

# 棉花根际亲和性高效促生细菌的分离筛选

夏觅真<sup>1,2</sup> 马忠友<sup>1,3</sup> 齐飞飞<sup>1</sup> 常慧萍<sup>1</sup> 唐欣昀<sup>1\*</sup> 甘旭华<sup>1</sup>

(1. 安徽农业大学生命科学学院 合肥 230036)

(2. 安徽医科大学 合肥 230032)

(3. 安徽科技学院 凤阳 233100)

**摘要:** 为了从棉花根际土壤筛选能与棉花凝集素具有亲和作用的高效促生细菌,以选择性培养基从棉花根部初步筛选具有固氮能力、解磷能力及解钾能力的促生细菌,再以异硫氰酸磺(FITC)标记的棉花凝集素为复筛工具,从棉花根际促生细菌中筛选能与棉花凝集素结合的亲和性菌株,分别挑选 2 株固氮菌、2 株解磷细菌和 2 株解钾细菌作为微生物肥料接种到棉花根部进行盆栽试验,观察其在根部定殖情况。结果是在选择性平板上有 20%~30% 的菌株具有凝集素染色阳性。盆栽试验显示,接种的 6 株亲和性菌株能在棉花根部成功定殖,根际细菌数量约是灭活对照的 10 倍。通过初步鉴定,固氮菌株 N1111 为固氮菌属(*Azotobacter*), N2121 属于德克斯氏菌属(*Derxia*); 解磷菌株 P2126 属于黄单胞菌属(*Xanthomonas*), P1108 菌株为假单胞菌属(*Pseudomonas*); 解钾菌株 K2204 和 K2116 属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

**关键词:** 棉花凝集素, 促生细菌, 亲和性菌株, 盆栽试验

## Isolation and Screening of Effective and Affinity Strains of Growth-Promoting Bacteria from Cotton Rhizosphere

XIA Mi-Zhen<sup>1,2</sup> MA Zhong-You<sup>1,3</sup> QI Fei-Fei<sup>1</sup> CHANG Hui-Ping<sup>1</sup>  
TANG Xin-Yun<sup>1\*</sup> GAN Xu-Hua<sup>1</sup>

(1. Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

(2. Anhui Medical University, Hefei 230032)

(3. Anhui Science and Technology College, Fengyang 233100)

**Abstract:** To screen effective and affinity plant growth-promoting rhizobacteria strains (PGPR) that can react with cotton lectin from cotton rhizosphere, we isolate nitrogen-fixation bacteria, phosphate-releasing bacteria and potassium-releasing bacteria from cotton rhizosphere by Ashby medium, phosphate-releasing bacteria medium and potassium-releasing bacteria medium, respectively. The strains were re-screened by cotton lectin labeled with fluorescein isothiocyanate. According to their ability of nitrogen-fixation, p-releasing and K-releasing in pure culture condition, 2 strains of nitrogen-fixation bacteria, 2 strains of phosphate-releasing bacteria and 2 strains of potassium-releasing bacteria were inoculated as microbial fertilizers in pot experiment of cotton, respectively. About 20%~30% strains of PGPR had positive reaction

with cotton lectin labeled by FITC among the PGPR. Study showed that the numbers of PGPR in cotton rhizosphere were about 10 times of those of controls sterilized. Pot test data suggested the 6 strains have certain affinity with cotton and can propagate in cotton rhizosphere. Through preliminary identification of 6 affinity strains, the strain of N1111 was identified as *Azotobacter* and N2121 was classified as *Derxia*. P2126 and P1108 were *Xanthomonas* and *Pseudomonas*, respectively. K2204 and K2116 were *Bacillus*.

**Keywords:** Cotton lectin, Plant growth-promoting rhizobacteria, Affinity strain, Pot experiment

植物根际是指生物、化学和物理特性受到影响的紧密环绕植物根的区域, 植物根际的微生物数量多而活跃, 构成了根际特有的微生物区。根际微生物在根际微生态系统中对养分的转化吸收和根系的生长有其独特的影响。根际微生物区系主要以细菌为主, 根据对植物的作用, 可将根际微生物(rhizobacteria)分为有益(2%~5%)、有害(8%~15%)和中性(80%~90%)三大类, 其中有益的类群具有固氮、解磷、解钾、产生植物激素和分泌抗生素等能力, 或至少具有其中之一能力, 可促进植物生长、防治病害、增加作物产量、改善农产品品质, 这一类群被称为促生根际菌(plant growth-promoting rhizobacteria, 简称PGPR)<sup>[1]</sup>。PGPR在植物根部(根表和根际)的成功定殖涉及到植物-微生物之间的复杂的信号交换和相互识别过程<sup>[2]</sup>, 与植物-微生物之间相互识别有关的物质包括植物分泌的凝集素(lectin)和类黄酮、微生物合成的胞外多糖、脂多糖、荚膜多糖和根钙粘素(rhcadhesin)等等<sup>[2,3]</sup>, 其中植物合成的凝集素对于植物-微生物之间的识别和PGPR的定殖具有重要的作用。凝集素广泛存在于各类生物, 是一类非酶、非抗体的糖结合蛋白, 功能复杂多样, 在不同细胞之间的识别过程中扮演着重要作用<sup>[4]</sup>。不同植物凝集素的糖结合专一性不同, 可特异识别相关的根际微生物, 表现出植物根部对根际微生物的选择作用<sup>[5,6]</sup>。目前PGPR的筛选方法是采用选择培养基进行筛选, 获得具有功能的PGPR菌株的概率大约为10%<sup>[1]</sup>。但是到目前为止, 几乎没有研究报道能够肯定所获得的菌株与植物(作物)之间存在特异亲和性。生产应用领域采用的菌株一般也是实验室保藏的普通菌株, 没有证据显示这些菌株与作物存在亲和性, 可在作物根部存活、定居<sup>[7]</sup>。本研究拟从新的角度, 以凝集素在植物与微生物的特异识别中起重要作用为理论依据, 以荧光标记的棉花凝集素作为复筛手段, 采用选择性平板和凝集素作为双重筛选工具, 从棉花根际筛选出高效固氮、解磷、解钾

亲和性菌株, 为PGPR菌株的筛选、应用提供试验数据和技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 土样

安徽农业大学农场棉花根际土。

### 1.2 棉花凝集素的提取及其荧光标记

1.2.1 棉花凝集素的提取: 泗棉三号棉籽由安徽农业大学农场惠赠, 凝集素分离纯化参照曾仲奎等实验方法<sup>[8]</sup>。

1.2.2 棉花凝集素的荧光标记: 采用Marshall法标记提取的凝集素<sup>[9]</sup>。

### 1.3 棉花根际细菌的分离纯化

1.3.1 土壤样品的采集: 采自安徽农业大学农场试验田, 取生长50 d左右的棉花幼苗放入灭菌纸袋内, 带回实验室筛选棉花根际功能菌株。

1.3.2 分离培养基: 固氮菌培养基(Ashby培养基)、解磷细菌培养基、解钾细菌培养基<sup>[10]</sup>。

1.3.3 棉花根际固氮菌、解磷细菌和解钾细菌初步筛选及性能测定: 实验方法参照蒋宝贵、赵斌实验方法<sup>[10,11]</sup>。

### 1.4 具有棉花凝集素亲和性细菌的筛选

参照革兰氏染色法, 用微量移液器分别取50  $\mu$ L用异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的棉花凝集素溶液和未标记的棉花凝集素溶液加在涂片上, 25 $^{\circ}$ C暗处保湿反应30 min。然后用pH 7.8的PBS缓冲盐水漂洗15 min, 用蒸馏水稍稍冲洗, 干燥后置于荧光显微镜下观察, 蓝色光( $\lambda=495$  nm)激发。整个操作过程应避光, 选取发出具有FITC特异绿色荧光的菌株保藏备用。

### 1.5 棉花盆栽试验

分别选取2株固氮、解磷和解钾能力强的菌株进行盆栽试验。接种方法为: 将试验菌株分别接种到Ashby无氮液体培养基、解磷细菌液体培养基、解钾细菌液体培养基中培养72 h, 棉种浸种催芽,

然后将棉芽浸在各培养液中 1 h, 晾干后均匀点播在盆钵中, 每盆 4 棵。重复 3 次, 同时设置灭活菌液作对照。

用稀释平板法计数棉苗根际固氮细菌、解磷细菌和解钾细菌数量法(CFU/g 根际土)。

### 1.6 亲和性促生细菌的初步鉴定

主要进行形态学和生理生化鉴定<sup>[12]</sup>, 包括菌落和菌体形态观察、革兰氏染色、芽胞染色、淀粉酶水解试验、甲基红试验(M. R)、V. P 试验、葡萄糖氧化试验、接触酶反应和明胶液化试验等, 比对主要形态和生理生化指标测试。

## 2 结果与分析

### 2.1 棉花凝集素的分离纯化及荧光标记

参照曾仲奎实验方法提取本试验所需凝集素, 产率为 0.4 mg/g 棉籽。被标记的棉花凝集素凝集兔血细胞的最高效价为 1:64, 即凝集素凝集兔血细胞的最低浓度为 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 2.2 棉花根际亲和性优良菌株的筛选

**2.2.1 棉花根际细菌的初步筛选:** 用涂布法将棉花根际菌悬液涂在 Ashby 无氮培养基、解磷细菌培养基和解钾细菌培养基平板中, 28 $^{\circ}\text{C}$  培养 5 d 后, 初筛获得固氮菌 57 株, 解磷细菌 84 株, 解钾细菌 78 株。

**2.2.2 具有棉花凝集素特异亲和性菌株的筛选:** FITC 标记的棉花凝集素作用于菌株涂片后, 如果该菌株能够和棉花凝集素发生特异性亲和作用, 则凝集素不会被漂洗掉, 置荧光显微镜下观察, 经蓝光激发后, 由于其携带有 FITC, 因此会发出 FITC 特有的绿色荧光如图 1, 说明此菌株和凝集素有一定的亲

和性, 即为实验所需菌株。对照及不能与棉花凝集素结合的菌株无荧光。经过复筛获得具有能和棉花凝集素发生特异亲和作用的固氮菌 16 株、解磷细菌 19 株、解钾细菌 18 株。

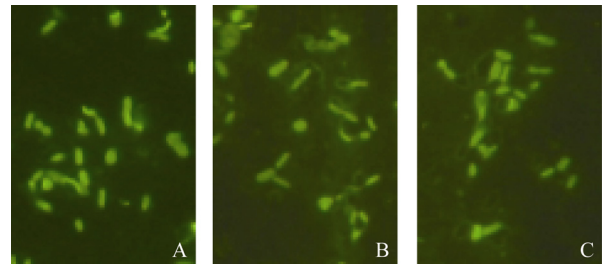


图 1 部分菌株的荧光标记棉花凝集素染色结果( $\times 1000$ )  
Fig. 1 Result of strains stained by FITC-labeled cotton lectin

Note: A: N1111; B: P2126; C: K2116

**2.2.3 菌株的固氮、解磷及解钾能力测定结果:** 结果分别见表 1、表 2 和表 3, 统计学分析差异极其显著( $P < 0.01$ )。得到固氮率较高的菌株 N1111 和 N2121, 固氮能力分别为 15.6 mg N/g 葡萄糖和 10.4 mg N/g 葡萄糖, 这相当于固氮能力较高的共生固氮菌的固氮能力。用钼蓝比色法测培养液中水溶性磷含量, P2126 具有较强的分解难溶态的无机磷的能力, 与对照相比, P2126 发酵液水溶性磷含量增加了 16.8 倍, P1108 发酵液中水溶性磷比对照增加了 12 倍。用火焰光度计测定培养液水溶性钾含量, 培养液中钾含量均有所增加, 菌株 K2204 和 K2116 增幅明显。

表 1 固氮菌固氮能力  
Table 1 Nitrogen-fixing ability of nitrogen-fixing bacteria

菌株编号 No. of strains	固氮率(mg N/g G) N-fixing ability	菌株编号 No. of strains	固氮率(mg N/g G) N-fixing ability
CK	0.0h	N1105	5.198 $\pm$ 0.556de
N1111	15.611 $\pm$ 0.823a	N1203	5.397 $\pm$ 0.499d
N1126	2.482 $\pm$ 0.473fg	N2121	10.423 $\pm$ 0.799b
N2132	8.111 $\pm$ 0.724c	N3101	6.821 $\pm$ 0.224cd
N1124	10.633 $\pm$ 1.881b	N3103	2.166 $\pm$ 0.356fg
N1207	1.641 $\pm$ 0.387fg	N1107	3.132 $\pm$ 0.077f
N3106	0.749 $\pm$ 0.137g	N2126	2.421 $\pm$ 0.352fg
N1125	1.519 $\pm$ 0.137fg	N1201	3.321 $\pm$ 0.096ef
N1120	1.311 $\pm$ 0.137fg		

表 2 解磷细菌解磷能力

Table 2 Phosphate-dissolving ability of phosphate-dissolving bacteria in pure culture

菌株编号 No. of strains	可溶性磷含量 Dissolved P( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	解磷强度(%) P-solubilizing ability	菌株编号 No. of strains	可溶性磷含量 Dissolved P( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	解磷强度(%) P-solubilizing ability
CK	5.181 $\pm$ 0.152k	1.73	P3102	63.441 $\pm$ 1.371c	21.15
P2109	56.832 $\pm$ 0.913ef	18.94	P3103	58.372 $\pm$ 0.545de	19.46
P7	11.521 $\pm$ 1.306i	3.84	P2117	61.113 $\pm$ 0.785cd	20.37
P211	10.419 $\pm$ 0.591i	3.47	P1118	15.006 $\pm$ 0.260h	5.00
P2105	54.051 $\pm$ 2.509f	18.02	P1	9.281 $\pm$ 1.003f	3.09
P2101	9.782 $\pm$ 0.433ij	3.26	P1103	16.624 $\pm$ 0.705h	5.54
P2122	10.019 $\pm$ 0.400ij	3.34	P1205	61.946 $\pm$ 0.719cd	20.65
P2126	92.291 $\pm$ 1.692a	30.76	P2119	5.188 $\pm$ 0.113k	1.73
P1108	67.711 $\pm$ 2.765b	22.57	P3104	27.982 $\pm$ 0.665g	9.33
P3	17.342 $\pm$ 0.616h	5.78	P3101	6.422 $\pm$ 0.076jk	2.14

表 3 解钾细菌解钾能力

Table 3 Potassium-releasing activity of silicate bacteria

菌株编号 No. of strains	水溶性钾含量 Solvable K( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	菌株编号 No. of strains	水溶性钾含量 Solvable K( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
CK	0.280 $\pm$ 0.005f	K3104	0.346 $\pm$ 0.019f
K1114	3.271 $\pm$ 0.535c	K3202	0.319 $\pm$ 0.029f
K1120	0.382 $\pm$ 0.017f	K2121	2.180 $\pm$ 0.122d
K2210	0.663 $\pm$ 0.036ef	K1105	0.286 $\pm$ 0.007f
K2204	5.321 $\pm$ 0.482a	K2106	3.592 $\pm$ 0.204c
K2102	0.558 $\pm$ 0.023ef	K1212	1.924 $\pm$ 0.071d
K3205	3.432 $\pm$ 0.233c	K2116	4.695 $\pm$ 0.213b
K2107	0.592 $\pm$ 0.011ef	K2115	1.197 $\pm$ 0.026e
K3102	0.341 $\pm$ 0.014f	K2108	2.266 $\pm$ 0.321d
K2119	0.279 $\pm$ 0.007f		

### 2.3 棉花盆栽试验结果

从棉花根际细菌中选取N1111、N2121、P2126、P1108、K2116和K2204菌株进行盆栽试验,取生长40 d的棉苗根部,计数各处理根际细菌数量。经统计学分析显示,接种活菌剂处理和灭活菌剂处理相比,棉苗根际细菌数量差异极为显著( $P < 0.01$ ),结果见图2。灭活处理根际细菌均在 $10^5$ 范围内,接种处理的根际细菌数量比对照明显增加,达到 $10^6$  CFU/g根际土,初步说明这些细菌能在棉苗根部定殖。

### 2.4 亲和性菌株的鉴定

**2.4.1 形态特征和培养特征:** 观察并记录菌株的个体形态及培养特征,菌落形态都为圆形,固氮菌扁平,解磷细菌稍隆,解钾细菌呈油滴状。其它特征见表4。

**2.4.2 生理生化特征:** 6株细菌的生理生化特征见

表 5。

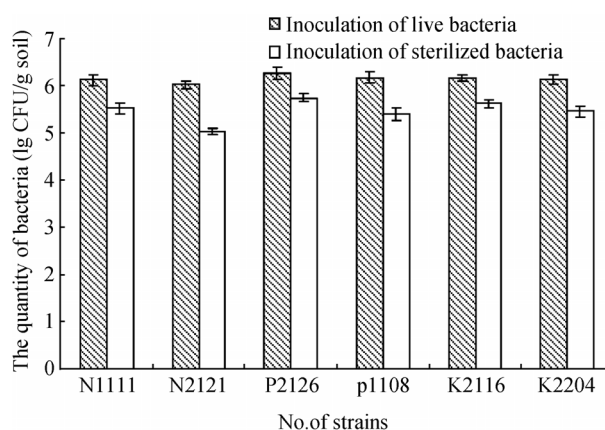


图 2 盆栽棉花根际固氮细菌、解磷细菌及解钾细菌的数量

Fig. 2 The quantity of bacteria in cotton rhizosphere

表 4 革兰氏染色、菌体和菌落形态特征  
Table 4 Profile of colony shape, cell shape and Gram staining

菌株 Strains	革兰氏染色 Gram staining	形状 Cell shape	菌体大小 Cell width and length (μm)	芽孢 Spore	菌落形态 Colony characters			
					形态 Shape	表面 Surface	边缘 Edge	颜色 Color
N1111	-	杆菌	1.5×1.8	-	圆形	光滑黏稠	整齐	乳白
N2121	-	杆菌	1.6×4.2	-	圆形	光滑黏稠	不规则	乳白
P2126	-	杆菌	1.5×2.2	-	圆形	光滑湿润	整齐	黄色
P1108	-	杆菌	0.8×1.5	-	圆形	光滑湿润	整齐	淡黄
K2116	-	杆菌	1.0×1.8	+	油滴状	光滑黏稠	整齐	乳白
K2204	-	杆菌	0.6×1.5	+	油滴状	光滑黏稠	整齐	乳白

注: +: 阳性, -: 阴性

Note: +: Positive; -: Negative

表 5 菌株的生理生化特征  
Table 5 Physiological characters of the strains

菌株 Strains	葡萄糖利用 Use of glucose	氧化酶 Oxidase	接触酶 Catalase	V. P 反应 V. P reaction	M. R 试验 M. R test	明胶液化 Gelation liquefaction	淀粉酶 Amylase	产 H <sub>2</sub> S H <sub>2</sub> S production
N1111	+	+	+	-	+	+	+	+
N2121	+	+	-	+	+	+	-	+
P2126	+	+	+	-	-	+	+	-
P1108	+	+	+	+	+	+	-	+
K2116	+	+	+	-	-	+	+	-
K2204	+	+	+	-	-	+	+	-

注: +: 阳性, -: 阴性

Note: +: Positive; -: Negative

结合《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)对 6 株菌株的形态和生理生化特征分析,初步鉴定固氮菌株 N1111 为固氮菌属(*Azotobacter*), N2121 属于德克斯氏菌属(*Derxia*); 解磷菌株 P2126 属于黄单胞菌属(*Xanthomonas*), P1108 菌株为假单胞菌属(*Pseudomonas*); 解钾菌株 K2204 和 K2116 属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

### 3 讨论

根据在植物-根瘤菌系统的研究,细菌在植物根表吸附是根瘤菌感染、侵入、形成共生关系的第一步<sup>[13]</sup>。凝集素识别假说认为,凝集素对根毛细胞和细菌的多糖均具有特异结合位点,可作为媒介使菌体和根毛细胞联结,将细菌定位于根尖、在根尖聚集形成优势,再启动后续阶段的反应,导致细菌定殖成功。基因工程的工作也证实了凝集素对于根瘤菌吸附、侵染起关键作用<sup>[14]</sup>。

PGPR类土壤微生物与植物的关系没有根瘤菌那样密切,但是其在植物根部的定殖和生存也是非豆科植物正常生长不可缺少的因素,有些菌株可以与植物形成联合共生关系。Yegorenkova 等研究了巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)在小麦根部的定殖,发现该菌的定殖可能涉及麦胚凝集素与细菌多糖之间的识别和交联<sup>[15]</sup>, Antonyuk 等认为麦胚凝集素促进了巴西固氮螺菌固氮活性、合成植物生长激素的能力,是固氮螺菌的重要生长因子,在固氮螺菌-植物之间的通讯中起到重要作用<sup>[16,17]</sup>。目前有关其他 PGPR 在非豆科植物根部的吸附、定殖机理的研究还十分缺乏。

本试验采取从棉籽中提取凝集素,用 FITC 标记凝集素,用标记的凝集素作为复筛手段,对从选择性平板上生长的植物根部菌株进行亲和性染色鉴定,采用选择性平板和凝集素作为双重筛选导向,发现在选择性平板上 20%~30% 的菌株具有凝集素染色

阳性,从棉花根部筛选到了大量具有固氮、解磷、解钾等促生功能、与棉花根部具有亲和性的菌株。将这些菌株重新接种到棉花根部,与灭活处理相比,细菌数量增加了约10倍,说明这些菌株能在棉苗根部成功定殖。影响PGPR菌株在作物根部定殖除了凝集素外,还有其他的影响因素。进一步的研究证实本试验筛选的PGPR菌株可以在棉花根部持久定殖,并随着根的生长而不断在根部延伸、扩散,在根部不同部位定殖水平达到 $10^5$  CFU/g~ $10^6$  CFU/g<sup>[18]</sup>。这些结果显示可以采用棉花凝集素作为筛选工具,获得对棉花具有一定亲和性的高效PGPR菌株,为PGPR菌株的筛选和应用提高新的技术。有关凝集素在棉花与根际微生物相互识别中的作用机理、筛选获得的亲和性菌株的潜在应用价值正在进一步的研究之中。

## 参 考 文 献

- [1] 胡江春,薛德林,马成新,等. 植物根际促生菌(PGPR)的研究与应用前景. 应用生态学报, 2004, 15(10): 1963-1966.
- [2] Rodrigue-Navarro DN, Dardanelli MS, Ruiz-Saniz JE, et al. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 272(1): 127-136.
- [3] Hirsch A. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, 2(4): 320-326.
- [4] 熊维全,万群. 植物凝集素及其在生物固氮中的作用. 热带农业科技, 2005, 28(2): 21-26.
- [5] 孙建中,王克夷. 植物凝集素的超级家族. 生物化学与生物物理进展, 1994, 21(2): 104-109.
- [6] Rudiger H, Gabius HJ. Plant lectins: occurrence, function and application. *Glycoconj J*, 2001, 18(5): 589-613.
- [7] 唐欣昀,张明,赵海泉,等. 微生物肥料及其在生产应用中的问题. 生物学杂志, 2002, 18(1): 28-33.
- [8] 曾仲奎,吴洽庆,鲍锦库. 棉花凝集素的纯化及性质研究. 植物学报, 1995, 30(3): 204-211.
- [9] 沈霞主编. 临床免疫学与免疫学检验新技术. 北京:人民军医出版社, 2002, pp.22-27.
- [10] 蒋宝贵,赵斌. 解磷解钾自生固氮菌的分离筛选及鉴定. 华中农业大学学报, 2005, 24(1): 43-48.
- [11] 南京农业大学编. 土壤化学分析. 北京:农业出版社, 1980, pp.63-74.
- [12] 陈金春,陈国强. 微生物学试验. 北京:清华大学出版社, 2005, pp.31-35.
- [13] Albareda M, Dardanelli MS, Sousa C, et al. Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 259(1): 67-73.
- [14] Van Rhijn P, Goldberg RB, Hirsch AM. Lotus nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *Plant Cell*, 1998, 10(1): 1233-1249.
- [15] Yegorenkova IV, Konnoval SA, Sachuk VN, et al. *Azospirillum brasilense* colonization of wheat roots and the role of lectin-carbohydrate interactions in bacterial adsorption and root-hair deformation. *Plant and soil*, 2001, 231(2): 275-282.
- [16] Sadovnokova Yu N, Bepalova LA, Antonyuk LP. Wheat germ agglutinin is a growth factor for the bacterium *Azospirillum brasilense*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2003, 389(1): 103-105.
- [17] Antonyuk LP, Evseeva NV. Wheat lectin as a factor in plant-microbial communication and a stress response protein. *Microbiology*, 2006, 75(4): 470-475.
- [18] 齐飞飞,夏觅真,唐欣昀,等. *luxAB* 基因标记的 K2116 菌株在棉花根际中的定殖. 生态学杂志, 2008, 27(2): 192-196.