

# 致瘤农杆菌的鉴定及与转基因 741 杨基因互作研究

曹秀利<sup>1,2</sup>, 马万路<sup>1</sup>, 孙旭霞<sup>1</sup>, 杜克久<sup>2</sup>

(1. 廊坊职业技术学院, 河北 廊坊 065000; 2. 河北农业大学 林业资源与工程学院, 河北 保定 071000)

**摘要:**以从长瘤的转基因 741 杨和非转基因毛白杨的根际土壤中分离得到致瘤农杆菌为试材, 采用切片、染色及活体接种的方法, 对其进行了形态和生物学鉴定。结果表明: 其形态符合致瘤农杆菌的特征; 胡萝卜和番茄苗的致瘤性试验结果为阳性; 该菌株在诱导胡萝卜和番茄苗肿瘤发生同时, 还发现其有明显地促进杨树组培苗以及番茄实生苗不定根的诱导能力; 该菌株回接转基因 741 杨组培苗后, 并未发现与其寄主之间存在基因转移现象。

**关键词:**致瘤农杆菌; 生物学鉴定; 转基因 741 杨; 基因漂移

**中图分类号:**Q 943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)14-0085-04

植物根癌病由土壤杆菌(*Agrobacterium* sp.)中的致

病菌株引起, 是一种世界性的细菌病害, 在欧洲<sup>[1]</sup>、北美<sup>[2]</sup>及亚洲<sup>[3]</sup>的一些国家普遍发生。根癌病菌可侵染 93 科 331 属 643 种双子叶植物和少数裸子植物<sup>[4]</sup>。杨树根癌是一种主要发生在幼苗期的病害。河北全省各地均有发生, 毛白杨、加杨、大青杨均可受害, 以毛白杨的幼树受害最重, 病株率可达 5%~10%。现从杨树的根际土壤中分离得到该病原细菌, 并对其进行了生物学检测并与转基因 741 杨之间基因漂移现象进行了检测,

**第一作者简介:**曹秀利(1978-), 女, 河北邢台人, 博士, 讲师, 研究方向为生物技术。E-mail: cxl\_0@163.com.

**责任作者:**杜克久(1966-), 男, 博士, 教授, 现主要从事基因工程的教学与科研工作。E-mail: dukejiu@126.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30972384)。

**收稿日期:**2014-01-20

[4] 张智俊, 谭晓风, 陈永忠. 油茶总 RNA 及 mRNA 的分离与纯化[J]. 中南林业学院学报, 2003, 23(2): 76-78.

[5] 鲜登宇, 江为, 赵夏云, 等. 开花整合子 SOC1 花期调控的分子机制[J]. 中国蔬菜, 2013(6): 1-8.

[6] 郭文丹. 油桐花芽分化期 Tungfly 基因时空表达及内源激素含量的动态变化[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2009.

[7] 刘海, 林德球, 徐杰, 等. 一种适合于富含多糖和酚类物质的香蕉果实 RNA 提取方法[J]. 果树学报, 2006, 23(1): 136-137.

## Study on Improvement of Methods for RNA Isolation From Flower Bud of *Vernicia fordii* and Clone and Analysis of VfSOC1 Gene

LUO Min<sup>1</sup>, SUN Ying<sup>1</sup>, CHEN Xian<sup>2</sup>, LI Jian-an<sup>1</sup>, XIONG Li<sup>1</sup>

(1. The Key Lab of Non-wood Forest Products of State Forestry Administration, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004; 2. The Landscape and Famous Scenery Management Committee of Dahong Mountain, Suizhou, Hubei 431521)

**Abstract:** Using RNAiso-mate + modified CTAB method for RNA extraction of *Vernicia fordii* flower bud and detect RNA and protein by agarose gel electrophoresis and nucleic acid protein detector respectively, the method of RNA extraction of *Vernicia fordii* flower bud were studied. The results showed that the RNA of high quality, clear strip, high brightness, good integrity and purity was extracted by the method of RNAiso-mate + modified CTAB. The ratio of A<sub>260</sub> and A<sub>280</sub> was 1.97 and 1.93 respectively, yield was 176.9 and 154.2 μg/mL respectively. Based on the extracted high quality RNA, the VfSOC1 gene fragment was successfully cloned by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The length of VfSOC1 gene fragment was 611 bp and encode 203 amino acids. Compared with SOC1 genes of *Ricinus communis*, *Populus trichocarpa*, *Glycine max*, VfSOC1 share 85%, 84% and 78% identity respectively. The phylogenetic analysis showed that the genetic relationship of VfSOC1 and MvSOC1 was closer.

**Key words:** *Vernicia fordii*; flower bud; RNA extraction; SOC1 gene

以期作为转基因植物根际微生物基因转移以及植物根癌病的防治、瘿木的开发利用提供重要的理论和应用价值,为判断转基因林木是否与其周围环境存在基因漂移提供了一定的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为带瘤的非转基因普通毛白杨、转基因 741 杨和对照非转基因毛白杨的组培苗、3 年生大田种植苗及其根际土壤,室外种植胡萝卜和番茄苗等。

### 1.2 试验方法

1.2.1 根际细菌的分离和纯化 取非转基因普通毛白杨上的根瘤,用 70% 酒精将其表面消毒后用无菌水冲洗 3 遍,用无菌刀片切去根瘤的外表皮,将根瘤内部组织削成薄片,然后将其培养于 YEB 固体平板上,28℃,24 h 后得到若干纯菌株菌落并从中获得纯培养体<sup>[5]</sup>。

1.2.2 细菌的鉴定 其形态特征采用油镜活菌观察与显微测微尺测量。其特殊性状用革兰氏染色<sup>[6]</sup>、荚膜染色(湿墨水背景染色法)<sup>[7]</sup>及鞭毛染色(银染色法)<sup>[8]</sup>等方法观察。通过 YEB 固体平板培养,28℃,培养 24 h 后用肉眼观察其培养特征<sup>[5,9]</sup>。

1.2.3 生物学检测 胡萝卜接种鉴定:选择新鲜无损伤的胡萝卜,洗干净后在无菌台上用 70% 酒精对其进行表面消毒,并迅速通过火焰使其干燥。将胡萝卜横切成 5~8 mm 厚的圆片,放在灭过菌的湿润滤纸上,置于无菌培养皿内。用无菌棉球蘸取生长状态良好的菌悬液擦胡萝卜表面或直接滴加菌悬液在其表面上。25℃ 保湿培养,1 周后观察结果。番茄苗接种鉴定:将生长状态良好的番茄苗的幼茎先用 70% 酒精表面消毒后,将菌悬液注射接种于消毒好的幼茎内,然后将接种部位用无菌的棉球蘸取无菌水保湿。置于 20~27℃ 环境中培养,1~2 d 即可除去棉球停止保湿,4~5 d 后观察结果。杨树组培苗的检测:将分离得到的致瘤农杆菌于 28℃、150 r/min 振荡培养 12 h 左右,分装于 7 mL 的无菌离心管中,然后将 3~5 cm 高的转基因 741 杨和对照非转基因毛白杨的组培苗在根部或茎的中下部划出伤口以后,浸泡在该菌液中约 30 min。然后将这 2 种组培苗均接在 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L 上。待这些组培苗在该培养基上生长 4~5 d 后,将转基因 741 杨转接到含有 kan 50 mg/L、carb 200 mg/L 的 1/2MS+IBA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L 上,对照非转基因毛白杨转接到不含抗生素的培养基上。以后每隔一定时间观察此 2 种组培苗的变化差异。杨树大田苗的检测:春季,取 1~2 年生转基因 741 杨和对照非转基因毛白杨无病通直枝条各 10 根于室内分别进行水培养,顶端用石蜡封闭,疏散叶片并每天换水 1 次。4~5 d 后,如果枝条能正常生长,就将该致瘤农杆菌分别反接到转基因

741 杨和普通毛白杨枝条上(采用针刺法和灼伤接种法)。

1.2.4 转基因 741 杨与致瘤农杆菌间基因漂移的分子生物学检测 在浸过该菌液的组培苗经过几代继代培养后,将其叶片或茎段直接接到 YEB 固体平板上,在 28℃ 下培养。当该菌株长出后,再检测其与转基因杨树之间是否有基因漂移。PCR 检测用引物正向序列为 5' CTG ACG TAA GGA TGA CGC AC 3',反向序列为 5' ACT ATT GAT AGT CGC GGC ATC 3',退火温度是 53℃。PCR 反应体系为:DNA 1 μL,10 × Taq Buffer 2.5 μL,2.5 mmol dNTP 0.5 μL,3'端引物 1 μL,5'端引物 1 μL,5 U/mL Taq 酶 0.3 μL,最后加 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL。PCR 反应结束后,取 10 μL PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原菌的鉴定

对从转基因 741 杨根际土壤中分离得到的多种细菌的几种特殊特征进行测定,结果只有 1 种细菌的几种特定形态特征与致瘤农杆菌完全符合。在 YEB 固体培养基上对该细菌进行进一步培养鉴定,可观测到该菌的培养特征也完全符合致瘤农杆菌的培养特征,因此该菌即被确定为致瘤农杆菌<sup>[10]</sup>。

### 2.2 致瘤农杆菌的生物学检测

2.2.1 胡萝卜片和番茄苗接种鉴定结果 用该菌反接胡萝卜(图 1)和番茄苗(图 2),同时用致瘤农杆菌的标准菌株作阳性对照(图 1-C),重蒸水作阴性对照(图 2-A 左图中间植株)。从图 1-B 和图 2-A 两侧植株中可以看出,在茎的底端有一个瘤状体即根瘤,与阳性对照(图 1-

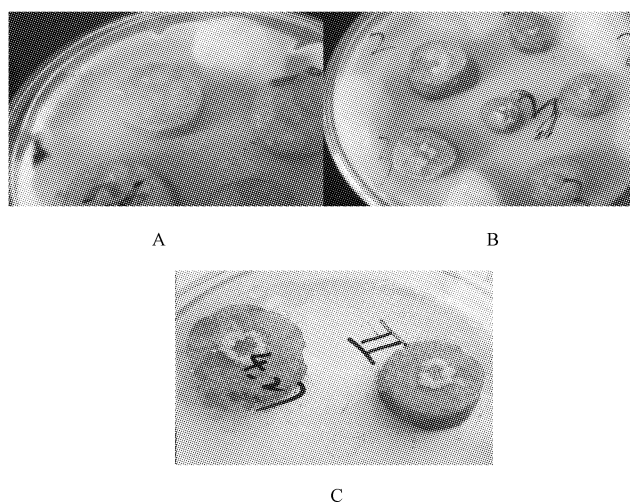


图 1 致瘤农杆菌的胡萝卜反接试验

Fig. 1 The *Agrobacterium tumefaciens* reinoculated to the carrots



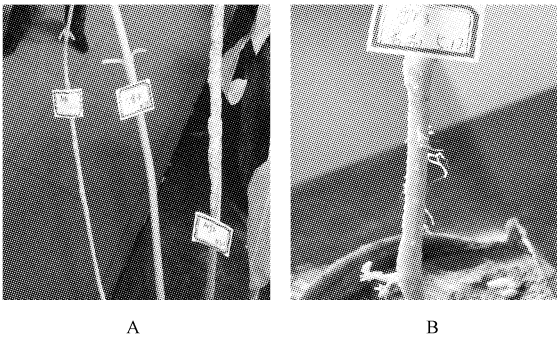


图 2 致瘤农杆菌的番茄苗反接试验  
Fig. 2 The *Agrobacterium tumefaciens* reinoculated to the tomato breedings

表 1 转接 6 d 后组培苗的生根情况  
Table 1 The rootage condition of tissue culture plants after six days

处理 Treatment	株号 No. of line										合计 Total	平均值 Average	显著性检验 Significant test	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			0.05	0.01
被该菌侵染过的 转基因杨 PB29+Arg	7	8	4	9	7	9	11	8	6	10	79	7.9	a	A
被该菌侵染过的 非转基因杨 CK+Arg	5	7	13	5	5	6	9	9	7	8	74	7.4	a	A
转基因杨 PB29	2	0	0	0	1	0	3	3	0	0	9	0.9	b	B
非转基因杨 CK	0	0	2	0	5	0	3	0	0	1	11	1.1	b	B

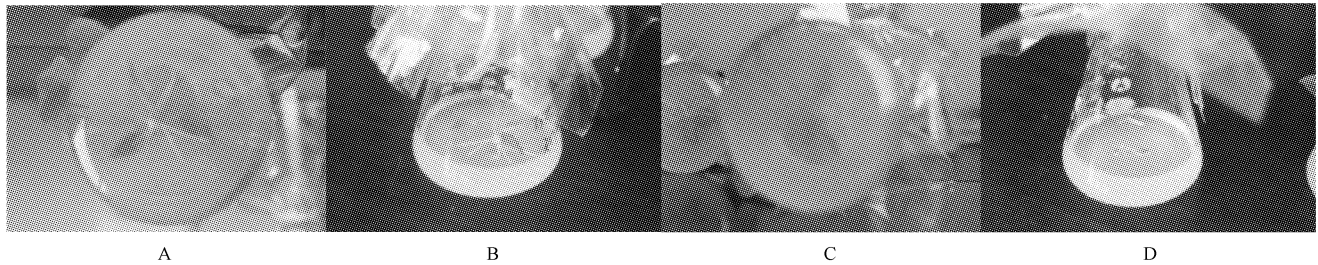


图 3 致瘤农杆菌的毛白杨组培苗反接试验  
注:A、B 为用分离得到的致瘤农杆菌反接的毛白杨组培苗;C、D 为阴性对照用重蒸水反接的毛白杨组培苗。  
Fig. 3 The *Agrobacterium tumefaciens* reinoculated to the tissue culture of *Populus tomentosa*

Note: A, B for the use of isolated tumorigenic *Agrobacterium* reverse connection of Chinese white poplar tissue culture seedlings. C, D as negative control reversed connection with bidistilled water of Chinese white poplar tissue culture seedlings.

明该菌可以明显地促进杨树组培苗的生根。而转基因 741 杨和对照非转基因毛白杨的生根情况没什么分别,即杨树中导入的外源基因对该菌在植物体内的表达影响不大。从图 3 可以看出,致瘤农杆菌对毛白杨组培苗的生根具有明显的促进作用。而且从图 3-A 可以看出,在组培苗的根部低端有一个明显的瘤状物,而阴性对照则没有。

2.2.3 杨树大田苗检测结果 该研究并没有获得预期的根瘤。因为自细菌侵入寄主植物到显现症状的时间可能从几周至 1 a 以上,因气候及其它因素的影响而异。土壤湿度和性质直接影响发病率的高低。通常在湿度大的土壤中发病率高,微碱性和疏松的土壤有助于病害

C)结果相同,而阴性对照(图 2-A 左图中间植株)无此现象出现。根瘤颜色呈肉色。另外,从图 2-B 还可以看出,该菌可以促进番茄苗的不定根的生成。

2.2.2 杨树组培苗检测结果 将浸泡过致瘤农杆菌菌液的转基因 741 杨和对照非转基因毛白杨组培苗在生根培养基上培养 6 d 后,可以看出其生根情况有明显不同。从图 3、表 1 可以看出,被该菌液侵染过的杨树组培苗生根情况均优于没有侵染过该菌液的杨树组培苗;被该菌液侵染过的组培苗全部都有根生出,即生根率为 100%,其中生出的根数为 6~10 条的占 75%,而对照组培苗大部分还没有生根或有少数几条根生出,生根的植株仅占总数的 40%。即用该菌液侵染过的杨树组培苗和没用该菌液侵染过的杨树组培苗的生根情况有极显著差异,进一步说

的发生,而酸性、粘重的土壤则不利于病害的发生。

2.3 转基因 741 杨与致瘤农杆菌间基因漂移的分子生物学检测

当浸过该菌液的转基因 741 杨树组培苗经过 3 次继代培养后,从浸过该菌液的转基因 741 杨和对照非转基因毛白杨组培苗上再一次分离纯化该菌株,对其进行重新鉴定,其结果与前面的鉴定结果完全一致,说明该菌株在组培苗经过几代继代培养后,在植物体内仍有存活。然后提取其质粒 DNA 并对其进行 PCR 检测(图 4)。

从图 4 电泳图可以看出,阳性对照经 PCR 扩增后得到 1 条约 749 bp 的条带,而从转基因 741 杨上和对照非转基因毛白杨上分离获得的菌株经 PCR 扩增后,均没

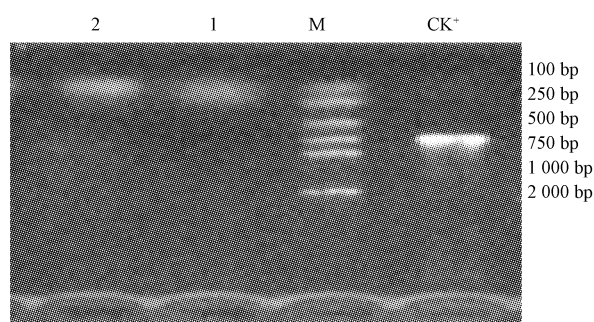


图4 转基因741杨与致瘤农杆菌间  
基因漂移检测结果

注:M;DL 2 000 Marker;CK<sup>+</sup>转基因741杨;1.转基因741杨上获得菌株;2.非转基因杨上获得菌株。

Fig. 4 The identified result of gene flow between transgenic 741 *populus* and the *Agrobacterium tumefaciens*

Note:DL 2 000 Marker;CK<sup>+</sup> transgenic hybrid poplar 741;1. Transgenic hybrid poplar 741 to obtain strains;2. Non transgenic poplar was strain.

有目的条带出现,初步说明外源 *Bt* 基因并没有从转基因741杨上漂移到该菌株的质粒DNA中。

### 3 结论与讨论

致瘤农杆菌在根瘤内存在的数量很少,往往不易从肿瘤组织中分离到。菌体少的原因尚未清楚。但有人从试验中证明了癌肿组织内有噬菌体存在,这可能是菌体少的原因。根癌细菌主要存活在癌瘤的表层和土壤中。该菌在土壤中存活的时间因土内寄主残体存在与否而定,有时可存活几个月甚至1年以上,如果不伴随寄主组织进入土壤中,则只能生活很短的时间。研究表明,在组织中发现有吲哚类化合物,而且细菌在培养基上能产生异生长素,其浓度可使在琼脂上培养的寄主细胞增生,这可能也是促进组培苗寄主生根的主要因素之一。有些学者认为,这种植物细胞的病理变化是许多生

理因素受干扰失去了平衡而开始的。这是由根癌细菌制造的肿瘤诱发素使细胞转化的结果。还有报道认为,寄主癌细胞的产生是由于病菌的致癌基因组进入寄主细胞的结果。自细菌侵入到显现症状的时间从几周到1年以上,因气候及其它因素的影响而异。

该研究用分离所得的致瘤农杆菌反接的室外大田苗没有获得预期的根瘤,其原因可能是由于气候或其它因素所致,由于该菌有明显促进组培苗生根的作用,所以该菌也可能是野杆菌属的发根农杆菌。用该菌对转基因741杨和对照非转基因毛白杨组培苗进行转化,在经过3次继代培养后,从该组培苗中重新分离得到该细菌。并对该菌在反接前后分别进行了外源DNA的分子生物学检测,结果发现其与转基因741杨之间没有基因漂移现象发生。

### 参考文献

- [1] Sule S. Biotypes of *Agrobacterium tumefaciens* in Hungary[J]. Bacteriol, 1978,44:207-213.
- [2] Perry K L, Kado C I. Characteristics of Ti plasmids from broad-host-range and ecologically specific biotype 2 and 3 strains of *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Bacteriol, 1982,151:343-350.
- [3] Lele V C, Durgapal J C, Agarwal D K, et al. Crown and root gall of grape(*Vitis vinifera*) in Andra Pradesh[J]. Current Science, 1978,47:280.
- [4] De Cleene M, Deley J. The host range of crown gall[J]. Bot Rev, 1976, 42:389-466.
- [5] 喻子牛,何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社, 1996:312-325.
- [6] 刘芬,赵韶星. 革兰氏染色三步法[J]. 山西职工医学院学报, 2002(1):54.
- [7] 陈则清,李朝晖. 改良荚膜染色法检查新形隐球菌[J]. 上海医学检验杂志, 1997,12(3):185.
- [8] 张美莲,邢晓波,郭建,等. 介绍一种快速细菌鞭毛染色法[J]. 陕西医学检验, 2000,15(2):29-30.
- [9] 曹秀利,郜秀荣,张昆,等. 转双价抗虫基因741杨根际致瘤农杆菌分离及生长曲线测定[J]. 河北林果研究, 2004,19(2):105-107.
- [10] 周仲铭. 林木病理学[M]. 北京:中国林业出版社, 1989:203-208.

## Study on the Identification of the *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Towns) Conn. and the Gene Interaction With the Transgenic 741 *Populus*

CAO Xiu-li<sup>1,2</sup>, MA Wan-lu<sup>1</sup>, SUN Xu-xia<sup>1</sup>, DU Ke-jiu<sup>2</sup>

(1. Langfang Polytechnic Institute, Langfang, Hebei 065000; 2. College of Forestry, Resources and Engineering Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000)

**Abstract:** Taking *Agrobacterium tumorigenic* isolated from the rhizosphere soil of transgenic 741 *Populus* long tumour and non-GMO populus tomentosa as experimental materials, with the methods of sections, staining and inoculated respectively, the morphology and biology of two *Agrobacterium tumorigenic* were identified. The results showed that the morphological characters were accord with the character of the *Agrobacterium tumefaciens*. Tumorigenicity test of carrot and tomato seedlings was positive; The bacterium induced tumour of carrot and tomato, at the same time, this bacterium could facilitate the rootage and the cancerization of the carrots and the tomato seedlings. The gene flow phenomena could not be found between this bacterium and its host after it was reinoculated to the transgenic 741 *Populus*.

**Key words:** *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Towns) Conn.; biological identification; transgenic 741 *Populus*; gene flow