

解磷细菌 K₃ 的 GFP 标记及其解磷能力检测^①

李晓婷, 董彩霞, 杨兴明, 钟增涛, 沈其荣, 徐阳春*

(南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室, 南京 210095)

摘要: 本文运用构建成功的含有假单胞菌属自身启动子及绿色荧光蛋白 (GFP) 的质粒 pTRGFP 电转至假单胞菌解磷细菌 K₃ 中, 通过激光共聚焦显微镜及质粒检测, 获得了发光稳定的标记菌株 K₃GFP。7 天液体摇瓶试验中, 标记菌株 K₃GFP 的可溶性 P 含量在第 4 天达到最高 774 μg/ml, 而出发菌株 K₃ 在第 3 天时已经达到了最大含量 780 μg/ml, 说明 pTRGFP 质粒的转入对 K₃ 菌株解 P 能力有一定的影响。标记菌株 K₃GFP 施入自然土壤 10 天后数量维持在 5.47×10⁶ CFU/g ~ 2.40×10⁶ CFU/g 左右, 35 天后降到 5.0×10³ CFU/g 左右, 说明解磷细菌 K₃GFP 可以在自然土壤中定殖。本试验为研究解磷细菌在根际及土壤中的生长动态等行为特征奠定了基础。

关键词: 解磷细菌; GFP; 解磷能力; 定殖

中图分类号: S154.38

我国约有 75% 的土壤缺 P, 特别是石灰性土壤, 虽然全 P 含量较高, 但能被作物吸收利用的有效 P 含量很低^[1-2], 即使是化肥中的可溶无机 P, 施入土壤后大部分也很快转化为作物难吸收的难溶性磷酸盐。土壤中存在一些能够将难溶性磷酸盐转化为可利用形态的微生物, 这些微生物称为溶磷菌或解磷菌^[3-5]。它们主要属于假单胞菌属、杆状菌属、沙雷氏菌属、欧文氏菌属等。解磷菌依靠自身的代谢产物或与其他生物协同溶解土壤中的难溶性无机 P, 在土壤 P 素转化中起着重要作用。目前, 解磷菌已作为生物肥料应用于农业生产来提高土壤中 P 素的利用率, 但是对于解磷菌在土壤中的生存、定殖状况等信息未有深入的报道。

发光标记系统等现代基因标记技术, 是研究细菌的根际定殖动态的有效手段, 已成功用于微生物定殖、宿主组织侵染、微生物动态监测、基因表达调控等研究^[6-9]。发光标记基因^[10]主要有 lux 基因、GUS 基因、CAT 基因、冰核基因、绿色荧光蛋白 (GFP) 基因等。GFP 以标记基因小、可直接肉眼检测荧光、对细胞安全、稳定等优点, 被认为是当前最理想的报告基因。绿色荧光蛋白是从多管水母属的 *Aequorea Victoria* 中分离出的一种天然的荧光蛋白, 分子质量约 27 ~ 30 kD, 含有 238 个氨基酸残基, 在 395 nm 能吸收蓝光, 受到 Ca²⁺ 或紫外线激活时发绿色荧光^[11-12]。国内外已

有利用 GFP 标记固氮菌、根瘤菌、枯草芽孢杆菌、蜡质芽孢杆菌的报道。Nomander 等^[13-14]将 GFP 标记的 *Pseudomonas fluorescense* 菌株 DR54-BN14 接种于植株, 检测标记菌在燕麦根际的定殖、生长与分布状况; 国内有报道利用 LuxAB^[15]及 GFP^[16]标记解磷细菌。K₃ 是自玉米根际分离的一株解磷细菌, 在室内有很好的解磷效果^[17]。但是目前对 K₃ 在土壤或作物根际的定殖、存活、繁殖等微生态行为规律及其解磷机制仍缺乏深入系统的研究。本文利用 GFP 作为标记基因, 研究了解磷细菌 K₃ (*P. fluorescense*) 的 GFP 标记技术, 并对标记菌株与出发菌株的解磷效果、生长动态等进行比较, 以期后续研究 K₃ 菌株在根际定殖动态等行为特征提供材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与质粒 解磷细菌 K₃ (*Pseudomonas fluorescense*) 为短杆状, 革兰氏阴性, 由本实验室自玉米根系分离; 质粒 pTRGFP, 是组成型的 *gfp* 基因 (1.4kb) 克隆到广宿主载体 pTR102 (10.5 kb) 上, 具有氨苄青霉素 (Amp) 与四环素 (Tet) 抗性 (图 1), 由南京农业大学生命科学学院提供。

①基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771258) 和国家 863 项目 (2006AA10Z416) 资助。

* 通讯作者 (yxcu@njau.edu.cn)

作者简介: 李晓婷 (1983—), 女, 山西运城人, 硕士研究生, 主要从事微生物有机肥料研究。

①基金项目：国家自然科学基金项目（30771258）和国家 863 项目（2006AA10Z416）资助。

* 通讯作者（yexu@njau.edu.cn）

kpn I

作者简介：李晓婷（1983—），女，山西运城人，硕士研究生，主要从事微生物有机肥料研究。

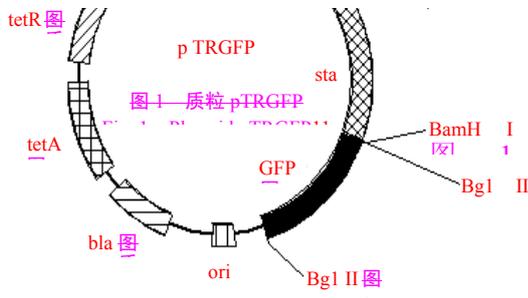


图 1 质粒 pTRGFP

Fig. 1 Plasmid pTRGFP

图 1—质粒 pTRGFP

Fig. 1—Plasmid pTRGFP

1.1.2 培养基与培养条件 DH5 α 与 K_3 菌株采用 LB 培养基，分别于 37℃ 和 28℃ 下培养。比较解磷性状时采用改良的 Picovoskaya (PVK) 与 NBRIP 培养基^[17]于 28℃ 下培养。

1.1.3 抗生素及使用浓度 四环素 (Tet) 为 50 $\mu\text{g/ml}$ ，氨苄青霉素 (Amp) 为 50 $\mu\text{g/ml}$ 。

1.2 试验方法

1.2.1 质粒提取 参照分子克隆第一章中质粒的小量制备：SDS 碱裂解法制备质粒 DNA^[18]。

1.2.2 电转化 K_3 单菌落于 5 ml LB 中过夜培养，按 1% 的接种量接入 100 ml LB 三角瓶中，摇床 180 r/min 培养，OD 值达到 0.4 后冰浴 1 h，然后转入 50 ml 离心管 8 228 r/min 离心 10 min，倒掉上层清液，ddH₂O 清洗沉淀，重复此步骤 3 次，收集菌体，加入 15% 的甘油 100 μl 分装于 PCR 管，为 K_3 菌株感受态，-70℃ 冰箱中保存备用。质粒 pTRGFP 0.5 μl 于感受态中，1.3 kv 电击转化，28℃、100 r/min 培养 1 h，转移到含有四环素 (Tet) 为 50 $\mu\text{g/ml}$ 与氨苄青霉素 (Amp) 为 50 $\mu\text{g/ml}$ 的抗生素平板，28℃ 恒温培养。

1.2.3 质粒检测 K_3 GFP 菌株提取质粒，与阳性对照比较，检验是否有质粒 pTRGFP 存在。

1.2.4 荧光检测与照相 用德国蔡司 LSM510 激光共聚焦扫描显微镜（氩激光光源，激发波长为 488 nm），观察标记菌株是否有绿色荧光。

1.2.5 质粒稳定性检测 分别用含有四环素 (Tet) 与氨苄青霉素 (Amp) 以及不加 Tet 与 Amp 的 LB 培养基的平板传代 30 次，每次间隔 24 h，挑取一些单菌

落在左右培养基的 T D 液体培养基中过夜培养，在荧

光显微镜下观察菌落发光。按 1% 接种量接入含 200 ml LB 的 1 L 三角瓶中，3 次重复，28℃、170 r/min 连续培养，间隔 2 h 取样放置在冰箱中，分光光度计（600 nm）测其 OD 值。

1.2.7 解磷能力测定 (1) 固体平板测定。在改良的 PVK 培养基平板上分区，用牙签分别接种 K_3 与 K_3 GFP，重复 5 个平板，28℃ 培养 3 天，测量菌落直径和透明圈直径，计算透明圈与菌落直径比。

(2) 液体培养测定。灭菌牙签挑取单菌落（出发菌株 K_3 与标记菌株 K_3 GFP）接种于 3 ml LB 液体培养基中，振荡培养，OD 值约 0.6 时，镜检，按 1% 接种量接入含 200 ml 的 NBRIP 液体培养基的 1 L 三角瓶中，对照 (CK) 同样按照 1% 接种量即 2 ml 的 LB 液体于含 200 ml 的 NBRIP 液体培养基的 1 L 三角瓶中，每个处理 3 次重复，28℃、170 r/min 培养 7 天，每隔 24 h 定量取样。样品以 12 857 r/min 离心^[19]，上清液经适当稀释后，钼锑抗比色法直接测定培养液中的有效 P。

1.2.8 标记菌株在土壤中存活 选择江苏淮安的石灰性土壤，pH 值为 8.36，速效 P 6 mg/kg，全 P 767 mg/kg。试验设计为接入标记菌株 K_3 GFP (K_3 G) 与有机肥加标记菌株 K_3 GFP (M + K_3 G) 两个处理，每个处理称取 300 g 土壤于营养钵中，按照 5% (v/w) 的接种量接入标记菌株菌悬液至土壤 (5.6×10^9 CFU/g 土) 中，各处理重复 3 次。每隔 7 天取 10 g 土样，按照平板稀释涂布法，涂布于含 Tet 50 $\mu\text{g/ml}$ 以及 Amp 50 $\mu\text{g/ml}$ 的 LB 平板上，28℃ 恒温培养 3 天后记录发光菌落数。

2 结果与分析

2.1 标记菌株 K_3 GFP 的构建与荧光检测

K_3 属于假单胞菌，本实验所用的 pTRGFP 质粒上携带的启动子由假单胞菌属获得，可以选定此质粒标记假单胞菌 K_3 。由于 K_3 不能在含有 Tet 为 50 $\mu\text{g/ml}$ 与 Amp 为 50 $\mu\text{g/ml}$ 的 LB 平板生长，质粒 pTRGFP 具有 Tet 与 Amp 抗性，则 K_3 为感受态细胞电转后在含 50 $\mu\text{g/ml}$ Tet 与 50 $\mu\text{g/ml}$ Amp 的 LB 平板生长的菌落即为结合子 K_3 GFP。激光共聚焦扫描显微镜检测获得标记菌株 K_3 GFP (图 2)。

2.2 K_3 GFP 的质粒检测

挑取 K_3 GFP 与 K_3 单菌落提取质粒检测。如图

3 质粒电泳图谱所示, 出发菌株 K_3 中提取不到质粒, 标记菌株 K_3GFP 中提取的质粒和质粒 pTRGFP 条带相同, 表明 pTRGFP 质粒已转入到受体菌 K_3 菌株中。

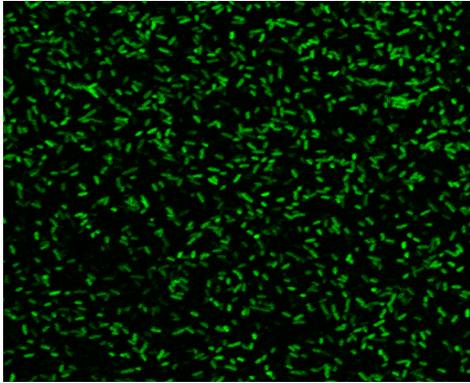
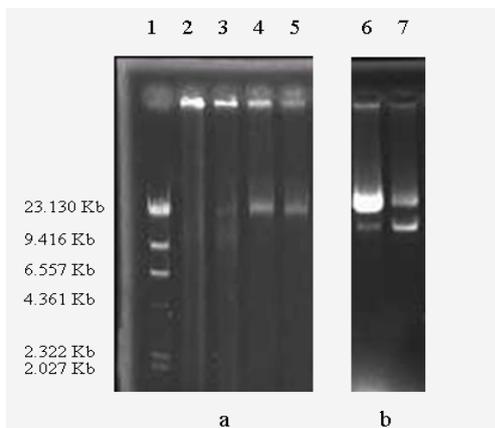


图 2 标记菌株的发光性检测 (1000×)
Fig. 2 Luminescence detection of *gfp* marked strain

2.2 K_3GFP 的质粒检测

挑取 K_3GFP 与 K_3 单菌落提取质粒检测。如图 3 质粒电泳图谱所示, 出发菌株 K_3 中提取不到质粒, 标记菌株 K_3GFP 中提取的质粒和质粒 pTRGFP 条带相同, 表明 pTRGFP 质粒已转入到受体菌 K_3 菌株中。



(1: -marker λ -Hind III; 2、3:- K_3 ; 4、5:- K_3GFP ; 6、7:- pTRGFP)

图 3 出发菌株 K_3 与标记菌株 K_3GFP 质粒的电泳图 (a) 和质粒 pTRGFP 的电泳图 (b)

Fig. 3 Electrophoretic graph of plasmid from K_3 and K_3GFP (a) and graph of plasmid pTRGFP from DH5 α (b)

2.3 K_3GFP 在纯培养条件下的稳定性试验

K_3GFP 在 LB 平板传代 30 次后, 分别在含有抗生素以及不含抗生素的 LB 平板上形成菌落数量相差在十倍左右, 其中不含抗生素培养基上形成的菌落

在含有 Tet 50 μ g/ml 与 Amp 50 μ g/ml 的 LB 平板上仍可生长, 过夜振荡培养, 用荧光显微镜观察, 细胞具有绿色荧光, 证明含绿色荧光蛋白基因 *gfp* 标记质粒的假单胞菌在传代过程中能稳定遗传^[20]。

2.4 K_3 与 K_3GFP 的生长动态比较

由图 4 可见, 标记菌株 K_3GFP 与出发菌株 K_3 的生长趋势基本一致, K_3GFP 的生长速度较慢, 而且进入对数期的时间比 K_3 稍迟, 达到稳定期延缓于 K_3 , 主要原因可能是外源质粒进行复制及相关基因表达消耗细胞能量, 导致细胞生长受到一定影响, 图中也可看出质粒的导入对细菌生长速率有影响, 但对最终的生长量没有显著影响, 可以作为进一步研究的实验材料。

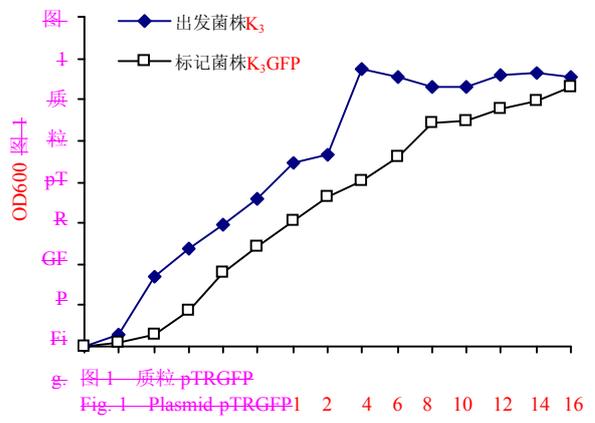


图 4 出发菌株 K_3 与标记菌株 K_3GFP 的生长比较

Fig. 4 Growth curves of strain K_3 and marked strain K_3GFP in LB culture

2.5 K_3 与 K_3GFP 的解磷效果比较

2.5.1 室内平板解磷试验结果 如图 5, K_3 透明圈直径 D 平均为 12 mm, 透明圈直径与菌落直径之比 $D/d=4$; K_3GFP 的 D 平均为 10 mm, $D/d=3.3$ 。说明 K_3GFP 比 K_3 解磷效果弱, 外源质粒对细菌解磷能力的影响不大。



图 5 出发菌株 K_3 与标记菌株 K_3 GFP (KG) 的溶磷圈
Fig. 5 Halos of parent strain K_3 and marked strain K_3 GFP(KG)

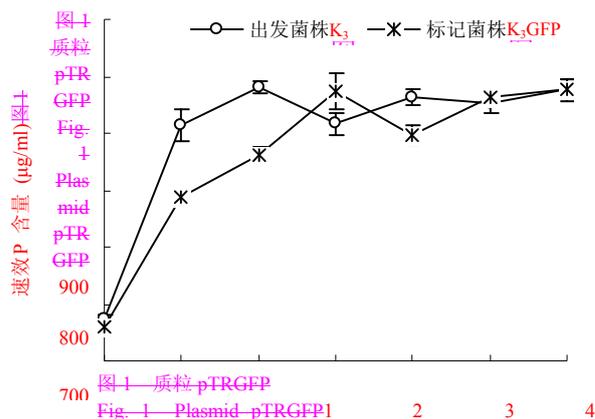


图 6 K_3 与 K_3 GFP 在 7 天中的速效 P 含量比较
Fig. 6 Available P contents of K_3 and K_3 GFP in 7 days

2.5.2 培养液含 P 量 接种出发菌株与标记菌株对 NBRIP 培养液中可溶性 P 含量影响见图 6, 随着时间的推移, K_3 与 K_3 GFP 菌液中的可溶性 P 含量均增加, K_3 在培养第 3 天时可溶性 P 含量达到最高值 780 $\mu\text{g/ml}$; 而 K_3 GFP 在培养第 4 天时可溶性 P 含量才达到最高点 774 $\mu\text{g/ml}$, 说明在摇床培养 3~4 天后, 菌株就可以最大限度地发挥其解磷作用; 与对照相比(对照处理 7 天内在 NBRIP 培养液的可溶性 P 含量 6.94~7.21 $\mu\text{g/ml}$), 说明解磷细菌促使培养液中难溶性 P 的溶解。继续培养, 可溶性 P 含量维持平衡或有所降低。Whitelaw 等^[21]发现在液体培养基中, 可溶性 P 含量随着时间变化也是出现峰点后又降低; 郝晶等^[3]发现解磷细菌培养中, 随着时间延长可溶性 P 含量达到最高点后又降低或保持平衡; Babenko 等^[22]研究结果表明随着时间延长增加培养基含量, 可溶性 P 含量出现几个峰点。此现象的原因可能是随着时间的增加, 培养基中营养的消耗, 导致菌株生长需要消耗溶液中的部分有效 P, 将其转化为菌体中的结构 P, 则达到最高点后出现下降或保持平衡。从 K_3 与 K_3 GFP 可溶性 P 含量整体比较, 质粒 pTRGFP 的加入延了解磷效果, 降低可溶性 P 的含量但幅度不大。

2.6 K_3 GFP 在土壤中的稳定性及存活能力

两个处理中 K_3 GFP 施入土壤后随时间延长, 数量呈逐渐下降趋势, 35 天内由 10^9 CFU/g 土降到了 10^3 CFU/g 左右, 14 天与 21 天之间有一段稳定期分别维持在 10^6 CFU/g 土和 10^7 CFU/g 土左右(图 7), 在 40 天时仍能检测到荧光, 可见在土壤环境中该质粒能稳定存在。 K_3 GFP 数量的减少主要原因可能是土壤中土著微生物对施入外来微生物的养分与空间竞争, 也有一部分可能是土壤营养物质缺乏或标记菌株对土壤环境不适应造成的。有机肥加标记菌株 K_3 GFP (M+ K_3 G) 处理的土壤中 K_3 GFP 数量低于只加入 K_3 GFP (K_3 G) 处理的土壤, 可能是有机肥中的细菌影响标记菌株的生长。Azad^[23]认为根际促生细菌 (PGPR) 与植物间有互惠互利的关系, 微生物在植物根际或土壤中存活是一个非常复杂的动态过程, 受到诸多因素的影响, 如土壤类型、微生物本身特性等^[23]。

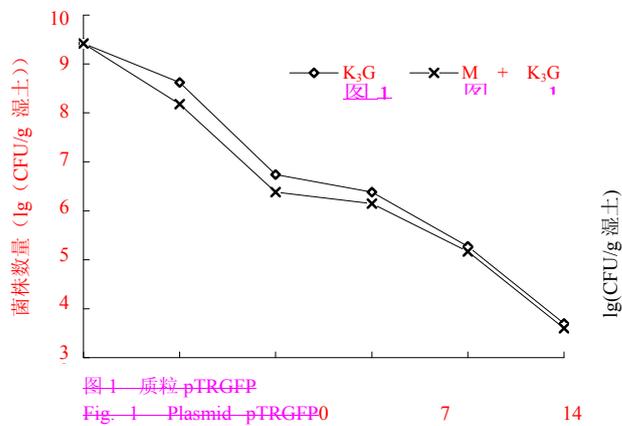


图 7 标记菌株 K_3 GFP 在土壤中的定殖
Fig. 7 Colonization of labeling strains K_3 GFP in soil

3 讨论

运用基因标记法标记受体菌株,常用的一种方法是利用转座子将标记基因插在受体菌的染色体上或质粒上,这种方法会因为基因插入的位点不同影响受体菌株的生长。另一种方法是质粒的接合转移,将已经构建好的带有标记基因的小质粒,通过菌体的相互接触或电转化将其全部转入受体菌,这种方法与转座技术相比操作简单、对出发菌株的影响较小,主要问题是选择稳定的载体和启动子。本研究运用质粒的接合转移方法开展了假单胞菌属解磷细菌的 GFP 标记, pTRGFP 质粒是假单胞菌属中筛选的启动子带动 GFP 的表达,将 pTRGFP 电转到 K₃ 菌株中,获得具有绿色荧光的 K₃GFP。采用激光共聚焦扫描显微镜观察标记菌株 K₃GFP,结果表明质粒 pTRGFP 在菌株 K₃ 中表达并且有较强的荧光。K₃GFP 菌株遗传 30 代后,在四环素 (Tet) 50 μg/ml 与氨苄青霉素 (Amp) 50 μg/ml 的 LB 平板上培养,仍能够发光,表明标记基因在受体菌中能稳定遗传。Bloemberg 等^[25]已验证 pGB3、pGB4、pGB5 等质粒可在假单胞菌中至少稳定遗传 30 代。因此在研究解磷细菌 K₃ 在土壤生态的行为时运用 GFP 标记是可靠的。

比较 K₃ 与 K₃GFP 在 LB 液体培养基中的生长趋势, K₃GFP 进入对数期的时间比 K₃ 缓慢,说明外源基因对受体菌的生长速度有影响,但对受体菌的生长量没有显著的影响。韦兵等^[26]研究发现 *luxAB* 基因的导入并未影响出发菌株的解 K 能力,本研究在 NBRIP 培养液中 K₃GFP 速效 P 的含量在第 4 天才达到最高,而 K₃ 的速效 P 含量在第 3 天时已达到最高,但是 K₃GFP 速效 P 的含量达到最大值时只略低于 K₃ 溶解的速效 P,说明 pTRGFP 质粒的导入对标记菌株的解磷效果影响不大。培养液中的接入菌株处理的可溶性 P 含量随着时间推移先呈上升趋势,与对照相比,说明解磷细菌溶解培养液中难溶性 P,增加可溶性 P 含量;继续培养,溶液中可溶性 P 含量有所降低,这种下降的原因也可能是细菌生长过程中,营养成分的消耗、某些有毒的代谢物质产生或者细胞的自溶作用^[27]导致解磷细菌的解磷能力下降,从而使培养液中可溶性 P 含量降低;另一方面可能是由于培养液中营养消耗,释放出的可溶性 P 为解磷细菌细胞吸收转化为自身生长所需要的结构 P^[3],很多假单胞菌具有形成多聚磷的能力。

GFP 已被作为研究微生物在特定植物根系定殖的重要工具。Normander 等^[13-14]利用 GFP 标记研究了假

单胞菌属生防菌 DR54-BN14 在大麦根际的定殖, Bloemberg 等^[25]利用 GFP 检测了假单胞菌在番茄幼苗根际的活动, Gilbertson 等^[28]研究降解菌在杨树根际定殖及 Villaciers 等^[29]研究荧光假单胞菌在紫花苜蓿根际的定殖;国内有叶小梅等^[16]等研究的解磷细菌对黑麦草生长与在根际定殖以及邱珊莲等^[30]等研究的降解菌在蔬菜根际的定殖。本研究中,在自然土壤中培养 35 天内 K₃GFP 的数量虽然有所下降,但仍可以在土壤中定殖,说明该标记菌株可以作为研究解磷细菌在根际以及土壤中行为特征的材料,对进一步揭示该解磷细菌在土壤生态环境及菌植互作过程中的动态变化奠定了基础。

参考文献:

- [1] 张宝贵,李贵桐. 土壤生物在土壤磷有效化中的作用. 土壤学报, 1998, 35(1): 104-111
- [2] Kucey RMN. Effect of *penicillium bilajion* solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. Soil Sci., 1987, 68: 261-270
- [3] 郝晶,洪坚平,刘冰,张健. 石灰性土壤中高效解磷细菌菌株的分离、筛选及组合. 应用与环境生物学报, 2006, 12(3): 404-408
- [4] 王光华,赵英,周德瑞,杨谦. 解磷菌的研究现状与展望. 生态环境, 2003, 12(1): 96-101
- [5] 杨秋忠,张芝贤,陈立夫. 台湾土生固氮溶铁磷细菌特性之研究. 中国农业化学会志, 1998, 36(2): 201-210
- [6] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science, 1994, 263: 802-805
- [7] Suarez A, Guttler A, Stratz M, Staendner LH, Timmis KN, Guzman CA. Green fluorescent protein-based reporter systems for genetic analysis of bacteria including monocopy applications. Gene, 1997, 196: 69-74
- [8] Gage DJ, Bobo T, Long SR. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *rhizobium meliloti* and alfalfa (*medicago sativa*). Journal of Bacteriology, 1996, 178(24): 7 159-7 166
- [9] Zhao H, Thompson RB, Lockett V, Johnson DE, Mobley HL. Use of green fluorescent protein to assess urease gene expression by uropathogenic *proteus mirabilis* during experimental ascending urinary tract infection. Infection and Immunity, 1998, 66(1): 330-335
- [10] 邱珊莲,崔中利,樊奔,戴青华,李顺鹏. 甲基对硫磷降解菌 GFP 标记菌株的构建. 应用与环境生物学报, 2004, 10(6):

- 778-781
- [11] Chem REV, Zimmer M. Green fluorescent protein (GFP): Applications, structure and related photophysical behavior. Chem. Rev., 2002, 102 (3): 759-781
- [12] 田涛, 王琦. 绿色荧光蛋白作为分子标记物在微生物学中的应用. 微生物学杂志, 2005, 25(1): 68-74
- [13] Normander B, Hendriksen NB, Nybroe O. Green fluorescent protein-marked *pseudomonas fluorescens*: Localization, viability and activity in the natural barley rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65: 4 646-4 651
- [14] Tombolini R, Gaag DJ, Gerhardson B, Jansson JK. Colonization pattern of the biocontrol strain *pseudomonas chloroaphis* MA 342 in barley seeds visualized by using green fluorescent protein (GFP). Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65: 3 674-4 680
- [15] 董昌金, 蒋宝贵. 解磷细菌 PD01 的分离与分子标记. 湖北农业科学, 2005, (1): 62-64
- [16] 叶小梅, 何加骏, 王小妹. 一株土生克雷伯氏菌接种对黑麦草生长及磷吸收的影响. 江苏农业科学, 2008, (2): 461-464
- [17] 朱培淼, 杨兴明, 徐阳春, 欧阳红, 沈其荣. 高效解磷细菌的筛选及其对玉米苗期生长的促进作用. 应用生态学报, 2007, 18(1): 107-112
- [18] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- [19] 林启美, 王华, 赵小蓉, 赵紫鹏. 一些细菌和真菌的解磷能力及其真理初探. 微生物学通报, 2001, 28(2): 26-30
- [20] Novagen. pET System Manual. 8th ed. Novagen, 1999.
- [21] Whitelaw MA, Harden TJ, Helyar KR. Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *penicillium radicum*. Soil Biology and Biochemistry, 1999, 31: 655-665
- [22] Babenko YS, Tyrygina G, Grigoryev EF, Dolgikh LM, Borisova TI. Biological activity and physiolo-biochemical properties of bacteria dissolving phosphates. Microbiologiya, 1984, 53: 533-539
- [23] Azad HR, Davis JR, Schnathorst WC, Kado C. Influence of verticillium wilt resistant and susceptible potato genotypes on populations of antagonistic rhizosphere and rhizoplane bacteria and free nitrogen fixers. Applied Microbiological Biotechnology, 1987, 26: 99-104
- [24] 张霞, 张杰, 李国勋, 黄大昉, 陈中义. 绿色荧光蛋白标记荧光假单胞菌 P303 及其生存能力检测. 植物保护学报, 2005, 32(3): 280-287
- [25] Bloemberg GV, Ootoole GA, Lugtenberg BJJ, Kolter R. Green fluorescent protein as a marker for *pseudomonas* spp. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(11): 4 543-4 551
- [26] 韦兵, 唐欣昀. 假单胞菌 JK45 菌株 *lux* 基因标记及在土壤中的存活. 农业环境科学学报, 2006, 25(6): 1 524-1 528
- [27] Gaind S, Gaur AC. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mung-bean. Plant Soil, 1991, 133: 141-149
- [28] Gilbertson AW, Fitch MW, Burken JG, Wood TK. Transport and survival of GFP-tagged root-colonizing microbes: Implications for rhizodegradation. European Journal of Soil Biology, 2007: 1-9
- [29] Villaceros M, Power B, Sanchez-Contreras M, Lloret J, Oruezabal RI. Colonization behavior of *pseudomonas fluorescens* and *sinorhizobium meliloti* in the alfalfa (*medicago sativa*) rhizosphere. Plant Soil, 2003, 251: 47-54
- [30] 邱珊莲, 崔中利, 王英, 王兴祥, 李顺鹏. 甲基对硫磷降解菌 DLLBR 在青菜及根际土壤中的定殖研究. 土壤, 2005, 37(1): 100-104

Labeling of Phosphate-Solubilizing Bacteria K_3 with GFP and Its Phosphate Solubilization Ability

LI Xiao-ting, DONG Cai-xia, YANG Xing-ming, ZHONG Zeng-tao, SHEN Qi-rong, XU Yang-chun

(College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Jiangsu Key Laboratory for Solid Organic Waste Utilization, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this study, the plasmid pTRGFP with *Pseudomonas* promoter and green fluorescent protein (GFP) segment was transformed into strain K_3 by electroporation, and the conjugant K_3 GFP with steady fluorescence was acquired. Both fluorescent microscope and plasmid analysis were used to verify the success of the electroporation. The available P concentration reached the peak (770 $\mu\text{g/ml}$) at the 4th day for the labeling strain K_3 GFP while the wild strain achieved the most (780 $\mu\text{g/ml}$) at the 3rd day. The result demonstrated that phosphate-solubilizing ability of the wild strain was affected after the electroporation. The total population of K_3 GFP strain was $5.47 \times 10^6 - 2.40 \times 10^6$ CFU/g soil from 10 to 28 days, and

decreased to about 5.00×10^3 CFU/g soil after 35 days in a natural soil. The result indicated the K₃GFP had strong colonization ability in soil. The K₃GFP will provide a foundation to the further research on phosphate-solubilizing bacteria.

Key words: Phosphate-solubilizing bacteria, GFP, Phosphate-solubilizing ability, Colonization