

油菜内生细菌 16S 核糖体 DNA 的 RFLP 分析

杨瑞先 孙广宇* 张 荣 陈立军

(西北农林科技大学植保学院 杨凌 712100)

摘 要 植物内生细菌定殖在植物组织内部但不引起明显的病害症状。从健康油菜植株的不同器官中分离到大量内生细菌,这些细菌菌落形态存在明显的差异,表明油菜组织中存在大量内生细菌,且类群丰富。分离到的 122 株内生细菌根据菌落形态可以划分为 35 类,利用细菌通用引物对 16S 核糖体 DNA 进行扩增,获得约 1.5 kb 片段,分别用内切酶 *Hae* III 和 *Msp* I 对扩增产物进行限制性酶切,产生不同的酶切图谱,根据酶切图谱聚类分析结果,所有供试菌株被归为 39 类,这一结果从遗传上显示油菜内生细菌类群的多样性。两种方法归类结果比较发现菌落特征所反映的信息量有限,只能作为初步的参考指标,核糖体 DNA 的限制性片段长度多态性分析快速、准确,可以作为油菜内生细菌多样性分析的一种有效方法。

关键词 多样性, 16S 核糖体 DNA, 限制性片段长度多态性

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)04-0606-04

植物内生细菌(Endophytic bacteria)定殖在植物组织内部但不引起明显的病害症状^[1]。内生细菌对其宿主具有许多生物学作用,例如促进植物生长、抵抗病虫害侵袭等,因而植物内生细菌概念提出的时间虽然较短,已引起了微生物学家、植物病理学家和微生物生态学家以及作物学家们的广泛关注。油菜内生细菌的系统研究目前开展的较少。Germida 等^[2]最早开始油菜内生细菌的分离工作,从油菜根中分离到了 220 个分离物,鉴定了其中的 137 株,隶属于 8 个属。Nejad 等^[3]筛选出一些内生菌株,这些分离物可提高油菜种子萌发速度,促进幼苗生长,并能显著降低油菜上一些微管束病害的发生。Graner 等^[4]从分离的内生细菌中筛选到一些有益的生防菌株。整体看来,以前油菜内生细菌的研究主要集中在生防菌筛选方面。

传统的细菌鉴定方法费时费力,不适合于大量细菌的鉴定和种类、种群多样性研究。近年来,随着生物化学和分子生物学技术的发展,一些新的分子生物学技术,如 16S rDNA PCR-RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)技术、T-RFLP 分析等分子分类方法为我们的工作提供了极大的方便。细菌的 16S rDNA 基因大小适中,既含有高度保守序列,同时具有相当的变异,其 RFLP 分析能够较好地反映出属、种和亲缘关系较近的菌株间的差异,目前研究者已将 16S rDNA PCR-RFLP 分析用于细菌多样性研究^[7-9]。

本研究对健康油菜植株的不同器官进行内生细菌分离,根据菌落形态进行初步归类,并采用 16S rDNA PCR-RFLP 技术将分离的内生细菌进行系统归类,建立不同内生细菌的

16S rDNA PCR-RFLP 图谱类型,试图为今后油菜内生细菌种群多样性、种群动态、种群鉴定等提供一种简便、快捷的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织材料 试验所用甘蓝型油菜(*Brassica napus*)组织材料采自陕西杨凌农田。采样时选择为无病害症状、无虫孔的材料。所有分离材料均在苗期采集。

1.1.2 试剂 *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶为 Promega 产品,引物由上海 Sangon 公司合成,其它试剂均购自北京鼎国生物工程技术有限公司。

1.2 内生细菌的分离和纯化

将采集的新鲜样品(根、茎、叶和叶柄)带回室内,取 1g 鲜组织用流水冲洗 3min,滤纸吸去水分,75%乙醇浸 1min,转入 2%次氯酸钠溶液中 3min,75%乙醇 30s,无菌水漂洗 3 次,剪碎放于无菌研钵中,加 9mL 无菌水,充分研磨,汁液梯度稀释两次,取 0.2mL 涂布到 NA^[8]平板上,每个浓度涂 3 个平板,28℃培养 2~3d,根据菌落形态、颜色、大小分别挑取不同类细菌,并在 NA 平板上划线纯化,纯化后的内生细菌用含 10%甘油的 NB^[10]培养基于 -20℃保存、备用。

1.3 分离物的初步归类

将不同时间、不同批次分离获得的菌株,在相同的培养条件下进行菌落形态的比较。主要根据菌落的颜色、大小、突起特征、边缘特征、表面光滑与否和透明度等肉眼可辨的特征对分离到的内生细菌进行初步归类^[10,11]。使用培养基:

基金项目 国家自然科学基金(30170004)

* 通讯作者。Tel 86-29-87092075 Fax 86-29-87092402 E-mail: sunguang@public.xa.sn.cn

作者简介 杨瑞先(1979-),女,河南洛阳人,硕士研究生,植物病理学专业。E-mail: fairy19790805@163.com

收稿日期 2004-12-15,修回日期 2005-04-16

NA 培养基 培养条件 28℃。

1.4 细菌 DNA 制备

取在 NB 培养液中过夜培养的菌悬液 1.5mL, 离心收集菌体, 用超纯水洗涤两次后, 加入 100 μ L 超纯水, 于沸水中煮 10min, 10000g 离心 3min, 取上清液稀释 100 倍后直接作为 PCR 扩增模板^[12]。

1.5 16S rDNA 的扩增

扩增采用细菌 16S rDNA 的通用引物 BSF 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 BSR 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'^[13]。PCR 体系(25 μ L): 细菌模板 DNA 30ng, 10 \times PCR 缓冲液(含 25mmol/L MgCl₂) 2 μ L, 引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, dNTP(2.5mmol/L) 1.5 μ L, Taq DNA 聚合酶(2U/ μ L) 1 μ L, 加水补足 25 μ L。PCR 反应条件: 94℃ 5min; 94℃ 30s, 55℃ 1min, 72℃ 2min, 35 个循环, 72℃ 5min。反应结束后, 取 2 μ L PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.6 扩增片段的限制性酶切分析

分别用 *Hae* III 和 *Msp* I 两种限制性内切酶对 16S rDNA PCR 扩增产物消化。酶切反应总体积为 20 μ L, 含 8 μ L PCR 反应产物, 1U 的内切酶和 2 μ L 的 10 \times 反应缓冲液。37℃ 水浴 4h 后, 取 8 μ L 酶切产物在 2% 的琼脂糖凝胶上 80V 电压进行电泳检测。

统计每个酶切图谱上酶切片段的大小, 对应于每一个菌株, 在相同位置上有条带的编码为“1”, 无条带的编码为“0”, 转化成计算机可以接受的数值, 采用 SAS 数据分析软件包 Cluster 聚类过程中的类间最短距离(Single)方法进行分析, 将结果转化为树状图。

2 结果和分析

2.1 内生细菌的分离结果

将采集的新鲜油菜样品的不同组织器官根、茎、叶和叶柄表面消毒后进行组织内部内生细菌的分离。结果发现培养基中长出大量菌落, 菌落形态存在明显的差异, 说明油菜组织中不仅存在大量的内生细菌, 而且内生细菌的类群丰富。

在分离过程中, 对不同组织器官的同批次分离菌株肉眼感觉不同的菌落分别编号, 并进行纯化。共获得内生细菌 122 株, 其中从根部分离到 29 株, 叶部 25 株, 叶柄 24 株, 茎部 44 株。为了对这些菌株进行归类, 将不同批次分离的所有菌株在相同培养基相同培养条件下进行培养和比较。主要依据菌落的形态进行归类, 在单菌落的颜色、大小、是否突起, 突起特征、边缘特征、表面光滑与否和透明度等任意一个方面存在有差异, 就归为不同的类群。根据这一标准, 将 122 个菌株归为 35 类(结果未显示)。

2.2 16S rDNA 扩增和限制性酶切结果

以 BSF 和 BSR 为引物, 特异性地对部分 16S rDNA 区段进行扩增, 所有供试菌株均可获得 PCR 产物, 扩增片段大小约为 1.5kb 左右。利用限制性内切酶 *Hae* III 和 *Msp* I 分别对扩增片段进行酶切, 经电泳产生了丰富的谱带类型, 其中 *Hae* III 酶切后产生了 17 种类型(图 1), 不同类型包含的酶切片段数目不同, 多数为 3~7 条带, 最大的为 1200bp, 所有菌株均有一条 200bp 和一条约 150bp 的条带, 其它条带大小不同, 为多态性片段; *Msp* I 酶切后产生了 12 种不同的图谱类型, 最大的酶切片段也为 1200bp, 所有菌株均有一条大小约为 100bp 的条带, 其它条带大小不同, 为多态性片段(图 2)。

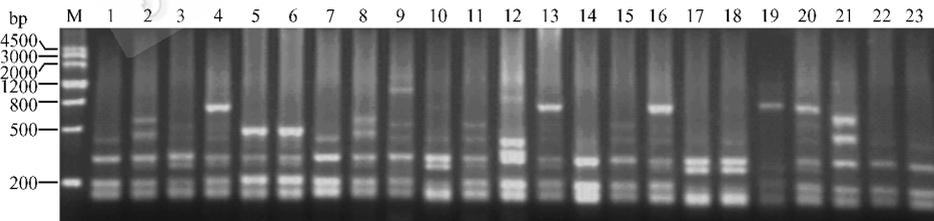


图 1 部分菌株 16S rDNA 的 *Hae* III 限制性酶切图谱

Fig. 1 Restriction patterns of 16S rDNA of tested strains digested with *Hae* III

M, DNA marker III; 1. BS15 2. GW1 3. BS19 4. J6 5. BS2 6. LT5 7. B5 8. G19 9. J2; 10. LT6; 11. J11; 12. J1; 13. BYM3; 14. BS10; 15. BS5; 16. BS7; 17. BS4; 18. LT11; 19. LT21; 20. G8; 21. LT12; 22. G5; 23. BYB1.

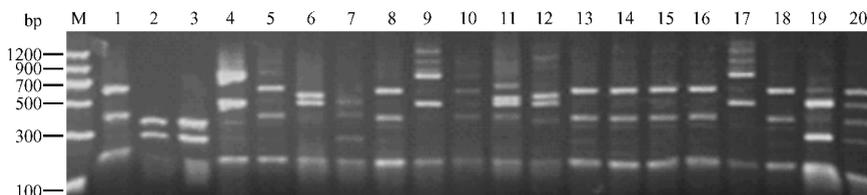


图 2 部分菌株 16S rDNA 的 *Msp* I 限制性酶切图谱

Fig. 2 Restriction patterns of 16S rDNA of tested strains digested with *Msp* I

M, DNA marker II; 1. J2 2. BS7 3. LT23 4. BS5 5. LT17 6. B3 7. BS10 8. B5 9. J44; 10. LT7; 11. J3; 12. J27; 13. LT24; 14. BS18; 15. LT9; 16. J2; 17. J38; 18. BS4; 19. J29; 20. G19.

2.3 限制性酶切图谱的聚类分析结果

结合两种酶切的图谱结果,统计每个酶切图谱的酶切片段,对应于每一个菌株,有条带处以“1”表示,无条带处以“0”

表示。小于 100bp 的片段在琼脂糖凝胶上难于辨别,均不统计。采用 SAS 数据分析软件中的聚类分析程序进行相似性聚类分析,产生树状图(图 3)。

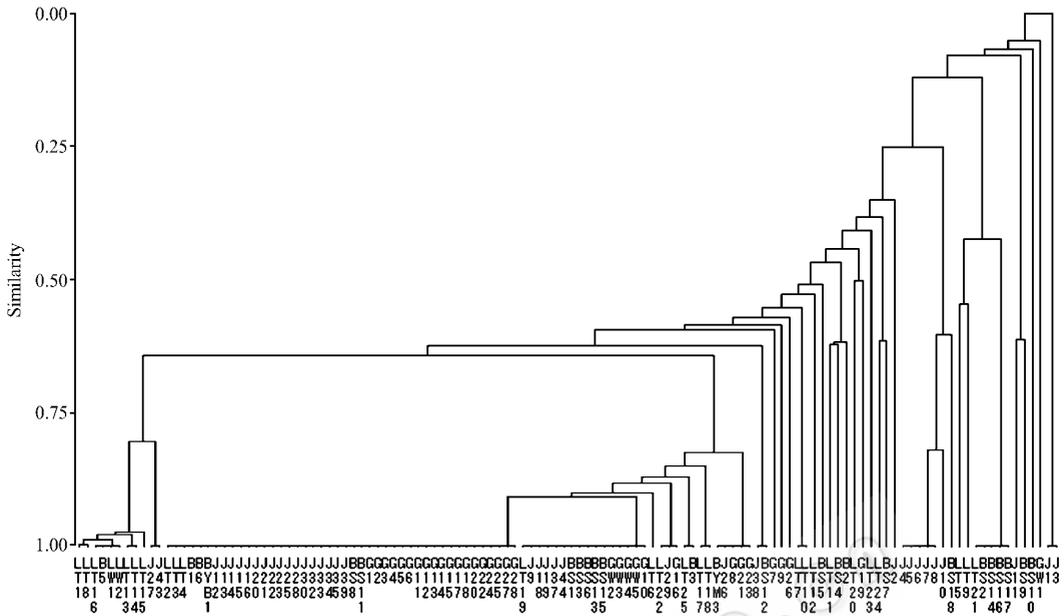


图 3 油菜内生细菌 16S rDNA PCR-RFLP 图谱相似性聚类图

Fig. 3 Dendrogram based on the similarity of PCR-RFLP patterns using clustering analysis

从树状图中可以看出,122 株内生细菌在 100% 的相似水平上被聚类分为 39 个类群。其中部分类群具有较高的相似性,多数类群差异较大,在 70% 的相似水平上仍被聚类分为 27 个类群,表明油菜内生细菌存在丰富的多样性。

为了方便起见,树状图中每个类群的第一个菌株号作为该类群的编号。在 39 个类群中,类群 LT2 和 LT19 都包括分离自根、茎、叶和叶柄的菌株,表明这 2 个类群的细菌能够系统性存在于寄主体内;类群 BYM3、LT21、LT16、LT22、LT1、LT13、LT17、J1 和 LT25 等都包括至少分离自 2 种以上器官组织的菌株,这些类群也具有在寄主内系统存在和扩展的能力;其它类群的菌株都分别来自根、茎和叶中的一种器官,这些菌株是否具有系统定殖能力有待于进一步的试验证据。

3 讨论

本研究从油菜不同器官组织中分离到大量内生细菌。通过菌落形态和 16S rDNA PCR-RFLP 分析发现油菜内生细菌存在丰富的多样性。根据菌落形态我们将分离的菌株归为 35 类,根据两种限制性内切酶酶切图谱的统计分析 122 株内生细菌被归为 39 类,两种方法归出的类群数量大致相当。将两种归类方法的结果相比较发现,部分归类结果相一致,如 LT7 和 LT10 其菌落形态相同,在树状图中,LT7 和 LT10 也聚为一类,G3、G6、G15、G26、G27 和 G28 菌落形态分类和 RFLP 分析结果也是一致的,但是对于多数类群,归类结果差异很大,说明根据菌落形态进行归类不可靠,只能作为初步的参考指标。鉴于此,我们认为在内生细菌的分离、多样性研究、种群动态分析中,要充分注意菌落特征反应遗传差异

的局限性。

16S rDNA PCR-RFLP 技术被用于许多细菌(包括内生细菌)的多样性研究和鉴定,在本研究中,利用两种限制性内切酶的 RFLP 分析能够反映出油菜内生细菌丰富的多样性,显示 16S 核糖体 DNA 的 RFLP 可以作为油菜内生细菌多样性分析的一种有效方法。

利用 RFLP 分析对快速、经济地评估自然生境中微生物的多样性具有重要作用。本试验将油菜内生细菌的 16S rDNA 归为 39 个不同的 RFLP 型(结合 *Hae* III 和 *Msp* I 两种酶切图谱),对这些 RFLP 类型内的代表菌株进行序列测定,可获得油菜内生细菌种群多样性更加深入的信息,并且这些 RFLP 型可以用于进一步比较不同环境、不同品种、不同生长季节油菜内生细菌种群动态变化等方面的研究。

由于国内外目前对油菜内生细菌系统鉴定研究很少,本研究室也缺少已知分类地位的标准菌株,所以对 RFLP 分析所归类的 39 个类群代表的归属和分类等级,还不能确定,目前我们正在进行这些细菌的系统鉴定研究。

参 考 文 献

- [1] Denise K Z, Pat L. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *App Environ Microbiol*, 2002, **68**: 2198 - 2208.
- [2] Germida J J, Sciliano S D, Freitas J R. Diversity root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus*) and wheat (*Triticum aestivum*). *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, **26**: 43 - 50.

- [3] Nejad P , Johsson P A . Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. *Biological Control* , 2000 , **18** : 208 – 215 .
- [4] Graner G , Pesson P , Meijer J , et al . A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen , *Verticillium Longisporum* . *FEMS Microbiology Letters* , 2003 , **224** : 269 – 276 .
- [5] Gurrle V . The role of recombination and mutation in 16S-23S rDNA spacer rearrangements. *Gene* , 1999 , **238** : 241 – 252 .
- [6] Alfonso R , Montse P , Albert M , et al . Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 2000 , **50** : 1981 – 1987 .
- [7] Brunel B , Givaudan A , Lanois A , et al . Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR amplified 16S rRNA genes. *App Environ Microbiol* , 1997 , **2** : 574 – 580 .
- [8] Stubbs S , Brazier J , Talbot P , et al . PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of *Bacteroides* spp. and characterization of nitroimidazole resistance genes. *Journal of Clinical Microbiology* , 2000 , **9** : 3209 – 3213 .
- [9] 冯瑞华 . 用 AFLP 和 16S rDNA PCR-RFLP 分析毛茛菪根瘤菌的遗传多样性. *微生物学报* , 2000 , **4** : 339 – 345 .
- [10] 方中达 . 植病研究方法 . 北京 : 中国农业出版社 , 1998 .
- [11] 东秀珠 , 蔡妙英 . 常见细菌系统分类和鉴定方法 . 北京 : 科学出版社 , 2001 .
- [12] 何 红 , 邱思鑫 , 蔡学清 , 等 . 辣椒内生细菌 BS-1 和 BS-2 在植物体内的定殖及鉴定. *微生物学报* , 2004 , **1** : 13 – 18 .
- [13] William G W , Susan M B , Dale A P , et al . 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* , 1991 , **2** : 697 – 703 .

16S rDNA RFLP analysis of endophytic bacteria from *Brassica napus*

YANG Rui-xian SUN Guang-yu* ZHANG Rong CHEN Li-jun

(College of Plant Protection , Northwest A&F University , Yangling 712100 , China)

Abstract : Endophytic bacteria reside in plant hosts without causing disease symptom. In this study ,122 endophytic bacteria strains isolated from healthy oilseed rape plant were categorized preliminarily to 35 groups based on colony morphology ; 16S rDNAs were amplified with universal primers of bacteria , all the strains could produce a single band about 1500bp , the PCR products were digested with restriction endoenzyme *Hae* III and *Msp* I respectively , different patterns were obtained for each enzyme , by combining all the restriction patterns for the two enzymes , the 122 strains could be grouped into 39 16S rDNA genotypes. The results indicated that endophytic bacteria from *Brassica napus* were genetically diversity. By comparing two methods , colony morphology only showed limited and preliminary information , and PCR-RFLP could be as a rapid and accurate tool for the diversity analysis of endophytic bacteria from *Brassica napus* .

Key words : Diversity , 16S rDNA , Restriction fragment length polymorphism

Foundation item : National Natural Science Foundation of China(30170004)

* Corresponding author. Tel 86-29-87092075 ; Fax 86-29-87092402 ; E-mail : sunguang@public.xa.sn.cn

Received date :12-15-2004