

GFP标记短小芽孢杆菌LYMC-3在马尾松体内的定殖

李亮亮 谈家金 陈凤毛

南京林业大学林学院/南方现代林业协同创新中心,南京 210037

摘要 为研究松材线虫拮抗细菌短小芽孢杆菌 LYMC-3 的内生性及其在马尾松体内的定殖规律,采用扫描电子显微镜(SEM)观察菌株在马尾松组培苗体内的定殖,并采用高渗透法将质粒 pGFP78 转入菌株 LYMC-3,对其进行绿色荧光蛋白(GFP)标记,同时测定标记菌株的遗传稳定性。在此基础上,以 GFP 标记和抗性标记作为示踪手段,将标记菌株接种到 2 年生马尾松盆栽实生苗的根部,借助激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)和稀释涂板的方法,对马尾松根部、茎部的标记菌株进行定期回收检测。结果显示,通过 SEM 成功观察到菌株 LYMC-3 在马尾松体内的定殖,并成功获得 LYMC-3 菌株荧光表达强烈且遗传稳定的转化子,经过连续 8 次的稀释培养,其遗传稳定性为 96.8%。GFP 标记菌株在接种马尾松根部后的第 4 天,根部、茎部都能回收到大量标记菌株的存在,随后呈持续下降的趋势,且根部的下降速度快于茎部。接种 40 d 后,根部回收标记菌株数量为 0.3×10^2 cfu/g,茎部回收标记菌株数量为 0.8×10^2 cfu/g。以上结果表明短小芽孢杆菌 LYMC-3 具有内生性,能在马尾松体内良好地定殖和传导。

关键词 短小芽孢杆菌; 马尾松; 绿色荧光蛋白; 遗传稳定性; 定殖

中图分类号 S 763 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)06-0068-06

植物内生细菌的概念由克洛珀于 1992 年首次提出,是指能够定殖在健康植物组织器官内、并与可与植物建立和谐统一关系的一类微生物^[1],是林业有益微生物中的重要生防菌资源之一^[2]。松材线虫病(*Bursaphelenchus xylophilus*)又称松树萎蔫病,是世界上极具危害的林业病害之一,国内外尚无有效的防治方法。该病主要分布在美国、加拿大、墨西哥、日本、韩国、中国和葡萄牙等国家^[3]。我国自 1982 年在南京紫金山发现以来,已迅速蔓延至安徽、浙江、山东、广东、湖北、台湾和香港等地,对我国的林业经济、森林生态和自然景观造成了巨大损失和严重破坏^[4-5]。目前,国内外针对松材线虫病的生防研究主要集中在从不同地域或植物体内线虫拮抗微生物的分离筛选方面,对拮抗微生物在寄主体内的定殖动态研究相对较少^[6]。

短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)菌株 LYMC-3 分离自洛阳隋唐植物园马尾松的茎部,前期研究表明,该菌株对松材线虫具有较高的拮抗活

性。生防细菌能否有效发挥促生抗病作用,在很大程度上要取决于其在植物体上的稳定定殖能力^[7-8],可以说定殖是生防成功的关键。基于此,本研究采用扫描电子显微镜观察、绿色荧光蛋白(GFP)基因标记及激光扫描共聚焦显微镜观察相结合的方法研究短小芽孢杆菌菌株 LYMC-3 在马尾松体内的定殖部位和时间动态,为该菌未来的实际应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 菌株与质粒: 菌株 LYMC-3 为笔者从洛阳隋唐植物园马尾松的茎部分离,对松材线虫具有较高的拮抗活性,鉴定为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)。质粒:pGFP78 质粒由中国农业大学亓雪晨^[9]构建,带有组成型表达的 *gfp* 基因以及氨苄青霉素(ampicillin, 100 μg/mL)和四环素(tetracycline, 10 μg/mL)抗性。

收稿日期: 2016-04-08

基金项目: 江苏省高校自然科学研究重大项目(14KJA220002); 江苏省生物学优势学科(PAPD)项目

李亮亮,博士研究生。研究方向:森林病理学。E-mail: 734657680@qq.com

通信作者: 谈家金,博士,教授。研究方向:森林病理学。E-mail: tanjiajin@njfu.edu.cn

2) 植物材料: 将马尾松种子在 70% 的乙醇中浸泡 30 s, 之后浸入 30% 的过氧化氢溶液中 30 min, 无菌水冲洗 6 次, 然后将消毒过的种子置于含有 20 mL 的 1/2MS 培养基的瓶中, 放在组织培养室中 (25 °C) 培养, 培养 4 个月作为细菌内生定殖接种材料; 马尾松 2 年生盆栽生苗。

3) 培养基: 菌株 LYMC-3 的培养及 *gfp* 基因转化用 LB 培养基; 马尾松无菌苗的培养用 1/2MS 培养基。

4) 主要试剂: DNA marker 购自 TaKaRa 公司; 四环素(tetracycline)购自南京金庆祥公司, 工作浓度为 10 μg/mL; 所需引物由金斯瑞公司合成, 引物序列为:

GFP-F: 5'-CCGTCTAGAATGAGTAAAGGAGAAG-3'
GFP-R: 5'-CGCAAGCTTTATTGTATAGTTCAT-3'.

1.2 菌株 LYMC-3 在马尾松体内的扫描电镜(SEM)观察

将菌株 LYMC-3 在 LB 液体培养基中于 28 °C、200 r/min 摆培 24 h, 4 °C 条件下 10 000 r/min 离心 10 min 后, 用 PBS 缓冲液将菌体浓度调整为 10⁵ cfu/mL, 作为接种剂备用。缓慢将 5 mL LYMC-3 接种剂接种到马尾松组培苗根部, 置于组织培养室继续培养。培养 7 d 后, 取出组培苗, 70% 的乙醇冲洗 3 min, 无菌水冲洗 6 次, 用无菌刀片将组培苗的根、茎分别切成 0.5~1.5 cm, 置于 Christ/Alpha1-2 冷冻干燥机中进行干燥。接着将干燥的样品从内部剖开, 粘托后喷金, 用 NeoScope JCM-5000 台式扫描电镜进行观察。

1.3 *gfp* 基因标记法检测 LYMC-3 在马尾松体内的定殖情况

1) 菌株 LYMC-3 的 *gfp* 基因标记。芽孢杆菌的生物学特性比较特殊, 比其他细菌的转化效率低得多。普通制备细菌电转化感受态细胞的方法不适用于芽孢杆菌。试验采用了 Xue 等^[10]建立的利用高渗透法提高芽孢杆菌转化效率的方法(有改进)进行菌株的 *gfp* 标记。

① LYMC-3 感受态细胞的制备。

a) 接种 LYMC-3 于 5 mL LB 培养基中, 过夜培养。

b) 取 2.5 mL 培养菌液接入 40 mL 含 0.5 mol/L 山梨醇的 LB 培养基中, 于 28 °C、200 r/min 条件下培养至 OD₆₀₀ 为 0.9 左右。

c) 将以上摇培菌液冰水浴 10 min, 然后 10 000

r/min、4 °C 离心 5 min, 收集菌体。

d) 用 50 mL 预冷的电转培养基(0.5 mol/L 山梨醇, 0.5 mol/L 甘露醇, 10% 葡萄糖)重悬菌体, 10 000 r/min、4 °C 离心 5 min, 去上清, 如此反复漂洗 3 次。

e) 将漂洗后的菌体重悬于 1 mL 的电转培养基中, 每管 60 μL 分装于 EP 管。

② 带有 *gfp* 基因的质粒向受体菌的转化。

a) 将 50 ng 质粒 DNA(1~8 μL) 加入到 60 μL 感受态细胞中, 冰上孵育 2 min, 加入预冷的电转杯(1 mm)中, BTX ECM630 电穿孔仪电击。电转化参数设置: 2.0 kV、1 mm、电击 1 次。

b) 电击完成后, 立即向电转杯中加入 1 mL 复苏培养基(LB + 0.5 mol/L 山梨醇 + 0.38 mol/L 甘露醇), 于 28 °C、200 r/min 条件下振荡复苏培养 3 h, 取 100 μL 涂布含 10 μg/mL 四环素的 LB 平板。平板置于 28 °C 温箱培养过夜。

③ 转化子的筛选及鉴定。

挑取转化子筛选平板上的单菌落在含 10 μg/mL 的四环素的 LB 液体培养基中于 28 °C、200 r/min 转速摇培 24 h。取摇培菌液涂片固定, 在 Zeiss Axio Imager M2 荧光显微镜下观察转化子的荧光特性, 选择有较高亮度的转化子做进一步鉴定。提取有较高亮度的转化子的质粒, 利用 *gfp* 基因特异引物进行 PCR 扩增, 所得 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分离检测。

④ 转化菌株质粒遗传稳定性测定。

挑取一环 LYMC-3 转化菌株接种在不含抗生素的 LB 液体培养基中, 28 °C, 200 r/min 振荡培养 16~18 h 作为母液。取 50 μL 母液接入 50 mL 不含抗生素的 LB 液体培养基于同样条件下培养 12 h, 接着取以上培养液 50 μL 接种到 50 mL 不含抗生素的 LB 液体培养基里培养 12 h, 如此连续接种培养 8 次, 取培养菌液涂布不含抗生素的 LB 平板, 然后从中随机选取 200 个单菌落转入含 10 μg/mL 四环素的 LB 平板, 以抗性菌株所占百分比计算标记菌株的遗传稳定性。

2) *gfp* 基因标记菌株在马尾松体内的激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)观察。将标记菌株 LYMC-3 在 LB 液体培养基中于 28 °C、200 r/min 摆培 24 h, 4 °C 条件下 10 000 r/min 离心 10 min 后, 用 PBS 缓冲液将菌体浓度调整为 10⁵ cfu/mL, 作为接种剂备用。取 5 mL 接种液接种到马尾松组

培苗根部,置于组织培养室培养30 d取出松苗,用大量无菌水对其进行冲洗;对植株的根、茎进行徒手切片,然后在载玻片上滴1滴无菌水将切片铺展其中,盖上盖玻片,用Zeiss LSM710激光扫描共聚焦显微镜观察,激发波长为481 nm。

3) *gfp*基因标记菌株在马尾松体内的种群消长动态。将荧光标记LYMC-3菌株在LB液体培养基中于28℃、200 r/min摇培24 h,4℃条件下10 000 r/min离心10 min后,用PBS缓冲液将菌体浓度调整为10⁵ cfu/mL,作为接种剂备用。取20 mL接种剂缓慢接种到马尾松2年生的盆栽实生苗根表面。并分别于接种后第4、6、9、12、15、20、25、30、40天取根、茎进行内生细菌的分离。称取上述各处理植株样品0.2 g,经70%乙醇和0.1%升汞表

面消毒后,大量无菌水冲洗3次,样品置于无菌环境干燥后加1 mL无菌水进行充分研磨。静置片刻,吸取一定量上清液做10⁻¹、10⁻²、10⁻³的梯度稀释。然后取100 μL各浓度稀释液涂布于含10 μg/mL四环素的LB平板,各稀释浓度重复3次,28℃培养48 h,计算菌落数,统计其定殖情况。

2 结果与分析

2.1 菌株LYMC-3在马尾松体内的SEM观察

短小芽孢杆菌LYMC-3接种到马尾松组培苗7 d后,对其根、茎进行扫描电镜观察。由图1可知,在马尾松组培苗根表面接种LYMC-3菌株7 d后,菌体细胞在松苗根和茎的内部均有分布,说明该菌株具有内生性,能在马尾松体内良好地定殖



图1 菌株LYMC-3在马尾松组培苗体内的SEM观察结果

Fig.1 Endophytic bacteria inside masson pine plantlet under SEM

和传导。

2.2 *gfp*基因标记法检测菌株LYMC-3在马尾松体内的定殖情况

1) 菌株LYMC-3的*gfp*基因标记。采用高渗透法对菌株LYMC-3进行*gfp*基因标记,通过四环素抗性平板筛选转化子,用蔡司荧光显微镜对转化子的荧光特性进行检测,选择荧光最强的转化子进行进一步研究。由图2可以看出,菌体经481 nm的蓝光激发后,产生的绿色荧光清晰可见。检测结果表明,*gfp*基因在菌株LYMC-3中得到了良好的表达。提取荧光转化子的质粒作为模板,利用*gfp*的特异性引物进行扩增。得到了1条约750 bp的清晰条带(图3),与预期的片段大小一致。以上结果说明*gfp*基因已转入菌株LYMC-3中。

将*gfp*基因标记菌株LYMC-3连续接种培养,检测其遗传稳定性。试验结果表明:标记菌株经过连续8次的稀释培养,其遗传稳定性为96.8%

(图4)。芽孢杆菌在适宜的培养条件下分裂1代大约需要30 min,在自然环境下分裂1代则需要50~100 h^[11],因此,认为构建的工程菌可以用于在马尾松体内的定殖规律研究。

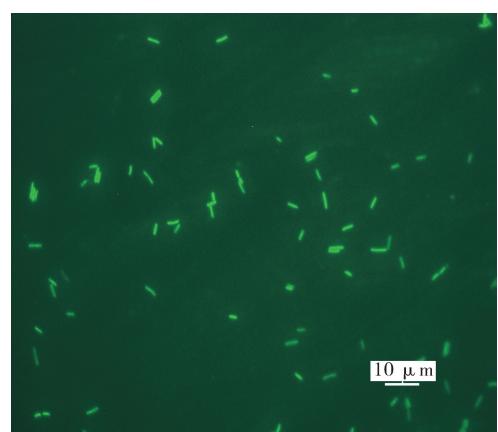
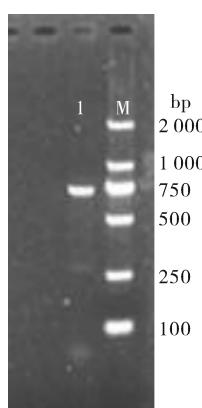


图2 *gfp*基因在菌株LYMC-3体内的表达

Fig.2 Expression of the *gfp* gene in strain LYMC-3



M:DNA 梯加标记 2000 bp DNA ladder plus marker; 1:*gfp* 基因的 PCR 产物 The PCR production of *gfp* gene.

图 3 *gfp* 基因 PCR 扩增

Fig.3 PCR amplification of the *gfp* gene in strain LYMC-3

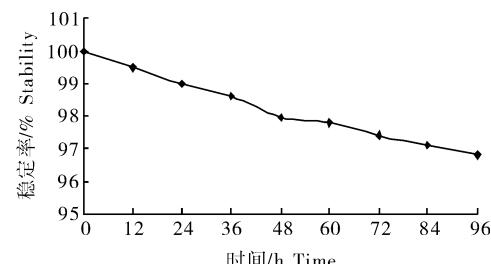


图 4 *gfp* 基因标记菌株 LYMC-3 的质粒稳定性

Fig.4 Stability of engineering strain LYMC-3-*gfp*

2)*gfp* 基因标记菌株在树体内的激光扫描共聚焦显微镜观察。在接种 *gfp* 基因标记菌株 LYMC-3 后的第 30 天分别取马尾松组培苗的根、茎做徒手切片,无菌水冲洗干净后置于激光扫描共聚焦显微镜下观察。由图 5 可以看出, *gfp* 标记菌株在马尾松根和茎的内部均有分布。

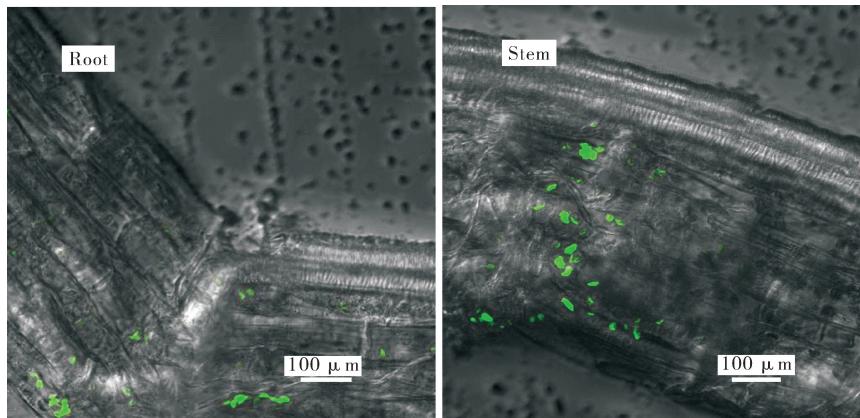


图 5 *gfp* 基因标记菌株 LYMC-3 在马尾松体内的激光扫描共聚焦显微镜观察

Fig.5 Colonization of strain LYMC-3-*gfp* in masson pine seedling under LSCM

3)*gfp* 基因标记菌株在马尾松实生苗内的种群动态。通过根表面对马尾松盆栽实生苗进行接种,回收试验结果表明,菌株 LYMC-3 不仅可以有效地在马尾松体内定殖,并能快速地在宿主体内传导,接种后 4 d 在马尾松的根部和茎部都能检测到标记菌株的存在。

检测期间,菌株 LYMC-3 在根、茎的数量总体呈下降的趋势。接种后 15 d 内根部的细菌数量下降趋势快于茎部,之后下降趋势变缓,最后趋于稳定,定殖量达 1 个数量级。其原因可能是标记菌从马尾松根表面进入根内部后,因其在树体内具有传导性,大部分菌体通过运输系统自地下部分输送到地上部分茎的原因。当标记菌在根、茎内部定殖后,由于其要逐渐适应松苗内部的微环境,故前期菌体

大量死亡,数量迅速下降,经过一段时间的适应,菌体数量不再下降,在树体内部开始生存和繁殖,逐渐达到一个稳定水平(图 6)。总体来看,马尾松茎部

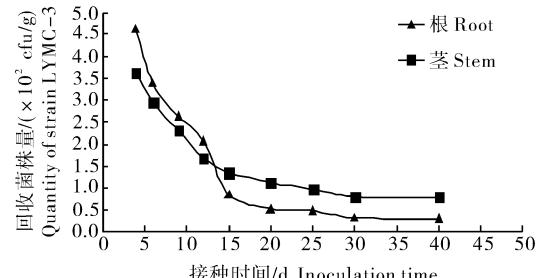


图 6 *gfp* 基因标记菌株 LYMC-3 在马尾松体内的数量消长动态

Fig.6 Population fluctuation of strain LYMC-3-*gfp* in masson pine seedling

的标记菌定殖量高于根部定殖量,可能是茎部环境更适于标记菌的生存和繁殖,这与该菌分离自松树茎部是相对应的。

3 讨 论

众所周知,在实验室筛选的具有良好抑制病害的生防微生物,在野外的效果往往并不理想。这其中很重要的一个原因就是生防菌在复杂的野外环境中不能很好地定殖,从而不能发挥功能,这也是一些微生物菌剂释放到田间生防效应年度间浮动大、重复性差的主要原因。有益微生物定殖能力的强弱决定着其应用效果的好坏。目前研究拮抗微生物在植物体内定殖的方法有很多,如免疫学法、抗生素标记法、特异性寡核苷酸片段标记法、基因标记法等。GFP由于不影响目的基因的结构和功能以及细胞的正常培养繁殖,已成为近些年来广泛应用于微生物定殖研究的一种分子标记方法^[12]。并且 GFP 的表达具有广谱性,目前为止 *gfp* 基因已经在细菌、真菌、植物、鱼类及哺乳动物中进行了表达和应用^[13],还可对标记的活体细胞进行实时定位观察。如任嘉红等^[14]利用 GFP 标记技术成功观测了溶磷草木樨中华根瘤菌 CHW10B 在南方红豆杉根际的数量消长动态。安千里等^[15]使用激光扫描显微镜完整观察到了 GFP 标记菌株 SA2 从水稻根成熟区表面向根内入侵的全过程。

笔者所在实验室前期分离到 1 株对松材线虫具有高拮抗活性的短小芽孢杆菌菌株 LYMC-3,采用卡那霉素标记的方法已经初步证明了其内生定殖性。考虑到抗生素标记本身的缺陷^[16],而且为了更为直观、更精确地揭示菌株 LYMC-3 的内生现象和内生机制,本研究采用绿色荧光蛋白(GFP)基因标记与激光扫描共聚焦显微镜观察相结合的方法验证了 LYMC-3 具有内生性,且可以在马尾松体内传导。此外,试验也研究了菌株 LYMC-3 在马尾松体内的数量动态,接种 40 d 后马尾松体内仍有一定量的标记菌株存在。以上研究结果表明,菌株 LYMC-3 可以有效地定殖于盆栽马尾松体内,但是菌株能否长期在林间马尾松体内有效定殖还需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] KLEOPPER J W, SCHIPPER B, BAKKER P. Proposed elimination of the term endorhizosphere[J]. *Phytopathol*, 1992, 82: 726-727.
- [2] 何红, 邱思鑫, 胡方平, 等. 植物内生细菌生物学作用研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2004, 24(3): 40-45.
- [3] ZHAO B G, FUTAI K, SUTHERLAND J R, et al. *Pine wilt disease*[M]. Tokyo: Springer, 2008.
- [4] 谢立群, 赵博光. 松材线虫病的病理学研究进展[J]. *江西农业大学学报*, 2003, 25(2): 204-208.
- [5] 杨振德, 赵博光, 郭建. 松材线虫行为学研究进展[J]. *南京林业大学学报*, 2003, 27(1): 87-92.
- [6] 杜芳, 何鹏飞, 吴毅歆, 等. GFP 标记内生枯草芽孢杆菌 Y10 及其在白菜体内的定殖[J]. *生态学杂志*, 2015, 34(7): 2064-2070.
- [7] 魏海雷, 王烨, 张力群, 等. 生防菌株 2P24 与 CPF~10 的鉴定及相关性状的初步分析[J]. *植物病理学报*, 2004, 34(1): 80-85.
- [8] LUGTENBERG B J J, DEKKERS L, BLOEMBERG G U. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*[J]. *Annual review of phytopathology*, 2001, 39: 461-490.
- [9] 亓雪晨. 枯草芽孢杆菌启动子片段的克隆及其在绿色荧光蛋白标记中的应用[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- [10] XUE G P, JOHNSON J S, DALRYMPLE B P. High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*[J]. *Journal of microbiological methods*, 1999, 34(3): 183-191.
- [11] LIU Y B, TABASHNIK B E, MOAR W J, et al. Synergism between *Bacillus thuringiensis* spores and toxins against resistant and susceptible diamond back moths (*Plutella xylostella*) [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(4): 1385-1389.
- [12] CORMACK B P, VALDIVIA R H, FALKOW S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP) [J]. *Gene*, 1996, 173: 33-38.
- [13] 李世贵, 吕天晓, 顾金刚, 等. 绿色荧光蛋白在微生物根际定殖研究中的应用[J]. *生物技术通报*, 2009(2): 34-37.
- [14] 任嘉红, 刘辉, 姜楠, 等. GFP 标记溶磷草木樨中华根瘤菌 CHW10B 及其定殖[J]. *林业科学*, 2015, 51(1): 74-79.
- [15] 安千里, 杨学健, 董越梅, 等. 用共聚焦激光扫描显微镜观测 GFP 标记的内生固氮菌 *Klebsiella oxytoca* SA2 侵染水稻根[J]. *植物学报*, 2001, 43(6): 558-564.
- [16] ERRAMPALLI D, LEUNG K, CASSIDY M B, et al. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms[J]. *Journal of microbiological methods*, 1999, 35: 187-199.

Colonization of GFP-tagged *Bacillus pumilus* strain LYMC-3 in masson pine

LI Liangliang TAN Jiajin CHEN Fengmao

College of Forestry, Nanjing Forestry University, Collaborative Innovation Center of Sustainable Forestry in Southern, Nanjing 210037, China

Abstract SEM (scanning electronic microscopy), LSCM (laser scanning confocal microscope) and GFP (green fluorescent protein) techniques were used to study the endogeneity and colonization rules of *Bacillus pumilus* strain LYMC-3, which has high nematicidal activity. The shuttle vector pGFP78 carrying *gfpmut3a* gene, was transformed into *B. pumilus* strain LYMC-3 for fluorescence-tagging by nature transformation and expressed successfully. The plasmid stability was then determined. After inoculating the bacteria in root surface of masson pine, the colonization of LYMC-3 tagged with GFP was studied by combining antibiotics plate recovery and LSCM. GFP-tagged LYMC-3 with bright green fluorescence was observed under 481 nm wavelength and the genetic stability was 96.8% after 8 continuous dilution culture. On 4th day after inoculation in masson pine root, a large number of labeled strains were recovered, followed by a downward trend, and the number decreased faster in the root than in the stem. On 40th day after inoculation, the number of the labeled strain was 0.3×10^2 cfu/g in the root, and 0.8×10^2 cfu/g in the stem. These results demonstrated that the tagged strain could successfully colonize and transmit in masson pine, which provide a scientific basis for the exploitation and utilization of strain LYMC-3.

Keywords *Bacillus pumilus*; masson pine; green fluorescent protein; genetic stability; colonization

(责任编辑:边书京)