

我国葡萄根癌农杆菌 Ti 质粒的特征*

马 德 钦

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 以窄宿主葡萄农杆菌 Ag162Ti 质粒的 T-DNA 区 *tmr*、*tmr1* 和 *ocs* 基因座位以及 T_A -DNA 和 T_B -DNA 片段为探针,对 12 株我国分离的不同生物型、质粒类型和寄主范围的葡萄根癌农杆菌的 Ti 质粒转移 DNA (T-DNA) 进行 Southern 杂交分析。在 9 株生物 3 型 octopine Ti 质粒菌株中,与上述探针均同源。其中窄宿主葡萄根癌农杆菌菌株杂交片段彼此较一致。广宿主葡萄根癌农杆菌菌株的杂交片段彼此差异较大。1 株无致瘤能力的生物 1 型菌株与 5 个探针均不杂交。1 株生物 3 型 nopaline Ti 质粒菌株及 1 株诱导冠瘿瘤中只合成精氨酸的菌株,杂交带的变化也大。由此可见葡萄农杆菌在生物进化过程中其转移 DNA 呈多态性,成为农杆菌中特殊类群。本分析对葡萄根癌农杆菌致病菌株的鉴定亦有帮助。

关键词 农杆菌,葡萄,Ti 质粒,Southern 印迹分析

葡萄根癌农杆菌是农杆菌中较为特殊的与众不同的种类,尽管人为接种时它亦能对一些双子叶植物致瘤,但有严格的寄主特异性。在自然界中这种生物 3 型农杆菌总是与葡萄寄主相关,引起根癌病,给葡萄种植业带来重大经济损失。

农杆菌对植物的致瘤能力及寄主范围主要由其 Ti 质粒所决定。对广宿主生物 1 型 octopine Ti 质粒根癌农杆菌 A6 和窄宿主葡萄根癌农杆菌 Ag162 等 Ti 质粒的 T-DNA 区和 *vir* 区基因的比较研究,已能从分子生物学方面揭示 pTiA6 和 pTiAg162 它们间差异的原因^[1-3]。对生物 3 型葡萄根癌农杆菌各菌株 Ti 质粒的特征,虽有一些研究报告^[4],但还没有深入到比较其转移 DNA (T-DNA) 同源性的研究。本文报告从我国北方分离的某些生物 3 型和生物 1 型葡萄根癌农杆菌所含质粒图谱,并对其中一些菌株 Ti 质粒的 T-DNA 区进行同源性分析比较,阐明这类细菌 Ti 质粒的多种多样性以及其与植物致瘤能力的关系。

1 材料和方法

1.1 菌株

所用的根癌农杆菌均是从我国葡萄冠瘿瘤分离出^[5],大部属于生物 3 型 octopine Ti 质粒,只有少数属 nopaline Ti 质粒及生物 1 型 octopine Ti 质粒菌株。这些菌株人工接种感染植物,其宿主范围有较大差别,据此又分为宽宿主 (WHR) 与窄宿主 (LHR) 范围两种,我们以人工接种能使向日葵、蕃茄、烟草及更多植物幼苗致瘤的称宽宿主,只对葡萄苗致瘤者称窄宿主,但两者均对葡萄的致瘤能力强(表 1)。

* 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1994 年 6 月 23 日收到。

1.2 Ti 质粒的检测

使用改良碱裂解法进行^[6]。

1.3 DNA 分离和 Southern 杂交

作为分析葡萄农杆菌 T-DNA 区同源性所用的探针,来自窄宿主 octopine Ti 质粒 pTiAg162 的 T-DNA 区一些基因座位。5 个探针分别为: tms1 基因(含 T_B-DNA 的 1.0kb BamHI 片段); tmr 基因(含 T_A-DNA 的 1.3kb EcoRI 片段); ocs 基因(含 T_A-DNA 3.4kb EcoRI-HindIII 片段), T_A-DNA 片段(含 11.5kb BamHI 片段)以及带有整个 T_B-DNA 片段的粘粒克隆子 pvck 431。上述探针均为美国华盛顿大学 Yanofsky 博士赠送, 探针位置及大小见文献[2]。除 T_B-DNA 外, 所有探针片段均克隆在 pUC18 中。

表 1 实验用葡萄根癌农杆菌的特征

Table 1 Characteristics of *Agrobacterium* strains isolated from grapevine

菌株 Strains	生物型 Biotype	冠瘿碱合成 Opine ¹⁾	采集地点 Collection locality ²⁾	葡萄寄主 Host grapevine ³⁾	宿主范围 Host range ⁴⁾	来源 Source
M13-2	3	Oct	内蒙 I. M.	玫瑰香 M.H.	窄 LHR	This work
M14-1	3	Oct	内蒙 I. M.	玫瑰香 M.H.	窄 LHR	This work
M14-6	1		内蒙 I. M.	玫瑰香 M.H.	不致瘤 Avirulent	This work
L1645 ⁵⁾	3	Arg, only	内蒙 I. M.	龙眼 L.Y.	窄 LHR	This work
L17-1	3	Oct	内蒙 I. M.	龙眼 L.Y.	窄 LHR	This work
L18-2	3	Oct	内蒙 I. M.	龙眼 L.Y.	窄 LHR	This work
G19-1	3	Oct	内蒙 I. M.	巨丰 J.F.	窄 LHR	This work
M114-1	3	Oct	内蒙 I. M.	玫瑰香 M.H.	窄 LHR	This work
M116-2	1	Oct	内蒙 I. M.	玫瑰香 M.H.	窄 LHR	This work
M122-1	3	Oct	内蒙 I. M.	玫瑰香 M.H.	宽 WHR	This work
MB28-6	3	Oct	北京 B. J.	玫瑰香 M.H.	宽 WHR	This work
MB30-5	3	Oct	北京 B. J.	玫瑰香 M.H.	窄 LHR	This work
MS32-1	3	Oct	山东 S. D.	玫瑰香 M.H.	宽 WHR	This work
BS33-6	3	Nop	山东 S. D.	白雅 B.Y.	宽 WHR	This work
GL56-1	3	Oct	辽宁 L. N.	巨丰 J.F.	窄 LHR	This work
AB56	1	Oct	U.S. S. R.	<i>V. vinifera</i>	窄 LHR	Dr. Ne ter

(pTiAg162)

- 1) Oct., Octopine, Nop., Nopaline, Arg., Arginine.
- 2) I. M., Inner Mongolia, B. J., Beijing, S. D., Shandong, L. N., Liaoning.
- 3) M. H., Muscat Hamburg, L. Y., Longyan, J. F., Jufeng, B. Y., Bai Ya.
- 4) LHR, Limited host range, WHR, Wide host range.
- 5) Opines have not been detected in the tumors induced by strain L1645 but arginine.

杂交探针质粒 DNA 按文献[7]分离。农杆菌总 DNA 按先前使用方法提取^[8], 经 EcoRI 酶消解完全后, 琼脂糖凝胶电泳区分开, 吸印转移至硝酸纤维素滤膜与探针进行 Southern 滤膜杂交, 本试验的杂交和水洗在相对低的双链解链温度 (5 × SSC-0.1% SDS, 65°C) 下进行^[9]。

2 结果

2.1 Ti 质粒的比较

实验检测了 13 株葡萄农杆菌所含质粒和 Ti 质粒,除 M14-6 菌株无致病性外,这些菌株代表不同的生物型、不同 Ti 质粒类型、不同采集寄主和宿主范围。从各菌株质粒的琼脂糖凝胶电泳图(图 1)可见,每株农杆菌均含有两个以上质粒,其中一个质粒电泳移

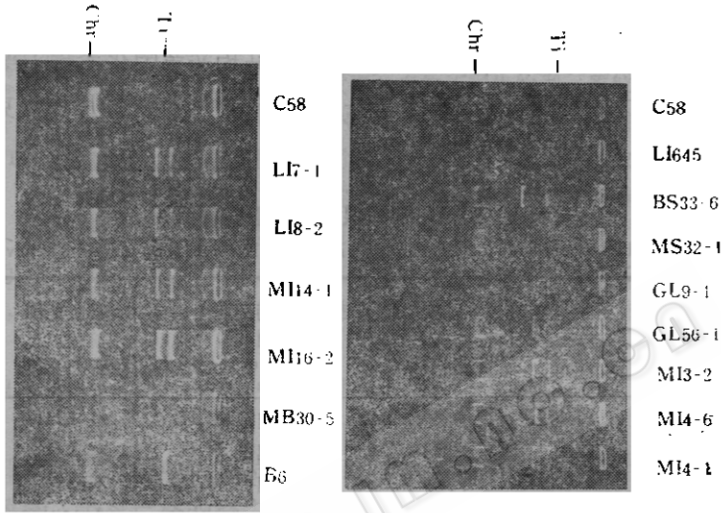


图 1 葡萄根癌农杆菌 Ti 质粒的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of Ti plasmid in *Agrobacterium* strains isolated from grapevine tumors

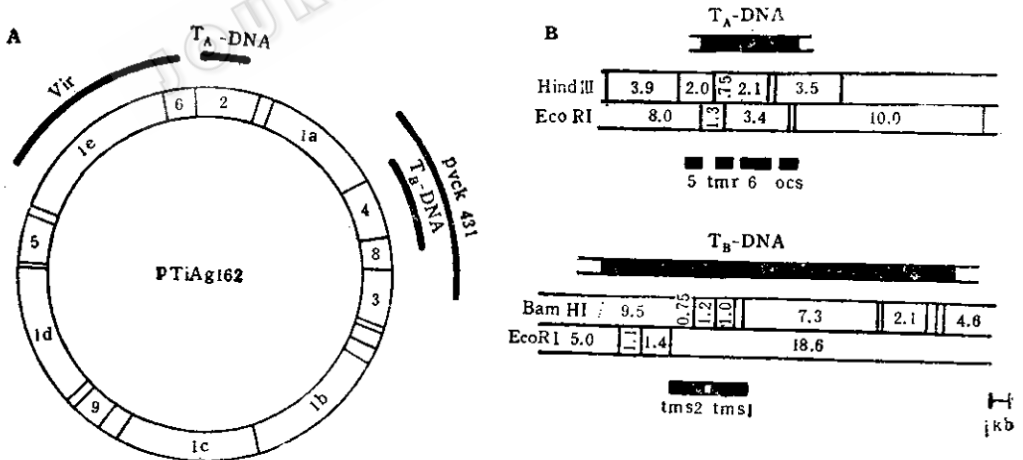


图 2 作为探针用的窄宿主 octopine Ti 质粒 pTiAg162(A) 及其 T_A-DNA 和 T_B-DNA 区的 EcoRI 酶切图 (B)

Fig. 2 Limited host range octopine-type Ti plasmid, pTiAg162(A) and its EcoRI restriction sites for T_A-DNA and T_B-DNA regions (B)

动位置相当于 pTiC58 和 pTiB6,大小约 200kb,可能是 Ti 质粒,其余则是隐性质粒。这是从我们过去 Ti 质粒杂交鉴别的试验推测的,隐性质粒的作用尚不清楚。从 13 株农

杆菌的质粒图谱表明,其质粒是呈多态性的。

2.2 T-DNA 区基因的同源性比较

本实验使用 LHR 质粒 pTiAg162 的 T-DNA 区主要基因作为探针,是因为它是目前研究得最清楚,有代表性的 LHR octopine 型 Ti 质粒,与 WHR pTiA6 质粒仅有 15% 的同源性。其 T-DNA 区分为两部分,称为 T_A -DNA (长约 5~7kb) 和 T_B -DNA (长约 20kb),彼此相隔 25kb 以上(图 2-A)。编码生长素生物合成酶的两个基因, *tms1* 和 *tms2* 均位于 T_B -DNA 区;而编码细胞分裂素生物合成酶的基因 *tmr* 及 octopine 合成酶基因 *ocs*,则位于 T_A -DNA 区(图 2-B)。

在上述 Ti 质粒比较基础上,重新挑选 12 株葡萄根癌农杆菌进行 T-DNA 区同源性比较,12 株菌株总 DNA 的 EcoRI 酶切片段与 LHR 质粒 pTiAg162 T-DNA 区的 5 个特异性探针的 Southern 印迹分析结果见图 3。当使用 *tmr* 基因探针时,几乎所有菌株在 1.3 和 3.4kb EcoRI 片段上都有明显杂交带(图 3-A)。使用 *ocs* 基因探针,有 8 株生物 3 型 octopine Ti 质粒菌株在 3.4 和 10kb EcoRI 片段杂交,其杂交片段大小完全一致(由于洗印照片关系,有的质粒 10kb 带不清楚)。只有生物 3 型 nopaline Ti 质粒

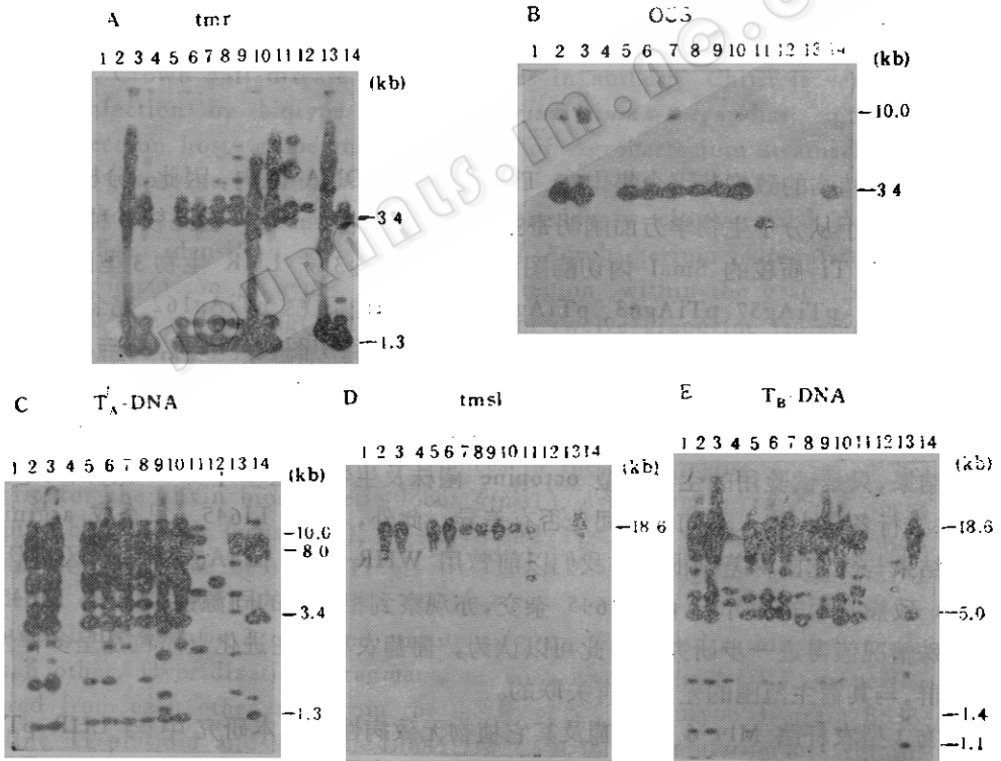


图 3 葡萄农杆菌 T-DNA 区的 Southern 印迹分析

(所有探针来自 LHR 菌株 Ag162)

Fig. 3 Southern blot analysis of LHR T-DNA regions

The following probes derived from strain Ag162: *tmr* locus (A); *ocs* locus (B); T_A -DNA (C); *tms1* locus (D); T_B -DNA (E). Strain numbers (1~14) in each figures are shown:

1. A348 (pTiA6); 2. M13-2; 3. M14-1; 4. M14-6; 5. L17-1; 6. L18-2; 7. GL9-1; 8. M114-1;
9. M122-1; 10. MB28-6; 11. MS32-1; 12. BS33-6; 13. L1645; 14. A856 (pTiAg162).

菌株 BS33-6,以及在冠瘿瘤中发现只合成 arginine, 尚未测出冠瘿碱的菌株 LI645, 与 *ocs* 基因是不杂交的(图 3-B)。如果以含有整个 T_A -DNA 区片段的探针(11.5kb *Bam*H_I 片段)杂交, 则除 MI4-6 外, 所有菌株都有同源性。其中有 8 株菌株在 1.3、3.4、8.0 和 10kb *Eco*RI 片段均有杂交带, 其 T_A -DNA 区酶切片段较相似(图 3-C)。

以 *tms1* 基因为探针时, 结果非常明显, 有 6 株菌在 18.6kb 片段杂交, 只有 3 株不杂交。另有一株有杂交带, 但片段的大小跟其它不同(图 3-D)。当用 LHR pTiAg162 整个 T_A -DNA 区的粘粒克隆子 *pvck431* 为探针时, 几乎所有试验的菌株均杂交(图 3-E)。

从上述杂交结果可见, 窄宿主 MI3-2、MI4-1、LI7-1、LI8-2、GI9-1 和 MI14-1 菌株之间的杂交片段完全一致, 与 LHR 质粒 pTiAg162 杂交片段亦较相似。它们属于生物 3 型, 含 octopine Ti 质粒。而宽宿主 MI22-1、MB28-6、MS32-1 及 LI645 菌株的杂交带变化较大, 不但相互间不同, 且与窄宿主菌株亦有差异。值得注意的是, 菌株 LI645 (只检测到合成 arginine) 及 BS33-6 (合成 nopaline) 的杂交结果与其它 octopine Ti 质粒菌株很不同(见图 3-B、第 12、13 行)。另外, 对葡萄无致病性的生物 1 型葡萄农杆菌 MI4-6 及来自非葡萄寄主冠瘿瘤的生物 1 型 WHR 菌株 A348 (含 WHR Ti 质粒 pTiA6), 与探针均不杂交或很弱杂交带, 这意味着它们的同源性与否对葡萄的毒力有联系。

3 讨论

农杆菌对植物的致瘤基因全集中在 Ti 质粒的 T-DNA 区内, 因此, 分析 T-DNA 区的异同有助于从分子生物学方面阐明寄主范围的差别。*knaut*^[4] 曾比较 3 种生物型葡萄根癌农杆菌 Ti 质粒的 *Sma*I 内切酶图谱, 其结果是 3 株 LHR 生物 3 型菌株 octopine Ti 质粒 pTiAg57、pTiAg63、pTiAg158 与 LHR 质粒 pTiAg162 完全一致。而 3 株 WHR 菌株质粒, pTiAg83、pTiAg86、pTik305 酶切图彼此不同, 且与 pTiAg162 和生物 1 型 WHR 质粒 pTiB6 亦不同。nopaline Ti 质粒菌株彼此间的 *Sma*I 酶切图亦相似。本实验通过比较我国分离的葡萄农杆菌 T-DNA 区各基因座的同源性, 亦得到相似的结果, 只是试验用的生物 1 型 octopine 菌株及生物 3 型 nopaline 菌株各只有 1 株, 无法进行各自比较, 不知相互间是否有差异。此外, 菌株 LI645 (只合成 arginine) 的杂交结果与其它菌株差别很大, 我们以前曾用 WHR 质粒 pTiA6 的 *vir* 区基因及 T-DNA 致瘤基因的探针与 pTiLI645 杂交, 亦观察到相互间的同源性较低^[5]。LI645 菌株的特殊情况值得进一步研究。由此可以认为, 葡萄农杆菌在进化上质粒是呈多样性的特殊类群, 与其宿主范围的差异是有关联的。

生物 1 型农杆菌 MI4-6 对葡萄及其它植物无致病性, 在本研究中与 LHR pTiAg162 的特异性探针不杂交, 它可能不是根癌农杆菌。结果亦表明, 分子杂交试验亦是区分致瘤与非致瘤农杆菌的有效方法。

致谢 美国华盛顿大学(西雅图) E. W. Nester 教授及 Yanofsky 博士对本研究给予指导和协助, 天津南开大学分子生物学研究所蔡宝立先生给予帮助, 特此衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] Yanofsky M, Lowe B, Montoya A *et al.* *Mol Gen Genet*, 1985, 201: 237~246.
[2] Yanofsky M, Montoya A, Knauf V *et al.* *J Bacteriol*, 1985, 163 (1): 341~348.
[3] Ma D Q, Yanofsky M, Gordon M *et al.* *Appl Envir Microbiol*, 1987, 53 (6): 1338~1343.
[4] Knauf V C, Panagopoulos C, Nester E W. *J Bacteriol*, 1983, 153 (3):1535~1542.
[5] 马德钦,林应锐,周娟,等. 微生物学报,1985,25(1): 45~53.
[6] 马德钦,赵家英,游积峰. 植物病理学报,1994,24(1): 32~37.
[7] Birnboim H C, Doly J. *Nucleic Acids Res*, 1979, 7: 1513~1523.
[8] Albright L M, Leroux B, Yanofsky M *et al.* *J Bacteriol*, 1987, 169: 1046~1055.

CHARACTERISTICS OF AGROBACTERIUM TUMEFACIENS Ti PLASMID ISOLATED FROM GRAPEVINE IN CHINA

Ma Deqin

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Crown gall disease on grapevines in northern China is very serious. Pathogenic infection by biotype 3 *Agrobacterium tumefaciens* has significant detrimental effect on host grapevine. A number of *Agrobacterium* strains have been isolated from grapevine tumors in China. Their properties, including biotype, Ti plasmid type, host range, DNA homology to previously characterized T-DNA and vir loci, have been identified. As Ti plasmid of *Agrobacterium* is required for tumorigenicity, comparison of genes in T-DNA region within the grapevine strains are valuable. A tumor-inducing(Ti) plasmid from twelve grapevine isolates of *A. tumefaciens*, which represent different biotype, plasmid type and host range, were detected by agarose gel electrophoresis and compared with the limited-host-range (LHR) Ti plasmid pTiAg162. Probes specific for each of the LHR (pTiAg162) T-DNA were used to identify homologous sequences in these grapevine strains. When probes specific for the auxin biosynthetic locus (*tms1*), cytokinin biosynthetic locus (*tmr*), octopine biosynthetic locus (*ocs*), T_A-DNA and T_B-DNA fragments were used, strong hybridization to nine octopine Ti plasmid DNA from biotype 3 strain was observed, but little or no homology to DNA isolated from biotype 1 strain MI4-6 was observed. Six LHR biotype 3 octopine strains gave EcoRI hybridization fragments similar to each other. Hybridization fragments of wide-host-range(WHR) grapevine strains differed from each other and from the LHR strain. A biotype 3 strain BS33-6 with nopaline Ti plasmid and a strain LI645 resulted in accumulation of arginine in the tumor tissue showed little or no homology to these loci used. The data in this studies indicate that the use of Ti plasmid DNA probes for determining tumorigenicity of *Agrobacterium* strains would be very useful. Besides, the DNA sequences in the T-DNA regions within the grapevine strains are diversified.

Key words *Agrobacterium*, Grape, Ti plasmid. Southern blot