

# 韭菜根际荧光假单胞菌株的分离和初步研究

刘国奇 蒋如璋

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

**摘要** 从韭菜 (*Allium tuberosum*) 根内分离出荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescent* DE1。用筛选出的具有利福平抗性的自发突变株 *P. f.* NKDE2 通过拌种和拌培养土回接韭菜, 结果表明: *P. f.* NKDE2 能定殖于韭菜根表、根内和根围土中。播种前用 *P. f.* NKDE2 拌种, 对韭菜生长有明显的促生效果; 与对照相比, 幼苗的单株根重、主根长、单株叶重及子叶长度四项指标均有显著差异。

**关键词** 韭菜, 荧光假单胞菌, 分离, 根际菌

**分类号** Q9391.12 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-03-0189-192

## ISOLATION AND PRELIMINARY STUDY ON *PSEUDOMONAS FLUORESCENT* RHIZOBACTERIAL STRAIN FROM CHINESE CHIVES

Liu Guoqi Jiang Ruzhang

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071)

**Abstract** A fluorescent pseudomonas rhizobacterial strain, *Pseudomonas fluorescent* DE2, was isolated from Chinese chives (*Allium tuberosum* Rattl. ex Spreng) and one of the spontaneous Rif<sup>r</sup> mutant strain, *P. f.* NKDE2 was selected. The effect of seed inoculation and soil inoculation on the ability of *P. f.* NKDE2 to colonize on the rhizosphere of Chinese chives was studied. Results show that *P. f.* NKDE2 can spread rapidly to the surface and interroot of the seeding root. Seedcoating with *P. f.* NKDE2 before sowing can promote the growth of Chinese chives significantly in both roots and leaves

**Key words** Chinese chives, *Pseudomonas fluorescent* DE1, Isolation, Rhizobacterial strain

韭菜是叶菜类蔬菜, 分布在我国各大菜区。随着耕作制度的改进, 目前已经成为四季栽培的菜种。迟眼蕈蚊 (*Bradysia odoriphaga*) 幼虫危害韭菜地下部位, 威胁其生产。为避免使用高残毒的有机磷和有机氯农药, 生产无公害蔬菜, 研究韭菜根际微生态区系分布, 分离韭菜根际有益菌群并借以构建迟眼蕈蚊的生物防治遗传工程菌株具有重要的意义。本文首次从韭菜的根内分离出能在韭菜根际定殖的荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescent*, 简称 *P. f.*) DE1, 并进一步研究了其对韭菜的促生效果, 为构建工程菌株准备了良好的受体菌。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

*P. f.* DE1 为从韭菜根内分离到的荧光假单胞菌; *P. f.* NKDE2 具有利福平抗性 (Rif<sup>r</sup>), 是 *P. f.* DE1 的自发突变株。

### 1.2 分离方法

从天津市东丽区大毕庄镇韭菜田内取完整韭菜根, 用 0.25% 的安替福民浸泡 15min, 再用灭菌的 0.1% 硫酸镁冲洗两遍, 用镊子夹碎, 挤出汁液, 涂于 LB 培养基平板, 30℃ 培养。划线分离单菌落, 分别编号, 待进一步鉴定。

### 1.3 利福平抗性突变株 P. f. NKDE2 的筛选

将 3mL 的 P. f. DE1 过夜培养菌液, 离心浓缩, 涂布于含有利福平 (Rif) 100μg/mL 的 LB 培养基平板上, 30℃ 培养 24h 后, 从平板上挑取生长较快的单菌落, 编号为 P. f. NKDE2。

### 1.4 P. f. NKDE2 对韭菜的促生效果

将两份韭菜种子, 分别用 P. f. NKDE2 的过夜培养菌液 (菌浓约为  $3.0 \times 10^8$ ) 和 LB 液体培养基浸种 1h, 播种于营养钵中, 两次重复, 培养土为沙壤土, 取自本院试验田。以自来水浇灌, 每周两次, 室温培养。观察出苗情况和幼苗长势, 30d 后两种处理各取 30 株韭菜, 测量单株根重、主根长、单株叶重、子叶长度四项指标, 用新复级差法<sup>[1]</sup>测验差异显著性。

### 1.5 P. f. NKDE2 在韭菜上的回接及定殖

采用两种方法将 P. f. NKDE2 回接韭菜品种津南青韭: 用 P. f. NKDE2 过夜培养菌液拌种 1h, 菌浓为  $10^4$ /g 土。对照为 LB 液体培养基拌种 1h。培养土 (1:1 的壤土: 蛭石), 室温培养。30d 后测定 P. f. NKDE2 的含菌量 (CFU): 0.1g 根围土 (即与土壤疏松结合的土壤) 加入 1mL PBS 提取液, 混匀, 将上清逐级稀释, 取 10μL 涂布于含 Rif 100μg/mL 的 LB 平板上, 30℃ 过夜培养, 计数单菌落, 计算 CFU; 取含根尖的区段 5cm, 用力振荡, 去除与根疏松结合的根围土壤后, 加入 1mL PBS 洗根表, 用力振荡, 以下步骤同上; 取含根尖的根段 5cm 自来水冲洗干净, 于 0.25% 的安替福林中浸泡 20min, 再用灭菌的 0.1% 的硫酸镁冲洗两遍, 加入 PBS, 研磨成匀浆, 以下步骤同上。

### 2.2 荧光假单胞菌 P. f. DE1 的形态特征

30℃ 过夜培养, 在 LB 培养基上 P.f.DE1 的菌落大小为 2~3mm, 凸起圆形, 边缘较整齐, 透明有光泽, 光滑湿润 (如图 1A), 在显微镜下观察, 细胞个体形态特征为: 杆状  $2.5 \sim 3 \times 0.5 \sim 0.7\mu\text{m}$  两端钝圆、微弯、无芽胞、无夹膜, 单个散在, 随机排列, 革兰氏染色呈阴性 (如图 1B)。

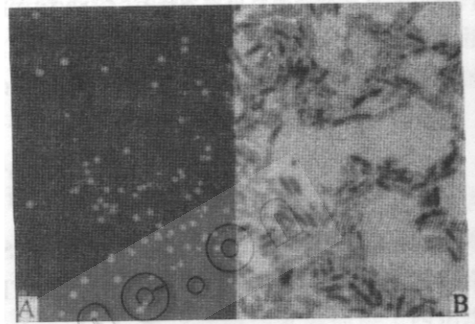


图1 荧光假单胞菌 P. f. DE1 的形态特征  
A: P. f. DE1 菌落形态, B: P. f. DE1 细胞形态

### 2.3 根际菌的回接及对韭菜的促生效果

用分离到的 10 株根际菌菌液拌种, 同时以 LB 液体培养基作对照, 观察根际菌对韭菜的促生效果, 发现荧光假单胞菌 P.f.DE1 对韭菜的生长表现出较强的促生效果, 用 P.f.DE1 处理的种子比用 LB 液体处理的种子, 提早 2~3d 出苗, 幼苗表现叶色浓绿, 植株生长稳健, 生长势明显优于后者, 对出苗后 30d 的植株主根长度、单株根重、子叶长、单株叶重四项指标进行调查, 并进行差异显著性分析, 结果如表 1。从表 1 看出: 四项指标中 P.f.DE1 处理与对照相比, 差异均达到极显著水平。

## 2 结果

### 2.1 根际菌的分离

取韭菜根的汁液涂布于 LB 平板上, 30℃ 培养 16h, 出现若干菌落, 经划线分离, 得到革兰氏阳性菌两株, 编号 BS1-2; 革兰氏阴性菌 8 株, 编号为 DE1-8, 因其在 S1<sup>[2]</sup>培养基上能正常生长, 而且菌落在长紫外线下呈现蓝绿色荧光, 初步鉴定为荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)。

表1 P.f.DE1对韭菜的促进生长效应

部位 处理	主根长 (cm)	单株根重 (g)	子叶长 (cm)	单株叶重 (g)
DE1	8.93A	0.067A	10.84A	0.075A
LB	6.86B	0.041B	6.73B	0.053B

注: 表中的数据代表 30 株的平均值, 在  $P = 0.01$  水平上, 使用 Waller-Duncan 测验, 凡与对照相差极显著的用不同字母标出。LSD<sub>0.01</sub> 单株根重 = 0.008; LSD<sub>0.01</sub> 主根长 = 1.66; LSD<sub>0.01</sub> 子叶长 = 1.78; LSD<sub>0.01</sub> 单株叶重 = 0.007

## 2.4 P.f.DE1对常用抗菌素的抗性及利福平性自发突变株的筛选

为了确定用于基因克隆操作中采用的反筛选标记, P.f.DE1对常用一些抗菌素的最低抑菌浓度作了测试, 从表2看出, P.f.DE1对氨基青霉素、氯霉素具有较强的抗性, 其次是四环素; 而对利福平和卡那霉素等抗生素较敏感。因此, 氨基青霉素、氯霉素是鉴别P.f.DE1较好的天然选择标记。当P.f.DE1作受体菌进行遗传转化或接合转移时, 利福平、卡那霉素、壮观霉素、庆大霉素、硫酸链霉素、四环素等抗生素都可作为反筛选药物。

表2 不同抗菌素对P.f.DE1的最低抑菌浓度

抗菌素	浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			
	100	50	25	12.5
氨基青霉素Ap	+	+	+	+
氯霉素Cm	+	+	+	+
利福平Rif	-	-	-	-
卡那霉素Km	-	-	-	-
庆大霉素Gent	-	-	-	+
壮观霉素Spect	-	-	-	+
硫酸链霉素Sm	-	-	-	+
四环素Tc	-	+	+	+

注: +, P.f.DE1能生长, -, P.f.DE1不能生长

为了进一步观察追踪P.f.DE1回接韭菜根际的分布动态, 筛选了P.f.DE1的利福平抗性的自发突变株(Rif<sup>r</sup>)P.f.NKDE2。

## 2.5 荧光假单胞菌P.f.NKDE2在韭菜根际的定殖能力

采用P.f.NKDE2培养菌液拌种和拌培养土两种方法, 将P.f.NKDE2回接韭菜根际。播种30d后, 分别从根围土壤(与根疏松结合的土壤)、根表、根内三个部位进行活菌计数。表3是其在韭菜根际的分布情况。在根围土中, 拌土处理的活菌数CFU高于拌种处理, 分别为 $5.5 \times 10^2$ 、 $1.2 \times 10^2$ ; 前者是后者的4倍。在根表土中拌种处理的CFU为 $3.2 \times 10^5$ 是拌土处理的32倍。在根内, 拌种处理的CFU是拌土处理的3倍。从表3初步得出结论: 拌种处理更有利于P.f.NKDE2在韭菜根际的定殖。在同一处理中, P.f.NKDE2在不同部位的分布不同, 基本

趋势为: 根表最多, 根内次之, 根围土最少。由此可知P.f.NKDE2在韭菜根表的定殖能力最强。

表3 P.f.NKDE2在韭菜根际及体内的分布

部位	根围土壤	根表	根内
处理	(CFU/g)	(CFU/cm)	(CFU/cm)
种子	$1.2 \times 10^2$	$3.2 \times 10^5$	$6.0 \times 10^3$
土壤	$5.5 \times 10^2$	$1.0 \times 10^4$	$2.0 \times 10^3$
对照	0	0	0

注: 表中的数据为两个重复的平均值

## 3 讨论

根际微生物的数量和种类与植物的种、品种有关。不同的物种或品种其根际分泌物不同从而形成了特定的微生态区系。研究表明: 荧光假单胞菌常常是植物的有益菌<sup>[3]</sup>。以往的报道也肯定了某些假单胞菌对不同的植物, 如甜菜<sup>[4]</sup>、土豆<sup>[5]</sup>、萝卜<sup>[6]</sup>等十种植物的促生效果。本试验分离到的P.f.NKDE2菌株, 表现出了在韭菜根际有较强的定殖能力和明显的促生效果。对促生的机制研究由来已久, 目前, 拮抗作用是普遍接受的观点。由于植物促生菌在根际的定殖, 排除或完全取代了根际有害细菌和真菌的繁殖, 使植物摆脱了有害菌的危害, 因而间接地起到促生的效果。

不同的植物促生菌在植物的根际定殖能力不同, 本试验分离的P.f.NKDE2在1:1的粘土: 蛭石的人工土壤中, 接种30d后, 在两种处理中均检测到P.f.NKDE2存在, 且以根表的含菌量最多, 说明P.f.NKDE2在韭菜的根际的定殖能力最强。有研究表明: 根际某些分泌物是根际微生物的化学趋向剂, 如某些氨基酸吸引流泪假单胞菌<sup>[7]</sup>(*Pseudomonas lachymans*), 而恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的聚集和快速粘附于根部的有关基因受广泛化合物的诱导。植物提供的特异性的营养物可被根际菌分解, 而分解产物又诱导了植物合成基因的表达<sup>[8]</sup>。这为进一步探讨P.f.NKDE2与韭菜体共生的机理提供了线索。试验也发现P.f.NKDE2在韭菜体内有一定的存在, 其进入植株体内的机理还

有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] 南京农业大学主编. 田间试验和生物统计. 北京: 农业出版社, 1988.
- [2] Gould W D, Hagedorn C, Brdinelli T R *et al.* Appl Environ Microbiol, 1985, **49**:28~32.
- [3] Schroth M N, Hancock J G. Science, 1982, **216**: 1376~1381.
- [4] Suslow T V. Phytopathology, 1982, **72**:199~206.

- [5] Klopper J W. Ph. D. Dissertation, University of California, Berkeley, 1979.
- [6] Klopper J W. Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Radishes, in: Proc. Fourth Int. Conf. Plant Path. Bacteria. Vol.2 Angers, France, 1982, 879~882.
- [7] Loak G J, Ashby A M, Shaw C H. J Gen Microb, 1988, **134**:1427~1430.
- [8] Philliips D A. in: Kleister D L, Cregan P B (eds), The Rhizosphere and Plant Growth, The Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1985, 149~154.