

内生细菌 01-144 在番茄根茎内定殖的初步研究

龙良鲲 肖崇刚*

(西南农业大学植物保护系 重庆 400716)

摘要: 对内生细菌 01-144 进行了抗药性标记, 利用标记菌株研究了其在番茄根茎内的定殖情况。浸种与灌根处理均可使 01-144 在番茄根茎内定殖, 且在根内的定殖能力大于茎内; 灌根处理还表明, 其在茎下部的定殖能力大于茎上部; 01-144 定殖数量动态在根茎内均有一个“由增到减”的趋势, 但其在根内的数量变化明显较茎内平缓。

关键词: 内生细菌, 番茄, 定殖, 动态

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0053-04

PRELIMINARY STUDY ON THE COLONIZATION OF ENDOPHYTIC BACTERIUM 01-144 IN TOMATO ROOT AND STEM

LONG Liang-Kun XIAO Chong-Gang

(*Dept. of Plant Protection, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716*)

Abstract: The endophytic bacterium 01-144 was marked by using the method of antibiotic-resistance. Colonization of 01-144 in tomato root and stem was investigated. Result showed that 01-144 colonized in the root and stem and the colonizing ability in the root was stronger than in the stem after dipping seed or watering root treatment. It was also found that

* 联系人 Tel: 023-68251293, E-mail: chgxiao@swau.cq.cn

收稿日期: 2002-09-23, 修回日期: 2002-12-09

this bacterium could more easily colonized in the low stem than in the upper stem. The population fluctuation of 01-144 had the same trend in both root and stem i.e. first increased then decreasing, and the fluctuation in the root was more even than in the stem.

Key words: Endophytic bacterium, Tomato, Colonization, Fluctuation

内生菌 01-144 是本实验室从健康番茄根内分获的一株细菌。室内平板与盆栽试验发现该菌对致病番茄青枯菌 (*Ralstonia solanacearum*) 具一定的拮抗作用 (待发表)。众多研究表明, 生防菌与目标作物具良好的亲和能力是其活体稳定发挥生防效果的关键^[1]。因此探明生防菌在目标作物上的定殖情况成为生防研究的重要内容之一。本文目的即在于初步探明 01-144 在番茄根茎内的定殖能力, 以为进一步明确其防病机理, 预测其生防潜力及为指导生产防病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株: 内生细菌 01-144, 致病青枯菌 Bs01-05 (均由本实验室提供)。

番茄品种: 合作 903 (上海佳丰蔬菜种子种苗有限公司)。

抗生素: 硫酸链霉素 (streptomycin sulfate), 用蒸馏水配成 25mg/mL 母液, 冰箱保存; 利福平 (rifampin), 用 95% 乙醇配成 10mg/mL 母液, 常温保存。

1.2 目标菌的抗药性标记

按吴蔼民等^[2]的方法对 01-144 进行抗药性标记。

1.3 标记菌株的抑菌活性检测

采用平板喷雾法^[3]比较标记菌与原始菌对致病青枯菌 (Bs01-05) 的拮抗性。所用平板为 NA 培养基。

1.4 标记菌在番茄根茎内的定殖与消长动态

浸种处理: 取番茄种子浸入浓度约 2×10^9 cfu/mL 的 01-144^t 菌悬液 12h 后, 在垫有湿润滤纸的培养皿中催芽。出芽后播于沙土之中, 24℃ ~ 26℃、光照 16h/d, 定期施 Honglands 营养液培养。同时设清水对照。出苗后 (约 4d) 随机取 8 ~ 10 株苗, 清水冲净, 待稍干后剪下根茎, 取适量称其鲜重, 将根浸入 70% 酒精中浸 2 ~ 3s 后置于 2% NaClO 表面消毒 5 ~ 7min, 无菌水洗 4 次; 茎采用酒精火焰灭菌, 然后分别置于无菌研钵中, 并加 5mL 无菌水充分研磨, 静止 20min, 倍比稀释后, 取适当稀释度悬液 0.2mL 涂回收平板 (NA 平板中加终浓度 200μg/mL 链霉素和 100μg/mL 利福平), 各 3 个重复。28℃ 培养 3 ~ 4d 后计菌落数, 并换算成 cfu/g 鲜组织。同时检查 CK 上是否有菌落长出。以后每 3d 回收 1 次。

灌根处理: 盆钵沙土育苗, 约 25d, (2 ~ 3 叶期), 取 40 株, 每株浇灌 01-144^t 菌液 (约 5×10^8 cfu/mL) 25mL, 温度升为 25℃ ~ 31℃ 培养。同时设清水 CK。次日随机取 3 ~ 4 株苗, 分别称取其根系, 茎下部 (子叶以下), 茎上部 (子叶至第二真叶部分), 同上分离计数, 以后每 3d 分离 1 次。

数据分析: 采用 SSR 法 ($\alpha = 0.05$) 分别对同一处理同一时期不同部位的 01-144^t 定殖量作差异显著性检验。

1.5 回收菌的抑菌活性检测

随机取回收单菌落数次, 如 1.3 进行平板抑菌试验。

2 结果与分析

2.1 目标菌的抗药性标记

经逐步抗生素诱导筛选, 最终获取一株菌落形态与原始菌相似, 且在不含抗生素的 PSA 及 NA 斜面上连续转代 20 次后, 仍抗 $200\mu\text{g/mL}$ 链霉素及 $100\mu\text{g/mL}$ 利福平的自发突变株 (01-144^t), 具备了抗药性标记性状。

2.2 标记菌的抑菌活性检测

平板试验表明: 标记菌株具备原始菌对 B_s01-05 的抑菌活性 (见图 1)。

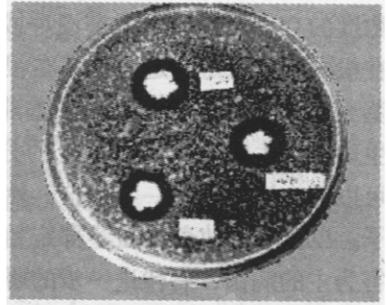


图 1 01-144 (上方), 01-144^t (左下) 及回收菌株 (右方) 对 BSO1-05 的拮抗作用

2.3 标记菌在番茄根茎内的定殖与消长动态

整个回收试验中 CK 平板上均没长出细菌菌落, 且回收菌菌落形态与 01-144^t 相似, 表明回收结果具可靠性。详细结果如下:

菌液浸种处理可使 01-144^t 定殖于番茄根茎内。统计分析表明: 每一检测时期 01-144^t 在根与茎内定殖量均存在显著差异。从图 2, 可知其在根内定殖力强, 初期定殖量可达 10^5 cfu/g, 到第 25d 仍可达 7.1×10^3 cfu/g; 而在茎内定殖力相对较弱, 定殖量比根内约低 2 个数量级, 第 22d、25d 均不能回收到 (图中以空白表示)。数量动态上看, 01-144^t 在根茎内前期均有一个短暂的数量上升阶段, 随即开始下降, 根内下降趋势较缓, 而茎内定殖量迅速下降, 直至检测下限。

灌根处理表明, 01-144^t 也能通过直接灌根处理进入番茄根茎内, 见图 3。总的看来, 其定殖能力强弱依次为根内 > 茎下部 > 茎上部。统计分析知第 1~9d 其在茎下部的定殖量与根内相当, 差异均不显著, 之后根内数量持续上升, 第 12d 后缓慢下降, 第 21d 仍有 5.0×10^3 cfu/g 的数量, 而 9d 后茎下部数量则较快下降, 并与根内数量保持显著差异, 第 21d 已下降了 2 个数量级。相比之下茎上部定殖量要少的多, 各个回收时期与根内、茎下部数量均存在显著差异。其除第 1~6d 是一个上升趋势, 数量可达 10^3 cfu/g 外, 之后便急速下降, 第 18d、21d 则不能检测到 (图中以空白表示)。

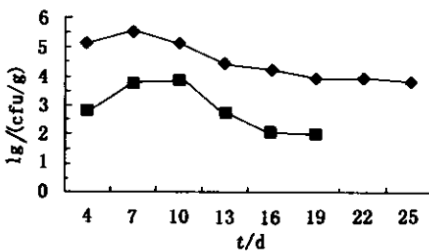


图 2 浸种处理后 01-144^t 的定殖趋势
◆ 根, ■ 茎。

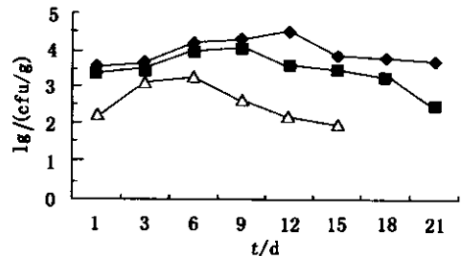


图 3 灌根处理后 01-144^t 的定殖趋势
◆ 根, ■ 茎下部, △ 茎上部

2.4 回收菌的抑菌活性检测

通过多次平板试验表明, 回收菌同样具有对番茄青枯菌的拮抗性 (图 1)。进一步

验证回收菌即为引入菌。

3 讨论

采用抗药性标记引入微生物,以研究其在环境中的定殖情况是一种传统而实用的方法,具有简便、经济、快速的优点^[4,5]。

本文对内生细菌 01-144 进行抗药性标记,并借助其标记菌株 01-144^k 初步探明,一定浓度的 01-144 菌液对番茄浸种或直接灌根处理,均可使其定殖于番茄根茎之内,尤其在根内能较稳定的定殖,其在根内定殖能力明显强于茎内,而在茎下部定殖力又强于茎上部。总的看来,该菌在番茄体内具良好的定殖潜力,具有进一步研究的价值。内生菌作为生防菌具有能稳定的分布于植株体内,易于发挥作用的优势^[6]。本研究结果可以作为该结论的一个例证。然而,有关影响该菌定殖于番茄体内的生物与非生物因子,以及如何改善其在茎部定殖能力,以便更好的控制青枯菌这种以在茎部维管束危害为主的病菌,有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 全赞华,郭荣君.微生物学通报.2001,28(4):40~44.
- [2] 吴嵩民,顾本康,傅正擎,等.植物病理学报.2001,1(4):289~294.
- [3] 董春,曾宪铭,刘琼光.华南农业大学学报.1999,20(4):1~4.
- [4] 张炳欣,张平.浙江大学学报(农业与生命科学版),2000,26(6):624~628.
- [5] Klopper J W, Beauchamp C J. Can J Microbiol, 1992, 38: 1219~1232.
- [6] Andrews J H. Annu Rev Phytopathol, 1992, 30: 603~635.