘液。氧化酶反应阳性。葡萄糖氧化型。在所试的向日葵、蕃茄、落地生根上都能致瘤。与 Bergey^[22]、Holmes^[23] 分类系统中的根癌土壤杆菌的描述一致。



图 2 Pp-6 菌株在落地生根上诱发的冠瘿瘤

Fig. 2 Tumors on *Kalanchoe* induced by *A. tumefaciens* Pp-6 a nopaline plasmid strain.

2. 生物型特征: 实验菌株 Pp-5、Pp-6、Pd-7、Py-10、Pt-12、Pt-25 在 Clark^[13] 生物 I 型培养基上生长良好, 在 New 与 Kerr^[14] 的生物 II 型培养基上都不生长。初步表明它们属于生物 I 型菌。进一步根据 Kersters^[17] 和 White^[18] 生物型分型方法测定的生理生化特性见表 1。表 1 指出, 菌株 Pp-5、Pp-6、Pd-7、Py-10、Pt-12, 在 3-酮基乳糖反应、石蕊牛奶反应和赤藓糖醇、酒石酸钾、乳酸盐、柠檬酸铁铵的利用等六项主要生理生化性状方面, 都与生物 I 型一致。Pt-25 仅在石蕊牛奶反应、赤藓糖醇和酒石酸钾利用方面与生物 I 型相同, 3-酮基乳糖反应、乳酸盐和柠檬酸铁铵利用却与生物 II 型相同。因此, 可以认为是 I-II 之间的中间型。

3. Ti 质粒的检测: 试验中以 C58 菌

表 1 六株根癌土壤杆菌生物型的鉴定特征

Table 1 Differential characters of biotypes of 6 strains of *Agrobacterium tumefaciens*

测 定 Test	菌 株 Bacterial strain	Pp-5	Pp-6	Pd-7	Py-10	Pt-12	Pt-25
3-酮基乳糖反应 Formation of 3-ketolactose		+	+	+	+	+	+
石蕊牛奶反应 Litmus milk 反应 reaction 颜色 color		碱性 basic 蓝色 blue	碱性 basic 蓝色 blue	碱性 basic 蓝色 blue	碱性 basic 蓝色 blue	碱性 basic 蓝色 blue	碱性 basic 蓝色 blue
在柠檬酸铁铵上形成棕色膜 Brown surface pellicle on ferric ammonium citrate medium		+	+	+	+	+	-
乳酸钠的利用 Use of sodium lactate		+	+	+	+	+	-
酒石酸钾的利用 Use of potassium tartrate		-	-	-	-	-	-
赤藓糖醇的利用 Use of erythritol		-	-	-	-	-	-

+ 阳性 Positive - 阴性 Negative

1 2 3 4 5 6 7



← Ti 质粒 Ti-Plasmid DNA a
← 染色体 Chromosomal DNA b

图 3 七株根癌土壤杆菌 Ti 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3. Agar gel electrophoresis of Ti-plasmid DNA from 7 strains of *A. tumefaciens* [0.7% 琼脂糖, 40mM Tris-NaAc, 2mM Na₂-EDTA (pH8.0) 缓冲液, 2V/cm, 16 小时]
1. Pp-5 2. Pp-6 3. Pd-7 4. Py-10 5. Pt-12 6. Pt-25 7. C58

a Ti 质粒 DNA Ti Plasmid DNA b 染色体 DNA 带 Chromosomal DNA (0.7% agarose gel, 40 mM Tris-NaAc, Na₂-EDTA (pH 8.0) buffer, 2V/cm, 16 h)

株为对照,通过琼脂糖凝胶电泳,鉴别测试的六个菌株有无 Ti 质粒 DNA 带。

图 3 为 6 个菌株和 C58 的质粒 DNA 在琼脂糖凝胶电泳上的结果。在电泳图谱上,6 株实验菌都有一条与 C58 Ti 质粒 DNA (约 120×10^6) 相对应的质粒 DNA 带(见图示中 a)。

4. 植物冠瘿瘤中 Opine 的测定: 按“材料和方法”一节中所述方法,检测了 Pp-5、Pp-6、Pd-7、Py-10、Pt-12 和 Pt-25 六个菌株在蕃茄幼苗上诱发的冠瘿瘤中所含的 Opine 类化合物。在 Pp-5、Pp-6、Py-10、Pt-25 4 个菌株诱发的冠瘿瘤中,测得了 Nopaline; 在 Pd-7 菌株诱发的冠瘿瘤中,测得了 Octopine 和 Agropine; 在 Pt-12 菌株诱发的冠瘿瘤中,测得 Agropine。根据这些结果,我们认为桃树、梨树、毛白杨(采自大兴县)根癌土壤杆菌 Pp-5、Pp-6、Py-10、Pt-25 四个菌株所含的 Ti

表 2 六株根癌土壤杆菌的生物型和质粒类型

Table 2 Biotype and plasmid type of 6 strains of *Agrobacterium tumefaciens*

菌株 Bacterial strain	生物型 Biotype	冠瘿中的 Opines Opines in tumors	质粒类型 Plasmid type	原 寄 主 Original host	采集地点 Collection locality
Pp-5	I	Nopaline	Nopaline	桃树 <i>Prunus persica</i>	北京东北义园果园 Dongbeiyiyuan orchard, Beijing
Pp-6	I	Nopaline	Nopaline	桃树 <i>P. persica</i>	北京圆明园果园 Yuanmingyuan orchard, Beijing
Py-10	I	Nopaline	Nopaline	梨树 <i>Pyrus</i> sp.	北京香山公园 Xiangshan Park, Beijing
Pt-25	I-II	Nopaline	Nopaline	毛白杨 <i>Populus tomentosa</i>	北京大兴县苗圃 Daxing nursery, Beijing
Pd-7	I	Octopine agropine	Octopine	山桃 <i>Prunus davidiana</i>	北京东北义园果园 Dongbeiyiyuan orchard, Beijing
Pt-12	I	Agropine	Agropine	毛白杨 <i>P. tomentosa</i>	北京东北旺苗圃 Dongbeiwang nursery, Beijing

质粒属于 Nopaline 类型；山桃根癌土壤杆菌 Pd-7 菌株所含 Ti 质粒属于 Octopine 类型；采自北京东北旺苗圃毛白杨的 Pt-12 菌株所含质粒则属于 Agropine 类型(表 2, 图 4-1, 4-2)。

张锡津等^[24]曾从毛白杨根癌病的瘤中分离并鉴定了病原细菌，他们没有对这株

根癌土壤杆菌的 Ti 质粒类型进行鉴定。我们将这一菌株（暂编号为 L₁）接种蕃茄幼苗，在诱发的冠瘿瘤中测到了 Opine，证明是 agropine (图 4-2)，与我们毛白杨的 Pt-12 菌株相同(表 2,图 4-2)。

以往对植物冠瘿瘤合成的 Opine 类化合物研究得较多的是六十年代发现的 Oc-

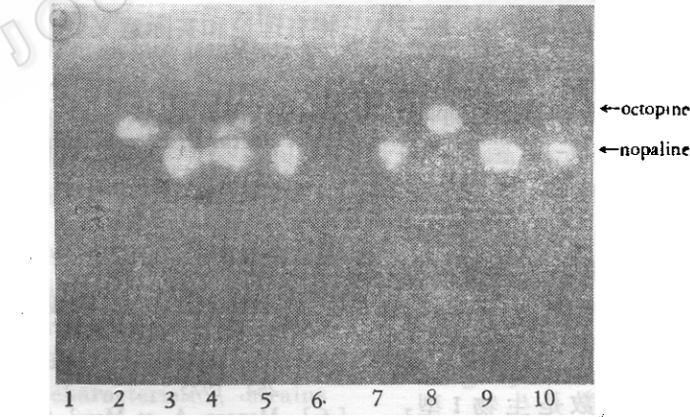


图 4-1 六株根癌土壤杆菌诱发的蕃茄幼苗冠瘿瘤中 octopine 和 nopaline 的纸电泳图
Fig. 4-1. Paper electrophoresis of octopine and nopaline in extracts of tomato tumors induced by 6 strains of *A. tumefaciens*.
1.健康植株 Normal plant tissue 2. Octopine标准品 Authentic octopine 3.Nopaline 标准品 Authentic nopaline 4. Octopine + nopaline Authentic octopine-nopaline 5. Pt-25; 6. Pt-12; 7. Py-10; 8. Pd-7; 9. Pp-6 10. Pp-5

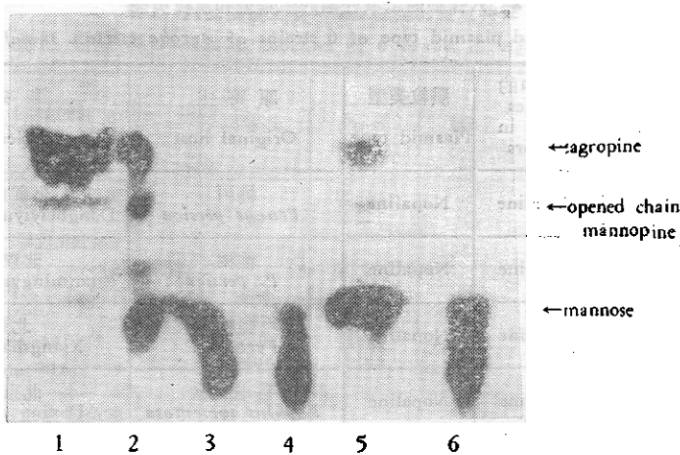


图 4-2 根癌土壤杆菌 Pt-12、Pt-7 和 L_1 诱发的蕃茄植株冠瘿瘤中 Agropine 的纸电泳图
Fig. 4-2 Paper electrophoresis of agropine in extracts of tomato tumors induced by 3 strains of *A. tumefaciens*. 1. Agropine 标准品 Authentic agropine 2. Pt-12; 3. 感病植株的健康部位 Normal tissue of an infected plant; 4. 正常植株 Normal plant 5. L_1 ; 6. Pd-7

topine 和 Nopaline 两类。1978 年英国的 Firmin 和 Fenwick^[25] 在 A6、B6、A66 菌株诱发的 Octopine 冠瘿瘤中,发现了一类新的 Opine 化合物,称作 Agropine。不久, Guyon 等^[26] 在原来没有测到 Nopaline 和 Octopine 的,被称为“空白型”(null-type)的 Bo542 菌株诱发的冠瘿瘤中,也测到了 Agropine。我们从山桃冠瘿中分到的 Pd-7 菌株,与 A6、B6、A66 菌株一样,它们诱发的冠瘿瘤同时合成 Octopine 和 Agropine; 而毛白杨冠瘿中分到的 Pt-12-菌株,与 Bo542 一样,诱发的冠瘿瘤只合成 Agropine。这两类根癌土壤杆菌在国内尚未见报道。

从表 2,图 4-1,4-2 可见,自北京郊区五个地点,四种植物(桃、山桃、梨、毛白杨)上采到的 26 个冠瘿瘤中分离到的六株根癌土壤杆菌,虽然大多数是生物 I 型,但它们分别含有三种不同类型的 Ti 质粒。尤其值得注意的是,从两个不同地点采集的毛白杨冠瘿中分到的两株根癌土壤杆菌,它们的生物型不同,所含 Ti 质粒类型也不同。目前我国杨树的冠瘿病发生较普

遍,毛白杨更易感病。迄今已知根癌土壤杆菌对植物的致癌性和它的寄主范围,是由 Ti 质粒上的基因决定的,不同菌株的 Ti 质粒可通过菌株的接合等方式进行转移。因此进一步研究我国经济植物上的根癌土壤杆菌及其 Ti 质粒的分子生物学和遗传学,对预防这些病害和植物基因工程将有理论和实际意义。

参 考 文 献

- [1] Smith, E. F. and Townsend, C. O., *Science* 25: 671—673, 1907.
- [2] Panagopoulos, C. G. and Psallidas, P. G., *J. Appl. Bacteriol.* 36: 233—240, 1973.
- [3] Keane, P. J. et al., *Aust. J. Biol. Sci.*, 23: 585—595, 1974.
- [4] Zaenen, I. et al., *J. Mol. Biol.*, 86: 109—127, 1974.
- [5] Watson, B. et al., *J. Bacteriol.*, 123: 255—264, 1975.
- [6] Menage, A. et Morel, G., *C. R. Acad. Sci.*, 259: 4795—4796, 1964.
- [7] Goldmann, A. et al., *C. R. Acad. Sci.*, 268: 825—854, 1969.
- [8] De Cleene, M. and DeLey, J., *Bot. Rev.*, 42: 389—466, 1976.
- [9] 戴芳澜等: 中国经济植物病原目录, 科学出版社 1958, pp. 1—500.

- [10] 王业勤等: 微生物学报, 20(3): 331—333, 1980
- [11] Kado, C. L. and Heskett, H. G., *Phytopathology* 60: 969—978, 1970.
- [12] 李英、王钧: 云南植物研究, 4: 83—87, 1982.
- [13] Clark, A. G., *J. Appl. Bacteriol.*, 32: 348—351, 1969.
- [14] New, P. B. and Kerr, A., *J. Appl. Bacteriol.*, 34: 233—236, 1971.
- [15] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著: 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社, 1978.
- [16] Bernaerts, M. J. and De Ley, J., *Nature*, 197: 406—407, 1963.
- [17] Kersters, K. et al., *J. Gen. Microbiol.*, 78: 227—239, 1973.
- [18] White, L. O., *J. Gen. Microbiol.*, 72: 565—574, 1972.
- [19] Otten, L. A. and Schilperoort, R. A., *Biochem. Biophys. Acta*, 527: 497—500, 1978.
- [20] Trevelyan, W. E. et al., *Nature*, 166: 444—445, 1950.
- [21] Kado, C. I. and Liu, S. T., *J. Bacteriol.*, 145: 1365—1373, 1981.
- [22] Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., R. E. Buchanan and N. E. Gibbons, eds.), pp. 264—267.
- [23] Holmes, B. and Roberts, P., *J. Appl. Bacteriol.*, 50: 443—467, 1981.
- [24] 张锡津等: 林业科技通讯, 3: 22—24, 1980.
- [25] Firmin, J. L. and Fenwick, G. R., *Nature*, 276: 842—843, 1978.
- [26] Guyon, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77: 2695—2697, 1980.

IDENTIFICATION OF BIOTYPE AND PLASMID TYPE OF SEVERAL STRAINS OF *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* ISOLATED FROM THE VICINITY OF BEIJING

Zhang Jingjuan Na Shumin Yu Maoxiao Xiang Wangnian

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Six strains of *Agrobacterium tumefaciens* were isolated from crown galls on peach, David peach, pear and poplar trees from the suburbs of Beijing. Typical tumors were induced on young plants of sunflower, tomato and *Kalanchoë* inoculated with these bacterial strains. They were then tested for the formation of 3-ketolactose, litmus milk reaction, utilization of carbohydrates, growth on Clark's medium and New and Kerr's medium and opines synthesized in plant tumors. Based on these and other characteristics, strains Pp-5, Pp-6 isolated from peach, strain Py-

10 from pear tree were found to belong to biotype I, nopaline plasmid type; strain Pd-7 from David peach to biotype I, octopine plasmid type; strain Pt-12 from poplar to biotype I, agropine plasmid type; while Pp-25 from poplar in another locality was found to belong to biotype I-II, nopaline plasmid type.

Key words

Agrobacterium tumefaciens biotype; Ti-plasmid type; opines; *Populus tomentosa* crown gall; *Prunus davidiana* crown gall