

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(5) 617-623; 4 May 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

丛枝菌根真菌珠状巨孢囊霉孢子伴生细菌的绿色荧光蛋白标记及定殖分析

龙良鲲^{1,3}, 姚青², 艾云灿³, 朱红惠^{1*}

(¹广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070)

(²华南农业大学园艺学院, 广州 510642)

(³中山大学生命科学院, 广州 510275)

摘要 【目的】分析丛枝菌根(Arbuscular Mycorrhizal, AM)真菌珠状巨孢囊霉(*Gigaspora margarita*) MAFF 520054 孢子伴生细菌的定殖情况, 明确其生态位点, 以及为进一步分析其种群生态或功能提供信息。【方法】以载体 pNF8(gfp-mut1)对 6 株珠状巨孢囊霉 MAFF520054 孢子伴生细菌进行绿色荧光蛋白(GFP)标记, 并通过荧光显微镜和平板计数的方法研究标记菌株对真菌宿主的定殖位点和不同条件下的定殖数量动态。【结果】对粘状芽孢杆菌(*Peanibacillus* spp.)M060106-1 和 M061122-6、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)M061122-10 和短小芽孢杆菌(*Brevibacillus* sp.)M061122-12 成功进行了 GFP 标记, 其均具有较好的质粒稳定性, 且与出发株的基本性状一致, 适合短期内进行环境定殖研究。所有菌株均能定殖珠状巨孢囊霉 MAFF 520054 孢子壁, 而 M061122-6 和 M061122-12 还能够定殖其菌丝; 不同 pH 值条件下, 各菌株定殖珠状巨孢囊霉 MAFF 520054 孢子的数量动态均为先上升后下降, pH 值对各菌株的定殖数量有不同的影响; 各 GFP 菌株对低活力的珠状巨孢囊霉孢子定殖数量高于高活力的孢子, 且对高活力孢子的定殖数量动态不同。【结论】分离的珠状巨孢囊霉孢子伴生细菌能够重新定殖其孢子, 菌株的定殖能力受其特性及外界因子的影响, 为进一步分析 AM 真菌伴生细菌的种群生态及功能提供了信息。

关键词: 珠状巨孢囊霉; 伴生细菌; 绿色荧光蛋白标记; 定殖

中图分类号: Q938.1 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)05-0617-07

丛枝菌根(Arbuscular Mycorrhizal, AM)真菌是一类与 80% 以上的陆生植物形成互惠共生关系的土壤真菌。AM 真菌能够积极协助宿主植物吸收矿质营养(尤其是 P), 和抵抗各种生物(土传病菌等)和非生物(盐、重金属等)胁迫, 其对于维持农业生态系统平衡具有十分重要的意义^[1-2]。在 AM 真菌的菌体(孢子和菌丝)表面或内部分布着一些细菌类群,

这些细菌可以称之为 AM 真菌伴生细菌^[3]。由于伴生细菌可能对 AM 真菌的生命活动或功能具有重要的意义, AM 真菌伴生细菌也逐步成为研究的热点^[4-6]。微生物的生态定殖是环境微生物学研究的重要内容。AM 真菌伴生细菌对其真菌宿主的定殖能力如何, 易受哪些因素影响等, 明确这些问题对于揭示细菌与 AM 真菌的互作本质, 以及掌握其中的

基金项目: 广东省自然科学基金(E05202480 D7000509)

* 通信作者。 Tel/Fax: +86-20-37656629; E-mail: zhuohonghui66@yahoo.com.cn

作者简介: 龙良鲲(1978-), 男(土家族), 湖北五峰人, 助理研究员, 博士, 主要从事微生物生态学研究。 E-mail: llk8341@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-11-11, 修回日期: 2009-02-12

生态规律具有重要的意义。国外,研究者开展了部分土壤细菌对 AM 真菌菌丝的定殖的研究,发现不同种类的细菌对真菌的定殖能力各不相同^[7]。细菌对 AM 真菌孢子具有怎样的定殖情况,目前未见相关报道。前期的研究中,我们从珠状巨孢囊霉(*Gigaspora margarita*)MAFF 520054 孢子上分离到一批伴生细菌,其中有些菌株对其真菌宿主具有积极的意义(数据发表中)。本文以绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)标记技术对部分伴生细菌进行了标记,并对其生态定殖作了相关的分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 载体和菌株:①pNF8 载体(*gfp-mut1*, *Listeria monocytogenes* promoter *P_{dlt}*)^[8]保存于大肠埃希氏杆菌(*Enterobacter coli*)JM109 中,由瑞典农业大学微生物学系 Jansson 教授惠赠。②AM 真菌:珠状巨孢囊霉(*Gigaspora margarita*)MAFF 520054(源自日本农林渔业部遗传资源库)由广东省菌种保藏与应用重点实验室以等体积比的砂土混合物为基质和白三叶草(*Trifolium repens* L.)为宿主植物进行纯系扩繁、保存。③细菌菌株:从珠状巨孢囊霉(*G. margarita*)MAFF 520054 孢子表面分离的伴生细菌 6 株,分别为粘状芽孢杆菌(*Peaibacillus* spp.)M060106-1、M061122-2 和 M061122-6,芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)M061122-4 和 M061122-10,以及短小芽孢杆菌(*Brevibacillus* sp.)M061122-12。

1.1.2 培养基:GB 培养基和 SOC 培养液参照文献[9-10]配制。

1.1.3 主要试剂和仪器:电脉冲转化仪 4308 805.005(Eppendorf) 荧光显微镜(Leica) ZF-1 型三用紫外分析仪(上海宝山顾村电光仪器厂) UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生物工程有限公司) 红霉素(Erythromycin, ER)(Amresco),其他生化试剂为国产分析纯。

1.2 目标菌株的 GFP 标记

1.2.1 感受态细胞的制备:参照文献[11-12]中的方法进行。

1.2.2 电击转化:无菌的 0.1 cm 电击杯冰上预冷 10 min。100 μ L 感受态细胞加入 1 μ L 纯化的 pNF8(约 3.4 μ g)轻轻混匀,冰上放置 5 min。将混合液轻轻注入备好的电击杯中,并放入电脉冲转化仪。

调节电脉冲转化仪参数,8~16 kv/cm,5 ms,电击。立即加入 1/5 强度的 SOC 培养液 1 mL,轻轻混匀。冰上放置 5 min 后,移入无菌的试管中,并加入 1/5 强度的 SOC 培养液 3 mL,30 $^{\circ}$ C、180 r/min、振荡培养 3 h。取菌液 200 μ L 涂板含 10 μ g/mL 红霉素(ER)的 GB 平板,30 $^{\circ}$ C 倒置培养 1~2 d。观察、统计转化子。

1.2.3 转化子筛选及其稳定性测定:于紫外光(365 nm)下检测转化平板,挑取产生强烈荧光(绿色或偏紫色)的转化子,编号、转管保存。选定的转化子经液体扩大培养,收集的菌体经 10 mg/mL 溶菌酶处理后,碱裂解法^[13]提取质粒,并用 CTAB 法^[11]纯化。获得的质粒 DNA 用 *Bam*H I 进行酶切分析。含有 7.7 kb 质粒 DNA 的转化子即为阳性转化子。

质粒稳定性测定。目标菌以 1% 量接种到 100 mL GB 培养液中,30 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养。每隔 1 h 取 100 μ L 菌液测定其 OD₆₀₀ 的吸光度,共测定 14 次。以时间为横坐标,生长量为纵坐标作生长曲线,计算指数生长期 OD 值增加 1 倍所需的时间,得出目标菌株代时。取转化子接种到 100 mL GB 液体培养基(不含 ER)中,30 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养,定时(根据菌株的对数期)转接菌体至新的 GB(不含 ER)液体培养,使菌体始终处于对数期生长。连续转接培养,使菌体生长 20~100 代,取菌液适当稀释并涂布含 ER 和不含 ER 的 GB 平板、培养,比较两种平板上菌落数的差异,以及在 365 nm 的紫外光下检测检查荧光菌落占总菌落数的比例。计算出质粒的稳定率。

1.2.4 标记株与出发株性状的比较:比较标记菌株与出发菌株在菌落生长性状(生长速率与培养形态)上的差异。

1.3 GFP 标记株的定殖

1.3.1 对珠状巨孢囊霉(*G. margarita*)MAFF 520054 孢子和菌丝的定殖:取表面消毒的真菌孢子 10 粒,浸入 100 μ L GFP 标记菌液(约 5×10^7 CFU/mL, 无菌水配制)中 10 min,将孢子移入垫有无菌滤纸的培养皿(Φ 60 mm)中,并加 2 mL 无菌水保湿,26 $^{\circ}$ C 培养。待孢子萌发后(约 4 d),取孢子及菌丝,用 100 μ L 无菌水漂洗 3 次后,置于荧光显微镜(450~470 nm 激发波长)下检测菌体的定殖情况。设清水 CK,各种样品至少进行 3 次重复试验。

1.3.2 不同 pH 值条件下标记株的定殖:未经表面消毒的珠状巨孢囊霉(*G. margarita*)MAFF 520054

健康孢子 50 粒为一组,装入 1.5-mL EP 管中,0.5 mL 无菌水漂洗,共进行 3 次,备用。

用 pH 为 5.5 和 7.0 的 PBS 缓冲液(1/5 强度),分别将预先培养的 GFP 标记菌配成悬液,浓度约 2×10^6 CFU/mL。将真菌孢子浸入对应的菌悬液(500 μ L)中 15 min,移入垫有滤纸的培养皿(Φ 60 mm)中,各加入对应的 PBS 缓冲液(1/5 强度)1.2 mL,26 $^{\circ}$ C 培养。分别于 0.5 h、1 d、3 d、5 d、7 d 后,随机取出 10 粒孢子悬浮于 100 μ L 无菌生理盐水(1.5-mL EP 管盛装)。孢子经 300 μ L 无菌生理盐水漂洗 1 次后,以无菌研棒充分压碎孢子,4000 r/min 转速 5 min 稀释涂布法(含 ER 的 GB 平板)测定菌落数量,紫外光下(365 nm)统计荧光菌落数。各处理 3 次重复。比较各 pH 值下标记株的数量动态。数据间的显著性分析采用 LSD 法($P = 0.05$)进行(下同)。

1.3.3 不同活力孢子的标记株定殖 取已扩繁珠状巨孢囊霉(*G. margarita*)MAFF 520054 的蛭石基质各 30 mL,盛装于培养皿(Φ 90 mm)中。用无菌水配制标记菌悬液(浓度约 2×10^7 CFU/mL),并取 20 mL 均匀浇入基质中,26 $^{\circ}$ C 培育。分别于 1 d、3 d、5 d、7 d、9 d 湿筛法^[4]从基质中获取奶白色和褐色的孢子各 10 粒,分别作为高活力和低活力孢子。前期试验表明,前者的萌发活力显著高于后者。同上,以稀释涂布法对孢子样品中的目标菌体进行菌落计数。各处理 3 次重复。分析不同活力孢子的目标菌定殖动态。

2 结果和分析

2.1 电转化及转化子筛选、鉴定

对 6 株目标菌进行 pNF8 的电击转化,电击参数 10 kV/cm、5 ms 适合所有菌株。经过抗性筛选以及 365 nm 紫外光下的荧光检测,所有菌株均能够得到发出明亮的绿色到偏紫色荧光的转化子。其中粘状

芽孢杆菌(*Paenibacillus* spp.)M060106-1、M061122-2 和 M061122-6 转化效率(指表达 GFP 的转化子)较高,可达 10^4 CFU/ μ g DNA,而芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)M061122-4、M061122-10 和短小芽孢杆菌(*Brevibacillus* sp.)M061122-12 的转化效率较低,仅 10^2 CFU/ μ g DNA。

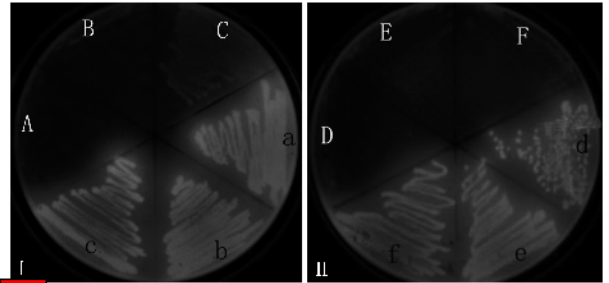


图 1 各出发菌株及其标记株在 365 nm UV 下(I 和 II)的检测

Fig. 1 Original bacterial strains and their GFP-tagged strains under 365 nm UV light. A-F: Original strains of M060106-1, M061122-2, M061122-4, M061122-6, M061122-10, and M061122-12, respectively; a-f: GFP-tagged strains of A to F, respectively.

各菌株挑选 4~5 个荧光强烈的转化子转接培养,进一步以 365 nm 紫外灯检测其 GFP 的表达。结果所有转化子都能表达 GFP,发出强烈荧光(图 1)。转化子的质粒提取与酶切鉴定,表明所有转化子含有的质粒与对照 pNF8 分子量同等,进一步验证了所获得转化子为表达 *gfp-mut1* 的阳性转化子。

2.2 标记株的质粒稳定性测定

各标记株分别记为 M060106-1G、M061122-2G、M061122-4G、M061122-6G、M061122-10G 和 M061122-12G。在无选择压力下经过 20~100 代的生长,标记株的质粒稳定性各不相同。其中,菌株 M060106-1G、M061122-6G、M061122-10G 和 M061122-12G 具有较好的质粒稳定性,100 代生长后,稳定率仍达 80% 以上(表 1),可进行后续试验。

表 1 不同代数生长后 GFP 标记株的质粒稳定率(%)

Table 1 Plasmid stability rate of GFP-tagged strains after different growth generation(%)

Generations	Strains					
	M060106-1G	M061122-2G	M061122-4G	M061122-6G	M061122-10G	M061122-12G
20	99	70	62	98	99	99
50	95	35	13	94	93	95
100	84	-	-	83	87	90

2.3 标记株与出发株的性状比较

所有出发株菌落在可见光下呈灰白色,而各标

记株在可见光下的菌落均呈浅绿色。标记株的其他培养性状或形态与出发株一致。

2.4 标记株对珠状巨孢囊霉(*G. margarita*)MAFF 520054 孢子和菌丝的定殖

4 株 GFP 标记株(M060106-1G、M061122-6G、M061122-10G、M061122-12G)分别接种 *G. margarita* 孢子,5 d 后均有孢子萌发。荧光显微镜镜检结果表明,孢子壁有明显的自发荧光,一定程度上影响了目标菌体的观察,但除 CK 外,各处理的孢子壁表面均能够检测到亮绿色的荧光菌体。对菌丝进行检测,仅能够检测到 M061122-6G 和 M061122-12G 的少量菌体与 *G. margarita* 菌丝粘附。

2.5 不同 pH 值下标记株的定殖动态

在 pH 5.5 和 7.0 的条件下,检测了 GFP 菌株定殖珠状巨孢囊霉(*G. margarita*)MAFF 520054 孢子

的数量动态情况。从图 2 可知,4 个菌株均呈现为先升后降的趋势。在处理 0.5 h 到 1 d 的时期内,存在一个大幅度(约 2 个数量级)的上升,之后开始逐渐下降。pH 值对各菌株定殖数量的影响不同。0.5 h 时,M060106-1G 在 pH 7.0 条件下的定殖数量显著高于 pH 5.5 的处理,之后两 pH 处理无显著性差异。M061122-6G 则为初始时,pH 5.5 下的数量显著高于 pH 7.0,之后相反。M061122-10G 的情况与 M061122-6G 相反,为初始时高 pH 下定殖数量显著高,之后低 pH 下数量显著高(1 d 时两者数量差异不明显)。pH 值对 M061122-12G 的定殖数量无明显影响,各时期检测,两处理的数量差异不显著,但第 3 d 除外(低 pH 的数量高)。

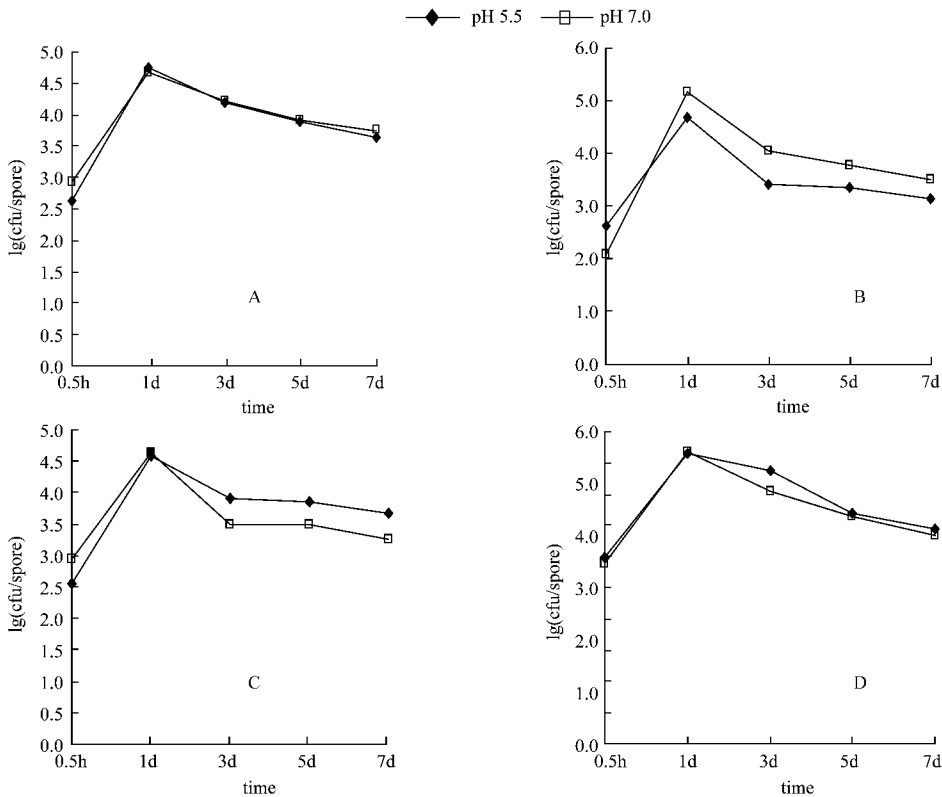


图 2 不同 pH 下 GFP 标记株定殖珠状巨孢囊霉(*G. margarita*)MAFF 520054 孢子的数量动态

Fig. 2 The population dynamic of GFP-tagged strains colonized on *G. margarita* spores under different pH. A: M060106-1G; B: M061122-6G; C: M061122-10G; D: M061122-12G.

2.6 不同活力孢子的标记株定殖动态

从图 3 可以看出,所有 GFP 菌株对低活力的珠状巨孢囊霉(*G. margarita*)MAFF 520054 孢子定殖数量显著高于高活力孢子(约 1 个数量级以上)。对低活力孢子的定殖,M0601-1G 和 M061122-6G 表现为开始时数量低,然后升高并处于相对平稳的状态,M061122-10G 和 M061122-12G 则一直处于相对平稳的数量状态。对高活力孢子的定殖,M061122-6G 一

直表现为数量逐步上升,其他菌株均为先上升后下降。到第 7 d 时,M061122-10G 仅能检测到很少量的菌体,而 M060106-1G 和 M061122-12G 分别在第 9 d 和第 7 d 已经不能检测到(图 3)。

3 讨论

分析伴生细菌对 AM 真菌宿主的定殖情况具有重要的意义。Artursson 等通过溴脱氧尿苷技术从土

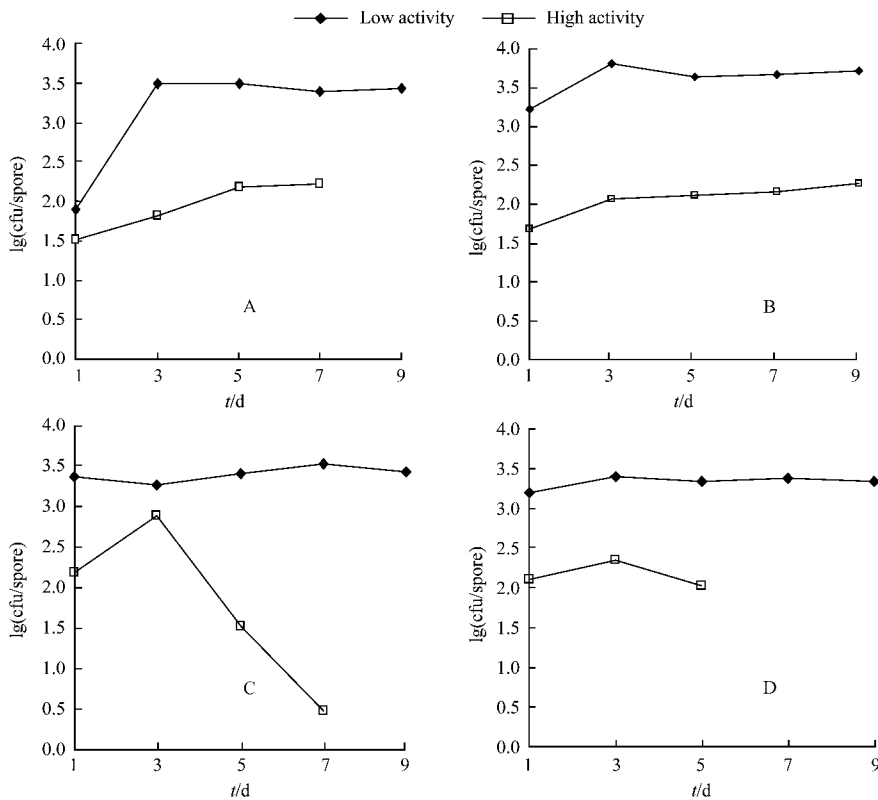


图3 不同活力珠状巨孢囊霉(*G. margarita*)MAFF 520054孢子的GFP标记株定殖数量动态

Fig.3 The population dynamic of GFP-tagged strains colonized on low-vitality or high-vitality *G. margarita* spores. A: M060106-1G; B: M061122-6G; C: M061122-10G; D: M061122-12G.

壤捕获到一株腊状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)VA1,并以绿色荧光蛋白基因(*gfp*)标记技术直接观察到其与球囊霉(*Glomus dussii*)菌丝紧密联系在一起^[15]。本文选取了珠状巨孢囊霉(*G. margarita*)MAFF 520054孢子伴生细菌的常见类群粘状芽孢杆菌(*Paenibacillus*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)和短小芽孢杆菌(*Brevibacillus*)的部分菌株进行了GFP标记。质粒pNF8含有*gfp-mut1*基因和来自单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)的强启动子*P_{dlt}*适合对革兰氏阳性菌株进行标记和进行环境示踪研究^[8,10]。本文以电转化的方法将pNF8导入所有待标记的菌株中,并有效表达了GFP。环状的质粒导入菌体后,可能存在质粒不稳定的情况。通过质粒稳定测定,表明其中4个出发菌的标记株(M060106-1G、M061122-6G、M061122-10G、M061122-12G)具有较好的质粒稳定性(表1)。它们适合作为短期内环境定殖研究的标记菌。

平板共培养条件下,能够检测到4个标记株定殖到珠状巨孢囊霉(*G. margarita*)MAFF 520054的孢子壁上,其中2个菌株(M061122-6G、M061122-

12G)能够定殖于真菌菌丝表面。显然,不同细菌菌株对真菌宿主的定殖能力有所差异。Toljander等研究了不同类群的土壤细菌对球囊霉(*Glomus* sp.)43205和根内球囊霉(*Glomus intraradices*)MUCL43194菌丝的黏附能力^[7]。他们发现各个菌株对AM真菌菌丝的定殖能力相距甚大,其中节杆菌(*Arthrobacter chlorophenolicus*)A6G不能定殖到菌丝,粘状芽孢杆菌(*Paenibacillus brasiliensis*)PB177对活力菌丝的定殖能力强于非活力菌丝,而腊状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)VA1和粘状芽孢杆菌(*Paenibacillus peoriae*)BD62对无活力的菌丝定殖能力强于活力菌丝。这应该与各个菌株的生理特性或营养特性有关。同时,有研究已经表明胞外多糖(EPS)对巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)和根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)黏附AM真菌菌体具有重要的意义^[16]。

本文通过平板计数的方法,研究了GFP标记株对珠状巨孢囊霉(*G. margarita*)MAFF 520054孢子定殖的数量动态。不同pH条件的研究发现,各菌株的定殖动态均呈现为先上升后逐渐降低的趋势,

且 pH 对各菌株定殖数量有不同的影响,有的菌株在高 pH(7.0)下的定殖数量高,有的菌株在低 pH(5.5)下的定殖数量高,有的则不受影响。显然不同细菌菌株具有不同的 pH 适应性,在不同 pH 的自然环境中,AM 真菌孢子上应该会定殖不同种群结构的细菌。同时,研究了 GFP 菌株对不同活力 AM 真菌孢子的定殖情况。AM 真菌孢子在形成过程中,其色泽通常随发育进程而加深^[21]。本试验中所用的珠状巨孢囊霉的新生孢子为乳白色(高活力),成熟孢子为浅黄色,衰老孢子则为黄褐色(低活力)。结果发现,所有菌株定殖低活力孢子的数量远高于高活力的孢子,原因可能是低活力的孢子在湿润的条件下容易衰败,并释放其内部的营养物质,容易使菌体大量繁殖。各细菌菌株对高活力孢子的定殖动态除 M061122-6G 一直是逐步上升的趋势外,其他菌株在后期均难以检测到。可能是这些菌株的定殖能力较低,或者菌株在基质环境下丢失了标记性状。本文证实了分离获得的 AM 真菌伴生细菌能够重新定殖到真菌菌体上,且其定殖数量受到细菌菌株自身的特性和某些环境因素的影响。然而,这些细菌定殖 AM 真菌的内在作用机制还不清楚,进一步研究相关问题将有助于揭示 AM 真菌伴生细菌的生态学功能。

参考文献

- [1] Gianinazzi S, Schüepp H. Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, 1994.
- [2] Powell CL, Bagyaraj DJ. VA mycorrhiza. USA: CRC Press, 1984.
- [3] Mayo K, Davis RE, Motta J. Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore-associated bacteria. *Mycologia*, 1986, 78: 426 - 431.
- [4] 龙良鲲, 姚青, 艾云灿, 等. 丛枝菌根真菌伴生细菌的研究进展. 生态学报(*Acta Ecologica Sinica*), 2007, 27(12): 5345 - 5351.
- [5] Bharadwaj DP, Lundquist P-O, Persson P, et al. Evidence for specificity of cultivable bacteria associated with arbuscular mycorrhizal fungal spores. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 65: 310 - 322.
- [6] Cruz AF, Horii S, Ochiai S, et al. Isolation and analysis of bacteria associated with spores of *Gigaspora margarita*. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 104(6): 1711 - 1717.
- [7] Toljander JF, Artursson V, Paul LR, et al. Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *FEMS Microbiology Letter*, 2005, 254: 34 - 40.
- [8] Fortineau N, Trieu-Cuota P, Gaillota O, et al. Optimization of green fluorescent protein expression vectors for in vitro and in vivo detection of *Listeria monocytogenes*. *Research Microbiology*, 2000, 151: 353 - 360.
- [9] 卢圣栋, 马清钧, 刘德培, 等. 现代分子生物学实验技术. 第二版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.
- [10] Weid IV, Artursson V, Seldin L, et al. Antifungal and root surface colonization properties of GFP-tagged *Paenibacillus brasilensis* PB177. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, 12: 1591-1597.
- [11] Rosado A, Duarte G, Seldin L. Optimization of electroporation procedure to transform *B. polymyxa* SCE2 and other nitrogen-fixing *Bacillus*. *Journal of Microbiology Methods*, 1994, 19: 1-11.
- [12] Ferreira ECN, Clementino VB, Duarte GF, et al. Plasmid transduction in *Paenibacillus polymyxa*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1999, 15: 99 - 104.
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [14] 刘润进, 李晓林. 丛枝菌根及其应用. 北京: 科学出版社, 2000.
- [15] Artursson V, Jansson JK. Use of bromodeoxyuridine immunocapture to identify active bacteria associated with arbuscular mycorrhizal hyphae. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 6208-6215.
- [16] Bianciotto V, Andreotti S, Balestrini R, et al. Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures. *European Journal of Histochemistry*, 2001, 45(1): 39 - 49.

Analysis of bacterial colonization associated with *Gigaspora margarita* spores by green fluorescence protein (GFP) marked technology

Liangkun Long^{1 3} , Qing Yao² , Yuncan Ai³ , Honghui Zhu^{1 *}

(¹ Guangdong Province Institute of Microbiology , Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application , Guangdong Provincial Open Laboratory of Microbial New Application Technique , Guangzhou 510070 , China)

(² College of Horticulture , South China Agricultural University , Guangzhou 510642 , China)

(³ College of Life Science , Sun Yat-sen University , Guangzhou 510275 , China)

Abstract [Objective] We analyzed bacterial colonization associated with spores of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) *Gigaspora margarita* to indicate their ecological niche , and to provide information for further researches on their populations or functions . **[Methods]** Six bacteria strains (*Peaibacillus* sp. M060106-1 , *Peaibacillus* sp. M061122-2 , *Peaibacillus* sp. M061122-6 , *Bacillus* sp. M061122-4 , *Bacillus* sp. M061122-10 and *Brevibacillus* sp. M061122-12) isolated from *G. margarita* spores were tagged with green fluorescence protein (GFP) using the carrier plasmid pNF8 (*gfp-mut1*) . We analyzed the ecological niche and population dynamics of tagged strains on *G. margarita* under different conditions by using fluorescent microscope and/or plate counts . **[Results]** Four strains (M060106-1 , M061122-6 , M061122-10 and M061122-12) were tagged with GFP , showing high plasmid stability . These tagged strains possessed the basic characteristics identical to their original strains and , hence , were fit for short-term study of environmental colonization . All four GFP-tagged strains colonized the spore wall of *G. margarita* , and M061122-6 and M061122-12 further colonized the fungal hyphae . Under different pH conditions , the population dynamic of each GFP-tagged strain on the spores showed the same trend , i. e. first increased and then decreased , and the effects on the population size varied with different pH value . GFP-tagged strains colonized the spores of low viability more easily than those of high viability , and the population dynamic on the spores of high viability was different for each tagged strain . **[Conclusion]** The isolated bacteria associated with *G. margarita* spores can re-colonize the fungal spores , whereas their colonizing ability depends on their characteristics and environmental factors . These data contributes to the further understanding of populations and functions of AMF-associated bacteria .

Keywords : *Gigaspora margarita* ; associated bacteria ; green fluorescence protein (GFP) ; colonization

(本文责编 : 王晋芳)