

根癌土壤杆菌接合转移和生物型特性的遗传学研究

苏鸿声 相望年 戴秀玉

(中国科学院微生物研究所, 北京)

陆 德 如

(第二军医大学分子遗传学教研室, 上海)

用转座子 Tn5-Mob 和辅助诱动转移质粒 R 68.45 将根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 生物型 (Biotype) II 和 III 接合转移到具三重缺陷的生物型 I 的菌株中, 获得了七组转移接合子。通过对其中六组转移接合子生物型分类的主要生理生化特性 (3-酮基乳糖反应、石蕊牛奶反应、赤藓糖醇产酸、乙醇产酸、松三糖产酸、粘酸产碱及在 New 和 Keer 的选择性生长培养基上能否生长等) 测试, 发现这些性状通过接合转移而被转移到受体菌中。

关键词 接合转移; 根癌土壤杆菌生物型; 生理生化特性

根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 是引起植物冠瘿病的病原细菌。据 1984 年出版的“伯杰氏细菌分类方法”^[1], 它归属于根瘤菌科 (Rhizobiaceae) 土壤杆菌属 (*Agrobacterium*)。该属还包括放射土壤杆菌 (*A. radiobacter*)、发根土壤杆菌 (*A. rhizogenes*) 和悬钩子土壤杆菌 (*A. rubi*)。

对土壤杆菌的分类, 1970 年 Keane 等^[2]和 1972 年 White^[3]根据生化反应、血清学类型、蛋白质电泳图谱和 DNA 同源性等, 将土壤杆菌分成两种生物型 (Biotype)。1973 年 Kersters 等^[4]对土壤杆菌的数值分类结果和 Keane 等的报告相一致。1977 年 Keer 等^[5]从葡萄冠瘿中分离出不同于生物型 I 和 II 的菌株, 定为生物 III 型菌株, 并和 Panagopoulous^[5,6]等提出了生物型变种的概念。1981 年 Holmes 等^[7]提出, 根据土壤杆菌生理生化特性把土壤杆菌属分成四个种 (簇)。该分类方法不是以对植物的致病性 (即由质粒编码的性状), 而是以对其本身的生理生化特性来分类而具有一定的合理性。但是, 迄今为止, 并无直接

的证据证明这些决定生物型生理生化特性是由染色体编码的, 虽然不同种间的生物型生理生化分类特征是一致的。

近年来, 人们对根癌土壤杆菌遗传学进行的广泛研究表明, 土壤杆菌的染色体和 Ti 质粒对植物的致病性^[8]、寄主范围^[9]及对生物碱代谢^[10]有着密切关系。为了对土壤杆菌基因组进行研究, Hooykass 等^[11]用辅助诱动转移质粒 R 68.45 诱动土壤杆菌染色体转移, 并对 26 个营养标记进行了定位。

我们实验室近几年来对我国的毛白杨^[12]、葡萄^[13]、啤酒花^[14]等植物上的根癌土壤杆菌生物型、致病性、质粒类型进行了广泛的研究, 获得了三个生物型的大量菌株。为了了解生物型生理生化特性与染色体的关系, 本文用 Tn5-Mob 和 R68.45 诱动转移系统, 以具有三重缺陷的生物型 I 的菌株为受体菌株, 生物型 II 和 III 的菌株为

本文于 1987 年 1 月 22 日收到。

本工作所用实验菌种由张静娟、马德钦、陈晓英同志赠送, 实验过程中得到王敖全同志的帮助, 特此致谢。

供体菌株,进行了染色体转移实验,并对转移接合子和供体菌株的生理生化特性进行了比较测定。

材 料 和 方 法

(一) 实验菌株和质粒

见表 1。

(二) 培养基和氨基酸、核苷酸及抗生素浓度

大肠杆菌在 LB (每升含 10 蛋白胨,5g 酵母膏和 5g 氯化钠,pH7.0)培养基保存和生长;土壤杆菌在 YEM (每升含 1g 酵母膏,0.1g 氯化钠、10g 甘露醇、0.2gMgSO₄·7H₂O, pH7.0)培养基生长和保存。用于营养缺陷型菌株鉴定和转移接合子选择的基础培养基为 M63^[13]。

各种氨基酸浓度为 L 型 20μg/ml; DL 型加倍。核苷酸浓度为 40μg/ml。

抗生素浓度为:链霉素(Str) 500μg/ml;四

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strain and plasmid	遗传标记 Genetic markers	来 源 Source
大肠杆菌 <i>E. coli</i> K12 CSH-52 K802 S17-1	 araΔ(lac pro) strA thi (φ80d lac ⁺) met hsr pro res mod chrom::RP4-2 (Tc::Mu)(Km::Tn7)	 J. H. Miller J. H. Miller R. Simon
根癌土壤杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> HS-2 HSM105T II-2 IIp31-99 IIp16-59 IIp22-76 IIp33-81 IIp45-41 IIpc7 IIp II-4 IIp12-96 IIp41-63 IIp33-22 IIp12-87 IIp II-1 III-5 IIIp9-59 IIIp15-67 IIIp19-19 IIIp3-80	 str his met trp rif str his::Tn5-Mob str his::Tn5-Mob str chrom::Tn5-Mob str chrom::Tn5-Mob str cyt::Tn5-Mob str cys::Tn5-Mob chrom::Tn5-Mob str chrom::Tn5-Mob str chrom::Tn5-Mob str chrom::Tn5-Mob str chrom::Tn5-Mob str chrom::Tn5-Mob str str his::Tn5-Mob str chrom::Tn5-Mob str chrom::Tn5-Mob(glu met) str chrom::Tn5-Mob str	 生物型 I, 本实验室 Biotype I, this lab. 由 HS-2, 经 NG 诱变获得 from HS-2, NG mutagenesis 生物型 II, 本实验室 Biotype II, this lab. 由 II-2 插入 Tn5-Mob 获得 Tn5-Mob inserted on chromosome of II-2 生物型 III, 本实验室 Biotype III, this lab. 由 III-5 经 Tn5-Mob 插入 Tn5-Mob inserted 获得 on chromosome of III-5
质粒 Plasmid pSUP5011 R68.45	 Ap Km Cm Ap Km Tc	 R. Simon B. W. Holloway

环素 (Tc) 15 μ g/ml; 利福平 (Rif) 100 μ g/ml; 卡那霉素 (Km) 50 μ g/ml; 氨苄青霉素 (Ap) 25 μ g/ml; 三甲氧苄二氨嘧啶 (Tm) 100 μ g/ml。

(三) 生物型生理生化特性

按 Moore 等所用的主要性状和方法^[16]进行测定。

(四) N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (NG) 诱变

将要诱变的菌株 HS-2 接种于 LB 肉汤中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 次日再活化 3h, 离心后, 用 pH 6.0 的 Tris-maleic acid 缓冲液洗涤菌体一次, 用同一缓冲液溶解 NG; 使其终浓度为 1 mg/ml, 将菌体悬浮于 NG 溶液中, 28 $^{\circ}$ C 保温 45 min。加 LB 肉汤洗涤菌体一次, 并在相同的培养基中振荡培养 2h。将培养液稀释, 涂布于 YEM 平皿上, 28 $^{\circ}$ C 培养 48h 后, 即可看到大小不同的菌落。

(五) 营养缺陷型菌株的检出

按 R. W. Davis 方法^[17]。

(六) 接合转移实验

将供体菌、受体菌分别培养过夜后, 活化 3h, 各吸 0.1 ml 菌液一起涂布在 YEM 培养基上。质粒的接合转移为 28 $^{\circ}$ C 培养 8h, 土壤杆菌染色体的接合转移为 28 $^{\circ}$ C 培养 30h^[14], 再用 10 mmol/L MgSO₄ 缓冲液洗下菌体, 做成不同的稀释度, 涂布在适宜的选择性生长培养基上培养。

(七) 质粒转化

小质粒的提取按 D. Ish-Horwitz^[18], 转化按 Schleif, R. F. 的方法^[19]。

(八) 大质粒的提取和检测

按 Kado 和 Liu 方法^[20]。

结 果

(一) 实验菌株生物型生理生化特性

为了便于对染色体转移接合子进行检测, 我们选择产 3-酮基乳糖反应、石蕊牛奶反应, 赤藓糖醇、乙醇、松三糖产酸, 粘液酸产碱及在 New 和 Keer 的选择性生长培养基上能否生长等几个主要生理生化特性作为转移接合子生物型特性的指标。

表 2 表明出发菌株 HS-2、II-2 和 III-5 经多次传代后, 这些特性未发生改变。因

此, 我们可以借助辅助诱动转移质粒 R 68.45 和对受体菌营养标记的选择作用, 获得转移接合子, 并通过比较染色体转移前后供受体菌株和转移接合子生理生化性状的变化判断这些性状和染色体之间的关系。

(二) 实验菌株构建

1. NG 诱变构建受体菌株 HSM105T: 在细菌染色体接合转移中, 为选择到转移接合子, 受体菌株必须带有可供选择的多种标记。我们用化学诱变剂 NG 对根癌土壤杆菌生物型 1 菌株 HS-2 经三次诱变获得 His、Met 和 Trp 三重营养缺陷型菌株, 并通过自发突变获利福平 Rif^r 特性。该菌株定为 HSM105T。对三个营养缺陷标记回复率的测定表明, 它们的回复突变频率均低于 10⁻⁹。

2. 转座子供体菌株 S17-1(pSUP5011) 的构建: 转座子载体 pSUP5011 是 Simon 等^[21]通过将转座子 Tn 5 转移到 pBR 325 的衍生质粒上, 再通过体外克隆将 RP4 的 OriT 片段克隆到转座子 Tn5 上, 使 OriT 片段能和转座子 Tn 5 共同转座而成为 Tn5-Mob 转座子。由于 pSUP5011 只可在大肠杆菌中自主复制, 所以它可作为大肠杆菌以外的革兰氏阴性菌株中 Tn5-Mob 转座载体。

质粒 pBR325 是非转移性质粒, 它被组建成 pSUP5011 时, 需要在 RP4 或其衍生质粒的辅助下进行转移。为此, Simon 等^[21]构建了诱动转移菌株 S17-1; 该菌株的染色体上插入了一个 RP4 的衍生质粒, 而使带有 Mob 片段的 DNA 具有自主转移能力。该菌株可以使 pSUP5011 具有 100% 的接合转移能力。

我们用小质粒转化法构建菌株 S17-1 (pSUP5011)。转化子以 Ap 和 Tm 为选择标记。将具有 Ap 和 Tm 抗性的转化

表 2 土壤杆菌的生物学特性

Table 2 Biotype characteristics of *Agrobacterium*

试 验 Test	生物学特性 Biotype characteristics		
	生物型 I Biotype I	生物型 II Biotype II	生物型 III Biotype III
产 3-酮基乳糖 3-ketolactose Production	+	—	—
2% NaCl 生长 Growth in 2% NaCl	+	v°—	+
35℃生长 Growth at 35℃	+	v —	+
石蕊牛奶 Litmus milk	碱 性 alkali	酸 性 acid	碱 性 alkali
产 酸 Acid production from:			
赤藓糖醇 Erythritol	—	+	—
乙醇 Ethanol	+	—	—
松 三 糖 Melezitose	+	—	—
产 碱 Alkali production from:			
丙二酸块 Malonate	v —	v +	+
L(+) 酒石酸块 L(+) Tartrate	v	+	+
丙 酸 块 Propionate	v	—	—
粘液 酸 Mucic acid	—	+	—
选择性培养基的生长 Growth on selective medium			
Schroth	+	—	—
New and Keer	—	+	—

a: 性状可变。
The characteristic was variable.

子进行电泳检测，结果表明无质粒带的 S 17-1 菌株获得了 Ap 抗性之后具有和供体菌株 CSH 52(pSUP 5011) 相同的质粒带，该菌株即为转座供体菌 S17-1 (pSUP 5011)。

3. 根癌土壤杆菌染色体插入钝化证明: Simon 等^[22]认为由 Tn5-Mob 介导的染色体转移中，由于该转座子的插入而使染色体转移特性与大肠杆菌的 Hfr 菌株

所诱动的定向转移相似。在土壤杆菌中的转移方式是否相同还不清楚。但如果要求它具有类似于 Hfr 的转移特性，则 Tn5-Mob 要插入到染色体上，而不是在染色体以外的遗传物质上。这是因为辅助诱动转移质粒 R68.45 本身也具有诱动染色体转移的功能，而且它的诱动转移方式是多位点的且方向不定的^[23]。如果 Tn5-Mob 不是插入细菌染色体，由辅助诱动质粒 R

68.45 所诱动的染色体转移将会影响对结果的分析。

我们以 S17-1(pSUP5011) 为转座子供体菌株,以经自发突变获链霉素抗性的菌株 II-2 和 III-5 为受体菌株,进行转座实验,以链霉素和卡那霉素抗性为选择标记,获得了转座子 Tn5-Mob 诱变的菌株。Tn5-Mob 对 II-2 和 III-5 的转座频率约为 10^{-5} 和 10^{-6} ; 这表明它具有较高的转座频率,并和报道的相一致^[22]。

通过对突变株营养需要检测,共获得 16 株营养缺陷型菌株(表 1),它们大部份只表现出营养需要,而未表现出具体的营养缺陷特性。检测后还发现,转座子 Tn5-Mob 对土壤杆菌诱变中,出现营养缺陷型的比例为 0.2%,而不是通常的 1—2%^[24]。

为了证实上述菌株营养缺陷表型的表现是由 Tn5-Mob 插入钝化所造成的,我们将这些菌株在基础培养基上获得回复子。通过检测回复子的卡那霉素抗性表明,随着这些菌株原养型特性的出现,卡那霉素抗性随即消失,这进一步证实了 Tn5-Mob 是插入到土壤杆菌染色体上,而造成这些菌株的营养缺陷特性的出现,且无双重转座现象。

4. 染色体转移供体菌株构建: 当在土

壤杆菌染色体上插入 OriT 片段后,这样的染色体 DNA 片段已经具备了自主接合转移的起始位点和自主转移的必要条件^[25]。通过引入类似于 RP 4 的广泛寄主范围转移质粒 R 68.45 而使它具有自主转移的能力。以菌株 K802(R68.45) 和上述 16 株转座子插入钝化菌株进行结合转移,以链霉素和四环素抗性为转移接合子的选择标记,2—3 天后即可长出菌落,并在相应的培养基上纯化。

因为在染色体转移接合子的选择中是以利福平抗性为反选择标记,我们检测了出发菌株 II-2 和 III-5 的利福平自发突变频率约为 10^{-10} 。

(三) 根癌土壤杆菌染色体接合转移

1. 营养标记的转移: 为了获得不同生物型的接合转移重组子,我们以生物型 I 的菌株 HSM105T 为受体菌株,以构建过的生物型 II 和 III 的菌株为染色体转移供体菌,经活化后在 YEM 培养基上进行接合转移,在含利福平的适宜选择培养基上进行选择,对获得的转移接合子的非选择性标记进行了检测。共获得七组染色体转移接合子。表 3 列出了其中六组的结果。部分菌株未出现染色体转移现象,可能是因为 Tn5-Mob 位点距选择性标记较远而

表 3 根癌土壤杆菌转移接合子的遗传分析

Table 3 Genetic analysis of trans-conjugants in *Agrobacterium tumefaciens*

交配组 Mating group	选择标记 Selected marker	转移频率 Transfer frequency	检测的转移接合子数 No. of trans-conjugants tested	和下列标记的共转移频率(%) Co-transfer frequency with the markers(%)		
				Trp	His	Met
IIpPC7(R)×H	Trp	1.3×10^{-7}	210	100	0	0
IIp11-4(R)×H	His	2.7×10^{-7}	84	0	100	5
IIp33-81(R)×H	Met	7.5×10^{-8}	/	/	/	/
IIp33-81(R)×H	Met	1.7×10^{-5}	54	0	19	100
	His	4.9×10^{-7}	100	0	100	99
IIp12-87(R)×H	His	1.9×10^{-6}	100	0	100	0
IIp22-76(R)×H	Met	3.5×10^{-7}	100	0	0	100
IIIp19-19(R)×H	Met	1.6×10^{-7}	100	0	0	100

表 4 根癌土壤杆菌转移接合子的生物型特性检测

Table 4 Assay of biotype characteristics of trans-conjugants in *Agrobacterium tumefaciens*

交配组 No. of mating group	选择标记 Selected marker	检测的转移接合子数 No. of transconjugants tested	生物型特性的共转移频率(%) Co-transfer frequency with biotype characteristics						
			产 3-酮基乳糖 3-ketolactose production	石蕊牛奶 Litmus milk	赤藓糖醇产酸 Acid production from erythritol	松三糖产酸 Acid production from melezitose	乙醇产酸 Acid production from ethanol	粘酸产碱 Alkali production from mucic acid	N. K. 培养基 N. K. selected medium
1	Trp	210	74	36	0	94	12.5	0	0
2	His	84	0	0	3.5	93	0	6	3.5
3	Met	56	3.6	2	0	87	3.6	0	0
	His	100	25	8	0	100	10	0	0
4	His	100	10	8	0	100	15	0	0
5	Met	100	0	0	46	98	0	57	46
6	Met	100	0	/	/	99	0	/	/

难于在选择性培养基上长出菌落。

由于辅助诱动质粒 R68.45 具有形成 R' 因子而使受体细胞出现对缺陷型标记的互补,形成对该选择性标记的原养型菌落。为了排除由于 R' 因子可能造成的影响,我们检测了这些转移接合子的四环素抗性,未发现具四环素抗性的转移接合子的出现。同时,还对其中几株转移接合子进行了质粒的快速检测,未发现它们与受体菌株 HSM105T 有差异。说明这些转移接合子的原养型特性与 R' 因子无关。

检测了表 3 中列出转移接合子的链霉素抗性特征,未发现链霉素抗性的转移接合子。由供体菌株中的利福平抗性自发突变率为 10^{-10} 以及 HSM105T 的三个营养标记回复突变率低于 10^{-9} ,说明这些转移接合子是通过染色体转移后出现的原养型菌落,且链霉素抗性标记未发生共转移。

2. 转移接合子生物型特性检测: 对表 3 中列出的用于对生物型分类的主要生理生化特性进行了检测。

表 4 的结果表明,和生物型有关的那些生理生化特性随着染色体转移而发生了

共转移,且三酮基乳糖反应、石蕊牛奶反应、乙醇产酸等三个位点与 His 和 Try 之间的染色体片段的转移有关;而粘酸产碱、赤藓糖醇产酸及在 New 和 Keer 选择性生长培养基上生长特性与 His 另一侧的染色体片段转移有关;而松三糖产酸的特性在每组转移接合子中均发生了变化,它似乎并非由单一操纵子决定的,且该基因簇分布位点也较多。从表 4 还可看出,赤藓糖醇产酸和在 New 及 Keer 的选择性培养基上生长的特性是一致的。

讨 论

根癌土壤杆菌生物型生理生化特性是否由染色体直接编码的,除了 Moore 等^[26]和 White 等^[27]证明了根癌土壤杆菌 Ti 质粒和生物型生理生化特性无关外,还无这方面工作的报道。本工作通过用 Tn5-Mob 转座子介导及 R68.45 辅助诱动转移质粒将根癌土壤杆菌生物型 II 和 III 的染色体转移到生物型 I 的菌株中。通过检测染色体转移接合子,证明决定生物型特性的 3-酮基乳糖反应、石蕊牛奶反应、赤藓糖醇

产酸、松三糖产酸、乙醇产酸、粘液酸产碱和在 New 与 Keer 的选择性生长培养基上可否生长等特性与染色体密切相关;它们随着不同交配组而在转移接合子中以不同的共转移频率出现(表 4)。由此看出:生物型生理生化特性似乎是由土壤杆菌的染色体决定的。

在对这些转移接合子生物型特性检测中,由于样本处理数量较少,而不能真实地反映出这些生物型生理生化特性基因在染色体上的位点,同时,对于这些生理生化特性的遗传背景还无足够的了解,难于进行基因定位工作。对于这些性状的遗传学研究还有待于进一步深入。

Simon 等^[23]曾对大肠杆菌 K802 进行过以 Tn5-Mob 介导的染色体转移工作,土壤杆菌的转移方式还不清楚。从表 3 的结果中可以看出它们的转移是固定位点和具有一定方向的。从第 2—3 组的交配结果中,可以看出第 2 组是从 met→his 的转移,而第 3 组是从 his→met 的转移。

Tn5-Mob 介导的染色体转移过程是通过使转移 DNA 区段获得自主转移特性,并在辅助诱动转移质粒进行反式互补作用实现的^[25]。它不同于单由辅助诱动转移质粒 R68.45 所诱动的染色体转移;前者是本身片段从 OriT 位点开始,通过形成交配对和转移复制酶系统进行的自主转移^[25];而后者是通过和转移对象形成共整合结构的中间体,在辅助诱动转移质粒 R68.45 本身所具有的接合转移能力帮助下诱动转移的。在由 Tn5-Mob 介导的染色体转移中,其接合转移子未出现任何四环素抗性而只有 R68.45 介导的染色体转移接合重组子中出现 2%—95% 的四环素抗性^[11]这一事实可以推测:在前者的染色体自主转移过程中,只有染色体片段的转移,而无辅助诱动转移质粒 R68.45 的共同转移,虽然

辅助诱动转移质粒 R68.45 本身也能自主地转移,但由于这种转移子不能表现原养型特征而难于被选择出来,而后的转移过程是通过形成共整合的中间结构实现的,它同样也为辅助诱动转移质粒 R68.45 本身的转移提供了机会,因此,在转移接合子中可以出现辅助诱动质粒 R68.45。

参 考 文 献

- [1] Krieg, N. R. et al.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1: 224—254, 1984.
- [2] Keane, P. J. et al.: *Aust. J. Biol. Sci.*, 23: 585—595, 1970.
- [3] White, L. O.: *J. Gen. Microbiol.*, 72: 227—239, 1972.
- [4] Kersters, K. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 78: 227—239, 1973.
- [5] Keer, A. et al.: *Phytopath.*, 90: 172—179, 1977.
- [6] Panagopoulos, C. G. et al.: *Proc. 4th Int. Conf. plant Path. Bact.*, Angers, p. 221—228, 1978.
- [7] Holmes, B. et al.: *J. Appl. Bacteriol.*, 50: 443—467, 1978.
- [8] Douglas, C. J. et al.: *J. Bact.*, 152: 196—202, 1982.
- [9] Kanuf V. C. et al.: *J. Bact.*, 153: 1535—1542, 1983.
- [10] Schardl, C. L. et al.: *J. Bact.*, 155: 196—202, 1983.
- [11] Hooykass, P. J. et al.: *M. G. G.*, 188: 12—17, 1982.
- [12] 张静娟等: *微生物学报*, 24(4): 365—375, 1984.
- [13] 马德钦等: *微生物学报*, 25(1): 45—53, 1985.
- [14] 陈晓英等: *微生物学报*, 27(1): 10—16, 1987.
- [15] Silhavy, T. J. et al.: *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 219, 1984.
- [16] Schaad, N. W. et al.: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, *Bacteriol. Comm. Amer. Phytopathol. Soc. St. Paul, MN.* p. 17—25, 1980.
- [17] Davis, R. W. et al.: *A manual for Genetic Engineering—Advanced Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p. 209, 1984.
- [18] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 89, 1982.
- [19] Schleif, R. F. et al.: *Practical Methods in Molecular Biology*, (ed. Schleif, R. F. et al.), Springer-Verlag, New York, Heidelberg Berlin, p. 134, 1984.
- [20] Kado, C. I. et al.: *J. Bact.*, 145: 1365—1373,

- 1981.
- [21] Simon, R., et al.: *Molecular Genetics of Bacteria-Plant Interaction* (ed. Puhler, A.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, Tokyo, p. 51—63, 1983.
- [22] Simon, R.: *M. G. G.*, 196: 413—420, 1984.
- [23] Riess, G. et al.: *Advanced Molecular Genetics* (ed. Pühler, A. et al.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, p. 51—63, 1983.
- [24] Katalin, R. et al.: *M. G. G.*, 197: 230—235, 1984.
- [25] Willetts, N.: *Molecular Biology, Pathogenicity and Ecology of Bacterial Plasmid* (ed. Levy S. B. et al), New York p. 207—215, 1984.
- [26] Moore, L. W. et al.: *Ann. Rev. Phytopatho.*, 17: 163—179, 1979.
- [27] White, F. F. et al.: *J. Bact.*, 141: 1134—1141, 1980.

CHROMOSOMAL TRANSFER OF *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* BY CONJUGATING AND GENETICS STUDY OF BIOTYPE CHARACTERISTICS

Su Hongsheng Xiang Wangnian Dai Xiuyu

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Lu Deru

(*Lab. of Molecular Genetics, The Second Military Medical College, Shanghai*)

By using transposon Tn5-Mob and plasmid R68.45, we transferred the chromosome of *Agrobacterium tumefaciens* biotype II and III to biotype I strain which has three auxotrophic markers. We got seven groups of trans-conjugats. After analysis of the main classical characteristics of biotypes: 3-ketolactose production; limus milk; acid production from erythritol, ethanol and melezitose;

alkali from mucic acid and growth on selective media New and Keer, we found that these characteristics have transferred to the recipient.

Key words

Chromosomal transfer by conjugating;
Main classical characteristics of biotype;
Agrobacterium tumefaciens.