

## 根癌土壤杆菌的分离与鉴定

王业勤\* 陈薇 汪化 严荣华\*\*

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

我们从樱桃根癌组织中分离出一株根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*), 它对多种植物有诱发肿瘤的毒力。此菌株的一些特性与文献报道的根癌土壤杆菌有所不同, 属于不同类型。现将分离、鉴定的初步结果报告如下。

### 材料和方法

#### (一) 菌株

根癌土壤杆菌 702; 放射土壤杆菌 (*A. radiobacter*) 1150, 501; 豌豆根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum*) 166, 172。其中 1150 菌株系中国科学院微生物研究所惠赠, 其余菌株为本单位分离。

#### (二) 培养基

1. 常规培养基 (%) : 甘露醇 1, 酵母膏 0.3, 磷酸氢二钾 0.05, 氯化钠 0.02, 硫酸镁 0.02, pH 7.0。

2. 筛选培养基: Patel 氏培养基<sup>[1]</sup>, Schroth 氏培养基<sup>[2]</sup>和 Kado 氏培养基<sup>[3]</sup>。

#### (三) 分离方法

将樱桃根癌(来源于河北省昌黎果树研究所)匀浆, 接种于向日葵 (*Helianthus annuus*) 植株茎部, 待形成肿瘤后, 取肿瘤组织, 经表面灭菌后加水磨碎。取上层液稀释 1000 倍, 吸取 0.1 毫升接种于不同的固体筛选培养基上, 在 28℃ 培养 2—4 天, 挑出菌落, 接种常规液体培养基, 培养 24 小时, 再回接到寄主植物上, 观察致瘤能力。

#### (四) 血清免疫法

1. 抗血清的制备: 接种常规培养基 (以 4 克硝酸钠代替原配方中的酵母膏, 并加 1 微克生物素), 于 28℃ 培养 24 小时, 离心收集菌体, 用生理盐水洗涤两次, 然后用 pH7.2 的磷酸盐生理盐水适当稀释后免疫家兔。先后共注射 4 次, 最初两次加福氏佐剂做皮下注射, 后两次不加佐剂做耳静脉注射。最后一次注射后 10 天, 从颈动脉采血制抗血清。

2. 抗原的制备: 接种常规液体培养基 (以 6.7 克水解蛋白代替原配方中的酵母膏, 并加 0.2 克氯化钙和 2 毫升 EDTA-Fe), 于 28℃ 培养 48 小时, 离心收集菌体, 用生理盐水洗涤两次, 再用磷酸盐生理盐水缓冲液稀释成每毫升含  $10^9$ — $10^{10}$  个细胞的悬液。在进行琼脂扩散时, 细胞经超声波破碎热处理 5 分钟。

3. 琼脂扩散和免疫电泳: 琼脂凝胶板是用琼脂粉 1 克, 离子强度 0.05 pH8.2 的巴比妥缓冲液 50 毫升, 加水 50 毫升, 叠氮化钠 0.05 克制备的。一般扩散一天。电泳时每厘米电压为 5 伏, 电泳一小时后加抗血清, 再在室温下扩散。

#### (五) 电镜观察

将肿瘤组织切成小块, 置含 3% 戊二醛的 0.1 M pH7.0 磷酸缓冲液中, 在 0°—4℃ 固定 10 小时, 再用冷缓冲液洗净。移入含 2% 锇酸的同样缓冲液中, 在 0°—4℃ 再固定 1.5 小时。用酒精脱水, 包埋于甲基丙烯酸丁酯和甲基丙烯酸甲酯 (9:1) 中, 超薄切片。切片用 50% 酒精配制的饱和醋酸铀染色一小时, 电镜观察。

观察菌体形态采用悬滴法。在涂蜡的培养皿上滴一滴反染液 (2% 磷钨酸与 0.05% 绵羊血浆白蛋白为 1:1), 将带有标本的铜网放在液滴上 5—15 分钟, 取下, 用滤纸吸干铜网上的液体, 电镜观察。

#### (六) 生化试验

依 Bernaerts 和 De Ley 推荐的方法<sup>[4]</sup>。

#### (七) DNA 的制备及碱基比的测定

DNA 的提取、纯化依 Marmur 的方法<sup>[5]</sup>。DNA 碱基比的测定参照 Broughton 等人的方

本文于 1979 年 7 月 1 日收到。

承中国科学院上海细胞生物学研究所王新明、周美云同志协助拍摄电镜照片, 特此致谢。

\* 现在湖北省武汉市中国科学院水生生物研究所工作。

\*\* 现在上海纺织纤维研究所工作。

法<sup>[6]</sup>。

### (八) 诱发肿瘤试验

接种常规培养基,于 28℃ 培养 24 小时,取菌液数滴加至植株的茎上,用无菌针或尖细玻璃棒将加菌处的组织刺伤至皮层,直径约为 0.5 厘米左右。在夏秋季节,一般经一个星期便可观察到冠瘿肿瘤出现。

## 结果与讨论

### (一) 根癌土壤杆菌 702 菌株的分离

我们最初采用 Schroth 等人的筛选培养基进行分离,将在此培养基上长出的呈凸圆形、有光泽、半透明的淡黄色菌落挑出,接种在乳糖酵母膏培养基上,检测这些菌株产生 3-酮基乳糖反应的能力。将此反应为阳性的菌株回接到向日葵等植物上,观察肿瘤的形成。Schroth 氏培养基对筛选土壤杆菌有一定的选择性,据我们试验的结果,从此培养基上挑出的菌株,虽然绝大多数 3-酮基乳糖反应均为阳性,但都不能诱发肿瘤。其后,改用 Patel 氏经典筛选培养基进行分离,702 菌株的菌落在此培养基上出现较迟,呈凸圆形,透明,有光泽。经感染试验证明,对向日葵有很强的毒力。再将此菌株进行分离纯化。702 菌株利用葡萄糖作为碳源,优于甘露醇和蔗糖,生长最适 pH 为 6.5—7.0。

### (二) 诱发肿瘤试验

702 菌株接种向日葵 7 天后,便可出现典型的冠瘿肿瘤,两周后其直径可达 2—3 厘米(图 1)。此外,702 菌株对番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、甜菜 (*Beta vulgaris*)、长春花 (*Catharanthus roseus*)、凤仙花 (*Impatiens balsamina*)、落地生根 (*Kalan-*

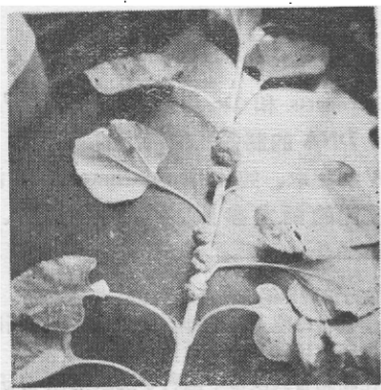


图 1 702 菌株接种向日葵幼苗后 15 天出现的肿瘤

*choe daigremontiana*)、饭豇豆 (*Vigna cylindrica*) 等植物也都有明显的诱发肿瘤的作用。

### (三) 细胞形态

电镜观察结果表明,702 菌株的细胞为杆状或短杆状,长轴 0.9—2 微米左右。其形态是多变的,有的为长杆状,有的接近于圆形。在菌悬液浓时,细胞呈网状排列。这些特征与 Nishizawa<sup>[7]</sup> 观察的结果相一致。从图版 I-1, 2 中可以看出,有些细胞的胞质均一,壁光滑膨胀,而有的细胞壁凹凸不平,胞质中出现密集的颗粒物质。这可能是幼龄细胞和衰老细胞之差异。我们没有进行细胞的鞭毛着生情况的观察。

此外,在肿瘤组织的切片中也可清楚地观察到这种形态多变的杆状细菌,单独存在或群集在一起(图版 I-3, 4)。

### (四) 702 菌株脱氧核糖核酸的碱基比率

测定结果表明,702 菌株 DNA 的 G + C 克分子百分比为 59.8 克分子%。此结果与 De Ley 等<sup>[8]</sup>及 Larsen<sup>[9]</sup> 应用熔点法和浮标密度法测定的结果是相近的。

### (五) 血清学鉴定结果

由于我们没有标准的根癌土壤杆菌,因此,在进行免疫血清鉴定时,只好用 702 菌株的抗血清与放射土壤杆菌 1150 菌株进行比较。免疫扩散结果(图版 I-5)表明,702 菌株抗血清与 1150 菌株、501 菌株(在 Schroth 氏培养基上选出)的抗原交叉反应,但这两个菌株所产生的沉淀带与 702 菌株所产生的沉淀带,在其连接处不呈 V 形联合,而有明显的分叉。说明 702 菌株与 1150 菌株有部分共同抗原,而它们在抗原特性上又是不一致的。吸收免疫扩散试验同样证明了上述的结果(图版 I-6—8),702 菌株抗血清被放射土壤杆菌 1150 菌株和 501 菌株细胞吸收之后,仍能与 702 菌株抗原产生专一性沉淀带;而 702 菌株抗血清被 702 菌株抗原吸收之后,则与三个菌株的抗原都不再形成沉淀带。此外,还比较了 702 菌株与豌豆根瘤菌 166 菌株的抗原关系,两者之间没有抗原交叉反应。

根据血清学鉴定结果,我们认为,702 菌株与放射土壤杆菌的抗原虽有部分是共同的,但两者明显不同。

### (六) 702 菌株在筛选培养基上的生长特性及 3-酮基乳糖反应

702 菌株在筛选土壤杆菌的 Schroth 氏培养

表 1 702 菌株在筛选培养基上的生长特性及 3-酮基乳糖反应

菌 株	生 长 特 性			3-酮基 乳糖反应	诱发肿瘤 的能力
	Schroth 氏培养基	Kado 培养基	Patel 培养基		
根癌土壤 杆菌 702	不 生 长	不 生 长	菌落直径 0.5 毫米左右, 凸圆形,透明,有光泽	—	+
放射土壤 杆菌 501	菌落直径 0.5—1 毫米,凸 圆形,淡黄色,半透明	菌落直径 1.5—2 毫米,凸 圆形,橄榄色	菌落直径 1.5—3 毫米,凸 圆形,淡乳色,透明	+	—
放射土壤 杆菌 1150	菌落 0.3—0.6 毫米,淡黄 色,半透明,凸圆形	菌落 1—2 毫米,凸圆形, 淡蓝色	菌落 4—5 毫米,淡乳色, 透明,凸圆形	+	—
豌豆根瘤 菌 172	不 生 长	不 生 长	不 生 长	—	

注: 28℃ 培养 60 小时。

基和 Kado 氏培养基上均不生长,在乳糖培养基上虽生长良好,但不产生 3-酮基乳糖(表 1)。而放射土壤杆菌 1150 菌株和 501 菌株在上述三种培养基上均生长良好,且乳糖代谢旺盛,产生 3-酮基乳糖。

虽然绝大多数土壤杆菌都产生 3-酮基乳糖反应<sup>[1]</sup>,但也有例外。702 菌株与 Kerr<sup>[10]</sup> 等人分离的菌株非常相似,它们属于根癌土壤杆菌的不同生理类型。Kerr 等建议将此类菌株列入根癌土壤杆菌 II 型。

De Ley 等对土壤杆菌属分类的改进意见认为,鉴定根癌土壤杆菌的 4 个主要依据为: 能使植物形成冠瘿肿瘤;细菌 DNA 的 G + C 克分子百分比为 59.5—62.8 克分子%;绝大多数菌株都产生 3-酮基乳糖反应;细菌形态为杆状,周生 1—6 根鞭毛。

702 菌株对许多种植物都有诱发冠瘿肿瘤的毒力,并根据其生长特性、细胞形态、DNA 的 G + C 克分子百分比和血清免疫反应等,初步鉴定为根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*), 属于

Kerr 等人所建议的根癌土壤杆菌 II 型。

## 参 考 文 献

- [1] Patel, M. K.: *Phytopathology*, 16: 577—581, 1926.
- [2] Schroth, M. N. et al.: *Phytopathology*, 55: 645—647, 1965.
- [3] Kado, C. I. et al.: *Phytopathology*, 60: 969—976, 1970.
- [4] Bernaerts, M. J. and J. De Ley: *Nature*, 197: 406—407, 1963.
- [5] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, 3: 208—218, 1961.
- [6] Broughton, W. J. et al.: *Anal. Biochem.*, 46: 164—172, 1972.
- [7] Nashizawa, R.: *Botanical magazine*, 81: 89—99, 1968.
- [8] De Ley, J. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 43: 7—17, 1966.
- [9] Larsen, P. O. and M. Zaitlin: *Phytopathology*, 61: 337, 1971.
- [10] Kerr, A.: *Aust. J. Biol. Sci.*, 23: 585, 1970.