



生防细菌 NCD-2 突变体构建及抑菌功能基因的防病作用

孙会刚¹, 蒋继志¹, 李社增^{2*}, 鹿秀云², 马平²

(1. 河北大学,保定 071002; 2. 河北省农林科学院植保所,保定 071000)

摘要:生防细菌 NCD-2 是一株枯草芽孢杆菌菌株,该菌株通过分泌抑菌肽而对棉花黄萎病病原菌和棉花立枯病病原菌起到抑制作用。本研究着重通过原生质体法与诱导转座方法,建立了携带转座子 Tn917 质粒 pTV1 对枯草芽孢杆菌 NCD-2 野生菌株的转化体系与转座子突变技术,获得 1500 多个转座子插入突变子。通过测定这些突变子对大丽轮枝菌的抑制作用,筛选到 2 个抗生素作用丧失的抑菌功能缺失的突变子。室内盆栽试验结果表明这 2 个抑菌功能缺失突变子对棉花立枯病的防效显著低于野生菌株,说明 NCD-2 野生菌株产生的抑菌肽在该菌株防治棉花立枯病中起到主要作用,进而说明编码该抑菌肽的基因在该菌株防治棉花立枯病中具有重要作用。

关键词: 抗生素作用; Tn917; 突变; 转座子标签法; 枯草芽孢杆菌; 大丽轮枝菌

中图分类号: S435.621 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2006)03-0131-04

Generation of Antibiosis-free Mutants of *Bacillus subtilis* NCD-2 with Transposon Tn917 and the Role of Antibiosis of NCD-2 in Controlling Cotton Sore Shin

SUN Hui-gang¹, JIANG Ji-zhi¹, LI She-zeng^{2*}, LU Xiu-yun², MA Ping²

(1. Hebei University, Baoding 071002, China; 2. Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Baoding 071000, China)

Abstract: The bacterial isolate NCD-2, isolated from the rhizosphere of cotton, was an effective *Bacillus subtilis* strain to control cotton *Verticillium* wilt in field. Further it had been proved that this bacterium secreted antipeptides to inhibit the plant pathogens, *Verticillium dahliae* of cotton *Verticillium* wilt and *Rhizoctonia solani* of cotton sore shin. This paper determined the role of the antipeptide in controlling cotton disease. A mutagenesis technique system of *B. subtilis* NCD-2 was generated by transposon Tn917 mutagenesis, and the functional gene encoding the antipeptide was knocked off by the transposon. In this study, *B. subtilis* NCD-2 was transformed with a plasmid pTV1 carrying transposon Tn917 by protoplast methods. Twenty transformed NCD-2 strains were screened resistant against chloromycetin, erythromycin and lincomycin. By the transposon Tn917 mediated insertional mutagenesis technique, the transposon Tn917 successfully inserted the genome of *B. subtilis* NCD-2 and 1500 mutants were screened that were resistant to erythromycin and lincomycin but susceptible to chloromycetin. Among them, 2 antibiosis-free mutants were screened against *V. dahliae*. The results from the experiment on control of cotton sore shin with wild NCD-2 and antibiosis-free mutants in greenhouse showed that antibiosis of NCD-2 played an important role in controlling this disease with *B. subtilis* NCD-2. This suggested that the functional gene of *B. subtilis* NCD-2 encoding the antipeptide against *V. dahliae* had a significant function in

收稿日期: 2006-01-09

作者简介: 孙会刚(1978-),男,硕士研究生,shg1022@sina.com; * 通讯作者, biocont@heinfo.net

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(C2004000735); 河北省农科院重点项目(A03-1-03-09)

control of cotton sore shin disease.

Key words: antibiosis; Tn917; mutagenesis; transposon tag; *Bacillus subtilis*; *Verticillium dahliae*

生防细菌 NCD-2 分离自棉花根围土壤,是一株对棉花黄萎病具有高效防治效果的枯草芽孢杆菌菌株^[1-2]。该菌株的抑菌功能是通过分泌抑菌肽抑制棉花黄萎病病原大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)生长与发育^[3]。

利用转座子 Tn917 通过转座子标签法获得枯草芽孢杆菌的突变子,进而研究功能性基因的方法是一种比较成熟而有效的方法^[4-5]。长度 5257 bp 的转座子 Tn917 位于存在温度敏感型的复制子如 pE194 或 pE194Ts 等载体质粒如 pTV1、pTV1Ts 等上,利用相应的培养条件,载体质粒被导入枯草芽孢杆菌细胞中,进而通过转座诱导插入方法使转座子 Tn917 插入到细菌基因组 DNA 中,获得突变子。对突变子施加适当的选择压,可获得具有相应目标性状的突变子。利用这种方法获得突变子,不仅是获得革兰氏阳性细菌枯草芽孢杆菌突变子的成熟方法,而且也在许多其他革兰氏阳性细菌^[4,6-8]的突变子研究上获得成功。

本文着重通过转座子标签法,将转座子 Tn917 插入生防细菌 NCD-2 的基因组 DNA 中,筛选对 *V. dahliae* 的抑菌功能缺失突变子,并初步研究了抑菌功能基因在防治棉花立枯病中的作用。

1 材料和方法

1.1 菌株

NCD-2: 枯草芽孢杆菌,自棉花根围土壤中分离,由通讯作者所在实验室提供。

PY143: 枯草芽孢杆菌,携带转座子 Tn917 的质粒 pTV1 的宿主菌^[5]。由中国农业大学植病生防实验室惠赠。

1.2 酶及试剂

Pst I、*Eco*R I、*Kpn* I,大连宝生物工程有限公司生产;氯霉素(Cm)、红霉素(Em);Amresco 公司;林可霉素(Lin);华北制药集团制剂有限公司生产。

1.3 培养基

LB,DM3, TY 等培养基

CmLB: 含有氯霉素 5 mg · L⁻¹ 的 LB。

EmLB: 含有红霉素 0.15 mg · L⁻¹ 的 LB。

LCEL: 含有氯霉素 5 mg · L⁻¹, 红霉素 1 mg · L⁻¹、林可霉素 25 mg · L⁻¹ 的 LB。

LEL: 含有红霉素 5 mg · L⁻¹、林可霉素 75 mg · L⁻¹ 的 LB。

1.4 质粒 pTV1 的提取和纯化

质粒的提取和纯化采用 PAL 方法^[9]。

1.5 生防细菌 NCD-2 的转化与转化子筛选

生防细菌 NCD-2 的转化采用原生质体转化方法^[10]。

转化子筛选: 通过 2 种方法比较未经证实转化子中质粒与质粒 pTV1, 结果一致者即为转化子。1) 酶切方法: 应用限制性内切酶对这 2 个底物进行单酶切和双酶切; 2) 分子检测: 应用转座子 Tn917 分子检测方法(方法见 1.7), 以这 2 个底物为模板进行 PCR 扩增, 比较扩增出的序列长度。

1.6 转座子 Tn917 的诱导转座与突变子筛选

诱导转座: 方法参见文献[5], 并做了一些改进: 其中涉及到培养温度为 48℃ 时改为 50℃。

突变子的筛选: 用无菌牙签挑取 LEL 平板上的同一单菌落分别点种于 CmLB 平板和 LEL 平板上, 进行原位生长比较试验。具有 Em、Lin 抗性而缺失 Cm 抗性的菌株即为 Tn917 转座插入 NCD-2 菌株基因组的突变子。

1.7 转座子 Tn917 检测方法

Tn917 上带有红霉素抗性基因序列, 根据该序列设计一对引物 ERM189 (5'-CTGGAA-CATCTGTGGTATGGC-3') 与 ERM624 (5'-GG-TACAGGGCATTTAACGACG-3'), 以不同底物为模板, 进行 PCR 扩增。含有该抗性基因序列的底物可扩增出 436 bp DNA 片段。

1.8 抑菌功能缺失突变体筛选

利用双层培养基法, 测定每个突变子对 *V. dahliae* 生长的抑制作用, 筛选没有抗生作用的突变子, 即为抑菌功能缺失突变子。

1.9 生防抑菌功能基因在防治棉花立枯病中的作用研究

在 LB 培养液中对 NCD-2 野生菌株、转化子、抑菌功能缺失突变子(NCD-2-16 和 NCD-2-20) 进行培养, 30℃, 160 r · min⁻¹, 24 h, 制成 1 亿个 · mL⁻¹ 的菌体悬浮液。用各供试菌株的悬浮液浸泡棉花种子 1 h。并设清水浸泡种子为对照。棉花品种为新棉 33B。然后将棉花种子播种于育

苗盒中,育苗土为棉田自然土壤、蛭石、鸡粪混合物(重量比为 1:1:1),并置于温室中培育。每个处理 3 次重复。棉花立枯病为自然发病。棉花出苗后,调查出苗与病害发生情况。

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌 NCD-2 转座子突变体库的构建

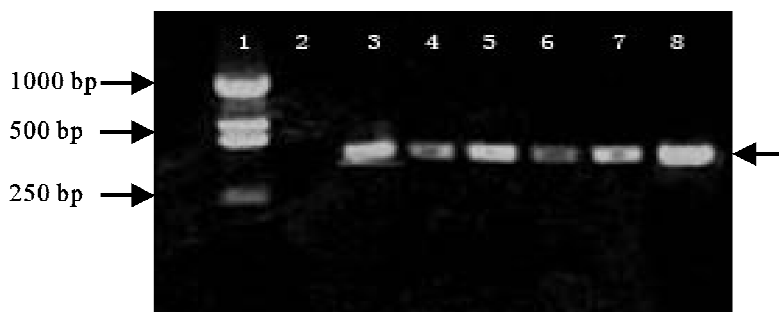
利用原生质体法将质粒 pTV1 对 NCD-2 菌体细胞进行转化,获得了对氯霉素具有抗性的转化细胞 20 个。通过对该细胞的形态观察及应用转座子 Tn917 的检测法进行检测,证明获得的转化细胞是 NCD-2 菌株获得质粒 pTV1 的转化菌株。

转化子经过诱导转座,转座子 Tn917 插入 NCD-2 菌株基因组 DNA 中,转化子在含有不同抗生素的培养基上生长性状发生改变,根据同一

单菌落在含有氯霉素的培养基上不能生长而在含有红霉素和林可霉素的培养基上能够生长的性状,筛选到 1500 个突变子。

2.2 抑菌功能缺失突变株筛选

利用双层培养基法测定突变子对 *V. dahliae* 的抑菌活性,从 1500 个突变子中筛选到 2 株对该病原菌抑菌作用失活的突变子,即抑菌功能缺失突变子 NCD-2-16 与 NCD-2-20。经 Tn917 分子检测证明,可从这两个菌株的基因组 DNA 中扩增出约 430 bp 的 DNA 片段(图 1 中 6~7 道),与以质粒 pTV1 为底物扩增出的片段大小一致(图 1 中 8 道),而从 NCD-2 野生菌株中不能扩增到该片段(图 1 中 2 道)。该结果说明这 2 个突变子是由于 Tn917 插入 NCD-2 基因组序列中而发生的突变。



1: Marker;2: NCD-2 野生菌株;3: *B. subtilis* PY143;4~5: 转化子;6~7: 突变子;8: pTV1。

图 1 转座子 Tn917 分子检测

Fig. 1 Identifying Tn917 in different isolates with PCR

2.3 生防菌株 NCD-2 抑菌功能基因在防治棉花立枯病中的作用

本试验共使用 4 个菌株:抑菌功能缺失突变子 2 个(NCD-2-16 与 NCD-2-20),NCD-2 野生菌株(NCD-2)与转化子各 1 个(NCD-2['])。试验结果表明(表 1):1)4 个菌株的处理与对照(CK)之间的出苗率差异不显著。2)转化子 NCD-2['] 和 NCD-2 野生菌株处理的死苗率差异不显著,防病

效果分别为 84.1%和 76.2%;而 2 个抑菌功能缺失突变子处理的死苗率显著高于 NCD-2 野生菌株,防病效果显著减小,防病效果仅为 33.3%和 44.4%。

该结果说明生防细菌 NCD-2 菌株产生的抑菌肽在该菌株防治棉花立枯病中起到主要作用,同时也说明编码该抑菌肽的基因在生防细菌 NCD-2 菌株防治棉花立枯病中具有重要作用。

表 1 生防细菌 NCD-2 的编码抑菌肽的基因在防治棉花立枯病中的作用

Table 1 Experiment on the role of functional gene encoding antipeptide against

V. dahliae in *B. subtilis* NCD-2 in controlling cotton sore shin with *B. subtilis* NCD-2

处理	抗生素作用	出苗率/%	死苗率/%	防效/%
对照(清水)	无	61.57ab	24.71a	
NCD-2(野生菌株)	有	62.74ab	5.88c	76.2
NCD-2 ['] (转化子)	有	60.00ab	3.92c	84.1
NCD-2-16(抑菌功能缺失突变子)	无	63.50a	16.47b	33.3
NCD-2-20(抑菌功能缺失突变子)	无	56.08b	13.73b	44.4

3 讨论

由于位于枯草芽孢杆菌 PY143 中的质粒 pTV1 拷贝数低,使得质粒的提取和纯化工作难度增大,在本研究中曾对几种不同提取方法进行了比较,最终确定 PAL 方法是最适宜的质粒提取方法。

应用携带该转座子 Tn917 的载体 pTV1 对一些枯草芽孢杆菌菌株进行转化时存在着一定的难度,甚至不能成功转化^[11]。因此,枯草芽孢杆菌 NCD-2 的遗传转化是本研究的关键之一。本文作者在研究质粒 pTV1 对枯草芽孢杆菌 NCD-2 菌株转化时曾采用了四种转化方法,即电击法、原生质体法、氯化钙法和感受态细胞法,只有通过原生质体法获得了成功转化并得到转化子,其他 3 种方法都没有获得成功转化,其原因需进一步研究。

另外,研究发现从转化子中提取的质粒不能被相应限制性内切酶进行酶切,因此提取物是不是质粒 pTV1 不能得到证实。本研究最终通过应用 PCR 技术对位于该质粒上的 Tn917 上的红霉素抗性基因片段进行扩增,证明了提取物为质粒 pTV1。但转化子中质粒 pTV1 为什么不能被相应限制性内切酶进行酶切,需进一步研究。

根据 Youngman 等人的方法诱导 Tn917 转座,关键是要进行连续的高温处理(48~52℃),以确保转座子成功转座,转化子中质粒消失,否则诱导工作不能保证 Tn917 成功插入到细菌基因组中,导致突变子数量过少。本研究结果证明,处理温度在 50℃ 时,能保证转化子中质粒 pTV1 消失,并获得较多的突变子,而温度在 48℃ 时突变子较少。

致谢:本实验曾得到中国农业大学张力群博士的指导,在此表示感谢。

参考文献:

[1] 李社增,马平,刘杏忠,等. 利用拮抗细菌防治棉花

黄萎病 [J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(5), 422-425.

[2] 李社增,鹿秀云,马平,等. 防治棉花黄萎病的生防细菌 NCD-2 的田间效果评价及其鉴定 [J]. 植物病理学报, 2005, 35(5):451-455.

[3] 李社增,鹿秀云,马平,等. 棉花黄萎病生防细菌 NCD-2 抑菌物质提取初步研究 [J]. 棉花学报, 2004, 16(1):62-63.

[4] CAMILLI A, Portnoy A, Youngman P J. Insertional mutagenesis of *Listeria monocytogenes* with a novel Tn917 derivative that allows direct cloning of DNA flanking transposon insertions [J]. J Bacteriol, 1990, 172: 3738-3744.

[5] YOUNGMAN P J, John B. P, Richard L. Genetic transposition and insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis* with *Streptococcus faecalis* transposon Tn917 [J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 1983, 80: 2305-2309.

[6] ISRAELSEN H, Madsen S M, Vrang A, et al. Cloning and partial characterization of regulated promoters from *Lactococcus lactis* Tn917-lacZ integrants with the new promoter probe vector pAK80 [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61:2540-2547.

[7] BABB B L, Collett H J, Reid S J, et al. Isolation and characterization of solvent deficient and metronidazole resistant mutants [J]. FEMS Microbiol Lett, 1993, 114: 343-348.

[8] COSSART P, Vicente M F, Mengaud J, et al. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes* direct evidence obtained by gene complementation [J]. Infect Immun, 1989, 57: 3629-3636.

[9] MARTIN I Voskvil, Glenn H, Glenn H Chambliss. Rapid isolation and sequencing of purified plasmid DNA from *Bacillus subtilis* [J]. Applied and environmental microbiology, 1993, 59:1138-1142.

[10] CHANG S, Stanley N C. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA [J]. Molecular Genetics and Genomics, 1979, 168: 111 - 115.

[11] 张霞. 枯草芽孢杆菌 B931 防治小麦全蚀病及促进植物生长的机理研究[D]. 北京: 中国农业大学, 1999. ●