

基于分子生物学和基因组学的植物根际微生物研究

郝大程^{1*} 陈士林² 肖培根²

(1. 大连交通大学环境化工学院生物技术教研室 辽宁 大连 116028)

(2. 中国医学科学院药用植物研究所 北京 100193)

摘要: 根际微生物是指在植物根系直接影响的土壤范围内生长繁殖的微生物。根际微生物研究对微生物生态学和工业生物技术开发均十分重要, 妨碍其研究进展的主要原因是 99% 的根际微生物物种在实验室中无法成功培养。近年来, 将基于分子生物学和基因组学的非培养研究技术应用于根际微生物多样性研究取得了很大进展, 本文结合作者对红豆杉根际的研究, 评述近期相关新技术的应用和其未来应用前景。

关键词: 根际微生物, 分子生物学, 基因组学, 系统发育, 多样性

Study of Rhizosphere Microbe Based on Molecular Biology and Genomics

HAO Da-Cheng^{1*} CHEN Shi-Lin² XIAO Pei-Gen²

(1. Laboratory of Biotechnology, Dalian Jiaotong University, Dalian, Liaoning 116028, China)

(2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The rhizosphere is the narrow region of soil that is directly influenced by roots and associated soil microorganisms. Research on rhizosphere microbe is essential for microbial ecology and industrial biotechnology. However, the inability of culturing most rhizosphere microorganisms (around 99%) in the laboratory obviates the research progress. In recent years, there is enormous advance in applying non-culturing techniques based on molecular biology and genomics to the study of rhizosphere microbial diversity and plant-microbe interactions. This review discusses recent findings and future challenges in the study of rhizosphere microbe, with brief comment of our *Taxus* rhizosphere study and various novel techniques.

Keywords: Rhizosphere microbe, Molecular biology, Genomics, Phylogeny, Diversity

根际微生物(Rhizosphere microbe)是指在植物根系直接影响的土壤范围内生长繁殖的微生物。有细菌、放线菌、真菌、藻类和原生动物等。一般数量比根际外多几倍至几十倍。它们和植物间是互生

关系, 与植物根系相互作用、相互促进。微生物大量聚集在根系周围, 将有机物转变为无机物, 为植物提供有效的养料; 同时, 微生物还能分泌维生素, 生长刺激素等, 促进植物生长。在植物生长过程中,

死亡的根系和根的脱落物(根毛、表皮细胞、根冠等),以及根系向根外分泌的无机物和有机物是微生物重要的营养来源和能量来源;由于根系的穿插,使根际的通气条件和水分状况优于根际外,从而形成利于微生物的生态环境。根际微生物在同一植物的不同品种可表现出其特异性,如雀稗根际内的雀稗固氮菌(*Azotobacter paspali*)只在雀稗品种的根际内受到刺激,而在另一品种的根际内则发育不好。固氮螺菌(*Azospirillas* sp.)在玉米品种 UR-1 根际内固氮活性不强,而在 UR-1 的杂种 S1 根际内则固氮酶活性很高。

根际微生物以细菌为主,并且是革兰氏阴性菌占优势。常见的有假单胞菌、黄杆菌、产碱杆菌、土壤杆菌和色杆菌等。根际中的革兰氏阳性短杆菌、球菌、芽孢杆菌反而比根际以外少。真菌、放线菌的根际效应一般不明显。大多数根际微生物对植物无害,或对植物生长有促进作用。它们在根际的生命活动中,由呼吸作用放出二氧化碳或代谢产酸有助于难溶矿物质的溶解,增加植物对磷及其他矿质元素的吸收。此外,它们分泌的生长刺激素类物质(如吲哚乙酸,赤霉素等)还能促进植物生长。植物也分泌杀害或抑制微生物生长的物质,是造成不同植物的根际微生物组成和数量不同的原因之一。有些根际微生物分泌抗生素,可抑制植物病原微生物的繁殖。在植物根际也有土著性的病原微生物,它们或是引起植物病害,或是产生有毒物质,对植物生长不利。

分子生物学和基因组学技术的应用极大地推动了根际微生物研究,本文结合作者近年研究,对基于分子生物学和基因组学的根际微生物研究方法进行扼要评述。

1 用于根际研究的分子生物学技术

传统上,根际微生物研究主要依靠微生物培养技术,各种细菌培养和真菌培养技术(例如富集培养,平板计数等)提供了大量关于根际微生物多样性的有用信息。但其缺点明显:1) 由于使用的培养基和培养条件不同易造成结果的偏倚;2) 只能培养和分离出一小部分微生物群落,自然群落中约 99%的物种无法得到分离并在人工培养基上生长^[1]。微生物功能多样性信息对于明确不同环境中微生物群落

作用具有重要意义,而微生物群落的定量描述一直是微生物学家面临的最艰巨的任务之一。目前,以群落水平碳源利用类型为基础的Biolog氧化还原技术为研究根际微生物群落功能多样性提供了一种简单、快速的方法^[2,3],并得以广泛应用。但它仍然是一种以培养为基础的方法,对快速生长和适合在Biolog实验条件下生长的小部分群落成员有强烈的选择性,显示的代谢多样性类型不一定反映整个根际微生物群落的功能多样性。因此,这种方法优点明显,缺陷也存在,并且在应用过程中还有很多关键的操作要点与技巧。磷脂脂肪酸(PLFA)是活体微生物细胞膜的重要组分,不同类群的微生物可通过不同的生化途径合成不同的PLFA。一些PLFA可作为分析微生物量和微生物群落结构变化的“生物标记”。在根际微生物分析中,越来越多地采用了PLFA方法^[4,5]。采用PLFA方法并结合其他方法有助于获取根际微生物群落多样性的更多和更全面而完整的信息。DNA复性动力学分析^[6]也能提供关于特定微生物群落总的遗传多样性的信息。然而上述方法的分辨率不够高,为了鉴别群落水平的关键性微生物种类,阐明它们在生态系统中的作用,rRNA基因分析越来越受重视^[6]。

1.1 变性梯度凝胶电泳(DGGE)和温度梯度凝胶电泳(TGGE)

DGGE 最初是 Lerman 等人于 1980 年代初期发明的,起初主要用来检测 DNA 片段中的点突变。Muyzer 等人在 1993 年首次将其应用于微生物群落结构研究。后来又发展出其衍生技术 TGGE。此后十年间,该技术被广泛用于微生物分子生态研究的各个领域,目前已经发展成为研究微生物群落结构的主要分子生物学方法之一。原理:双链 DNA 在一般的聚丙烯酰胺凝胶电泳时,其迁移行为决定于其分子大小和电荷。不同长度的 DNA 片段能够被区分开,但同样长度的 DNA 片段在胶中的迁移行为一样,因此不能被区分。DGGE/TGGE 在一般的聚丙烯酰胺凝胶基础上,加入了变性剂(尿素和甲酰胺)梯度,从而能把同样长度但序列不同的 DNA 区分开。Da Mota 等用 PCR-DGGE 研究增施石灰对玉米根际土壤和非根际土壤微生物群落结构的影响^[7]。增施石灰于酸性土壤能防止铝的毒性,使作物增产。有些玉米品种显示了耐受铝的特性,可能与根部有机酸分泌有关。研究发现铝应激对根际细菌群

落的影响大于玉米品种(是铝敏感还是铝耐受的)的影响。发现播种后 30 d 和 90 d 的根际细菌群落(主要是放线菌)差异明显。相反,由 DGGE 谱图可见,增施石灰或玉米品种对根际真菌群落结构影响不大。发现播种后 30 d 和 90 d 的根际真菌群落结构差异较小。将 DGGE 主要 16S rRNA 条带切下纯化,克隆测序,发现非根际土壤中的主要类群为放线菌目和根瘤菌目。

根际是一个多种有机体共同参与作用的生态系统,与植物健康和环境可持续性密切相关。非生物因素影响根际微生物-植物互作,而根际微生物群落可能受转基因植物中异源基因表达的影响。巴西的 Andreote 等研究了野生型和转基因桉树的根面和根际土壤中与根瘤菌目有关的 α -变形杆菌(Rhizobiales-like community)群落的动态变化^[8]。实验在温室进行,研究了 2 个野生型品种(WT17 和 WT18)和 4 种转基因(TR-9、TR-15、TR-22 和 TR-23)桉树。培养非依赖的研究方式包括用实时定量 PCR 对与根瘤菌目有关的 α -变形杆菌进行表达定量研究,用 PCR-DGGE 和 16S rRNA 基因克隆文库分析细菌多样性。定量 PCR 发现 TR-9 和 TR-15 的特定 α -变形杆菌表达量少,而基于 PCR-DGGE 的主成分分析表明各个细菌群落结构有差异,不仅转基因桉树和野生型间有差别,而且 2 个野生型品种间也有差别。由 TR-15 和 WT17 获得克隆文库,比较 2 个文库发现其细菌群落不同。总的看,转基因桉树根际菌群有些特点,但其与野生型根际菌群的差异并不大于野生型品种之间的差异。到目前为止,对没有进行荧光或同位素标记的 DNA 的染色技术灵敏性相对较低,造成 DGGE 法的灵敏度较低,与可以使用内标法的 T-RFLP 法相比, DGGE 法的另一个缺陷是没有合适的分子量标准物,使得不同次电泳的样品之间难以进行比较。

1.2 末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)

T-RFLP 技术以分子系统学原理为基础,综合运用了 PCR、限制性酶切、荧光标记和 DNA 序列分析等技术,通过对特定核酸片段长度多态性的测定来分析微生物群落结构和功能。首先根据比较基因组学原理选取一段具有系统进化标记特征的 DNA 序列作为目标分析序列,从原理上讲,微生物群落中任何具有特异性的 DNA 片段都可以作为目标分析序列,包括微生物核糖体小亚基(SSu)16S rRNA

(原核生物)和 18S rRNA(真核生物)的基因序列,以及一些保守的功能基因序列等。之后根据目标基因序列的保守区设计引物,荧光标记。提取总 DNA,PCR 扩增片段一端带有荧光标记。限制性内切酶对扩增的 DNA 消化,产生长度不同的片段。电泳分离、荧光检测,检测带荧光标记的片段(Terminal Restriction Fragment, T-RF)。通过分析,揭示样品种类、数量和种群大小等信息,从而解析群落结构、功能及动态变化。

Flores-Mireles 等用 T-RFLP 研究了墨西哥红树根际脱氮菌(*nirS*和*nirK*基因)和固氮菌(*nifH*)的分子多样性^[9],并对比 3 个取样地点的菌落组成结构。*nifH* 运算分类单位(OTU)的数量在所有 3 个地点均高于*nirK*或*nirS*。地点 3 根际沉积物的有机质含量和含沙量最高,孔隙水(Pore water)氧浓度最低,而*nifH*多样性最高;用非度量多维量表(MDS)和 Bray-Curtis 系数分析 T-RFLP 数据,并进行采样地的成组分析和配对比较,可将地点 3 的 OTU 与地点 1 和 2 的完全分开。3 个地点*nirS* OTU 的组成有显著差异,但变异程度小于*nifH*。基于*nirK*的 OTU 在三地很相似。*nifH*, *nirK*和*nirS*的系统发育分析表明绝大多数克隆序列与根际分离菌的相应序列相似,而与已知菌株或其它环境菌不同。

系统获得抗性(SAR)是一种可诱导的植物系统防御反应,有助于植物抵抗各种病原体,并能分泌抗微生物化合物到土壤中。然而 SAR 对根际菌的影响未知。Hein 等研究了模式植物拟南芥根际细菌群落指纹以考查 SAR 对细菌群落结构和多样性的影响^[10]。用 T-RFLP 分析 *Msp* 和 *Hae* 消化的 16S rDNA,以乳杆菌为内对照,评估根际细菌群落多样性。T-RFLP 分析充分显示根际对细菌群落结构的影响,用丰富度,Shannon-Weiner 指数, Simpson 多样性指数和均匀度分析根际和非根际土壤 OTU(用 T-RF 定义),证实拟南芥根系的存在显著改变细菌群落。对 T-RF 进行多元聚类分析亦可见植物对菌群结构的影响。还发现不同拟南芥 SAR 突变体在根际菌群指纹图谱方面差异显著。然而,未发现组成型 SAR 表达导致根际细菌多样性显著降低。未来可进一步探讨应用 SAR 等可诱导的植物防御反应调控土壤菌群结构。

T-RFLP 的局限性: 1) 摆脱不了 PCR 技术共同的缺陷,如不同菌种 DNA 的差异性扩增,以及目标

DNA在菌种间拷贝数的差异等^[11]; 2) T-RFLP图谱中每个T-RF有可能不只对应一个菌种, 造成对群落多样性的低估; 3) 酶切后T-RF的长度分布也会造成对复杂群落多样性的低估, 因为测序仪检测 500 bp以上的T-RF精度不够^[12]; 4) 实验过程影响因素众多, 使得T-RFLP图谱的解析存在一定的不确定性; 5) 在如何对大量T-RFLP数据进行处理和统计学分析, 以挖掘出其中的群落结构信息方面, 很多理论和技术上的问题仍处于摸索阶段。为解决上述局限性, 需要根据研究目的、样品、环境条件等对T-RFLP分析的各个步骤进行优化, 如: 对DNA片段进行克隆、测序和分析; 利用多种酶对PCR扩增产物分别进行酶切, 将多个T-RFLP图谱进行综合分析; 利用毛细管电泳技术, 提高分辨率^[12]等。

1.3 扩增 rDNA 限制酶分析(ARDRA)

ARDRA 原理是基于 PCR 技术选择性扩增 rDNA 片段(如 16S rDNA), 再对 rDNA 进行限制性酶切片长度多态性分析。多种多样的细菌利用根际复杂的微域环境生长繁衍。研究转入植物的异源基因如何影响根际细菌-植物互作日益受到重视。Andreote 等研究番茄根际和根面细菌群落, 比较转基因番茄(CAB1, CAB2 和 TRP)和野生型(WT)番茄根际菌群^[13]。在生长阶段和开花阶段(发芽后 1 和 3 月)收集根际样品, 分离菌株以考查根际可培养菌群落的多样性。用 ARDRA 和 16S rDNA 测序进一步鉴别各分离菌株, 发现常见的根际菌为 α -变形杆菌、 β -变形杆菌、放线菌和芽孢杆菌。PCR-DGGE 分析发现植物发育早期根际细菌群落有改变, 随时间推移原初的群落结构重新建立。转基因番茄和野生型番茄根际菌群的差异不如根面菌群明显。用聚类分析和主成分分析(PCA)将各品系根据菌落结构特征分组。在各品系间差异大的条带对应于泛菌属(*Pantoea* 在 WT), 杆菌(在 CAB)和 *Burkholderia*(在 TRP)。研究提示尽管转基因植物种植影响根际/根面菌群组成, 在种植一轮后土壤可恢复初始细菌多样性。

Lee等通过分析菌群 16S rRNA基因克隆, 研究了韩国海滨沙丘两种主要植物滨旋花(*Calystegia soldanella*)和滨麦草(羊草, *Elymus mollis*)根际的细菌多样性^[14]。用 *Hae* 消化的ARDRA结果显示 2 种植物根际菌群成分差异显著, 并观察到与植物分布地区有关的差异。还识别了一种在 2 种植物根际均

最为常见(滨旋花克隆的 50.6%, 滨麦草克隆的 62.5%)的ARDRA谱型, DNA测序发现其为溶杆菌(*Lysobacter* spp.), 属 γ 变形菌黄色单胞菌科。滨旋花其它次要谱型代表了假单胞菌(*Pseudomonas* spp.), 根瘤菌(*Rhizobium*), 金黄杆菌(*Chryseobacterium* spp.)和泛菌, 滨麦草其它次要谱型代表假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。溶杆菌普遍存在于沙丘植物根际, 具有拮抗植物病原体的潜力, 提示其与宿主植物可能形成了共生关系。ARDRA更适合于细菌种和亚种水平的鉴定。由于此法是对某一基因进行RFLP分析, 因此产生的条带较少, 结果较易分析。在菌种鉴定中具有特异、敏感、快速、准确等特点。但是, 由于利用的是局部的基因信息, 有时也可能导致分辨率的下降。

1.4 DNA 克隆测序法

本文作者通过比较 3 个中国亚热带和温带红豆杉根际的 16S rRNA基因克隆文库(扩增接近全长基因, 克隆载体为pMD19T)研究了根际细菌群落的地区变异^[15]。筛选分析 146 个克隆, 系统发育分析表明温带曼地亚红豆杉根际多含 γ -变形杆菌、 β -变形杆菌和放线菌。亚热带南方红豆杉根际多含酸杆菌。定量分析 3 个克隆文库的细菌丰富度和多样性发现亚热带红豆杉根际显著高于温带, 且亚热带种植红豆杉根际高于野生红豆杉根际。用富集菌培养从大连曼地亚红豆杉根际土壤筛选出一株Actinobacteria DICP16, 用 16S rRNA 和gyrase B序列分析鉴定为 *Leifsonia shinshuensis* sp. DICP16 能去除 7-木糖-10-去乙酰基巴卡亭III和 7-木糖-10-去乙酰基紫杉醇的木糖基, 使我们能利用含木糖紫杉烷提取 10-去乙酰基巴卡亭III和抗癌药紫杉醇。本研究首次探讨了红豆杉根际微生物多样性及其工业应用。

固氮是土壤菌群最重要的作用之一, 解决了多种生态系统氮供应的难题。固氮菌减少可能威胁生态系统健康, 使生产力下降, 所以选用适宜的分子生物学方法监测特定菌群很重要。Lamarche等用大区试验研究了Bt白云杉^[16], 此转基因植物能组成性表达苏云金芽孢杆菌的Cry1Ab杀虫毒素, 抗云杉青虫。Lamarche等研究了Bt白云杉对根际固氮菌群的影响。随机对照实验中包括非转基因对照植物, GUS白云杉(转入 β -葡萄糖醛酸酶基因)和Bt/GUS白云杉(组成性表达Cry1Ab毒素和 β -葡萄糖醛酸酶)。种植 4

年后收集各植物根际样品,提取基因组DNA,扩增固氮酶还原酶(*nifH*)基因的1个360 bp区域,进行克隆测序(克隆载体为pDrive)。用DOTUR软件确定OTU,计算多样性指数。用SONS软件计算各克隆文库共有OTU的比例。发现非转基因对照植物, GUS白云杉和Bt/GUS白云杉根际固氮菌组成无显著差异。然而,观察到实验种植地点白云杉和两处天然白云杉根际固氮菌群差异显著,其中一处与种植地仅隔几米远。尚无证据表明转入*cryIAb*基因影响根际固氮菌组成,实验地点或/和种植前的准备可能是更重要的决定因素。

以上4种方法是基于PCR技术的研究方法,这些方法可以将极微量的DNA进行大量扩增,通过比较分析基因序列的特异性来研究根际微生物的多样性。

2 用于根际研究的基因组学技术

微生物基因组学的快速进展使人们获得了上百种微生物的完整基因组序列信息^[17]。新的分子生物学技术和基因组学技术结合使得我们能够将根际某种特定的代谢活性与系统发育方面明确可辨的微生物物种直接关联起来,各种方法的组合应用使我们能深入研究根际功能和植物-微生物互作的细节。

2.1 荧光原位杂交(FISH)

FISH采用荧光基团特异的系统发育探针(靶向rRNA)和荧光显微镜,有助于根际未培养菌的种属鉴定。联用FISH和显微放射自显影能检测和定量利用特定底物的有活性的微生物群体。Kutter等用共培养(Monoxenic)系统研究食源性病原体鼠伤寒沙门氏菌(*S. enterica*)和3种李斯特菌(*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*)在大麦根部的内生定殖^[18]。植物接种菌后1~4周计数CFU,进行特异性PCR,并用荧光标记的寡核苷酸探针和共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)进行FISH检测。发现鼠伤寒沙门氏菌是大麦根部的内生定殖菌,可达 2.3×10^6 CFU/g根鲜重。李斯特菌的数量与阴性对照*E. coli* HB101(非内生菌)相当,仅为鼠伤寒沙门氏菌的1/10。FISH/CLSM检见根毛和根表面鼠伤寒沙门氏菌的高密度定殖,且发现菌散布于根被皮层和内皮层。相反地,接种的李斯特菌仅定殖于根毛区,根表面的其它部位未发现定殖,未见李斯特菌的内生定殖。特异性PCR和平板计数证实此发现。

Watt等用FISH研究农田小麦根部天然菌,假单胞菌和丝状菌的数量和分布^[19]。于一季不同时间从保护性耕作系统的未翻耕地土壤采集种子根。这样的土壤在空间上是非匀质的,许多根在满是裂纹和孔隙的硬土中缓慢生长,其间遍布上一茬作物的死根。切片上可见根和根际形态,以及与土壤颗粒的接触, FISH中使用Cy5和Cy5.5荧光染料在远红区观察切片,避免自体荧光干扰。空间分析显示细菌长在距根表面11 microm(2 microm~30 microm)的稳定基质(Biofilm)内,40%的根可见菌聚集。一半菌丛集于表皮细胞间的轴向槽,土壤颗粒,根冠细胞或根毛。细菌数平均为 $15.4 \times 10^5/\text{mm}^3$ 根际,其中假单胞菌和丝状菌分别占10%和4%,此数字与植物年龄无关,与取样时间关系也不大。根冠定殖的菌最多,而伸长区最少。随着根部发育假单胞菌变异不大,占伸长区细菌的17%。伸长区未发现丝状菌。对根际菌群影响最大的是是否与死根残余物接触,在该部位假单胞菌减少而丝状菌增加到57%($P < 0.001$)。发现根部残余物有大量细菌,48%为丝状菌($P < 0.001$),1.4%为假单胞菌($P = 0.014$)。在可持续农业系统中应深入研究根际菌,根冠和根系分泌物,残余根可作为有益菌的来源。需要指出, FISH用于分析原核微生物的群落结构,精度高,但其应用受到环境样品微生物的生理状态的影响,而且事先要根据已知种属设计探针,不能检测出环境样品中的未知种属。

2.2 稳定同位素探针(SIP)

稳定性同位素标记技术同分子生物学技术相结合而发展起来的SIP,在对各种环境中微生物群落组成进行遗传分类学鉴定的同时,可确定其在环境过程中的功能,提供复杂群落中微生物互作及其代谢功能的大量信息,具有广阔的应用前景。其基本原理是:将原位或微宇宙(Microcosm)的环境样品暴露于稳定性同位素富集的基质中,这些样品中存在的某些微生物能以基质中的稳定性同位素为碳源或氮源进行物质代谢并满足其自身生长需要,基质中的稳定性同位素被吸收同化进入微生物体内,参与各类物质如核酸及PLFA等的生物合成,通过提取、分离、纯化,分析这些微生物体内稳定性同位素标记的生物标志物,从而将微生物的组成与其功能联系起来。此技术在甲基营养菌、有机污染物降解菌、根际微生物生态、互营微生物、宏基因组学等方面

有广阔的应用前景。

根际是一个代谢活跃的动态环境, 其中的微生物能利用根分泌物中的碳元素和土壤有机质(SOM)中原有的碳。Haichar等用SIP研究了4种植物根际菌群同化碳元素的动态过程^[20]。小麦、玉米、油菜和蒺藜苜蓿分别在同样土壤中生长, 环境含有¹³CO₂(¹³C占99%)。从根际土壤提取的DNA用等密度离心分层。用¹³C-DNA和根DNA的DGGE研究哪些菌同化了根分泌物中的碳元素, 从¹²C-DNA的分析中判断哪些菌同化了SOM中的碳。发现植物根分泌物显著影响了根际菌群结构。根际的鞘脂杆菌目和粘球菌属同化了4种植物根分泌物中的碳元素, 鞘脂单胞菌目能利用2种来源的碳, 所以在轻、重和根三离心层DNA中都能找到。鞘脂单胞菌目是单子叶植物根际特有的, 而肠杆菌和根瘤菌定殖于所有4种植物的根际, 能利用2种来源的碳, 属广食者(Generalist)。有证据表明根分泌物影响根际菌群结构, 促进菌对土壤SOM碳元素的同化。

植物残余物主要由纤维素组成, 含有陆地生态系统中最多的有机碳。土壤微生物负责将此有机碳转移至大气, 但作用细节未知。Haichar等用DNA-SIP技术鉴别出参与纤维素降解的细菌群体^[21], 将木醋杆菌(*Acetobacter xylinus*)在土壤中孵育7 d、14 d、30 d和90 d, 环境含有¹³CO₂, 结果产生了¹³C-纤维素。从土中提取总DNA, ¹³C-标记的(重)和未标记的(轻)DNA用超速离心分层, 用自动化细菌核糖体基因间隔序列分析(B-ARISA)和DGGE研究代谢活跃菌群的组成。发现纤维素降解与重DNA层中的菌群结构显著改变相关, 木醋杆菌在土中孵育30 d会出现新的DGGE条带, 其它条带的相对强度也增加。木醋杆菌在土中孵育90 d, 大部分DGGE条带的相对强度降低。对其中10个条带进行DNA测序和系统发育分析, 发现绝大多数是已知能降解纤维素的菌或未培养的土壤菌。

FISH和SIP是基于分子杂交技术的分子标记法, 可对微生物在根际环境中的存在与否、分布模式及丰度等情况进行研究, 具有较高的灵敏性和特异性。

2.3 宏基因组文库

1998年, Handelsman J等提出了建立未培养微生物的Metagenomic library即构建宏基因组文库的设想^[22], 把对未培养微生物的研究引入了一个新的层次。直接提取纯化宏基因组构建文库是从分子生

物学角度研究微生物基因资源的重要途径, 这也是研究未培养微生物的生态、生理等特性的关键方法。例如传统上用菌培养找寻耐镍菌, 为深入研究与镍耐受有关的基因, Mirete等分析了西班牙西南部Tinto河岸特有的石南属植物*Erica andevalensis*的根际菌群^[23], 此天然极酸环境富含金属。根际DNA的16S rRNA序列分析表明存在受酸性浸矿废水(AMD)影响的5组细菌和2组古菌。为寻找新的耐镍菌, Mirete等构建筛选了5个宏基因组文库, 宿主菌为*E. coli*, 高拷贝数克隆载体为pSKII⁺。约2.15 Gb的环境DNA被克隆进5个文库, 获得约726500个重组克隆, 平均插入片段大小为2.5 kb (1 kb~8.5 kb)。共筛选分析了13个阳性克隆, 通过分析胞内镍含量和DNA序列相似度推测其耐镍机制。2个克隆编码ABC转运蛋白成分, 由此可解释菌泵出金属的机制; 另外发现一个编码有保护作用的丝氨酸O-乙酰转移酶的克隆, 可解释菌耐受胞内高浓度镍的机制; 4个克隆编码已知蛋白, 但以前未知其与耐镍有关; 其余6个克隆编码功能未知的假想蛋白。这是用AMD环境的根际宏基因组筛选耐镍基因的首例报道。

稻田是温室气体甲烷的重要来源, 由产甲烷的古菌产生, 尤其是水稻Cluster I (RC-I)产甲烷菌。RC-I产甲烷菌尚无纯培养, 其在稻田中占优势的机制未知。Erkel等构建了完全的RC-I宏基因组文库(3.18 Mb)^[24]。宿主菌为*E. coli*, CopyControl™ pCC1 fosmid载体。在全基因组鸟枪法克隆中使用了3734个fosmid克隆, 2个鸟枪文库的插入片段大小为1.5 kb和3.5 kb。文库克隆序列分析显示RC-I耐氧的, H₂/CO₂依赖的生活方式, 以及糖代谢酶和同化硫酸盐还原的酶活性强等, 这些是未在其它产甲烷菌中发现的。这些特性和一套独特的抗氧化酶, DNA修复机制, 以及氧不敏感(Oxygen-insensitive)的酶使RC-I在栖息地与其它产甲烷菌相比具有选择优势, 从而解释了其在水稻根际占优势的原因。细菌人工染色体(BAC)和fosmid都具有大肠杆菌F因子遗传稳定的优点, 但构建原理和插入DNA片段的能力不一样。BAC的插入片段最大达350 kb, 平均100 kb, 比fosmid克隆片段长, BAC的复制子来源于F因子(单拷贝复制), 因此, BAC在宿主菌内只有极少拷贝数, 即使传代100代以后, 仍可稳定遗传, 尚未检出缺失、重组、嵌合现象。由于BAC文库中插

入片段大,在同一克隆中发现系统发育标记和功能标记的可能性大大增加,尤其当 16S rRNA 基因邻近功能基因时^[25]。BAC 有望用于根际微生物宏基因组文库构建。

2.4 基于微芯片的根际微生物研究

基因芯片技术是 90 年代中期以来快速发展起来的分子生物学高新技术,是各学科交叉综合的崭新科学。其原理是采用光导原位合成或显微印刷等方法,将大量 DNA 探针片段有序地固化于支持物的表面,然后与已标记的生物样品中 DNA 分子杂交,再对杂交信号进行检测分析,就可得出该样品的遗传信息。基因芯片技术目前国内外都取得了较大的进展,该技术可用于 DNA 测序,基因表达及基因组图的研究,基因诊断,新基因的发现,药物筛选,给药个性化等,在根际研究中亦有很好的应用前景。

农杆菌 T-DNA 的转移功能要求酸性环境中植物酚类信号诱导 Ti 质粒上的毒力基因(Vir regulon)。Yuan 等用微芯片分析转录组^[26],芯片上 60-mer 寡核苷酸分别代表了 5419 个农杆菌的开放阅读框,氨基化的 cDNA 用 Cy3 或 Cy5 标记。发现酸性环境引发 2 种迥异的反应:1) 农杆菌通过一种普遍的保守反应调整基因表达谱,适应环境酸化;2) 一种高度特化的酸介导的信号反应参与农杆菌-植物互作。酸性环境(pH 5.5)与中性环境(pH 7.0)相比,共 78 个基因的表达明显增加,74 个基因的表达明显降低。DNA 微阵列分析不仅证实了以前鉴别出的酸诱导基因,而且发现很多新的酸诱导基因如 *virE0*, *virE1*, *virH1* 和 *virH2* 可能直接参与农杆菌-植物互作。发现酸性环境诱导 ChvG-ChvI 双组分系统,其对菌毒力至关重要。酸性环境还诱导 VI 型分泌系统和一种非血红素过氧化氢酶。Yuan 等发现酸诱导的基因表达不依赖 VirA-VirG 双组分系统。农杆菌已进化出一种机制,使 vir regulon 的 3 步活化包含级联调控和层次信号路径,根际酸环境活化的 ChvG-ChvI 系统直接活化了 VirA-VirG 系统,导致 T-DNA 转移。

根际细菌多样性对于生态系统可持续性和土壤生物学功能至关重要,DNA 分类学(Taxonomic)微阵列的高通量分析潜力非常适合研究细菌多样性。Sanguin 等用基于 16S rRNA 的微芯片分析玉米根际微生物,并对该技术进行方法学验证^[27]。芯片上有 170 种探针,主要针对变形杆菌。从玉米根际和非根

际土壤扩增 16S rRNA,进行克隆测序。在芯片杂交中发现所有与相应探针匹配好的测试克隆均呈阳性反应。所用层次嵌套探针(Hierarchically nested probe)可靠性好,但分类鉴定水平受成套探针(Probe set)特异性影响较大。比较杂交的实验结果和理论结果,假阳性率 0.91%,假阴性率 0.81%。DNA 掺加实验表明对于给定 DNA 类型微阵列检测阈约为 0.03%。比较玉米根际和非根际土壤杂交结果,农杆菌在根际明显较多,而酸杆菌,拟杆菌,疣微菌和浮霉菌明显较少。另外鞘氨醇单胞菌,根瘤菌和放线菌在 2 种环境都存在,且杂交信号强。分类微阵列能很好地区分相关生物样品的菌群成分,为根际细菌多样性的高通量研究提供了便利工具。

3 结语和展望

实践表明,没有哪一种技术能独自解析根际全部的微生物多样性和植物-微生物互作,根据研究需要可选择不同分子生物学和基因组学技术的组合。例如,可用 FISH-显微放射自显影研究碳利用微生物和这些微生物中是否存在特定功能基因。将同位素与 DNA 微阵列结合可以从不同角度研究此类问题,不仅能检测到更多碳利用微生物,而且能监测关键功能基因的表达。未来可将 SIP 和 DNA 微阵列,以及 SIP 和宏基因组文库结合,前者可鉴别利用根部含碳元素的分泌物的根际微生物,同时评估根际相应微生物基因表达水平;后者可用于深入研究根际微生物的结构与功能的关系。另外,需要提高 SIP 中 DNA/RNA 标记的敏感性,优化超速离心条件和改进取样方法等。

参考文献

- [1] Prosser JI. Molecular and functional diversity in soil microorganisms. *Plant Soil*, 2002, **244**(1-2): 9-17.
- [2] Grayston SJ, Wang S, Campbell CD, *et al.* Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem*, 1998, **30**(3): 369-378.
- [3] Houlden A, Timms-Wilson TM, Day MJ, *et al.* Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, **65**(2): 193-201.
- [4] Qiu Q, Noll M, Abraham WR, *et al.* Applying stable isotope probing of phospholipid fatty acids and rRNA in a Chinese rice field to study activity and composition of the methanotrophic bacterial communities *in situ*. *ISME J*,

- 2008, **2**(6): 602–614.
- [5] Shrestha M, Abraham WR, Shrestha PM, *et al.* Activity and composition of methanotrophic bacterial communities in planted rice soil studied by flux measurements, analyses of *pmoA* gene and stable isotope probing of phospholipid fatty acids. *Environ Microbiol*, 2008, **10**(2): 400–412.
- [6] Torsvik V, Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol*, 2002, **5**(3): 240–245.
- [7] Da Mota FF, Gomes EA, Marriel IE, *et al.* Bacterial and fungal communities in bulk soil and rhizospheres of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive maize (*Zea mays L.*) lines cultivated in unlimed and limed Cerrado soil. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, **18**(5): 805–814.
- [8] Andreote FD, Carneiro RT, Salles JF, *et al.* Culture-independent assessment of rhizobiales-related *Alphaproteobacteria* and the diversity of *Methylobacterium* in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic eucalyptus. *Microb Ecol*, 2009, **57**(1): 82–93.
- [9] Flores-Mireles AL, Winans SC, Holguin G. Molecular characterization of diazotrophic and denitrifying bacteria associated with mangrove roots. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(22): 7308–7321.
- [10] Hein JW, Wolfe GV, Blee KA. Comparison of rhizosphere bacterial communities in *Arabidopsis thaliana* mutants for systemic acquired resistance. *Microb Ecol*, 2008, **55**(2): 333–343.
- [11] Moeseneder MM, Winter C, Arrieta JM, *et al.* Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) screening of a marine archaeal clone library to determine the different phylotypes. *J Microbiol Methods*, 2001, **44**(2): 159–172.
- [12] Watts JE, Wu Q, Schreier SB, *et al.* Comparative analysis of polychlorinated biphenyl-dechlorinating communities in enrichment cultures using three different molecular screening techniques. *Environ Microbiol*, 2001, **3**(11): 710–719.
- [13] Andreote FD, Mendes R, Dini-Andreote F, *et al.* Transgenic tobacco revealing altered bacterial diversity in the rhizosphere during early plant development. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2008, **93**(4): 415–424.
- [14] Lee MS, Do JO, Park MS, *et al.* Dominance of *Lysobacter* sp. in the rhizosphere of two coastal sand dune plant species, *Calystegia soldanella* and *Elymus mollis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2006, **90**(1): 19–27.
- [15] Hao da C, Ge GB, Yang L. Bacterial diversity of *Taxus* rhizosphere: culture-independent and culture-dependent approaches. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, **284**(2): 204–212.
- [16] Lamarche J, Hamelin RC. No evidence of an impact on the rhizosphere diazotroph community by the expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin by Bt white spruce. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(20): 6577–6583.
- [17] DeLong EF. Microbial population genomics and ecology. *Curr Opin Microbiol*, 2002, **5**(5): 520–524.
- [18] Kutter S, Hartmann A, Schmid M. Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria* spp.. *FEMS Microbiol Ecol*, 2006, **56**(2): 262–271.
- [19] Watt M, Hugenholtz P, White R, *et al.* Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots quantified by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Environ Microbiol*, 2006, **8**(5): 871–884.
- [20] Haichar FE, Marol C, Berge O, *et al.* Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME J*, 2008, **2**(12): 1221–1230.
- [21] Haichar FZ, Achouak W, Christen R, *et al.* Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing. *Environ Microbiol*, 2007, **9**(3): 625–634.
- [22] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemical & Biology*, 1998, **5**(10): 245–249.
- [23] Mirete S, de Figueras CG, González-Pastor JE. Novel nickel resistance genes from the rhizosphere metagenome of plants adapted to acid mine drainage. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(19): 6001–6011.
- [24] Erkel C, Kube M, Reinhardt R, *et al.* Genome of rice cluster I archaea--the key methane producers in the rice rhizosphere. *Science*, 2006, **313**(5785): 370–372.
- [25] Wellington EM, Berry A, Krsek M. Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: exploiting genomics and stable isotope probing. *Curr Opin Microbiol*, 2003, **6**(3): 295–301.
- [26] Yuan ZC, Liu P, Saenkham P, *et al.* Transcriptome profiling and functional analysis of *Agrobacterium tumefaciens* reveals a general conserved response to acidic conditions (pH 5.5) and a complex acid-mediated signaling involved in *Agrobacterium*-plant interactions. *J Bacteriol*, 2008, **190**(2): 494–507.
- [27] Sanguin H, Remenant B, Dechesne A, *et al.* Potential of a 16S rRNA-based taxonomic microarray for analyzing the rhizosphere effects of maize on *Agrobacterium* spp. and bacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(6): 4302–4312.