

利用发光酶基因标记技术跟踪 棉花根圈中的绿针假单胞菌 PL9L^{*}

柏建玲^{**} 王 平 胡正嘉^{***}

(华中农业大学微生物科学技术系 武汉 430070)

提 要 采用细菌转化和杂交的方法,成功地将全套发光酶基因标记系统 Tn7-luxCDABE 引入绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*) PL9,得到稳定的发光标记菌 PL9L。采用发光菌落平板计数法和 X-射线胶片自显影法,通过盆栽试验和盒栽试验,研究了发光标记菌 PL9L 在棉花根圈的定殖动态和分布规律。盆栽试验结果表明,在灭菌土盆栽中,播种后 6d 左右 PL9L 在棉花根圈的定殖水平达最高(3.1×10^9 cfu/g 根土),播种后 56d 左右趋向稳定,PL9L 数量为 1.7×10^2 cfu/g 根土。未灭菌土盆栽中,播种后 8d 左右 PL9L 的定殖水平达最高(1.1×10^9 cfu/g 根土),46d 左右趋向稳定,菌数为 1.4×10^2 cfu/g 根土。盒栽试验结果表明,PL9L 可从种子向根尖方向扩散,但并不与根的伸长生长同步,播种后 36d,灭菌土盒栽中 PL9L 可扩散至种子下方 12.0cm 以内,而未灭菌土盒栽中 PL9L 扩散至 11.0cm 以内。在棉花根尖区域均未检测到 PL9L。

关键词 发光酶标记基因 绿叶假单胞菌 棉花根圈 定殖动态

分类号 Q344 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)01-0043-48

八十年代以来,在土壤微生物学的研究领域内,关于植物促生根圈细菌(Plant Growth-promoting Rhizobacteria,简称 PGPR)的研究已形成一个热点。PGPR 对植物的促生作用可直接来自它们产生的活性物质,也可来自其产生的抑制病原微生物的物质,间接地起促生作用^[1,2]。但不论是何种作用,其成功的根部定殖必不可少。PGPR 在植物根部的定殖与活动规律受到很多因素的影响,有非生物因素(如水势、温度、pH 等)和生物因素(宿主植物、细菌本身特性等)^[3]。由于传统的研究方法难以将引入的 PGPR 菌株与同类土著性细菌分开,以致研究结果准确性不高。

随着分子生物学技术的发展,跟踪释放到自然环境中的微生物和遗传物质的效果也得到了大大提高。免疫学方法、核酸探针技术虽然能准确检测释放到环境中的特殊微生物群,但不能区别死、活细胞,且费时费力^[4]。外源分子标记技术则克服了这些缺点,标记基因种类很多,其中发光酶基因标记技术因其灵敏度高、选择性强、重复性强、快速且能原位检测等优点,近年来在微生物生态学中应用最普遍^[6~7]。本项研究采用全套发光酶基因(luxCDABE)标记技术,将 Tn7-luxCDABE 标记系统引入目标细菌,结合使用 X-射线胶片自显影和发光菌落平板计数法,研究 PGPR 菌株 *Pseudomonas chlororaphis* PL9 在棉花根圈的定殖动态和分布规律,为 PGPR 的应用提供依据。

^{*} 国家自然科学基金资助项目(No. 39370019)

^{**} 1997 届硕士毕业生,现在工作单位:广东省微生物研究所

^{***} 通讯作者

收稿日期:1997-07-21,修回日期:1998-01-20

1 材料和方法

1.1 供试菌种与材料

1.1.1 供体菌和辅助菌:大肠杆菌 *E. coli* JM109(pHSK728R),质粒 pHSK728R 为质粒 pHSK728 含 *rib* 启动子、*lac* 操纵子的衍生质粒, pHSK728 含转座子 Tn7-luxCDABE、具有 Sm^{r} [8-9],大肠杆菌 *E. coli* S17-1(pMON7181), pMON7181 含 *att*Tn7、具有 Gm^{r} 等 [9]。以上两菌株由美国加州大学 Growley 教授赠送。

1.1.2 绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)PL9 :系本项研究从棉花根圈分离得到。

1.1.3 培养基 :MG 培养基 [9],KB 培养基 [10],LB 培养基 [11]。

1.1.4 抗生素及其使用浓度 :卡那霉素(Km),100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,链霉素(Sm),100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,庆大霉素(Gm),15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。以上抗生素粉剂均购自 Sigma 公司。

1.1.5 用于质粒提取和细胞转化的溶液和试剂 均按文献 [11] 制备。

1.2 发光酶基因标记系统(Tn7-luxCDABE)向受体菌的转移

参考文献 [9] 和 [11] 介绍的方法进行。

1.3 灭菌土和不灭菌土盆栽试验

1.4 取样及发光标记菌株测定方法

参考文献 [2] 介绍的方法进行。

1.4.1 分段和整根系测数 :参照文献 [12] 介绍的方法进行。

1.4.2 X-射线胶片自显影法记录发光标记菌株在棉花根系上的分布 :将根盒打开 ,小心取出整个棉花根系 ,按原样摆放在含有 Sm 的 KB 平板上(15cm 培养皿或大方盘) 28℃ 培养 16~20h ,在暗室中将 X-射线胶片压在培养皿或大方盘背面 ,曝光适当时间后 ,冲洗 X-射线胶片 ,观察发光菌在根系上的分布。

1.5 灭菌土和不灭菌土盆栽试验

接种物、棉种的准备及接种方法同盆栽试验。

取菜园土打散 ,加水拌匀 ,装钵 ,装量为 3kg/钵 ,126℃ 湿热灭菌 2 h ,冷却后浇无菌水保湿 5~7d 后播种 ,每钵播入 6 粒出芽棉种。苗出齐后 ,定苗 3 株/钵 ,自然光照培养 ,定期浇水 and Hoagland 营养液。

不灭菌土盆栽试验则采用未灭菌菜园土装钵后 ,直接播种 ,方法同上。

2 结果和讨论

2.1 Tn7-luxCDABE 向 PL9 的转移

将长有菌落的双抗选择性平板(MG + Sm + km)置暗室中观察 ,记录发光菌落。pMON7181::Tn7-luxCDABE 的转移频率约为 10^{-7} /受体。挑取发光菌落 ,在不加抗生素的 MG 平板上 ,连续转接培养 4 次 ,检查后得到稳定发光的标记菌株 PL9L。发光标记菌株 PL9L 兼具供体菌和受体菌所具有的抗性(Sm^{r} 、 Km^{r}) ,产水溶性黄绿色素 ,且在固体培养基中(KB 或 MG)形成绿色针状晶体。这说明发光标记菌株 PL9L 确为 PL9 的 Tn7-

luxCDABE 转座诱变菌株。经发光酶基因稳定性试验及发光标记菌 PL9L 和亲本菌株 PL9 的比较,证实发光酶基因 luxCDABE 稳定,且其引入并未明显改变亲本菌株的基本性状。

2.2 PL9L 在棉花根圈的定殖动态和分布规律

2.2.1 盆栽系统中 PL9L 在棉花根圈定殖的数量变化:利用 KB + Sm 平板测定 PL9L 在棉花根圈的定殖密度和动态变化,但测数时只计入发光菌落。PL9L 在根圈的定殖情况如图 1。接种 PL9L 后即开始增殖(最初接种量为 1.4×10^8 cfu/颗棉籽),在灭菌土盆栽条件下,定殖在棉花根圈的 PL9L 数量在接种后 6 d 左右达最高(3.1×10^9 cfu/g 根土),56 d 左右趋向稳定,数量为 1.7×10^2 cfu/g 根土;在未灭菌土盆栽条件下,PL9L 的定殖数量则在 8 d 左右时达最高(1.1×10^9 cfu/g 根土),46 d 左右即开始趋向稳定,为 1.4×10^2 cfu/g 根土。未灭菌条件下达到增殖高峰的时间迟于灭菌条件下的,且最大定殖数量也低于灭菌条件下的,其原因可能与土著微生物对养分和定殖空间的竞争有关。

2.2.2 根盒-土壤微宇宙中 PL9L 在棉花根圈的定殖与分布:通过测定 KB + Sm 平板上的发光菌落数获得分段测数结果(表 1)和整根系测数结果(表 2)。图版 I 所示则为 X-射线胶片自显影记录的 PL9L 在棉花根系上的分布情况。

由表 1 及图版 I-A 可知,在根盒-未灭菌土微宇宙中,棉花生长 14 d 时,在长 15cm 的根上,只能在种子以下约 5cm 范围内检测到 PL9L,定殖数量为 2.86×10^6 cfu/g 根土;21d 时,在长 16.5cm 的根上,种子以下 11cm 范围内可检测到 PL9L;29~36d 时,在种子以下 12cm 区域根圈内可检测到 PL9L;由表 1 及图版 I-B 则可知,在根盒-未灭菌土微宇宙中,棉花生长 14d 时,在种子以下 4.1cm 同样可检测到 PL9L;21d 时,约在种子以下 9.1cm 内可检测到 PL9L;29~36d 时,种子以下 11cm 内仍可检测到。但在根尖区域均未检测到 PL9L。将测数结果与 X-射线胶片自显影结果相比,两种方法得到的结果基本一致。

表 2 所列整根系测数结果表明,PL9L 在棉花根圈的定殖数量随时间延长而减少,在根盒-灭菌土微宇宙中,从 14d 的 3.7×10^6 cfu/g 根土减少至 36d 的 1.1×10^4 cfu/g 根土;在根盒-未灭菌土微宇宙中,从 14d 的 5.3×10^5 cfu/g 根土减少至 36d 的 4.4×10^2 cfu/g 根土。这一规律与前面盆栽试验的结果一致。比较未灭菌和灭菌-根盒微宇宙中 PL9L 的定殖状况,可以看出未灭菌条件下 PL9L 的定殖数量也少于灭菌条件下的。

由图版 I 还可看出,PL9L 主要是沿主根和垂直方向的侧根向根尖扩散的,在这些根上定殖的菌数较多,在侧根上,则只在基部(即侧根与主根交叉部位)检测到 PL9L。在根尖部位也未检测到发光菌 PL9L。由此可见,PL9L 是从种子向根尖方向扩散的,但并不与根的伸长同步,而是迟于根的伸长生长。这与 Kluepfel^[13]和 Bowers 等^[14]所得结果一致。

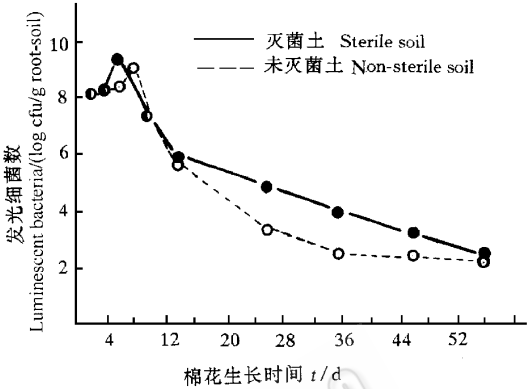


图 1 PL9L 在棉花根圈定殖的动态变化
Fig.1 Dynamic variations of PL9L colonizing in the cotton rhizosphere

表 1 根盒-土壤微宇宙中棉花根部各区段定殖的 PL9L 数量*

Table 1 Populations of PL9L colonized in cotton rhizosphere of different root sections in rhizobox-soil microcosms

样品编号 Sample No.	生长天数 Growth time/d	主根长 Main root length/cm	样品重量 Sample weight/g		PL9L 数量 Number of PL9L cfu/g root-soil			
			上 upper	中 median	下 lower	上 upper	中 median	下 lower
ACK1	14	13.5	1.04	0.92	0.65	0	0	0
A1	14	15.0	1.12	1.01	0.80	2.86×10^6	0	0
A2	21	16.5	1.20	2.33	1.13	3.79×10^5	4.2×10^4	0
A3	29	18.0	1.50	1.61	1.21	2.80×10^5	2.6×10^3	0
A4	36	18.5	1.76	2.41	1.52	5.30×10^4	1.4×10^3	0
BCK1	14	13.0	0.64	0.66	0.55	0	0	0
B1	14	12.5	1.29	1.15	0.68	4.5×10^5	0	0
B2	21	16.5	2.75	1.30	0.64	2.7×10^4	6.9×10^2	0
B3	29	20.0	2.40	2.20	0.21	3.8×10^3	2.3×10^2	0
B4	36	20.0	2.65	2.12	0.92	7.9×10^3	1.7×10^2	0

* 1)根系分段是从茎基部到根尖由上至下平均分 3 段 2)样品重量为根土混合物的鲜重 3)表中每一数据均由 4 株样品所测结果平均所得 4)样品编号中带有“ A ”的为灭菌土盒栽中所得样品 ,带有“ B ”的为未灭菌土盒栽中所得样品。

* 1)The root was averagely divided into three sections from the stem base to the root tip ;
2)Sample weight was the weight of fresh root with adherent soil ;
3)Every datum in the Table was the mean calculated from four samples ;
4)Sample No. with A was the sample collected from rhizobox contained sterilized soil , and B was from rhizobox contained non-sterilized soil.

表 2 根盒-土壤微宇宙中 PL9L 在棉花整根系上的定殖数量*

Table 2 Populations of PL9L colonized in the whole root rhizosphere of cotton in the rhizobox-soil microcosms

样品编号 Sample No.	生长天数 Growth time/d	主根长 Main root length/cm	样品重量 Sample weight/g	PL9L 菌数 Number of PL9L cfu/g root-soil
ACK2	14	13.0	1.84	0
A5	14	13.8	2.12	3.7×10^6
A6	21	19.4	3.40	2.3×10^5
A7	29	20.0	3.52	3.7×10^4
A8	36	20.0	3.59	1.1×10^4
BCK2	14	13.0	1.58	0
B5	14	13.5	2.60	5.3×10^5
B6	21	16.5	2.95	5.4×10^4
B7	29	20.0	3.60	6.8×10^3
B8	36	20.0	3.70	4.4×10^2

* 1)样品重量为根土混合物的鲜重 2)表中每一数据均由 4 株样品所测结果平均所得 3)样品编号中带有“ A ”的为灭菌土盒栽中所得样品 ,带有“ B ”的为未灭菌土盒栽中所得样品。

* 1)Sample weight was the weight of fresh root with adherent soil ;
2)Every datum in the Table was the mean calculated from four samples 3)Sample No. with A was the sample collected from rhizobox contained sterilized soil , and B was from rhizobox contained non-sterilized soil.

欲改进 PGPR 的应用技术 ,提高应用效果 ,首先要了解所用之菌在土壤中的动态 ,即它们的存活性、繁殖性、适应性与扩散性。本项研究发现 ,土著性微生物对引入之标记细

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

菌的定殖有影响。但不论是在土壤灭菌条件下还是未灭菌条件下,PL9L 定殖数量的变化都是先快速增殖然后迅速下降,并保持一个较低的相对稳定状态。这表明根圈微环境有一定的自我平衡能力。

我们在研究过程中还发现。土壤水分对所引入之细菌的定殖动态有较大影响。Natsch^[16]的研究表明:在田间试验中,引入的细菌可散布至种子以下 150cm 深处,大雨之后随种子引入的细菌可快速向更深的土层扩散。在本项根盒-土壤微宇宙中,如果土壤含水过饱和以致形成水流,所接细菌会随水流快速扩散。而若将土壤含水量始终控制在 60%~70% 范围内,播种后 36 d 左右,所接细菌则仅扩散至种子以下 12.0cm 以内。所以在研究施入土壤的细菌定殖动态时应尽量减少水份的影响。

整个研究也表明,发光酶基因作为标记基因,在微生物分子生态学中的应用不但十分可靠而且非常灵敏。

参 考 文 献

- [1] 王 平,胡正嘉,李阜棣. 荧光假单胞菌群中 PGPR 的作用机制. 见:葛 诚主编. 微生物肥料的生产应用及其发展. 北京:中国农业出版社,1995. 210~218.
- [2] Lambert B, Joos H (吴南君译). 生物技术通报,1991,3:1~5.
- [3] 王 平,胡正嘉,李阜棣. 应用与环境生物学报,1996,2(4):408~414.
- [4] Lindow S E. *Molecular Ecology*, 1996, 4:555~566.
- [5] White d, Leifert C, Ryder M H *et al.* *New Phytologist*, 1996, 133:173~181.
- [6] 王 平,李阜棣. 生物技术通报,1994,5:9~12.
- [7] 王 平,胡正嘉,李阜棣. 华中农业大学学报,1997,16(3):220~225.
- [8] Shen H, Gold S E, Tamaki S J *et al.* *Gene*, 1992, 122:27~34.
- [9] Brennerova M V, Crowley D E. *FEMS Microbiology Ecology*, 1994, 14:319~330.
- [10] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京:科学出版社,1979.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T (金冬雁等译). 分子克隆实验指南(第二版). 北京:科学出版社,1992.
- [12] Wang Ping, Hu Zhengjia, Li Fudi. Root colonization of wheat by lux-marked *Pseudomonas fluorescens* X16L2. In: Akira Ogoshi *et al.* eds. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Present statues and future prospects*. OECD-Japan Phytopathology Society, 1997. 449~452.
- [13] Kluepfel D A. *Annual Review of Phytopathology*, 1993, 31:441~472.
- [14] Bowers J H, Parke J L. *Soil Biology and Biochemistry*, 1993, 25(12):1693~1701.
- [15] De Weger L A, Dunbar P, Mahafee W F *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, Dec. 3641~3644.
- [16] Natsch A, Keel C, Defago G. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, Jan. 33~40.

USING LUX GENES MARKER TECHNIQUE TO TRACK PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS PL9L IN COTTON RHIZOSPHERE*

Bai Jianling Wang Ping Hu Zhengjia

(Department of Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract Th7-luxCDABE marker system was successfully transferred into *Pseudomonas chlororaphis*

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

(strain PL9)by means of transformation and conjugation and a stable lux-marked strain PL9L was obtained. The colonizing dynamics and distribution of the luminescent bacteria PL9L in the rhizosphere of cotton planted in pots and rhizoboxes were studied by the methods of X-ray film imaging and enumeration of luminescent colonies on agar media ,The results of pot culture experiment showed that PL9L successfully colonized in the rhizosphere of cotton. In pot cultures of sterile soil the highest colonizing leve(3.1×10^2 cfu/g root soil)was reached on 6th day after seeds sown (On 56th day ,the population of PL9L tended to stable and decreased to 1.7×10^9 cfu/g root soil)but in pot cultures of unsterile soil , the highest cdonizing leave(1.1×10^9 cfu/g root soil) was reached on 8th day. On 46th day ,the population of PL9L tended to a stationary state ,the numbers of them were 1.4×10^2 cfu/g root soil. The results of rhizobox culture experiment showed that PL9L spread from seeds toward the dirction of root tip ,but not synchronized with the stretch of roots. 6 days after seeds sown , in rhizobox culture of sterile soil ,PL9L spread 12.0cm below seeds ,but in non-sterile soil was 11.0cm. In the region of cotton root tip ,PL9L were not detected.

Key words Tn5-luxCDABE genes , *Pseudomonas chlororaphis* ,Cotton rhizosphere ,Colonizing Dynamics.

图 版 说 明

Explanation of plate

在灭菌(A)和未灭菌(B)根盒-土壤微宇宙中 PL9L 随棉花生长时间的延长在根部的分布状态 * Distribution of PL9L on root sections at different phases of cotton growth in steril(A)and nonsteril(B) rhizobox-soil microcosms

- * 每组图(如 A-a)中 1 为棉花根系分布图 2 为 X-射线胶片自显影记录的 PL9L 在棉花根部的分布。
- * No. 1 showed the root system of cotton and 2 showed the distribution of PL9L with X-ray film autophotography of root system in each group of pictures(eg. A-a)
- (A):1)14d (主根长 15.0cm ,PL9L 扩散至种子以下 5.0cm 以内) 2)21d (主根长 16.5cm ,PL9L 扩散至种子以下 11.0cm 以内) 3)36d (主根长 18.5cm ,PL9L 扩散至种子以下 12.0cm 以内)
- (B):1)29d (主根长 20.0cm ,PL9L 扩散至种子以下 10.3cm 以内) 2)36d (主根长 20.0cm ,PL9L 扩散至种子以下 11.0cm 以内)
- (A) a)14d(The PL9L distributed to 5.0cm of root from the seed when the main root was 15.0cm in length) ; b)21d(The PL9L distributed to 11.0cm of root from the seed when the main root was 16.5cm in length) c) 36d(The PL9L distributed to 12.0 cm of root from the seed when the main root was 18.5cm in length)
- (B) a)29d(The PL9L distributed to 10.0cm of root from the seed when the main root was 20cm in length) b) 36d(The PL9L distributed to 11.0cm of root from the seed when the main root was 20cm in length)

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No. 39370019)