



茶树内生草螺菌 ZXN111 生长素合成及其对云抗-10 号植物的促生功能

曾秀丽¹, 王志¹, 罗利², 王旭¹, 陈宣钦³, 周育^{1,2*}

¹安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 安徽 合肥 230036

²上海大学上海市能源作物育种与应用重点实验室, 上海 200444

³昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500

摘要: 【目的】以紫娟茶树分离的内生菌水生草螺菌ZXN111为研究对象, 通过分子遗传学方法证实该菌株植物生长素吲哚3-乙酸(IAA)合成的主要分子途径。【方法】参考草螺菌基因组信息中IAA合成基因簇, 选取与IAA合成密切相关的候选基因, 即芳香族氨基酸转氨酶基因(*tyrb*), 通过基因插入突变与基因互补方法, 结合茶树组培苗体内促生能力分析, 初步验证水生草螺菌生长素合成的主要机制。【结果】植物生长素IAA合成候选基因*tyrb*突变后, 突变株*tyrb::pK19mobΩ2HMB* 48 h的IAA合成量显著低于野生型菌株ZXN111, 且*tyrb*基因互补后, 互补株*tyrb::pK19mobΩ2HMB(+)*的IAA合成能力得到了显著恢复。茶树促生实验发现, 突变株*tyrb::pK19mobΩ2HMB*接种组的茶树组培苗根长、根重及植株鲜重指标上均显著低于野生菌处理组。【结论】水生草螺菌ZXN111有多条IAA合成途径, 其中的吲哚-3-丙酮酸(IPA)是最主要途径, 其生长素合成对寄主茶树具有显著的促生功能。

关键词: 茶树内生菌, 水生草螺菌, 生长素合成, *tyrb* 基因

植物内生菌是生活于健康植物生活史一定阶段、分布于植物各种器官内部(如根、茎、叶、花、果实等)且多数对宿主植物没有危害的微生物群落^[1-2]。研究表明, 植物内生菌几乎存在于所有植物中, 其中内生草螺菌多分布于根茎部, 且多具

有合成植物生长素、联合固氮等植物促生功能, 从而对植物生长起调节作用^[3-4]。大部分植物与内生菌之间为互作关系, 植物信号可以调节细菌体内黏附素、鞭毛和脂多糖合成酶基因表达, 激发细菌附着于根表面; 内生菌定殖又有利于内生菌

基金项目: 安徽省自然科学基金(1608085QC57); 上海市能源作物育种与应用重点实验室开放基金; 茶树生物学与资源利用国家重点实验室开放基金(SKLT0F20190110)

*通信作者。Tel: +86-551-65786701; E-mail: microbes@ahau.edu.cn

收稿日期: 2019-11-10; 修回日期: 2020-01-07; 网络出版日期: 2020-01-21

向寄主植物中释放蛋白质和植物激素, 刺激植物生长、调控植物防御反应^[5]。植物生长素为植物生长发育重要信号分子, 由吲哚-3-乙酸(IAA)和相关的内源性物质组成^[6]。研究表明, IAA 合成不局限于高等植物, 亦存在于细菌、真菌、酵母菌中, 在内生细菌中合成 IAA 最重要的作用是促进植物生长, 同时 IAA 的合成也有助于细菌在宿主植物上定殖及适应^[7-10]。

植物本身可通过吲哚-3-乙酰胺(IAM)、吲哚-3-丙酮酸(IPA)、色胺、吲哚-3-乙醛肟(IAOx)等不同分子途径合成生长素 IAA^[11-12]。近年研究显示, 很多细菌(尤其是 G⁻细菌)合成 IAA 的途径也多种多样, 主要包括吲哚乙酰胺(IAM)、吲哚丙酮酸(IPA)、色胺(Tryptamine)、吲哚乙醛肟(IAOx)和衍生自色氨酸的吲哚-3-乙醛(Indole-3-acetaldehyde)等五种不同生物合成途径^[7,13-15]。在 Pedrosa 等公布的植物内生菌——织片草螺菌(*Herbaspirillum seropedicae*)基因组信息中, 菌株 SmR1 可能含有 IPA、IAM、色胺和吲哚乙醛肟 4 条不同途径, 并预测 IPA 途径可能为最主要途径, 但未作进一步的生物学验证^[5]。本研究以实验室前期从紫娟茶树中分离获得的具有生长素合成、ACC 脱氨酶、联合固氮等多种植物促生活性的水生草螺菌 ZXN111 为研究对象^[16], 依据已公布的草螺菌基因组信息为参考^[5], 选取 IPA 合成途径中关键酶(芳香族氨基酸转氨酶)基因 *tyrb* 为候选基因, 对草螺菌属细菌生长素合成的分子机制作进一步的验证。在此基础上, 应用组培苗侵染方法, 对野生菌株及生长素突变株的茶树促生功能进行体内验证, 明确生长素合成在菌株 ZXN111 植物促生功能中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

实验所用菌株为水生草螺菌(*Herbaspirillum aquaticum*) ZXN111, 该菌株从紫娟茶树叶片中分离获得, 为茶树内生菌, 菌株具有显著的植物生长素 IAA 合成能力^[16]。本实验所用其他菌株、质粒与引物等相关材料如表 1 所示, 所有引物均由本实验室设计, 并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

用于抗性筛选的卡那霉素(Km)、硫酸庆大霉素(Gm)等抗生素为分析纯, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。用于细菌培养基配制的酵母粉、蛋白胨均为 Oxoid 公司产品, 色氨酸、吲哚乙酸、吲哚丁酸标准品购自于北京索莱宝科技有限公司。用于液相色谱分析用的色谱纯的乙腈和乙酸为美国天地公司(TEDIA)产品。质粒小提试剂盒及 DNA 回收试剂盒购于天根公司(TIANGEN); *Bsp*1407 I、*Hind* III 限制性内切酶、Easytaq 酶、*T*₄ DNA Ligase 购于 TaKaRa 公司; 用于茶树组织培养用的 MS 培养基为青岛海博生物技术有限公司产品。其他试剂与培养基均为国产分析纯。IAA 合成所用的有氮培养基配方为: 葡萄糖 10.0 g、硫酸铵 1.0 g、磷酸氢二钾 2.0 g、七水合硫酸镁 0.5 g、氯化钠 0.1 g、酵母粉 0.5 g、水 1000 mL, pH 7.2, 115 °C 灭菌 30 min。LB 培养基配方为: 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母粉 5.0 g, 氯化钠 10.0 g, 去离子水 1000 mL, pH 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。茶苗组织培养所用培养基配方为: 在 MS 培养基(4.43 g/L)中加入 30 g/L 的蔗糖以及 8 g/L 的琼脂, 加水定容, 用 NaOH 调节 pH 至 5.8, 然后分装到组培瓶中, 121 °C 灭菌 20 min, 冷却备用。

表 1. 本实验中所用到的菌株、质粒和引物
Table 1. Strains, plasmids, and primers used in this study

Strains/plasmids/primers	Description	References
Strains		
ZXN111	Isolated from Zijuan tea	[16]
<i>tyrb::pK19mobΩ2HMB</i>	The partial <i>tyrb</i> insertion mutant strain of ZXN111, Km ^r	This study
<i>tyrb::pK19mobΩ2HMB(+)</i>	<i>tyrb::pK19mobΩ2HMB</i> carrying the expression plasmid pSRK-Gm- <i>tyrb</i> , Gm ^r	This study
<i>E. coli</i> DH5α	Cloning strain	TransGenBiotech, Beijing, China
Plasmids		
<i>pK19mobΩ2HMB</i>	Suicide plasmid, Km ^r	[17]
pSRK-Gm	Expression vector, Gm ^r	[18]
Primers		
	Sequence	Restriction sites
<i>tyrb</i> -F	ATGAACGCACCTGTCTCCG	No restriction sites
<i>tyrb</i> -R	TTACAGCACCTTGGCGATG	No restriction sites
ins-F	GGG <u>TGTAC</u> AGCCATACAGCGAGAACGA	<i>Bsp</i> 1407 I (underlined)
ins-R	CCC <u>AAGCT</u> TGGTCAACGCCTATCCCTAC	<i>Hind</i> III (underlined)
ver1-F	GCGCTTCAGTTGCGACAGC	No restriction sites
ver1-R	GACAACGGCAAGGTCCCCC	No restriction sites
comp-F	GGAATCC <u>ATATG</u> ATGAACGCACCTGTCTCCG	<i>Nde</i> I (underlined)
comp-R	CCG <u>CTCGAG</u> TTACAGCACCTTGGCGATG	<i>Xho</i> I (underlined)

1.2 菌株 ZXN111 基因组中 *tyrb* 基因验证

参照 Pedrosa 等公布的草螺菌基因组^[5], 选取 IPA 途径中的关键酶 *tyrb* 基因序列两端设计引物 *tyrb*-F 及 *tyrb*-R (表 1), 以水生草螺菌 ZXN111 为出发菌株(野生菌), 提取 ZXN111 的 DNA 为模板, 扩增完整的 *tyrb* 基因。PCR 反应体系为: 10×Buffer 2 μL, dNTPs 2 μL, *tyrb*-F 0.5 μL, *tyrb*-R 0.5 μL, DNA 模板 2 μL, Easytaq 酶 0.2 μL, 加入去离子水至 20 μL。PCR 反应程序: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 30 s, 32 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增结果采用琼脂糖凝胶电泳和测序验证。

1.3 菌株 ZXN111 基因组中 *tyrb* 基因突变

图 1 为重组质粒 *pK19mobΩ2HMB*- P-*tyrb* 构建及插入突变遗传操作原理。以上一步扩增获得的 *tyrb* 基因序列为依据, 在 *tyrb* 基因序列近中间位置, 设计插入突变片段(P-*tyrb*)的上游引物 ins-F

和下游引物 ins-R, 引物上下游分别加酶切位点 *Bsp*1407 I 和 *Hind* III^[17](表 1)。PCR 反应体系为: 10×Buffer 2 μL, dNTPs 2 μL, ins-F 0.5 μL, ins-R 0.5 μL, 基因组 DNA 模板 2 μL, Easytaq 酶 0.2 μL, 加入去离子水至 20 μL。PCR 反应程序为: 94 °C 4 min; 然后 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 30 s, 反应 32 循环; 72 °C 10 min。用 1.5% 的琼脂糖凝胶在 80 V 电压下进行电泳检测, 将目的条带依照 DNA 胶回收试剂盒说明书操作步骤进行胶回收纯化。

将纯化目的基因及质粒 *pK19mobΩ2HMB* 分别在 37 °C 条件下孵育 1 h 进行酶切反应, 再将酶切体系置于 65 °C 水浴 20 min 终止反应(酶切体系: *Bsp*1407 I 0.5 μL, *Hind* III 0.5 μL, DNA/质粒 17.0 μL, 10×Buffer 2 μL)。酶切产物用琼脂糖凝胶电泳检测, 并对酶切产物进行胶回收。将回收后的目的片段及 *pK19mobΩ2HMB* 质粒片段, 用 T₄ DNA 连接酶完成目的片段和质粒的连接。质粒与

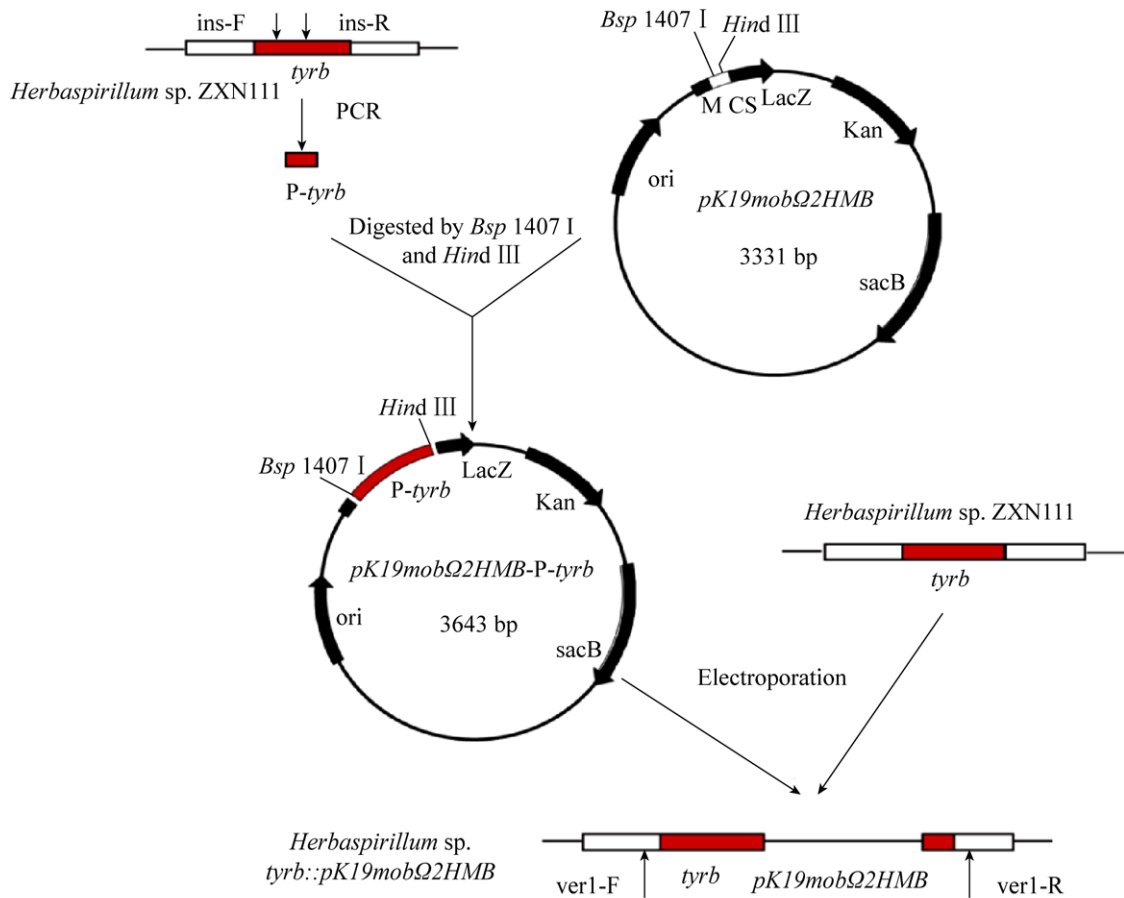


图 1. *pK19mobΩ2HMB-P-tyrb* 插入突变重组质粒遗传操作示意图
Figure 1. Schematic description on *pK19mobΩ2HMB-P-tyrb* construction.

目的片段连接体系为: T₄ DNA 连接酶 1.0 μL, DNA 酶切产物 13.0 μL, *pK19mobΩ2HMB* 酶切产物 4.0 μL, 10×Buffer 2.0 μL; 于 16 °C 温度下连接 4 h 以上, 构建重组质粒 *pK19mobΩ2HMB-P-tyrb*。将构建好插入突变质粒 *pK19mobΩ2HMB-P-tyrb* 转化至 *E. coli* DH5α 中, 37 °C 过夜培养后, 以 ins-F 和 ins-R 为引物进行菌落 PCR 验证插入突变质粒是否成功。采用质粒小提试剂盒, 依据产品说明书提取插入突变重组质粒, 双酶切验证、保存备用。

经 LB 平板活化后的野生菌株 ZNX111, 转接至 100 mL 的 LB 液体培养基于 28 °C、160 r/min

振荡培养至 OD 值约为 0.8, 取 10 mL 新鲜菌液, 在 7000 r/min 条件下冷冻离心 10 min 获得菌体, 用 10% 的甘油 10 mL 清洗菌体 4 次, 最后加 600 μL 10% 甘油重悬菌体, 分装于 3 支干净的离心管, 向每个重悬液中加入 5 μL 插入突变重组质粒(对照组不加质粒)混匀。取 200 μL 重悬液, 加入到已用 75% 乙醇和去离子水处理过的电击杯中, 将电击杯放置于电击槽中在 2.5 kV 条件下电击 5 ms (电转仪: BTX ECM 399)。电击转化后, 立即向转化液加入 1.0 mL 无抗 LB 液体培养基, 于 28 °C、160 r/min 条件下振荡培养 3 h, 然后 7000 r/min 离心 3 min, 将收集的菌体涂布于卡那霉素抗性的

LB 平板上。挑取候选阳性克隆，以上下游引物 *ver1-F* 和 *ver1-R* (表 1)，进行 PCR 验证，筛选阳性突变株 *tyrb::pK19mobΩ2HMB*。PCR 反应程序为：94 °C 4 min；94 °C 30 s，65 °C 30 s，72 °C 3 min，32 个循环；72 °C 10 min。

1.4 基因互补株构建

图 2 为互补重组质粒 *pSRK-Gm-tyrb* 构建原理及遗传操作示意图。

依据 *tyrb* 基因全长序列，重新设计基因互补上游引物 *comp-F* 和下游引物 *comp-R*，引物上下游分别引入酶切位点 *Nde I* 和 *Xho I* (表 1)，以基因互补引物，扩增完整目的基因。PCR 反应体系为：10×Buffer 2 μL，dNTPs 2 μL，*comp-F* 0.5 μL，

comp-R 0.5 μL，模板 DNA 2 μL，Easytaq 酶 0.2 μL，加入去离子水至 20 μL。PCR 反应程序为：94 °C 4 min；94 °C 30 s，53 °C 30 s，72 °C 30 s，32 个循环；72 °C 10 min。参照上述同样方法，进行 PCR 产物及互补质粒 *pSRK-Gm* 双酶切、产物回收与连接转化，构建 *tyrb* 基因互补的重组质粒 *pSRK-Gm-tyrb*。质粒构建完成后，以 *comp-F* 和 *comp-R* 为验证引物完成 PCR 验证，并以上述同样方法完成 *Nde I* 和 *Xho I* 双酶切验证。以 1.3 中的方法步骤，将互补质粒 *pSRK-Gm-tyrb* 电击转化至突变株 *tyrb::pK19mobΩ2HMB*，构建功能互补株，将电击转化菌液涂布于含庆大霉素抗性 (*Gm^r*) 的 LB 平板，挑选候选阳性克隆，以验证

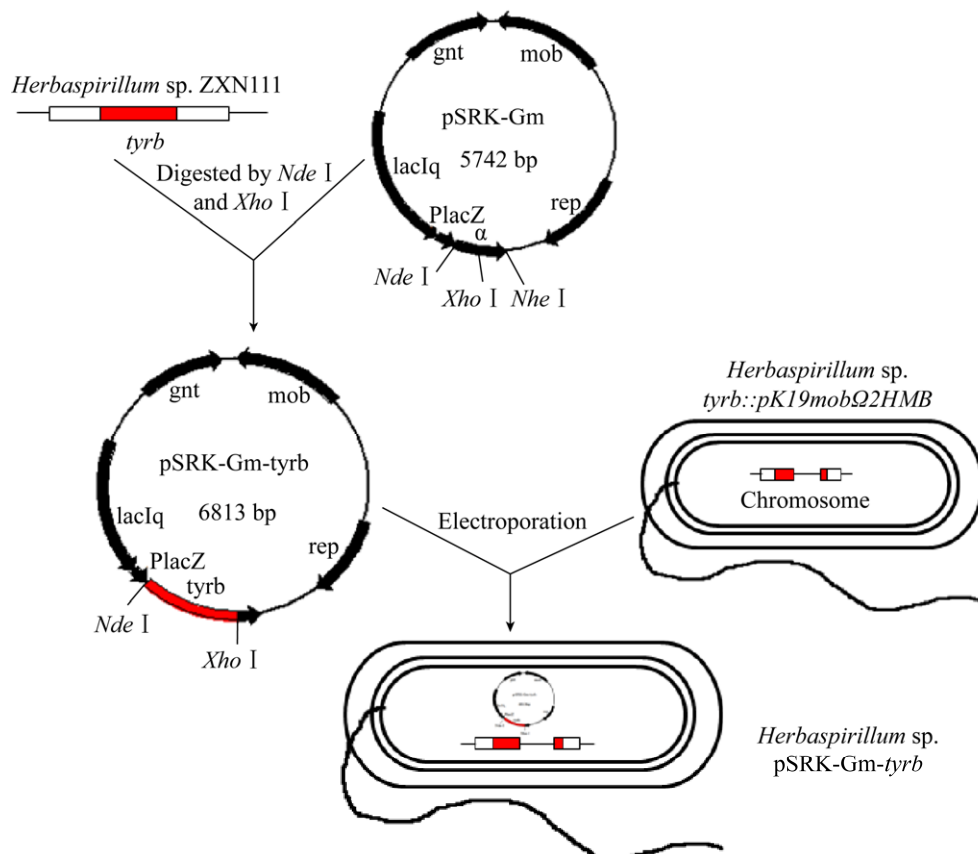


图 2. *pSRK-Gm-tyrb* 基因互补重组质粒遗传操作示意图

Figure 2. Schematic description on *pSRK-Gm-tyrb* construction.

引物对 comp-F 和 comp-R, 按照前述 PCR 条件, 进行菌落 PCR 验证和测序, 筛选出阳性互补菌株 *tyrb::pK19mobΩ2HMB(+)*。

1.5 菌株培养、生长素提取与检测

参照已报道的植物生长素 IAA 检测方法, 进行菌株培养和生长素提取净化, 采用超高效液相色谱(UPLC)检测含量。将营养琼脂上活化后待测菌株, 接种于营养肉汤, 于 28 °C、160 r/min 条件下, 培养菌液至 OD_{600} 为 0.6, 然后取 250 μ L 菌液加入到含有 5.0 mL 色氨酸(终浓度为 0.5 mg/mL)的 25 mL 有氮培养基中, 28 °C、160 r/min 条件下避光培养 1–2 d, 以 12000 r/min 离心 10 min, 取上层清液, 用 HCl/H₃PO₄ 溶液调节 pH 至 2.5。以体积比 1:1 比例加入的乙酸乙酯萃取, 反复萃取 3 次, 最后将萃取液混匀, 取 3.0 mL 萃取液氮气吹干, 再加入 1.0 mL 流动相复溶, 参照已发表的文献条件, 用 UPLC 检测含量^[16]。

1.6 内生菌侵染与促生功能检测

1.6.1 云抗-10 组培苗的制备: 以“茶树生物学与资源利用国家重点实验室”组培平台, 已成功培养和保存的紫娟的近缘种云抗-10 号为茶树材料, 挑选长势较好的无菌组培苗, 在超净工作台中用无菌剪刀剪下上部约 3 cm 的粗壮枝条, 基部浸泡于无菌的 0.5 mg/mL 吲哚丁酸(IBA)溶液约 5 min, 无菌滤纸吸干茶苗表面水分后, 插入未加任何生长激素的培养基中, 于温度 25±2 °C、光照黑暗交替 12 h、光强 1500–2000 lx 的组培室中培养, 直至组培苗生根。

1.6.2 菌株接种: 本实验的突变株为植物生长素合成基因突变株, 与植物侵染定殖相关的三型分泌系统基因簇未做任何遗传改变, 突变株与野生菌对茶树的定殖特性不变, 实验以野生菌作为侵

染定殖研究材料^[5]。将待测菌株接种于 50 mL 无抗液体 LB 中 28 °C 振荡培养至 OD 值为 0.6–0.9, 取 1 mL 菌液 9000 r/min 离心 10 min, 倒掉上清, 用无菌水洗菌体 3 次, 然后用 1 mL 无菌水悬浮菌体, 轻轻接种于组培苗根部(以 1 mL 无菌水为空白对照), 放置于组培室中继续培养 30 d。培养结束后, 将各组茶树组培苗取出, 测量根长、根数以及称量根重、植株鲜重。

1.6.3 茶苗内生菌定殖数量测定: 将培养结束后的组培苗取出, 于超净工作台中进行消毒。以 75% 乙醇浸泡 1 min, 3.25% NaClO 浸泡 6 min, 75% 乙醇浸泡 1 min, 无菌水清洗 5–6 次, 取 200 μ L 最后一次无菌水清洗液涂布于无抗营养琼脂(NA), 检查是否消毒完全。取 1 g 消毒后植物组织(根、茎、叶)于无菌研钵中, 分别加 10 mL 生理盐水, 进行无菌研磨, 制备 10⁻¹ 稀释液; 对稀释液进行梯度稀释, 获得 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ 梯度稀释, 取 200 μ L 10⁻³, 10⁻⁴ 和 10⁻⁵ 稀释液, 分别均匀涂布于无抗 NA 上。将涂布后平板放置于 30 °C 培养箱中, 倒置培养 3 d 后, 进行菌落计数, 并随机挑选菌落进行 16S rRNA 基因测序验证。

1.7 数据分析

本实验检测数据均在 3 次生物学重复下, 使用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 *T*-test 检验(* $P < 0.05$)对数据进行统计分析。所有统计分析都是在 Graphpad prism (5.0)软件下进行。

2 结果和分析

2.1 基因突变与功能验证

2.1.1 ZXN111 中 *tyrb* 基因克隆与突变株构建: 以 *tyrb*-F 和 *tyrb*-R 为引物, 野生菌株 ZXN111 基

基因组 DNA 为模板, PCR 克隆获得一条约 1.2 kb 的单一一条带(图 3), 将阳性条带进行 T-A 克隆测序后, 获得一条 1218 个碱基对的基因序列(GenBank accession: MN603494), 经 NCBI 网站比对, 确认为 *tyrb* 基因。

以 *ins-F* 及 *ins-R* 为扩增引物对, PCR 扩增获得 250–500 bp 的 *tyrb* 基因, 且为单一一条带(图 4-A), 扩增产物经克隆测序后, 确认与预期序列匹配率为 100%, 表明该部分基因克隆成功。通过 PCR 产物及 *pK19mobΩ2HMB* 质粒双酶切, 产物回收及酶连反应, 构建 *pK19mobΩ2HMB-P-tyrb* 插入突变重组载体。所构建的 *pK19mobΩ2HMB-P-tyrb* 重组质粒, 用 *Bsp1407 I* 和 *Hind III* 双酶切后, 经琼脂糖凝胶电泳验证, 发现两条线性条带, 并且分别与质粒(3.3 kb)和目的基因条带(346 bp)大小相对应, 表明重组载体构建成功(图 4-B)。

重组质粒 *pK19mobΩ2HMB-P-tyrb* 经电击转化后, 随机挑取在含卡那霉素 NA 平板上长出的阳性候选菌株, 以 *ver1-F* 和 *ver1-R* 为引物对, 进

行菌落 PCR 验证。结果显示, 重组质粒已正确插入预期位置(条带大小为 4035 bp), 初步判断成功获得插入突变子(图 4-C)。同时, 在约 750 bp 的位置出现非特异性扩增条带, 通过多次重新设计引物仍然无法避免, 猜测突变株基因组上还存在与这个 4035 bp 片段有一定相似性的小片段, 但这

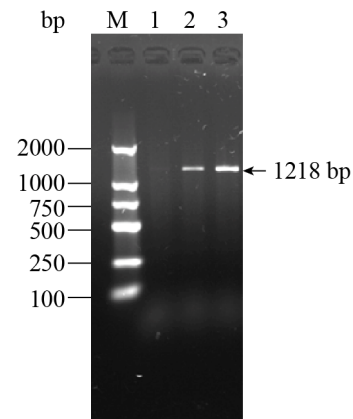


图 3. 菌株 ZNX111 的 *tyrb* 基因扩增结果

Figure 3. The PCR products of gene *tyrb* from strain ZNX111. Lane 1: negative control; lanes 2–3: positive results.

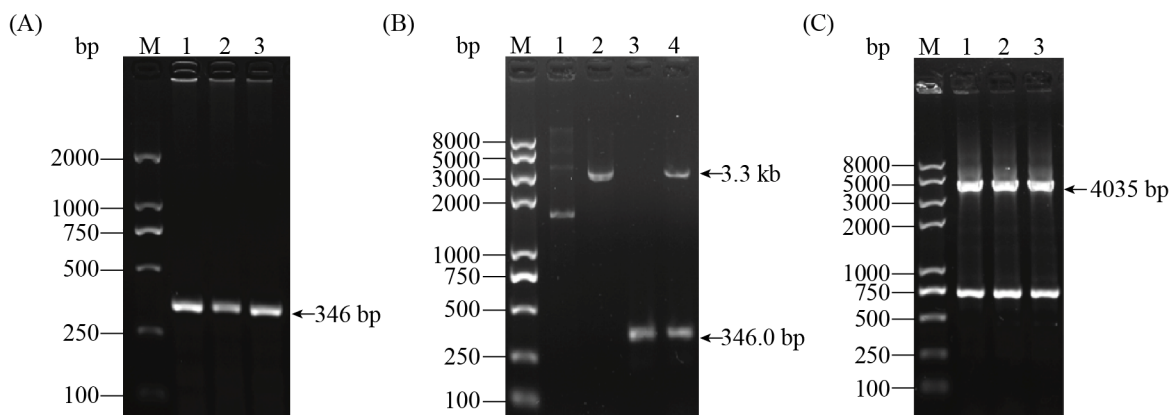


图 4. 菌株 ZNX111 的 *tyrb* 基因突变体构建

Figure 4. The *tyrb* mutant construction from strain ZNX111. A: The PCR product of partial *tyrb* gene. M: DNA marker; lanes 1–3: partial *tyrb* gene. B: Double enzymes digestion of *pK19mobΩ2HMB-P-tyrb*. M: DNA marker; lane 1: *pK19mobΩ2HMB*; lane 2: double enzymes digestion of *pK19mobΩ2HMB*; lane 3: double enzymes digestion of partial *tyrb* gene; lane 4: double enzymes digestion of *pK19mobΩ2HMB-P-tyrb*. C: Verification of *tyrb* gene mutant. M: DNA marker; lanes 1–3: PCR products.

两个片段大小差异明显, 不干扰鉴定结果。在此基础上将 PCR 产物目的片段胶回收纯化测序, 结果比对正确, 表明突变成功。

2.1.2 突变菌株 *tyrb::pK19mobΩ2HMB* 生物活性验证:

在有氮培养基培养 24 h 时, 野生株 ZXN111 和突变株 *tyrb::pK19mobΩ2HMB* 生长素 IAA 合成量并无显著性差别(图 5), 此时培养液还较为澄清, 菌体仍处于延滞期末期或对数期的初期。随着培养时间延长, 野生菌 ZXN111 培养液中 IAA 含量将会逐步增多。经过 48 h 培养, 突变株 *tyrb::pK19mobΩ2HMB* 的 IAA 合成量有所增加, 但是整体增幅有限, 野生型菌株却比 24 h 生长素 IAA 合成量增加了近 10 倍(图 5)。野生型菌株 48 h 的 IAA 合成量为 40.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 突变型 IAA 合成量为 10.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。水生草螺菌 ZXN111 在 *tyrb* 基因突变后, 生长素 IAA 合成能力显著降低, 说明芳香族氨基酸氨基转移酶基因 *tyrb* 是该菌株生长素 IAA 合成的关键性基因, IPA 途径为水生草螺菌合成植物生长素 IAA 的最主要途径。但是, 该合成途径阻断后, 突变株 *tyrb::pK19mobΩ2HMB* 的 IAA 合成能力未完全丧失, 表明菌株 ZXN111 仍存在 IAA 合成补救途径。

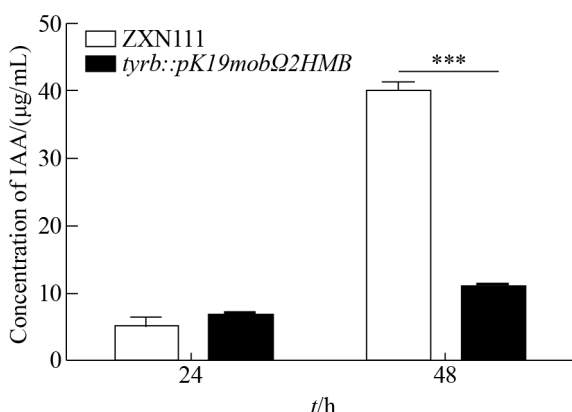


图 5. 植物生长素突变菌株的表型验证

Figure 5. Auxin IAA synthetic activities of mutant *tyrb::pK19mobΩ2HMB*. T test was used ($P < 0.001$), $n = 3$.

2.2 基因互补与功能验证

2.2.1 *tyrb* 基因功能互补菌株构建:

以野生型菌株 DNA 为模板, comp-F 为 comp-R 引物对(表 1), 扩增获得 *tyrb* 完整基因, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 在 1.2 kb 位置有单一条带(图 6-A), 经测序验证, 与预期序列匹配率为 100%, 表明互补基因克隆成功。

经胶回收纯化后的目的片段与互补载体 pSRK-Gm 分别进行 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 酶切产物纯化后, 用 T_4 连接酶进行酶连, 构建互补表达载体 pSRK-Gm-*tyrb*, 并转入 *E. coli* DH5 α 。然后以 comp-F 及 comp-R 引物对, 进行菌落 PCR 验证, 在约 1.2 kb 位置有单一条带(图 6-B), 初步证明互补质粒构建成功。在此基础上, 提取互补重组质粒, 经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后, 获得两个预期条带, 分别为约 5.5 kb 的 pSRK-Gm 互补载体和约 1.2 kb 的 *tyrb* 基因(图 6-C), 表明载体构建成功。经电击转化后, 转化子候选菌落经 PCR 验证, 随机挑取的克隆在 1.2 kb 位置有单一条带(图 6-D), 经测序确认互补菌株 *tyrb::pK19mobΩ2HMB(+)* 构建成功。

2.2.2 功能互补菌株表型验证:

将野生型 ZXN111、突变株 *tyrb::pK19mobΩ2HMB* 和互补株 *tyrb::pK19mobΩ2HMB(+)*, 同步培养 36 h 后(此时 3 个菌株菌液 OD_{600} 均为 0.6 左右), 其中互补株培养基加入了终浓度为 0.2 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG), 检测各菌株 IAA 合成量。结果显示, ZXN111、*tyrb::pK19mobΩ2HMB* 和 *tyrb::pK19mobΩ2HMB(+)* 的 IAA 合成能力, 分别为野生菌 > 互补株 > 突变株(图 7)。野生型菌株 ZXN111 的 36 h 生长素 IAA 合成量高达 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而突变株 *tyrb::pK19mobΩ2HMB* 的 IAA 合成量仅为 0.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 互补菌株 *tyrb::pK19mobΩ2HMB(+)*

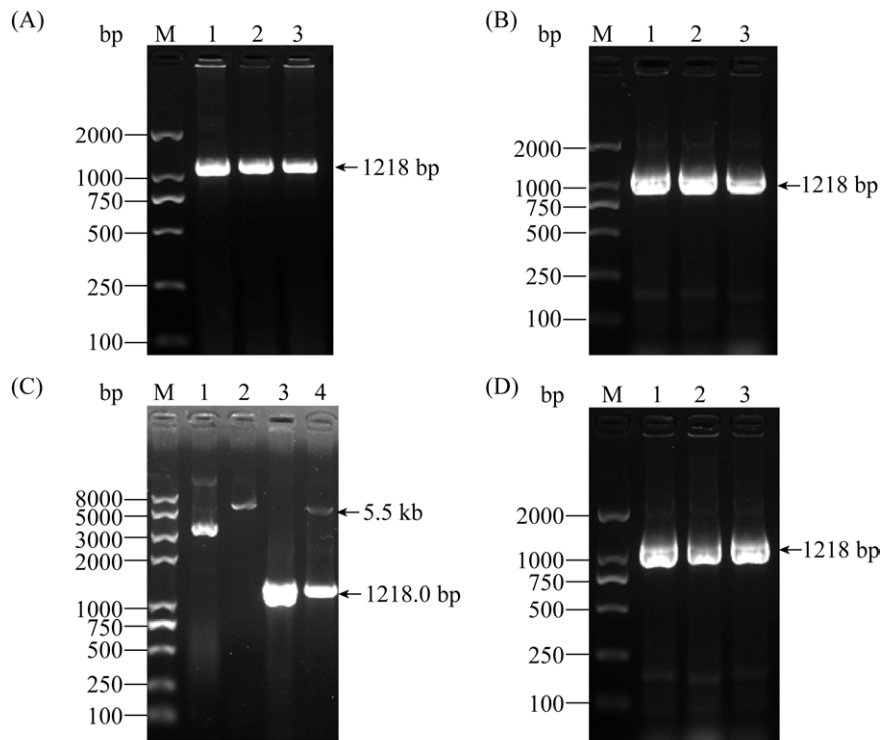


图 6. 基因 *tyrb* 功能互补表达载体及互补株的构建

Figure 6. Construction of *tyrb* complementary strain. A: The PCR product of *tyrb*. M: DNA marker; lanes 1–3: PCR products. B: The *tyrb* PCR product from constructed pSRK-Gm-*tyrb*. M: DNA marker; lanes 1–3: PCR products. C: Verification of double enzymes digestion. M: DNA marker; lane 1: pSRK-Gm; lane 2: double enzymes digestion of pSRK-Gm; lane 3: double enzymes digestion of *tyrb*; lane 4: double enzymes digestion of pSRK-Gm-*tyrb*. D: Verification of complementary strain containing pSRK-Gm-*tyrb*. M: DNA marker; lanes 1–3: PCR product of gene *tyrb*.

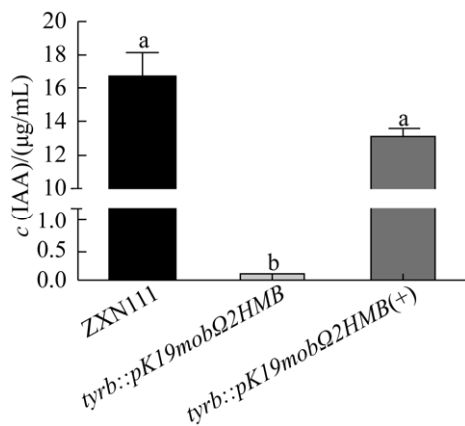


图 7. 基因 *tyrb* 互补菌株的表型验证

Figure 7. Auxin IAA synthetic activities of complementary strain *tyrb::pK19mobQ2HMB(+)*. One-way ANOVA was used, $n=3$. Different letters indicated statistical differences between treatments.

的 IAA 合成能力, 在突变株的基础上得到了显著恢复, 但与野生型菌株 IAA 合成量仍有一定差距, 达到 13.1 μg/mL (恢复了 87.3%)。互补实验再次证明了 *tyrb* 基因是草螺菌 ZNX111 合成生长素途径中的关键性基因, IPA 是水生草螺菌 IAA 合成的重要途径。

2.3 菌株促生功能与定殖情况

茶苗促生功能结果显示, 与空白对照组(无菌水)相比, 野生型菌株 ZNX111 处理组茶苗的根长、根数、根重和植株鲜重均显著高于对照组, 说明菌株 ZNX111 能显著地促进无菌组培茶苗的生长。与接种野生型菌株处理组相比, 突变型菌株

tyrb::pK19mobQ2HMB 处理组在根长、根重及植株鲜重几个生物学性状, 显著低于野生菌处理组, 说明生长素 IAA 突变株对无菌茶苗的植物促生功能显著减弱(图 8)。生物学性状的统计结果, 与图中

茶苗在组织培养瓶中的生长情况基本吻合, 菌株 ZXN111 的植物生长素合成功能的丢失, 会显著影响该菌株对茶树生长的调节能力。

内生菌定殖分离结果显示(图 9), 水生草螺菌

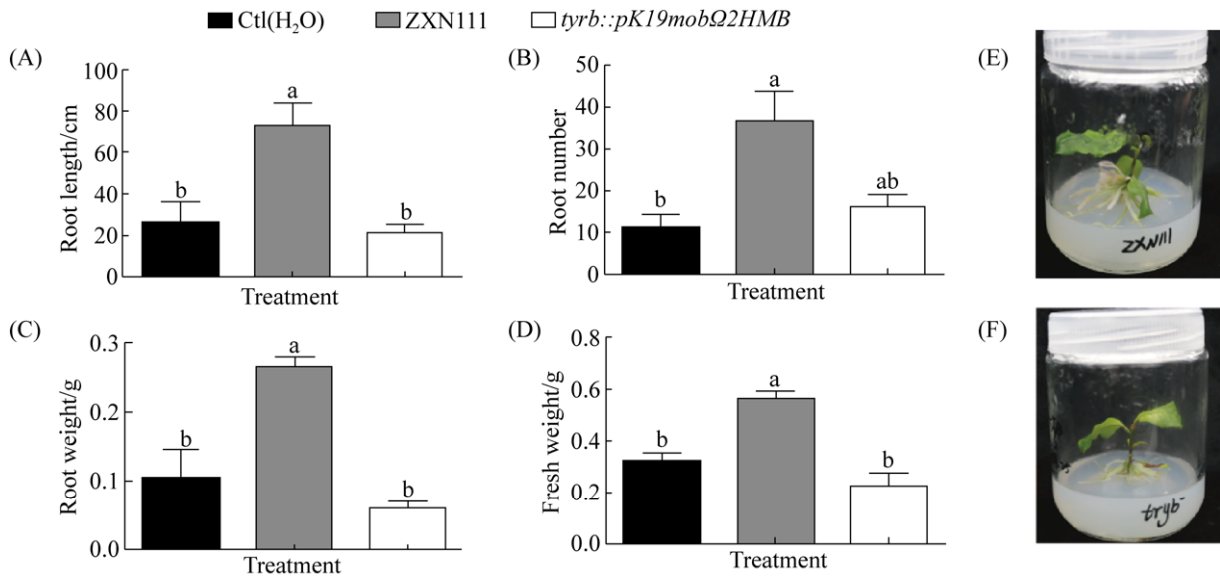


图 8. 不同菌株侵染处理对云抗-10 号组培苗生长的影响

Figure 8. The effect of different inoculants on the growth of Yunkang-10 cultivar. A: root length; B: root numbers; C: root weight; D: fresh weight; E-F: the effect of ZXN111 and *tyrb::pK19mobQ2HMB* on the growth of Yunkang-10 cultivar. One-way ANOVA was used, $n=3$. Different letters indicated statistical differences between treatments.

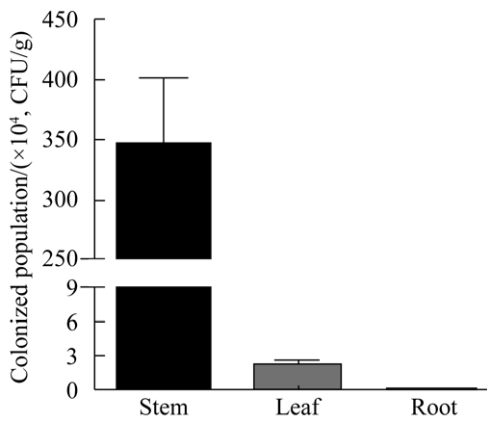


图 9. 草螺菌 ZXN111 在云抗-10 号组培苗不同部位定殖数量

Figure 9. The colonized population in different tissues of Yunkang-10 culture seeding. Values are mean of three replicates \pm standard deviation.

ZXN111 在云抗-10 号中主要定殖于茎部和叶部, 定殖于茎部的草螺菌数量达到 3.65×10^6 CFU/g 鲜茎, 定殖于叶部的数量达到 2.2×10^4 CFU/g 鲜叶, 因此水生草螺菌定殖于茎部的数量居多。在本次试验中植物内生菌研磨材料涂布的稀释度统一为 10^{-3} – 10^{-5} , 可能由于稀释度过大, 在根中未检测出有效定殖的内生菌, 由此也说明定殖于茶树根中的草螺菌是比较少的。内生草螺菌是在紫娟茶树叶片中分离得到, 茶树侵染实验也证明, 该菌株主要定殖于茎叶中, 可能该菌株对茶树茎叶中物质有趋化性相关, 其明确的因素仍有待进一步探索。

3 讨论

国内外对于茶树内生菌,尤其是内生细菌-茶树互作调节茶树生长的研究尚不多见,这项研究对茶树种植过程中化学肥料减施、茶叶品质提升及生态农业具有重要意义。研究证明,植物内生草螺菌可以通过联合固氮、表达 ACC 脱氨酶和合成植物生长素等多种方式,调节寄主植物生长,协助植株适应不良环境^[2-5,16]。王婷等在武汉东湖磨山公园栽培的茶树叶片分离出两株茶树内生草螺菌 WT00C 和 WT00F^[4],其亲源关系与本研究菌株 ZNX111 一致,16S rRNA 基因相似性与水生草螺菌 (*Herbaspirillum aquaticum*) 达到 99% 以上。草螺菌 WT00C 和 WT00F 能够产生 IAA、NH₄⁺ 和嗜铁载体,但无固氮酶活性。结合本研究结果,认为内生草螺菌可能较广泛存在于茶树植物中^[4,16],研究内生草螺菌对寄主茶树促生长机制,尤其是内生草螺菌 IAA 合成机制,对茶树栽培过程中产量和品质提升有重要意义。

Pedrosa 等对织片草螺菌 (*H. seropedicae*) SmR1 及其链霉素抗性突变株 Z78 进行了完整的基因组测序和注释,发现菌株 SmR1 含有包括 IPA 在内 4 条不同的 IAA 生物合成途径,并预测,以 *tyrb* 为关键基因的 IPA 途径可能为最主要途径,但未作进一步的生物学验证^[5]。本研究以织片草螺菌 SmR1 基因组预测信息为基础,选取草螺菌 IAA 合成的 IPA 途径中关键酶基因 *tyrb* 为研究对象,对 *tyrb* 基因进行插入突变和功能互补。结果发现 *tyrb* 基因插入后的突变菌株 *tyrb::pK19mobQ2HMB*,其生长素 IAA 合成能力显著低于野生型菌株 (降低了 90%); 而基因互补后的互补株 *tyrb::pK19mobQ2HMB(+)*,其生长素 IAA 的合成

能力显著提升(恢复至野生菌的 87.3%)。因此,验证了 *tyrb* 基因是草螺菌 ZNX111 合成 IAA 的关键酶基因。在已报道的 G⁻细菌合成 IAA 的 5 条不同途径中,*tyrb* 基因为吡啶-3-丙酮酸(IPA)途径中的关键酶基因,该结果证实了水生草螺菌 ZNX111 合成 IAA 的主要途径为 IPA,这与 Pedrosa 等对织片草螺菌 (*H. seropedicae*) SmR1 的功能基因预测结果相一致。然而 IPA 合成途径阻断后,突变株 *tyrb::pK19mobQ2HMB* 的 IAA 合成能力未完全丧失,说明水生草螺菌 ZNX111 基因组中仍存在其他 IAA 合成的补救路径,尽管这些路径的 IAA 合成能力显著低于 IPA 途径。

此外,通过茶树无菌组培苗侵染实验发现,水生草螺菌 ZNX111 能够有效定殖于云抗-10 茶树茎部和叶部(主要定殖于茎部),在本次试验中,茶苗根部可能因为定殖数量较少未能检测到有效定殖菌株。定殖的野生菌株 ZNX111 对云抗-10 号茶树无菌组培苗具有显著的正向生长调节作用(促生长作用);然而,与野生菌株 ZNX111 相比,其生长素 IAA 突变株 *tyrb::pK19mobQ2HMB* 对云抗-10 号无菌组培苗的促生效果显著减弱,由此说明水生草螺菌植物生长素 IAA 的合成能对茶树的生长调节具有重要意义。

参考文献

- [1] Chen LY, Zhang YM, Chen XY, Fang RX, Zhang LL. Identification of endophytic bacteria selectively enriched in *Camellia sinensis* leaf. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(10): 1776–1785. (in Chinese)
陈丽莹, 张玉满, 陈晓英, 方荣祥, 张莉莉. 茶树叶际选择性富集的内生细菌的鉴定. *微生物学报*, 2018, 58(10): 1776–1785.
- [2] Liu WL, Zhan GT, Wang T, Cheng W, You H, Li K, Xu X, Ding KM, Rao HF, Zhang JD, Cheng CS, Li YD, Li Y, Wu WH, Wang XG. Physicochemical properties and

- growth-promoting effects of *Herbaspirillum* sp. WT00F. *Journal of Hubei University (Natural Science)*, 2017, 39(3): 291–298, 304. (in Chinese)
- 刘伟林, 占桂婷, 王婷, 程伟, 尤恒, 李珂, 徐萧, 丁坤明, 饶辉福, 张君岱, 程长松, 李亚东, 李洋, 吴文华, 王行国. 草螺菌 *Herbaspirillum* sp. WT00F 的生理生化性质和促生作用研究. 湖北大学学报(自然科学版), 2017, 39(3): 291–298, 304.
- [3] 程伟. 茶树内生草螺菌 WT00C 的基因组学研究. 湖北大学硕士学位论文, 2017.
- [4] Wang T, Yang S, Chen YX, Hu LL, Tu Q, Zhang L, Liu XQ, Wang XG. Microbiological properties of two endophytic bacteria isolated from tea (*Camellia sinensis* L.). *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(4): 424–432. (in Chinese)
- 王婷, 杨升, 陈亚雪, 胡玲玲, 屠琴, 张丽, 刘雪芹, 王行国. 两株茶树内生草螺菌的微生物学特性. 微生物学报, 2014, 54(4): 424–432.
- [5] Pedrosa FO, Monteiro RA, Wassem R, Cruz LM, Ayub RA, Colauto NB, Fernandez MA, Fungaro MHP, Grisard EC, Hungria M, Madeira HMF, Nodari RO, Osaku CA, Petzl-Erler ML, Terenzi H, Vieira LGE, Steffens MBR, Weiss VA, Pereira LFP, Almeida MIM, Alves LR, Marin A, Araujo LM, Balsanelli E, Baura VA, Chubatsu LS, Faoro H, Favetti A, Friedermann G, Glienke C, Karp S, Kava-Cordeiro V, Raittz RT, Ramos HJO, Ribeiro EMSF, Rigo LU, Rocha SN, Schwab S, Silva AG, Souza EM, Tadra-Sfeir MZ, Torres RA, Dabul ANG, Soares MAM, Gasques LS, Gimenes CCT, Valle JS, Ciferri RR, Correa LC, Murace NK, Pamphile JA, Patussi EV, Prioli AJ, Prioli SMA, Rocha CLMSC, Arantes OMN, Furlaneto MC, Godoy LP, Oliveira CEC, Satori D, Vilas-Boas LA, Watanabe MAE, Dambros BP, Guerra MP, Mathioni SM, Santos KL, Steindel M, Vernal J, Barcellos FG, Campo RJ, Chueire LMO, Nicolás MF, Pereira-Ferrari L, da Conceição Silva JL, Gioppo NMR, Margarido VP, Menck-Soares MA, Pinto FGS, Simão RDCG, Takahashi EK, Yates MG, Souza EM, Richardson PM. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genetics*, 2011, 7(5): e1002064.
- [6] Grossmann K. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Management Science*, 2010, 66(2): 113–120.
- [7] Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 2007, 31(4): 425–448.
- [8] Duca D, Rose DR, Glick BR. Characterization of a nitrilase and a nitrile hydratase from *Pseudomonas* sp. strain UW4 that converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(15): 4640–4649.
- [9] Reineke G, Heinze B, Schirawski J, Buettner H, Kahmann R, Basse CW. Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. *Molecular Plant Pathology*, 2008, 9(3): 339–355.
- [10] Xin G, Glawe D, Doty SL. Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid-producing yeasts occurring in *Populus* trees. *Mycological Research*, 2009, 113(9): 973–980.
- [11] Phillips KA, Skirpan AL, Liu X, Christensen A, Slewinski TL, Hudson C, Barazesh S, Cohen JD, Malcomber S, McSteen P. *vanishing tassel2* encodes a grass-specific tryptophan aminotransferase required for vegetative and reproductive development in maize. *The Plant Cell*, 2011, 23(2): 550–566.
- [12] Tao Y, Ferrer JL, Ljung K, Pojer F, Hong FX, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Lvans LJ, Cheng YF, Lim J, Zhao YD, Ballaré CL, Sandberg G, Noel JP, Chory J. Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, 2008, 133(1): 164–176.
- [13] Brandl MT, Lindow SE. Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(11): 4121–4128.
- [14] Fedorov DN, Doronina NV, Trotsenko YA. Cloning and characterization of indolepyruvate decarboxylase from *Methylobacterium extorquens* AM1. *Biochemistry*, 2010, 75(12): 1435–1443.
- [15] Romasi EF, Lee J. Development of indole-3-acetic acid-producing *Escherichia coli* by functional expression of IpdC, AspC, and Iad1. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 23(12): 1726–1736.
- [16] Yan XM, Wang Z, Mei Y, Wang LQ, Wang X, Xu QS, Peng S, Zhou Y, Wei CL. Isolation, diversity, and growth-promoting activities of endophytic bacteria from tea cultivars of Zijuan and Yunkang-10. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1848.
- [17] Luo L, Yao SY, Becker A, Rüberg S, Yu GQ, Zhu JB, Cheng HP. Two new *Sinorhizobium meliloti* LysR-type transcriptional regulators required for nodulation. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(13): 4562–4572.
- [18] Khan SR, Gaines J, Roop II RM, Farrand SK. Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM Expression on Ti plasmid quorum sensing. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(16): 5053–5062.

Auxin synthesis in tea plant endophytic *Herbaspirillum* sp. ZXN111 and the plant growth promotion on Yunkang-10

Xiuli Zeng¹, Zhi Wang¹, Li Luo², Xu Wang¹, Xuanqin Chen³, Yu Zhou^{1,2*}

¹ State Key Laboratory of Tea Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Heifei 230036, Anhui Province, China

² Shanghai Key Laboratory of Bio-Energy Crops, Shanghai University, Shanghai 200444, China

³ School of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, Yunnan Province, China

Abstract: [Objective] The predicted mechanism of indole-3-acetic acid (IAA) synthesis was investigated by molecular method on an endophytic bacterium *Herbaspirillum aquaticum* ZXN111 that was isolated from Zijuan tea. [Methods] Aromatic-amino-acid aminotransferase gene (*tyrb*) in indole-3-pyruvic acid (IPA) pathway responsible for IAA synthesis was selected on the basis of *Herbaspirillum seropedicae* genomic analytical results. Gene *tyrb* was mutated by recombinant plasmid *pK19mobΩ2HMB-P-tyrb* to produce mutant *tyrb::pK19mobΩ2HMB*, and a complementation strain *tyrb::pK19mobΩ2HMB(+)* was further constructed by recombinant plasmid *pSRK-Gm-tyrb*. IAA synthesis activities of mutant *tyrb::pK19mobΩ2HMB*, strain *tyrb::pK19mobΩ2HMB(+)* and wild type ZXN111 were analyzed, and the three strains' plant growth promotion (PGP) activity was evaluated by tissue cultured seedling of Yunkang-10. [Results] After *tyrb* gene mutated by *pK19mobΩ2HMB-P-tyrb* insertion, IAA synthetic activity of mutant *tyrb::pK19mobΩ2HMB* was much lower than that of wild-type ZXN111 in 48 h culture, but IAA synthesis activity of complementary strain *tyrb::pK19mobΩ2HMB(+)* was restored by plasmid *pSRK-Gm-tyrb*. The wild-type strain ZXN111 positively regulated the plant growth of Yunkang-10, while the mutant *tyrb::pK19mobΩ2HMB* lose the plant promotion activity significantly. [Conclusion] The indole-3-pyruvate (IPA) pathway is the primary IAA synthesis pathway in *Herbaspirillum aquaticum* ZXN111 and the *tyrb* is the key gene of IPA pathway, but other alternative pathways are also existed. Auxin production was one of the important contributors to PGP activity of *Herbaspirillum aquaticum* ZXN111.

Keywords: tea plant endophyte, *Herbaspirillum aquaticum*, auxin synthesis, *tyrb* gene

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Anhui Natural Science Foundation (1608085QC57), by the Foundation from Shanghai Key Laboratory of Bio-Energy Crops, Shanghai University and by the Open Fund of State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization (SKLTOF20190110)

*Corresponding author. Tel: +86-551-65786701; E-mail: microbes@ahau.edu.cn

Received: 10 November 2019; Revised: 7 January 2020; Published online: 21 January 2020