

研究报告

巨大芽胞杆菌 *luxAB* 标记菌株的根际定殖研究刘健¹ 李俊^{2*} 姜昕² 徐玲玫² 樊蕙² 葛诚²(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)¹(中国农业科学院土壤肥料研究所 北京 100081)²

摘要: 通过三亲本杂交方法成功地用发光酶基因 *luxAB* 标记巨大芽胞杆菌 ATCC14581, 所获得的标记菌株 ATCC14581-L 在不同的条件下能稳定发光。将该标记菌株制成微生物接种剂, 并利用土壤微缩系统将其接种小麦进一步研究它在小麦根际的定殖动态和散布规律。结果发现, ATCC14581-L 在灭菌土壤中的定殖水平高于不灭菌土壤, 在垂直方向上主要的定殖在 0~7cm 根段间, 且随深度增加而降低。ATCC14581-L 在小麦种后第 7d 之前就已达到最高定殖水平, 在初始接种量为 3.40×10^7 cfu/g 根情况下, 第 7d 时灭菌土壤处理的根际菌数为 2.54×10^5 cfu/g 根, 而不灭菌土壤的根际菌数为 8.87×10^4 cfu/g 根; 随着时间的增长, 定殖数量明显降低。

关键词: 巨大芽胞杆菌, 发光酶基因 *luxAB*, 小麦根际, 定殖

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 06-0001-04

STUDY ON ROOT COLONIZATION OF WHEAT BY *luxAB* GENES-MARKED *BACILLUS MEGATERIUM* ATCC14581

LIU Jian¹ LI Jun^{1*} JIANG Xin XU Ling-Mei FAN Hui GE Cheng

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of

Science & Technology, Shanghai 200237)

(Soils & Fertilizers Institute, CAAS, Beijing 100081)

Abstract: By triparental mating, *Bacillus megaterium* ATCC14581 strain marked by *luxAB* gene were successfully obtained, then the ATCC14581-L strain was made to microbial inoculant. After it was inoculated on seeds of wheat, the colonizing dynamics and distribution of the luminescent bacteria ATCC14581-L in the rhizosphere of wheat plant in rhizoboxes were studied by the method of X-ray film imaging and enumeration of luminescent colonies on agar media. The results showed that ATCC14581-L successfully colonized in the rhizosphere of wheat. The population reached to the highest level, 2.54×10^5 and 8.87×10^4 cfu/g root respectively in the sterile soil and unsterile soil after 7 days, with initial inoculant dose of 3.40×10^7 cfu/g root. The population of them trended to be stable and decreased to 4.47×10^3 and 8.57×10^2 cfu/g root respectively after 16th day.

Key words: *B. megaterium*, *LuxAB* gene, Wheat rhizosphere, Colonization

巨大芽胞杆菌是目前微生物肥料生产中常用的菌种之一^[1]。虽然对其应用效果的研究不少, 但对其促进植物生长的机理研究却涉及不多, 且不深入, 尤其对这类菌株在植物根际的定殖动态和散布规律的研究鲜有报道。近年来随着分子生物学向微生物

* 联系作者

收稿日期: 2000-08-09, 修回日期: 2000-10-19

生态学的渗透,特别是基因标记技术的建立与发展,为PGPR菌株的微生态学研究提供了有效手段。目前,国内有用发光酶基因 *luxAB* 标记荧光假单胞菌来研究其在植物根际定殖规律的报道^[2,3],但还没有应用发光酶基因 *luxAB* 成功标记巨大芽胞杆菌的报道;本研究利用基因标记技术对巨大芽胞杆菌在植物根际的定殖进行了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 本实验所用三亲本杂交的受体菌为巨大芽胞杆菌 ATCC14581。供体菌和辅助菌分别是大肠杆菌 (*E. coli*) DH52 (pTR102 + *LuxAB*, Amp^r, Km, Tc^r) 和 *E. coli* MM294 (pRK2013, tra⁺, mob⁻, Spe^r), 由中国农业大学生物学院提供。所有菌株都经过平板划线和镜检确认为纯培养后选用,采用 LB 培养基^[3]进行培养。

1.1.2 试剂: 1mol/LCaCl₂ 溶液用纯水配制,再经 0.22μm 滤器除菌后备用;用乙醇作溶剂配制 33% (W/V) 的癸醛 [CH₃ (CH₂)₈CHO] 母液,使用的液体样品按每毫升加入 1μL 母液,而培养皿菌落检测每次用母液 0.1~0.3mL。抗生素则按实验设计要求制备好所需的浓度 (μg/mL, 括号中的数量为抗生素浓度): 氨苄青霉素 Amp (50, 75, 100)、氯霉素 Cm (20, 50, 75)、卡那霉素 Km (50, 100, 150)、壮观霉素 Spe (20, 40, 60)、链霉素 Str (25, 50, 100)、四环素 Tc (25, 50, 75)。

1.1.3 实验作物和土壤: 供试作物为小麦品种中优-16,由中国农业科学院作物研究所提供。实验土壤取自耕层土壤,经风干后过 2mm 孔径筛,并按土壤与细沙 1:4 比例混匀,用高压蒸汽 1×10⁵Pa,灭菌 1.5h。每盆装土 1.5kg,土壤含水量约为 50%~60%。其养分状况测定见表 1。

表 1 供试土壤的基本理化性状

全氮 (%)	全磷 (%)	全钾 (%)	有机质 (%)	有效磷 (mg/kg)	速效钾 (mg/kg)	缓效钾 (K) (mg/kg)	碱解氮 (N) (mg/kg)	pH
0.098	0.462	2.10	2.23	14.08	714	166	99	7.9

1.2 方法

1.2.1 实验菌株的天然抗性测定: 分别按 3 个抗生素浓度梯度制备抗性平板。使用多头接种器将 ATCC14581 接种于制备好的抗性平板上,置于 28℃ 培养箱培养 48h,观察其天然抗性。

1.2.2 发光酶基因 *luxAB* 标记供试菌株的方法: 参照文献 [2, 3] 介绍的方法进行。

1.2.3 发光酶基因 *luxAB* 标记菌株的稳定性试验: 分别在 LB 和含抗生素的 LB 的平板上进行 15 次传代,并在液体培养和土壤中等不同的情况下检测标记菌株发光酶的活性。

1.2.4 发光酶基因 *luxAB* 标记菌株的检测方法: 采用发光菌落平板计数法^[3],或 X-射线胶片自显影检测^[3],在暗室中自显影的时间为 24~36h。

1.2.5 小麦的根盒栽培: 按图 1 所示制备根盒 (25×25×2.5cm)。按 1:250 浓度用 84 消毒液浸泡 30min,清水洗净后待用。装上灭菌或不灭菌土壤,用自来水将土壤水分调至田间持水量 50%~60%。用 50℃ 温水浸小麦种子 2~3h,经 0.1% 升汞灭菌 3min,再用无菌水冲洗,在装有双层滤纸的培养皿中于 28℃ 过夜,挑选发根 2mm~3mm 长的麦种。用灭菌的 0.85% NaCl 生理盐水制备标记菌株的菌悬液,将准备好的麦种置于菌悬液中

浸泡 5min 接种。然后种植于根盒之中，覆土 1.5cm ~ 2cm，每盒 2 棵。

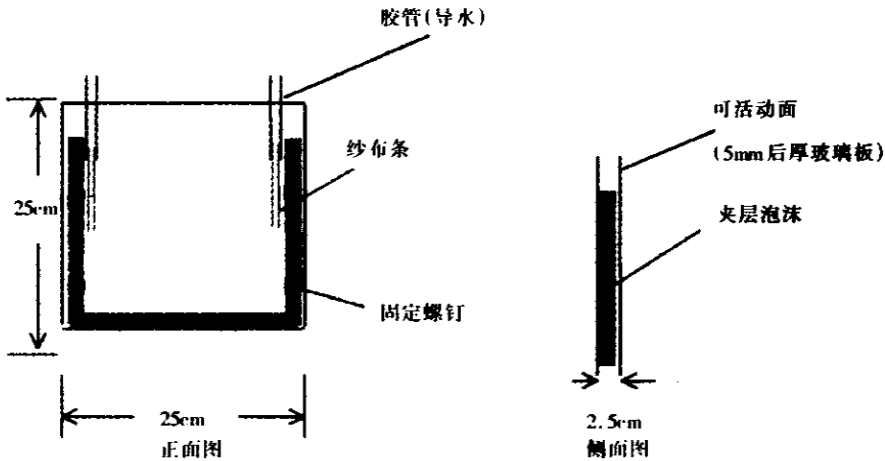


图 1 根盒结构

1.2.6 根盒栽培系统中小麦根际的定殖动态和分布规律的研究方法：将小麦根系从上至下分为上、中、下 3 个区段，取样时先卸下可活动玻璃面，按无菌操作规程，从下至上（以免交叉污染），用无菌的剪刀和镊子将相同部位的根段剪下，抖落根系上的土粒，分别放入已编号的无菌培养皿中。根段称重后按平板稀释计数法统计发光菌落数。取样的时间分别为 7d、16d、24d 和 36d。

2 结果

2.1 标记菌株的获得及其稳定性检测

经过天然抗性测定，待标记的菌株 ATCC14581 可用 $40\mu\text{g}/\text{mL}$ 的壮观霉素 Spe 进行抗性筛选。供体菌大肠杆菌 DH52 (pTR102 + *luxAB*) 则用卡那霉素 Km 在 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 下进行筛选。经过三亲本杂交，结合抗性平板，筛选出带有发光酶活性的阳性菌落，即为 *luxAB* 基因标记的菌株，编号为 ATCC14581-L。

ATCC14581-L 菌株在 LB 和含抗生素的 LB 平板上传接 15 代，并将其液体培养物直接加入反应底物和接种于

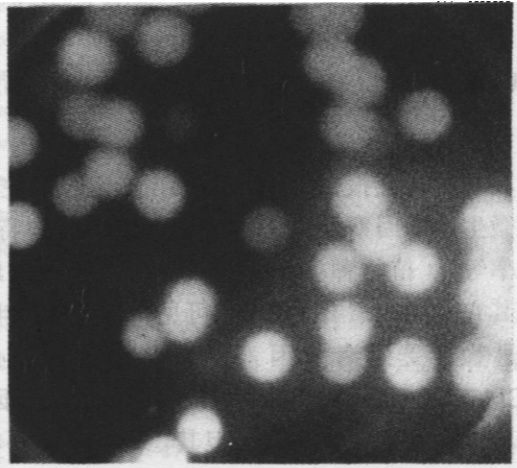


图 2 ATCC14581-L X-射线胶片自显影发光菌落

土壤中，检验结果均能稳定发光，表明标记菌株具有较好的遗传稳定性。图 2 是 ATCC14581-L 接种于小麦根圈土壤后，用 X-射线胶片自显影 36h 检测的发光菌落情况。

2.2 ATCC14581-L 菌株在小麦根圈的定殖动态和分布规律

表 2 和图 3 反映出发光酶基因标记菌株 ATCC14581-L 在小麦根圈的定殖数量和在小麦根际的分布情况。结果表明，无论土壤灭菌与否，ATCC14581-L 在小麦根圈的定殖动

态变化规律相似,但标记菌株在灭菌土壤上的定殖水平高于不灭菌土壤。随着时间增长,接种菌株的定殖数量均降低。发现在小麦播种后第7d之前接种菌株就已经达到了最高的定殖水平,第7d的根际菌数测定结果为:灭菌处理的土壤 2.54×10^5 cfu/g 根,而不灭菌土壤是 8.87×10^4 cfu/g 根;在垂直分布上,标记菌株则主要定殖在0~7cm的根段间,且随着深度的增加,定殖的数量降低。

表2 ATCC14581-L 在小麦根圈的定殖数量和分布 (cfu/g 根)

根层 (cm)	土壤处理	t (d)				
		1	7	16	24	36
0~7	不灭菌土壤	3.40×10^7	8.87×10^4	8.57×10^2	6.13×10^2	+
	灭菌土壤	3.40×10^7	2.54×10^5	4.74×10^3	2.84×10^3	2.12×10^2
7~14	不灭菌土壤	0	-	-	-	-
	灭菌土壤	0	+	+	+	+
14~21	不灭菌土壤	0	-	-	-	-
	灭菌土壤	0	-	-	-	-

“-”表示土壤原液不能检测到发光菌落,“+”表示土壤原液能检测到发光菌落

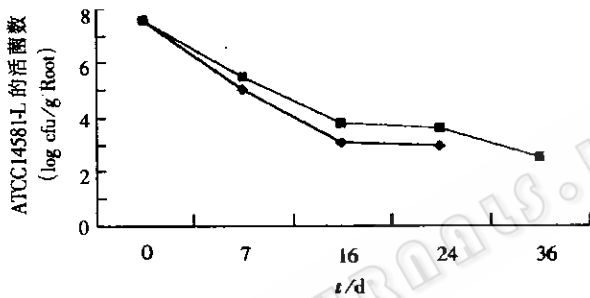


图3 ATCC14581-L 在小麦根际的定殖动态(0~7cm)

◆ 不灭菌, ■ 灭菌

3 讨论

引入植物根际的接种菌株要稳定地发挥其功效,在植物根部的成功定殖是首要的关键,因此,研究接种微生物在植物根圈的定殖动态规律是十分重要和有应用价值的。在灭菌土壤处理中,接种菌株的定殖数量较未灭菌土壤的定殖数高,其原因是不灭菌土壤中包括病原微生物在内的土著微生物活动影响了标记菌株的定殖能

力。其它的研究报告发现, *LuxAB* 标记菌株在小麦根圈的定殖能力和分布范围,除了土著微生物的因素外,还与接种菌株本身的特性(细胞表面性质、渗透压耐受性及生长速率等)、植物种类、土壤类型(溶重、质地等)、土壤条件(水分、温度、pH等)以及其它一些因素有关^[4,5]。可见,接种的微生物在植物根际的定殖是一个非常复杂的动态过程,受到诸多因素的影响。因而有必要进行更深入的研究,以揭示影响 ATCC14581-L 标记菌株在植物根际定殖的关键因子。另一方面,尽管发光酶基因的标记简便易行,优于抗性标记,但其稳定性还需要在不同的试验条件下进行更多的验证。

参 考 文 献

- [1] 葛 诚主编. 微生物肥料生产应用基础. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [2] 莫才清, 李卓棣. 大豆科学, 1998, 17 (13): 19~22.
- [3] Akkermans A D L, Elsas J D, Bruijn F J. Molecular Microbial Ecology Manual. Kluwer Academic Publishers, 1996.
- [4] Kloeppe J W, Beauchamp C J. A review of issues related to measuring colonization of plant by bacteria. Can. J. Microbiol, 1992, 38: 1219~1232.
- [5] Rattray E A S, Tyrrell J A, Proser J I. Effects of soil bulk density and temperature on wheat rhizosphere colonization by lux-marked *Ps. fluorescens*. Eur. J. SOIL. Biol. 1993, 29 (2): 73~82.