

水稻内生固氮细菌的分离及鹌鸡肠球菌在水稻根中的分布

王逸群^{1,2}, 郑金贵², 陈文列³, 钟秀容³

(1. 福建师范大学生物工程学院, 福州 350007; 2. 福建农林大学生物技术中心, 福州 350002; 3. 福建医科大学电子显微镜室, 福州 350004)

摘要: 从福建省推广的谷秆两用水稻 201 中分离出内生细菌 12 株, 鉴定为阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、鹌鸡肠球菌 (*Enterococcus gallinarum*)、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、脂肪杆菌 (*Pimelobacter*) 和节杆菌 (*Arthrobacter*)。选择固氮酶活性较大的 3 个菌株, 对其抗性、革兰氏染色特性进行了研究。采用三亲交配法将标记基因 *nifH-lacZ* 导入到鹌鸡肠球菌中, 用该固氮细菌回接水稻, 对感染鹌鸡肠球菌的水稻根进行 β -半乳糖苷酶组织化学染色、光学显微镜和电子显微镜观察。结果表明, 固氮细菌鹌鸡肠球菌在水稻根表皮细胞、内皮层细胞、维管组织细胞和细胞间隙中存在。

关键词: 水稻; 内生固氮细菌; 分离; 分布

中图分类号: Q939.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)04-0296-07

Isolation of an Endophytic Diazotroph from Rice and the Distribution of *Enterococcus gallinarum* in Rice Roots

WANG Yi-qun^{1,2}, ZHENG Jin-gui², CHEN Wen-lie³, ZHONG Xiu-rong³

(1. College of Biological Engineering, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China; 2. Center of Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. Department of Electron Microscope, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

Abstract: Twelve strains of endophytic diazotrophic bacteria were isolated from grain-straw-dual-purpose rice 201 popularized in Fujian Province. They were identified as: *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus gallinarum*, *Bacillus pumilus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. sphaericus*, *B. cereus*, *Pimelobacter*, and *Arthrobacter*. Three strains with high acetylene reduced activity were selected to study the bacterial resistance to antibiotics, and results of Gram staining. The plasmids harboring the reporter gene *lacZ* fused to the promoters of *nifH* were transformed into *Enterococcus gallinarum* by triparental crossing. The inoculated rice roots were examined by β -galactosidase staining and observed under light and electron microscopes. The results indicated that the endophytic diazotrophic bacteria existed in epidermal cells, cortex cells, vascular tissue cells and intercellular spaces of rice roots.

Key words: Rice; Endophytic diazotroph; Isolation; Distribution

在健康植物组织的内部也有微生物存在, 这类微生物称为植物内生菌, 主要是指内生真菌和内生细菌。感染内生菌的植物宿主与未感染的植株相比, 具有生长速度快、抗病原菌和抗逆境能力强的优点, 从而提高了植物生存的竞争能力和对自然环

境的适应能力, 因此从生态学角度来看, 植物内生菌发挥了重要的作用^[1]。

禾谷类作物自主固氮是世界生物固氮研究中的重大和热点问题。当今世界每年生产近亿万吨氮肥用于水稻、小麦、玉米等禾谷类作物的施肥。在生

收稿日期: 2005-03-16 接受日期: 2005-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30070467); 福建省科技厅青年人才创新项目(2001J047); 福建省博士后基金项目资助

产氮肥过程中,大量的二氧化碳气体排放,加重了全球的温室效应;在使用中有50%以上的氮肥流失,结果使土壤矿化,反硝化产生亚硝酸等有毒物质,严重污染水土资源,使环境恶化,生态失衡。研究非豆科固氮的目标就是使禾谷类作物能自主固氮,达到少施化肥,保护环境的目的。上述问题已引起化学、生物化学、农业生物学和植物分子生物学等领域研究者的普遍重视^[2]。1986年Barbara从卡拉草内分离到了固氮弧菌(*Azoarcus* sp.)。研究表明由于固氮弧菌的作用使生长在巴基斯坦常年不施任何氮肥的盐碱土中的卡拉草每年可收获20-40 t hm⁻²^[3]。1987年Lima等人研究证明了甘蔗所需N素营养的60%来自于生物固氮作用^[4],1988年Cavalcante等人从甘蔗体内分离到固氮醋酸杆菌(*Acetobacter diazotrophicus*)^[5]。这些给我们很大启示:若要实现禾谷类作物自主固氮这一目标,其可行途径是利用作物自身所具有的内生固氮体系。

本文从福建农林大学选育的谷种两用水稻品种中分离得到固氮细菌12株,采用乙炔还原法测定内生固氮细菌的固氮酶活性,并对内生固氮细菌进行鉴定。选择固氮酶活性较高的鸚鸡肠球菌感染水稻根,并在电子显微镜下进行观察。本实验为进一步研究内生固氮细菌与植物的相互作用奠定基础。

1 材料和方法

植物材料 谷种两用水稻种子201、水稻种子明恢86、水稻种子中花8号、水稻种子中花10号均由本室保存。

菌株和质粒 pAB358、pRK2013 HB101由中国农业大学李季伦教授惠赠。其中,pAB358含有nifH启动子调控的lacZ基因,pRK2013为协助质粒。大肠杆菌DH5 α 由本室保存。

固氮细菌的分离 取试验田中的谷种两用水稻201的根,对其进行表面消毒:0.1%的HgCl₂消毒5 min,无菌水洗涤5次,70%乙醇消毒1 min,无菌水洗涤5次。将表面消毒过的材料用研钵研碎,取其汁液涂布在Ashbg无氮培养基上,28℃培养,2-3 d长出菌落。将长出的细菌回接在已表面消毒无菌培养的水稻种子上。待水稻长到10 cm左右,取该材料进行表面消毒,用研钵研碎,取其汁液涂布在Hurek培养基上,28℃培养,2-3 d长出菌落。然后对分离到的细菌进行纯化。

内生固氮细菌的乙炔还原酶活性测定 按

文献[6]的方法,用岛津GC-8A气相色谱仪测定内生固氮细菌的乙炔还原酶活性。

内生固氮细菌的鉴定 按文献[7-9]的方法,用法国生物梅里埃公司VITEK32型全自动细菌生化鉴定仪和美国BD公司Phoenix system全自动细菌鉴定仪对细菌进行鉴定。

革兰氏染色 以大肠杆菌(*Escherichia coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)分别作为阴性、阳性对照,经过草酸铵结晶紫染色,碘液媒染,再以酒精脱色,最后以番红复染,根据染色情况确定革兰氏阴阳性。

固氮细菌的荧光染色 用染料EB进行染色,在荧光显微镜下观察。

固氮细菌的抗性鉴定 选用卡那霉素、氨苄青霉素、四环素、利福平、头孢霉素,按照0 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹, 100 mg L⁻¹, 200 mg L⁻¹浓度梯度对固氮细菌进行抗生素敏感性鉴定。

三亲交配法 按文献[10,11]的方法进行。将nifH启动子调控的lacZ基因通过三亲交配法导入固氮细菌。

β -半乳糖苷酶组织化学染色 按文献[12]的方法进行。取用含有标记基因的鸚鸡肠球菌(*Enterococcus gallinarum*)感染水稻根,进行 β -半乳糖苷酶组织化学染色。

水稻接种固氮细菌后对细菌进行光学显微镜观察 按文献[13]的方法进行。取接种鸚鸡肠球菌并且经过 β -半乳糖苷酶组织化学染色后染成蓝色的水稻根,连同作为对照的未接种固氮细菌的水稻根一起,用3%戊二醛和1%钨酸进行双固定,依次置于各级丙酮中脱水,Spurr树脂渗透、包埋,在LKB2088型超薄切片机上切片。美蓝染色,光学显微镜下观察。

水稻接种固氮细菌后对固氮细菌进行电子显微镜观察 按文献[14]的方法进行。进行透射电镜观察的材料按下列方法进行处理:接种鸚鸡肠球菌的水稻根连同未接种固氮细菌的水稻材料一起,经过固定、脱水和包埋后,先进行半薄切片,通过光学显微镜下观察定位后,进行超薄切片,切片厚度为60-80 nm,用醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染,在JEM-100CX/II型透射电镜下观察和拍照。进行扫描电镜观察的材料按下列方法进行处理:接种鸚鸡肠球菌的水稻根连同未接种固氮细菌的水稻材料一起,经过固定、脱水、临界点干燥后喷金,在JSM-5310LV型扫描电镜下观察和拍照。

固氮菌对水稻的作用 首先将水稻种子表面消毒,然后在无菌条件下萌发。在 Hurek 液体培养基中培养鹌鸡肠球菌,然后用该细菌接种水稻幼苗的根。将作为对照未接菌的水稻与接种鹌鸡肠球菌的水稻分别种植到经过消毒的 Hurek 固体培养基中,每个大试管种 1 株,在光照培养箱中进行光照培养,培养温度 26℃。培养 1 个月后对水稻的生长情况进行观察。

2 结果和分析

2.1 固氮细菌的分离与乙炔还原酶活性

经过回接分离,共分离到固氮细菌 12 株。对它们进行乙炔还原酶活性测定,结果见表 1。

表 1 水稻内生细菌的乙炔还原活性的测定
Table 1 Detection of acetylene reduction activity (ARA)
of endophytic bacteria in rice

菌株 Strains	乙炔还原酶活性 ARA (nmol C ₂ H ₄ ml ⁻¹ h ⁻¹)
1	744.44
2	806.58
3	495.56
4	74.37
5	82.30
6	18.22
7	65.05
8	72.64
9	58.50
10	58.50
11	7.36
12	0

由于固氮细菌的固氮酶活性与乙炔还原酶活性存在正相关,因此固氮细菌乙炔还原酶活性的大小可以反映固氮酶活性大小。从表中可见,乙炔还原酶活性较高的菌株有 3 株(即固氮细菌菌株 1、菌株 2、菌株 3),它们的固氮酶活性较高,我们推测它们参与固定大气中氮的能力可能较强,因而有必要对这 3 个菌株加以研究。

2.2 水稻内生固氮细菌的鉴定

对分离到的 12 株水稻内生固氮细菌进行了鉴定,结果见表 2。

12 株固氮细菌分属于阴沟肠杆菌、鹌鸡肠球菌、短小芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、球形芽孢杆菌、脂肪杆菌和节杆菌 9 种。结果表明健康的水稻植株中存在着内生固氮细菌。

表 2 水稻内生固氮细菌的鉴定结果
Table 2 Identification of endophytic bacteria in rice

菌株 Strains	鉴定 Identification
1	阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloaca</i>
2	鹌鸡肠球菌 <i>Enterococcus gallinarum</i>
3	短小芽孢杆菌 <i>Bacillus pumilus</i>
4	蜡状芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>
5	短小芽孢杆菌 <i>B. pumilus</i>
6	蜡状芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>
7	巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i>
8	巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i>
9	地衣芽孢杆菌 <i>B. licheniformis</i>
10	球形芽孢杆菌 <i>B. sphaericus</i>
11	脂肪杆菌 <i>Pimelobacter</i>
12	节杆菌 <i>Arthrobacter</i>

2.3 固氮细菌的革兰氏染色和荧光染色

对乙炔还原酶活性较高的 3 个菌株进行革兰氏染色,结果表明,鹌鸡肠球菌为革兰氏阴性细菌,阴沟肠杆菌和短小芽孢杆菌是革兰氏阳性细菌。形态学观察表明,菌株 1 阴沟肠杆菌为长杆菌(图版 I: B, 革兰氏染色)。菌株 2 鹌鸡肠球菌为球菌(图版 I: G, 荧光染色),菌株 3 短小芽孢杆菌为短杆菌(图版 I: C, 荧光染色)。

2.4 固氮细菌对抗生素抗性鉴定

为了对固氮细菌进行分子操作,需要对乙炔还原酶活性较高的 3 个菌株进行抗生素抗性测定。结果表明,这 3 个菌株对氨苄青霉素、四环素、利福平、头孢霉素都具有一定的抗性,只有抗生素浓度较高时,才对这 3 株细菌有抑制作用,但它们对卡那霉素都较为敏感。因此,在某些质粒中含有外源基因和卡那霉素筛选标记基因时,如果将这些质粒导入到这 3 个菌株中,用适当浓度的卡那霉素筛选,就可以获得转外源基因的菌株。同时,研究菌株对抗生素的敏感性和抗性,也可以对菌株染色体上是否存在抗性基因有所认识。

2.5 β-半乳糖苷酶组织化学染色

通过三亲交配法将质粒 pAB358 导入到鹌鸡肠球菌中,在涂有 X-gal 和 IPTG 的 hurek 平板上经过卡那霉素筛选,出现蓝色菌落。再挑取单菌落在同样的培养基上划线培养 2-3 d,有蓝色菌落出现,而作为对照的非转基因的鹌鸡肠球菌无此反应,从而证明标记基因已经导入到鹌鸡肠球菌中(图版 I: A)。

将水稻接种含有标记基因的鹌鸡肠球菌,2 周后取其根,用无菌水进行数次洗涤,去除根表的固氮

细菌,然后进行 β -半乳糖苷酶组织化学染色。经过次氯酸钠透明后,在解剖镜下观察染色结果。取染成蓝色的材料,进行徒手切片观察,发现根的横切片中有LacZ染色的斑点。

2.6 光学显微镜观察

对接种鹌鸡肠球菌的水稻根进行半薄切片,光学显微镜观察结果表明,在水稻根的表面细胞、内皮层、维管组织细胞都有内生固氮细菌的存在,固氮细菌存在于细胞中和细胞间隙(图版 I: D、E、F)。

2.7 电子显微镜观察

对接种鹌鸡肠球菌的水稻根进行处理后,在扫描电子显微镜上观察,结果表明,固氮细菌在细胞中大量存在(图版 II: A-D),在侧根的裂隙中也发现了固氮细菌(图版 II: E、F)。

对接种鹌鸡肠球菌的水稻根进行超薄切片,在透射电子显微镜上观察,结果表明:在细胞间隙和细胞中都有固氮细菌,细菌宽度 $0.35\text{--}0.55\ \mu\text{m}$,长度 $1.2\text{--}1.5\ \mu\text{m}$,细胞壁厚度 $100\text{--}150\ \text{nm}$,而对照细胞及细胞间隙无固氮细菌(图版 II: G-J)。虽然细胞间隙存在固氮细菌,但细胞壁结构完好无损,细胞内可见结构完整的细胞核和线粒体。从透射电子显微镜观察结果来看,细菌的存在并未使植物的超微结构发生改变。

2.8 鹌鸡肠球菌对水稻的作用

水稻接种鹌鸡肠球菌1个月后,对植株高度、鲜重进行测定,结果表明未接固氮细菌的对照植株平均高度为 $10.00\ \text{cm}$,而接种鹌鸡肠球菌的平均高度为 $20.92\ \text{cm}$,提高幅度为 109% ;对照植株单株平均鲜重为 $0.147\ \text{g}$,而接种鹌鸡肠球菌的平均为 $0.223\ \text{g}$,提高幅度为 51.7% 。由此可见,接种鹌鸡肠球菌对水稻的生长具有促进作用。

3 讨论

固氮细菌在细胞内以分散或聚集状态分布,固氮细菌侵入宿主植物细胞后,宿主细胞并未出现防御反应现象,其超微结构与对照一样并未发生改变,未出现组织坏死和细胞死亡现象,可见该固氮细菌和宿主细胞相处十分协调(图版 II: H)^[15]。

在表皮细胞、内皮层、维管组织细胞都观察到了固氮细菌,在细胞间隙和侧根裂隙的细胞中有固氮细菌存在,由此推断固氮细菌可能通过细胞间隙

和侧根裂隙细胞侵入。然而根瘤菌侵入豆科植物的方式是:根瘤菌首先吸附到豆科植物的根毛上,经过二者信号分子交换即专一性识别作用后,豆科植物根毛发生卷曲,根瘤菌被包围在凹部,然后穿过粘液层,通过根毛的卷曲作用被挤压在根毛细胞或附近表皮细胞的细胞壁上。接着局部的细胞壁降解,细菌侵入植物细胞,开始形成侵入线。由此可见,根瘤菌侵入豆科植物的方式与固氮细菌侵入水稻根的方式是不同的。

致谢 对于福建农林大学谢宝贵副教授提供的无私帮助,表示衷心感谢!

参考文献

- [1] An Q L (安千里), Yang X J (杨学健), Dong Y M (董越梅), et al. Using confocal laser scanning microscope to visualize the infection of rice roots by GFP-labelled *Klebsiella oxytoca* SA₂, an endophytic diazotroph [J]. Acta Bot Sin, 2001, 43(6):558-564. (in Chinese)
- [2] Stoltzfus J R, So R, Malarvithi P P, et al. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen [J]. Plant Soil, 1997, 194:25-36.
- [3] Reinhold-Hurek B, Hurek T. Life in grass: diazotrophic endophytes [J]. Trend Microbiol, 1986, 6:139-144.
- [4] Lima E, Boddey R M, Dobereiner J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ¹⁵N aided nitrogen balance [J]. Soil Biol Biochem, 1987, 19:165-170.
- [5] Cavalcante VA, Dobereiner J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane [J]. Plant Soil, 1988, 108: 23-32.
- [6] Hai W L (海伟力), Wang Y D (王耀东), You C B (尤崇杓), et al. Studies on the associative diazotrophs in rice rhizosphere [J]. Acta Microbiol Sin (微生物学报), 1993, 33(2):79-85. (in Chinese)
- [7] Group of Bacteria Classification in Institute of Microbiology, Academia Sinica (中国科学院微生物研究所细菌分类组). Methods in Bacteria Identification [M]. Beijing: Science Press, 1975. 51-102. (in Chinese)
- [8] Gordon R E, Haynes W C, Pang C H N. Translated by Cai M Y (蔡妙英), Liu Y T (刘聿太), Zhan L K (战立克). *Bacillus* [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 1983. 30-98. (in Chinese)
- [9] Murry R G E, Brenner D J, Bryant M P, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. I [M]. Baltimore, London: Williams and Wilkins, 1984. 540-570.
- [10] Mo C Q (莫才清), Qing Y L (覃雅丽), Zhou J C (周俊初), et al. *luxAB* genes as marker for detecting *Rhizobium fredii* HN01 nodulation functions [J]. Acta Microbiol Sin (微生物学报), 1998, 38(3):213-218. (in Chinese)
- [11] Mo C Q (莫才清), Zhou J C (周俊初), Li F D (李阜棣). Development of a suicide plasmid containing *luxAB* genes and its translo-

- cation to *Rhizobium fredii* HN01 [J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 1997, 3(3):252-257. (in Chinese)
- [12] Boivin C, Camut S, Malpica C A, et al. *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions [J]. *Plant Cell*, 1990, 2:157-1170.
- [13] Li Z L(李正理). *Plant Tissue Microtomy* [M]. Beijing: Beijing University Press, 1996. 17-138. (in Chinese)
- [14] Cui K M(崔克明), Luo L X(罗立新), Li Z L(李正理). Ultrastructural observation of changes of polysaccharide grains in dormant shoots of *Eucommia ulmoides* [J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 2000, 42(8):788-793. (in Chinese)
- [15] Cocking E C, Davey M R, Kothari S L, et al. Altering the specificity control of the interaction between *Rhizobia* and plants [J]. *Symbiosis*, 1992, 14:123-130.

图版说明

图版 I

A. lacZ 标记的固氮细菌; B. 固氮细菌 1 (阴沟肠杆菌); C. 经过荧光染色的固氮细菌 3 (短小芽孢杆菌); D-F. 水稻根的半薄切片。D. 未接种固氮细菌的水稻根作为 E、F 的对照; E、F. 水稻根皮层、维管组织细胞内的固氮细菌; G. 经过荧光染色的固氮细菌 2 (鸭鸡肠球菌)。

图版 II

ED. 内生固氮细菌; CR. 裂隙; M. 线粒体; N. 细胞核。A-F. 扫描电子显微镜观察。A. 未接种固氮菌的水稻根横切面, 作为 B 的对照($\times 750$); B. 接种鸭鸡肠球菌的水稻根横切面(箭头所指为固氮细菌)($\times 3\ 500$); C. 未接种固氮菌的水稻根横切面, 作为 D、E、F 的对照($\times 3\ 500$); D. 单个细胞内的固氮细菌(箭头所指为固氮细菌)($\times 5\ 000$); E. 水稻侧根, 箭头所指为侧根裂隙($\times 350$); F. 放大的水稻侧根裂隙, 可见固氮细菌(箭头所指为固氮细菌)($\times 7\ 500$); G-J. 透射电子显微镜观察。G. 未接种固氮细菌的水稻根, 作为 H、I、J 的对照, 细胞内和细胞间隙无固氮细菌, 可见线粒体(箭头所指)($\times 4\ 800$); H. 接种固氮

细菌的水稻根细胞, 细胞间隙可见固氮细菌, 细胞内可见结构完整的细胞核和线粒体(箭头所指)($\times 7\ 000$); I. 细胞内和细胞间隙中的固氮细菌, 箭头所示细胞间隙中的固氮细菌($\times 3\ 000$); J. 示细胞内的固氮细菌($\times 3\ 600$)。

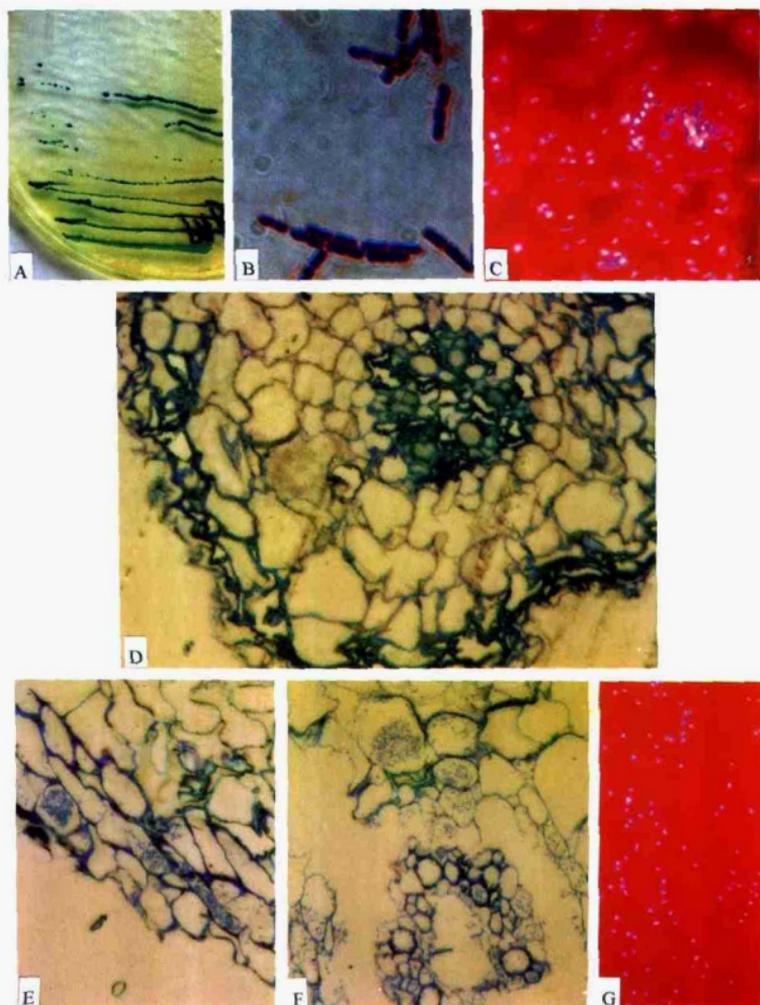
Explanation of plates

Plate I

A. Diazotroph with *nifH-lacZ* reporter gene; B. The diazotroph 1 (*Enterobacter cloacae*); C. The diazotroph 3 (*Bacillus pumilus*) after the fluorescence staining; D-F. Semi-thin section of rice root. D. The rice roots without inoculation as the control; E, F. Showing diazotroph in cortex cell and vascular cell; G. The diazotroph 2 (*Enterococcus gallinarum*) after the fluorescence staining.

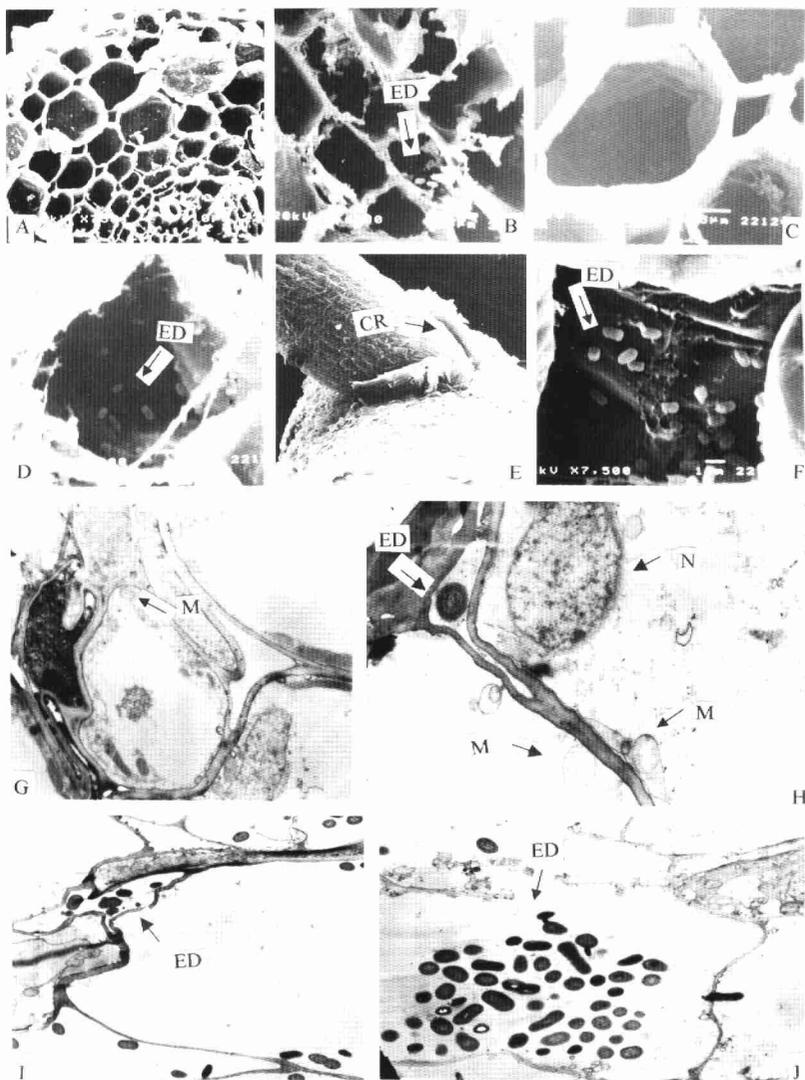
Plate II

ED. Endophytic diazotroph; CR. Crevice; M. Mitochondrion; N. Cell nucleus. A-F. Rice root under scanning electron microscope. A. Rice root without inoculation as the control ($\times 750$); B. Rice root inoculated with *Enterococcus gallinarum* after cross-section ($\times 3\ 500$); C. The rice root without inoculation as the control ($\times 3\ 500$); D. The diazotroph in the cell ($\times 5\ 000$); E. Lateral root of rice, showing crevice in lateral root (arrow) ($\times 350$); F. Enlargement of crevice in lateral root. Diazotroph were found in crevice (arrow) ($\times 7\ 500$); G-J. Rice roots under transmission electron microscope. G. The rice root without inoculation as the control. No bacteria were found in intercellular and intracellular spaces of rice root. The nucleus and mitochondria were observed in intracellular space ($\times 4\ 800$); H. The cell of rice root inoculated with diazotroph. The diazotroph were observed in intercellular space of rice root and the nucleus and mitochondria with integrity in cellular structure were also found in intracellular space of rice root ($\times 7\ 000$); I. The diazotroph in intercellular (arrow) and intracellular spaces of rice roots ($\times 3\ 000$); J. Showing the diazotroph in intracellular space of rice root (arrow) ($\times 3\ 600$).



王逸群等: 图版 1

WANG Yi-qun et al.: Plate 1



王逸群等: 图版 II