

## 巨大芽孢杆菌在油菜根部定殖和促生作用的研究\*

胡小加<sup>†</sup> 江木兰 张银波

(中国农业科学院油料作物研究所, 农业部油料作物遗传改良重点实验室, 武汉 430062)

**摘要** 采用基因标记技术和常规方法跟踪巨大芽孢杆菌 A6(*gusA*) 在缩影系统油菜根际的定殖情况。A6(*gusA*) 菌在油菜不同根段部位的定殖密度表现从上到下逐渐递减的现象。随着接种后时间的延长而逐渐下降。在根段 8cm 以外的根区几乎检测不到接种菌。在油菜播种后 3d, 定殖密度可达最高水平( $8.7 \times 10^5$  cfu g<sup>-1</sup>根), 然后急速下降, 30d 后保持相对稳定的较低水平( $2.2 \times 10^2$  cfu g<sup>-1</sup>根)。在促生试验中, 表现在不同程度上增加植株干重、全氮、全磷和全钾的含量。

**关键词** 巨大芽孢杆菌; 油菜; 定殖

中图分类号 S154.3 文献标识码 A

在植物—微生物—土壤三元关系中, 根际微生物作为土壤和植物的中介与桥梁, 是最为活跃的因素, 其活动规律对于土壤肥力、植物营养和植物病害都有举足轻重的作用。进入 60 年代后, 许多研究人员发现在植物根际还存在着一些对植物生长有促生和保护作用的其他微生物, 而这些能够直接或间接促进植物生长的根际细菌统称为植物促生根际细菌(Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR)。在根际生态系统中, 不同植物的根系及其分泌物不仅为 PGPR 提供了栖息场所和能源物质, 而且把植物营养遗传特性与根际促生菌(PGPR) 的生存及其对宿主植物营养状况的调控巧妙的结合在一起<sup>[1,2]</sup>。PGPR 主要是通过提高养分的有效性和促进植物对养分的吸收、改善植物营养状况以及防治作物病害等<sup>[3,4]</sup>, 达到促进植物生长的目的。到目前为止, 人们只顾及单一因素, 及通过增加在种子上的接种量来增加 PGPR 在根际的定殖。而未对土壤特征、环境条件、植物种类及其株龄与细菌在根际生存能力相互关系进行综合考察<sup>[5]</sup>。由于 PGPR 应用效果的不稳定性, 近 30 年来, 在国内外的商品化进程中受到很大程度的限制。造成不稳定性主要原因是环境因子影响植物促生根际细菌在植物根际的定殖, 定殖不成功就不能有效地发挥其作用<sup>[6,7]</sup>。因此, 植物促生根际细菌在植物根际的定殖微生态研究是

近 10 多年来人们关注的重点。但在十多年以前, 人们在跟踪和回收引入菌株时, 一直无法将其与同类土著细菌分开, 因而对于引入菌株能否在植物根部或土壤中存活、繁殖并发挥作用知之甚少。随着分子生物学的发展, 特别是基因标记技术的建立与应用, 为植物根际细菌定殖微生态学的研究提供了有效手段<sup>[8]</sup>。本研究采用基因标记技术、缩影系统<sup>[9]</sup>并结合常规的分析方法, 研究植物促生根际细菌——巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium* A6 *gusA*) 在油菜根际的定殖动态。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试土壤和品种

供试土壤取自本所试验农场的灰潮土, 其基本农化性状为全氮  $0.819$  g kg<sup>-1</sup>, 碱解氮  $106$  mg kg<sup>-1</sup>, 速效磷  $23.5$  mg kg<sup>-1</sup>, 速效钾  $79$  mg kg<sup>-1</sup>, 有机质  $12.8$  g kg<sup>-1</sup>, 土壤 pH (水浸) 为 7.2。

供试油菜品种为中油 119, 由武汉中油阳光种业科技有限责任公司提供。其硫甙和芥酸的含量分别为  $30$  μmol g<sup>-1</sup> 和 1%。

### 1.2 接种物的制备及种子丸衣化

挑 1 环活化的促生菌 A6(*gusA*) (卡那霉素  $50$  μg ml<sup>-1</sup>) 菌苔置于盛有 100 ml LB 液体培养基<sup>[10]</sup> 的

\* 国家科技攻关重点课题“双低”油菜优质高效生产技术研究(2001BA507A-06)

† 通讯作者

作者简介: 胡小加(1960~), 男, 湖北省武汉市人, 副研究员, 从事油菜根际微生物研究

收稿日期: 2004-01-02; 收到修改稿日期: 2004-04-09

250 ml三角瓶内, 28℃, 150 r min<sup>-1</sup>摇床培养 48 h。取培养液于 3 500 r min<sup>-1</sup>离心 15 min, 去上清液。将沉淀物加入 0.1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 缓冲液 10 ml, 涡旋振荡打散菌体后, 转入无菌的 50 ml 三角瓶中, 作为丸衣化的接种菌。

种子丸衣法按文献[11]描述的方法进行。

对无菌缩影系统试验的油菜籽作表面灭菌, 而对于有菌缩影系统的油菜籽未作表面灭菌。

### 1.3 土壤缩影系统的建立

将灰潮土调节水分含量约 20%, 按 700 g 瓶<sup>-1</sup>分别装入瓶内, 装至距开口端 2 cm 处为止, 再经高温灭菌处理。所用瓶为罐头瓶, 高 18 cm, 直径 7 cm, 使用时用黑纸罩住瓶 4 周。

将经过丸衣化接种(接种量为 6.3 × 10<sup>8</sup> cfu g<sup>-1</sup> 种子)的油菜籽按每瓶 1 粒播入土表, 再盖一层厚约 0.5 cm 的土。用无菌塑料压膜纸包住瓶口并用绳扎紧, 置 28℃培养室催芽。待油菜萌发露出土表后, 移至室外, 利用自然光照和温度培养。用剪刀在对应油菜部位将封口纸剪十字形小口, 以便油菜苗伸出瓶口正常生长。

待油菜主根尖伸长接近瓶底时(约 2 周), 将玻璃瓶小心弄破, 按无菌操作取下油菜苗的整个根系于无菌培养皿内, 同时将另一油菜苗的根系自上而下分为 A、B、C 三等分, 抖掉附着在根上的土粒后, 以无菌镊子和剪刀自下而上分别采取各部位根段并转入对应编号的无菌培养皿内, 计根段数并称重。将称重后的根系和不同部位的根段分别转入盛有 20 ml 0.1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 溶液和数颗玻璃珠的三角瓶内, 涡旋高速振荡 30 min, 再行 10 倍系列稀释(盛有样品的悬液为原液, 即稀释度为零次方)。用含有卡拉霉素(50 μg ml<sup>-1</sup>)的 LB 固体培养基按 MPN 法测定细菌数量<sup>[12]</sup>。试验设 3 次重复。

gusA 基因的检测, 按文献[13]描述的方法进行, 其侵染部位为蓝色。

### 1.4 土壤缩影中 A6(gusA) 在油菜根际的定殖动态实验

自油菜出苗 3 d 后开始按无菌操作规程取样, 以后每隔 3 d 取样 1 次。取样方法: 从子叶下方开始, 抖掉附着在根上的土粒后, 以每 2 cm 根长为一段剪取, 将相同部位的根段收集在 1 个无菌培养皿内; 每个部位的根段样品由 3 株油菜苗根系的同一部位组成; 计每个部位的根段数并称重。之后的处理同样采用 MPN 法测定细菌数量。

### 1.5 促生盆栽试验

采用常规土培法。播种丸衣化的油菜籽, 其含菌量为 1 × 10<sup>8</sup> cfu g<sup>-1</sup> 种子。设空白对照 1 个, 每个处理重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 A6(gusA) 在油菜根际的定殖部位和数量

油菜出芽 2 周后取样测定结果表明, 不论是在灭菌土壤缩影还是未灭菌土壤缩影中, 根系不同部位的侵染点数都表现为从上到下逐渐大幅减少, 菌数也是逐渐下降的趋势, 甚至在 C 段内(8~12 cm)未能检出 A6(gusA), 表 1。土壤灭菌与未灭菌, 对 A6(gusA) 在油菜根际的定殖能力有很大的影响。就 A、B 两段而言(分别属于根部 0~4 cm 和 4~8 cm 处), 无论是侵染数量还是菌群数量, 灭菌土壤均明显高于未灭菌土壤。

表 1 A6(gusA) 在油菜根际的定殖影和数量

Table 1 Effect of soil sterilization on colonization of A6(gusA) in roots of oilseed rape (cfu g<sup>-1</sup> root)

根段 Root segment	根长 (cm) Root length	gusA 基因测定 gusA gene expressed	定殖密度 Colonization density (cfu g <sup>-1</sup> root)
A	0~4	++	3.6 × 10 <sup>3</sup>
SA	0~4	+++	8.7 × 10 <sup>5</sup>
B	4~8	+	5.3 × 10
SB	4~8	++	2.2 × 10 <sup>2</sup>
C	8~12	—	0
SC	8~12	—	0

注: S 表示灭菌土壤缩影; + 表示蓝色的深浅, 表中数据均为 4 个样品测定结果的平均值 Note: S means sterilized soil; + means blue of different shades; data are average of 4 replications

### 2.2 A6(gusA) 在油菜根际的定殖动态

油菜播种 3 d 后开始定期检测 A6(gusA) 在各根段部位的定殖数量。从表 2 可以看出, 通过种子部位接种的 A6(gusA) 在油菜根部的定殖分布表现为根尖部位定殖数量最小, 离根尖越远的根段部位 A6(gusA) 的定殖数量越多; 随着接种后时间延长, 定殖数量逐渐下降, 然后维持在一个较低的水平。A6(gusA) 在油菜播种后 3 d 即可在 4 cm 以内的根段部位达到最高定殖水平(8.7 × 10<sup>5</sup> cfu g<sup>-1</sup> 根), 然后随着根的生长开始下降。油菜生长到 12 d 时, 6~8 cm 根段部位的菌群已降至定量检出限以下, 油菜生长

至 18 天时, 定殖在 2~4 cm 根段部位上的菌数也降至检出限以下, 直至油菜生长 1 个月时, 定殖在 0~2 cm 根段部位内的菌数降至  $2.2 \times 10^2$  cfu g<sup>-1</sup> 根。

表 2 土壤缩影中 A6(*gusA*) 在油菜根际的定殖动态

Table 2 A6(*gusA*) colonization in roots of oilseed rape in rhizosphere soil microcosms (cfu g<sup>-1</sup> root)

播后取样时间 Sampling days after sowing (d)	根长 Root length				
	0~2 cm	2~4 cm	4~6 cm	6~8 cm	8~12 cm
3	$6.2 \times 10^5$	$8.7 \times 10^5$	—	—	—
6	$7.1 \times 10^4$	$2.3 \times 10^4$	$2.6 \times 10^2$	—	—
9	$8.5 \times 10^3$	$3.3 \times 10^2$	$1.7 \times 10^2$	$3.5 \times 10$	0
12	$3.7 \times 10^3$	$1.8 \times 10^2$	$1.2 \times 10$	0	0
15	$4.5 \times 10^2$	$2.4 \times 10$	0	0	0
18	$3.4 \times 10^2$	0	0	0	0
30	$2.2 \times 10^2$	0	0	0	0

### 2.3 土壤缩影中 A6(*gusA*) 在油菜根际的定殖能力和散布范围

两周以后分别检测好气性细菌总数、真菌和 A6(*gusA*) 在油菜根系各根段部位根际的定殖水平, 所

得结果列于表 3。从表 3 可知, 引入菌株 A6(*gusA*) 能散布至油菜根部 8 cm 以内的根段部位, A6(*gusA*) 菌的数量表现 A 段高于 B 段, B 段高于 C 段, 定殖在油菜根际的好气性细菌总数的分布规律也呈离根尖越远密度越小, 真菌定殖趋势也相似。

表 3 土壤缩影中根际微生物的群体数量

Table 3 Microbial population in soil microcosms (cfu g<sup>-1</sup> root)

微生物 Microorganism	根长 Root length		
	0~4 cm	4~8 cm	8~12 cm
好气性细菌总数 Total aerobacteria	$8.9 \times 10^7$	$3.6 \times 10^6$	$4.3 \times 10^5$
真菌 Fungus	$2.7 \times 10^4$	$1.8 \times 10^3$	$8.3 \times 10^2$
A6( <i>gusA</i> )	$4.5 \times 10^2$	$1.7 \times 10$	0

### 2.4 在盆栽试验中 A6(*gusA*) 的促生效果

在盆栽试验中 A6(*gusA*) 表现出一定的促生作用, 植株干重、全氮和全钾上比对照分别增加 4.1%、13.9% 和 2.3%, 在全磷上比对照增加 18.4%, 达到显著差异水平(表 4)。

表 4 A6 对油菜的促生作用

Table 4 Growth promoting effect of bacterial strain A6(*gusA*) on rape seedling

处理 Treatment	干重 Dry weight (g plant <sup>-1</sup> )	增加 Increase (%)	全氮 Total N (mg plant <sup>-1</sup> )	增加 Increase (%)	全磷 Total P (mg plant <sup>-1</sup> )	增加 Increase (%)	全钾 Total K (mg plant <sup>-1</sup> )	增加 Increase (%)
A6	4.05 a	4.1	97.85 a	13.9	16.33 a	18.4	131.96 a	2.3
CK	3.89 ab		85.89 ab		13.79 b		128.95 ab	

注: a 和 b 表示 SSR0.05 的显著差异 Note: a and b express SSR0.05 markedness difference

## 3 小 结

本研究结果表明, 在灰潮土缩影中, 油菜播种后 3 天 A6(*gusA*) 在油菜根际的定殖密度可达最高水平 ( $8.7 \times 10^5$  cfu g<sup>-1</sup> 根), 然后急速下降, 在油菜播种半个月后的生长时间里, 下降趋势缓慢, 基本处于  $10^2$  cfu g<sup>-1</sup> 根水平的相对稳定状态。这一动态变化过程与 Kloepper<sup>[14]</sup> 报道的结果基本一致。A6(*gusA*) 在不同根段部位的定殖密度具有从上到下逐级递减的规律, 表明接种菌在根层的上部区域定殖, 很难随着根生长向下移动并繁殖, 而根的功能活跃区恰恰在根冠区域。在促生试验中, 表现在不同程度上增加植株干重、全氮、全磷和全钾的含量。这一结果揭示了该菌促进油菜生长及其利用的可能性。

微生物分子生态学就是运用分子生物等新技术在分子水平上研究自然或人工引入的微生物群体与生态环境的相互关系, 包括释放遗传改良微生物可能带来的生态影响。现在, 人们试图通过分子生态学的研究途径阐明植物促生根际细菌菌株在植物根圈的活动规律、作用机理、与宿主植物的识别机制、与病原菌的相互关系、土壤环境因子的影响等, 为提高植物促生根际细菌的促生和生防效果提供依据和指导。我们采用 *Gus* 基因标记的方法对土壤缩影中的标记菌株在油菜根圈的定殖动态、散布范围及其与土壤环境的相互关系进行了初步的研究。对于跟踪和原位研究引入菌株在生态环境中的群体动态及其生命活动规律, 基因标记技术是一种十分理想的方法, 而且灵敏度高、检测速度快, 为增强其根际竞争力和生存力提供依据, 并建立起一套具有分子生

物学特征的研究微生物生态学的新方法。为进一步开展植物促生根际细菌在油菜营养供给平衡和生防等方面的研究工作奠定了一定的基础。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Shen Q R, Wang Y, Chen W, Shi R H. Changes of soil microbial biomass C and P during wheat growth after application of fertilizers. *Pedosphere*, 1997, 7: 225~ 290
- [ 2 ] Yao H Y, He Z L, Campbell C D, Wilson M J. Some limitations of BIOLOG system for determining soil microbial community. *Pedosphere*, 2000, 10(1): 37~ 44
- [ 3 ] Kloepper W J, Lifshitz R, Gemida J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertil. Soils*, 1997, 24: 358~ 364
- [ 4 ] Akmal M, Khan K S, Xu J M. Dynamics of microbial biomass in a rainfed soil under wheat cultivation. *Pedosphere*, 2004, 14(1): 53~ 62
- [ 5 ] Heijnen E, Hok-Hin C, Veen J. Improvements to the use of bentonit clay as a protective agent, increasing survivals of bacteria introduced into soil. *Soil Biol.*, 1992, 24: 533~ 538
- [ 6 ] Roberts D P, Kobayashi D Y. Behavior of biocontrol bacteria in the spemsphere and rhizosphere. *Plant Pathology*, 1996, 1: 137~ 147
- [ 7 ] Roberts D P, Kobayash D Y, Dery P D, *et al.* An image analysis method for determination of spatial colonization patterns of bacteria in plant rhizosphere. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 51: 653~ 658
- [ 8 ] Lindlow S E. The use of reporter genes in the study of microbial ecology. *Molecular Ecology*, 1995, 4: 555~ 566
- [ 9 ] Nielsen K M, Elsas J D, Smalla K. Transformation of *Acinetobacter* sp. Strain BD413(pFG4 $\Delta$ npII) with Transgenic plant DNA in soil Microcosms and effects of kanamycin on selection transformants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 5: 1 237~ 1 242
- [ 10 ] 李阜棣. 土壤微生物学. 北京: 中国农业出版社, 1996, 180~ 190. Li F D. *Soil Microbiology* (In Chinese). Beijing: China Agricultural Press, 1996. 180~ 190
- [ 11 ] 王家玲. 环境微生物学. 北京: 高等教育出版社, 1988, 239~ 240. Wang J L. *Environmental Microbiology* (In Chinese). Beijing: Higher Education Press, 1988. 239~ 240
- [ 12 ] 中国科学院南京土壤研究所微生物研究室. 土壤微生物研究方法. 北京: 科学出版社, 1985, 54~ 58. Research Laboratory of Microbe, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences. *Research Methods in Soil Microbiology* (In Chinese). Beijing: Science Press, 1985. 54~ 58
- [ 13 ] Kenneth J. O' Callaghan, Stone P J, Hu X J, *et al.* Effects of Glucosinolates and flavonoids on colonization of the roots of *Brassica napus* by *Azarcizobium aulinodans* ORS571. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5): 2 185~ 2 191
- [ 14 ] Kloepper J W, Beauchamp C J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 1992, 38(6): 667~ 672

## BACILLUS MEGATERIUM A6 (gusA) COLONIZATION IN ROOTS AND ITS GROWTH PROMOTING EFFECT ON RAPESEED

Hu Xiaojia Jiang Mulan Zhang Yinbo

(*Oil Crop Research Institute, CAAS and Key Lab of Genetics Improvement of Oil Crops, Wuhan 430062, China*)

**Abstract** *Bacillus megaterium* A6(gusA) colonization in roots of rapeseed in rhizosphere microcosms was investigated by means of gene labeling technique and traditional technique. Rape seeds were inoculated with A6(gusA), an effective strain of bacteria in promoting growth of rape seedlings. Results indicated that A6(gusA) population decreased with the roots going downwards and with the time after inoculation. Populations of A6(gusA) were not detectable on roots more than 8 cm apart from the hypocotyl base. The population density of A6(gusA) on roots reached the maximum of  $8.7 \times 10^5$  cfu  $g^{-1}$  root 3 days after sowing, and then declined rapidly till 30 days when it leveled off at  $2.2 \times 10^2$  cfu  $g^{-1}$  root in rhizosphere microcosms. The result showed A6(gusA) could increased dry weight of the plant and content of total N, total P and total K in the plant.

**Key words** *Bacillus megaterium*; Rapeseed; Colonization