

发光酶基因标记的华癸根瘤菌 JS5A16L 在紫云英根圈的定殖动态*

王 平 冯新梅 李阜棣

(华中农业大学微生物学系, 武汉 430070)

摘 要 在土壤-盆栽、盆栽微宇宙系统 (Microcosm) 中和田间条件下, 研究了发光酶基因 (*luxAB*) 标记的华癸根瘤菌 JS5A16L 在紫云英根圈的定殖动态、分布范围及结瘤情况。在盆栽系统中, JS5A16L 的定殖密度在紫云英出苗 2 天后达到最高水平 (7.88 log cfu / 克根) (cfu 为 colony forming unit 的缩写), 然后开始下降, 并保持在一个相对稳定的水平; 58 天后又有所回升, 且能散布至种子下方 22 cm 处的根段部位。盆栽条件下的定殖动态与盆栽系统中的相似, 紫云英播种 3 天后, JS5A16L 可达最高定殖水平 (6.92 log cfu / 株根系), 随后开始缓慢下降, 直至 32 天时仍维持在一个相对稳定水平。JS5A16L 在田间条件的定殖动态则不同, 播种后 30 天时定殖密度达到最大值 (7.03 log cfu / 克根), 90 天后降到最低值 (5.24 log cfu / 克根), 然后又开始上升, 160 天时为 7.87 log cfu / 克根, 甚至在地上部植株收割后 20 天仍可维持在 7.89 log cfu / 克根。接种该菌株可显著提高紫云英的生物学产量。

关键词 发光酶标记基因, 华癸根瘤菌 JS5A16L, 紫云英根圈, 定殖动态

中图分类号 Q938.1⁺³

在现阶段国内外出现的众多微生物肥料中, 豆科根瘤菌肥料是应用最早、效果最为肯定和稳定的微生物肥料^[1], 曾在我国农业、草业生产中发挥了重要作用^[2]。但由于应用过程中的一些关键性问题, 如根瘤菌竞争结瘤机制尚未阐明等, 而影响了人们对提高接种效果的技术的进一步改进^[3]。

根瘤菌竞争结瘤的过程实质上是一个发生在植物根圈的十分复杂的生物学和生态学过程, 首先是共生伙伴的相互识别, 然后是感染和根瘤的形成。相互识别的过程又包括了两个阶段, 即根瘤菌在根表面的定殖及其在根和根毛表面的粘附。而根瘤菌在根表面的定殖过程是与根瘤菌感染、共生两个阶段密切相关的最初阶段——腐生阶段 (Saprophytic phase), 对其竞争结瘤至关重要^[4,5]。引入根瘤菌和土著根瘤菌之间、根瘤菌同其他土壤微生物之间的竞争能力在很大程度上决定于根瘤菌在植物根圈的定殖水平、定殖动态。有效根瘤的分布与根瘤菌的散布范围也密切相关。因此, 关于根瘤菌在豆科植物根圈的定殖动态及其根圈适应性与竞争结瘤的关系的研究现已成为根瘤菌分子生态学研究的前沿课题^[6]。

* 欧盟合作项目 (IC18-CT96-0103) 及国家自然科学基金 (39770026) 资助, 97 届毕业生柯水杰同学参加了部分工作

收稿日期: 1999-09-04; 收到修改稿日期: 2000-02-25

本室多年的研究结果表明发光酶基因用于细菌根圈定殖的研究十分灵敏、可靠而且方便^[7~10]。因此,本项研究采用发光酶基因(*luxAB*)标记检测技术,研究了华癸根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*) JS5A16L 在土壤-盆栽、盆栽系统中及田间条件下在紫云英根圈的定殖动态和分布范围,为提高根瘤菌肥料的应用效果提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

带有发光酶基因标记的华癸根瘤菌 JS5A16L,系本室分离自江苏省武进县田间紫云英根瘤上并标记^[11,12]。

1.2 供试培养基、供试土壤和紫云英种子

参见文献 [12]。

1.3 根盒(rhizobox)的装配与表面灭菌

参见文献 [8]。

1.4 接种物的制备和拌种

参见文献 [8]。

1.5 根盒——土壤微宇宙的建立

将已调节好水分含量(约 30%)但未灭菌的黄棕壤(取自华中农业大学科研试验场),按每盒 700g 分别装入根盒。将经过菌液拌种的紫云英种子(接种量为 $8.24 \log_{10} \text{cfu} / \text{粒种子}$)按每盒 2 粒等距离播入土表,种子上再盖一层厚约 1cm 的土。自紫云英出苗后第 2 天开始按无菌操作规程取样,取样时从种子下方根部开始,每 4cm 根长为一段。其他处理方法参见文献 [8]。然后用 SM 双抗(Cyc + Km)培养基测定发光菌落数^[12]。

1.6 盆栽系统的建立

参见文献 [11]。紫云英种子初始接种量为 $7.90 \log_{10} \text{cfu} / \text{颗种子}$ 。待紫云英出苗后 3 天开始取样。取样方法:自塑料钵中小心取出整株根系,抖掉附着在根上的土粒,称根重,测发光菌落数^[12]。

1.7 田间小区试验

1.7.1 接种物的制备 将活化好的 JS5A16L 接一环于 100 ml YMA 培养液中, 8°C 、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ / 分培养 3 天。按 25 g 草炭接 1 ml 菌液的比例接入 JS5A16L 菌液,拌匀后测定草炭中的发光菌落数^[12],为 $9.40 \log_{10} \text{cfu} / \text{g}$ 草炭。同时采用按 25 g 草炭接 1 ml 无菌 YMA 培养液制作的混合物作为对照用接种剂。

1.7.2 种子拌菌 紫云英种子经 75% 酒精和 0.1% HgCl_2 表面灭菌后催芽。出芽后,按 154 g 种子加 240 g 接种剂拌种,并检测每颗种子上携带的菌数^[12],结果为 $7.59 \log_{10} \text{cfu} / \text{颗种子}$ 。对照处理则按相同比例将种子与对照用接种剂拌匀^[12]。

1.7.3 小区的设置 选用华中农业大学科研试验场内试验地一块(经 MPN 法紫云英结瘤实验检测,田间土壤中无土著华癸根瘤菌),犁翻后平整、开沟,南北向排列。每个小区的面积为 $1.4 \text{ m} \times 7 \text{ m}$ 。将经过草炭拌种的紫云英种子均匀撒播于每个小区内,播种量为 $154 \text{ g} / \text{小区}$,接菌和对照处理均设 3 个重复。自紫云英出苗后第 30 天开始取样,每个小区多点取样。取样时,将植株和根系一起采挖,一部分去掉根上的土后,称根重,测发光菌落数^[12];将另一部分根系用自来水冲洗干净,用吸水纸吸干水,称地上、地下部鲜重、数总根瘤数,并计总株数,计算每株地上部鲜重、总鲜重及每株根瘤数。

1.8 统计分析

两个平均值之间的比较采用 *t* 检验法。

2 结果与分析

2.1 华癸根瘤菌 JS5A16L 在盆栽系统中的定殖动态、分布范围及结瘤情况

紫云英不同生长时期根部分段取样结果(如表 1)表明: 紫云英出苗 2 天后, JS5A16L 在

表1 华癸根瘤菌 JS5A16L 在盆栽系统中的定殖动态及其在紫云英根部的分布¹⁾

Table 1 Colonization dynamics and the distribution of *Mesorhizobium huakuii* JS5A16L on the root of *Astragalus sinicus* in the rhizobox-soil microcosm (log cfu/g root)

生长时间 Growth time (day)	主根长 Tap root Length(cm)	各根段内的根瘤菌菌数 Quantities of rhizobium on the root (log cfu/g root)				
		0~4cm	4~8cm	8~12cm	12~16cm	16~22cm
2	1.3	7.88				
6	4.2	5.80	--			
10	8.4	5.69	--			
14	12.7	6.47(7 ²⁾)	2.30	--		
25	19.9	5.23(15)	3.74	--	--	
31	22.3	5.28(9)	2.66(5)	1.50	--	
44	22.3	4.57(13)	3.39(2)	2.13	--	--
58	22.3	6.59(67)	5.69(31)	4.67(14)	4.71(3)	4.24(18)

1) 起始接种量为 8.24 log cfu/粒种子 The initial inoculation dosage was 8.24 log cfu/seed

2) 括号里的数据是此根段范围内的根瘤数 The data in brackets are nodule numbers

紫云英种子下方 0~4 cm 根段上达到最高定殖密度。随着植物的生长, 定殖密度逐渐下降, 但到 58 天时又有所回升。随着根的伸长, JS5A16L 向根下部扩散, 但与根的伸长并不同步, 当植物生长到 58 天时可以扩散到根下 22 cm 处。紫云英出苗后 14 天时, 种子下方 0~4 cm 根段上开始出现根瘤, 随后, 根瘤越来越多, 但主要集中在 0~8 cm 根段上, 与该部位 JS5A16L 的定殖密度最高相一致。

2.2 华癸根瘤菌 JS5A16L 在盆栽系统中的定殖动态及结瘤情况

以全根系作为取样单位, 不同时间取样检测的结果如图 1 所示。从图 1 可以看出: 紫云英出苗 3 天后 JS5A16L 在紫云英根圈中的定殖密度达到最大值, 然后开始缓慢下降, 直至植株生长到 35 天时仍

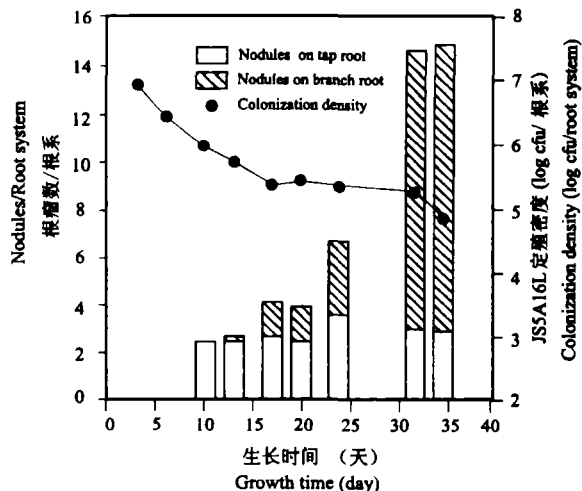


图1 盆栽系统中华癸根瘤菌 JS5A16L 在紫云英根际的定殖动态和结瘤情况

Fig.1 Colonization dynamics and nodulation of *Mesorhizobium huakuii* JS5A16L on the root of *Astragalus sinicus* in the pot experiment

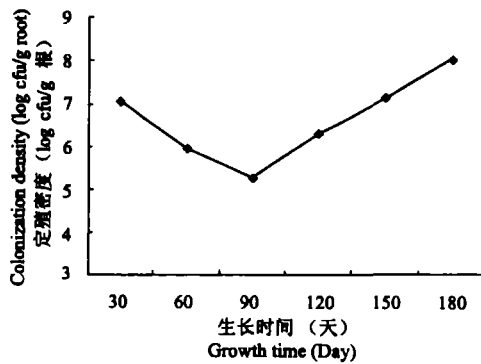


图2 田间条件下JS5A16L在紫云英根圈的定殖动态

Fig.2 Colonization dynamics of JS5A16L on the root of *Astragalus sinicus* under the field conditions

保持在相对稳定水平;紫云英生长到第10天时,主根上有根瘤出现,32天后根瘤大量产生,但主要集中在侧根上。

2.3 田间土壤中华癸根瘤菌 JS5A16L 在紫云英根圈的定殖动态

田间条件下 JS5A16L 在紫云英根圈的定殖动态如图 2。从图 2 可以看出:在紫云英出苗后第 30 天, JS5A16L 的定殖密度达到 7.03 log cfu/克根,接着开始下降,90 天时降至最低点 (5.24 log cfu/克根),然后又开始上升,到 160 天收割地上部植株时达 7.87 log cfu/克根,即使在收割植株 20 天后仍维持在相对稳定的水平 (7.89 log cfu/克根)。

2.4 田间条件下 JS5A16L 对紫云英生长的影响

不同时间取样结果如表 2 所示。由于田间无土著华癸根瘤菌存在,因此在紫云英生长早期,接种 JS5A16L 可显著地促进地上部生长,90 天、120 天时每株植物结瘤数也显著高于对照。但到后期,由于对照也感染了 JS5A16L,因此,至 150 天时每株植物结瘤数没有显著性差异。

表2 田间条件下JS5A16L对紫云英生长的影响

Table 2 Effects of inoculation of *Mesorhizobium huakuii* JS5A16L on the growth of *Astragalus sinicus* under the field conditions

生长时间 Growth time (day)	地上部鲜重 (g/株)		总鲜重 (g/株)		根瘤数/株	
	Fresh weight of shoot (g/plant)		Total fresh weight of plant (g/plant)		Nodules/plant	
	Control	JS5A16L	Control	JS5A16L	Control	JS5A16L
90	0.071a	0.114a	0.110a	0.164a	0.10a	12.40b
120	0.075a	0.629b	0.129a	0.762b	0.23a	26.87b
150	1.585a	2.495b	1.766a	2.707b	8.37a	27.30a

注:“/”测验:同栏内同一行数字后两个不同字母表示差异极显著 ($P < 0.05$)

“/” test: the data followed by the different letters means significant difference ($P < 0.05$)

3 讨 论

田间条件下, JS5A16L 在紫云英根圈的定殖水平与荧光假单胞菌在小麦根圈的定殖水平相比^[8,9],其定殖密度高、维持的时间长、散布的范围广,这可能正是共生固氮菌肥料的应用效果比非共生菌肥料的应用效果要稳定的原因。

盆栽试验和田间试验结果均表明,即使在紫云英的生长后期, JS5A16L 的定殖密度也还会上升,而荧光假单胞菌作为植物根圈的常住菌,在植物的生长后期几乎检测不到^[8],这一方面说明了根瘤菌与豆科植物共生关系的优越性,同时,也反映出根圈共生细菌(根瘤菌)与荧光假单胞菌这样的互生菌在利用根圈分泌物能力方面生理生化特征的不同。

盆栽试验中的结瘤情况表明, JS5A16L 所结根瘤主要集中在种子下方 0~8cm 根段范围, 与其在此根段部位的定殖密度一直很高密切相关, 从而说明了根瘤菌在豆科植物根圈的定殖水平对其结瘤能力具有重要影响。

由于在本项田间试验的一开始没有检测出土著根瘤菌, 因此无法比较 JS5A16L 与土著根瘤菌的竞争结瘤能力, 但从它的定殖动态及其结瘤促生情况可以看出, 该菌株具有很强的与其他土壤微生物竞争的能力, 亦即具有很强的根圈适应性 (Rhizosphere competence)。

本项研究还再次证明发光酶基因可以准确快速地跟踪引入菌株在田间土壤条件下的动态变化与存活性。

参 考 文 献

1. Mulongoy K *et al.* Biofertilizers: agronomic and environmental impacts and economics. *In: Silva D A et al ed., Biotechnology: Economic and Social Aspects-Issues For Developing Countries.* Cambridge University Press, 1994, 55~69.
2. 荆玉祥. 生物固氮及其菌肥(葛诚主编), 微生物肥料的生产应用及其发展. 北京: 中国农业科技出版社, 1996. 26~32
3. 薛景珍. 对生物肥料的发展和存在问题的探讨(葛诚主编), 微生物肥料的生产应用及其发展. 北京: 中国农业科技出版社, 1996. 55~60
4. Keser H H *et al.* Rhizobial ecology and technology. *In: F. Blaine Metting, Jr. ed. Soil Microbial Ecology—Applications in Agricultural and Environmental Management.* Marcel Dekker, Inc., 1993. 205~226
5. Hardy R W F, Eaglesham A R J. Ecology and agricultural applications of nitrogen-fixing systems: overview, *In: Igor A. Tikhonovich et al eds. Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications, Proceedings of the 10th International Congress on Nitrogen Fixation.* Kluwer Academic Publishers, 1995. 619~620
6. O'Gara *et al.* Recent developments in biotechnology and the potential impact on nitrogen fixation in the field. *In: Igor A. Tikhonovich et al eds., Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications.* Kluwer Academic Publishers, 1995. 623~628
7. 王平等. 小麦根圈荧光假单胞菌的发光酶基因标记. 华中农业大学学报, 1997, 16(3): 220~225
8. 王平等. 发光酶基因标记的荧光假单胞菌 X16L2 在小麦根圈的定殖动态. 微生物学报, 2000(在印刷中)
9. 柏建玲, 王平等. 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. 微生物学报, 1999, 39(1): 43~49
10. 王平等. 发光酶基因标记荧光假单胞菌 X16L2 的发光研究. 土壤学报, 1998, 35(4): 545~552
11. 王平, 冯新梅等. 华癸根瘤菌 JS5A16 的发光酶基因标记及其检测. 中国土壤学会第九届全国会员代表大会学术论文集, 华中农业大学学报, 1999, (增刊): 135~140
12. 王平等. 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, 1999, 18(3): 238~241

**CLONIZATION OF *MESORHIZOBIUM HUAKUII* JS5A16L
MARKED WITH *LUXAB* GENES IN THE RHIZOSPHERE OF
*ASTRAGALUS SINICUS***

Wang Ping Feng Xin-mei Li Fu-di

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

Summary

Colonization density of *Mesorhizobium huakuii* JS5A16L marked with *luxAB* genes on the root of *Astragalus sinicus* reached to the maximum (7.88 log cfu/g root) in rhizobox-soil microcosm 2 days after seed planted, then reduced and kept in a stable level for a long time. After 58 days, it rose up a little, and also the strain could dispersed to the place of 22cm from seed to root tip. The colonization dynamics in pot-soil microcosm is similar with those in rhizobox-soil microcosm. Under the field conditions, however, it reached to the maximum (7.03 log cfu/g root) 30 days after seed planted, afterward declined to the minimum (5.24 log cfu/g root) 90 days later, then began to go up to 7.89 log cfu / g root 20 days after plant harvested. Inoculation of JS5A16L strain could increase the plant biomass of *Astragalus sinicus* in a large scale.

Key words *luxAB*, *Mesorhizobium huakuii* JS5A16, *Astragalus sinicus*, Root colonization, Nodulation