

广谱拮抗菌 B96-II 的分子鉴定及 GFP 标记

郝变青,马利平,乔雄梧

(山西省农业科学院 山西省农药重点实验室,山西 太原 030031)

摘要:用 PCR 方法扩增的广谱拮抗菌 B96-II 的 16S rDNA 经序列测定和 BLAST 同源序列比较,结合传统的形态观察、生理生化特征鉴定,确定了 B96-II 分类地位为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。将含有绿色荧光蛋白基因和氯霉素抗性基因标记的大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭表达载体(pNW33N-gfp-B96-II-N)通过原生质体法转化 B96-II,获得表达 GFP 的 4 株标记菌株,在荧光显微镜下发出明亮的绿色荧光。室内平板抑菌试验结果表明,GFP 标记对 B96-II 的广谱抑菌活性没有影响。

关键词:广谱拮抗菌;分子鉴定;绿色荧光蛋白;原生质体转化

中图分类号:S432.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)05-0188-04

Identification of Broad-spectrum Antagonistic Strain B96-II and GFP Tagging

HAO Bian-qing, MA Li-ping, QIAO Xiong-wu

(Shanxi Key Laboratory of Pesticide Science, Shanxi Academy of Agriculture Sciences, Taiyuan 030031, China)

Abstract: 16S rDNA of broad-spectrum antagonistic strain B96-II was amplified by PCR and sequenced. Using BLAST software, comparison results showed B96-II was possibly identified as *Bacillus subtilis* combining its morphological, physiological and biochemical characteristics. In order to construct *Escherichia coli*-*Bacillus* shuttle vector containing gfp and B96-II self promoter, digested fragments of total DNA of B96-II that was digested by *Sau3A* I were ligated to pNW33N-gfp that was digested by *Bam*H I, and the product was transformed into *E. coli* DH5 competent cells. Protoplast transformation method was used to gain tagged strain by gfp and GFP was well expressed in tagged B96-II under fluorescence microscope. B96-II-gfp remained strong antifungal activities against 12 kinds of plant pathogenic fungi as B96-II. The results provided fundamental possibility for the further study on the ecological behavior of broad-spectrum antagonistic bacterium B96-II.

Key words: Broad-spectrum antagonistic strain; 16S rDNA; GFP; Protoplast transformation

蔬菜土传病害是由生活在菜田土壤中的病原体如真菌、细菌、线虫和病毒在条件适宜时从蔬菜根部或茎部侵害而引起的病害,且为害程度会随着蔬菜连作年限的增加而逐年加重,造成严重减产甚至绝产,经济损失重大^[1]。在防治方面,化学防治和抗病品种目前只对少数土传病害有效,对大多数病害防效甚微,且使用化学农药还会造成农药残留、环境污染,降低蔬菜产量和品质^[2]。同时化学农药的长期使用,使得病原菌对其产生抗药性,因而导致防效下降甚至失败。而芽孢杆菌生物防治以生态学为基础控制有害生物,克服了化学防治的弊端,避免了化学

农药使用带来的一系列植保、环境和能源方面的问题,避免了农药残留对人畜的危害,并可促进农业的可持续发展。研究和实践已证明该方法对部分土传病害经济有效,因而成为防治土传病害研究的热点,越来越受到人们的重视^[3-5]。然而生物均具有一定的生态适应性,引入一定生态系统中的生防菌能否适应其被引入的生态环境,能否在病菌的寄主植物上定殖、增殖以及与相应病原物进行竞争,决定着生物防治的成败,这些都与生防菌的定殖和生物学特性紧密相关。现代标记基因技术的建立与发展,为细菌定殖的微生物学研究提供了有效手段。*LacZ*,

收稿日期:2009-06-08

基金项目:山西省青年基金项目(2007021037);山西省科技攻关项目(2006031033);山西省重点实验室开放基金项目(200603021)

作者简介:郝变青(1975-),女,山西原平人,助理研究员,在读博士,主要从事植物生防研究工作。

通讯作者:乔雄梧(1959-),男,山西浑源人,研究员,主要从事农药残留研究工作。

gus, *xylE* 以及 *lux* 等标记基因已被广泛应用于微生物的环境示踪^[6,7]。其中由于绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 基因标记系统荧光性能稳定、检测方便、灵敏度高且表达不受种属限制等特性,越来越为人们重视,并被成功地用于研究细菌在植物根部的定殖^[8,9]及工程菌向环境的释放^[10]。

B96-II 是山西省农药重点实验室从沤肥浸渍液中分离筛选到的一株广谱高效拮抗菌,对 10 多种蔬菜土传病害具有良好的防病促生作用^[11-14]。为了对 B96-II 进行深入研究,有必要明确其准确的分类地位。用 16S rDNA 序列分析鉴定细菌具有快速、准确等优点,是一种较好的鉴定方法,自 1990 年 Relman 首次报道用 16S rDNA 序列分析鉴定了未知特性的细菌以来,该方法在国际上得到了广泛的应用^[15-17]。本研究即采用 16S rDNA 序列分析,结合传统的形态观察和生理生化特征,确定其分类地位。此外用 GFP 标记具有广谱防病促生功能的芽孢杆菌的研究少有报道,本研究拟构建带有 GFP 标记和氯霉素抗性标记的穿梭表达载体,对 B96-II 进行 GFP 标记,从而为该生防菌的环境跟踪提供可能。

1 材料和方法

1.1 供试材料

广谱拮抗菌 B96-II 为山西省农药重点实验室从沤肥浸渍液中分离筛选得到;大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 及 12 种病原菌为本室保存;载体 pNW33N-gfp 为南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点实验室李顺鹏教授惠赠。

1.2 主要试剂及仪器

LB 培养基;氯霉素 (Cm)、限制性内切酶、碱性磷酸酶和 T4 DNA 连接酶等(购自华美);荧光显微镜 (OLYMPUS BX51);紫外凝胶成像系统 (Bio-Rad Gel Doc 170 - 8170);高速冷冻离心机 (sigma 3K15);电泳仪 (上海六一) 等。基因组 DNA 提取试剂盒为 BioDev-Tech 公司生产,16S rDNA 细菌鉴定试剂盒由 TaKaRa 公司生产,序列由 TaKaRa 公司测定。

1.3 B96-II 的 16S rDNA 扩增

供试菌株于 37 在 LB 平板活化纯化后,按照 BioDev-Tech 基因组 DNA 小量提取试剂盒操作说明提取 B96-II 基因组 DNA,再按 TaKaRa (Dalian, PR China) 16S rDNA 细菌鉴定 PCR 试剂盒操作说明进行 16S rDNA 的扩增。PCR 反应程序为:94 5 min 预变性;94 1 min;52 1 min;72 1.5 min;第二步循环 29 次;72 10 min;4 保存。扩增产物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测后送 TaKaRa 公司进行序

列测定。

1.4 形态学观察及生理生化试验

B96-II 的形态特征及生理生化反应参照文献 [18] 进行鉴定。

1.5 B96-II 基因组 DNA 启动子基因文库的构建

建立 25 μ L 酶连反应体系,将经 *Bam*H 酶切的脱磷探针 pNW33N-gfp 与 B96-II 总基因组 DNA 的 *Sau*3A 酶切消化片段酶连。酶连条件为 15.5 反应 15.5 h。将酶连产物热激转化 *E. coli* DH5 新鲜感受态细胞后,涂布氯霉素 (10 μ g/mL) LB 选择性平板,37 过夜培养后荧光检测发绿光的菌落即为带有启动子片段的阳性克隆。

1.6 B96-II 的 GFP 标记

B96-II 感受态细胞的制备与转化参考文献 [19]。接种新鲜 B96-II 单菌落至 3 mL LB 培养基中,37 下 150 r/min 培养过夜。100 μ L 菌液接种至 10 mL SPI 培养基中,37 下 180 r/min 培养 5 h。取 1 mL 菌液接种至 9 mL SPII 培养基中,37 下 100 r/min 培养 1.5 h。加 100 μ L 100 \times CAYE 于 37 放置 10 min,分装成每管 90 μ L。加入 10 μ L 质粒载体 pNW33N-gfp-B96-II-N,轻轻混匀后先于 37 下 100 r/min 培养 30 min,再于 37 下 180 r/min 培养 1.5 h,取菌液涂布含 10 μ g/mL 氯霉素的 LB 平板,培养 20 h,根据氯霉素抗性平板上长出菌落的形态结合荧光显微镜观察发绿光的菌即可判断为 GFP 标记菌。

1.7 标记菌株与出发菌株抑菌活性的比较

划线接种 B96-II 和 B96-II-gfp 于 PDA 平板两侧,37 培养,48 h 后在平板中央接种病原菌菌饼,以不接拮抗菌的平板为对照,28 培养,共培养 7 d 后测量病原菌的半径,分别计算标记菌株和出发菌株对病原菌的抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照半径} - \text{处理半径}}{\text{对照半径} - \text{菌饼半径}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 B96-II 的菌种鉴定结果

以菌株 B96-II 总 DNA 为模板,进行 16S rDNA 扩增得到约 1.5 kb 的特异性扩增产物。PCR 产物测序结果表明,测序片段长 1 490 bp。此序列已登录 GenBank,登录号 FJ796217。将所得序列在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 网站中使用 Blastn 在 GenBank 中进行同源性搜索,结果表明,与登录号 AB195282.1,AY962473.1 等前 10 株枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的同源性为 99%。显微镜观察 B96-II 菌体为杆状、革兰氏染色为阳性;芽孢椭圆形,中生或

近中生,芽孢囊膨大,结合其部分生理生化特性(表1),将菌株 B96-II 的分类地位确定为枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)。

表 1 B96-II 的生理生化特征

| Tab.1 Phenotypic characteristics of strain B96-II | | | |
|---------------------------------------------------|--------|-----------------------|--------|
| 特征 Characteristics | B96-II | 特征 Characteristics | B96-II |
| 运动性 | + | NaCl 5 % | + |
| 过氧化氢酶 | + | 7 % | + |
| V. P 反应 | + | 10 % | + |
| 生长在 pH5.7 培养基上 | + | 糖利用 葡萄糖 | + |
| 淀粉水解 | + | 阿拉伯糖 | + |
| 苯丙氨酸脱氨酶 | - | 木糖 | + |
| | | 甘露醇 | + |

注: +. 阳性; - . 阴性。
Note: +. Positive; - . Negative.

2.2 启动子文库的构建

采用鸟枪法,利用启动子探针载体 pNW33N-gfp 从 B96-II 总基因组中克隆到系列启动子。在 1 062 个转化子中获得了具有肉眼可见绿色荧光的阳性克隆 21 个,经双酶切质粒载体 pNW33N-gfp-B96-II-N (N = 1 ~ 21),回收片段的大小均约为 720 bp (*GFP* 基因长度),证明已成功构建大肠杆菌—芽孢杆菌穿梭表达载体 pNW33N-gfp-B96-II-N (N = 1 ~ 21)。

表 2 GFP 标记对病原菌抑菌活性的影响

| Tab.2 Effects of GFP tagging on antifungal activities | | | | | |
|-------------------------------------------------------|------------------------------|------------|------------|-------------------|--------|
| 供试菌 Fungi | 菌落半径/ mm Colony semidiameter | | | 抑制率/ % Inhibition | |
| | B96-II-gfp | B96-II | CK | B96-II-gfp | B96-II |
| 黄瓜枯萎菌 | 10.3 ±0.4a | 10.4 ±0.6a | 43.3 ±1.0b | 82.5 | 82.3 |
| 西瓜枯萎菌 | 16.4 ±2.2a | 15.3 ±1.8a | 42.4 ±1.1b | 66.5 | 69.3 |
| 青椒枯萎菌 | 9.0 ±2.9a | 9.4 ±2.1a | 42.3 ±1.1b | 85.6 | 84.6 |
| 一品红枯萎菌 | 16.5 ±1.0a | 16.1 ±0.9a | 42.4 ±0.8b | 65.9 | 66.9 |
| 仙客来枯萎菌 | 16.3 ±0.6a | 16.0 ±0.3a | 42.5 ±0.6b | 66.8 | 67.6 |
| 番茄枯萎菌 | 6.4 ±1.3a | 7.1 ±1.3a | 26.1 ±7.8b | 86.4 | 83.3 |
| 棉花枯萎菌 | 10.6 ±0.6a | 10.9 ±0.9a | 43.0 ±1.3b | 81.6 | 80.9 |
| 芦笋枯萎菌 | 19.4 ±0.5a | 19.6 ±1.0a | 39.9 ±4.3b | 56.0 | 55.5 |
| 芦笋茎枯菌 | 16.4 ±0.4a | 16.1 ±1.2a | 43.6 ±0.8b | 67.5 | 68.2 |
| 青椒疫病菌 | 12.5 ±1.0a | 12.5 ±0.6a | 42.7 ±1.4b | 76.6 | 76.6 |
| 番茄早疫病菌 | 10.0 ±0.6a | 9.6 ±1.2a | 34.3 ±0.8b | 78.4 | 79.7 |
| 番茄晚疫病菌 | 9.4 ±0.7a | 8.9 ±0.8a | 43.0 ±0.9b | 84.6 | 85.9 |

注:表中数字均为 7 次重复的平均值,同行数据后小写字母不同者表示在 0.05 水平时差异显著。
Note:The date are the average of seven replicates. The different letters in the same row show the significant difference at 0.05 level.

3 讨论

16S rDNA 序列分析是根据 16S rDNA 两端的保守序列设计特异的引物,对未知细菌的 DNA 样品进行 PCR 扩增,然后对 PCR 扩增的 DNA 片段进行序列分析,经与 GENBANK 中的已知序列进行同源性比较,确定菌种的分类地位。相对于传统的微生物形态观察、生理生化特征鉴定,16S rDNA 序列分析是在分子水平上对细菌进行分类,具有提供信息稳

2.3 B96-II 的 GFP 标记

通过原生质体转化法,质粒 pNW33N-gfp-B96-II-N (N = 4, 11, 13, 19) 成功转入 B96-II 中,得到表达 GFP 的 4 株标记菌株,在荧光显微镜下发出明亮的绿色荧光(图 1)。

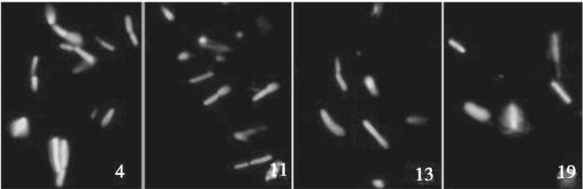


图 1 荧光显微镜下表达 GFP 的 B96-II 标记菌株
Fig.1 The tagged B96-II expressing GFP under fluorescence microscope

2.3 GFP 标记对菌株抑菌活性的影响

室内平板抑菌试验结果表明,标记菌株 B96-II-gfp 对以枯萎菌 (*Fusarium oxysporum* Schl) 为主的 12 种植物病原真菌有较强的抑制作用,与出发菌株 B96-II 抑菌活性无显著差异(表 2),因此可认为此标记没有改变菌株的主要拮抗功能,可代表原始菌株用于环境行为跟踪研究。

定可靠、快速、重复性好等优点,已成为细菌系统分类学研究中最常用的方法^[20],在国际上得到广泛的应用^[15-17]。

本研究用 PCR 扩增的广谱拮抗菌 B96-II 的 16S rDNA 序列经 BLAST 同源序列比较分析,并结合传统的形态观察和生理生化特征鉴定,明确了 B96-II 的分类地位为枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)。尽管国内外对枯草芽孢杆菌防治植物病害的研究已有许多报道^[3-5,21],但大部分枯草芽孢杆菌作用范围窄,只对

少数几种病原菌有抑制作用,而本研究所用枯草芽孢杆菌 B96-II 不仅作用谱广,对 10 多种病原菌都有抑制作用,而且在温室和大田试验中除了具有良好的防病作用外,还具有促生效果,因此是一株非常具有开发应用前景的生防菌^[11-14]。

野生型芽孢杆菌由于存在复杂的遗传修饰系统,遗传转化效率低,甚至不能转化^[22]。本研究室的多次试验证明,利用来源于 *Bacillus cereus* 的 4412 启动子不能够启动 GFP 基因在近缘种短小芽孢杆菌 NY97-1 及芽孢杆菌 B96-II 中的表达^[23]。本研究通过鸟枪法克隆了 B96-II 的自身启动子,成功实现了 GFP 在 B96-II 中的良好表达,表明合适的启动子对于转化成功与否有至关重要的作用。本研究为今后研究广谱拮抗菌 B96-II 在自然环境中的定殖、分布及动态变化研究提供了可能。

参考文献:

- [1] 杨祥田,李伟龙,叶建人,等.设施栽培几种土传病害的发生为害现状及控制途径探讨[J].浙江农业科学,2005(4):313-315,288.
- [2] 李宝聚.我国蔬菜病害研究现状与展望[J].中国蔬菜,2006(1):1-5.
- [3] 孔建,王文夕,赵白鸽,等.枯草芽孢杆菌 B-903 菌株的研究 I.对植物病原菌的抑制作用和防治试验[J].中国生物防治,1999,15(4):157-161.
- [4] 檀根甲,李增智,刘淑芳,等.枯草芽孢杆菌 BS8026 对苹果采后炭疽病的控病效果及作用机制[J].植物保护学报,2008,38(3):227-232.
- [5] 齐东梅,惠明,梁启美,等.枯草芽孢杆菌 H110 对苹果梨采后青霉病和黑斑病的抑制效果[J].应用与环境生物学报,2005,11(2):171-174.
- [6] 陈晓斌,张炳欣,楼兵干,等.运用生色基因标记黄瓜根围促生菌(PGPR)筛选菌株[J].微生物学报,2001,41(3):287-292.
- [7] Xi C W, Lambrecht M, Vanderleyden J, et al. Bi-functional *gfp* and *gus A*-containing mini-Tn5 transposon derivatives for combined gene expression and bacterial localization studies[J]. Microbiol Meth, 1999, 35(1): 85-92.
- [8] Rams H J O, Roncato-Maccari L D B, Souza E M, et al. Monitoring Azospirillum-wheat interactions using the *gfp* and *gus A* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector[J]. Biotechnol, 2002, 97(3): 243-252.
- [9] 张昕,张炳欣,喻景权,等.生防菌 ZY1 及 ZY116 的 GFP 标记极其在黄瓜根围的生态适应性[J].应用生态学报,2005,16(11):2144-2148.
- [10] Scott K P, Mercer D K, Glover L A, et al. The green fluorescent protein as a visible marker for lactic acid bacteria in complex ecosystems[J]. Fems Microbiol Ecol, 1998, 26(3): 219-230.
- [11] 马利平,乔雄梧,高芬,等. B96-II 对 3 种枯萎病的防治效果及拮抗物质初步分析[J]. 华北农学报, 2006, 21(4): 99-102.
- [12] 马利平,郝变青,秦曙,等.芽孢杆菌 B96-II 对芦笋茎枯病的防治及机制研究[J]. 华北农学报, 2008, 23(2): 180-184.
- [13] 郝变青,马利平,乔雄梧,等.拮抗菌对黄瓜枯萎病菌的室内生物活性[J].应用与环境生物学报,2001,7(2):155-157.
- [14] 马利平,郝变青,乔雄梧.山西省芦笋病害现状及无公害生产技术[J].山西农业科学,2009,37(1):69-73.
- [15] Delgado S, Suárez A, Mayo B. Identification of dominant bacteria in feces and colonic mucosa from healthy spanish adults by culturing and by 16S rDNA sequence analysis[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2006, 51(4): 744-751.
- [16] Katano T, Fukui M, Watanabe Y. Identification of cultured and uncultured picocyanobacteria from a mesotrophic fresh water lake based on the partial sequences of 16S rDNA[J]. Limnology, 2001, 2: 213-218.
- [17] 张艾青,刘书亮,敖灵.产广谱细菌素乳酸菌的筛选和鉴定[J].微生物学通报,2007,34(4):753-756.
- [18] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:353-399.
- [19] 诸葛健.现代发酵微生物实验技术[M].北京:化学工业出版社,2005:186-187.
- [20] 周延清,杨清香,张改娜.生物遗传标记与应用[M].北京:化学工业出版社,2008:240.
- [21] 田宏先,崔林,王秀英,等.马铃薯内生促生菌的促生长作用[J].山西农业科学,2003,31(1):28-30.
- [22] 陈中义,张杰,曹景萍,等.杀虫防病基因工程枯草芽孢杆菌的构建[J].生物工程学报,1999,15(2):215-220.
- [23] 张丽珍,马利平,乔雄梧,等.一株多菌灵降解菌 NY97-1 的分子鉴定及 GFP 标记[J].应用与环境生物学报,2006,12(4):555-558.