

AM真菌与拮抗细菌的互作及对 番茄根系酚类物质的影响

朱红惠¹, 姚青², 羊宋贞¹

(1 广东省微生物研究所, 广东 广州 510070; 2 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要: 在两室根箱系统中以番茄为供试植物, 接种丛枝菌根(AM)真菌 *Glomus versiforme* 和/或拮抗细菌, 研究两者在根际的互作及对根细胞壁结合态酚的影响, 结果表明: 拮抗细菌对菌根侵染率有轻微的促进作用, 菌丝密度因接种拮抗细菌而增加, 而接种 AM 真菌降低了拮抗细菌在根面、根际的定殖, 前者由 $7.94 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ 降低到 $3.75 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$, 后者由 $8.08 \times 10^5 \text{ g}^{-1}$ 降低到 $2.87 \times 10^5 \text{ g}^{-1}$, 其影响甚至延伸到根面以外 2 cm 的范围; AM 真菌和拮抗细菌都能提高根细胞壁结合态酚类物质的含量, 但后者的增幅更大。可以认为, 拮抗细菌对 AM 真菌有协同作用, 双接种有可能促进 AM 真菌抗病功能的进一步发挥。

关键词: AM 真菌; 拮抗细菌; 互作; 酚类物质

中图分类号: S 436.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2003) 03-0020-04

丛枝菌根真菌(AM 真菌)是一类土壤真菌, 能够与 80% 以上的陆地植物根系建立共生关系, 形成丛枝菌根。AM 真菌在与植物形成菌根之后, 在许多方面改变宿主植株的生理生化过程, 包括促进根系对土壤矿质营养的吸收、改善植株的水分代谢状况、提高植株对重金属胁迫的抗/耐性、增强植株的抗病性等。近 10 年来, 随着对 AM 真菌非营养效应研究的开展和深入, 利用 AM 真菌进行植物病害的生物防治也引起重视。AM 真菌增强植物抗病性的作用机制涉及营养效应、组织的形态结构和生理生化变化、根际微生物区系的变化以及根系构形的改变。Grand-maison 等^[1]认为, 洋葱根系酚类物质含量的提高是 AM 真菌增强植株抗病性的重要因素。利用拮抗微生物防治植物病害是传统的生物防治措施, 在许多植物病害防治上均取得良好的效果。研究表明, 同时利用 AM 真菌和拮抗微生物可以获得累加的防病效果^[2], 但是关于两者在根际的互作的报道较少。本试验将对植物进行 AM 真菌和拮抗细菌双接种, 探讨两者在根际土壤中相互作用, 以及对植物根系酚类物质含量的影响, 为利用 AM 真菌和拮抗细菌控制植物病害打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料为番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.),

丛枝菌根真菌为 *Glomus versiforme* (Karsten) Berch, 拮抗细菌为广东省微生物研究所从番茄抗病品种根际筛选获得, 诱导利福平抗性后用于试验。植株的生长介质为红壤、河沙和菇泥的混合物 ($V:V:V = 1:1:1$), 用卧式高压灭菌锅在 121 °C 条件下灭菌 2 h。试验系统为两室根箱(图 1), 根室和边室之间用 30 μm 孔径的尼龙网分隔, 使得根系不能进入边室而菌丝可以进入。根箱的长和高分别为 10 和 8 cm, 根室和边室的宽度分别为 8 和 2 cm, 装土量分别为 800 和 200 g。番茄播种在育苗盘中, 长至 4 叶期时, 选择长势一致的幼苗移栽到根箱中。

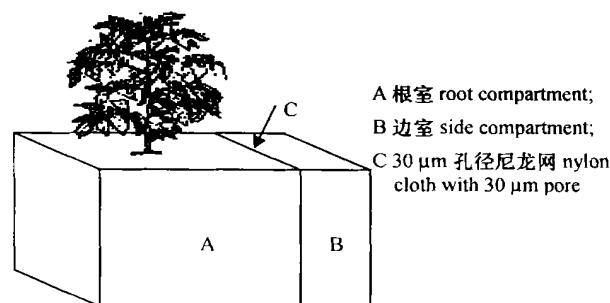


图 1 两室根箱示意图

Fig. 1 Diagram of two-compartment rhizobox

1.2 试验设计

试验设 4 个处理, 即不接种任何菌(对照)、接种 AM 真菌(AM)、接种拮抗细菌(J)和双接种(AM+J), 每个处理 4 次重复。AM 处理中, 菌剂(土壤、根段和

孢子的混合物)按 $w=5\%$ 的比例接种在根室; J 处理中, 幼苗在移栽时用 $5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 菌悬液浸根 20 min 后定植, 2 周后再用 $5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 菌悬液 10 mL 灌根。

1.3 植株培养

试验在 6~7 月进行, 幼苗移栽后置于网室中生长, 生长期温度为 25~35 °C, 光照为自然光, 植株生长 6 周后采样测定各项指标。

1.4 测定方法

植株采样后, 地上部在 70 °C 烘干至恒定质量, 测定干质量; 从根室中小心取出根系, 根面和根际的拮抗细菌数量按照常规方法测定; 菌根侵染率的测定同文献[3]。打开边室, 用刀片将边室土壤均等地分成 3 层, 每层约 0.67 cm。从各土层中称取 1 g 鲜土, 按常规方法测定拮抗细菌数量; 其余土壤风干后称取 10 g, 按 Frey 等^[4]的方法测定 AM 真菌菌丝密度。

根细胞壁结合态酚按宋凤鸣等^[5]的方法测定: 取 0.25 g 烘干根样, 0.03 g/mL SDS 匀浆, 4000 r/min 离心 5 min 后用乙醇、丙酮和乙醚各洗涤 1 次, 风干后用 3 mL 0.5 mol/L NaOH 水解 16 h, 加水至 5 mL 后

10 000 r/min 离心 5 min, 沉淀加 4 mL 0.5 mol/L NaOH 在 80 °C 水浴中水解 16 h, 离心后取上清液 1.6 mL, 用 2.5 mol/L HCl 调节 pH 至 8.0, 再加水至 2.5 mL (A 液), 另取 0.5 mL 上清液, 加 2.5 mL 0.06 mol/L NaOH (B 液), 以 B 液为参比测定 A 液的 $D_{245 \text{ nm}}$ 和 $D_{340 \text{ nm}}$, 分别表示细胞壁结合态简单酚和酚聚合物的含量, 以 D_{λ} 为 1 时, 定义为 1 个单位 (U)。

2 结果与分析

2.1 AM 真菌对植株生物量的影响

菌根侵染率的测定结果表明, 生长介质灭菌后 AM 真菌完全失去了侵染活性, 不接种 AM 真菌的两个处理中植株的侵染率均为 0 (表 1)。接种处理 AM 和 AM+J 的植株根系侵染率分别为 36.7% 和 41.1%, 表明拮抗细菌对 AM 真菌的侵染有轻微的促进作用。

由于 AM 真菌的侵染, 番茄植株的生长受到明显促进, 地上部干质量由不接种处理的 1.22~1.47 g 增加到接种处理的 1.85~2.22 g, 差异达到显著水平。

表 1 AM 真菌和拮抗细菌对番茄生物量、根细胞壁结合态酚和拮抗细菌数量的影响¹⁾

Tab. 1 Influence of AM fungus and antagonistic bacterium on plant growth, phenolic content in root and bacterial population

处理 treatment	侵染率 infection rate/ %	地上部干质量 shoot dry mass/g	拮抗细菌数量 antagonistic bacterial population/ (g ⁻¹)		根细胞壁结合态酚含量 wall-bound phenolic content in root/ (U·mg ⁻¹)	
			根面 root surface	根际 rhizosphere	简单酚 simple phenolics	聚合酚 complex phenolics
对照 control	0.0	1.47 a	—	—	0.068 a	0.031 a
AM	36.7 a	1.85 b	—	—	0.088 b	0.048 b
J	0.0	1.22 a	7.94×10^6 a	8.08×10^5 b	0.113 c	0.060 c
AM+J	41.1 a	2.17 b	3.75×10^6 a	2.87×10^5 a	0.101 bc	0.047 b

1) 同列数据后字母不同的差异显著, 字母相同的差异不显著 (LSD 0.05)

2.2 AM 真菌对拮抗细菌定殖的影响

表 1 的数据表明, 采用浸根和灌根法使得拮抗细菌成功地定殖于根面和根际。利用诱导利福平抗性的检测方法在对照和 AM 两个处理中未发现拮抗细菌存在, J 和 AM+J 两个处理中根面和根际的拮抗细菌数量分别达到 $1 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ 和 $1 \times 10^5 \text{ g}^{-1}$ 。比较接种拮抗细菌的两个处理 J 和 AM+J 可以发现, 接种 AM 真菌降低了拮抗细菌的数量, 这可能是与植株根系分泌物减少或者对碳源的竞争有关。

2.3 边室土壤中 AM 真菌与拮抗细菌的相互影响

图 2 表明, 边室土壤中 AM 真菌与拮抗细菌之间存在相互作用。比较两个接种 AM 真菌的处理 AM 和 AM+J 可以看出, 拮抗细菌可以促进 AM 真菌的菌丝生长, 在距离根室远近不同的 3 个边室土层中 AM 真菌的菌丝密度都有所增加, 甚至达到显著水平

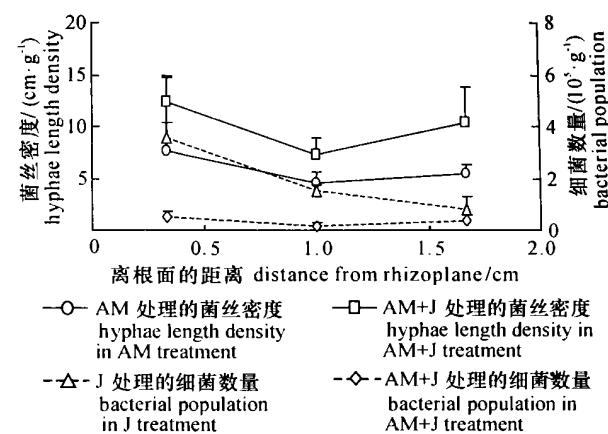


图 2 AM 真菌对拮抗细菌数量的影响和拮抗细菌对 AM 真菌菌丝密度的影响

Fig. 2 Influence of AM fungus on the bacterial population and influence of bacteria on the AM hyphae length density

(图2),这种增加与拮抗细菌提高菌根侵染率有一定的关系,但也不能排除拮抗细菌对菌丝的直接刺激作用。两个处理中,AM真菌外生菌丝的空间分布具有相同的特点,即菌丝密度在靠近根室的土层中最大,随着菌丝的延伸而降低,到达根箱壁时又增加,这是边室外壁阻碍菌丝进一步延伸所引起的富集效应。

在接种拮抗细菌的处理(J)的边室土壤中,拮抗细菌的数量随着离根室距离的增加而降低(图2),这是植株根际效应的表现。在双接种处理(AM+J)中,第1和第2土层中拮抗细菌的数量显著低于J处理,表明接种AM真菌对拮抗细菌的增殖有一定的抑制作用,这与根面和根际拮抗细菌数量的结果一致。值得注意的是在双接种处理中,拮抗细菌的数量尽管较低,但其在3个土层中的空间分布特点与菌丝密度相似,说明在远离根际的土壤中菌丝的存在对拮抗细菌有一定的促进作用。

2.4 AM真菌与拮抗细菌对根系细胞壁结合态酚的影响

本试验中,3个接种处理都显著增加了根细胞壁结合态酚的含量(表1),接种拮抗细菌处理的增幅最大,双接种处理次之,接种AM真菌处理最小。可见,拮抗细菌对根细胞壁结合态酚合成的刺激作用大于AM真菌,而AM真菌降低拮抗细菌的数量也使得AM+J处理中根系细胞壁结合态酚的含量低于J处理(表1)。在3个处理及对照中,细胞壁结合态聚合酚的含量大约为细胞壁结合态简单酚含量的一半。这些增加的细胞壁结合态酚对提高植株的抗病性应该起到一定的促进作用。

3 讨论

较高的侵染率是AM真菌发挥作用的前提,本试验中拮抗细菌提高了菌根侵染率,表明接种拮抗细菌对AM真菌侵染根系有协同作用。Edwards等^[6]研究了拮抗细菌 *Pseudomonas fluorescens* 与 *Glomus mosseae* 之间的互作,也发现两者之间的协同作用。根际细菌对AM真菌侵染能力的促进可能与根系形态、构形或生理过程的改变有关,也可能是促进了AM真菌在侵染前的孢子萌发与菌丝生长^[7]。

AM真菌对根际细菌也能产生反馈影响,研究表明,AM真菌能促进根际细菌在根际的定殖^[8]。本试验中,AM真菌明显抑制了拮抗细菌在根面和根际的定殖,其影响范围甚至扩大到根际以外2cm,这种抑制作用可能与根系分泌物减少有关。有研究指出,AM真菌侵染引起的根细胞膜透性降低、分泌物减

少,能够影响根际微生物的种群数量^[9]。本试验还表明,在远离根际的土层中,AM真菌的外生菌丝对拮抗细菌有一定的促进作用,这种促进作用应该归功于菌丝分泌物,因为在非根际范围内,菌丝分泌物可能是细菌的重要碳源, Filion等^[10]的研究也证实了这一点。综合来看,本试验中拮抗细菌的增殖受到根系分泌物和菌丝分泌物两者的影响,与前者相比,后者是次要因素,仅仅在远离根际的土层中发挥作用。

本试验表明AM真菌能够提高根细胞壁结合态酚的含量,这与笔者以前的研究结果一致(数据待发表)。酚类物质含量的增加被认为是AM提高植物抗病性的重要因素^[11]。Grandmaison等^[1]利用HPLC和NMR纯化、鉴定了洋葱菌根中的酚类物质,认为细胞壁结合态酚的主要成分是阿魏酸、香豆酸和阿魏酰酪胺。本试验中,拮抗细菌也增加了细胞壁结合态酚的含量,这是否具有普遍性,有待进一步研究证实。此外,本试验还发现拮抗细菌能提高AM真菌的侵染率和菌丝密度,这可能是因为孢子萌发和菌丝生长受到促进的缘故^[12],这一促进作用有望进一步增强AM真菌抗病和营养功能。

参考文献:

- [1] GRANDMAISON J, GYORGY M O, van MARIE—ROSE C, et al. Characterization and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots [J]. *Mycorrhiza*, 1993, 3: 155—164.
- [2] 小林纪彦. VA菌根菌による土壤病害の抑制[J]. 农耕と园艺, 1993, 9: 69—71.
- [3] YAO Q, LI X L, FENG G, et al. Mobilization of sparingly soluble inorganic phosphates by the external mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus[J]. *Plant and Soil*, 2001, 230: 279—285.
- [4] FREY B, SCHÜEPP H. A role of vesicular—arbuscular (VA) mycorrhizal fungi in facilitating interplant nitrogen transfer[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1993, 25(6): 651—658.
- [5] 宋凤鸣, 郑重, 葛秀春. 酚类物质在棉花对枯萎病抗性中的作用[J]. 应用与环境生物学报, 1997, 3(1): 71—75.
- [6] EDWARDS S G, YOUNG J P W, FITTER A H. Interactions between *Pseudomonas fluorescens* biocontrol agents and *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus within the rhizosphere[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 166: 297—303.
- [7] AZCÓN—AGUILAR C, DIAZ—RODRIGUZÉ R M, BAREA J M. Effect of soil microorganisms on spore germination and growth of the vesicular—arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*[J]. *Transactions of British Mycological Society*, 1994, 103: 199—205.

- ical Society, 1986, 86: 337—340.
- [8] FITTER A H, GARBAYE J. Interaction between mycorrhizal fungi and other soil organisms[J]. Plant and Soil, 1994, 159: 123—132.
- [9] AMES R N, REID C P P, INGHAM E R. Rhizosphere bacterial population responses to root colonization by a vesicular—arbuscular mycorrhizal fungus[J]. New Phytologist, 1984, 96: 555—563.
- [10] FILION M, ST—ARNAUD M, FORTIN J A. Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus in-*
- traradices* and different rhizosphere microorganisms[J]. New Phytologist, 1999, 141: 525—533.
- [11] BENHAMOU N, FORTIN J A, HAMEL C, et al. Resistance responses of mycorrhizal *Ri T—DNA*—transformed carrot root to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*[J]. Phytopathology, 1994, 84(9): 958—968.
- [12] HILDEBRANDT U, JANEITA K, BOTHE H. Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68 (4): 1919—1924.

Interactions Between AM Fungus and Antagonistic Bacterium and Their Effect on Phenolic Content in Tomato Plant Root

ZHU Hong-hui¹, YAO Qing², YANG Song-zhen¹

(1 Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China;

2 College of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: In a two—compartment rhizobox system, tomato plant (*Lycopersicon esculentum* Mill.) was inoculated with *Glomus versiforme*, an arbuscular mycorrhizal (AM) fungus, and/or an antagonistic bacterium to investigate their interactions in the rhizosphere and their effect on the cell-wall-bound phenolics of the host plant. Results indicated that the antagonistic bacterium improved the mycorrhizal infection rate slightly, and the hyphae length density was increased. Inoculation of AM fungus decreased the bacterial population on the root surface and in the rhizosphere, and the effect extended to 2 cm distance from the rhizoplane. Inoculation with both microbes increased the root cell wall—bound phenolics content, with a greater increase compared to bacterial inoculation. It is suggested that dual inoculation of AM fungus and antagonistic bacterium should enhance the pathogen-resistance function of AM fungus.

Key words: AM fungus; antagonistic bacterium; interaction; phenolics

【责任编辑 柴 焰】