

硫代葡萄糖甙和类黄酮对枯草芽孢杆菌 在油菜根部定殖的影响^{*}

胡小加 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)

EFFECT OF GLUCOSINOLATES AND FLAVONOIDS ON COLONIZATION OF *BACILLUS SUBTILIS* Tur 100(pXLGD4) IN ROOTS OF RAPE

Hu Xiaojia Jiang Mulan Zhang Yinbo

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

关键词 硫代葡萄糖甙; 类黄酮; 油菜

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^[1,2]。植物促生细菌(Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)在植物的根际普遍存在, 应用某些优良菌株促进植物生长的试验也获得了不少好的结果, 但这些试验多在人工控制的条件下进行, 真正应用于大田生产的效果却很不稳定或无效果。其原因在于接种的细菌未能在植物根际存活或继续生长繁殖。到目前为止, 人们只顾及单一因素, 即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、植物种类及其品种品质与细菌在根际生存能力相互关系进行综合考察^[3]。由于 PGPR 应用效果的不稳定性, 近二十年来, 在国内外的商品化进程中受到很大程度的限制。造成不稳定性的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^[4,5]。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十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^[6,7]。本研究以 Lac Z 为报告基因的质粒 pXLGD4 为供体, 采用电极转化法标记植物促生根际细菌~枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* Tur 100), 所得菌株 Tur 100(pXLGD4)用作试验。在不同油菜品种的根部接种 Tur 100(pXLGD4) 加或不加类黄酮, 通过 Tur 100 在油菜侧根细胞间隙间移殖内生(LRCs), 观察 Tur 100(pXLGD4)的侵染频率以及明确类黄酮所起的作用等, 为今后进一步深入地研究植物促生根际细菌与油菜的相互关系和细菌肥料在油菜上的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

枯草芽孢杆菌 Tur 100, 以 Lac Z 为报告基因的质粒 pXLGD4 为供体, 采用电极转化法^[8]标记 Tur 100, 得到 Tur 100(pXLGD4), 来自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。

1.2 油菜品种

甘蓝型油菜(表 1)。

* 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)”资助

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

收稿日期: 2006-02-21; 收到修改稿日期: 2006-06-08

表 1 供试油菜品种及来源

品种	硫代葡萄糖甙	芥酸	来源
中油 821	高	高	中国农业科学院油料作物研究所
Askari	高	高	英国诺丁汉大学生命科学系
四川 4678	高	低	中国农业科学院油料作物研究所
浙江 5110	高	低	中国农业科学院油料作物研究所
Industry	低	高	英国诺丁汉大学生命科学系
Almea	低	高	英国诺丁汉大学生命科学系
中双 4 号	低	低	中国农业科学院油料作物研究所
Express	低	低	英国诺丁汉大学生命科学系

1.3 类黄酮

黄烷酮(Naringenin), 购自美国西克玛化学公司。

1.4 油菜种子的处理、培养、加黄烷酮及接种 *Tur* 100(pXLGD4)

种子用 0.1% HgCl₂ 进行常规表面灭菌 3 min, 无菌水洗涤 7 次, 将种子移到无菌的含有滤纸和无菌水的培养皿中, 在 26 °C 下催芽, 待种子萌发后将其转入到 25 mm × 180 mm 的试管中, 试管含有 20 ml 半固体植物营养培养基^[9]; 加黄烷酮的试管, 黄烷酮配成原液加入, 其浓度达到 $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; *Tur* 100(pXLGD4) 的接种量为 200 μl ($1 \times 10^8 \text{ cfu ml}^{-1}$)。将含有幼苗的试管置于 24 °C 光照室培养, 光照强度为 3 200 lx, 光照 12 h, 黑暗 12 h。

1.5 试验设置

16 个处理分别为: (1) 中油 821 接种 *Tur* 100(pXLGD4); (2) 中油 821 接种 *Tur* 100(pXLGD4) 加黄烷酮; (3) Askari 接种 *Tur* 100(pXLGD4); (4) Askari 接种 *Tur* 100(pXLGD4) 加黄烷酮; (5) 四川 4678 接种 *Tur* 100(pXLGD4); (6) 四川 4678 接种 *Tur* 100(pXLGD4) 加黄烷酮; (7) 浙江 5110 接种 *Tur* 100(pXLGD4); (8) 浙江 5110 接种 *Tur* 100(pXLGD4) 加黄烷酮; (9) Industry 接种 *Tur* 100(pXLGD4); (10) Industry 接种 *Tur* 100(pXLGD4) 加黄烷酮; (11) Almea 接种 *Tur* 100(pXLGD4); (12) Almea 接种 *Tur* 100(pXLGD4) 加黄烷酮; (13) 中双 4 号接种 *Tur* 100(pXLGD4); (14) 中双 4 号接种 *Tur* 100(pXLGD4) 加黄烷酮; (15) Express 接种 *Tur* 100(pXLGD4); (16) Express 接种 *Tur* 100(pXLGD4) 加黄烷酮。每个处理 24 个重复。

1.6 Lac Z 基因的检测及显微镜观察

在油菜生长 16 d 后, 将油菜根部剪下, 放入用

二甲基甲酰胺溶液配制的含 2% X-gal(5-溴-4-氯-3-吲哚-β-半乳糖苷) 溶液中, 过夜观察。通过组织化学染色, 及 Lac Z 基因所产生的 β-半乳糖苷与 X-gal 起蓝色反应, 使得 *Tur* 100(pXLGD4) 在侧根两侧(入侵处)形成蓝色, 即侧根细胞间隙间并移植内生(LRCs)。侵染不同品种油菜侧根细胞间隙间并移植内生的百分数(LRCs)为被侵染的侧根数(L)除以侧根总数(T), 即 $LRCs = L/T \times 100\%$ 。将根部蓝色部分切下, 采用 Epon 812 环氧树脂包埋、切片、甲基胺蓝染色、光学显微镜观察及照相^[10]。

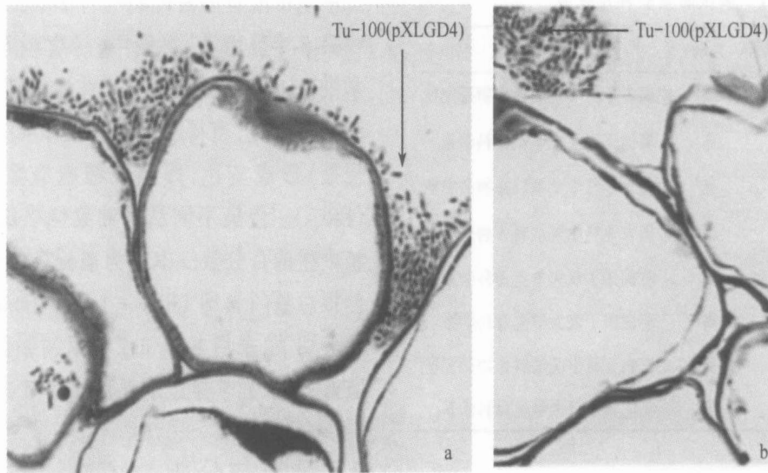
2 结果与分析

2.1 *Tur* 100(pXLGD4) 在油菜中的定殖及其影响因素

油菜生长 16d 后, 通过光学显微镜观察显示, 在质粒 pXLGD4 上的 Lac Z 与 X-gal 产生反应, 形成深蓝色, *Tur* 100(pXLGD4) 是从根缝隙侵入的。根部接种 *Tur* 100(pXLGD4) 以及加或不加黄烷酮, 枯草芽孢杆菌均能从侧根缝隙侵入, 并沿着细胞间隙向内延伸, 从外皮层至内皮层细胞间均有枯草芽孢杆菌的分布, 图 1a 显示出中油 821 接种 *Tur* 100(pXLGD4) 加黄烷酮, *Tur* 100(pXLGD4) 存在于细胞间隙, 图 1b 为中油 821 仅接种 *Tur* 100(pXLGD4), 使得 *Tur* 100(pXLGD4) 不能进入细胞间隙。中油 281 是高硫甙高芥酸型油菜, 结合图 2 分析可得出, 芥酸对 *Tur* 100(pXLGD4) 在油菜侧根细胞间隙定殖的影响不明显, 硫甙明显抑制 *Tur* 100(pXLGD4) 在油菜侧根细胞间隙定殖, 黄烷酮能够解除硫甙对 *Tur* 100(pXLGD4) 侵染的阻碍。

2.2 *Tur* 100(pXLGD4) 侵染油菜根系的 LRCs

Tur 100(pXLGD4) 侵染不同油菜品种侧根细胞间隙间并移植内生(LRCs) 的百分率是不同的(图 2)。从图 2 可以看出高硫甙、高芥酸和高硫甙、低芥酸两类品系, 仅接种 *Tur* 100(pXLGD4) 不加黄烷酮的 LRCs 比率分别为 8.1%、10.6%、13.2% 和 11.8%, 而接种 *Tur* 100(pXLGD4) 同时加黄烷酮的 LRCs 比率分别为 47.3%、53.7%、45.5% 和 50.3%, 即分别增加 40 个百分点左右。但在低硫甙、高芥酸和低硫甙、低芥酸两类品系中, 接种 *Tur* 100(pXLGD4) 加黄烷酮的处理较仅仅接种 *Tur* 100(pXLGD4) 的处理增加约 10 个百分点。



a 加黄烷酮; b 不加黄烷酮

图1 黄烷酮对中油 821 侧根细胞间隙间 Tu-100(pXLGD4) 定殖的影响(照片放大倍数为 1000)

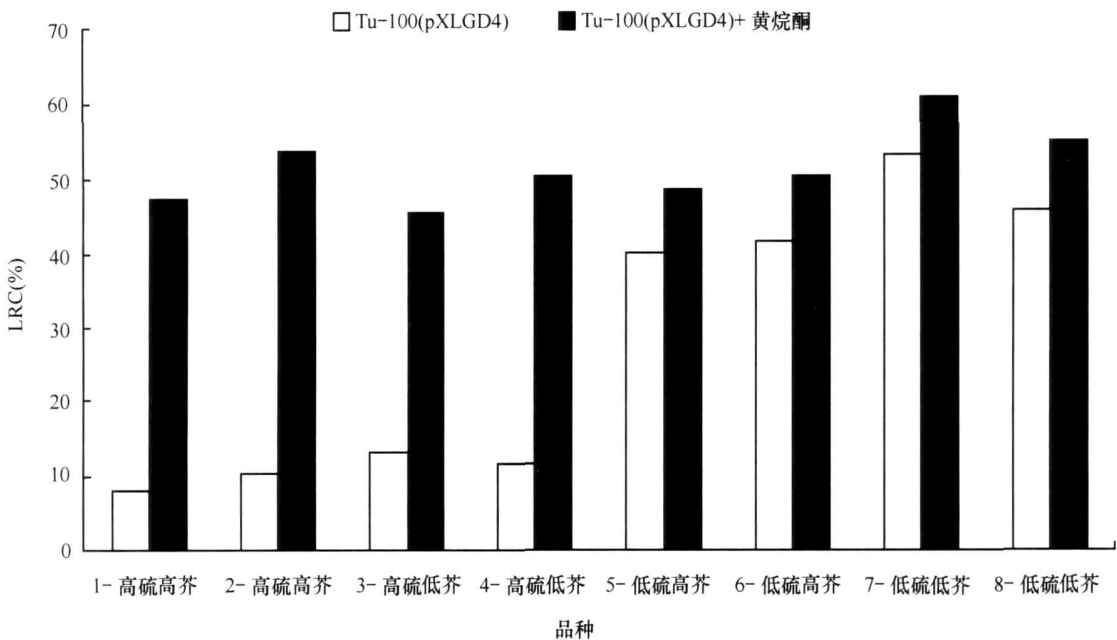


图2 油菜品种接种 Tu-100(pXLGD4) 加或不加黄烷酮的 LRCs 百分率(1. 中油 281; 2. Askari; 3. 四川 4678; 4. 浙江 5110; 5. Industry; 6. Alema; 7. 中双 4 号; 8. Express)

从枯草芽孢杆菌加或不加黄烷酮侵染不同的油菜品种所得 LRCs 百分率的结果, 可以看出硫甙对枯草芽孢杆菌的入侵有抑制作用, 而芥酸作用不明显。硫甙是一类天然物质, 它广泛存在于十字花科植物中。植物中的硫甙与其共存的一种芥子酶, 在适宜的条件下, 相互作用产生的某些水解产物是导致产生毒性、特殊气味的原因^[11]。一般来说硫甙大量存在于油菜的种子和根、茎、叶中^[12]。硫甙水解所产生的两类主要化合物为异硫氰酸酯和恶唑烷

酮。是否二种或其中的一种对枯草芽孢杆菌有抑制作用, 或者是黄烷酮对芥子酶有抑制作用, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] 李卓棣. 微生物学. 北京: 中国农业出版社, 2000. 190~201
- [2] Yao H Y, He Z L, Campbell C D, *et al.* Some limitations of BIOLOG system for determining soil microbial community. *Pedosphere*, 2000, 10(1): 37~44

- [3] 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
- [4] Roberts D P, Kobayashi D Y. Behavior of biocontrol bacteria in the spemsphere and rhizosphere. *Plant Pathology*, 1996, 1: 137~ 147
- [5] 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
- [6] 胡小加, 江木兰, 张银波. 巨大芽孢杆菌在油菜根部定殖和促生作用的研究. *土壤学报*, 2004, 41(6): 945~ 948
- [7] Hu X J, Roberts P D, Jiang M L, *et al.* Decreased incidence of disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and improved plant vigor of oilseed rape with *Bacillus subtilis* Tr 100. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68: 802~ 807
- [8] Sambrook J, Russell D W 著. 黄培堂译. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002. 99~ 102
- [9] 周平贞, 邓金兰, 张学江, 等. 豆科植物结瘤试验——水培法介绍. *中国油料*, 1979, 2: 60~ 63
- [10] O' callaghan J K, Stone J P, Hu X J, *et al.* Effects of glucosinolates and flavonoids on colonization of the roots of *Brassica napus* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5): 2 185~ 2 191
- [11] 官春云. 油菜品质改良和分析方法. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985. 66~ 71
- [12] 官春云. 油菜品质改良和分析方法. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985. 47~ 49