

运用生色基因标记黄瓜根围促生菌(PGPR)筛选菌株^{*}

陈晓斌¹ 张炳欣^{1*} 楼兵干¹ Ryder M H²

(¹ 浙江大学植物保护系, 杭州 310029)

(² CSIRO Land and Water, Glen Osmond, SA, 5064, Australia)

摘 要:采用三亲交配方法,通过 Tn7 转座系统将 *lacZY* 标记基因导入黄瓜根围促生菌(PGPR)筛选菌株 *Pseudomonas fluorescens* CN116 和 *Pseudomonas corrugata* CN31 的利福平抗性突变株中;标记假单胞菌菌株则被赋予了利用乳糖作为唯一碳源的能力,在只有乳糖的 M9 培养基上生长能分解 X-Gal,菌落显出特有的蓝色;经 Southern 杂交分析,证明标记基因 *lacZY* 存在于转化菌株的染色体上;经验证标记菌株标记性状稳定,与对应的野生菌株比较其它性状如培养性状、形态特征、生防效果等基本不变;PGPR 菌株利福平抗性和生色基因标记的结合(双标记)能最大限度地将土壤中引入的 PGPR 菌株与土著细菌分开,检测下限可达 10 CFU/mL,为 PGPR 在根围的分子生态学研究提供了一个较好的工具。

关键词:植物根围促生菌(PGPR),基因标记,*lacZY* 基因,转座子 Tn7,分子生态学

中图分类号:Q344. *3 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 03-0287-06

植物根围促生菌(Plant Growth-Promoting Rhizobacteria,简称 PGPR)是指根围的一类有益细菌,能直接或间接地对植物生长起促进作用,能够抑制多种植物病害尤其是土传病害^[1]。近年来,PGPR 菌株的筛选利用及其防病促生机制的研究已成为一个热点,至 1997 年,有关 PGPR 的国际专门研讨会已举行了四届^[2]。但对 PGPR 的作用机制的研究尚很不清楚^[3],特别是 PGPR 菌株在根围定殖动态的研究,如分布规律,非生物因素(如水势、温度和 pH 等)的影响,与宿主植物的关系,与病原微生物的互作等。由于缺乏理想的研究方法去跟踪检测引入根围的 PGPR 菌株,而将其与土著细菌分开,以致于上述许多问题的研究结果准确性不高^[4]。

随着分子生物学技术发展,近几年来生态学和分子生物学交叉形成了一门新兴边缘学科—分子生态学,其研究的主要内容是以分子生物学技术探讨生态学问题^[5]。一些具有高选择性、高灵敏度的技术包括免疫学方法、核酸探针和分子标记等日益成熟并用于根围生态学研究,其中,通过遗传重组将外源标记基因(Marker gene)导入供试菌株从而在回收或检测引入根围中的该种菌株时可以将其与同类土著细菌分开的方法为一个突出的代表,正成为飞速发展的研究领域。在土壤微生物研究中应用最多的标记基因是生色基因(如 *gus* 基因, *lacZY* 基因等)和生物发光酶基因(如 *luxAB*)^[4,6,7]。PGPR 菌株中的假单胞菌类通常不能利用乳糖作为碳源和能源物质^[7],通过转座子系统将大肠杆菌乳糖操纵子

^{*} 中澳合作项目(ACIAR PN9680)与国家自然科学基金项目(30070511)资助

^{**} 联系人

作者简介:陈晓斌(1967—),男,四川简阳人,农学博士,研究方向是根围 PGPR 生态学。

收稿日期:2000-07-24,修回日期:2000-10-18

的 *lacZ* 基因(编码 β -半乳糖基酶)和 *lacY* 基因(编码乳糖透性酶)转入假单胞菌菌株后,转化菌株则能利用乳糖作为唯一的碳源,在只有乳糖的 M9 培养基上生长,并能分解 X-Gal(5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷),菌落显出特有的蓝色,从而区别于同类土著细菌而得以回收^[8,9]。本文报道了将生色基因 *lacZY* 通过转座子 Tn7 导入黄瓜 PGPR 筛选菌株 *Pseudomonas fluorescens* CN116 和 *Pseudomonas corrugata* CN31,以及导入基因的 Southern 杂交验证和标记菌株初步应用于检测的实验结果。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

供体菌株大肠杆菌 *E. coli* R126,质粒为 pMON7197,含 *lacZY* 基因、转座子 Tn7 成分,具有 Gm^r(庆大霉素抗性)等^[10];助体菌为大肠杆菌 *E. coli* R81,质粒 pRK2013, Km^r(卡那霉素抗性),目标菌株为两个 PGPR 菌株 *Pseudomonas fluorescens* CN116 和 *pseudomonas corrugata* CN31(以下简称 CN116 和 CN31),为本实验室分离筛选自黄瓜根围,经盆栽和田间实验证明对黄瓜植株生长有明显的促进作用,并对由多种病原引起的黄瓜苗期猝倒病有较好的防治效果^[11],经细菌 BIOLOG 鉴定系统和 GC-FAME 鉴定系统鉴定至种。

1.2 培养基、抗生素及试剂

实验所用培养基有:KMB、TZCA^[11]、LB^[12]和 M9^[12]。

抗生素:庆大霉素(Gm),卡那霉素(Km),利福平(Rif),均为 Sigma 产品,分子生物学实验涉及的溶液和试剂参考文献[12]。

1.3 目标菌株的乳糖利用缺陷(*lac*-)表型鉴定和利福平自发抗性(Rif)突变株筛选

CN116 和 CN31 经 KMB 活化后,于 M9/*lac* 平板(含 1%乳糖的 M9 固体培养基)划线培养(27℃,48 h),检测生长情况;利福平自发抗性突变株的筛选采用平板涂布法,培养基为 KMB/Rif, Rif 浓度从低到高:20mg/L、40mg/L、60mg/L、80mg/L、100mg/L。

1.4 细菌杂交和转移接合子(标记菌株)的筛选

供体菌、助体菌和受体菌分别于含相应抗生素的 LB 培养液中培养,28℃过夜,取对数生长期的菌液,按供体菌:受体菌:助体菌为 1:1:1,10:1:1,1:10:1 和 1:1:10 等组合,分别至 1mL Eppendorf 管中混匀,用微量加样器转移到 LB 平板中央(不必涂布),30℃培养 18~24 h 后,用 2mLM9 培养液小心回收,涂布到 M9/*lac* (1%)/Rif (50mg/L) X-Gal (0.006%) 平板上,直到蓝色菌落长出。转移接合子的筛选是将长出的蓝色单菌落同时于 M9/*lac*/Rif/X-Gal 和 M9/*lac*/Gm/X-Gal 两种平板上划线培养,观察其生长情况,只保留在 Rif 平板上能生长而在 Gm 平板失去生长能力的蓝色菌落,即标记菌株的筛选。

1.5 标记基因的 Southern 杂交验证

供体菌质粒 DNA 的提取,标记 PGPR 菌株和相应野生菌株基因组 DNA 的提取, Southern 杂交等均参考文献[12]进行,其中杂交用探针是供体菌质粒 DNA 经限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切后,回收约 7kb 片段(质粒上 *lacZY* 基因所在片段),并用同位素 α -³²P 标记;基因组一完全酶切所选限制性内切酶为 *Hind* III,杂交滤膜为尼龙膜。

1.6 标记性状的稳定性检测

标记性状的稳定性检测包括在 KMB 平板(包括加和不加 Rif)上连续转代培养后、菌

种斜面保存一定时期后并混入土样(灭菌和不灭菌的菜园土)中一定时期后再用 M9/*lac*/Rif/X-Gal 平板检测。

1.7 标记 PGPR 菌株与对应野生型菌株比较

标记 PGPR 菌株与对应野生型菌株比较包括: TZCA 培养基上菌落形态比较; 通过液体培养, 用分光光度计比较两者的生长速度; 在 KMB 培养基上的荧光色素产生情况; PDA 平板对峙培养测定对黄瓜苗期猝倒病主要病原 *Rhizoctonia solani* AG4、*Pythium aphanidermatum* 和 *P. ultimum* 的离体拮抗性; 盆栽和隔离温室实验中促生和防病效果测定等。

1.8 标记菌株应用于回收检测

标记菌株选取 CN116RL, 生理盐水制成的菌悬液经平板稀释记数法测得已知浓度(达到 10^9 CFU/mL ~ 10^{10} CFU/mL)后, 用不同菜园土土样浸出液(含有大量土著细菌)进行梯度系列稀释后涂布于 KMB/Rif、M9/*lac*/Rif/X-Gal 和 M9/*lac*/X-Gal 平板上, 30℃ 培养 48 h, 观察形成菌落和生色情况。

2 结果和分析

2.1 CN116 和 CN31 两菌株的 *lac*-表型鉴定和 Rif 突变株筛选

CN116 和 CN31 两菌株在 M9 平板上划线培养, 均没有菌落长出, 说明这两株菌与其它假单胞菌一样, 均不能利用乳糖作为唯一碳源, 为 *lac*-(乳糖利用缺陷)表型。通过采用培养基中 Rif 浓度逐渐升高的方法, 筛选 CN116 和 CN31 抗性突变株到 Rif 浓度为 100mg/L, 记为 CN116R 和 CN31R, 经染色体指纹分析, 抗性菌和野生菌株为一致的。

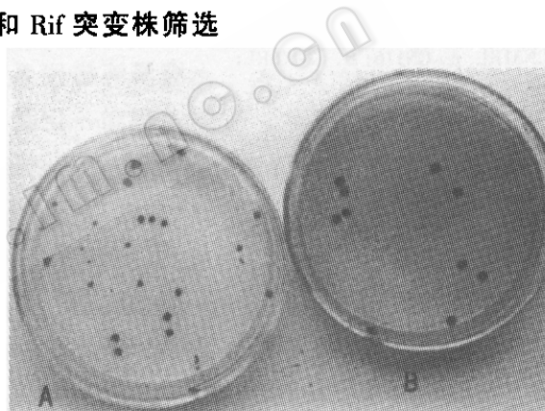


图 1 同一稀释浓度菌株 CN116RL 在不同选择性平板上菌落回收情况

Fig.1 Recovery colonies of CN116RL grown on different selective media at the same diluted density

A: M9/*lac*/X-Gal; B: M9/*lac*/Rif/X-Gal.

2.2 细菌杂交与标记菌株筛选

M9 培养液回收的混合液涂布到 M9/*lac*/Rif/X-Gal 选择平板上长出蓝色菌落后, 挑取的同一菌落只有极少数(约 5%)能在 M9/*lac*/Gm/X-Gal 平板生长, 其余绝大部分均失去 Gmr, 说明采用三亲本交配法, 双元载体

在 pRK2013 协助下, 将标记基因 *lacZY* 转移到了 CN116R 和 CN31R 菌株。选择培养基的使用同时既排除了供体菌的干扰, 同时也排除了转化菌中质粒 pMON7197 的存在。筛选的标记菌株记为 CN116RL 和 CN31RL, 在 M9/*lac*/Rif50/X-Gal 平板上划线培养, 菌落为蓝色(生色表型)(如图 1)。

2.3 导入基因的 Southern 印迹分析

CN116、CN116RL、CN31、CN31RL 的基因组 DNA 经 *Hind* III 酶完全酶切(图 2)后, 与同位素标记的探针杂交, 经放射自显影后, CN116RL 和 CN31RL 均有杂交带出现, CN116RL 和 CN31RL 杂交后只有一条带, 说明基因组 DNA 上均只有一个位点插入。

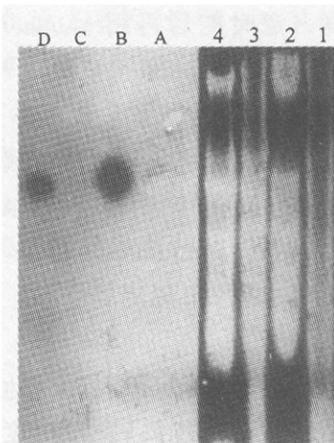


图2 导入标记基因的 Southern 杂交分析

Fig.2 Southern blotting analysis of inserted marker gene

1. CH116; 2. CN116RL; 3. CN31; 4. CN31RL. A. CN116; B. CN116RL; C. CN31; D. CN31RL.

2.4 标记性状的稳定性检测

连续转接 30 次以上,保存半年以上标记菌株的标记性状在选择平板上均稳定表达;无论是灭菌土还是非灭菌土经低温保存两个月,在选择性平板上均能有效地回收得到典型的蓝色菌落。这些实验说明标记基因在转化菌株中是较稳定的。

2.5 标记 PGPR 菌株与对应野生型菌株的比较

通过比较,每一标记菌株与其对应的野生型菌株的菌落形态、生长速度、荧光色素产生情况基本一致;标记菌株对黄瓜苗期猝倒病主要病原 *Rhizoctonia solani* AG4、*Pythium aphanidermatum*、*P. ultimum* 的离体拮抗也基本无变化;尤其是作为 PGPR 菌株的重要特征的防病促生效应仍然得以保持(图 3、图 4),标记菌株除标记性状以外其他性状基本与野生型菌株一致。

2.6 标记菌株应用于回收检测

通过已知浓度的 CN116RL 菌悬液用含有大量土著细菌的土壤浸液梯度系列稀释后涂布于不同的选择性平板,发现土壤中存在一定量的细菌(约占 10%)能利用乳糖,并能分解 X-Gal 形成蓝色菌落(如图 1A),虽然这些菌落通常都较小(假单胞菌掠夺营养能力强,生长速度相对较快),但不可避免地会造成干扰;而在加 Rif 的抗性 M9 平板上,则只有一种大小均一的菌落(如图 1B);另外在 KMB/Rif 平板上回收的目标菌落数常常偏大,存在土著细菌的天然利福平抗性。利用双标记回收目标细菌时,稀释倍数在 10^9 — 10^{10} 时,尚能分离到蓝色菌落,检测平板上仍能观察到蓝色菌落,即检测下限能达到 10CFU/mL,能较好地反映出目标菌株在土壤、根围等特殊生境中的真实情况,而我们在只用 Rif 标记菌株时,检测下限至少在 10^2 — 10^3 CFU/mL 之间。

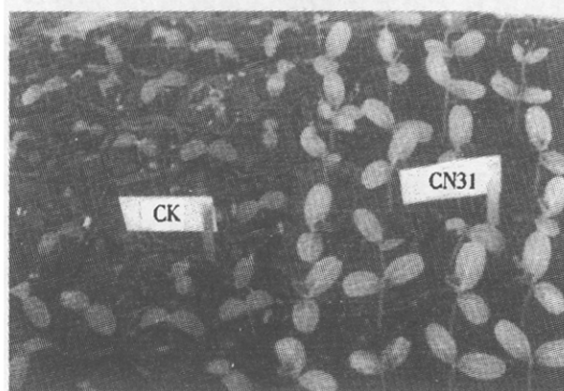


图3 CN31 菌株的防病促生效果

Fig.3 The cucumber growth-promoting and disease control effect of CN31

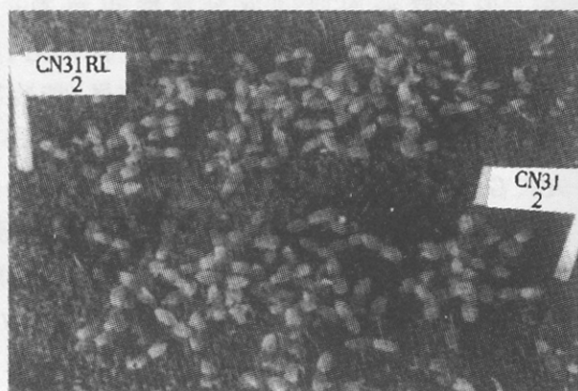


图4 CN31 和 CN31RL 防病促生效果比较

Fig.4 Comparison on the effect of disease control and cucumber growth-promoting by CN31 and CN31RL marked with *lacZY*

3 讨论

将引入根围的 PGPR 菌株与环境中的同类土著细菌分开,达到特异性回收检测,是研究其作用机制和在根围的生态学等问题的基础。传统的检测方法中最具代表性的是利用菌株的自发抗生素抗性,即筛选 PGPR 菌株的抗生素突变体利用选择性平板回收。该方法具有操作简便,成本低廉等优点,但由于土著细菌往往存在一定的天然抗性素抗性,因而有背景干扰。虽然采用筛选同时具两种(或以上)抗生素抗性的突变菌株能一定程度地解决这一问题,但往往导致筛选细菌生长明显受抑制或存活能力低,而不利于跟踪检测。此外,抗生素抗性突变体的利用还存在抗性不稳定的问题,而且其检测下限只在 10^2 CFU/g $\sim 10^3$ CFU/g 土的水平,灵敏度有限^[4]。

Drahoš 和 Hemming^[8,9]通过对至少 500 个假单胞菌菌株分离物验证,发现它们都不能利用乳糖作为唯一碳源,即乳糖利用缺陷型(*lac*-)。我们在肯定了供试 PGPR 菌株的 *lac* 表型基础上,通过 Tn7 转座系统,将基因 *lacZY* 导入其中,经 Southern 杂交分析,证明标记基因位于染色体而非质粒上,从而保证标记性状遗传的稳定持久,这正是作为跟踪检测工具所必须具备的^[13]。作为生防菌,标记后仍具有生防效果乃是至关重要的,也就是说,最好达到标记菌株除标记性状以外其它性状基本与野生型菌株一致。人们早就发现筛选的利福平抗性突变株往往不影响菌株的生防活性^[8]。同时本研究选用的 Tn7 转座子,插入位点在细菌基因组上是特异的,而且在每个细菌基因组的插入位点只有一个^[13],外源基因插入目标菌株后往往不会产生诱变,即非诱变插入(non-mutagenic insertion)^[14,15];而与过去常采用的 Tn5 转座系统,其在基因组上的插入是随机的、多位点的,插入诱变(mutagenic insertion)非常普遍,而插入诱变有利时情况(如彭于发等用 Tn5 诱变的 D93 生防菌株^[16])一般极少,往往有害或至少改变目标菌株的性状。因此,我们采用了 Tn7 转座系统对生防菌是适用的,从而保证了 PGPR 菌株的防病促生效应不受影响。实验结果也证明 *lacZY* 基因在两个供试菌株染色体上插入位点的特异性,标记菌株与其对应的野生菌株比较,除标记性状以外其他性状如培养性状,形态特征,生防效果等基本保持不变。

作为标记性状用于目标菌株的跟踪检测,要求检测灵敏度高。本实验结合 *lac* + 和 Rif + 双标记目标菌株,能有效避免背景干扰,特异性表型明显,回收菌落下限 < 10 CFU/g 土,比传统的利用抗生素抗性的回收检测方法精确得多。

实验结果表明,CN116RL 和 CN31RL 两标记 PGPR 菌株标记性状稳定、菌株的促生防病效果不变(图 4)、回收检测灵敏度高等特点,为 PGPR 菌株在根围的分子生态学研究工作提供了一个较为理想的工具。

参 考 文 献

- [1] Bay-Petersen J. The Biological Control of Plant Disease. FFTC Book Series, No. 42. Taipei: Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region, 1991. 142 ~ 152.
- [2] Ogoshi A, Kobayashi K, Honma Y. *et al.* Proceedings of the Fourth International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Sapporo, Japan, October 5 ~ 10, 1997, 65 ~ 71.
- [3] Agrios G N. Plant Pathology. 4th Edition. New York, San Francisco, London. Academic Press. 1997. 197 ~ 198.
- [4] Ryder M H. Detection of Introduced Bacteria in the Rhizosphere Using Marker Genes and DNA Probes. In: O' Gara F, Dowling

- D N, Boesten B ed. *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms*. Weinheim New York, Basel Cambridge, Tokyo VCH: CRC Press. 1994. 29 ~ 47.
- [5] 向近敏. 分子生态学. 武汉: 湖北科技出版社, 1996.
- [6] Lindow S E. *Molecular Ecology*, 1995, 4: 555 ~ 566.
- [7] 王 平, 李卓棣. 生物技术通报, 1994, 5: 9 ~ 12.
- [8] Hemming B C, Drahos D J. *J Cellular Biochemistry supplement*, 1984, 8: 252.
- [9] Drahos D J, Hemming B C, Mcpherson S. *Biotechnology*, 1986, 4: 439 ~ 444.
- [10] Barry G F. *Gene*, 1988, 71: 75 ~ 84.
- [11] 陈晓斌, 张炳欣, 楼兵干, 等. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 1999, 6: 578 ~ 82.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T(金冬雁等译). 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1992.
- [13] Lichtenstein C, Brenner S. *Nature*, 1982, 297: 601 ~ 603.
- [14] Turner P, Barker C, Daniels M. *Mol Gen Genet*, 1984, 195: 101 ~ 107.
- [15] Barry G F. *Biotechnology*, 1986, 4: 446 ~ 449.
- [16] 彭于发, 陈善铭. 植物病理学报, 1990, 4: 446 ~ 449.

INTRODUCTION OF THE CHROMOGENIC GENE TO THE PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA OF CUCUMBER *

Chen Xiaobin¹ Zhang Bingxin^{1**} Lou Binggan¹ Ryder M H²

(¹ Department of Plant Protection, Zhejiang University, Hangzhou, 310029, China)

(² CSIRO Land and Water, Glen Osmond, SA, 5064, Australia)

Abstract: Using a bicomponent transposition system with the *E. coli lacZY* gene cloned between Tn7 termini, a sensitive, selectable marker based on expression of the *E. coli lac* operon genes encoding β -galactosidase and lactose permease was transformed into the rifampicin resistant mutant of plant growth-promoting rhizobacteria of cucumber, *Pseudomonas aeruginosa* CN116 and *Pseudomonas corrugata* CN31, respectively. Transformants were conferred the ability to utilize lactose as a sole carbon source and the ability to cleave the chromogenic substrate X-Gal to show a specific blue color. Southern blotting analysis showed that *lacZY* gene was inserted into the genome DNA of target strains. Compared with the wild type strains, the cultural characters, morphological features, growth promoting and disease control effects of transformants were almost unchanged, except the new marked phenotype. This marker system enabled the detection of *lac*⁺ transformants at sensitivity of 10 CFU/g soil, which makes the further studies on PGPR more easily.

Key words: Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), Chromogenic marker gene, *lacZY* gene, Transposon Tn7, Molecular ecology

* Project Granted by ACIAR PN9680 and Chinese National Natural Science Fund(30070511)

** To whom correspondence should be addressed