

发光酶基因标记的荧光假单胞菌 X16L2 在小麦根圈的定殖动态*

王 平 胡正嘉 李阜棣

(华中农业大学农业微生物农业部重点实验室 武汉 430070)

提 要:在土壤微宇宙系统及田间土壤中,采用发光酶基因标记检测技术研究了荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*, 简称 Pf)X16L2 在小麦根圈的定殖动态。研究表明:在不灭菌灰潮土微宇宙中,Pf·X16L2 在小麦播种后 36d 定殖密度可达最高水平(3.2×10^4 cfu·g⁻¹ 根),然后开始下降,最后保持在一个相对稳定的较低水平(约 3.2×10^2 cfu·g⁻¹ 根)。在田间条件下,Pf·X16L2 通过种子表面接种在小麦根圈的定殖动态与微宇宙中的相似,可散布至种子下方 10cm 以内,水平移动距离在植物播种后 125d 不超过 40cm。

关键词: 荧光假单胞菌, 发光酶标记基因, 根圈定殖, 小麦, 分子生态学

中图分类号: Q939.11, S182 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2000)02-0150-54

植物促长根圈细菌(Plant-Growth-Promoting-Rhizobacteria, 简称 PGPR)在国内外的商品化进程之所以受到很大程度的控制,主要在于其应用效果的不稳定性^[1]。其原因主要与不同条件下 PGPR 在植物根圈的定殖能力有关,因为 PGPR 只有首先在植物根部成功定殖才能发挥其作用^[2],但在八十年代中期以前,由于无法将引入菌株与同类土著细菌分开,因而对引入菌株能否在植物根部或土壤中存活、繁殖并发挥作用知之甚少。近年来,随着分子生物学向微生物生态学的渗透,特别是基因标记技术的建立与发展,为我们开展根圈细菌定殖动态的研究提供了有效手段^[3]。在微生物分子生态学的研究中,生物发光酶标记基因是得到了广泛应用^[4]。本研究采用发光酶基因(*luxAB*)标记技术研究了根盒土壤微宇宙(microcosm)系统中及田间条件下 Pf·X16L2 在小麦根圈的定殖情况。

1 材料和方法

1.1 供试菌种

带有发光酶基因(*luxAB*)标记的 Pf·X16L2,抗卡那霉素和链霉素(Km^r, Str^r)。系本实验室从冬小麦根圈分离并标记的^[5]。

1.2 培养基与抗生素

S1 培养基(用于检测假单胞菌及 Pf·X16L2)^[6],KB 培养基(用于 Pf·X16L2 的摇床培养及接种量的检测),1/2 牛肉膏蛋白胨培养基(用于好气性细菌总数的检测)^[7]。

链霉素(Str), 50 μ g/mL;卡那霉素(Km), 100 μ g/mL。

* 国家自然科学基金(39270022)和国际科学基金(C/2362-1)资助

作者简介:王 平(1964-),男,湖南省南县人,华中农业大学微生物学系副教授,博士,现在美国奥本大学和 Ohio 州立大学研修,主要从事菌植互作及微生物生态学研究

收稿日期:1998-12-08, 修回日期:1999-02-02

1.3 供试土壤和麦种

供试土壤参见文献[8];供试小麦品种为 881[#],购自华农种子室。

1.4 接种物的制备及种子丸衣化^[9]

1.5 根盒(rhizobox)的装配与表面消毒

按有效容积=长×宽×内距=20cm×20cm×1.5cm,将2块5mm厚之无色透明有机玻璃板用螺丝固定,其中一块可自由拆卸。将装配好之干净根盒浸入新配制的5%NaClO溶液中15min,取出后倒置,沥干水分,再用无菌水洗涤3次,倒置于超净工作台上(台面上铺2层灭过菌的报纸)吹干,紫外线照射灭菌1h。

1.6 定殖动态研究用根盒——土壤微宇宙的建立

将已调节好水分含量(约20%)未灭菌的灰潮土,按每盒800g分别装入根盒。将经过1%羧甲基纤维素磷酸盐缓冲液(pH7.0)丸衣化接种的麦种(接种量为每粒 8.0×10^6 cfu)按每盒2粒等距离插入土表,种子上再盖一层厚约1cm的土。然后将根盒可拆卸的一面朝下,倾斜45°,盖上顶板避光,置28℃培养室催芽。待麦芽露出土表后,将盛有根盒的木箱移至盆栽场台面上,利用自然光照和温度培养。自小麦出苗后第3d开始按无菌操作规程取样。取样方法:取出根盒,卸下可拆的一面玻璃,从种子下方开始(以避免交叉污染)每2cm根长为一段,用无菌镊子和剪刀将相同部位的根段收集在一个对应编号的无菌培养皿内。抖掉附着在根上的土粒后,计根段数并称重。将称重后的不同部位的根段分别转入盛有20mL无菌的0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和玻璃珠的三角瓶内,涡旋振荡5min,再十倍系列稀释(样品原液稀释度为0次方)。然后,用S1双抗培养基及AMPN法^[10]测定样品中的发光菌落数。样品原液也点接平板。对于只有点接原液长出发光菌落的样品不作定量计数,但视为定性检测结果阳性,即有发光菌定殖。

1.7 田间小区试验

选用华农科研实验场内前茬为棉花的实验地一块,犁翻后平整、开沟,南北向抽行,每行长3m。然后将经过丸衣化的麦种(分接菌和不接菌2种)均匀撒播于行内并盖土,每行播种量为35g,接种量为每粒麦种 8.0×10^6 cfu。接菌行与对照行交叉排列,两两之间均设保护行,行与行之间相距0.2m。每种处理设6个重复。自小麦出苗后第10d开始取样,每行多点取样,每隔10d一次,共取三次,随后,每隔30d取一次。去掉根上的土块后,自种子下方开始,将根系分成2cm或4cm的根段,再以无菌剪刀和镊子自下往上剪取根段。其它处理同1.6节。同时,取小麦各部位根段数条,抖掉附着在根表的土粒,将其置于加有Km和Str的含0.65%琼脂的S1平板上,再倒入一层双抗S1培养基作根段夹层培养。28℃培养2d后,于暗室中观察从根段上长出的发光菌落,并摄影记录。

1.8 统计分析

对于“菌落形成单位(cfu)”测定结果,直接进行对数转换,然后取各自平均值。两个平均值之间的比较采用“*t*”检验法,多个平均值之间的比较方差分析则采用Duncan法。

2 结果

2.1 微宇宙中 Pf·X16L2 在小麦根圈的定殖动态

定期检测 Pf·X16L2 在各部位根段的定殖数量,结果如表1所示。通过种子丸衣化接

种, Pf·Xl6L2 在小麦播种后 3d 即可在种子下方 6cm 以内的根段达到最高定殖水平, 然后开始下降, 小麦生长 10d 时 4~6cm 根段上的菌数和 13d 时 2~4cm 根段上的菌数都已降至定量检出限以下, 但小麦生长 30d 时, 定殖在 0~2cm 根段内的 Pf·Xl6L2 仍能维持相对稳定水平。生长至第 7d 时, Pf·Xl6L2 可散布至种子下方 8cm 处, 30d 后, 主根长达 16cm, 但散布范围仍没有超出 8cm。

表 1 灰潮土微宇宙中 Pf·Xl6L2 在小麦根圈的定殖动态(单位: log cfu·g⁻¹根)

Table 1 Colonization dynamics and distribution of Pf·Xl6L2 in wheat rhizosphere in rhizobox-Calcareous chao soil microcosms(unit: log cfu·g⁻¹root)

Days after planting/d	Root length from seed/cm					
	0~2	2~4	4~6	6~8	8~10	10~16
3	4.60	3.30	2.36			
7	4.55	3.00	1.84	+	-	
10	4.00	1.84	+	+	-	-
13	3.32	+	+	+	-	-
16	2.61	+	+	+	-	-
19	2.69	+	+	+	-	-
30	2.45	+	+	+	-	-

+ : Luminescent bacteria detected from original sample suspension

- : No luminescent bacteria detected from original sample suspension

2.2 Pf·Xl6L2 在田间土壤中的定殖动态

小麦播种后第 15d 开始取样, 分别检测接菌和对照小区内小麦根系各部位(开始 2 次取样包括麦种胚皮的) Pf·Xl6L2 数量、好气性细菌总数、假单胞菌群数, 检测结果见表 2。

表 2 田间小区试验中微生物在小麦根圈的群体数量(单位: log cfu·g⁻¹根)

Table 2 Numbers of microorganisms in wheat rhizosphere in field plot experiment(unit: log cfu·g⁻¹root)

Days after planting	Root segment length from seed/cm	Total aerobacteria		Pseudomonads		Pf·Xl6L2	
		Inoculated	Control	Inoculated	Control	Inoculated	Control
15	Seed	6.64 ± 0.12*	6.79 ± 0.43	4.05 ± 0.08	5.41 ± 0.06	4.97 ± 0.21	-
	A(0~2)	6.03 ± 0.01	6.45 ± 0.22	3.97 ± 0.09	5.35 ± 0.15	5.36 ± 0.10	-
	B(2~4)	5.92 ± 0.09	6.09 ± 0.18	4.78 ± 0.17	4.93 ± 0.06	4.67 ± 0.11	-
	C(4~6)	5.36 ± 0.02	5.77 ± 0.09	4.78 ± 0.10	4.64 ± 0.14	4.33 ± 0.13	-
	D(>6)	4.84 ± 0.09	5.84 ± 0.27	3.81 ± 0.22	5.24 ± 0.72	4.15 ± 0.18	-
25	Seed	6.45 ± 0.05	5.89 ± 0.08	2.21 ± 0.11	-		
	A(0~2)	6.27 ± 0.08	6.05 ± 0.05	5.29 ± 0.08	5.31 ± 0.08	2.28 ± 0.09	
	B(2~4)	6.17 ± 0.03	5.74 ± 0.08	5.04 ± 0.07	4.54 ± 0.13	2.02 ± 0.13	-
	C(>4)	6.17 ± 0.06	5.36 ± 0.12	4.75 ± 0.09	5.21 ± 0.19	2.62 ± 0.19	-
35	A(0~2)	5.67 ± 0.07	5.49 ± 0.20	4.98 ± 0.07	4.96 ± 0.37	2.55 ± 0.04	-
	B(2~4)	5.20 ± 0.08	4.72 ± 0.07	4.27 ± 0.12	4.29 ± 0.20	2.19 ± 0.13	-
	C(4~6)	5.04 ± 0.04	4.45 ± 0.13	3.93 ± 0.08	4.16 ± 0.15	2.42 ± 0.03	-
	D(6~8)	4.97 ± 0.05	4.99 ± 0.06	4.60 ± 0.17	4.57 ± 0.06	1.39 ± 0.05	-
	E(>8)	5.12 ± 0.06	5.45 ± 0.16	3.93 ± 0.02	4.03 ± 0.22	2.70 ± 0.07	-
65	A(0~2)	5.58 ± 0.18	5.67 ± 0.27	4.70 ± 0.08	4.64 ± 0.15	2.27 ± 0.09	-
	B(2~4)	5.09 ± 0.09	5.30 ± 0.12	4.47 ± 0.07	4.57 ± 0.07	2.01 ± 0.11	-
	C(4~6)	4.83 ± 0.09	5.07 ± 0.06	4.45 ± 0.18	4.58 ± 0.27	2.02 ± 0.08	-
	D(6~8)	4.65 ± 0.09	5.01 ± 0.15	3.85 ± 0.16	4.62 ± 0.19	2.30 ± 0.06	-

续表 2

Days after planting	Root segment length from seed/cm	Total aerobacteria		Pseudomonads		Pf·Xl6L2	
		Inoculated	Control	Inoculated	Control	Inoculated	Control
95	E(8~10)	4.94 ± 0.05	4.94 ± 0.09	3.72 ± 0.11	3.87 ± 0.16	+	-
	F(>10)	4.57 ± 0.05	4.80 ± 0.04	3.56 ± 0.15	4.04 ± 0.26	-	-
	A(0~4)	5.33 ± 0.07	5.26 ± 0.08	4.58 ± 0.06	4.39 ± 0.08	2.06 ± 0.15	-
	B(4~8)	5.22 ± 0.09	5.81 ± 0.08	4.77 ± 0.08	5.04 ± 0.06	1.72 ± 0.24	-
	C(>8)	5.93 ± 0.23	5.68 ± 0.16	4.83 ± 0.18	5.57 ± 0.40	1.77 ± 0.16	-
125	A(0~4)	6.77 ± 0.04	7.01 ± 0.10	5.95 ± 0.19	5.68 ± 0.08	0.54 ± 0.04	-
	B(4~8)	5.56 ± 0.04	6.05 ± 0.08	4.72 ± 0.09	4.73 ± 0.07	0.66 ± 0.05	-
	C(>8)	6.34 ± 0.07	6.21 ± 0.06	4.83 ± 0.08	4.78 ± 0.12	0.36 ± 0.03	-

* :The standard error of mean(Sx); + :Luminescent bacteria detected from original sample suspension
 - :No luminescent bacteria detected from original sample suspension

从表 2 可知:(1)Pf·Xl6L2 在小麦根圈的定殖水平 15d 时比较高,25d 后已大幅度下降,25~29d 内维持相对稳定水平,125d 后已降至接近定量检出限。散布范围 15d 时至种子下方 6cm 以下,35d 时可至 8cm 以下根段,60d 时也不超过种子下方 10cm。(2)土著细菌的数量在经过一段时间的起伏后,随着小麦旺盛生长期的到来,其数量又会回升。引入菌株则不然,随着小麦生长时间的延长,其数量最终会大量减少。也许,这也正是我们在应用细菌接种剂时需要经常接种的原因。(3)定殖在小麦根圈的好气性细菌总数和假单胞菌群数在接菌处理和对照处理之间差别很小。在根系的不同部位,各菌样的定殖水平也没有呈现出规律性的变化。作为引入菌株,Pf·Xl6L2 在小麦根圈不同部位的定殖密度的变化也无规律可循,这说明根圈微生物在根系内的分布并不均匀,也没有从上到下递减的明显特征。(4)在对照处理的小麦根圈中一直没有检测到引入菌株 Pf·Xl6L2,这说明通过种子部位接种的引入菌株在土壤中的水平移动范围极其有限,至少小于 40cm。

种子下方 0~2cm(A)根段夹层培养的发光情况如图 1 所示,所取部位每一段根上均有发光标记菌株定殖,且在双抗选择性 S1 培养基上长出的菌落并不全是 Pf·Xl6L2 形成的发光菌落。

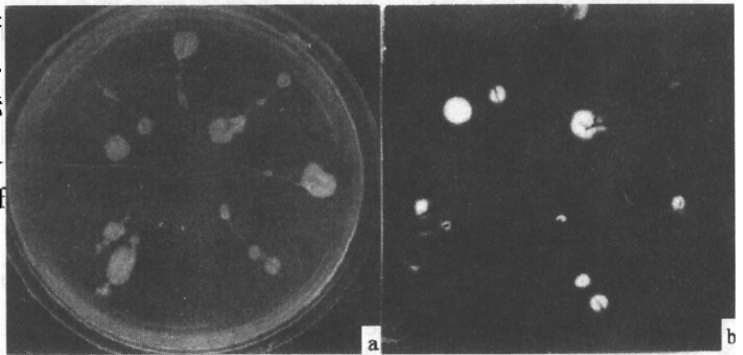


图 1 夹层培养平板中小麦根段上菌落(a)及其发光菌落(b)
 Fig.1 Bacterial colonies from root segments on sandwich plate in light(a) and luminescent colonies in dark(b)

3 讨论

Kluepful 发现在悉生条件下,引入细菌在植物根圈的群体数量在接种后 24~48h 内即达最大值^[11]。我们认为,Pf·Xl6L2 在

小麦根圈的定殖动态反映了引入细菌在小麦根部定殖和小麦根系生长状态之间的相互关系。如果 Pf·Xl6L2 在小麦生长开始几天的最大定殖密度代表了小麦根的最大载菌容量,那么,小麦生长 15d 后,Pf·Xl6L2 在小麦根圈相对稳定的定殖密度反映了小麦根能够稳定供应作为引入菌株碳源和能源的根分泌物的最低水平。田间小区试验表明: Pf·Xl6L2

通过种子部位接种在田间土壤中可散布至种子下方 10cm 以内的根段部位,但定殖密度并不具有从上到下逐级递减的规律。其原因可能是:小麦在较长的生长时间内,其种子根不断伸长,且不断产生次生根并向下生长,在不同生长期或在不同根段部位的次生根数量各不相同,由于稀释效应的不同,导致所测各根段部位定殖密度各异;或是根圈细菌在根上多以微菌落的形式分布,本身就不均匀。发光酶基因作为标记基因,用于田间条件下对引入菌株进行跟踪和选择性回收明显优于抗性标记。研究结果表明:从复杂的田间土壤中回收引入菌株时,单纯采用抗性标记(甚至双抗)会使结果大大偏高。

致谢 本项研究得到了杨志红同志的大力协助,在此表示深深的感谢。

参 考 文 献

- [1] Cook R J. *Annu Rev Phytopathol*, 1993, 31: 26~34.
- [2] Klopper J W, Beauchamp C J. *Can J Microbiol*, 1992, 38: 1219~1232.
- [3] 王 平,李阜棣. 生物技术通报, 1994, 5: 9~12.
- [4] 王 平,胡正嘉,李阜棣. 生态学杂志, 1996, 15(3): 26~34.
- [5] 王 平,胡正嘉,李阜棣. 华中农业大学学报, 1997, 16(3): 220~225.
- [6] Gould W D. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 49(1): 28~32.
- [7] 中国科学院北京微生物研究所. 一般细菌常用鉴定方法手册. 北京: 科学出版社, 1979.
- [8] 王 平,王 绩,胡正嘉,等. 土壤学报, 1998, 35(4): 545~552.
- [9] Beauchamp C J A, Klopper J M. *Can J Microbiol*, 1993, 39: 434~441.
- [10] Carvalhal M L C, Oliveria M S, Alterthum F. *J Microbiol Methods*, 1991, 14: 165~170.
- [11] Kluepfel D A. *Annu Rev Phytopathol*, 1993, 31: 441~472.

BOOT COLONIZATION OF WHEAT BY *lux-AB* GENES MARKED *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* X16L2

Wang Ping Hu Zhengjia Li Fudi

(Key lab of Agricultural microbiology, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: Colonization density of *Pseudomonas fluorescens* X16L2 marked with *luxAB* genes in wheat rhizosphere in asepsis rhizobox-Calcareous chao soil microcosms reached the maximum(4.60 log cfu. g⁻¹ root) 3 days after seeds coated with Pf·X16L2 sown, then declined to a relatively stable lower level(2.45 log cfu. g⁻¹ root) in 0~2cm root segment. Dynamics of colonization of Pf·X16L2 in wheat rhizosphere under field conditions was the same as in microcosms, Pf·X16L2 could move to the place of 10 cm of root from seeds under field conditions, distance of horizontal movement of Pf·X16L2 in field soil was not over 40 cm during 125 days of plant growth.

Key words: *Pseudomonas fluorescens*, *luxAB* marker genes, Root colonization, Wheat, Molecular ecology

In situ study on microecology of PGPR in rhizosphere of wheat(39270022) and Study on colonization dynamics Of a PGPR strain in rhizosphere of wheat(C/2362-1)