

用 ERIC-PCR 法研究番茄根际细菌群落结构变化*

朱红惠¹ 姚青² 赵立平³

(广东省微生物研究所 广州 510070)¹ (华南农业大学 广州 510642)²

(上海交通大学 上海 200240)³

摘要: 采用单一碳源回收菌群的方法和 ERIC-PCR 方法相结合, 检测番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 根际接种转基因微生物 E4 (*Enterobacteria cloacae*) 后的根际微生物的群落结构和多样性的变化。结果表明: 采用单一碳源回收菌群和 ERIC-PCR 相结合的方法, 可以准确、直观和清楚地检测到 E4 释放到环境中后对根际微生物的群落结构和种群数量的影响。这种单一碳源培养法与 ERIC-PCR 相结合的方法, 将有可能成为一种研究环境微生物群落结构变化的常用方法。

关键词: 根际细菌, 群落结构, 单一碳源回收, ERIC-PCR

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2003) 04-0010-05

FLUCTUATION OF BACTERIA COMMUNITY STRUCTURE IN TOMATO RHIZOSPHERE AS REVEALED BY ERIC-PCR

ZHU Hong-Hui¹ YAO Qing² ZHAO Li-Ping³

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)¹

(South China Agricultural University, Guangzhou 510642)²

(Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240)³

Abstract: With an improved method of sole carbon source utilization patterns of bacteria combined with ERIC-PCR, it was detected the fluctuation of bacterial community structure and diversity in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) rhizosphere, which was influenced by a genetic modified bacterium strain E4 (*Enterobacteria cloacae*). Results indicated that the influence of E4 releasing on the bacterial community structure and population could be accurately and clearly manifested through this combined method. It was suggested that the combined method would become a routine method in the research of environmental microorganism community structure.

Key words: Rhizosphere bacteria, Community structure, Sole carbon source utilization patterns, ERIC-PCR

植物根际是土壤中最活跃的微域环境, 其中的根际微生物则是该微域环境的重要组成部分。对根际微生物群落特征的研究已经成为植物-微生物互作研究领域中的一个重要内容^[1]。早期的研究是以平板培养为主要手段, 从而限制了其结果只能反映那些可培养微生物的群落特征。事实上, 到目前为止可培养的微生物仅占总土壤微生物的 0.3%^[2], 如何揭示其他 99% 以上的微生物群落特征显得尤为迫切。近 20 年来, 现代分子生物学技术在生态学研究中的应用大大推动了微生物生态学的发展, 使得人们能够在传统微生物生态学的基础上, 运用分子生物学技术直接探讨自然界中微生物的群落特征及其与环境的关系。

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30000006)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 30000006)

收稿日期: 2002-09-02, 修回日期: 2002-12-01

以微生物代谢指纹图谱和 DNA 分子指纹图谱来研究植物根际微生物区系的结构和多样性变化是目前较为成功的两个途径。由于不同的菌群对数种碳源的利用模式是特定的,因此利用单一碳源回收菌群,使得每种菌群都能形成特定的代谢指纹图谱,在此基础上对图谱进行统计分析即可得到菌群的群落特征^[3]。在肠道细菌中发现的 ERIC 序列 (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) 是一段长为 126bp 的反向重复序列,定位于基因组内可转录的非编码区域或与转录有关的区域^[4], Versaovic 等人^[5]已证实 ERIC-PCR 能成为细菌鉴别和细菌分类的分子遗传分析上的强有力的工具。ERIC 序列散布在整个基因组中,用 ERIC-PCR 得到的 DNA 条带特征能反映出细菌整个基因组结构的差异,用 ERIC-PCR 技术能清晰地区别包含有 ERIC 这些重复序列的不同的细菌种和不同的菌株,因此具有很强的鉴别种乃至菌株的能力^[6-8]。因此作为一种分子检测手段,ERIC-PCR 能较好地反映微生物种群结构和组分的不同。近年来,人们将微生物代谢指纹图谱和 DNA 分子指纹图谱相结合,用 ERIC-PCR 分析在 BIOLOG GN 微平板上生长的细菌群落的指纹图,也得到了清晰可辨的图谱^[3]。用这种方法对两种转基因的苜蓿根围细菌群落进行研究,结果表明转基因苜蓿的根际细菌群落组成发生了变化,同时也说明 ERIC-PCR 与 BIOLOG GN 微平板相结合可以有效地比较根际细菌的群落结构^[9]。

本研究利用单一碳源回收菌群的方法和 ERIC-PCR 方法相结合,探讨转基因微生物施用到番茄根际后对植物根际微生物的群落结构和多样性的影响,为转基因微生物的环境生态学研究及其安全性评价建立一套有效的研究方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

以番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 品种“红宝石”为供试植物 (华南农业大学提供); 供试菌株 E4 是以阴沟肠杆菌 (*Enterobacteria cloacae*) 为出发菌, 导入编码产过敏素的 *hpr* 基因构建而成^[10] (由山西大学生物工程室构建); 土壤为多年的菜园土。

1.2 植物培养与试验设计

将土壤充分混匀后装入一次性纸杯, 每杯装土 300g。番茄种子催芽后播种, 生长至 2 片真叶后定苗, 每杯留苗 20 株, 并向土壤施用 E4 菌悬液 (含菌量为 10^9 cfu/mL) 或清水 (对照处理) 15mL, 每处理重复 3 次, 处理 3d 后进行采样测定。

1.3 采样与测定

1.3.1 采样: 用剪刀纸杯剪开, 仔细取出根系, 在装有 0.85% 生理盐水的无菌烧杯中轻轻洗去根面上的松散泥土, 用无菌吸水纸吸去根面水分, 选取直径约 1mm 的侧根剪成约 0.5cm ~ 1.0cm 的根段, 称取 0.5g 根段放入装有 100mL 灭菌的 0.1% 焦磷酸钠的 300mL 三角瓶中, 加入 70 粒玻璃珠后 200r/min 振荡 1h, 过滤后将滤液稀释至 10^1 、 10^2 、 10^3 即为根际微生物提取液。将上述不同浓度的提取液分别涂在完全培养基平板、8 种单一碳源培养基平板和无碳源培养基平板上, 27℃ 下培养 2d (个别需要 5d) 后进行菌落计数。

1.3.2 培养基的配制: 完全培养基为牛肉膏蛋白胨培养基; 无碳源培养基为西蒙氏柠檬酸盐琼脂培养基; 在西蒙氏柠檬酸盐琼脂培养基中分别加入淀粉 (50g/L)、蔗糖 (50g/L)、麦芽糖 (50g/L)、果糖 (50g/L)、葡萄糖 (50g/L)、山梨醇 (20g/L)、草酸钠

(20g/L)、谷氨酰胺(10g/L) 8种碳源,形成8种单一碳源培养基,其中淀粉、蔗糖、麦芽糖、草酸钠经过高压灭菌,其余碳源经过过滤灭菌后加入培养基中。

1.3.3 基因组 DNA 的提取:采用上海华舜生物工程有限公司的细菌 DNA (小量) 抽提试剂盒(货号:W6511)。

1.3.4 ERIC-PCR:ERIC-PCR 的扩增引物为 ERIC1R (3' -CACCTAGGGGTCCTCGAATGTA-5') 和 ERIC2 (5' -AAGTAAGTGACTGCGGTGACUG-3')。反应体系 (25 μ L) 为 2 μ L dNTP (2.5mmol/L)、2.5 μ L 10 \times Buffer、1.5 μ L MgCl₂ (25mmol/L)、1.5 μ L ERIC1R (12.5pmol/L)、1.5 μ L ERIC2 (12.5pmol/L)、80ng 模板 DNA 和 0.3 μ L Taq 酶 (5u/ μ L); 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 7min 后,进行 35 次 PCR 循环 (94 $^{\circ}$ C 变性 1min、52 $^{\circ}$ C 退火 1min、65 $^{\circ}$ C 延伸 8min),最后 65 $^{\circ}$ C 延伸 16min。

2 结果与分析

2.1 番茄根际细菌种群数量的变化

单一碳源培养基回收根际细菌的结果表明(表1),在以麦芽糖为碳源的平板上,没有回收到菌群;以草酸钠作为碳源的菌群数量较少,菌落需 5d 才能长出,而在其他碳源的培养基上 2d 则可以长出菌落。

从表1数据可以看出,施用 E4 菌后,番茄根际的微生物数量大大增加,增加量达 1~19 倍。其中,在以谷氨酰胺为单一碳源的培养基的回收菌群中,施用 E4 的根际微生物数量比清水对照增加近 1 倍,而在以果糖为单一碳源的培养基的回收菌群中,施用 E4 的根际微生物数量比清水对照增加近 20 倍。在自然条件下(清水处理),以淀粉为单一碳源的培养基上回收得到的菌群数量最多,为完全培养基的 62.7%;以草酸钠为单一碳源的培养基上回收得到的菌群数量最少,仅为完全培养基的 10.3%。在 E4 处理的条件下,以果糖为单一碳源的培养基上回收得到的菌群数量最多,为完全培养基的 87.3%;以谷氨酰胺为单一碳源的培养基上回收得到的菌群数量最少,仅为完全培养基的 17.3%。这表明,在 E4 的影响下,番茄根际的细菌群落结构和种群数量都发生了变化。

表 1 不同碳源培养基回收的根际细菌数量

处理	完全培养基	葡萄糖	果糖	蔗糖	麦芽糖	淀粉	草酸钠	山梨醇	谷氨酰胺
种群数量 ($\times 10^6$ cfu/g)									
清水	84.8*	20.5*	15.5*	20.8*	0	53.2*	8.7*	46.0*	32.3
E4	310.5	142.1	271.0	222.0	0	133.2	70.3	211.3	53.7
单一碳源培养基回收菌群占完全培养基回收菌群的百分比 (%)									
清水	—	24.2	18.3	24.5	0	62.7	10.3	54.2	38.1
E4	—	45.8	87.3	71.5	0	42.9	22.6	68.1	17.3

注: * 表示清水处理与 E4 处理之间的差异达到显著水平。

2.2 番茄根际细菌的 ERIC-PCR 分析

从 ERIC-PCR 图谱的条带变化可以看出(图1、图2、图3),加入工程菌 E4 后,每种碳源上回收的菌群的 ERIC-PCR 图谱与清水对照的图谱完全不同,表现在带型和主带的大小存在明显差异。ERIC-PCR 的图谱上显示,凡是施用 E4 菌后,在 7 种单一碳源培养基上回收菌群的代谢指纹图谱都有两个明显的主带,分别位于约 1.8kb 和 1.2kb 处,与纯菌 E4 的 ERIC-PCR 图谱的主带一致;而在清水处理中,共有的主带位于约 8kb 处。

回收菌群的 ERIC-PCR 图谱带型不仅在清水与 E4 处理间有差异, 而且在各个培养基间也有差异。这些结果说明施用 E4 后, 根际微生物的群落结构和种群数量发生了变化, 优势菌群也发生了改变。可见, ERIC-PCR 图谱可以清楚地揭示出 E4 的环境释放对根际微生物的群落结构和种群数量的影响。

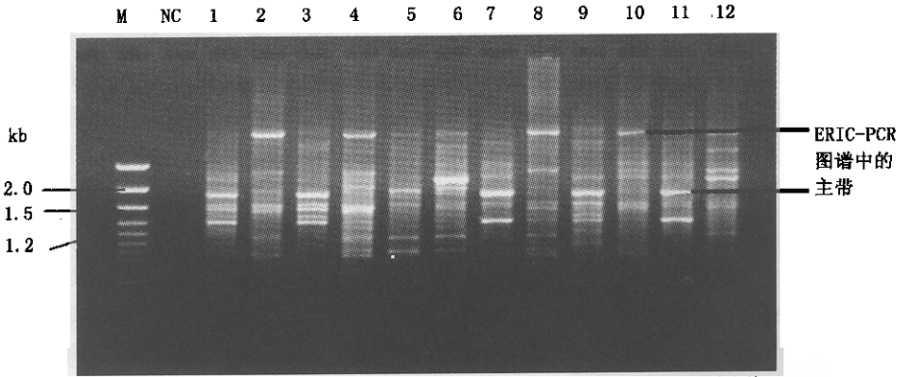


图1 番茄根际单一碳源培养基上回收菌群的 ERIC-PCR 图谱
1, 2 牛肉膏培养基, 3, 4 无碳源培养基, 5, 6 谷氨酰胺培养基,
7, 8 果糖培养基, 9, 10 葡萄糖培养基, 11, 12 蔗糖培养基
(单数为接 E4 菌处理, 双数为清水处理)

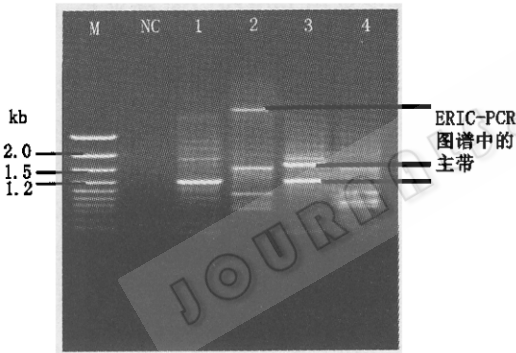


图2 番茄根际单一碳源培养基上回收菌群的 ERIC-PCR 图谱

1 山梨醇培养基 (E4), 2 山梨醇培养基 (清水),
3 淀粉培养基 (E4), 4 淀粉培养基 (清水)

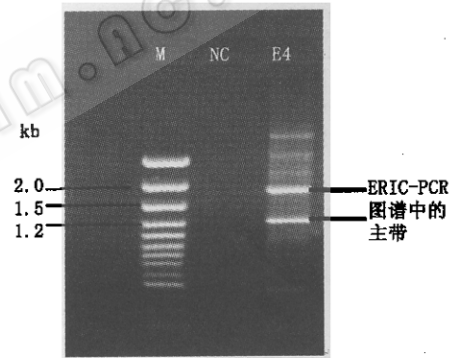


图3 纯的 E4 菌株的 ERIC-PCR 图谱

3 讨论

根据本试验结果, 从番茄根际回收的微生物在麦芽糖培养基上没有生长, 有可能是能利用该碳源的细菌数量太少, 达不到试验的检测水平 (少于1,000 个/mL); 也有可能是在番茄根际的微生物中没有能够利用麦芽糖的菌群; 采用单一碳源回收菌群和 ERIC-PCR 相结合的方法, 能准确、直观和清楚地检测到 E4 释放到环境中后, 对根部的微生物区系种群数量和群落结构的影响 (表1, 图1, 图2)。

在研究转基因微生物对根际微生物区系影响时, 传统的研究方法是以纯培养技术为基础的, 所以人们对微生物生态系统的认识程度取决于分离和培养微生物的能力^[11]。

分子生物学及其技术的飞速发展开辟了生态学研究的新途径。1996年,在美国微生物学会举办的讨论会上,首次提出了分子微生物生态学这个概念^[13]。微生物分子生态学采用的分子生物学技术有:PCR扩增技术,RAPD-PCR、ARDRA核酸杂交技术以及基于16S rRNA或23S rRNA同源性分析的TGGE、DGGE技术等等。这些方法已用于研究人肠道的微生态、活性污泥以及根际土壤微生态等,取得了不错的研究进展^[14~17]。

本试验是在单一碳源培养基上回收菌群,然后用ERIC-PCR的方法进一步的研究分析。这种以纯培养技术为基础,利用分子生态学技术研究植物环境微生物种类组成以及数量动态,只能是对菌群中可培养的一部分微生物进行分析,而对于那些不可培养的微生物则无法分析到它们。根据Amann等^[2]研究结果,采用培养技术对微生物种群多样性进行研究,只能鉴定出土壤中微生物总量的0.3%、海水中微生物总量的0.001%。虽然如此,Giovanni等^[9]认为,在研究转基因植物对环境微生物的影响时,研究微生物群落的一部分也可能得到有价值的信息,因为群落中的一部分也可能会反应一些整体的特性。例如,如果知道某一地区存在某些物种,就可以在某种程度上据此来推断该地区的整体生态特征。本实验所用的单一碳源培养的方法中,每一种碳源相当于一个指标,表征一个特定的菌群。这一指标是特定的,当特定指标越多时,就越能准确体现菌群的生态特点。因此,利用单一碳源培养微生物的方法能够描述复杂的微生物群落特征,本试验结果也证实了这一点(表1)。如果增加单一碳源的种类,则对微生物群落特征的描述更为细致、深入,正如诸多采用BIOLOG GN微平板(95种碳源)的研究结果^[3,12]。

本研究所用的单一碳源培养法与ERIC-PCR相结合的方法,将培养的方法与分子生物学的方法结合起来,可以清楚地反映不同处理后根际微生物群落的差别,这在微生物生态学上具有一定的应用意义,该方法将有可能成为研究环境微生物群落变化的常用方法。

参 考 文 献

- [1] Borneman J, Skroch P W, O'Sullivan K M, *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62 (6): 1935-1943.
- [2] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Microbiol Review, 1995, 59: 143-169.
- [3] Giovanni G D D, Watrud L S, Seidler R J, *et al.* Current Microbiology, 1999a, 38: 217-223.
- [4] Hulton C S J, Higgins C F, Sharp P M. Molecular Microbiology, 1991, 5 (4): 825-834.
- [5] Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. Nucleic Acids Research, 1991, 19 (24): 6823-6831.
- [6] 赵立平, 肖红. 应用与环境生物学报, 1999, 5: 30-33.
- [7] Rong-Fu W, Wei-Wen C, Cerniglia C E. Applied Environmental Microbiology, 1996, 62 (4): 1242-1250.
- [8] McCartney A L, Wenzhi W, Tanock G W. Applied Environmental Microbiology, 1996, 62: 4608-4615.
- [9] Giovanni G D D, Watrud L S, Seidler R J, *et al.* Microbial Ecology, 1999, 37: 129-139.
- [10] 朱红惠, 李艳琴, 邱晓颖, 等. 农业生物技术学报, 2001, 9 (1): 89-91.
- [11] Amann R L, Stromley J, Devereux R, *et al.* Applied Environmental Microbiology, 1992, 58: 614-623.
- [12] Bosaio D A, Scow K M. Applied Environmental Microbiology, 1995, 61: 4043-4050.
- [13] Abdelghani, Sghiret. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66 (5): 2262-2266.
- [14] Kowalchuk G A. Molecular Ecology, 2002, 11 (3): 571-581.
- [15] Cheng P Y. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67 (5): 222-229.
- [16] Hensan-Gomez S. FEMS Microbiology Letters, 2000, 193 (1): 45-50.
- [17] Satokari R M. Systematic and Applied Microbiology, 2001, 24 (2): 227-231.