

研究报告

转 HrpN 的工程菌 E4 对水稻根际细菌群落结构的影响*

朱红惠¹ 姚青² 赵立平³(广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 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与 ERIC-PCR 方法相结合, 检测水稻 (*Oryza sativa* L.) 根际施用转基因微生物 E4 (*Enterobacter cloacae* E4) 后, 其根际微生物的群落结构和多样性的变化, 进而推测转基因微生物 E4 在田间施用的安全性。结果表明: 转基因微生物 E4 施用到水稻根际后, 水稻根际的代谢指纹图谱和 DNA 指纹图谱都发生了改变, 采用 southern blotting 检测显示: E4 成为根际的优势菌, 这对植物生长有利, 应该不会造成不利的影响。

关键词: HrpN, 根际细菌, 群落结构

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 06-0001-05

Influence of HrpN-transformed *Enterobacter cloacae* Strain E4 on Bacterial Community Structure in Rhizosphere of Rice Plant*

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: Single carbon source recovery of bacteria and ERIC-PCR techniques were employed in this experiment, to detect the fluctuations of microbial community and diversity in rhizosphere of rice plant after application of transformed *Enterobacter cloacae* strain E4 into plant rhizosphere, and to evaluate the safety of releasing strain E4 into fields. Results demonstrated that metabolic fingerprint and DNA fingerprint of microbial community in rhizosphere changed after application of strain E4. Southern blotting profile revealed that E4 turned to be the dominant microbial species in rhizosphere, which is assumed to be beneficial to plant growth without any adverse effect.

Key words: HrpN, Bacteria in rhizosphere, Community structure

随着现代生物技术向农业学科的渗透和发展, 与植物病虫害防治和生物固氮有关的基因工程技术成为热点。构建具有良好性能的转基因工程菌, 将其应用到生产中, 可以取得意想不到的效果^[1-3]。但是大量转基因微生物引入到环境中, 可能会对人类健康和生态环境产生潜在的危害, 比如影响到根部菌群的多样性, 打破植物根际微生物区系固有的平衡, 这些潜在的危险甚至超过了目前人们所了解的程度^[4,5]。因此转基因微生物在环境释放前必须对其安全性进行评价^[6,7]。为此人们建立了许多方法^[8-12], 作者曾采用单一碳源回收菌群的方法和 ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR) 方法, 准确、直观和清楚地检测到转基因微生物释放到环境中后, 对番茄

* 广东省科技攻关项目 (No.2003C20511)

收稿日期: 2004-01-18, 修回日期: 2004-03-22

根际微生物的群落结构和种群数量的影响^[13]。

本论文采用单一碳源回收菌群与 ERIC-PCR 方法相结合,追踪转 *hnpN* 的工程菌 E4 施用到水稻根际后,对水稻根际微生物区系的结构和多样性的影响,并为 E4 的田间应用安全性评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

以水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种“华航一号”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*) E26 (pMC73A) 为出发菌,导入编码产过敏素的 *hnpN* 基因构建而成,由山西大学生物工程室构建并提供;供试菌株 E26 (pMC73A),由广东省微生物研究所提供;土壤为多年的水稻田土。

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 300 g。水稻种子催芽后播种,生长 15 d 后定苗,每杯留苗 20 株,分别向土壤施用 E4、E26 (pMC73A) 菌悬液(含菌量为 1×10^8 cfu/mL) 15 mL,每处理重复 3 次,处理 7 d 后进行采样测定。

1.3 采样与测定

1.3.1 采样:用剪刀将纸杯剪开,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 1 mm 的侧根剪成约 0.5 cm ~ 1.0 cm 的根段,称取 0.5 g 根段放入装有 100 mL 灭菌的 0.1% 焦磷酸钠的 300 mL 三角瓶中,加入 70 粒玻璃珠后 200 r/min 振荡 1 h,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、7 种单一碳源培养基平板和无碳源培养基平板上,置 27℃ 下培养 2 d (个别需要 5 d) 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 (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)、草酸钠 (20 g/L) 7 种碳源,形成 7 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,其余碳源经过滤灭菌后加入培养基中。

1.3.3 基因组 DNA 的提取与纯化:参照文献 [14] 方法进行。用 DyNA Quant 200 仪对所提 DNA 溶液进行浓度测定,用作 PCR 的模板。

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

1.4 Southern 杂交检测

以 E4 的 ERIC-PCR 产物标记探针,与水稻根际单一碳源上回收菌群的 ERIC-PCR 产物进行 Southern blotting,验证 E4 菌的存在(用 DIG-DNA 标记与检测试剂盒)。

2 结果与分析

2.1 水稻根际菌落计数结果

单一碳源培养基回收根际细菌的结果表明 (表 1), 从番茄根际回收的微生物中没有能够利用麦芽糖的菌群; 以果糖作为碳源的菌群数量较少, 菌落需 4 d 才能长出, 而在其他碳源的培养基上 2 d 则可以长出菌落。施用 E4 菌和 E26 (pMC73A) 菌的两种处理中, 植物根际的微生物数量有差异。7 种碳源平板上, 在 E26 (pMC73A) 处理条件下, 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 42.9%; 以果糖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 1.4%。在 E4 处理的条件下, 以山梨醇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 23.1%; 以果糖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 0.2%。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种群数量

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
种群数量 ($\times 10^6$ cfu/g)								
E26 (pMC73A)	79.25*	13.95*	1.11*	12.69*	0	34.00*	3.32*	21.35*
E4	60.60	11.55	0.12	11.55	0	13.85	7.17	14.00
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 (%)								
E26 (pMC73A)	—	17.60	1.40	16.01	0	42.90	4.19	26.94
E4	—	19.06	0.20	19.06	0	22.86	11.83	23.10

注: * 表示 E26/pMC73A 与 E4 处理之间的差异达到显著水平

2.2 水稻根际 ERIC-PCR 结果

ERIC-PCR 图谱显示, 加入 E4 菌后, 回收菌群的图谱与 E26 (pMC73A) 不同 (图 1、2), 带型和主带的大小存在明显差异, 条带数目和主带的位置也有变化。施用 E4 菌后, 7 种单一碳源培养基上回收菌群的代谢指纹图谱都有 3 个明显的主带, 分别位于约 1.8 kb、1.2 kb 和 0.5 kb 处; 而在 E26 (pMC73A) 处理中, 主带不明显。回收菌群的 ERIC-PCR 图谱带型不仅在 E26 (pMC73A) 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 菌后, 根际微生物的群落结构发生了变化, 优势菌群也有改变。从理论上讲, 工程菌 E4 和 E26 (pMC73A) 的受体菌都是野生型的固氮菌 *Enterobacter cloacae* E26, 将它们释放环境中后, 单一碳源上回收菌群的 ERIC-PCR 图谱主带应该基本一致, 但实际结果存在较大差异, 这是因为 E4 菌中携带的 pCPP430 质粒在起作用, 它分泌的 Harpin 蛋白诱导植物产生系统性获得抗性 (SAR), 使根际微生物区系发生变化。这种变化由我们需要的功能基因引起, 从理论上讲是有益的, 不会对植物和环境产生不良影响。

2.3 以 E4 为探针的杂交

以 E4 为探讨的杂交结果见图 3, 图 4。

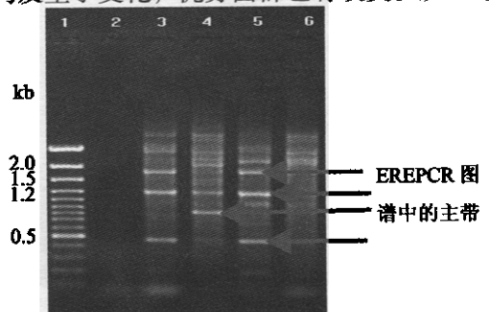


图 1 水稻根际回收菌群的 ERIC-PCR 图谱
1 100 bp ladder, 2 NC (阴性对照), 3、4 山梨醇培养基, 5、6 淀粉培养基单数为接 E4 菌处理, 双数 E26 (pMC73A) 处理

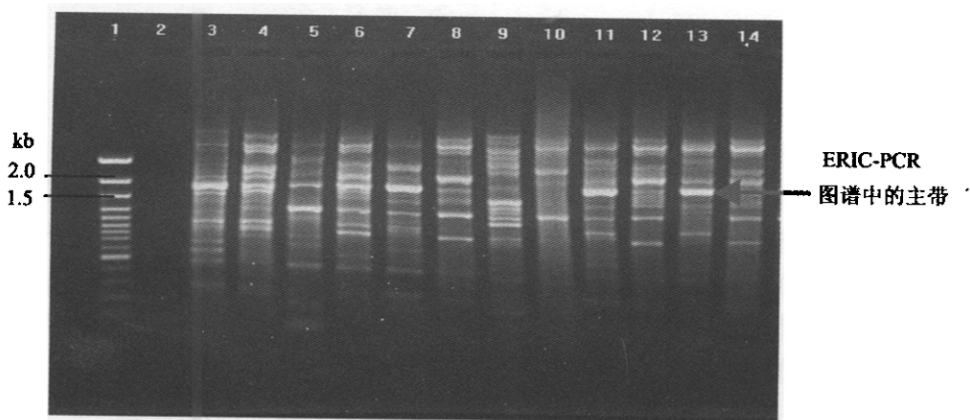


图2 水稻根际回收菌群的 ERIC-PCR 图谱

1 Marker, 2 NC, 3、4 牛肉膏培养基, 5、6 无碳源培养基, 7、8 草酸钠培养基, 9、10 果糖培养基, 11、12 葡萄糖培养基, 13、14 蔗糖培养基单数为接 E4 菌处理, 双数 E26 (pMC73A) 处理



图3 以 E4 的 ERIC-PCR 产物做探针的 Southern Blotting 分子杂交图谱

1 Marker, 2 NC, 3、4 牛肉膏培养基, 5、6 无碳源培养基, 7、8 草酸钠培养基, 9、10 果糖培养基, 11、12 葡萄糖培养基, 13、14 蔗糖培养基, 15 工程菌 E4 单数为接 E4 菌处理, 双数为 E26 (pMC73A) 处理, → 表示 E4 的特征性带

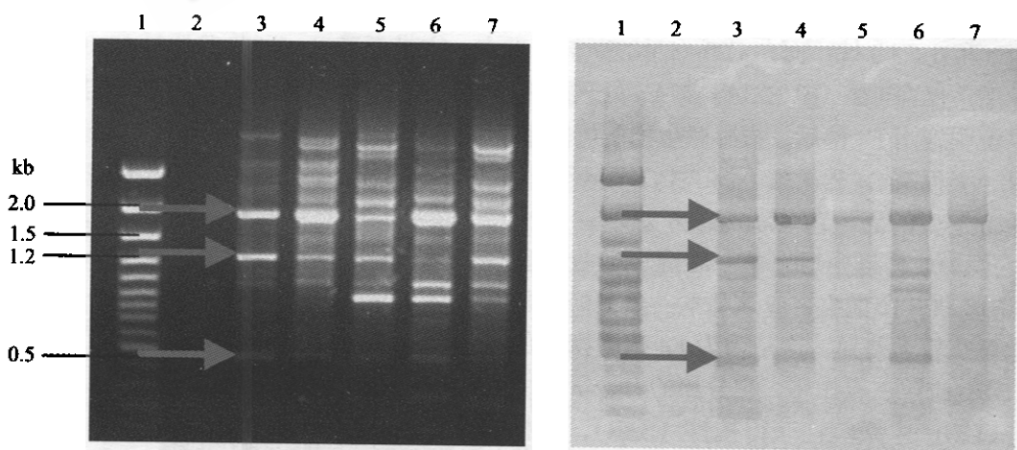


图4 以 E4 的 ERIC-PCR 产物做探针的 southern slotting 分子杂交图谱

1 Marker, 2 NC, 3 工程菌 E4, 4、5 山梨醇培养基, 6、7 淀粉培养基, 双数表示加 E4 菌, 单数表示加 E26 (pMC73A), → 表示 E4 的特征性带

从杂交结果看出 (图 3、4), E4 处理后在单一碳源上回收的菌群的 ERIC-PCR 上的主带都是 E4 的特征带 (1.8 kb、1.2 kb、500 bp 处显示杂交信号), 而 E26 (pMC73A)

处理, 只在 1.8 kb 处有杂交信号, 其他的主带没有杂交信号, 这说明多携带一个质粒的工程菌 E4 对水稻根际微生物的种群结构有影响, E4 施用到根际后, 它能存活并占据主导地位, 能诱导植物产生抗病性, 这对植物是有益的, 不会对环境产生危害。另外, 杂交结果还显示, 在水稻根际, E4 不能利用果糖。

3 讨论

试验结果中, 从水稻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); 也有可能是在水稻根际的微生物中没有能够利用麦芽糖的菌群。

实验结果表明, 产过敏素的固氮工程菌 E4 释放到环境中后, 对根部的微生物区系种群数量和种群结构有影响; 施用 E4 后, 水稻根际的微生物代谢指纹图谱发生了变化, 对碳源的利用有了改变。以 E4 的 ERIC-PCR 产物为探针的 southern 杂交结果还显示: E4 施用到土壤环境中后, 从单一碳源培养基上回收的菌群中, E4 菌成为优势菌。推测原因可能是 E4 刺激植物产生抗病性, 改变植物根系的分泌物, 使原来根际微生物优势种群变为弱势种群, 而 E4 本身却成为优势菌。这种变化对植物是有益的, 对植株的健康不会造成危害。Southern blotting 检测结果还显示, E4 不能利用果糖, 这就解释了为什么以果糖为碳源的培养基上回收的菌群最少的原因。

参考文献

- [1] 朱红惠, 李艳琴, 邱晓颖, 等. 农业生物技术学报, 2001, 9 (1): 89~91.
- [2] 陈三凤, 李季伦, 姚腾云, 等. 土壤肥料, 2002, 1: 37~40.
- [3] 李菊艳, 周彦武, 聂术忱. 现代农业, 2002, 8: 21.
- [4] 何新华. 北方园艺, 1994, 3.
- [5] Giovanni G D Di, Watrud L S, Seidler R J, et al. Microb Ecol, 1999, 37: 129~139.
- [6] 张尚通, 徐崇任. 应用生态学报, 1994, 5 (3): 325~330.
- [7] Perkins D D, Davis K H. Appl Environ Microbiol, 66 (12): 5107~5109.
- [8] Welsh J, McClelland M. Nucleic Acids Res, 1990, 18 (24): 7213~7218.
- [9] Hulton C S J, Higgins C F, Sharp P M. Molecular Microbiology, 1991, 5 (4) 825~834.
- [10] Eija H T, Eija S, Mirja M, et al. Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (1): 223~229.
- [11] Kurt H, Lieven Z Z, Jan V H, et al. Appl Environ Microbiol, 2002, 68 (5): 2172~2178.
- [12] Marco V, Valerie M, Ralf Z. Appl Environ Microbiol, 2003, 69 (7): 4296~4301.
- [13] 朱红惠, 姚青, 赵立平. 微生物学通报, 2003, 30 (4): 10~14.
- [14] 奥斯伯, 金斯顿, 赛德曼, 等. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1998. 35.