

# 水稻内生固氮细菌的生化特性及其对烟草和玉米的侵染\*

王逸群<sup>1</sup>, 钟秀容<sup>2</sup>

(1 福建师范大学生命科学学院发育与神经生物学重点实验室, 福建 福州 350108;

2 福建医科大学电子显微镜室, 福建 福州 350004)

**摘要:** 对水稻内生固氮菌 N1 (短小芽孢杆菌, *Bacillus pumilus*)、N2 (阴沟肠杆菌, *Enterobacter cloacae*) 和 N3 (鹌鸡肠球菌, *Enterococcus gallinarum*) 的一些生化特性及其对烟草和玉米的侵染进行了研究。采用三亲交配法将标记基因 *nifH-lacZ*、*nifHDK-lacZ* 和 *gfp* 分别导入到固氮菌中, 用携带标记基因的固氮菌分别接种烟草云烟 85 和玉米吉甜 6 号, 对感染固氮菌的烟草和玉米材料进行  $\beta$ -半乳糖苷酶组织化学染色和激光共聚焦扫描显微镜、透射电子显微镜和扫描电子显微镜观察。光学显微镜和电子显微镜观察结果表明在接菌的烟草和玉米部分根细胞中和细胞间隙都发现了固氮菌, 在接菌的玉米茎的维管组织细胞中也发现了固氮菌, 推测固氮菌从玉米根开始向上移动。接种固氮菌 N3 的玉米与对照相比, 在鲜重上提高了 18.53%。

**关键词:** 固氮菌; 生化特性; 烟草; 玉米; 侵染

中图分类号: Q 939.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2008)02-211-10

## Biochemical Characteristics of Rice Endophytic Diazotrophic Bacteria and Their Infection to Tobacco and Maize

WANG Yi-Qun<sup>1</sup>, ZHONG Xiu-Rong<sup>2</sup>

(1 Laboratory of Neural and Developmental Biology, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China;

2 Department of Electron Microscope, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

**Abstract:** Some biochemical properties of rice endophytic diazotrophic bacteria N1 (*Bacillus pumilus*), N2 (*Enterobacter cloacae*) and N3 (*Enterococcus gallinarum*) were characterized in this study. The plasmids harboring the reporter gene *lacZ* fused to the promoters of *nifH* and *nifHDK*, and the reporter gene *gfp* as well, were first transformed into rice endophytic diazotrophic bacteria respectively through triparental mating. After the conjugated bacteria were inoculated into tobacco Yunyan 85 and maize Jitian 6, the staining of  $\beta$ -galactosidase was carried out on the tobacco and maize roots and the observation was made under the confocal laser scanning microscope, transmission electron microscope and scanning electron microscope. The results showed that the rice endophytic diazotrophic bacteria were not only present in epidermal cells, cortex cells and intercellular spaces of tobacco and maize roots, but also found in vascular tissue cells of maize stem also, indicating that the bacteria had migrated from the roots into the stem. Data showed that the the fresh weight of maize plants inoculated with rice endophytic diazotrophic bacteria N3 was 18.52% more than that of the control.

**Key words:** Endophytic diazotrophic bacteria; Biochemical characteristics; Tobacco; Maize; Infection

非豆科植物自主固氮是世界生物固氮研究中的重大和热点问题。目前国内外已经从非豆科植物中分离到了一些内生固氮细菌, 1986年 Bar-

bara 从卡拉草内分离到了具有高固氮效率的固氮弧菌 (*Azoarcus* sp.); 1987年巴西 Dobereiner 实验室从甘蔗体内分离到内生固氮菌醋酸固氮菌

\* 基金项目: 福建省科技厅重点科技项目 (2004N026)、福建省自然科学基金项目 (B0410009) 和福建省教育厅科技项目 (JB03125) 资助  
收稿日期: 2007-06-17, 2007-09-17 接受发表

作者简介: 王逸群 (1964-) 男, 博士, 副教授。研究方向: 植物生物技术。E-mail: yiqun@fjnu.edu.cn

(*Acetobacter iazotrophicus*), 可以提供给甘蔗大部分氮素营养; 1981年丘元盛等从水稻根中分离到了粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*) A-15, 已经成功地构建了工程菌株 (Stoltzfus 等, 1997; Reinhold-Hurek and Hurek, 1986; Lima 等, 1987; 丘元盛等, 1981a, b; 尤崇杓等, 1982)。值得一提的是, 丘元盛等 (1981a, b) 对固氮菌 A-15 和 E-26 的生理生化性状进行了研究; 之后国内外一些学者对从不同种植物分离到的不同固氮细菌也进行了生理生化方面的研究, 取得了很多有意义的进展 (关秀清等, 1997; 孙晓璐等, 1999; 朱美珍和吴永强, 1999; 丁延芹等, 2004; Hannan 等, 2004; 姚拓等, 2004)。前人的研究结果给了我们很大启示, 要实现非豆科植物的自主固氮, 首先必须从植物体中分离固氮细菌, 然后对其性质进行研究, 并探讨能否扩大其宿主范围等。本文利用笔者从福建省推广的水稻品种中分离到的固氮酶活性较大的3株水稻内生固氮细菌 (王逸群等, 2005), 对其生物化学性质进行研究, 用这3株固氮细菌接种烟草和玉米, 在透射电子显微镜、扫描电子显微镜以及激光共聚焦扫描显微镜下观察它们对烟草和玉米根细胞的侵染, 本实验旨在为扩大水稻内生固氮菌的宿主范围以及为进一步研究内生固氮细菌与植物相互作用奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料

烟草云烟 85、玉米吉甜 6 号由本室保存。

### 1.2 菌株和质粒

水稻内生固氮细菌 N1 (短小芽孢杆菌, *Bacillus pumilus*)、N2 (阴沟肠杆菌, *Enterobacter cloacae*) 和 N3 (鸢鸡肠球菌, *Enterococcus gallinarum*) 由本室从水稻根中分离并保存 (王逸群等, 2005)。质粒 pHC60 携带能在原核细胞中表达的 *gfp* 基因 (四环素抗性) 由中国科学院植物研究所荆玉祥研究员惠赠; 质粒 pGFP4412 携带能在原核细胞中表达的 *gfp* 基因 (卡那霉素抗性) 由中国农业大学陈三凤教授赠送; 含有 *nifH* 启动子调控的 *lacZ* 基因的 pAB358 (卡那霉素抗性) 和协助质粒 pRK2013 由中国农业大学李季伦教授惠赠; 携带由启动子 *nifHDK* 调控的 *lacZ* 基因的 pMB210 (四环素抗性) 由北京大学王忆平教授赠送。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 水稻内生固氮菌的生化特性实验

1.3.1.1 水稻内生固氮菌的糖发酵实验 以蛋白胨 - 水为培养基, 分别加入葡萄糖、乳糖、甘露醇、蔗糖、阿拉伯糖、木糖等, 使单糖的最终浓度为 1.0%, 以酚红作为指示剂。将装有以上培养基的试管接种固氮菌 N1、N2 和 N3, 以不接种细菌的试管作为对照, 放入培养箱中 28℃ 暗培养, 48 h 后进行观察。

1.3.1.2 淀粉水解和明胶液化实验 在淀粉琼脂平板上划线接种固氮菌 N1、N2 和 N3, 以不接种细菌的平板作为对照, 置培养箱中 28℃ 暗培养, 48 h 后, 在平皿上滴加碘液, 无菌处平皿呈蓝黑色, 若细菌生长线周围变成透亮的无色, 为阳性 (+), 若细菌生长线周围仍为蓝黑色, 为阴性 (-)。

在装有明胶培养基的试管中, 接种固氮菌 N1、N2 和 N3, 以不接种细菌的试管作为对照, 放入培养箱中 28℃ 暗培养, 48 h 后将试管放入 4℃ 冰箱 30 min 后, 进行观察, 明胶培养基呈液化状态为阳性 (+), 无液化现象发生则为阴性 (-)。

1.3.1.3 触酶实验 使用无菌牙签将固氮菌 N1、N2 和 N3 从平板上取出, 将菌体涂于载玻片上, 用微量移液器将一滴过氧化氢溶液加于菌体之上, 若有气泡产生, 则为阳性 (+), 若无气泡产生, 则为阴性 (-)。

1.3.1.4 脲酶实验 在装有尿素琼脂培养基的试管中, 接种固氮菌 N1、N2 和 N3, 以不接种细菌的试管作为对照, 放入培养箱中 28℃ 暗培养 48 h 后进行观察, 若斜面上有紫红色产生, 则为阳性 (+), 若无紫红色产生, 则为阴性 (-)。

1.3.1.5 耐盐性实验 本实验所用 M9 基础盐培养基的成分如下: 每升含  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.4 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.6 g,  $\text{MgSO}_4$  0.1 g,  $\text{CaCl}_2$  0.1 g, 葡萄糖 5 g, NaCl 视实验需要添加, pH 为 6.8~7.0。在含有各种不同浓度 NaCl 的 M9 基础盐培养基上接种固氮菌 N1、N2 和 N3, 观察其生长情况, 判断其耐盐性。

1.3.1.6 氧化酶实验 取洁净的一张灭菌的滤纸, 放到培养皿中, 用无菌玻璃棒取固氮菌培养物涂于滤纸片上, 再滴加新配制的 1% 二甲基对苯二胺盐酸盐试液, 在 30 s 内由粉红色逐渐变成紫红色, 氧化酶反应为阳性, 否则为阴性。

1.3.1.7 乙酰甲基甲醇生成实验 将固氮菌接种在磷酸盐葡萄糖蛋白胨水培养基中, 28℃ 培养 48 h 后, 每 2 ml 培养液中加入 1-萘酚乙醇试液 1 ml, 混匀, 再加 40% 氢氧化钾溶液 0.4 ml, 充分振荡, 4 h 以内出现红色为阳性, 无红色反应为阴性。

1.3.1.8 枸橼酸盐利用实验 将固氮菌接种在枸橼酸钠斜面培养基上, 28℃ 培养 48 h, 斜面培养基上有菌苔生长, 培养基由绿色变为蓝色为阳性, 培养基颜色无改变时为阴性。

1.3.1.9 硝酸盐还原产气实验 将固氮菌接种在硝酸盐蛋白胨水培养基中, 28 ℃ 培养 48 h, 在装有培养基的杜氏小管中有气体产生, 即为阳性, 否则为阴性。

1.3.1.10 靛基质实验 将固氮菌接种在蛋白胨水培养基中, 28 ℃ 培养 48 h, 沿试管壁加入靛基质试液 0.3 ~ 0.5 ml, 液面呈玫瑰红色为阳性, 呈试剂本色为阴性。

1.3.1.11 苯丙氨酸脱氨酶实验 将固氮菌接种在苯丙氨酸斜面培养基上, 28 ℃ 培养 48 h。在培养好的菌种斜面上滴加 2 ~ 3 滴 10% 三氯化铁溶液, 自培养物上方流到下方, 呈蓝绿色者, 为阳性反应, 否则为阴性反应。

1.3.2 三亲交配法将报告基因 *gfp* 和 *lacZ* 导入到固氮菌中

按莫才清等 (1997; 1998) 的三亲交配法将报告基因 *gfp* 和 *lacZ* 导入到固氮菌 N1、N2 和 N3 中。

1.3.3 烟草和玉米无菌苗的制备和水稻内生固氮菌的接种

烟草和玉米种子用 1% 的硝酸银消毒 5 min, 无菌水洗涤 5 次, 再用 95% 的乙醇消毒 10 s, 用无菌水洗涤 5 次, 放到装有 LB 固体培养基的平板上 28 ℃ 暗培养 2 d 后, 将无任何污染的种子转入到 1/2 MS 固体培养基上黑暗培养 1 星期后萌发。烟草和玉米种子发芽后, 进行光照培养, 培养条件为: 培养温度为 26 ℃, 光照培养采用 16 h 光照和 8 h 黑暗的方式。

将萌发 2 ~ 3 星期并且没有污染的烟草和玉米转入到装有 Hurek 固体培养基的大试管 (玉米用培养瓶) 进行光照培养, 试管口用无菌的封口膜封住。将固氮菌 N1、N2 和 N3 接种在 Hurek 液体培养基中, 摇床转速为 220 r/min, 温度为 28 ℃ 的条件下培养 3 d 后, 取细菌培养物, 用 50 ml 离心管在 4 ℃、10 000 r/min 下离心 5 min, 去上清液, 用磷酸缓冲盐溶液 PBS (pH = 7.3) 悬浮细菌沉淀后, 用微量移液器吸取该菌液 2 ml, 接种在烟草和玉米根附近后, 将宽度为 3 cm 的牛皮纸卷成圆筒, 罩住接菌材料的根部, 然后连同不接菌的材料作为对照一起, 在 26 ℃ 条件下进行光照培养。

1.3.4  $\alpha$ -半乳糖苷酶组织化学染色和徒手切片的制作

用无菌镊子夹取接种含有标记基因 *lacZ* 的固氮菌 N1、N2 和 N3 感染烟草和玉米材料, 然后用无菌刀片将烟草和玉米根切成 1 cm 左右的小段后, 放到无菌水中清洗 10 次, 然后在 20% 的次氯酸钠溶液中消毒 5 min, 用无菌水清洗 10 次后, 放到消过毒的滤纸上去除根表面沾着的水。将表面消过毒的烟草和玉米根放到装有 LB 固体培养基的平板上 1 h 后, 将烟草和玉米根再放回 eppendorf 管中。LB 平板 28 ℃ 黑暗培养 48 h, 如果没有菌落长出来, 表明烟草和玉米根表面消毒干净, 没有细菌存在。取表面消毒干净的烟草和玉米根, 用 0.1 mol/L 的磷酸钠缓冲液 (pH = 7.2) 洗涤 3 次, 每次 5 min。用溶于 0.2 mol/L 二甲基磷酸钠 (pH = 7.2) 中的终浓度为 1.25% 的戊二醛固定 30 min, 抽真空 1 h。固定后的材料用 0.2 mol/L 的磷酸钠缓

冲液 (pH = 7.2) 洗涤 3 次, 每次 15 min。转移到染色液中染色, 在黑暗条件下, 温育过夜, 用无菌水洗涤 5 次, 每次 10 min。用 12% 的次氯酸钠透明 40 s。 $\alpha$ -半乳糖苷酶组织化学染色后按文献 (Boivin 等, 1990; 李正理, 1996) 介绍的方法制作徒手切片。在显微镜下观察和拍照。

1.3.5 烟草和玉米接种固氮菌后对细菌进行光学显微镜观察 分别取接种固氮菌 7 d、14 d、21 d、28 d 的烟草和玉米经过  $\alpha$ -半乳糖苷酶组织化学染色后呈蓝色的根, 与不接菌的烟草和玉米的根作为对照一起, 用 3% 戊二醛和 1% 锇酸进行双固定, 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 (李正理, 1996)。美蓝染色, 光学显微镜下观察。

1.3.6 对接种固氮菌的烟草和玉米进行激光共聚焦扫描显微镜观察 将分别取接种含有报告基因 *gfp* 的固氮菌 7 d、14 d、21 d、28 d 的烟草和玉米材料, 经过无菌水清洗 10 次后, 用次氯酸钠进行表面消毒, 无菌水清洗后放到 LB 固体培养基的平板上 1 h, 同样将该 LB 固体培养基平板 28 ℃ 黑暗培养 48 h, 来探测烟草和玉米根表面消毒的效果。取表面消毒干净的烟草和玉米根, 进行徒手切片, 在激光共聚焦扫描显微镜下观察。绿色通道激发光波长为 488 nm, 红色通道的激发光波长为 568 nm。观察烟草材料时, 用 488 nm + 568 nm 双光扫描; 观察玉米材料时, 488 nm + 568 nm + 透射光三通道观察 (程在全等, 2002; 刘元等, 2003; 迟峰等, 2004)。将不接菌的根作为对照。

1.3.7 烟草和玉米接种固氮菌后对固氮菌进行电子显微镜观察 分别取接种固氮菌 7 d、14 d、21 d、28 d 的烟草和玉米根, 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 (崔克明等, 2000)。将不接菌的根作为对照。

1.3.8 接种固氮菌的烟草对固氮菌进行扫描电子显微镜观察 接种固氮菌的烟草和玉米根连同未接种固氮菌的材料一起, 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。

1.3.9 烟草和玉米接种固氮菌后对固氮菌的分离

分别取接种固氮菌 7 d、14 d、21 d、28 d 的烟草和玉米根, 对烟草和玉米的根进行表面消毒: 0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 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。后将烟草和玉米根放到 LB 固体培养基的平板上 1 h 后, 取出烟草和玉米根, 然后将该 LB 固体培养基平板 28 ℃ 黑暗培养 48 h, 如果 LB 平板上没有菌落长出来, 证明烟草和玉米根表面消毒干净。取表面消毒干净的烟草根 (鲜重约 500 mg) 和玉米根 (鲜重约 1 g), 放入适量灭菌石英砂和无菌水的研钵中研碎, 转入

三角瓶内用磷酸缓冲盐溶液 PBS (pH = 7.3) 定容至 20 ml, 梯度稀释  $10^{-1} \sim 10^{-4}$ , 每个梯度取 400  $\mu$ l 汁液涂布在装有 Ashbg 无氮固体培养基的平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养, 36 ~ 48 h 长出菌落。将不接菌的根作为对照。

1.3.10 固氮菌对玉米的作用 首先将玉米种子表面消毒, 然后在无菌条件下萌发。将萌发 2~3 星期并且没有污染的玉米转入到装有 Hurek 固体培养基的培养瓶中, 每个培养瓶种 1 株, 进行光照培养。在 Hurek 液体培养基中培养固氮菌 N1、N2 和 N3, 摇床转速为 220 r/min, 温度为 28 $^{\circ}$ C 的条件下培养 3 d 后, 取细菌培养物, 用 50 ml 离心管在 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清, 用磷酸缓冲盐溶液 PBS (pH = 7.3) 悬浮细菌沉淀后, 用微量移液器吸取该菌液 2 ml, 接种在玉米根附近后, 在 26 $^{\circ}$ C 条件下进行光照培养。每个菌种接种玉米实验中设置了 3 组重复, 在每个重复中每种细菌接种 10 株玉米。以不接菌的玉米作为对照。

## 2 实验结果

### 2.1 水稻内生固氮菌的生化特性

固氮菌 N1 只利用蔗糖, 而不能利用其它糖类, 说明 N1 对碳源的利用范围较为狭窄; 而固氮菌 N2 和 N3 除了乳糖外, 对其它糖类都能利用, 说明 N2 和 N3 对碳源的利用具有广泛性。触酶可以催化将过氧化氢分解成为水和氧的反应, 触酶的功能是将代谢过程产生的、具有毒性的过氧化氢除去, 以保护细菌不被伤害。本实验中的固氮菌 N1、N2 和 N3 触酶反应都为阳性,

表 1 水稻内生固氮菌的生理生化特性

Table 1 Biochemical and physiological characteristics of endophytic diazotrophic bacteria obtained from rice plants

性质 Characters	水稻内生固氮菌菌株 Rice endophytic diazotrophic bacteria			性质 Characters	水稻内生固氮菌菌株 Rice endophytic diazotrophic bacteria		
	N1 ( <i>Bacillus pumilus</i> )	N2 ( <i>Enterobacter cloacae</i> )	N3 ( <i>Enterococcus gallinarum</i> )		N1 ( <i>Bacillus pumilus</i> )	N2 ( <i>Enterobacter cloacae</i> )	N3 ( <i>Enterococcus gallinarum</i> )
葡萄糖 (Glucose)	-	+	+	枸橼酸盐利用 (Citrate utilization)	+	+	+
乳糖 (Lactose)	-	-	+	硝酸盐还原 (nitrate reduction)	-	+	+
甘露醇 (Mannitol)	-	+	+	靛基质 (indole production)	-	-	-
蔗糖 (Sucrose)	+	+	+	耐盐性 (salt tolerance):			
阿拉伯糖 (Arabinose)	-	+	+	0% 的 NaCl	+	+	+
木糖 (Xylose)	-	+	+	3% 的 NaCl	+	+	+
甘露糖 (Mannose)	-	+	+	6% 的 NaCl	-	-	-
淀粉酶 (Amylase)	-	-	-	8% 的 NaCl	-	-	-
脲酶 (Urease)	-	-	+	苯丙氨酸脱氨酶实验 (Phenylalanine deaminase test)	-	-	-
明胶液化 (Gelatin hydrolysis)	-	-	-				
触酶 (Catalase)	+	+	+				
氧化酶 (Oxidase)	-	-	-				
乙酰甲基甲醇生成 (Voges-Proskauer test)	-	+	+				

说明它们具有排除代谢中产生的过氧化氢的能力。三株固氮菌的耐盐浓度都是在 3%, 这说明本实验的三株固氮菌与大多数细菌一样, 其耐盐浓度在 3% ~ 5% 范围内, 不具有耐受高浓度盐的能力 (表 1)。

### 2.2 -半乳糖苷酶组织化学染色与徒手切片观察

取固氮菌感染的烟草和玉米的根, 进行 -半乳糖苷酶组织化学染色, 接菌的材料染成蓝色, 而对照没有染色反应。对染成蓝色的烟草材料, 进行徒手切片后, 在显微镜下观察, 结果表明在烟草根的部分表皮细胞、内皮层细胞被染成蓝色 (图 1: C)。

### 2.3 对接种固氮细菌的烟草和玉米根根进行光学显微观察

光学显微镜观察结果表明: 在接种固氮细菌的烟草根表皮细胞、内皮层细胞中发现细菌存在, 而未接菌的对照烟草根细胞中没有发现细菌 (图 1: D)。在接种固氮菌的玉米根细胞中, 部分内皮层细胞, 维管组织细胞中发现细菌, 而对照没有发现细菌。

### 2.4 对接种固氮细菌的烟草和玉米进行激光共聚焦扫描显微镜观察

激光共聚焦扫描显微镜观察结果表明, 在接种携带报告基因 *gfp* 的固氮细菌的烟草材料中, 在根的表皮细胞和内皮层细胞可以观察到绿色荧光小点 (图 1: F; 图 2: I), 在根尖细胞中绿色

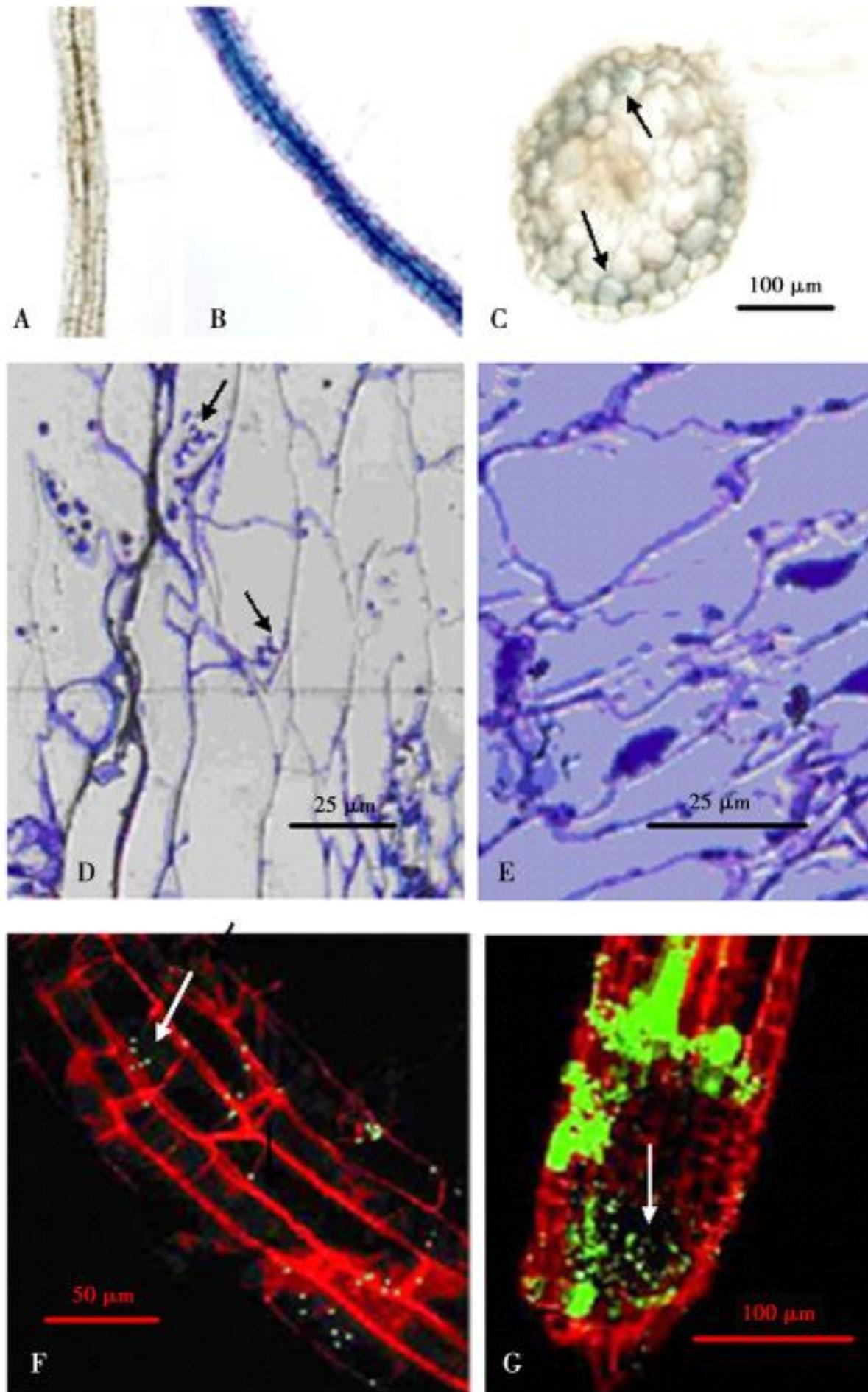


图1 A. 未接固氮菌的烟草根作为对照; B. 接种携带标记基因 *lacZ* 的固氮菌 N1 并且经过  $\beta$ -半乳糖苷酶组织化学染色后的烟草根; C. 对  $\beta$ -半乳糖苷酶组织化学染色后的烟草根进行徒手切片 (箭头所指为染成蓝色的细胞); D~E. 烟草根的半薄切片; D. 接种固氮菌 N1 的烟草根细胞 (箭头所指为固氮细菌); E. 未接菌的烟草根细胞作为对照; F~G. 对接种携带标记基因 *gfp* 的固氮菌的烟草根进行激光共聚焦扫描显微镜观察; F. 接种携带标记基因 *gfp* 的固氮菌 N3 的烟草根 (箭头所指为固氮细菌); G. 接种携带标记基因 *gfp* 的固氮菌 N3 的烟草根尖 (箭头所指为固氮细菌)

Fig. 1 A. Control, tobacco roots without inoculation; B. After inoculation of the endophytic diazotrophic bacteria N1 tagged with *lacZ* gene, tobacco roots were stained for  $\beta$ -galactosidase activity; C. Micrograph of a free-hand cross-section of a tobacco root inoculated with the rice endophytic diazotrophic bacteria N1 tagged with *lacZ* gene after histochemical staining of  $\beta$ -galactosidase (the arrow); D-E. Semi-thin section of tobacco roots; D. After inoculation of rice endophytic diazotrophic bacteria N1, the diazotroph bacteria were found in cell of tobacco roots (the arrow); E. control, tobacco roots without inoculation; F-G. The observation of tobacco roots inoculated with rice endophytic diazotrophic bacteria tagged with *gfp* gene under the confocal laser scanning microscope; F. After inoculation of rice endophytic diazotrophic bacteria N3 tagged with *gfp* gene, the diazotroph bacteria were found in the cells of tobacco roots (the arrow); G. After inoculation of rice endophytic diazotrophic bacteria N3 tagged with *gfp* gene, the bacteria were found in the cells of tobacco root tip

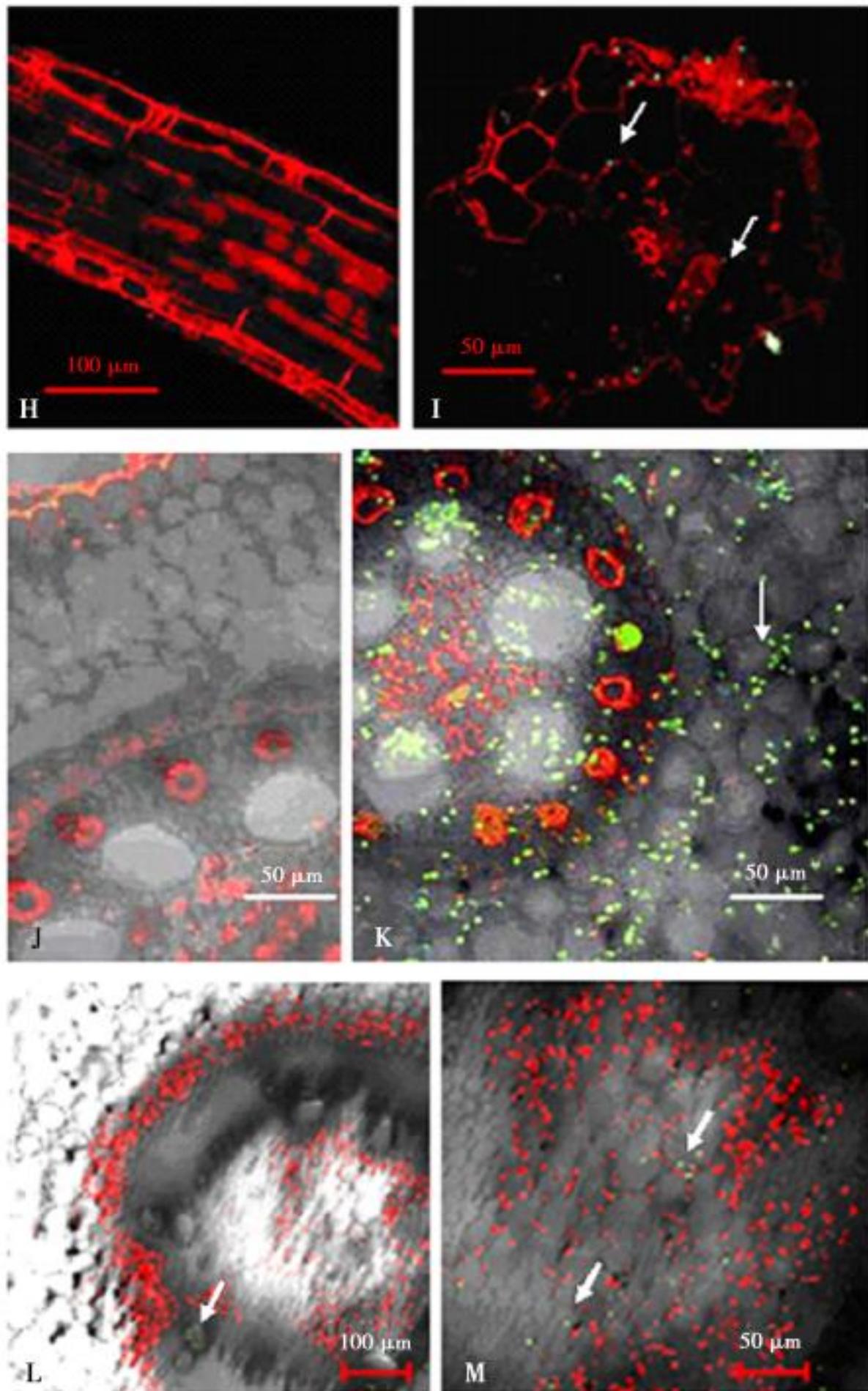


图2 H~M. 对接种携带标记基因 *gfp* 的固氮菌的烟草和玉米材料进行激光共聚焦扫描显微镜观察; H. 未接菌的烟草根作为对照; I. 对接种携带标记基因 *gfp* 的固氮菌 N3 的烟草根细胞进行观察 (横切), (箭头所指为固氮细菌); J. 未接菌的玉米根细胞作为对照 (横切); K. 对接种携带标记基因 *gfp* 的固氮菌 N2 的玉米根细胞进行观察 (横切), (箭头所指为固氮细菌); L. 对接种携带标记基因 *gfp* 的固氮菌 N2 的玉米茎细胞进行观察 (横切), (箭头所指为固氮细菌); M. 对接种携带标记基因 *gfp* 的固氮菌 N2 的玉米茎维管组织细胞进行观察 (横切), (箭头所指为固氮细菌)

Fig. 2 H-M. The observation of tobacco and maize inoculated with rice endophytic diazotrophic bacteria tagged with *gfp* gene under the confocal laser scanning microscope; H. Control, tobacco roots without inoculation; I. The diazotroph bacteria were found in the cells of tobacco roots inoculated with rice endophytic diazotrophic bacteria N3 tagged with *gfp* gene, (cross section) (the arrow); J. Control, maize roots without inoculation (cross section); K. The diazotroph bacteria were found in the cells of the maize roots inoculated with rice endophytic diazotrophic bacteria N2 tagged with *gfp* gene, (cross section) (the arrow); L. After inoculation of rice endophytic diazotrophic bacteria N2 tagged with *gfp* gene, the diazotroph bacteria were found in cells of maize stem, (cross section) (the arrow); M. After inoculation of rice endophytic diazotrophic bacteria N2 tagged with *gfp* gene, the diazotroph bacteria were found in vascular tissue cells of maize stem, (cross section) (the arrow)

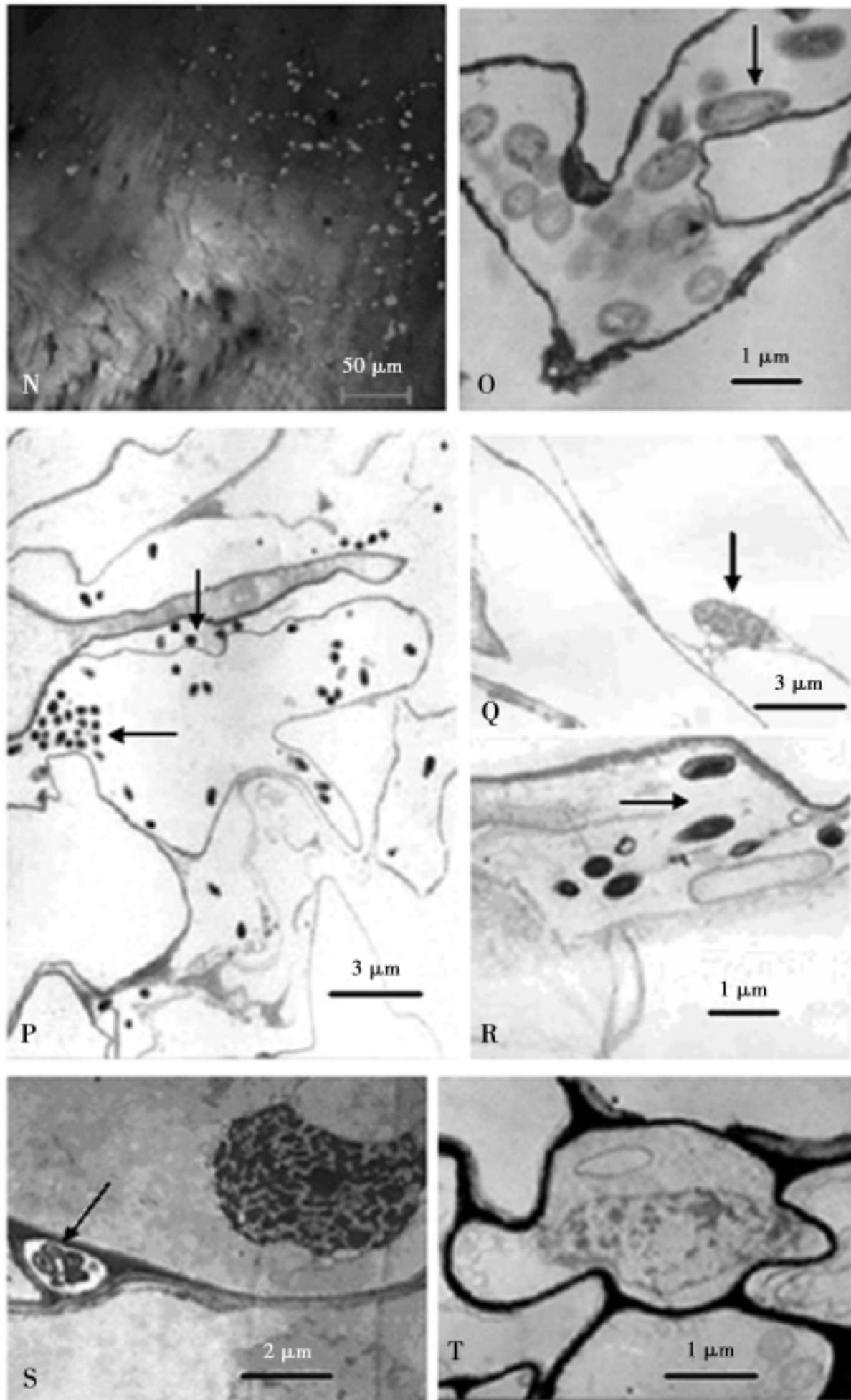


图3 N. 对照, 未接菌的玉米茎维管组织细胞的激光共聚焦扫描显微镜观察 (横切); O~T. 对接种固氮菌的烟草和玉米根细胞进行透射电子显微镜观察; O. 接种固氮菌 N2 后 14 天的烟草根 (箭头所示为细胞中的固氮菌); P. 接种固氮菌 N1 后 21 天的烟草根 (箭头所示为细胞和细胞间隙中的固氮细菌); Q. 对照, 未接种固氮菌的烟草根; R. 接种固氮菌 N2 后 21 天的烟草根 (箭头所示为细胞中的固氮菌); S. 接种固氮菌 N3 后 14 天的烟草根 (箭头所示为细胞间隙中的固氮菌); T. 对照, 未接菌的玉米根

Fig. 3 N. Control, the vascular tissue cells of maize stem without inoculation were observed under the confocal laser scanning microscope (cross section), O-T. The observation of tobacco and maize roots under the transmission electron microscope; O. The observation of tobacco roots with inoculation of endophytic diazotrophic bacteria N2 after 14 days, The diazotroph were found in cell of tobacco roots (the arrow); P. The observation of tobacco roots with inoculation of endophytic diazotrophic bacteria N1 after 21 days, The diazotroph were found in cell and intercellular spaces of tobacco roots (the arrow); Q. Control, tobacco roots without inoculation; R. The observation of tobacco roots with inoculation of endophytic diazotrophic bacteria N2 after 21 days, the diazotroph were found in cell of tobacco roots (the arrow); S. The observation of tobacco roots with inoculation of endophytic diazotrophic bacteria N3 after 14 days, the diazotroph were found in intercellular spaces of tobacco roots (the arrow); T. Control, the cells of maize roots without inoculation

荧光小点分布较多 (图 1: G), 而对照没有观察到绿色荧光小点, 说明固氮菌在接菌的烟草根细胞中有分布。在接种携带报告基因 *gfp* 的固氮细菌的玉米根细胞中, 在皮层细胞和维管组织细胞中, 有大量的绿色荧光小点分布 (图 2: K), 而对照没有; 在接菌的玉米茎细胞中, 在维管组织细胞中, 可以观察到绿色的小点 (图 2: L、M), 而对照没有。

### 2.5 对接种固氮细菌的烟草和玉米根进行电子显微镜观察

透射电子显微镜观察结果表明: 在接种固氮细菌的烟草根细胞和细胞间隙中, 观察到了细菌

的存在, 而未接菌的对照烟草根细胞没有发现细菌 (图 3: O、P、R), 而对照烟草材料的根细胞中没有发现细菌。在接种固氮细菌的玉米根细胞中, 发现大量的固氮细菌存在 (图 4: U)。

扫描电子显微镜观察结果表明: 在接种固氮细菌的烟草根细胞中, 观察到了细菌存在 (图 4: Y), 而对照没有观察到细菌存在。

水稻内生固氮细菌 N1、N2 和 N3 侵入烟草和玉米根后, 没有发现宿主烟草和玉米根细胞对细菌有排斥反应, 使细菌发生死亡, 因为在接种固氮细菌后不同的时间内分别取烟草和玉米根分离固氮细菌, 都可以分离到固氮细菌, 而对照未接

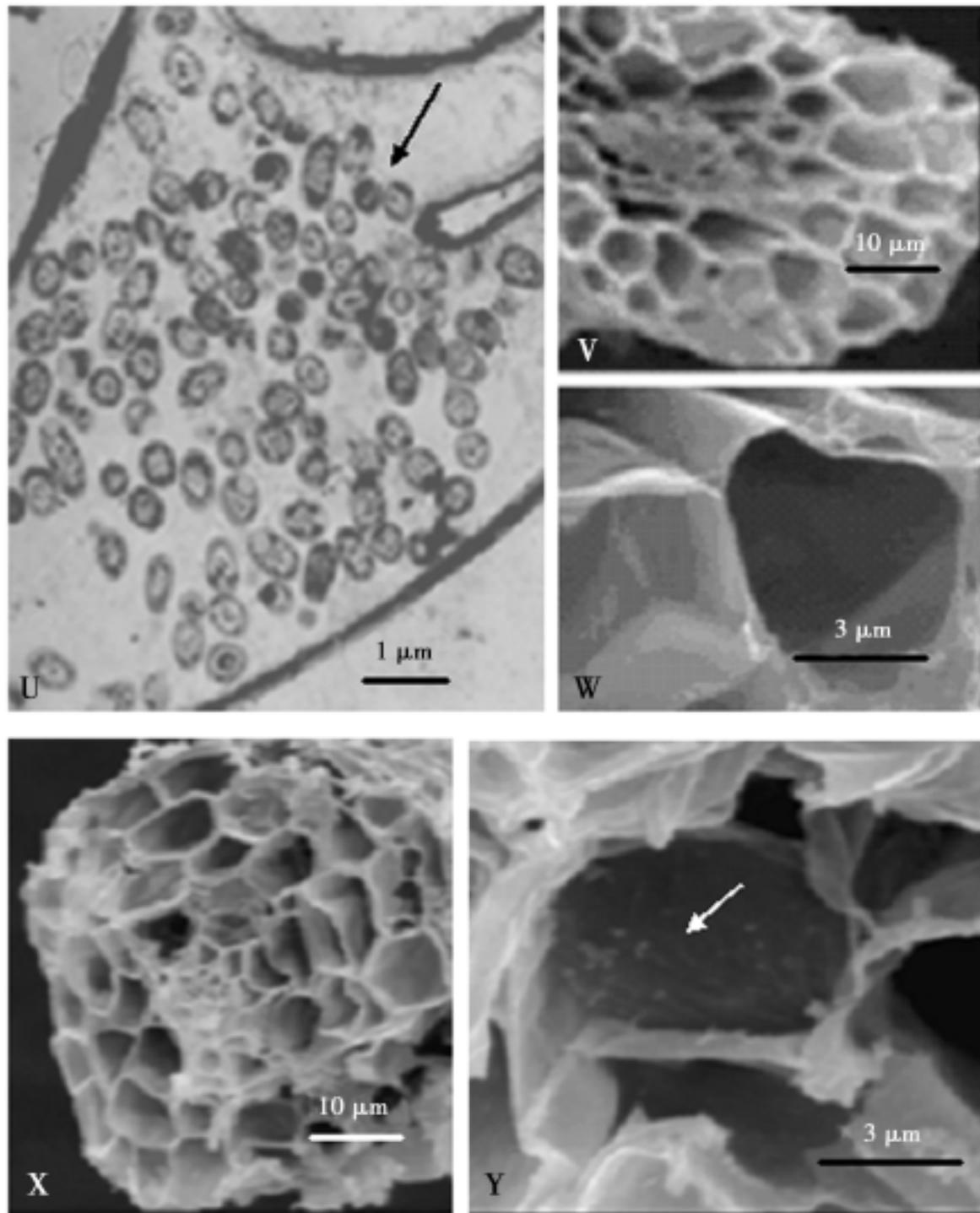


图 4 U . 接种固氮菌 N2 后 14 天的玉米根 (箭头所示为细胞中的固氮菌); V ~ Y . 对接种固氮菌的烟草根细胞进行扫描电子显微镜观察; V . 未接菌的烟草根作为对照; W . V 的局部放大; X . 接种固氮菌 N3 后 14 天的烟草根; Y . X 的局部放大 (箭头所示为细胞中的固氮菌)  
Fig . 4 U . The observation of maize roots with inoculation of endophytic diazotrophic bacteria N2 after 14 days, the diazotroph were found in cell of maize roots (the arrow); V-Y . The observation of tobacco roots with inoculation of endophytic diazotrophic bacteria under scanning electron microscope . V . Control, tobacco roots without inoculation; W . Showing the enlargement of parts of fig . V; X . The observation of tobacco roots with inoculation of endophytic diazotrophic bacteria N3 after 14 days; Y . Showing the enlargement of parts of fig . X, the diazotroph were found in cell of tobacco roots (the arrow)

菌的材料没有分离到固氮细菌; 并且电子显微镜的观察结果显示在接种固氮细菌后不同时间内烟草和玉米根细胞中都可以观察到细菌, 而对照没有观察到。细菌侵入烟草和玉米根细胞后, 没有对烟草和玉米根细胞造成伤害, 因为光学显微镜和电子显微镜的观察结果表明: 没有发现接种固氮细菌后烟草和玉米根细胞在结构上有什么变化。

## 2.6 烟草和玉米接种固氮细菌后对固氮细菌的分离

从接种固氮细菌 N1、N2 和 N3 的烟草和玉米根中, 可以分离到固氮细菌, 而未接菌的材料未分离到固氮细菌。将分离到的细菌制成涂片: 在灭菌的载玻片上加入 10  $\mu$ l 无菌水, 然后用无菌的接种环取分离到的细菌少许, 均匀涂在载玻片上, 盖上盖玻片, 在荧光显微镜下进行观察, 可以观察到发绿色光的小点点。由于接种的固氮菌携带报告基因 *gfp*, 在波长为 488 nm 的激发光作用下, *gfp* 基因表达出荧光蛋白呈绿色, 可以在荧光显微镜下观察发绿色光的小点点。另外, 用美国 BD 公司 Phoenix system 全自动细菌鉴定仪对分离到细菌进行鉴定, 结果表明分离到的菌株和接种菌株是同一种菌株。

## 2.7 固氮菌对玉米的作用

玉米接种固氮菌 1 个月后, 对植株鲜重进行测定, 结果表明未接菌的对照植株单株平均鲜重为 1.23 g (标准误为 0.035), 而接种细菌 N3 的玉米单株平均鲜重为 1.46 g (标准误为 0.027), 提高幅度为 18.52% (对测得的数据进行 *t* 测验,  $t = 5.16$ , 自由度  $df = 58$ , *t* 测验结果表明: 接种细菌 N3 的玉米单株鲜重与未接种的对照植株单株鲜重具有极显著差异); 而接种固氮菌 N1 和 N2 的材料鲜重没有提高。由此可见细菌 N3 对玉米生长有一定的作用。

# 3 讨论

## 3.1 固氮菌在所感染植物中的定殖范围

通过对水稻内生固氮细菌 N1、N2 和 N3 在烟草和玉米根中的定殖研究, 我们发现固氮菌在烟草和玉米的根中有分布 (图 1~3), 在玉米中也观察到了接种物向茎杆的移动 (图 2: L、M)。从目前文献报道来看, 研究感染植物固氮细菌的定殖大多集中在根部 (安千里等, 2001; 吕泽勋等, 2001a, b; 刘元等, 2003; 迟峰等, 2004), 在

植物其它器官中定殖的研究较少 (迟峰等, 2004), 根据我们在接菌玉米茎中固氮菌的定殖情况, 推测在植物其它器官中可能细菌分布也较少, 或者研究根部固氮菌的存在更有意义, 因为提供给植株氮素营养的器官一般在根部。

## 3.2 固氮菌的运动

在玉米根细胞和茎细胞中, 都观察到了固氮菌。玉米根细胞中固氮菌分布较多, 而玉米茎中细菌分布较少。因为我们接菌是在玉米根部, 却在玉米茎中也发现了细菌, 我们推测这些细菌能够从根部向上移动。这和前人观察的结果相一致 (Hannan 等, 2004; 迟峰等, 2004)。

## 3.3 固氮菌的生理生化特性

通过对固氮菌的一些生理生化特性的了解, 可以推测固氮菌侵入植物后会对植物细胞带来什么样的影响以及固氮菌能否更好适应植物细胞的环境, 与植物更好地合作进行生物联合固氮作用。例如, 明胶化试验可以检验固氮菌是否具有明胶酶, 明胶酶是有些微生物分泌的一种蛋白酶, 它能催化蛋白质分解, 能分泌明胶酶的固氮菌进入植物细胞后, 如果将植物细胞中的蛋白质分解, 对植物细胞的正常生理活动造成不良影响; 靛基质试验可以检验固氮菌是否具有将色氨酸分解为吲哚的能力, 靛基质试验阳性的固氮菌可以将植物细胞中的色氨酸分解为吲哚, 对植物细胞的蛋白质有效合成极为不利; 本文对固氮菌进行了糖发酵试验, 结果显示有的固氮菌利用糖类单一, 只能利用蔗糖作为碳源, 有的固氮菌能利用多种糖类, 如果固氮菌侵入某种植物的细胞中缺乏蔗糖, 那么对于只能利用蔗糖的固氮菌在植物细胞中生存下来都比较困难, 更不要说固氮了; 对固氮菌进行淀粉水解试验可以知道固氮菌是否具有将淀粉分解为麦芽糖的能力。如果反应为阳性, 该固氮菌可以将植物细胞中储存的淀粉分解, 固氮菌可以吸收分解产物麦芽糖并有效地利用它; 从固氮菌是否具有触酶活性可以判断出固氮菌是否具有将周围环境中的有毒物质过氧化氢除去的能力, 固氮菌侵入植物细胞中, 植物细胞代谢中也可能产生过氧化氢, 如果固氮菌触酶活性为阴性, 固氮菌在植物细胞中很可能受到过氧化氢的伤害, 不利于其生存; 固氮菌的抗盐能力可以推测固氮菌对植物细胞中高盐浓度环境的

适应情况, 如果植物是在盐碱地生长, 植物细胞中盐浓度可能会高些, 固氮菌能否在植物细胞这种逆境下生存并发挥作用, 取决于它的抗盐能力。因此了解固氮菌的一些生理生化特性, 对于判断固氮菌侵入植物细胞后的生存状况以及是否能更好地发挥联合固氮作用, 提供了一些试验依据。

致谢 中国科学院植物研究所荆玉祥研究员提供了无私的帮助。

### 〔参 考 文 献〕

- An QL (安千里), Yang XJ (杨学健), Dong YM (董越梅) *et al.*, 2001. Using confocal laser scanning microscope to visualize the infection of rice roots by GFP-labelled *Klebsiella oxytoca* SA<sub>2</sub>, an endophytic diazotroph [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **43** (6): 558—564
- Chen ZQ (程在全), Ding YM (丁玉梅), Zeng LQ (曾黎琼) *et al.*, 2002. The applications of GFP as a reporter gene in rice genetic transformation [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **24** (3): 341—351
- Boivin C, Camut S, Malpica CA *et al.*, 1990. *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions [J]. *Plant Cell*, **2**: 1157—1170
- Chi F (迟峰), Shen SH (沈世华), Chen SF (陈三凤) *et al.*, 2004. Migration of *Azospirillum brasilense* Yu62 from root to stem and leaves inside rice and tobacco plants [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **46** (9): 1065—1070
- Cui KM (崔克明), Luo LX (罗立新), Li ZL (李正理). 2000. Ultrastructural observation of changes of polysaccharide grains in dormant shoots of *Eucommia ulmoides* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **42** (8): 788—793
- Ding YQ (丁延芹), Wang JP (王建平), Liu Y (刘元) *et al.*, 2004. Isolation and identification of Nitrogen-fixing Bacilli [J]. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), **12** (6): 690—697
- Guan XQ (关秀清), Du QY (杜千有), Yu JZ (于井朝), 1997. Isolation and Characteristics of N<sub>2</sub>-fixers from Rhizosphere of plant *Leymus chinensis* in the rangeland of Inner Mongolia [J]. *Acta Agrestia Sin* (草地学报), **5** (2): 101—107
- Hannan HY, Mohamed F, Mohamed M *et al.*, 2004. Gluconacetobacter diazotrophicus: a natural endophytic diazotroph of Nile Delta sugarcane capable of establishing an endophytic association with wheat [J]. *Biol Fertil Soils*, **39**: 391—397
- Li ZL (李正理), 1996. Plant Tissue Section [M]. Beijing: Beijing University Press, 17—138
- Lima E, Boddey RM, Dobereiner J, 1987. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugarcane using a <sup>15</sup>N aided nitrogen balance [J]. *Soil Biol Biochem*, **19**: 165—170
- Liu Y (刘元), Chen SF (陈三凤), Li JL (李季伦), 2003. Colonization pattern of *Azorhizobium brasilense* Yu62 on maize roots [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **45** (6): 748—752
- Lü ZX (吕泽勋), Li JD (李久蒂), Zhu ZQ (朱至清), 2001a. Inoculation, isolation of endophytic diazotrophic bacteria and their colonization in maize root tissue under gnotobiotic condition [J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), **7** (3): 207—212
- Lü ZX (吕泽勋), Li JD (李久蒂), Zhu ZQ (朱至清), 2001b. *Klebsiella oxytoca* SG-11 labeling by green fluorescent protein gene (*gfp*) and its colonization in rice seedling roots [J]. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), **9** (1): 13—18
- Mo CQ (莫才清), Qing YL (覃雅丽), Zhou JC (周俊初) *et al.*, 1998. luxAB genes as marker for detecting *Rhizobium fredii* HN01 nodulation functions [J]. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), **38** (3): 213—218
- Mo CQ (莫才清), Zhou JC (周俊初), Li FD (李阜棣), 1997. Development of a suicide plasmid containing luxAB genes and its translocation to *Rhizobium fredii* HN01 [J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), **3** (3): 252—257
- Qiu YS (丘元盛), Zhou SP (周淑萍), Mo XZ (莫小真) *et al.*, 1981a. Study of nitrogen fixing bacteria associated with rice root I. Isolation and identification of organisms [J]. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), **21** (4): 468—472
- Qiu YS (丘元盛), Zhou SP (周淑萍), Mo XZ (莫小真) *et al.*, 1981b. Study of nitrogen fixing bacteria associated with rice root II. The characteristics of nitrogen fixation by *Alcaligenes faecalis* strain A-15 and *Enterobacter cloacae* strain E-26 [J]. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), **21** (4): 473—476
- Reinhold-Hurek B, Hurek T, 1986. Life in grass: diazotrophic endophytes [J]. *Trends in Microbiol*, **6**: 139—144
- Stoltzfus JR, So R, Malarvithi PP *et al.*, 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen [J]. *Plant and Soil*, **194**: 25—36
- Sun XL (孙晓璐), Yang HL (杨海莲), Song W (宋未) *et al.*, 1999. Identification, nitrogen-fixing and phytopathogen-antagonizing activity of a *Alcaligenes paradoxus* 1AG4 isolated from rice rhizosphere [J]. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), **29** (4): 294—298
- Wang YQ (王逸群), Zheng JG (郑金贵), Chen WL (陈文列) *et al.*, 2005. Isolation of an endophytic diazotroph from rice and distribution of *Enterococcus gallinarum* in the rice roots [J]. *J Trop Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), **13** (4): 296—302
- You CB (尤崇杓), Qiu YS (丘元盛), 1982. Nitrogen fixation of *Alcaligenes faecalis* in association with rice seedling [J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), **6**: 1—5
- Yao T (姚拓), Zhang DG (张德罡), Hu ZZ (胡自治), 2004. Associative nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of *Avena sativa* in an alpine region [J]. *Acta Prataculturae Sin* (草业学报), **13** (2): 106—111
- Zhu MZ (朱美珍), Wu YQ (吴永强), 1999. Studies on the isolation and identification of *Rhodobacter capsulatus* and the acceleration of its nitrogen fixation [J]. *Microbiology* (微生物学通报), **26** (5): 342—344