

# 转基因生防菌 308R( pCPP430 )对番茄根围菌群的影响\*

李艳琴\*\* 史通麟 刘彬彬

( 化学生物学与分子工程教育部重点实验室 山西大学生物技术研究所 太原 030006 )

**摘要** 研究目的在于了解转基因生防菌 308R( pCPP430 )对番茄根围菌群代谢能力和群落结构的影响。实验中使用了两种互为补充的方法,即单一碳源利用测试( SCSU )和 ERIC-PCR,对分别以 308R( pCPP430 )悬液、308R 悬液和无菌水蘸根处理的番茄植株根围菌群进行比较。SCSU 菌落计数的聚类分析表明,308R( pCPP430 )和 308R 处理的根围菌重复之间相似性好,水处理的相似性差。主成分分析也得到了相同的结果。ERIC-PCR 聚类结果表明,10 种碳源,其中 8 种水处理和 308R 处理聚为一类。实验为生防菌与植物的互作提供一些依据,为根围菌群结构研究提供一些新的思路。

**关键词** 转基因生防菌 根围菌 SCSU ERIC-PCR 聚类分析

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0654-05

## Effects of Transgenic Biocontrol Bacterium 308R( pCPP430 ) on Tomato Rhizosphere Bacterial Community\*

LI Yan-Qin\*\* SHI Tong-Lin LIU Bin-Bin

( Key Laboratory Chemical Biology and Molecular Engineering of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006 )

**Abstract** The study aimed at investigation the effect of the transgenic biocontrol bacteria 308R( pCPP430 ) on the tomato rhizosphere bacterial communities. Strain 308R( *Pantoea agglomerans* ), an adnascent bacterium isolated from tomato, was a biocontrol bacterium. The recombinant cosmid pCPP430 contained the *hrp* gene cluster of *Erwinia amylovora* was transformed into 308R Strain. Transgenic biocontrol bacterium 308R( pCPP430 ) produced Harpin protein which induce hypersensitive response and disease resistance in plants and, surprisingly, increase plant growth. Two complementary methods, sole-carbon-source utilization tests( SCSU ) and ERIC-PCR, were used to compare the characterization of bacterial communities from three groups of tomato roots dipped in sterilized water, 308R suspended liquid and 308R( pCPP430 ) suspended liquid. The cluster analysis and principal components analysis of the number of colonies from SCSU indicated consistent differences in the rhizosphere of each group. Cluster analysis of SCSU data showed that there were consistent differences in the rhizosphere of each group. The rhizosphere bacteria communities of root dipped with 308R( pCPP 430 ) and 308R have a relative good replication, but the differences of corresponding replicates in dipped with distilled water was increased by degrees. Cluster analysis of ERIC-PCR fingerprints revealed that most of results( eight in ten ) have overlaps between roots dipped in water and those dipped in 308R liquid. The methods used in this study may prove a useful approach for the comparison of bacterial communities.

**Key words** Transgenic biocontrol bacterial, Rhizosphere bacteria, SCSU, ERIC-PCR, Cluster analysis

根围因为直接受到植物根系的影响,因此拥有截然不同的微环境。同时,根围还是有益、有害微生物及宿主植物间相互作用的环境<sup>[1]</sup>,因此根围菌群在植物健康和生态系统中起着重要的作用。植物本身会有选择地改变土壤中根围菌群的组成和

多样性<sup>[2]</sup>。植物的物种和品种是根围菌群结构产生的主要原因,然而植物根所分泌的化学组分同样也被认为是一个很重要的原因。

现代生物技术的长足进步使得许多转基因生防菌可以应用于生产实践,但是,这些转基因微生物

\* 山西省科技攻关计划项目( No. 2006031047 )

山西省自然科学基金资助项目( No. 20021080 )

\*\* 通讯作者 Tel : 0351-7016679, E-mail : yanqin@sxu.edu.cn

收稿日期 2006-10-24, 修回日期 2007-01-15

物与其它微生物以及植物之间的相互作用并没有得到验证,它们是否会改变根围菌群和生态系统,或者更进一步地说,是否会对人们的生活产生影响? Doyle 等<sup>[3]</sup>曾经指出对于转基因微生物的研究不仅应该包括对转基因微生物的评测,而且还应该包括对其在环境中营养互作的研究。现在,更多的研究致力于开发一种新的、可行的方法来评测植物、转基因微生物和根围菌群的相互作用,以使生物防治机制成为一种可持续农业中的防病害机制。

从番茄植株上分离到的成团泛菌(*Pantoea agglomerans*) 308R,因其对病菌的拮抗、竞争而具有一定的生防作用。将携带梨火疫欧文氏菌(*Erwinia amylovora*) *hrp* 基因簇的质粒 pCPP430 转入 308R 获得多功能生防菌 308R(pCPP430)<sup>[4]</sup>。此工程菌不仅拥有对病菌的拮抗作用,而且可以产生诱导植物过敏反应的 Harpin 蛋白,从而提高植物自身的抗性,更令人惊奇的是它还可以促进植物生长。

单一碳源利用测试(sole-carbon-source utilization tests, SCSU)通过菌群对不同碳源的代谢能力来区别群落间的变化。以往的研究证明 20 种<sup>[5]</sup>甚至 9 种<sup>[6]</sup>碳源便可以确定微生物代谢能力的变化。肠杆菌基因间重复共有序列(ERIC 序列)分布于革兰氏阴性菌基因组的基因间区域<sup>[7]</sup>,许多与植物有关的细菌中亦含有此序列。它们分布在细菌基因组上的不同位点并以不同的距离分隔,存在菌株和种属水平上的差异。因此以 ERIC 序列为引物,进行反向 PCR,使其被分隔的 DNA 序列大量的扩增,以此作为不同细菌的 DNA 标记决定细菌基因型。这种方法也可用于混合菌群落结构的研究。

本研究综合使用了 SCSU 和 ERIC-PCR 方法对分别以 308R(pCPP430)悬液、308R 悬液和无菌水蘸根的番茄根围菌群进行分析。希望以此对转基因生防菌、非转基因生防菌与其它根围菌和宿主植物之间的互作关系作进一步探讨,并为转基因生防菌在实际应用中的安全性问题提供一些依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 蘸根用菌悬液:308R 为本室分离的 *Pantoea agglomerans* 308R(pCPP430)为本室构建的生防工程菌。分别在 LB 液体培养基中 30℃ 过夜培养至

$OD_{600} = 1.0 \sim 1.2$  4000r/min 离心 10 min 收集菌体,重悬于等体积的无菌水中。

1.1.2 植物种子:市售番茄品种“早魁”。

1.1.3 培养基:牛肉膏蛋白胨培养基用以总菌量计数;无碳源培养基(simmons citrate agar)<sup>[8]</sup>用作 SCSU 的空白对照;十种单碳源培养基为无碳源培养基中分别加入淀粉(50 g/L)、蔗糖(50 g/L)、麦芽糖(50 g/L)、果糖(50 g/L)、葡萄糖(50 g/L)、山梨醇(20 g/L)、琥珀酸钠(20 g/L)、草酸钠(20 g/L)、谷氨酰胺(10 g/L)、丝氨酸(10 g/L)。其中淀粉、蔗糖、麦芽糖、琥珀酸钠、草酸钠采用高压灭菌,其余采用过滤除菌。

### 1.2 方法

1.2.1 番茄植株培养:将种子种于装有未灭菌大田土的花盆中置于培养室,培养温度 18℃ ~ 25℃,日光照 16 h。待植株长出 3 片真叶后将其分成 3 组,每组分别以 308R(pCPP430)悬液、308R 悬液和无菌水蘸根,然后将它们分别种在 3 个相同的花盆中,并以如上所述的条件继续培养一个月。每种处理作 3 个重复。

1.2.2 根围菌群的提取与培养:将植株连根挖出,把根部浸入无菌生理盐水中,除去附在根上的土,取出放于无菌滤纸上,吸干溶液。无菌操作将直径小于或等于 1 mm 的侧根剪成约 1 cm 的小段,称取 0.5 g 放于 300 mL 三角瓶中,加入 100 mL 无菌 NaPP(0.1%)溶液和 70 粒玻璃珠 200 r/min 振荡 20 min,以此作为根围菌原液。用 NaPP 溶液进行 10 倍稀释。取 100 μL 稀释样品分别涂布于牛肉膏蛋白胨、无碳源和十种单碳源培养基平板上,28℃ 培养 1 周,计数直径大于或等于 2 mm 的菌落。

1.2.3 微生物 DNA 的提取:用 10 mL 无菌水将平板上的菌落洗入试管中,旋涡混匀。取 1 mL 菌悬液提取 DNA<sup>[9]</sup>,作为 PCR 模板。

1.2.4 ERIC-PCR 引物及扩增条件:引物,ERIC1 5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3' ERIC2 5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'。

扩增体系为 25 μL,包括 10 × 缓冲液 2.5 μL; MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL(25 mmol/L); dNTPs 2 μL(2.5 mmol/L);引物各 1.5 μL(12.5 pmol);Taq 酶 1.5 U 及模板 80 ng。

扩增条件:预变性 95℃ 7 min,降温至 75℃ 加入 Taq 酶,变性 94℃ 10 s,退火 49℃ 8 s,延伸 72℃ 10 min。

51℃ 1min ,延伸 74℃ 10 s、72℃ 5 min ,共进行 35 个循环 ,最后 72 ℃延伸 10 min 4℃保存。

1.2.5 统计分析 :用 SPSS 对菌落计数结果进行聚类分析 (cluster analysis )和主成分分析 ( principal components analysis )。ERIC-PCR 指纹图谱用 Gelwork、SPSS 进行分析 ,得到聚类图 ( dendrogram )。

2 结果与分析

2.1 菌落计数结果

分别取 100 μL 10<sup>-2</sup>和 10<sup>-3</sup>稀释样品涂布牛肉膏蛋白胨培养基平板 ,取 100 μL 10<sup>-1</sup>和 10<sup>-2</sup>稀释样品涂布无碳源和单碳源平板 ,为减小误差 ,每个浓度都涂 3 个平板作为重复 ,于 28℃ 培养 7 d ,记录直径大于或等于 2 mm 的菌落。

从表 1 牛肉膏蛋白胨平板的菌落计数结果看 , 308R ( pCPP430 ) 和 308R 蘸根处理 ,根表微生物稍有增加 ,但增加不多。

表 1 根表微生物平板回收结果( 平均值 ± 标准差 )			
培养基	培养基上的菌落数 ( × 10 <sup>5</sup> cfu/g )		
	无菌水	308R	308R ( pCPP430 )
葡萄糖	3.20 ± 1.11	2.73 ± 0.23	7.17 ± 0.15
果 糖	7.27 ± 0.21	8.67 ± 0.50	2.40 ± 0.10
蔗 糖	6.70 ± 0.50	3.20 ± 0.26	6.63 ± 0.06
淀 粉	5.50 ± 0.46	2.80 ± 0.20	2.97 ± 0.12
麦芽糖	7.20 ± 0.30	5.73 ± 0.68	5.63 ± 0.15
草酸钠	0.97 ± 0.21	3.93 ± 0.21	2.03 ± 0.06
丝氨酸	5.87 ± 0.60	8.87 ± 0.35	2.83 ± 0.12
山梨醇	6.23 ± 0.87	6.17 ± 0.75	4.10 ± 0.10
琥珀酸钠	2.13 ± 0.81	4.87 ± 0.31	9.40 ± 0.20
谷氨酰胺	9.13 ± 0.40	5.50 ± 0.10	9.20 ± 0.20
牛肉膏蛋白胨	78.33 ± 5.69	79.33 ± 3.06	82.67 ± 2.52

2.2 代谢能力的聚类分析及主成分分析

用 SPSS 软件系统对上述 3 组样品的数据进行聚类分析 ,绘制树形图 ( 图 1 )。3 种处理的结果各聚一类 ,其中 308R 处理和水处理的差距相对小些 ; 308R ( pCPP430 ) 和 308R 处理的重复性都很好 ,而水处理的重复性较差。对数据作主成分分析 ,所得结果 ( 图 2 )与聚类分析的结果吻合。

2.3 DNA 提取方法和 ERIC-PCR 的稳定性

因为样品由混合的根围菌群组成 ,所以取完全培养基平板上回收的菌液 ,提取 DNA 进行 ERIC-

PCR ,产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。重复 3 次 ,以此验证 DNA 提取和 ERIC-PCR 的重复性和可靠性。图 3 结果显示 3 次重复得到的图谱一致 ,证明实验中所用的方法是可靠的。

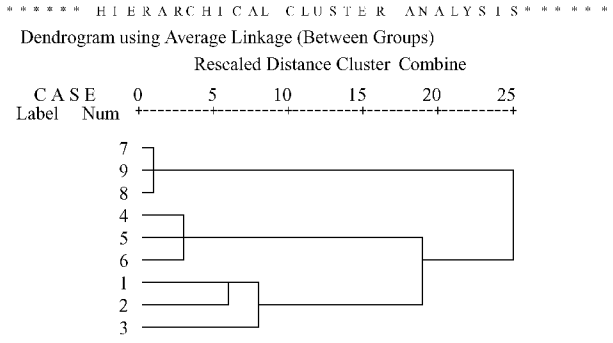


图 1 根围菌群 SCSU 的聚类分析图  
1 ~ 3 水蘸根样品的 3 个重复 ,4 ~ 6 308R 蘸根样品的 3 个重复 ,7 ~ 9 308R ( pCPP430 ) 蘸根样品的 3 个重复

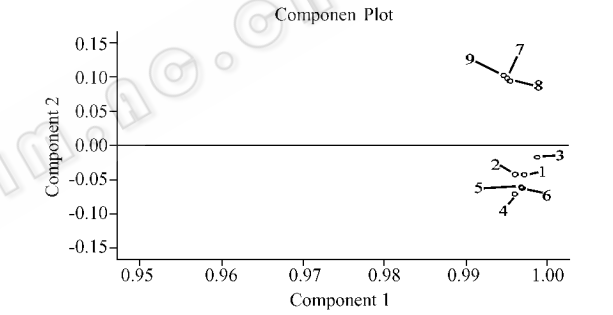


图 2 根围菌群 SCSU 的主成分分析  
1 ~ 3 水蘸根样品的 3 个重复 ,4 ~ 6 308R 蘸根样品的 3 个重复 ,7 ~ 9 308R ( pCPP430 ) 蘸根样品的 3 个重复

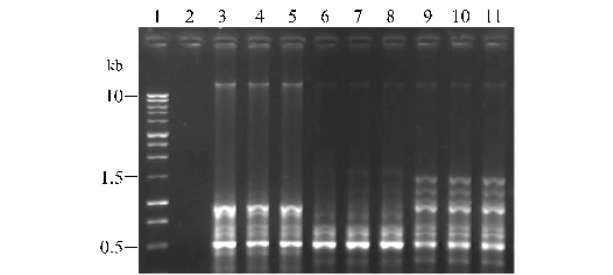


图 3 DNA 重复样品的 PCR 图谱  
1 1kb ladder ,2 PCR 对照 ,3 ~ 5 水蘸根样品 ,6 ~ 8 308R 蘸根样品 ,9 ~ 11 308R ( pCPP430 ) 蘸根样品

2.4 ERIC-PCR 指纹图谱及聚类分析

提取十种单碳源培养基平板上回收的细菌混合液 DNA ,进行 ERIC-PCR ,图谱显示菌群的基因型受到了根围效应和单碳源选择效应的综合影响 ( 图 4 )。

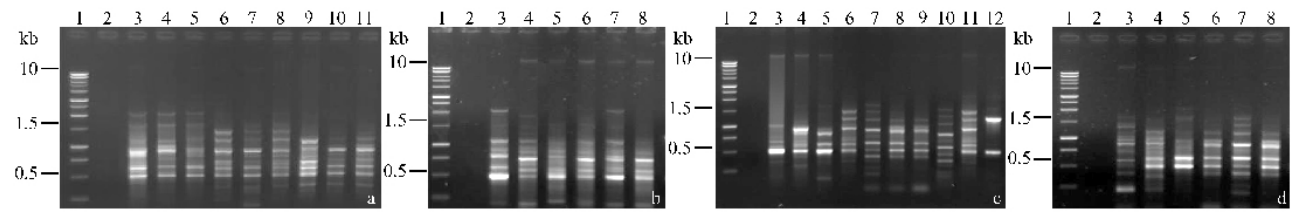


图 4 ERIC-PCR 指纹图谱

谱图中的 1、2 道分别为 1 kb ladder 和阴性对照 , ( a ) 3 ~ 5 葡萄糖 6 ~ 8 山梨醇 9 ~ 11 谷氨酸 ( b ) 3 ~ 5 麦芽糖 6 ~ 8 果糖 ( c ) 3 ~ 5 草酸钠 , 6 ~ 8 琥珀酸钠 9 ~ 11 丝氨酸 ( d ) 3 ~ 5 淀粉 6 ~ 8 蔗糖 , 每一组碳源的第 1 道为 308R 悬液样品 , 第 2 道为 308R ( pCPP430 ) 悬液样品 , 第 3 道为 308R 无菌水样品。

分别对每种单碳源培养基上不同处理的 ERIC-PCR 图谱进行聚类分析 ( 图 5 ) , 结果显示 , 除淀粉、草酸钠外 , 其余八种单碳源培养基上 , 308R

( pCPP430 ) 处理的群落结构与另两种的差异较大 , 308R 和水处理的聚为一类。

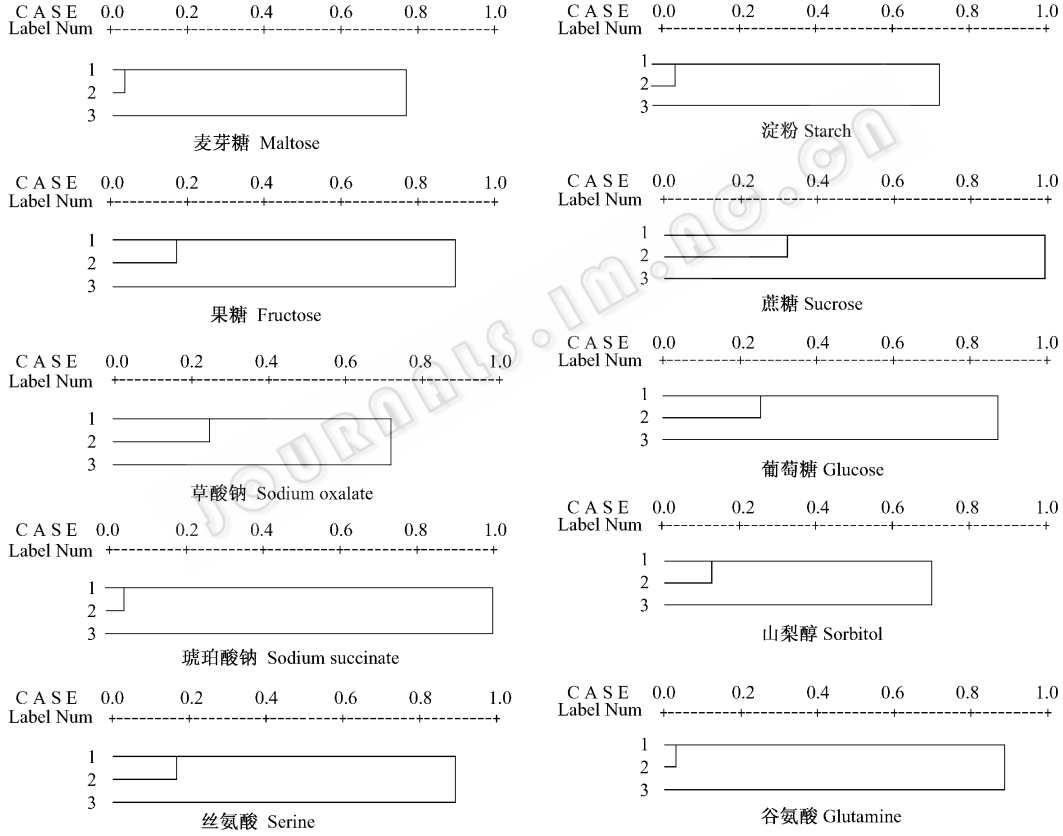


图 5 ERIC-PCR 聚类图

1 水 308R 样品 2 308R ( pCPP 430 ) 308R 样品 3 308R ( pCPP 430 ) 308R 样品

### 3 讨论

本实验利用 SCSU 方法结合聚类分析和主成分分析 , 对不同处理后番茄根围菌群的代谢能力进行评价。308R ( pCPP430 ) 和 308R 菌液 308R 根 , 相当于在根围中施入了数千万的 *P. agglomerans* , 它们与土壤中的微生物、植物经过 1 个月的互动 , 形成一种动

态平衡 , 虽然总菌量未成倍提高 , 但减小了根围菌群重复间的差异。3 种处理聚为 3 类 , 说明 308R 和 308R ( pCPP430 ) 对根围菌均有不同程度的影响 , 但所起的作用是不同的。

对 3 种处理的根围菌 , 每种单碳源培养基上的菌群进行 ERIC-PCR , 依此了解利用相同碳源的菌群结构之间的差别。聚类结果显示 , 308R ( pCPP430 )

蘸根的样品与 308R 的样品在大多数的单碳源培养基上有所不同。这一结果提示 308R (pCPP430) 和 308R 所起的作用不是完全相同的。308R (pCPP430) 和 308R 同样都有对某些病菌的竞争和拮抗作用,这是由于 *P. agglomerans* 本身的特性,但 308R 不具有使植物产生过敏反应、诱导植物提高抗性的能力,308R (pCPP430) 产生并分泌 Harpin 蛋白,刺激植物产生过敏反应,通过信号传导,启动了植物的防卫系统,改变了植物的生理生化反应,从而改变了根部分泌物,引起根围菌群结构的变化。

实验中,只将平板上直径大于或等于 2 mm 的菌落计数。这是因为在没有加入任何碳源的平板上也可以长出很多菌落,但这些菌落都比较小(直径小于 1mm)。这种现象可能是由于无碳源培养基中有微量来自琼脂、空气或根围样品的有机碳源。Garland 和 Mills<sup>[10]</sup>也曾指出根围样品中的有机物会干扰接下来的培养实验。

植物的根围可以认为是一个微小的生态群落,但这种生态群落不能用研究宏观生态群落的方法来研究。研究宏观生态系统时所使用的多度、优势度、种群密度等指标在这种微小的体系中都是不易测定的。本实验所用的 SCSU 方法中,每一种碳源相当于一个指标,对一个特定的菌群,这一指标是特定的,这种指标越多,越能准确体现菌群的特点。本实验将培养的方法与分子生物学的方法结合起来,并且

利用数学的统计方法对结果进行了量化,能够定量地反映细菌群落的差别,在微生物生态学上具有一定的意义。

该方法不足之处在于未对不可培养的菌群进行检测、分析。今后实验可收集根围菌,不经培养,直接提取 DNA,进行 PCR 图谱分析,获得更多信息。

### 参考文献

- [1] Loper J. *Phytopathology*, 1998, **78**: 166 ~ 172.
- [2] Marilley L, Vogt G, Blanc M, *et al.* *Plant Soil*, 1998, **198**: 219 ~ 224.
- [3] Doyle J D, Stotzy G, McClung G, *et al.* In: Neidleman S, Laskin A J ed. *Advances in Applied Microbiology*, vol. 40. San Diego, CA: Academic Press. 1995. pp. 237 ~ 287.
- [4] 赵立平, 申 泉, 李艳琴, 等. *植物病理学报*. 1999, **29**(2): 142 ~ 146.
- [5] Griffiths A J, Lovitt R. *Micro Eco*, 1980, **6**: 35 ~ 43.
- [6] Versalovic J, Schneider M, de Brulin F J, *et al.* *Meth. Mol Cell Biol*, 1994, **5**: 25 ~ 40.
- [7] Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. *Nucleic Acids Research*. 1991, **19**(24): 6823 ~ 6831.
- [8] Gerhardt P, Murray R G E, Costilow R N, *et al.* In: Phillips G B ed. *Manual of methods for general bacteriology*. Washington D C: American Society for Microbiology. 1981. pp. 365 ~ 386.
- [9] 赵立平, 肖 虹, 李艳琴, 等. *应用与环境生物学报*, 1999, **5**: 30 ~ 33.
- [10] Garland J L, Mills A L. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 2351 ~ 2359.