

外源基因标记的紫云英根瘤菌在水稻根部的定殖研究

张晓霞, 王 平*, 冯新梅, 胡正嘉

(华中农业大学生命科学技术学院农业微生物重点实验室, 武汉 430070)

摘要:前期研究中已证实紫云英根瘤菌(*Rhizobium astragalus*)JS5A16 菌株对水稻生长有一定的促生作用, 利用 *gusA* 基因标记的 JS5A16 菌株(编号为 JS5A16G)接种水稻种子并检测其在水稻(汕优 63)生长初期的根圈定殖动态及分布。结果表明菌株 JS5A16G 在水稻出苗后 2d 根圈定殖密度大量增加, 第 4 天达到最大值 16d 后趋于稳定。将水稻根表面灭菌后, 检测菌株 JS5A16G 在根内的定殖情况, 发现在“汕优 63”出苗后 2d 检测不出菌株 JS5A16G, 第 4 天可检测出。根部直接染色显示, 菌株 JS5A16G 在根部的分布并不均匀, 主要是在根系的某些部位形成微菌落。同时利用 *luxAB* 发光酶基因标记紫云英根瘤菌 JS5A16 菌株(编号为 JS5A16L)研究其不同品种水稻根部的定殖动态。结果表明, 菌株 JS5A16L 在不同水稻品种“汕优 63”、“汕优 64”和“马协 118-2”根部的定殖密度不同且可以进入不同水稻品种的根内。在整个水稻生长期菌株 JS5A16L 在“汕优 64”根部的定殖密度明显高于其在“汕优 63”根部的定殖密度, 在“马协 118-2”的定殖密度与其在“汕优 63”、“汕优 64”根部相比没有显著差异。但菌株 JS5A16L 在不同水稻根部的定殖动态相似, 数量均在水稻生长到 60~75d 时(即水稻的孕穗期)达到最高值。

关键词:紫云英根瘤菌; 水稻; 根圈定殖; 基因标记

Study on root colonazition of rice by genes marked *Rhizobium astragalus*

ZHANG Xiao-Xia, WANG Ping, FENG Xin-Mei, HU Zheng-Jia (Department of Microbial Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23 (4): 771~776.

Abstract:Root colonization of rice by *Rhizobium astragalus* JS5A16 marked with *gusA* and *luxAB* genes respectively was monitored. The strain has been proved to be a rice-growth promoting bacterium. In the experiment with Jensen sterile nitrogen-free medium, the *gusA* gene marked strain JS5A16G could successfully colonize the rhizosphere of rice. It multiplied rapidly after sprouted for 2~4 days, the highest colonization density was reached on 4th day, then its population began to decrease and trended to be stable. Strain JS5A16G was also found in endorhizosphere after 4th day of spoution. The localization of strain JS5A16G was visualized with steromicroscopy and x-GlucA staining of rice root. It formed

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970027)

收稿日期:2002-01-18; **修订日期:**2002-07-11

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: pwang118@hotmail.com

作者简介:张晓霞(1974~), 女, 内蒙古赤峰人, 现在中国农业科学院土壤肥料研究所工作, 主要从事农业微生物菌种资源的收集、保藏及利用研究。

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(No. 39970027)

Received date: 2002-01-18; **Accepted date:** 2002-07-11

Biography: 张晓霞, Mainly engaged in the collection, preservation and application of agricultural microorganisms.

microclonnies and which distributed on the root unevenly.

The colonization density of *luxAB* genes marked strain JS5A16L in rhizosphere of three different rice cultivars “Shan You 63”, “Shan You 64”, “Ma Xie 118-2” was different in sterile pot soil experiments, however, it entried into the inner of rice root. All of the colonization density reached the maximum after strain JS5A16L coated seeds sown for 60~75 days. The colonization density of JS5A16L in the root of “Shan You 64” was significantly higher than that in “Shan You 63”. Strain JS5A16L could get into the endorhizosphere of different rice cultivars.

Key words: *Rhizobium astragalus*; rice; colonization; marker gene

文章编号:1000-0933(2003)04-0771-06 中图分类号:Q938.1+3 文献标识码:A

根瘤菌诱导豆科植物结瘤固氮具有很强的宿主专一性。最近一些研究表明,有的根瘤菌能定殖在非豆科植物根部,并能促进其生长^[1~5]。尽管这一作用远不如共生结瘤固氮作用显著,但接种根瘤菌后,能增加非豆科作物产量,因此,受到人们极大关注。

大量研究表明,植物促生菌(Plant Growth-promoting Rhzobacteria,简称 PGPR)引入植物根部后能否有效地抑制病害发生,促进作物生长,关键取决于该菌在不断伸展的植物根圈的定殖能力。为揭示 PGPR 的作用机理,提高 PGPR 在农业生产中的应用效果,关键是要研究清楚 PGPR 在植物根圈的活动规律。但长期以来面临的主要问题是如何将接种的微生物与土著性根圈微生物区分开^[6,7]。目前,基因标记检测技术、PCR 扩增技术、菌株特异性单克隆技术和菌种特异性寡核苷酸基因探针等技术已经广泛应用到微生物生态学研究领域。将标记基因导入供试细菌,可以将其与其它同类土著菌分开的外源基因标记技术已得到了十分广泛的应用^[7]。采用发光酶基因(如 *lux*)、染料裂解酶基因(如 *celB*, *glucA*, *lacZ* 等)、绿荧光蛋白基因(*gfp*)标记供试菌株,原位研究其在根部、叶面的定殖动态、容量或土壤中的群体数量,具有稳定性好、灵敏度高、选择性强、直观快速等特点,因此具有良好的应用前景^[6]。本项研究分别采用 *gusA* 和 *luxAB* 基因标记和检测技术研究具水稻促生作用的紫云英根瘤菌在水稻根圈的定殖动态,为今后进一步研究该菌株与水稻的关系、促生机理,并为提高其应用效果提供指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

(1)供试菌株 JS5A16G 菌株 *gusA* 基因标记的紫云英根瘤菌 JS5A16;抗性:Sp^r 100μg/ml, Ery^r 50μg/ml; JS5A16L 菌株 *luxAB* 基因标记的紫云英根瘤菌 JS5A16;抗性:Km^r 50μg/ml, Ery^r 50μg/ml; 以上菌株由本室提供。

(2)供试水稻 汕优 63,汕优 64,马协 118-2,购于湖北省种子公司。

(3)培养基^[16] SM 培养基、Jensen 半固体培养基(无氮植物培养基)、PDA 培养基。

(4) x-GlucA 缓冲液的配制 5ml 50mM Na₃PO₄ 5ml 10mM EDTA, 2.5ml 0.05% SDS, 5ml 0.1% Sarkoryl, 5ml 0.1% Triton x-100 加 27.555ml 的水,配制成 50ml 的 x-GlucA 缓冲液。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株 JS5A16G 在水稻生长初期根部定殖的检测 (1)接种物的准备 取经活化的紫云英根瘤菌菌苔一环接种到 100ml SM 液体培养基中,28℃ 150r/min 摇床培养 48h。

(2)水稻种子的准备 选饱满的水稻种子,去壳,蒸馏水洗净,75%的酒精浸泡 5min,水洗 3 次(每次浸泡 10min),再用 3%~4%次氯酸钠,浸泡 5min,然后用无菌水充分冲洗干净,28℃、150r/min 摇床浸泡 4~5h 后点种到 PDA 平板上,28℃,暗室催芽^[8]。

(3)接种及播种 将催好芽的水稻种子分别挑到活化好的菌悬液 JS5A16G 中(不接种对照的水稻挑入 SM 液体培养基中),浸泡约 2h 后,取出浸在 JS5A16G 菌液中的种子约 20 颗,用平板计数法测每颗种子的接种量。所有数据下将种子按 3 粒/支播入装有 Jensen 培养基的试管(35mm×210mm)中。

(4)取样测数及染色 自水稻出苗之日起,第 2、4、8、16、32 天分别取样。具体方法为:在无菌条件下,

用镊子取出 3 株水稻苗,剪下根并称重,放入带有无菌玻珠的无菌三角瓶中,加入无菌水 10 倍稀释样品;涡旋震荡 10min 后,将样品悬液 10 倍系列稀释到 $10^{-6} \sim 10^{-8}$,取 4~6 或 4~8 稀释度的菌悬液涂加有 x-GlucA 和卡那霉素的 SM 选择性平板。取出经震荡过的根,以无菌水清洗、表面灭菌(75%酒精 5min,3%~4%次氯酸钠 5min)后,再用无菌研钵研磨成匀浆并 10 倍系列稀释至 10^{-3} ,取 0~3 各稀释度悬液涂加有 x-GlucA 卡那霉素的 SM 选择性平板计数有色菌落;同时取另 2 管水稻,将根洗净后进行 x-GlucA 组织染色并照相。

1.2.2 无菌盆栽条件下菌株 JS5A16L 在不同水稻根部定殖的检测 (1)采用 3 个不同的水稻品种 “汕优 63”,“汕优 64”,“马协 118-2”,分别接种紫云英根瘤菌 JS5A16L。

(2)接种物及水稻种子的准备、接种方法均与上同,栽培容器为塑料小桶(高×上底×下底= 14.5 cm ×17cm×12cm)。

(3)取样方法 自水稻出苗之日起,每隔 15d 取一次样,共取 7 次,每次每个处理取 3 盆。具体方法为:用镊子轻轻挑去根部的泥块,根部只带有少量的泥土;称取上述根土样 10g,放入盛有 90 ml 无菌水及玻珠的三角瓶中,涡旋震荡 10min,将菌悬液 10 倍系列稀释到合适浓度,取适当稀释度悬液涂加有卡那霉素、红霉素、放线菌酮的 SM 抗性平板。取出震荡过的根,经无菌水清洗、表面灭菌(75%酒精 5min,3%~4%次氯酸钠 5min)后,再用无菌研钵研磨成匀浆;10 倍系列稀释到 10^{-3} ,取 0~3 各稀释度悬液涂 SM 卡那霉素抗性平板。以上平板置于 28℃培养,约 5~8d 后观察结果。检测方法是在培养皿盖内加入 5μl 的癸醛,于 28℃暗室中观察并计数发光菌落。

1.2.3 统计分析 上述试验多个平均数间采用 SSR 检测(新复极差检测)进行显著性差异分析。

2 结果分析

2.1 菌株 JS5A16G 在水稻生长初期的定殖动态

采用加入 x-GlucA 的 SM 红霉素抗性平板系列稀释测数法,检测在水稻生长 2、4、8、16、32d 时菌株 JS5A16G 在水稻根部定殖密度的变化。其变化动态如图 1。

由图 1 可以看出,在 Jensen 琼脂管栽培条件下,在水稻生长初期(一个月内)紫云英根瘤菌 JS5A16G 能在水稻根圈定殖并增殖。在水稻出苗后的最初两天,根瘤菌开始在水稻根表大量繁殖,第 4 天后达到最大值(9.75 log cfu/g 根鲜重),然后开始减少,16d 后下降趋势减缓,逐渐趋于稳定(5.69 log cfu/g 根鲜重)。将根表面灭菌后,测得菌株 JS5A16G 在根内的定殖动态变化。在水稻生长第 4 天时可检测出根内的紫云英根瘤菌,数量为 1.52 log cfu/g 根鲜重。8d 后达到高峰并趋于稳定,数量为 1.98 log cfu/g 根鲜重。

直接对水稻根系进行 x-GlucA 组织化学染色结果如图 2 所示。从图 2 可以看出菌株 JS5A16G 在水稻根系的定殖部位。JS5A16G 可出现在水稻种子的表面、根基部、根尖、根突起物及其基部、侧根表面、根分支基部,并形成较大的种群。

2.2 菌株 JS5A16L 在不同水稻品种根部的定殖动态

为了研究紫云英根瘤菌在不同水稻品种根圈的定殖能力,在无菌土盆栽条件下栽培不同品种的水稻,在水稻整个生长周期内,每 15d 取一次根样测定紫云英根瘤菌 JS5A16L 在水稻根圈的定殖密度,检测结果如图 3。

从图 3 可以看出,在整个实验时间内,同一种根瘤菌在不同品种水稻根外的定殖密度虽然不同,但定殖动态相似。菌株 JS5A16L 的数量均在水稻生长到 60~75d 时(即在水稻的孕穗期)达到最高值,然后逐渐下降。在整个生长期内,菌株 JS5A16L 在“汕优 64”根圈的定殖密度要明显高于其在“汕优 63”根圈。差异达

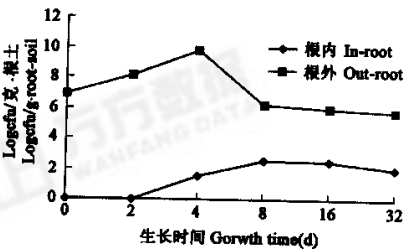


图 1 菌株 JS5A16G 在水稻生长初期根圈定殖的动态变化

Fig.1 Variation of strain JS5A16G colonization in the rhizosphere of rice

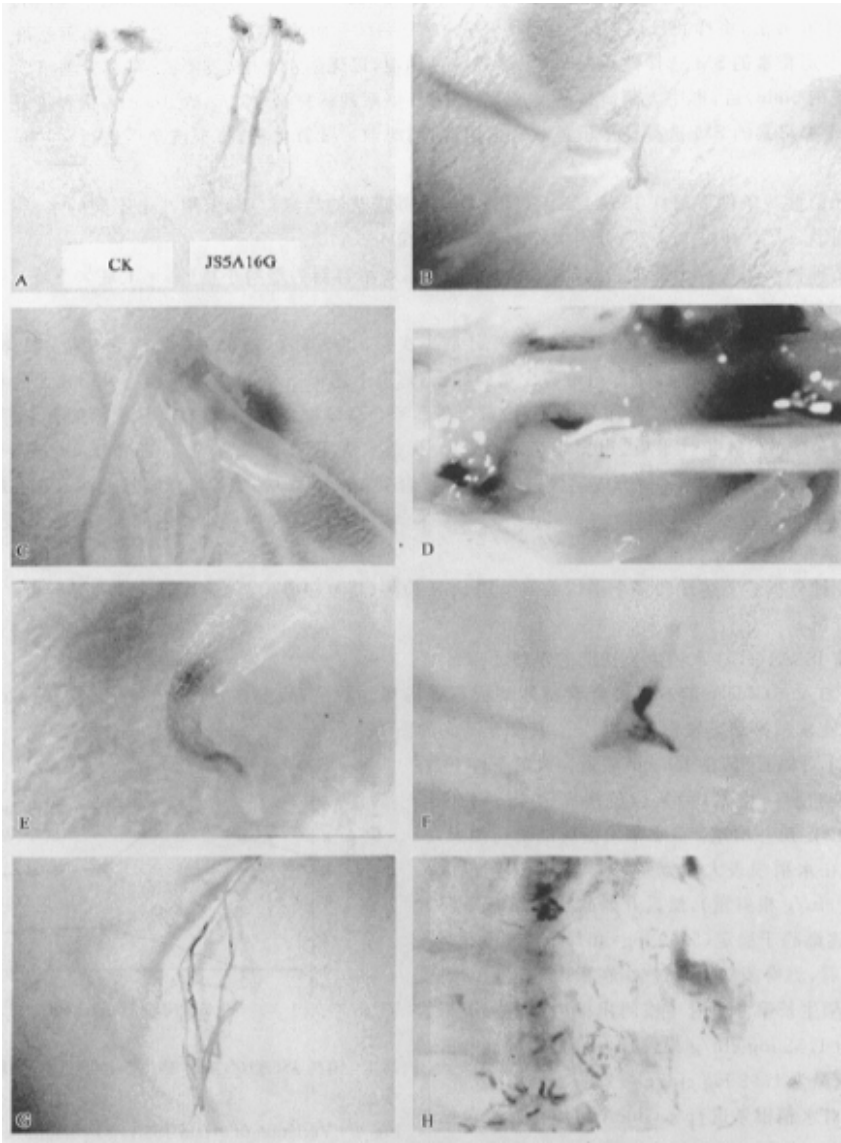


图 2 菌株 JS5A16G 在水稻生长初期根圈不同部位的定殖

Fig. 2 Visualization of colonization of strain JS5A16G in rice rhizosphere

A x-GlucA 染色的水稻根系 X-GlucA strained rice root; B 未接种的水稻根系 Non-inoculated rice root; C 接种 JS5A16G 的水稻根 Inoculated X-GlucA strained rice root; D 接种水稻根基部 Inoculated, X-GlucA strained bottom rice root; E 接种水稻根尖图 Inoculated, X-GlucA strained bottom rice root tip; F 接种水稻根部突起物基部 Inoculated, X-GlucA strained rice root tuber; G 接种水稻侧根表面 Inoculated, X-GlucA strained bottom rice root side; H 接种水稻根表细菌 Inoculated, X-GlucA strained rice root surface

到显著水平 ($\alpha < 0.05$),而在“马协 118-2”根圈的定殖密度与在“汕优 63”、“汕优 64”根圈的相比没有显著差异。

万方数据

此外,在接种量相同的条件下,第 1 次取样时菌株 JS5A16L 在“汕优 64”根部的定殖密度明显高于其

在“汕优 63”根部,说明接种后菌株 JS5A16L 在“汕优 64”根部的繁殖速度要比在“汕优 63”根部快。

由图 3 还可看出,菌株 JS5A16L 在不同品种水稻根内的定殖动态略有不同,但都是在水稻的生长初期达到最高值,然后逐渐下降。比较整个生长期,3 种水稻之间的定殖密度没有显著差异。值得一提的是,在第 75 天(即孕穗期)取样时,根内的菌数均出现了一个小的峰值。

3 讨论

本项研究通过琼脂管栽培系统,发现在水稻生长初期紫云英根瘤菌 JS5A16G 能在水稻根圈大量繁殖,且能在根内达到一定的定殖水平。一般认为,根瘤菌进入水稻根的途径主要有两种:(1),通过水稻根表皮的裂隙及侧根生成时的缝隙进入水稻根部;(2),通过根伸长生长过程中形成的伤口进入根内。其过程是,首先,根瘤菌以不同方式进入水稻根表皮细胞间隙,然后进一步进入皮质层细胞之间或死细胞内^[1,2,9]。关于根瘤菌可以成功地定殖到非豆科植物根圈的报道近年来越来越多。如用豌豆根瘤菌三叶草变种接种玉米、用三叶草根瘤菌接种生菜、用紫云英根瘤菌接种小麦、棉花等^[3~5,10,11]。

通过对根瘤菌在水稻根圈的定殖及扩散规律进行原位观察,发现菌株 JS5A16G 细胞在根表面并不呈均匀分布,而是集中分布在根表的某些部位,说明根面存在着有利于紫云英根瘤菌 JS5A16 生长繁殖的特定生态位,Weller 和 Rattray 等认为植物根表面存在着有利于 PGPR 生长繁殖的生态位,一般位于表皮细胞间隙或裂缝处、侧根、根毛或其它突起物基部或发生处^[12,13]。PGPR 可优先定殖于这些部位,利用其分泌物不断繁殖形成较大的种群,可以排斥有害根圈微生物的定殖扩展,减少其对植物造成的有害影响^[12,14]。而本研究表明,紫云英根瘤菌也具备这些定殖特征和根圈适应性,是一种很有潜力的 PGPR。

利用 *luxAB* 基因标记的紫云英根瘤菌菌株 JS5A16L 研究其在 3 种不同水稻品种根部的定殖,发现在整个实验过程中,虽然同一种根瘤菌在不同水稻根圈的定殖密度不同,但定殖的密度变化规律相似。它表明根圈微环境也有一定的自我维持生态平衡的能力,这也就是施入土壤的外源细菌无法始终维持自身较高定殖水平的原因。

就整个生长期而言,菌株 JS5A16L 在“汕优 64”外根圈的定殖密度要明显高于在“汕优 63”根圈的定殖密度,这可能与水稻生长初期根瘤菌在“汕优 64”根圈数量较多有关,这一结果与 Jemba 等的报道一致,Jemba 用 19 种不同的大豆根瘤菌接种大豆,最后的菌株数量明显不同,进一步研究表明引入菌株在植物根部定殖的能力与细菌对根的吸附力、细菌在液体培养基中的生长速度、根圈周围原生动物的密度及根圈周围可利用 C 源的浓度无关,引入菌株在植物根圈所达到的最大值主要取决于细菌最初的生长数量^[15]。

采用两种不同标记基因检测技术研究表明,不论在完全无菌的 Jensen 无氮植物培养基条件下还是在无菌土盆栽条件下,紫云英根瘤菌都能成功的进入水稻根内定殖,这一结果与 Yanni 等人的研究结果一致,他们采用 *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* 接种田间和悉生条件下的水稻,发现根瘤菌均可定殖于水稻根表及根内,而且定殖的程度与水稻品种、菌株类型有关^[3,16~18]。

研究表明,紫云英根瘤菌不但可以在水稻根圈定殖,还可以进入水稻根内,具有作为水稻 PGPR 的潜能,但其与土著微生物竞争水稻根圈生态位的能力有待进一步研究。

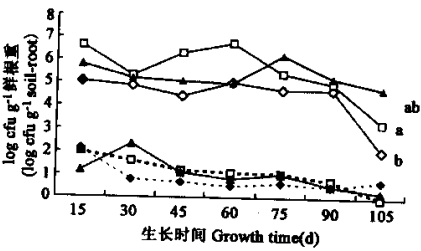


图 3 菌株 JS5A16L 在水稻根圈定殖的动态变化
Fig. 3 Dynamic of strain JS5A16L colonization in rhizosphere of three rice cultivars

- ◇—汕优 63 根外 Shan You 63 Ectorhizo sphere;
- 汕优 64 根内 Shan You 64 Endorhizo sphere;
- ◆—汕优 63 根内 Shan You 63 Endorhizo sphere;
- ▲—马协 118-2 根外 Ma Xie 118-2 Ectorhizo sphere;
- 汕优 64 根外 Shan You 64 Ectorhizo sphere;
- ▲—马协 118-2 根内 Ma Xie 118-2 Endorhizo sphere

References: 万方数据

[1] De Bruiji. Potential and pitfalls of trying to extend symbioti interactions of nitrogen-fixing organisms to prensently

non-nodulated plants, such as rice. *Plant and Soil*, 1995, **174**:225~240.

- [2] Rattray E A S, Prosser J I, Killham K, *et al.* Luminescent-based nonextractive technique for in situ detection of *Escherichia coli* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, Nov, 3368~3374.
- [3] Wang P, Feng X M, Zhang X X, *et al.* Marking *Rhizobium* Huakuii JS5A16 with Luminescent Enzyme Gene and its Detection. *J. Huazhong Agri. Uni.*, 1999, **28**:135~140.
- [4] Zhang X X, Wang P, Feng X M, *et al.* Screening Growth-promoting *Rhizobium* astragalus form rice and study on their colonization in rice Rhizosphere. *J. of App. and Envirn.*, 2002, **8**(2), 195~199.
- [5] Zhang X X, Wang P, Feng X M, *et al.* Screening of Rice Growth-Promoting *Rhizobia* Astragalus. *Siol and Fertilizer*, 2001, **6**:30~33, 45.
- [6] Wang P, Wang Q, Feng X M. Root Clonization of non-legume plants by *luxAB* and *gusA* genes marked HuaKuii JS5A16. *J. Huazhong Agri. Uni.*, 1999, **18**(3): 238~242.
- [7] Weller D M, and Cook R J. Suppression of take-all of wheat by seeds treatment with *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathol.*, 1983, **73**:483~496.
- [8] Barraquio W L, Revilla and Ladha J K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant and Soil*, 1997, **194**: 15~24.
- [9] Ladha J K and Reddy P M. Extension of nitrogen fixation to rice necessity and possibilities. *Geo. Journal*, 1995, **35**(3): 363~372.
- [10] Reddy P M, Ladha J K, SO R B. Rhizobial communication with rice roots: Induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. *Plant and Soil*, 1997, **194**:81~98.
- [11] Wang P, Li F D. Several Important Problems about Root Colonization of Bacteria. *Development of Pedology*, 1994, **22**(6):35~41.
- [12] Mazzola M, Cook R J, Thomshaw, L S, *et al.* Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, Aug, 2616~2624.
- [13] Schlöter W, Wiehe W, Assmus H S, *et al.* Root colonization of different plants by plant growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera. *Appl. and Environl. Microbiol.*, 1997, **63**(5): 2038~2046.
- [14] Li F D, Yu Z N, He S J. *Test technique in Agricultural Microbiology*. Beijing: Chinese Agricultural Publishing Company, Beijing, 1996. 32~34.
- [15] Jemba P K, Martin A. Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria, *Soil Biol Biochem.*, 1999, **31**:623~632.
- [16] Hardy R W F and eaglesham A R j. Ecology and agriculture applications of nitrogen-fixing system: overview in nitrogen fixation: fundamentals and applications. In: A. Tikhonovich, *et al* eds. Kluwer Academic Publishers. The Netherland, 1995. 619~620.
- [17] Wang P, Li F D. The Application of marker Gene in the study of Rhizosphere Colonization. *J. of Biotech.*, 1994, **5**:9~12.
- [18] Yanni Y G, Rizk R Y, Corich V. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant and Soil*, 1997, **194**:99~114.

参考文献:

- [3] 王平, 冯新梅, 张学贤, 等. 华癸根瘤菌 JS5A16 的发光酶基因标记及其检测. 华中农业大学学报, 1999b, **28**:135~140.
- [4] 张晓霞, 王平, 冯新梅, 等. 从水稻种子表面分离的紫云英根瘤菌与不同水稻品种亲和性的研究. 应用与环境生态学报, 2002, **8**(2): 195~199.
- [5] 张晓霞, 王平, 冯新梅, 等. 水稻有促生作用的紫云英根瘤菌筛选初报. 土壤肥料, 2001, **6**:30~33, 45.
- [6] 王平, 王勤, 冯新梅, 等. 华癸根瘤菌在非豆科植物根圈定殖能力的研究. 华中农业大学学报, 1999a, **18**(3):238~242.
- [11] 王平, 李阜棣. 有关细菌根部定殖的几个重要问题. 土壤学进展, 1994a, **22**(6):35~41.
- [14] 李阜棣, 喻子生, 何绍江. 农业微生物学实验技术. 中国农业出版社, 1996. 32~34.
- [17] 王平, 李阜棣. 标记基因在根圈细菌定殖研究中的应用. 生物技术通报, 1994b, **5**:9~12.