

土壤因子对发光酶基因标记的荧光假单胞菌 X16L2 在小麦根圈定殖的影响*

王 平 胡正嘉 李阜棣

(华中农业大学农业部农业微生物重点实验室 武汉 430070)

摘 要 采用发光酶基因(*luxAB*)标记检测技术研究了根盒土壤微宇宙(microcosm)中土壤灭菌、土壤含水量和土壤类型对荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*, 简称 Pf)X16L2 在小麦根圈定殖的影响。研究表明,灭菌土壤中 Pf·X16L2 在小麦根圈的定殖水平较不灭菌土壤中的高。土壤类型对 Pf·X16L2 的定殖水平有较大影响,在黄棕壤中的定殖水平显著高于灰潮土中的。土壤含水量对定殖情况的影响与土壤类型有关,当土壤含水量为 50%田间持水量(Field contents, 简称 FC)时,在黄棕壤中,Pf·X16L2 主要定殖在种子下方 4cm 以内的根段上,但仍可散布至 8cm 处,而在灰潮土中,Pf·X16L2 只能散布至种子下方 4cm 以内,在黄棕壤中,土壤含水量为 60%FC 和 75%FC 时,Pf·X16L2 的定殖水平显著高于在 50%FC 条件下的,不但能散布至种子下方 8cm 处,而且定殖水平可达 $3.0 \times 10^2 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 根,在灰潮土中,不同土壤含水量之间 Pf·X16L2 的定殖水平差异不大,但 Pf·X16L2 的散布范围不一,在 60%FC 和 75%FC 条件下,Pf·X16L2 可散布至种子下方 8cm 处,而在 50%FC 下则不能。

关键词 荧光假单胞菌,发光酶标记基因,根圈定殖,小麦,土壤因子

中图分类号:Q938.1 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2000)03-0312-17

在荧光假单胞菌群植物促长根圈细菌(Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria, 简称 PGPR)制剂的商品化过程中,与其它 PGPR 制剂所存在的问题一样,迄今仍有两大难题没有解决^[1]:一是田间接种效果不稳定,且随土壤类型的不同而有很大差异;二是播种前种子上所接菌株的存活量难以达到要求。国外大量研究结果表明,引入细菌在植物根圈的定殖能力和散布范围与土壤类型(质地、容重等)、土壤条件(如水分、温度、酸度)等密切相关^[2]。因此,为了摸清小麦 PGPR 菌株 Pf·X16L2 的有效使用条件,以提高其根圈适应性,充分发挥其促长防病的应用潜力,本项研究采用发光酶基因(*luxAB*)标记检测技术研究了根盒土壤微宇宙(microcosm)中土壤灭菌、土壤含水量、土壤类型对 Pf·X16L2 在小麦根圈定殖的影响。

1 材料和方法

1.1 供试菌种

带有发光酶基因标记的荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*, 简称 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^[3]。

* 国家自然科学基金(39270022)和国际科学基金(C/2362-1)

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,1998年赴美国奥本大学和 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:1998-10-08,修回日期:1999-02-02

1.2 培养基与试剂

1.2.1 培养基: S1 培养基^[4], KB 培养基, 马丁—孟加拉红真菌培养基, 1/2 牛肉膏蛋白胨培养基^[5]。

1.2.2 试剂及其使用浓度: 链霉素(Str): 50 μ g/mL; 卡那霉素(Km): 100 μ g/mL; 1% 羧甲基纤维素—磷酸盐缓冲液(pH7.0) 种子丸衣化吸附剂。

1.3 供试土壤

两种供试土壤及其基本农化性状和机械组成分别参见文献[6]。

1.4 供试小麦品种

供试小麦品种为 881#, 购自华中农业大学种子室。

1.5 接种物的制备及种子丸衣化^[7]

1.6 根盒(rhizobox)的装配与表面消毒^[8]

1.7 灭菌和不灭菌根盒—土壤微宇宙的建立

将已调好水含量(约 20%)并经间歇湿热灭菌(土壤装于塑料袋中, 121 $^{\circ}$ C 间隔 24h 灭菌一次, 共灭两次, 每次 1h)或未灭菌的灰潮土, 按每盒 700g 分别装入根盒。接种与播种方式、管理措施均与文献[8]相同。待小麦主根尖达根盒底部后, 取出根盒, 卸下可拆的一面玻璃, 按无菌操作规程先取下一株麦苗的整个根系于无菌培养皿内, 再将另 2 株麦苗的根系自上而下分为 A(0~4cm)、B(4~8cm)、C(>8cm)三段, 以无菌镊子和剪刀自下而上(避免交叉污染)分别采取各部位根段转入对应的之无菌培养皿内, 抖掉附着在根上的土粒后, 计根段数并称重。将称重后之根系和不同部位之根段分别转入盛有 20mL 无菌 0.1% MgSO₄·7H₂O 和玻珠的三角瓶内, 涡旋振荡 5min, 再进行十倍系列稀释(样品原液稀释度为 0 次方)。以双抗选择性 S1 培养基及 AMPN 法^[9]测定样品中的发光菌落形成单位。样品原液也点接平板。对于只有在点接原液的平板上长出发光菌落样品不作定量计数, 但视为定性检测结果阳性, 即有发光菌定殖。发光强度的检测方法参见文献[6]。

1.8 不同土壤类型和含水量之根盒—土壤微宇宙的建立

分别将两种供试土壤(不灭菌的灰潮土和黄棕壤)的含水量调节到 50%(FC)、60% FC、75% FC。以烘干土为基准, 装盒用黄棕壤的最终含水量分别为 19.4%、23.3% 和 29.1%, 灰潮土的则为 17.1%、20.5%、25.7%。装土量: 黄棕壤为每盒 900g, 灰潮土为每盒 800g。接种量为每粒 2.5×10^6 cfu。根系自上而下分为 A(0~4cm)、B(4~8cm)、C(8~12cm)和 D(>12cm)四段, 其它方法同上。

1.9 统计分析

对于“发光强度(relative-light-unit, 简称 rlu)”的测定结果, 先扣除对照处理的发光本底值, 再进行常用对数转换。对于“菌落形成单位(colony-forming-unit, 简称 cfu)”的测定结果, 因对照处理中均无发光菌检出, 故直接进行对数转换。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 土壤灭菌与否对 Pf·X16L2 在小麦根圈定殖的影响

小麦播种后第 14d 取样测定 Pf·X16L2 在小麦根圈的定殖密度(即群体数量), 结果见

表 1。

表 1 土壤灭菌对 Pf·Xl6L2 在小麦根圈定殖的影响

Table 1 Effects of soil sterilization on root colonization of wheat by Pf·Xl6L2

Root length/cm	log rlu/g Root	log cfu/g Root
A(0~4)	3.40a*	2.68a
SA(0~4)	4.73b	4.29b
B(4~8)	3.20a	2.61a
SB(4~8)	4.27 b	3.73 b
C(>8)	2.35 a	—
SC(>8)	2.53 a	—
W	3.31 a	3.34 a
SW	5.10 b	6.53 b

S Means sterilized rhizobox-soil microcosms ;W Means sampling unit is whole root system ;

— Means no luminescent bacteria detected from original sample suspension ;

* Different letters after the datas means significant difference($P < 0.01$) (t test).

从表 1 可以看出,土壤灭菌与否对 Pf·Xl6L2 在小麦根圈的定殖能力有很大影响。就整个根系而言,无论是发光强度还是发光标记菌的数量,灭菌土壤中的均显著高于不灭菌土壤中的。就 A(0~4cm) 和 B(4~8cm) 两段而言,情况也是如此。而且,不论是在灭菌土壤中,还是在未灭菌土壤中,根系的发光强度都表现出从上到下逐渐减弱的趋势,菌数也呈逐渐下降的趋势,而 C 段内(8~16cm)没有检出发光菌数。这说明在没有渗漏水的情况下,Pf·Xl6L2 在有菌和无菌两种土壤微宇宙中均只能沿根散布至种子下方 8cm 处。

2.2 土壤类型和水分对微宇宙中 Pf·Xl6L2 根圈定殖能力和散布范围的影响

在三种不同土壤水分含量的情况下,分别在灰潮土和黄棕壤微宇宙中考察了 Pf·Xl6L2 在小麦根圈的定殖能力和散布范围。播种 36d 后取样检测,取样时,各处理根盒—土壤微宇宙中,灰潮土(CCS)在 50% FC、60% FC 和 75% FC 下的含水量分别为 8.5%、12.7%、15.7%,黄棕壤(YBS)在 50% FC、60% FC 和 75% FC 下的含水量的分别为 14%、18.57%和 21.6%。分别检测好气性细菌总数、真菌和 Pf·Xl6L2 在小麦根系各根段的定殖水平,所得结果列于表 2。

表 2 不同土壤类型和水分含量的微宇宙中根圈微生物的群体数量分布(单位:log cfu·g⁻¹根)

Table 2 Numbers and distribution of microorganisms in wheat rhizosphere in rhizobox-soil microcosms with different soil type and water conten(unit:log cfu/g root)

Microbe	Soil type	50%FC				60%FC				75%FC			
		Root segment/cm				Root segment/cm				Root segment/cm			
		A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
Pf·Xl6L2	YBS	2.54A*	+	-	-	3.31aA	2.37b	-	-	3.45Aa	2.48b	-	-
	CCS	1.93B	-	-	-	1.42B	+	-	-	1.38B	+	-	-
Total aero-bacteria	YBS*	5.47aA	5.51aA	4.74bA	4.82bA	5.84aA	6.15aA	4.99bA	4.75bA	5.92aA	5.46aA	4.97bA	4.91bA
	CCS**	5.54aA	5.16aA	4.60bA	4.59bA	5.23aB	5.33aB	4.30bB	4.38bA	5.12aB	5.18aA	4.43bA	4.39bA
Fungi	YBS	2.87aA	2.68aA	2.52aA	2.78aA	4.23aA	4.56aA	4.00aA	2.90bA	3.89aA	4.26aA	4.06aA	2.55bA
	CCS	2.35aA	1.95abB	1.60bB	1.67bB	2.23aB	1.88abB	1.82bB	1.74bB	2.15B	2.21aB	1.96abB	1.61bA

YBS 黄棕壤; CCS 灰潮土

* Different little letters after the data in each row means signification difference($p < 0.01$) (Duncan's test)

** Different capital letters after two data in each row means significant difference($P < 0.01$) (t test)

从表 2 可知 (1) 引入菌株 Pf·X16L2 在三种水分条件下在小麦根圈的定殖水平, 黄棕壤中的都显著高于灰潮土中的, 且能散布至种子下方 8cm 处; 在灰潮土中, 虽然在 60% FC 和 75% FC 两种条件下也能散布至种子下方根段 8cm 处, 但定殖水平在定量检出限以下。在黄棕壤中, 土壤水分只有 50% FC 时, Pf·X16L2 主要定殖在种子下方 0~4cm 以内的根段上, 但仍可散布至 8cm 以内的根段处, 而在灰潮土中, Pf·X16L2 不能散布至 4cm 以外的根段部位。在黄棕壤中, 当土壤水分分别为 60% FC 和 75% FC 时, Pf·X16L2 的定殖水平高于 50% FC 时的, 其散布范围可达 8cm 处, 且在 4~8cm 根段上的定殖水平可达 $3.0 \times 10^2 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 根; 在灰潮土中, Pf·X16L2 虽然也能散布至 8cm 处, 但仍主要定殖在 0~4cm 的根段内, 在 4~8cm 范围内, 只达到了定性检测水平 (2) 在三种水分条件下, 两种土壤微宇宙中, 定殖在小麦根圈的“好气性细菌总数”在根系不同部位的定殖状况均表现为 A、B 两段的显著高于 C、D 两段的 (3) 定殖在小麦根圈的真菌, 在不同水分条件下的情况有所差异。如在 50% FC 条件下, 在黄棕壤中, 各根段部位定殖的真菌数量非常接近; 在灰潮土中, 则表现为 A 段的显著高于 C、D 两段的, 在 60% FC 和 75% FC 条件下, 真菌在灰潮土中小麦根圈不同部位的定殖情况与 50% FC 条件下的一致。但在黄棕壤中的情况略有不同, 在 60% FC 条件下, 真菌在 A、B、C 三段的定殖水平均显著高于 D 段的, 而在 75% FC 条件下, 真菌只在 A、B 二段的定殖水平与 D 段的有显著差异。

2.3 土壤类型和水分对小麦根系内微生物整体定殖水平的影响

通过采取小麦全根系, 且以一个全根系为一个样本单位, 分别测定好气性细菌总数、真菌和 Pf·X16L2 在根系内的整体定殖水平, 所得结果如表 3 所示。从表 3 可以看出, Pf·X16L2 的整体定殖水平在灰潮土中的三种水分条件下均无显著差异, 但在黄棕壤中以 60% FC 条件下的定殖水平最高, 与其它条件下的相比, 达到了显著性差异。此外, 定殖在小麦全根系内的好气性细菌总数在两种土壤微宇宙间的差异非常显著, 灰潮土中的显著高于黄棕壤中的, 但在各自土壤中不同水分条件下的差异不显著。小麦全根系内, 真菌的整体定殖水平, 除了在黄棕壤中 75% FC 水分条件下与其它水分条件相比有显著差异外, 其余均无显著差异。

表 3 不同土壤类型和水分条件下小麦全根系内微生物的群体数量 ($\log \text{ cfu} \cdot \text{全根系}^{-1}$)

Table 3 Population size of microorganisms in the whole root system of wheat under different soil condition ($\log \text{ cfu}/\text{whole root system}$)

Microorganism	YBS			CCS		
	50% FC	60% FC	75% FC	50% FC	60% FC	75% FC
Pf·X16L2	1.851a*	3.27b	2.27a	2.14a	1.90a	1.90a
Total aero-bacteria	5.14ab	4.93ab	4.69a	5.67c	5.46c	5.84c
Fungi	2.23a	2.22a	3.24b	2.10a	2.04a	2.05a

* Different little letters in each row means significant difference ($P < 0.01$) (Duncan's test)

YBS: 黄棕壤; CCS: 灰潮土

3 讨论

本研究表明, 土壤类型和土壤水分对土著微生物和引入菌株在小麦根圈的定殖数量均有显著影响。对土著细菌而言, 土壤类型对其在每个根段部位的定殖水平没有影响, 但对于土著真菌和引入菌株而言, 土壤类型对其在小麦根系各部位的定殖水平均有重要作

用。土壤水分含量过少对引入菌株定殖水平和散布范围的负面影响较大,在黄棕壤中,土壤水分含量为 60%~75%FC 时,有利于 Pf·Xl6L2 在小麦根圈的散布和定殖。但在灰潮土中,水分含量对 Pf·Xl6L2 在根部的定殖水平影响不大,造成这种差异的原因可能与土壤质地有关。

与灭菌土壤相比,自然土壤中引入细菌的根部定殖受到了很大程度的限制。这说明来自土著微生物区系的拮抗作用和竞争作用是影响引入细菌能否在根圈成功定殖的主要因素之一。有报道表明土壤中原生动物的捕食作用^[9]及噬菌体引起的细胞溃溶^[10]会引起某些荧光假单胞菌株的根部定殖密度下降。因此,我们在筛选 PGPR 菌株时,应尽量选择那些对土著微生物有一定抗性的菌株。

据报道,适合于荧光假单胞菌菌群根部定殖的合适土壤基质势范围为 $-1\text{kpa} \sim 140\text{kpa}$ ^[11]。当土壤含水量高时,水分充满大量土壤孔隙导致氧气不足;反之,细菌的运动性、细胞张力和养分的扩散性会下降。也有人认为土壤水分含量主要影响细菌根部定殖的群体水平,而灌水方式主要影响细菌沿根的分布^[12]。本项研究表明,土壤水分对 Pf·Xl6L2 在小麦根圈的定殖水平和散布范围也有一定影响,但依土壤类型而异。

与土壤类型密切相关的土壤质地既影响引入细菌的被动传送,也影响其根部定殖。有报道表明细菌在质地较轻的土壤中的运动距离要比在质地较重的土壤中的大,在根部的定殖水平也要高^[13]。但要证实土壤质地对荧光假单胞菌定殖能力的确切影响并非易事。因为,与土壤类型有关的其它一些因素如土壤酸度也可能导致差异。在本项研究中,土壤类型不但对引入菌株 Pf·Xl6L2 在小麦根圈的分布范围有一定影响,而且对其定殖水平也有很大作用,如 Pf·Xl6L2 在黄棕壤中小麦根圈的定殖水平显著高于灰潮土中的。

引入细菌在植物根圈的定殖及其散布范围会受到根尖和真菌菌丝的被动传送,随渗漏水的被动转移及其本身运动性的多重影响。而每一种因素的相对作用可能决定于包括根生长速率、土壤质地、酸度、水分特征在内的各种变异因子及引入细菌本身的特性如生长速率、运动性、趋化性和细胞表面性质等。因此,要揭示土壤因子对 PGPR 菌株根圈定殖的影响还有很多艰苦复杂的工作需要我们去。

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] 王 平, 胡正嘉, 李阜棣. 应用与环境生物学报, 1996, **2**(4): 408~414.
- [3] 王 平, 胡正嘉, 李阜棣. 华中农业大学学报, 1997, **16**(3): 220~225.
- [4] Gould W D. *Appl Environ Microbiol*, 1985, **49**(1): 28~32.
- [5] 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. 28~32.
- [6] 王 平, 王 绩, 胡正嘉, 李阜棣. 土壤学报, 1998, **35**(4): 545~552.
- [7] Beauchamp C J A, Klopper J M. *Can J Microbiol*, 1993, **39**: 434~441.
- [8] 王 平, 胡正嘉, 李阜棣. 微生物学报, 2000, **40**(2): 150~154.
- [9] Carvalhal M L C, Oliveria M S, Alterthum F. *J Microbiol Methods*, 1991, **14**: 165~170.
- [10] Acea m L, Alexander M. *Soil Biol Biochem*, 1988, **20**: 703~709.
- [11] Stephens P M, O'Sullivan M, O'Gara F. © 中国微生物学杂志编辑部 1987, **53** 合订部 1167. <http://journals.im.ac.cn>

- [12] Liddell C M , Parke J L. *Phytopathology* ,1989 **79** :1327~1332.
[13] Kloeppe J W , Beauchamp C J. *Can J Microbiol* ,1992 **38** :1219~1232.
[14] Heijnen C E , Hok-A-Hin C H , van Elsas J D. *Soil Biol Biochem* ,1993 **25**(2) 239~246.

EFFECTS OF SOIL FACTORS ON ROOT COLONIZATION OF WHEAT BY *luxAB* GENES-MARKED *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* X16L2

Wang Ping Hu Zhengjia Li Fudi

(Key Laboratory 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 sterilized Rhizobox—Calcareous chao soil microcosms was greater than that in insterilized microcosms. The population of Pf·X16L2 in the Rhizosphere in the rhizobox—Yellow brown soil microcosms was larger than that in the Calcareous chao soil microcosms ; As soil water content was about 50% field capacity (FC) , Pf·X16L2 could move to the place of 8 cm of root from coated seeds in the former microcosm , but only 4 cm in the later microcosm. In the former microcosms , the number of Pf·X16L2 in the rhizosphere under 60% FC and 75% FC were greater than that under 50% FC ; In the second microcosm , the dispersal distance of Pf·X16L2 along the root was affected significantly by the soil moisture , it could be detected as far as 8 cm of root from the coated seeds under 60% FC and 75% FC.

Key words : *Pseudomonas fluorescens* , *luxAB* Marker Genes , Root colonization , Wheat , Microcosm , Soil factors

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