

水稻植物内生链霉菌中线型和环型质粒的检测

田新莉¹ 周敏¹ 周世宁² 覃重军^{1*}

(1. 中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所 上海 200032)

(2. 中山大学生命科学院 广州 510275)

摘要: 以广东番禺和五山地区水稻植株中分离到的内生链霉菌为对象, 调查可能存在的内源质粒。利用脉冲电泳技术从 8 个菌株中检测到大小在 60 kb~410 kb 的线型质粒, 其中 4 个菌株的线型质粒可能有保守的端粒复制基因。该结果与土壤链霉菌中检测到线型质粒和具有保守端粒复制基因的比例相似, 表明水稻植物组织内部的独特环境不会造成链霉菌线型质粒的多样性分布产生大的变化。此外, 从 13 个菌株中检测到 6 kb~60 kb 的环型质粒。

关键词: 水稻内生链霉菌, 线型质粒, 环型质粒

Detection of Linear and Circular Plasmids Among Endophytic *Streptomyces* Strains from Rice Plant

TIAN Xin-Li¹ ZHOU Min¹ ZHOU Shi-Ning² QIN Zhong-Jun^{1*}

(1. Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

(2. Institutes of Biological Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275)

Abstract: Linear and circular plasmids were investigated among the 44 strains of the rice plant endophytic *Streptomyces*. By pulsed-field gel electrophoresis, 60 kb~410 kb linear plasmids were detected from the 8 strains and four of which might contain the conserved telomere replication gene *tap*, resembling that of soil *Streptomyces* strains, indicating that the diversity of *Streptomyces* linear plasmids was not affected by the unique environment of the rice plant. By alkaline method, 6 kb~60 kb circular plasmids were detected on gel from the 13 strains.

Keywords: Endophytic *Streptomyces*, Linear plasmid, Circular plasmid

放线菌类群属于高 G+C 含量的革兰氏阳性细菌, 迄今发表约 145 个属和 2000 个种, 其中链霉菌属的种多达 500 个^[1]。在过去 60 多年里, 主要从土壤分离的放线菌中发现了约 8700 种抗生素和生理活性物质。受递减规律的制约, 人们从土壤中越来越

难以发现新的抗生素药物, 因此, 渐渐将研究转向独特生态环境中的放线菌, 如植物内生、极端环境和海洋等来源的放线菌^[2]。国内外有关植物内生放线菌的研究不多, 主要在分类学、生态学、生理学及酶学方面进行了初步的研究^[3]。在遗传学方面,

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30325003, No. 30770045); 国家'863 计划'(No. 2007AA021503); 中科院项目(No. KSCX2-YW-G-014)资助

* 通讯作者: Tel/Fax: 021-54924171; E-mail: qin@sibs.ac.cn

收稿日期: 2008-04-01; 接受日期: 2008-06-11

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

在植物内生链霉菌中报道了一个 13 kb 的环型质粒^[4]，对植物内生放线菌中线型质粒的研究尚未见报道。

与多数细菌不同，在放线菌中发现了许多大小在 12 kb~1700 kb 的线型结构的质粒^[5]，进一步研究表明放线菌线型质粒具有新颖的 DNA 复制机制^[6,7]。这里，我们报道从广东省番禺、五山地区水稻上分离的 44 株不同类群的内生链霉菌中，调查其中是否含有天然的内源性线型质粒和环型质粒。

1 材料和方法

1.1 菌株和特性

从广东省番禺、五山的水稻植株中分离和鉴定了 300 多株内生放线菌^[8]，选取其中属于链霉菌中不同类群的 44 个菌株，包括金色类群、白孢类群、球孢类群、烬灰类群、灰褐类群等。这些链霉菌菌株，有的具有抗水稻植物病原真菌和强的果胶酶活性^[8]。

1.2 放线菌培养基及培养条件

固体培养基为高氏一号(g/L)：可溶性淀粉 20，KNO₃ 1，K₂HPO₄ 0.5，MgSO₄ 0.5，NaCl 0.5，FeSO₄ 0.01，琼脂 20，pH 调至 7.0。

液体培养基为胰酪豆汤(g/L)：Oxoid 公司的胰酪豆汤粉 30，pH 调至 7.0，培养温度为 30℃。

1.3 放线菌线型质粒和环型质粒的检测，端粒基因保守性检测

线型质粒的检测利用 Kieser 等^[9]的脉冲电泳方法，将胶块放入 1%脉冲电泳琼脂糖胶的样品槽中，对于大的质粒脉冲时间 50 s~90 s，电压 6 V/cm，总时间为 22 h，对于小的质粒用 1 s~25 s 的脉冲时间进行电泳。脉冲电泳仪器为 Bio-Rad 公司 CHEF DRIII 型。环型质粒的抽提和纯化根据 Kieser 等^[9]

的碱变性方法。利用保守的链霉菌端粒蛋白 Tap 的保守序列设计的一对核苷酸引物是 5'-GCGGCCTGGTCTGGACGTG-3'，5'-AGGTCGGACATCGTGCGAG-3'，预期 PCR 扩增片段的大小为 1.1 kb^[10]。

2 结果

土壤中分离到的链霉菌菌株中常常存在内源的线型和环型质粒^[10]。为了检测 44 株水稻内生链霉菌中是否存在内源质粒，将液体培养的菌体包埋在琼脂糖凝胶中，处理后进行脉冲电泳。结果表明，在一些水稻内生链霉菌中可以检测到线型质粒和线型染色体(图 1)，总计在 44 株菌中有 8 株(约 18%)被检测到线型质粒(表 1)。利用保守的链霉菌端粒蛋白 Tap

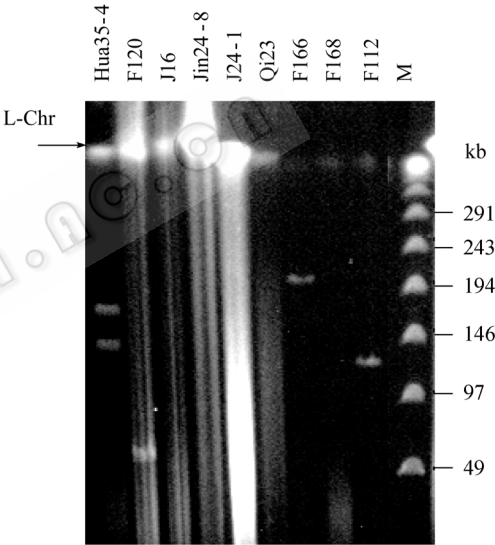


图 1 水稻内生链霉菌中线型质粒的检测
Fig. 1 Detection of the endogenous linear plasmids of the rice plant endophytic *Streptomyces*
M：DNA Marker；L-Chr：线型染色体
M: DNA Marker; L-Chr: Linear chromosome

表 1 水稻内生链霉菌的性质和内源线型质粒及其端粒基因				
Table 1 The endogenous linear plasmids and their telomere gene and the characterization of the rice plant endophytic <i>Streptomyces</i>				
菌株 Strain	类群 Group	抗菌和其他生物活性 Antibacterial and other bioactivity	线型质粒 Linear plasmid (kb)	端粒基因 <i>tap</i> Telomere gene <i>tap</i>
F120	金色类群	抗水稻纹枯病菌、稻瘟病菌	60	—
Hua35-4	白孢类群	抗稻瘟病菌、纹枯病菌，具有果胶酶活性	140, 170	—
F166	球孢类群	抗水稻纹枯病菌、恶苗病菌	210	+
J16	烬灰类群	抗稻瘟病菌、茄丝核病菌	210	+
F112	灰褐类群	未测定	130	—
Qi15W	灰褐类群	未测定	400	—
Hua35-2	灰褐类群	未测定	410	+
Hua35-10	球孢类群	抗稻瘟病菌、纹枯病菌	410	+

的保守序列设计核苷酸引物进行 PCR, 发现部分水稻内生链霉菌中可以检测预期大小的 DNA 扩增带(图片未列出), 暗示这些链霉菌中存在保守的端粒复制基因。利用碱变性方法提取环型质粒 DNA 进行普通凝胶电泳, 发现 13 个菌株(约 30%)存在环型质粒(表 2)。

表 2 水稻内生链霉菌的内源环型质粒 Table 2 The endogenous circle plasmids of the rice plant endophytic <i>Streptomyces</i>			
菌株 Strain	类群 Group	抗菌和其它生物活性 Antibacterial and other bioactivity	环型质粒 Circle plasmid (kb)
J24-4	金色类群	产生果胶酶	40
Gen5	白孢类群	产生果胶酶	30
F168	球孢类群	产生果胶酶	60
J29	赭灰类群	未知	35
Jin53	灰褐类群	抗稻瘟病菌、纹枯病菌	6
Gen3	灰褐类群	未知	40
F156	灰褐类群	抗稻瘟病菌、纹枯病菌	50
Jin48	灰褐类群	未知	9
J-3	灰褐类群	未知	8
J-5	球孢类群	抗稻瘟病菌、纹枯病菌	12
Jin24-8	金色类群	抗金黄色葡萄球菌	8
F9	球孢类群	未知	9
F150	金色类群	未知	8

3 讨论

本试验从 44 株水稻内生链霉菌中检测到线型质粒的比例(18%)与土壤链霉菌中检测到线型质粒的比例(17%)^[10]差别不大, 具有保守端粒复制基因的比例(50%)与土壤链霉菌线型质粒的比例(53%)^[10]相似, 表明水稻植物组织内部的独特环境不会造成链霉菌线型质粒的多样性分布产生大的变化。这些

水稻植物内生的链霉菌线型和环型质粒上是否携带抗生素生物合成基因簇有待进一步研究。本文首次报道在水稻内生链霉菌中检测到线型质粒和环型质粒, 对于开发水稻内生链霉菌资源具有意义。

参 考 文 献

[1] Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, *et al.* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

[2] 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术. 北京: 科学出版社, 2004, pp.213-215.

[3] 曹理想, 周世宁. 植物内生放线菌研究. 微生物学通报, 2004, **31**(4): 93-96.

[4] Coombs JT, Franco CM, Loria R. Complete sequencing and analysis of pEN2701, a novel 13-kb plasmid from an endophytic *Streptomyces* sp.. *Plasmid*, 2003, **49**(1): 86-92.

[5] Chen CW. Complications and implications of linear bacterial chromosomes. *Trends Genet*, 1996, **12**(5): 192-196.

[6] Chang PC, Cohen SN. Bidirectional replication from an internal origin in a linear *Streptomyces* plasmid. *Science*, 1994, **265**(5174): 952-954.

[7] Qin Z, Cohen SN. Replication at the telomeres of the *Streptomyces* linear plasmid pSLA2. *Mol Microbiol*, 1998, **28**(5): 893-903.

[8] 田新莉, 曹理想, 周世宁. 水稻内生放线菌类群及其对宿主病原菌的抗性研究. 微生物学报, 2004, **44**(5):641-646.

[9] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, *et al.* Practical *Streptomyces* genetics. 2nd ed. Norwich: Crowes, 2000, p.177.

[10] Zhang R, Yang Y, Fang P, *et al.* Diversity of telomere palindromic sequences and replication genes among *Streptomyces* linear plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(9): 5728-5733.