

番茄根际微生物种群动态变化及多样性

孙晓棠¹ 王 燕² 龙良鲲¹ 崔汝强³ 姚 青³ 朱红惠^{1*}

(1. 广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

(2. 广东省科技图书馆 广州 510070)

(3. 华南农业大学园艺学院 广州 510642)

摘要: 采用盆栽试验的方法对番茄根际主要微生物种群在不同生育期的动态变化进行了跟踪研究。结果表明,在番茄整个生育期内,可培养细菌数量在初花期和初果期时最多;放线菌数量从苗期到末期逐渐减少;真菌数量逐渐增多。番茄对细菌根际效应明显。DGGE 图谱显示不同生育期番茄根际均具有较高的细菌多样性。根际细菌种类和数量在初花期发生较为显著的变化,初果期根际群落多样性指数(H)和物种丰度(S)值都达到最高,微生物最丰富,是筛选拮抗菌的较好时期。

关键词: 番茄, 根际微生物, PCR-DGGE, 生物多样性

Variation and Diversity of Microbial Populations in the Rhizosphere Soil of Tomato Plants

SUN Xiao-Tang¹ WANG Yan² LONG Liang-Kun¹
CUI Ru-Qiang³ YAO Qing³ ZHU Hong-Hui^{1*}

(1. Guangdong Institute of Microbiology Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070)

(2. The Science and Technology Library of Guangdong Province, Guangzhou 510070)

(3. College of horticulture South China Agriculture University, Guangzhou 510642)

Abstract: The total amount of colony forming units (CFU) of bacteria, fungi and actinomycetes in the rhizosphere and surrounding soils were investigated at four different growing stages of tomato plants using traditional plate-counting method. The amount of bacteria reached its peak value at the blossoming stage and the fruiting stage. From seedling stage to late period, actinomycete number decreased gradually with time, but fungi increased. For bacteria, the rhizosphere effect of tomato plant (R/S) was the highest at the early blossoming stage and the early fruiting stage. The variation and diversity of microbial populations in the rhizosphere soil of tomato plants were also studied using cultivation-independent analysis. DGGE profile indicated high diversity of microbial populations in the rhizosphere soil at different growth stages. The bacterial species kept stable but the population of particular species changed in different patterns. Manifest change in rhizosphere bacterial species and populations occurred at the early blossoming stage, and the most abundant bacterial species was observed at the early fruiting stage. This investigation successfully revealed the community features of the

culturable and unculturable microbes in the rhizosphere soil of tomato plants, and indicated that the most abundant bacterial species occurred at the fruiting stage, suggesting this stage a suitable period for screening antagonistic bacteria.

Keywords: Tomato, Rhizosphere microorganism, PCR-DGGE, Biodiversity

番茄青枯病(Tomato Bacterial Wilt)是世界范围内的重大细菌性病害, 是许多国家农业生产中亟待解决的重大难题^[1]。青枯病是一种土传细菌性病害, 它的防治比较困难, 至今还没有特别有效的方法。采用植物根际拮抗菌防治植物病害符合农业可持续发展的要求, 是目前的研究热点。然而, 利用平板筛选到的拮抗菌株往往在实验室和温室里防治效果好, 而大田防效较差, 主要原因是土壤微生物的难培养性和复杂性。考虑到拮抗菌在番茄根际定殖的重要性, 选择在根际有竞争力的优势微生物, 适时接种, 将极大地提高生防菌的效果^[2]。我们的前期研究表明, 在YG培养基上, 20°C条件下, 避光培养较长时间, 能较好地回收番茄根际优势微生物, 是筛选番茄青枯病拮抗菌较好的培养方法^[3]。但是目前对于番茄根际微生物的群落结构, 番茄青枯病拮抗菌的筛选时间和接种时间还很少报道。

本文采用传统平板培养方法结合 PCR-DGGE 技术对连作灭菌和未灭菌土中种植的番茄根际微生物群落结构进行连续动态跟踪研究, 从而了解番茄在不同时期的根际微生物群落特点及其变化规律, 为快速、有效地筛选和接种番茄青枯病拮抗菌提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

供试土壤采自华南农业大学连续多年种植番茄的田块, 分为两部分, 一部分 1×10^5 Pa 高压灭菌 2 h, 连续 3 次, 装入灭过菌的塑料盆中。另一部分直接装入灭过菌的塑料盆中。

1.2 植株生长条件

番茄种子采用“红宝石”, 购自华南农业大学。用 10% H_2O_2 表面消毒, 在滤纸上 28°C 催芽 24 h 后播于盆中。放于光照培养箱中, 光照 16 h, 温度 30°C; 黑暗 8 h, 温度 25°C。待番茄长到 3 片真叶时, 定苗每盆留 2 株。转移至玻璃温室。每周施 1 次 Hoagland 营养液。

1.3 样品的采集

分别于苗期(3~4 片真叶)、7~9 片真叶期、初花期(第一穗花开时)、初果期(第一穗果变白时)和末期, 5 个时期取样, 每处理 3 个重复。参照杨合同等的方法^[4]将根区样品分为根围和根际两部分。

1.4 不同生育期可培养微生物的分离和计数

细菌用低营养浓度的 YG 培养基, 20°C 培养 12 d~15 d^[3]; 真菌用马丁氏培养基, 28°C 培养 5 d~7 d; 放线菌用高氏 I 号合成培养基, 26°C 培养 7 d~10 d 后菌落计数。

1.5 根际效应(R/S)

用每个生育期的根际微生物总数比同时期的根围微生物总数所得的值即是该生育期番茄对微生物的根际效应。

1.6 土壤细菌基因组 DNA 的提取与纯化

采用 Bead-Beating 法^[5]。用 Wizard[®] DNA clean-up system (Promega) 纯化, 置于 -20°C 保存, 待用。

1.7 16S rDNA 的 PCR 扩增

利用 Nested PCR 对土壤中所有细菌 16S rDNA V3 高变区进行扩增。反应 : 所用引物为细菌 16S rDNA 全长通用引物 F8-27 和 R1541-1522, 扩增 15 个循环。反应 : 所用引物为细菌 16S rDNA V3 高变区 F341-357(GC)和 R534-518。反应程序为 94°C 5 min 预变性; 94°C 30 s, 60°C~55°C 30 s (-0.5°C/循环), 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 7 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖分析检验。

1.8 DGGE 分析

所用聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%, 变性梯度为 35%~60%, 180V, 60°C 恒温, 0.5 × TAE 中电泳 4.0 h, GoldView 染料染色 30 min, UVI 成像系统拍照。用 UVIBand 分析软件帮助确定样品电泳条带的多少和条带的亮度峰值。

1.9 数据分析

用 Sorenson 配对比较相似性系数(Cs)^[6]比较不同样品 DGGE 图谱的相似性。Cs = $2j/(a+b)$, 其中 a、b 表示各样品中的 DNA 条带数目, j 表示 a 和 b 中相同的

条带数量。多样性指数(H),物种丰度(S)指标被用来比较各个样品的细菌多样性^[7]。 $H = -\sum p_i \ln p_i$ 其中, p_i 是某个样品中单一条带的强度在该样品中所有条带总强度中所占的比率。用UVIBand分析软件进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 番茄不同生育期可培养微生物数量的变化

从图 1a 可以看出, 番茄整个生育期根际定殖的细菌数量发生了明显变化, 而根围细菌数量变化不大。在整个生育期, 番茄根际细菌数量都高于同时期根围的细菌数量。根际土壤样品中, 未灭菌土样品和灭菌土样品变化趋势不同, 苗期时未灭菌土中

根际的细菌数量大于灭菌土, 之后灭菌土中细菌数量急剧上升, 初花期已超过未灭菌土, 到初果期达到最大值。未灭菌土样品中根际细菌数量从苗期后缓慢上升, 到初花期达到最大值, 之后缓慢下降。放线菌数量在未灭菌土和灭菌土中的变化趋势相同(图 1b), 从苗期一直到末期, 始终处于下降趋势。在番茄整个生育时期内, 根际土壤和根围土壤中的放线菌数量都比较接近。真菌数量从苗期到末期逐渐增加(图 1c)。

2.2 根际效应

番茄对细菌的根际效应较大, 对放线菌和真菌的根际作用较小(见表 1)。番茄对细菌根际效应的最高值出现在初花期和初果期。

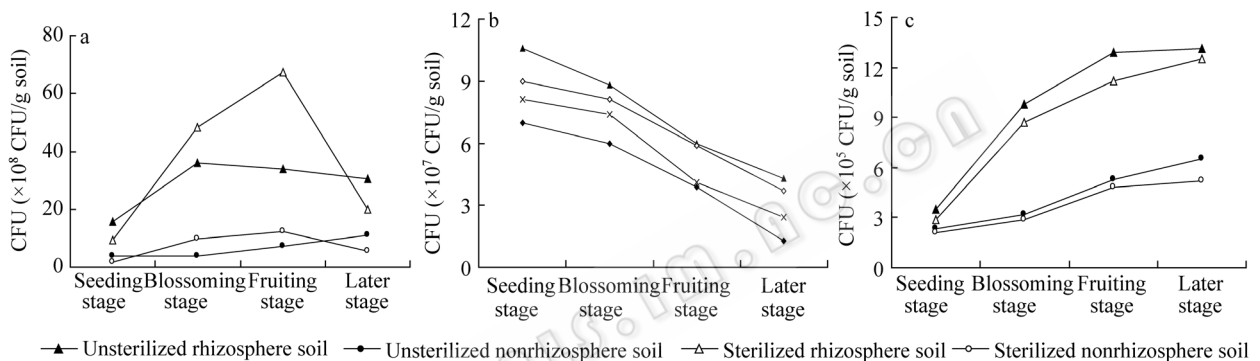


图 1 番茄不同生育期细菌(a)、放线菌(b)、真菌(c)的数量变化

Fig. 1 Changes of numbers of bacteria (a), actinomycetes (b), fungi (c) during different growing period of tomato

表 1 番茄的根际效应(R/S)值
Table 1 The value of rhizospheric effect of tomato (R/S)

R/S	苗期 Seeding stage	初花期 Blossoming stage	初果期 Fruiting stage	末期 Later stage
Bacteria in unsterilized soil	4.3	10.0	4.6	2.8
Bacteria in sterilized soil	5.5	5.0	5.6	3.6
Actinomycetes in unsterilized soil	1.2	1.1	1.0	1.2
Actinomycetes in sterilized soil	1.2	1.2	1.1	1.8
Fungi in unsterilized soil	1.2	1.1	1.2	1.0
Fungi in sterilized soil	1.1	1.1	1.1	1.3

2.3 番茄不同时期根际细菌的 DGGE 分析

从 DGGE 指纹图谱上可以看出(图 2), 未灭菌土和灭菌土根际样品中条带几乎都布满整条泳道, 说明不同生育期番茄根际均具有较高的细菌多样性, 表现为都含有 23 ~ 29 条带。其中初果期时根际样品条带最多, 说明初果期微生物最丰富。条带 1、2、3、6、7 等, 不仅位置相同, 亮度也相近, 说明番茄各生

育期根际土壤中细菌类群较相似。其中 1、2、3 等条带在番茄整个生育期图谱中无论是未灭菌土还是灭菌土中均较亮, 说明这些条带所对应的细菌在番茄整个生育期中都占优势地位, 是番茄根际土壤中的优势菌群。

细菌种类和数量随生育期的变化有所不同, 有些细菌种类只在特定的生育期出现。如条带 13、14

所对应的细菌在番茄 7~9 片真叶时处于优势地位, 但随着番茄的生长, 却变弱甚至检测不到。也有一些原本数量很少或几乎检测不到的细菌数量越来越多, 成为根际优势菌, 如条带 5、10、11、15、16 等所对应的菌。番茄 3~4 片真叶时期, 灭菌土中的根际细菌种群和未灭菌土样品相比明显较少, 条带的位置和亮度也存在差异。如条带 8、9 所对应的细菌在未灭菌土中处于优势地位, 但在灭菌土中却较少。较为显著的变化发生在初花期。根际土壤中条带 4、5、10、15、16 所对应的土壤微生物的数量相对于苗期有了明显的增加。说明根分泌物除了可以影响到根际微生物的种群数量外, 还可以通过改变

其成分, 促进某些微生物生长, 而限制另一些微生物类群生长, 从而控制根际微生物种类及其分布。

从聚类分析结果可以看出(图 4), 树状图分为 2 个大的分支, 其中灭菌土初花期、初果期和未灭菌土果期聚为一类, 说明果期和花期时根际微生物类群较相似; 除未灭菌土 3 片~4 片真叶时, 苗期的其它几个样品聚为一类。

表 2 数据显示, 除 3~4 片真叶时未灭菌土与灭菌土样品的相似性较低外, 其余所有样品相似性指数都在 50% 以上; 灭菌土花期和果期相似性达 73% 左右。

未灭菌土中番茄根际样品的多样性指数(H)和

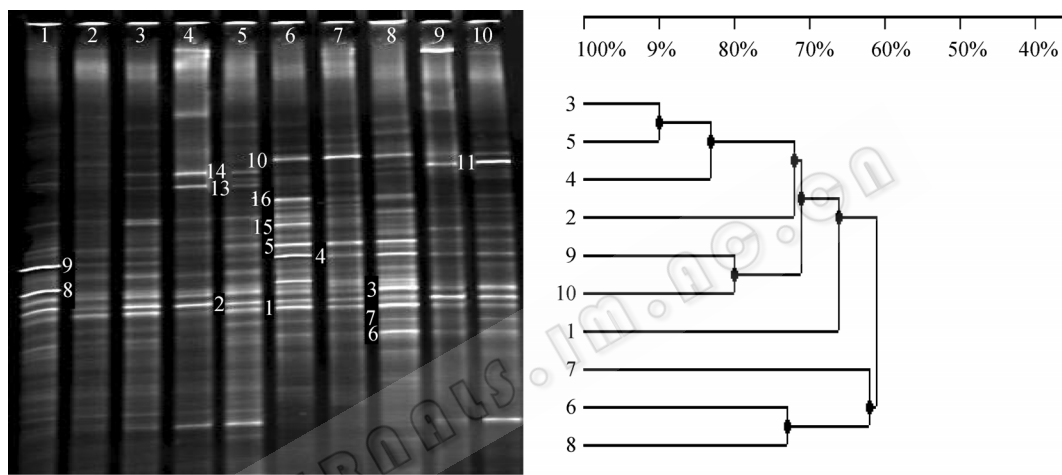


图 2 不同样品的 DGGE 图谱(a)及条带的聚类分析(b)

Fig. 2 DGGE profile of different samples (a) and cluster dendrogram analysis of DGGE bands (b)

注: 1、3、5、7、9: 未灭菌土 3 片~4 片真叶、7 片~9 片真叶、初花期、初果期、末期; 2、4、6、8、10: 灭菌土 3 片~4 片真叶、7 片~9 片真叶、初花期、初果期、末期

Note: 1,3,5,7,9: Unsterilized soil at seeding stage with 3~5 leaves, 7~9 leaves, at blossoming stage, at fruiting stage and at later stage; 2,4,6,8,10: Sterilized soil at seeding stage with 3~5 leaves, 7~9 leaves, at blossoming stage, at fruiting stage and at later stage

表 2 不同样品的 Cs 值
Table 2 Cs values of different samples

Cs	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
L1	1.00									
L2	0.46	1.00								
L3	0.67	0.73	1.00							
L4	0.71	0.62	0.83	1.00						
L5	0.77	0.67	0.91	0.77	1.00					
L6	0.57	0.67	0.57	0.63	0.53	1.00				
L7	0.67	0.57	0.62	0.67	0.71	0.59	1.00			
L8	0.53	0.63	0.67	0.71	0.75	0.74	0.67	1.00		
L9	0.57	0.62	0.67	0.57	0.77	0.63	0.53	0.59	1.00	
L10	0.50	0.67	0.77	0.67	0.71	0.71	0.63	0.67	0.80	1.00

物种丰度(S)值变化趋势相同(图 3a), 3~4 片真叶时多样性指数(H)和物种丰度(S)值高于 7~9 片真叶, 而后逐渐上升, 在初果期番茄根际群落多样性指数(H)和

物种丰度(S)值都达到最高。灭菌土样品中番茄根际样品的多样性指数(H)和物种丰度(S)值都在花期时达到最高(图 3b)。

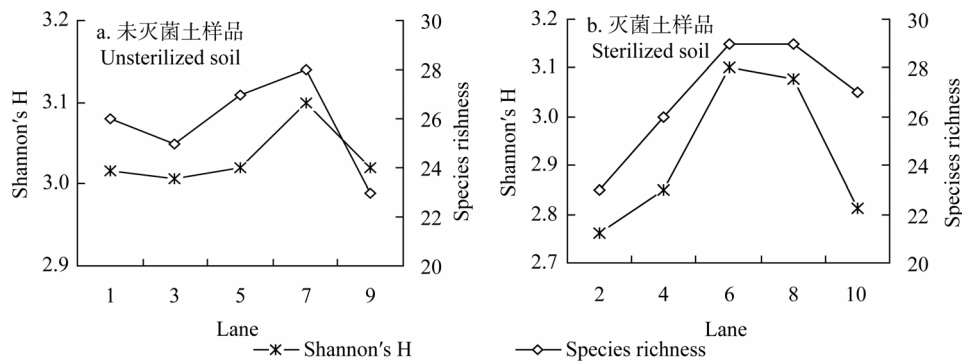


图 3 不同样品中细菌类群多样性指数(H)和物种丰度(S)

Fig. 3 Shannon-Wiener index (H) and species richness (S) of different samples estimated by the DGGE bands patterns

3 讨论

微生物的培养计数作为传统的分析方法在土壤微生物研究中占据着重要的位置。本研究结果表明, 番茄根际土壤样品中, 未灭菌土样品和灭菌土样品变化趋势不同。这种变化趋势可能是由于苗期末灭菌土样品中含有大量土著细菌, 而灭菌土此时的细菌主要来自于水, 移栽番茄幼苗时的操作, 空气中微生物自然沉降等, 因此苗期时未灭菌土中根际的细菌数量大于灭菌土; 随着番茄植株的迅速生长, 产生较多的根系分泌物, 可能促进了某些外源细菌类群的迅速繁殖, 而未灭菌土由于土著细菌的大量存在, 互相之间竞争养料和能源, 反而影响了外源细菌的定殖和繁殖, 因此细菌数量低于灭菌土。

由不同时期根际可培养微生物数量变化比较可知, 番茄根际微生物类群在不同时期分布为细菌 > 放线菌 > 真菌, 与有关资料报道一致^[8]。微生物的总数苗期最少, 至果期达到最高峰, 然后开始稍有降低。虽然微生物的总量一直处在动态变化中, 但细菌在各个时期土壤微生物组成中都占绝对优势, 说明它对根际微生态的稳定及根际养分的供应起重要作用。

番茄对土壤细菌有明显的根际效应。可以推断, 番茄根系分泌物是引起根际细菌区系变化的一个主要因素。由于在根际有较高浓度的可溶性糖、氨基酸、维生素等物质, 为根际细菌的繁殖提供了所需的营养和能源物质^[9], 因而根际细菌数量远高于根

围, 是筛选拮抗菌的较好采样位置。

DGGE图谱显示, 不同生育期末灭菌土和灭菌土番茄根际均具有较高的细菌多样性。有些条带在番茄不同生育期, 不同土壤样品中始终存在, 亮度较亮, 说明这些条带所对应的细菌在番茄整个生育期中始终占优势地位, 是番茄根际土壤中的优势菌群。Yoshitaka Shiomoi等人指出番茄各生育期优势菌种类没有太大差别^[10]。本试验也证实了这一结论。可能因为番茄根系分泌物组成是相似的, 所以吸引的细菌也不会有很大差别。只是营养物质的量不同, 可能导致不同部位细菌的数量有所不同。

根际细菌种类和数量在花期发生较为显著的变化, 相对于苗期土壤有了明显的增加。如条带 4、5、10、15、16 等的亮度同前期根际土样相比明显增加, 可以推测这些条带所对应的细菌在花期发挥着重要作用。从整个生长时期的群落变化来看, 花期和果期的微生物最丰富。这种变化趋势与前人报道的根分泌物随生育期的变化规律相似, 表明根系分泌物对细菌的种类和数量有较大的影响。杨合同的研究发现苗期根围对青枯菌有拮抗作用的菌株较少, 而盛果期青枯菌拮抗优势菌量较多^[4]。因此, 作者认为番茄果期根际微生物丰富, 拮抗菌较多, 是筛选拮抗菌的较好时期。而苗期土著微生物较少, 有利于外源菌群的定殖, 此时接种拮抗菌可能会得到较好的防病效果。

一直以来, 国内外研究人员在筛选植物青枯病拮抗菌时, 采用的方法就是首先在普通的培养基上

分离土壤微生物, 然后进行平板拮抗试验获得拮抗菌株, 最后在植株上生测。该方法存在 4 个方面问题: 1) 土壤微生物资源极为丰富, 然而到目前为止, 可以人工培养的土壤微生物极为有限, 不到总量的 0.3%^[11], 大大降低了筛选拮抗微生物的效率; 2) 采用普通平板筛选菌株容易造成选择性偏差, 筛选到的菌并不一定是土壤中的优势菌^[12]; 3) 中选菌株施入土壤后受到土壤中各种因素的影响, 未必能成为优势种群而使防病效果不稳定; 4) 从庞大的根际微生物群落中筛选拮抗菌的程序繁琐、工作量大, 耗时。因此这 4 个问题的解决将直接关系到利用拮抗菌进行植物病害生物防治这一策略能否进一步向前发展。如果依据 PCR-DGGE 指纹图谱技术, 了解植物在不同时期根际细菌群落特点、变化规律, 从而指导植物根际拮抗菌的筛选, 选择根际微生物最丰富时期的有益优势菌, 研制多种菌的混配制剂, 引入到番茄根际抑制有害菌或增加有益菌。本研究在理论上为拮抗菌的筛选提供了一个新的思路, 也为今后微生物肥料的研究提供了方向, 减少生态调节的盲目性, 从而真正达到改善根系微生物群落、进行生态预防和提高产量的目的。

参 考 文 献

- [1] Hayward AC. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanaceanua*. *Annu Rev Phytopathol*, 1991, **29**: 65–87.
- [2] Smith KP, Handelsman J, Goodman RM. Genetic basis in plants for interactions with disease-suppressive bacteria. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, **96** (9): 4786–4790.
- [3] 孙晓棠, 刘琼光, 朱红惠. 利用 DGGE 评价不同培养基回收番茄根际细菌类群的能力. *微生物学报*, 2006, **46**(3): 482–486.
- [4] 杨合同, 任欣正, 王少杰. 番茄根土区系中拮抗细菌的分布与青枯病发生的关系. *生物防治通报*, 1994, **10**(4): 162–165.
- [5] Yeates C, Gillings MR, Davison AD, *et al*. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological Procedures Online*, 1998, **1**: 40–47.
- [6] Gillan DC, Speksnijder AGCL, Zwart G, *et al*. Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR-amplified gene fragment coding for 16S rDNA. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(9): 3464–3472.
- [7] Andreoni V, Cavalca L, Rao MA, *et al*. Bacteria communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere*, 2004, **57**: 401–412.
- [8] 孙军德, 赵春燕, 黄小星. 保护地番茄根际微生物区系分析. *土壤通报*, 2005, **36**(6): 943–945.
- [9] Jaeger CH, Lindow SE, Miller W, *et al*. Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(6): 2685–2690.
- [10] Yoshitaka S, Masaya N, Tomoko O, *et al*. Comparison of bacterial community structures in the rhizoplane of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(9): 3996–4001.
- [11] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, **59**(1): 143–169.
- [12] Mcaig AE, Grayston SJ, Prosser JL, *et al*. Impact of cultivation on characterisation of species composition of soil bacteria communities. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, **35**(1): 37–48.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H、*Msp*、*Sau*3A 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。