

生防菌 AS₈₁₈ 抗药性标记株在大豆根际定殖*

仝赞华 郭荣君

(中国农业科学院生物防治研究所 北京 100081)

摘要: 通过⁶⁰Co γ -射线 (1.0×10^4 rad) 对生防菌株链霉菌 AS₈₁₈ 孢子悬液 (10^6 /mL) 进行诱变, 得到抗链霉素 ($> 50\mu\text{g}/\text{mL}$) 突变株 5 株。经诱导, RL-4 抗链霉素水平达到 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 。标记株 RL-4 在 1% 水琼脂 (WA) 和无菌土中培养的大豆根际定殖趋势有所不同。RL-4 在 1% WA 培养的大豆根表的定殖量呈逐步上升趋势。无菌土中种植的大豆根际和根表的检测表明: RL-4 可在无菌土中大豆根际短期定殖, 在根际第 1 周数量降低了 100 倍, 以后数量开始逐渐上升, 第 3 周达到高峰, 数量比第 1 周增加了 3 个数量级, 但在第 4 周其数量又开始下降; 在根表 RL-4 数量逐步下降, 到第 4 周已检测不到 RL-4 的存在。组织印记法检测发现标记株 RL-4 可以在无菌培养的大豆根表定殖并沿根分布, 但却不能定殖于根内。

关键词: 定殖, 机理

中图分类号: Q938.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2653 (2001) 04-0040-05

COLONIZATION OF STREPTOMYCIN RESISTANT RL-4 OF AS₈₁₈ ON SOYBEAN RHIZOSPHERE

TONG Zan-Hua GUO Rong-Jun

(Institute of biological Control, CAAS, Beijing 100081)

Abstract: Spore suspension of *Streptomyces griseus* AS₈₁₈ (10^6 /mL) was radiated by Co⁶⁰ γ -radiation, the radiation dosage was 1×10^4 rad. And 5 streptomycin resistant mutants (above $50\mu\text{g}/\text{mL}$) were screened, then the resistant level of mutant RL-4 was induced to $100\mu\text{g}/\text{mL}$. The number of RL-4 colonizing on soybean roots planted on 1% Water agar or in sterile soil was determined. The results showed that it could colonize on soybean rhizosphere and rhizoplane for a short period, but there is a little difference. When it was examined in 1% Water agar, the number of RL-4 raised gradually in soybean rhizoplane in 4 weeks. But when examined in sterile soil, RL-4 reduced about 100 times at the 1st week, then raised gradually and reached the highest point at the 3rd week, and decreased again at the 4th week. In the rhizoplane, it reduced gradually from the 1st week, and couldn't be examined at the 4th week. Mutant RL-4 couldn't be found in soybean endorhizosphere by tissue printing.

Key words: Colonization, Soybean rhizosphere

引入植物根际的生物因子要发挥它生防作用的先决条件是必须能在植物根际进行有效的定殖^[1], 许多田间防效稳定的生防菌如: 防治小麦全蚀病的荧光假单胞菌 Tn-5^[2]、防治大豆胞囊线虫病的保根菌^[3]都可在作物根际很好地定殖, 甚至可定殖于根

* 95 国家攻关资助项目 (No. 96-005-01-10-04)

农业部病虫害资源与利用重点实验室资助项目

收稿日期: 2000-02-01, 修回日期: 2000-06-02

内。生防菌在作物根上的定殖可优先利用根分泌物并占据根部空间,造成病原菌萌发及繁殖所需的碳、氮源的缺乏和侵染位点的减少^[4],从而更好地发挥其生防作用。

生防菌 AS₈₁₈ (*Streptomyces griseus*) 是经多年试验筛选出来的一株对东北大豆根腐病主要致病菌 *Fusarium oxysporum* 有较高抗性,并对大豆有良好促生作用的链霉菌菌株。该菌株已在黑龙江省东、西部不同大豆产区累计完成了2万亩面积的田间示范试验,平均田间防效均达到或超过60%,并对大豆有8%~12%的促增产作用,是一个很有应用潜力的菌株。那么该菌与大豆根的亲和能力如何,是否可在大豆根际定殖,需要进一步验证。对 AS₈₁₈ 菌株在大豆根际定殖能力的考察,不仅可以了解定殖在该菌生防机理中的地位,还将对菌剂剂型的改进和生产工艺的完善起到重要指导作用。全赞华(未发表)曾用 AS₈₁₈ 菌株进行过定殖实验,组织印记法及稀释平板法检测均显示 AS₈₁₈ 可在大豆根际及根表定殖,单位定殖量分别为每克土 1.18×10^5 和每条根 1.30×10^4 个菌,但由于土壤中也有链霉菌的存在,又没有特异的选择性培养基可进行该菌株的回收,无法准确判定回收的菌株是否为原始 AS₈₁₈ 菌株,因此本研究采用其抗药性标记菌株检测其在大豆根部的定殖能力。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

大豆 95A005: 中国农业科学院作物研究所提供。

大田土: 中国农业科学院作物研究所玉米地。

链霉菌 (*Streptomyces griseus*) AS₈₁₈: 本实验室分离。

病原菌 (*Fusarium oxysporum*) F₃: 黑龙江省农垦作物研究所谢云清提供。

1.2 AS₈₁₈ 抗药性突变株诱变

1.2.1 出发菌株自身耐链霉素水平测定: 制备 AS₈₁₈ 菌株单孢子悬浮液。各取 0.1 mL 孢子悬液,分别涂布于含有 1、2、5、10、20 μg/mL 链霉素的天冬素培养基上,每个浓度做 3 皿,28℃ 培养 4~5 d,观察平板上是否有菌落生长,确定初筛的药物浓度。

1.2.2 诱变处理: 用 ⁶⁰Coγ-射线作为诱变剂。各取 2 mL 孢子悬液分装于 4 支试管中,其中 1 支作对照,其它 3 个进行 ⁶⁰Coγ-射线照射,所用剂量为 0.5×10^4 、 1.0×10^4 、 5.0×10^4 rad。计算细胞存活率,再选择低中剂量进行诱变,涂布加入不同浓度(10、20、30、50、100 mg/mL)链霉素的平板,筛选突变株。

1.2.3 抗高链霉素水平菌株的诱导: 将在含有 50 μg/mL 链霉素的天冬素培养基上生长的菌株挑入斜面保存。再进行摇瓶发酵,然后涂布或划线接种于含有更高浓度链霉素(60 μg/mL、80 μg/mL、100 μg/mL)的培养基上,直到其抗链霉素的浓度达到 100 μg/mL。

1.2.4 标记株抑菌活性确定: 平板对峙培养法检测标记菌株对病原菌的抗性。AS₈₁₈ 出发菌株和标记菌株相距 4 cm 划线接种于 PDA 培养基,27℃~28℃ 培养 60 h 后,在两菌株划线中央接种 φ5 mm 新鲜培养(4 d)的 F₃ 病原菌菌丝块,25℃~26℃ 培养 4 d 后,游标卡尺测量抑菌带宽度。

1.3 标记株 RL-4 在大豆根际的定殖

1.3.1 标记株 RL-4 在 1% 水琼脂法培养大豆根表的定殖: (1) 大豆种子用 1% NaClO 消

毒3min, 无菌水漂洗3~5次, 晾干, 用RL-4孢子悬液浸种30min, 取出, 晾干, 种植于直径32mm×200mm, 装有高度约2/3的1%水琼脂(WA)的大试管中, 每管1粒种子, 设3个重复, 开始放于25℃温箱中暗培养, 待大豆生长到管口时, 进行光暗交替培养, 每周检测1次, 检测标记菌株RL-4在根表和根内的定殖情况。留20粒种子, 加入盛有20mL无菌水的三角瓶中, 200r/min震荡1h。稀释涂布于天冬素培养基, 28℃培养5~6d, 测定种子带菌量。(2)在大豆根表和根内定殖量检测, 采用组织印记法和稀释平板法。组织印记法: 将根的不同区段直接放置于天冬素选择性培养基(加入链霉素100μg/mL, K₂Cr₂O₇ 50μg/mL)平板上, 28℃培养7~10d, 观察菌的着生情况。稀释平板法: 取幼苗根, 称重, 测量长度。经以下处理: (a) 放入含有终浓度0.025%吐温80的无菌水中, 170r/min, 振荡2h; (b) 将根取出, 1% NaClO消毒5min, 漂洗5次, 无菌滤纸吸干, 剪成小段, 研磨成浆状。再进行稀释, 天冬素选择性培养基, 同1.3.1(2), 27℃~28℃培养3~4d, 检测根表和根内单位根重(g)及单位根长(cm)RL-4的定殖量。

1.3.2 标记株RL-4在无菌土中大豆根际的定殖: 种子用1% NaClO消毒5min, 无菌水漂洗5~6次, 晾干, 用标记株RL-4发酵液10mL浸种30min, 取出, 室温晾干。处理后的种子播种于无菌土中, 每处理10盆, 每盆播种15粒。温室培养, 室温20℃~22℃。以无菌水做相同处理作为对照。出苗后7d、14d、21d、28d取根进行以下处理: (a) 抖去根上大块土, 保留附着土, 加入无菌水, 震荡30min; (b) 根用无菌水洗涤, 再加入盛有玻璃珠并含有终浓度0.025%吐温80的无菌水中, 震荡30min。在天冬素选择性培养基上检测无菌土中大豆根际及根表RL-4的定殖量。

2 结果与分析

2.1 AS₈₁₈抗链霉素突变株的筛选

2.1.1 出发菌株自身耐药浓度确定: 出发菌株AS₈₁₈在加入1、2、5μg/mL链霉素的分离培养基平板上能生长, 但在加入10μg/mL链霉素的培养基平板上不生长。因此出发菌株自身耐链霉素的最高浓度为10μg/mL。

2.1.2 诱变剂量的测定及突变株的筛选: AS₈₁₈孢子悬液经不同剂量(0.5×10⁴、1.0×10⁴、5.0×10⁴ rad)⁶⁰Coγ-射线照射后, 菌的存活率分别为86.6%、31.3%、4.2%。因此可以确定⁶⁰Coγ-射线最适诱变剂量为1.0×10⁴ rad。

选择该诱变剂量, 进行AS₈₁₈抗链霉素突变株的诱变筛选。AS₈₁₈孢子悬液经⁶⁰Co γ-射线1.0×10⁴ rad照射后获得突变株6株, 其中5株抗链霉素浓度为50μg/mL, 1株抗链霉素浓度为30μg/mL。在含有100μg/mL链霉素的天冬素培养基上, 没有菌落生长。

2.1.3 抗高链霉素水平菌株的诱导: 选取孢子丰满, 状态好, 抗链霉素浓度为50μg/L的突变株RL-4进行诱导, 通过逐步提高培养基中链霉素的添加量的方法, 使RL-4抗链霉素浓度达到100μg/mL。

2.1.4 标记株RL-4的抗菌活性确定: 对峙培养法检测标记株RL-4和出发菌株AS₈₁₈对病原菌F₃的抑菌带宽度分别为1.81±0.46mm和1.91±0.32mm, 抑菌带宽度相近, 对病原菌的抗性基本无改变。

2.2 突变株 RL-4 在大豆根际定殖

2.2.1 水琼脂培养法检测 RL-4 在大豆根际的定殖

采用稀释平板法检测, RL-4 在 1% 水琼脂培养的无菌大豆幼苗根际的定殖趋势如图 1。在检测的 3 周内, 无论以单位根重 (g) 还是以单位根长 (cm) 或以每条根来衡量, RL-4 在根表的定殖量均呈逐步上升趋势, 在 3 周内由 1.65×10^5 (cfu/粒) 分别上升到 1.13×10^8 (cfu/g), 5.05×10^6 (cfu/cm), 5.63×10^7 (cfu/条)。

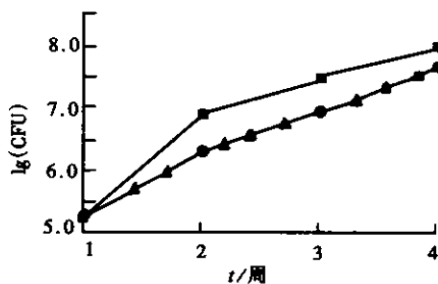


图 1 标记株 RL-4 在 1% 水琼脂培养的大豆根表的定殖趋势

—●— 每克根, —■— 每厘米根, —▲— 每条根

每条根上 RL-4 的数量与每厘米根段 RL-4 的量随时间变化的曲线一致, 但每克根的定殖量要比每厘米根长的定殖量高, 到第 3 周已经提高了 3 个数量级。采用组织印记法检测, 发现 RL-4 可以沿根延伸, 并可以在须根上定殖 (图 2)。但大豆根用 1% NaClO 表面消毒、漂洗后的研磨组织涂布于选择性平板上, 没有 RL-4 菌落长出来, 说明 RL-4 虽可沿根表延伸繁殖, 却不能定殖于根内。

2.2.2 标记株 RL-4 在无菌土中大豆根际的定殖: 标记株 RL-4 在大豆根际定殖实验结果表明: RL-4 可在大豆根际和根表短期定殖 (表 1)。第 1 周, RL-4 由初始带菌量 2.95×10^5 cfu/粒衰减到 2.0×10^3 cfu/g 根, 数量降低了 2 个数量级, 而在第 2 周, RL-4 在大豆根际的数量开始上升, 基本与接种量持平, 第 3 周 RL-4 在根际的定殖量达到高峰, 数量比第 1 周增加了 3 个数量级, 但在第 4 周其数量急剧下降。根表检测表明: RL-4 在大豆根表的数量呈逐步下降趋势, 到第 4 周已检测不到 RL-4 的存在。

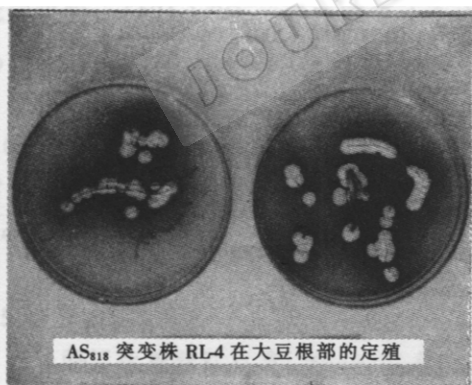


图 2 组织印记法检测标记株 RL-4 在 1% WA 培养 7d 的大豆根表的定殖

表 1 标记株 RL-4 在无菌土中大豆根际的定殖量

时间 (周)	定殖量 (cfu/g)	
	根际	根表
0	2.95×10^5 *	
1	2.0×10^3	-
2	1.47×10^5	1.59×10^5
3	1.05×10^6	8.3×10^4
4	2.66×10^2	0

* 单位为粒, - 未检测

3 讨论

通过 AS₈₁₈ 抗链霉素 (100 μg/mL) 标记株 RL-4 在大豆根际的定殖研究表明: 标记株 RL-4 可以在大豆根际短期定殖, 且定殖趋势与根际细菌 BH₁^[5] 及生防真菌淡紫拟青霉 M-14^[3] 在大豆根际的定殖趋势相似, 都是在接种 1 周后定殖量下降, 随后几周内又开始回升。RL-4 在大豆根际的定殖也间接说明了生防菌 AS₈₁₈ 在大豆根际的定殖能力。

对标记株 RL-4 在 1% WA 及无菌土中种植的大豆根表的定殖检测结果表明, 它在这两种状态下的定殖趋势明显不同, 这说明水琼脂法虽然可以用来检测生防菌在作物根表的定殖趋势, 但它并不能完全代表生防菌在自然条件下的定殖情况。因此如果要检测生

防菌在田间与其他微生物群落的竞争情况，还需要对标记方法进行改进，采用专一的标记方法进行生防菌的跟踪和回收。

生防菌在植物根际的定殖不仅取决于生防菌本身与寄主植物的亲和力，还受到许多其它因素的影响：如土壤的压力、渗透水、土壤中其它微生物的种类及密度等。另外，生防菌的应用方式也会影响它的定殖能力，这都需要我们在实际应用中加以考虑。

参 考 文 献

- [1] Schroth M N, Hancock J G. *Science*, 1982, 216: 1376 ~ 1381.
- [2] 彭于发, 张中鹤, 张玉勋, 等. 植物病理学研究进展, 1995, 276 ~ 282.
- [3] 孙漫红, 刘杏忠. 微生物学通报, 1998, 25 (3): 133 ~ 136.
- [4] Weller D M. *Ann Rev Phytopathol*, 1988, 26: 379 ~ 407.