

青枯病抗性不同的番茄土壤细菌生理群的数量变化

冯 杭¹, 谭秀明¹, 李艳嫦¹, 曾冬根², 刘琼光¹

(1 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642; 2 江西省吉安县农业局, 江西 吉安 343100)

摘要:对青枯病抗性不同的番茄品种根际细菌生理群数量变化进行了研究. 结果表明, 番茄根际细菌种群和数量的变化随品种抗性、生育期不同和季节的变化而变化, 其中氨化细菌的数量与番茄青枯病抗性呈正相关; 根际细菌中氨化细菌、硝化细菌、好气纤维素分解细菌、固氮细菌和反硫化细菌等数量均表现为夏季高于冬季, 而厌氧纤维素分解细菌和硫化细菌的数量则表现为冬季高于夏季.

关键词:番茄; 青枯病; 抗性; 细菌生理群

中图分类号: S436.412.15

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)01-0030-04

Studies on Populations of Bacterial Physiological Groups in Rhizosphere of Tomato with Different Resistance to *Ralstonia solanacearum*

FENG Hang¹, TAN Xiu-ming¹, LI Yan-chang¹, ZENG Dong-gen², LIU Qiong-guang¹

(1 College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Bureau of Agriculture in Ji'an County, Jiangxi, Ji'an 343100, China)

Abstract: The investigations were conducted on bacterial populations from rhizosphere soils of tomato with different resistance to *Ralstonia solanacearum*. The results showed that rhizosphere bacterial communities and populations in tomato varied with the changes of different resistant cultivars, the growth stages of tomato and seasons. The amount of ammoniation bacteria in the rhizosphere are positively correlated with the resistance *R. solanacearum*. The average quantities of the ammoniation bacteria, nitrifiers bacteria, aerobic cellulose-decomposer, nitrogen-fixing bacteria and desulphate bacteria were higher in the summer than that in the winter, but the quantities of the anaerobic cellulose-decomposer and the sulphate bacteria was higher in the winter than that in the summer.

Key words: tomato; *Ralstonia solanacearum*; resistance; bacterial physiological groups

番茄青枯病 *Ralstonia solanacearum* 是一种世界范围的毁灭性土传病害, 广泛分布于热带、亚热带及温带地区^[1]. 该病害由茄科劳尔氏细菌引起, 病菌可以侵染 50 多个科的 200 多种植物造成巨大的产量损失^[2], 目前尚无有效的防治药剂^[3]. 由于青枯病菌能够在土壤中无寄主的情况下存活很长时间^[4], 采用较长年限的轮作防治措施, 不适于现代农业的发展. 抗病品种的选育是最为有效的方法, 但因青枯细菌生理小种的多样性, 使抗病品种不能得到广泛的应用. 采用植物根际有益细菌防治该病害是一条重要的途径, 且符合农业可持续发展的要求, 是目前的

研究热点和发展方向^[5-7]. 与植物病害发生有关的土壤根际微生物的研究越来越引起人们的广泛关注^[8-9]. 细菌生理群是指具有相同或不同形态的执行着同一种功能的一类细菌, 各生理类群一方面表现为需要特定的生长条件, 另一方面表现为在物质转化中具有特定的功能^[10]. 水体、土壤、动物消化道中的细菌生理群均参与物质的转化, 它们在维持生态平衡中扮演着重要角色^[10].

番茄青枯病是一种重要的病害, 迄今有关不同青枯病抗性的番茄品种在不同的生育期中土壤七大类细菌生理群(氨化细菌、反硝化细菌、好气性自生

收稿日期: 2008-04-20

作者简介: 冯 杭(1981—), 男, 硕士; 通讯作者: 刘琼光(1964—), 男, 副教授, E-mail: qgliu@scau.edu.cn

固氮菌、好气性纤维素分解菌、厌气性纤维素分解菌、硫化细菌、反硫化细菌)的存在与否及数量变化的研究极少,本文对此进行了研究,以期寻找影响青枯病发生的菌群种类,为调整根系微生物的群落结构和微生态及青枯病的微生物防治奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

番茄品种:夏红1号(高抗青枯病)、夏钻石(中抗青枯病)、金宝(中感青枯病)、宝石5号(高感青枯病),均由华南农业大学园艺开发总公司提供。

供试培养基:蛋白胨胨化培养基、反硝化细菌培养基、阿须贝无氮培养基、纤维细菌合成培养基、嫌气性分解纤维素细菌培养基、硫化细菌培养基、斯塔克反硫化培养基。

1.2 方 法

所有供试番茄均播于钵中,盆土采自山东淄博、济南,广东韶关、梅州、清远等地的水稻、大豆、花生、玉米、番茄、烟草、辣椒植物的根际土,混匀后,每盆装土2.5 kg。春种番茄于2006年3月播种,秋种番茄于2006年9月播种,盆栽番茄置于开放的自然环境中,常规管理,定期取土样分离根际细菌。

分别于番茄的发芽期(2~3片真叶)、幼苗期(9~10片真叶)、开花期(第1穗花开)和果实期(第1穗果变白)4个时期取根际土壤,每处理取3盆土壤,每盆10 g,共30 g,混匀,3次重复。

称取混匀后的土样10 g,放入90 mL无菌水中,振荡20 min,按10倍稀释法进行梯度稀释。氨化细菌、反硝化细菌、好气性自生固氮菌、好气性纤维素分解菌、厌气性纤维素分解菌、硫化细菌、反硫化细菌等分离培养参照最大或然数(MPN)计数方法进行^[11]。分离后的土壤悬液,烘干并称质量。1 g干土所含的活菌数按下式计算:

活菌数 = (菌数近似值 × 数量指标第1位数的稀释度) / 土壤中干土质量。

2 结果与分析

2.1 不同季节番茄土壤氨化细菌数量变化

在春夏季节中,番茄的4个生育期,抗病品种中氨化细菌的数量高于感病品种,各品种在不同生育期氨化细菌的数量变化平缓(图1A)。在秋冬季节开花期,抗病品种(夏红一号、夏钻石)根际氨化细菌的数量明显多于感病品种。其他时期品种间的数量差异不大,4个番茄品种氨化细菌的数量在发芽期最低,结果期最高(图1B)。番茄土壤氨化细菌平均数量春夏季节明显高于秋冬季节。

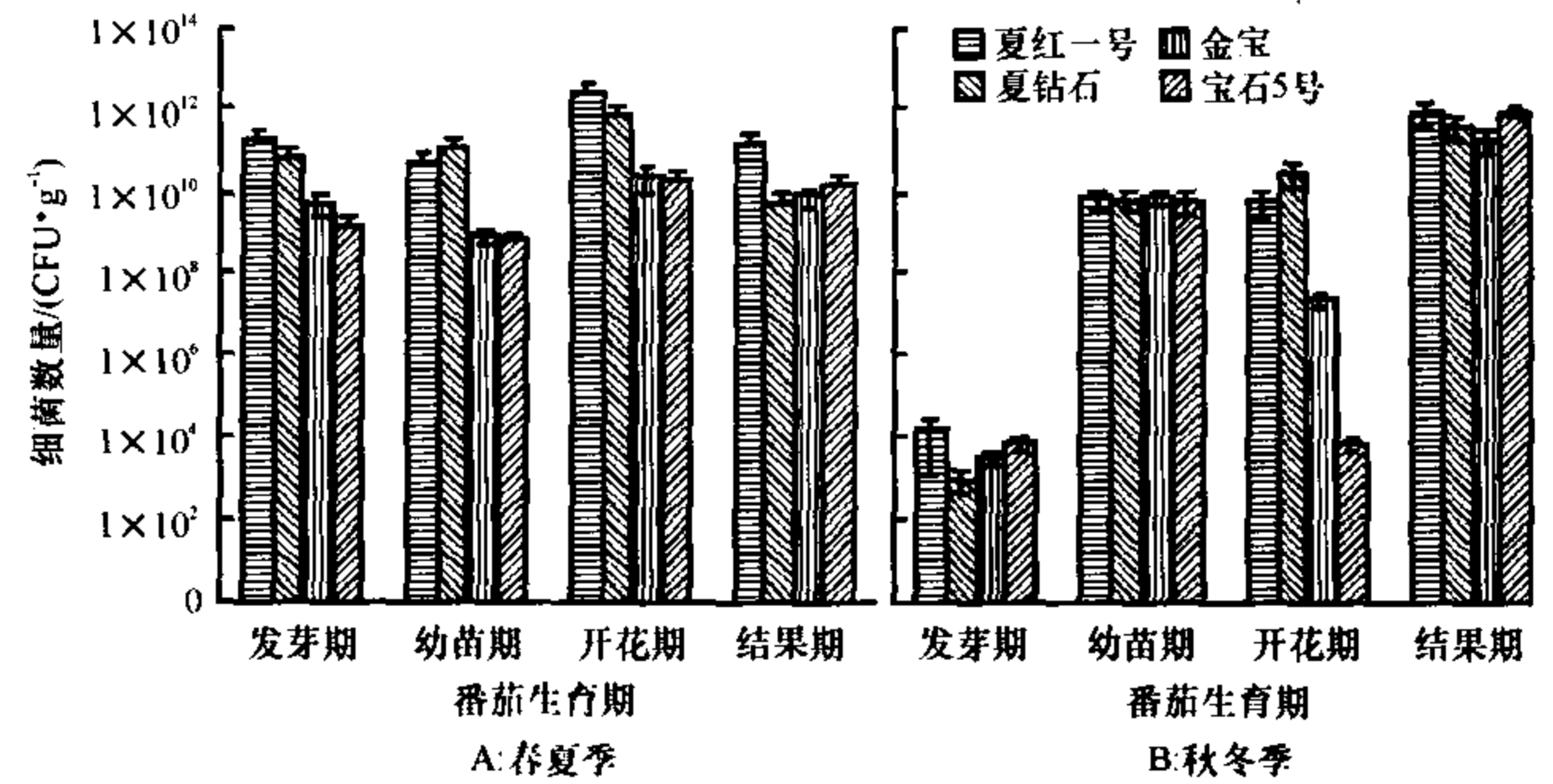


图1 春夏季和秋冬季番茄土壤氨化细菌数量变化

Fig. 1 Changes of ammoniation bacteria in tomato soil in the spring-summer and autumn-winter

2.2 不同季节番茄土壤反硝化细菌数量变化

在春夏季节中,发芽期,抗病品种反硝化细菌数量高于感病品种,各品种在不同生育期变化较平稳(图2A)。在秋冬季节,从发芽期至开花期,抗病品种中反硝化细菌的数量均高于感病品种(图2B)。番茄土壤反硝化细菌平均数量春夏季节高于秋冬季节。

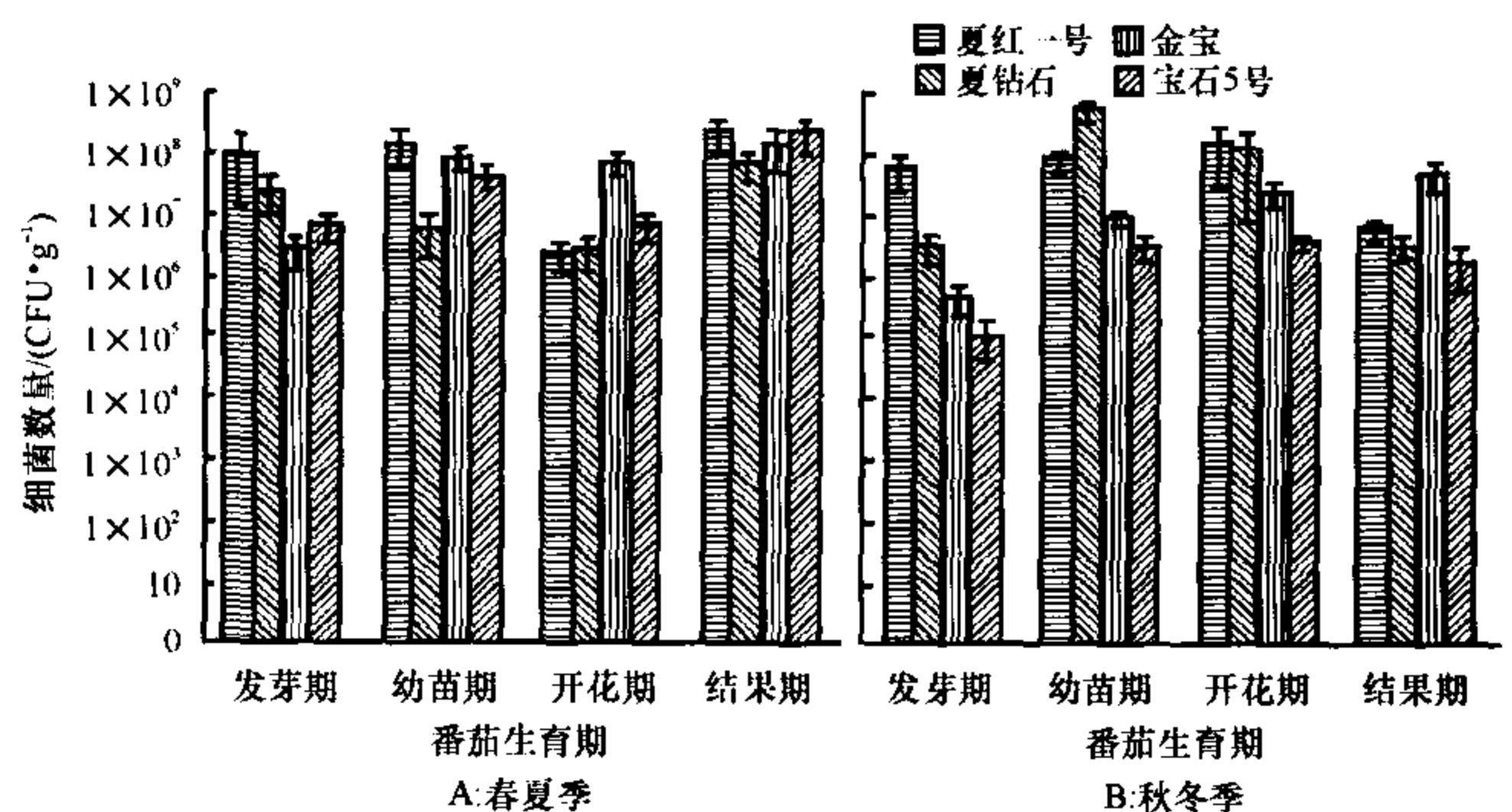


图2 春夏季和秋冬季番茄土壤反硝化细菌数量变化

Fig. 2 Changes of denitrifying bacteria in tomato soil in the spring-summer and autumn-winter

2.3 不同季节番茄土壤好气性自生固氮菌数量变化

在春夏季节中,开花期,感病品种好气性自生固氮菌的数量高于抗病品种;其他生育期,4个番茄品种好气性自生固氮菌数量变化不明显(图3A)。在秋冬季节中,各生育期,不同抗性的番茄品种之间好气性自生固氮菌数量的差异不明显,在幼苗期和结果期,高抗品种夏红一号土壤好气性自生固氮菌的数量高于高感品种宝石5号(图3B)。番茄土壤好气性自生固氮菌平均数量春夏季节明显高于秋冬季节。

2.4 不同季节番茄土壤好气性纤维素分解菌数量变化

在春夏季节中,从发芽期至开花期,感病品种土壤好气性纤维素分解菌均高于抗病品种,但在结果期,数量相差不大(图4A)。秋冬季节开花期,抗病品种的好气性纤维素分解菌的数量明显高于感病品种,高感品种在整个生育期的数量呈递减趋势(图4B)。

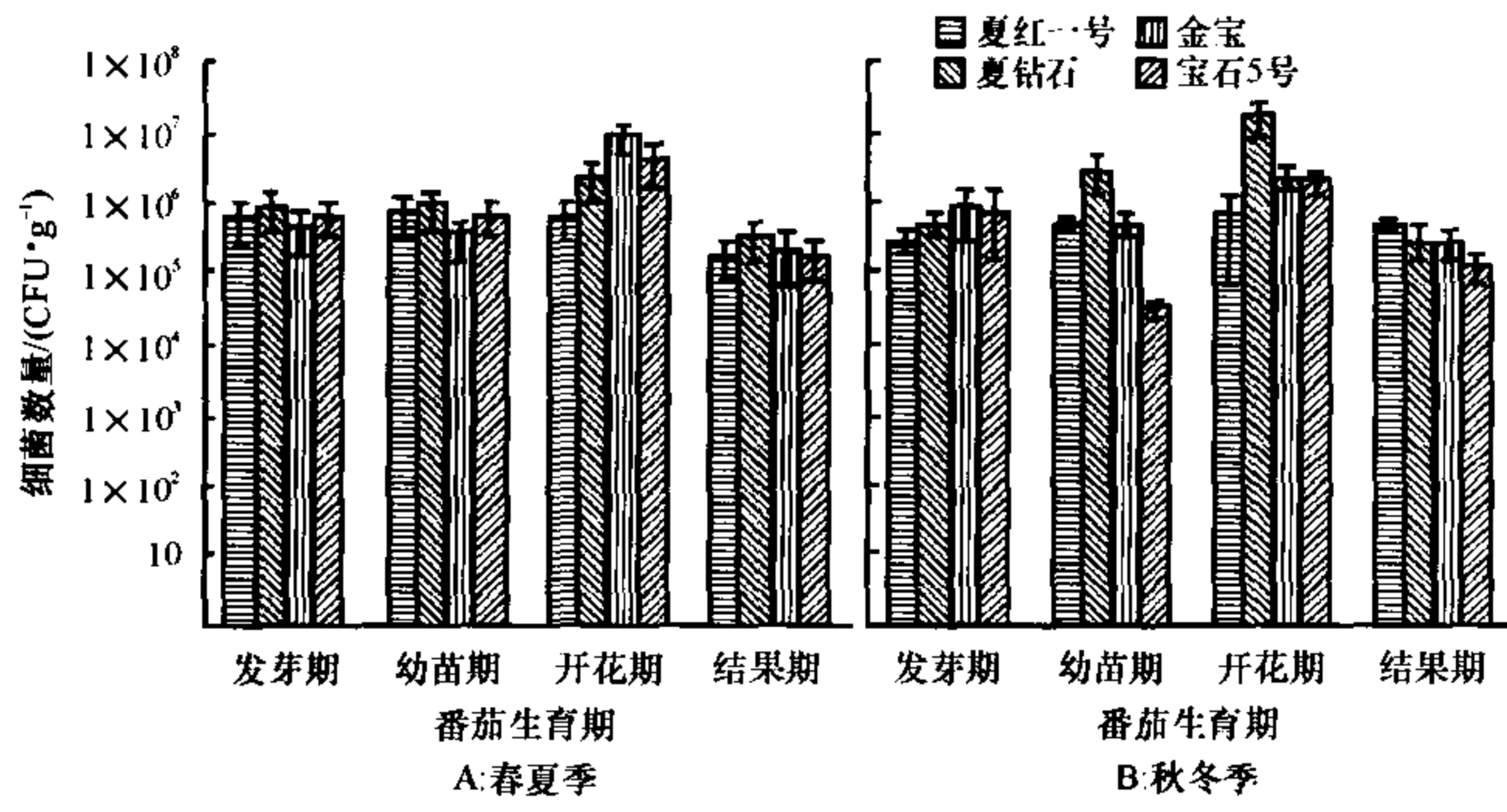


图3 春夏季和秋冬季番茄土壤好气性自生固氮菌数量变化
Fig.3 Changes of aerobic nitrogen-fixing bacteria in tomato soil in the spring-summer and autumn-winter

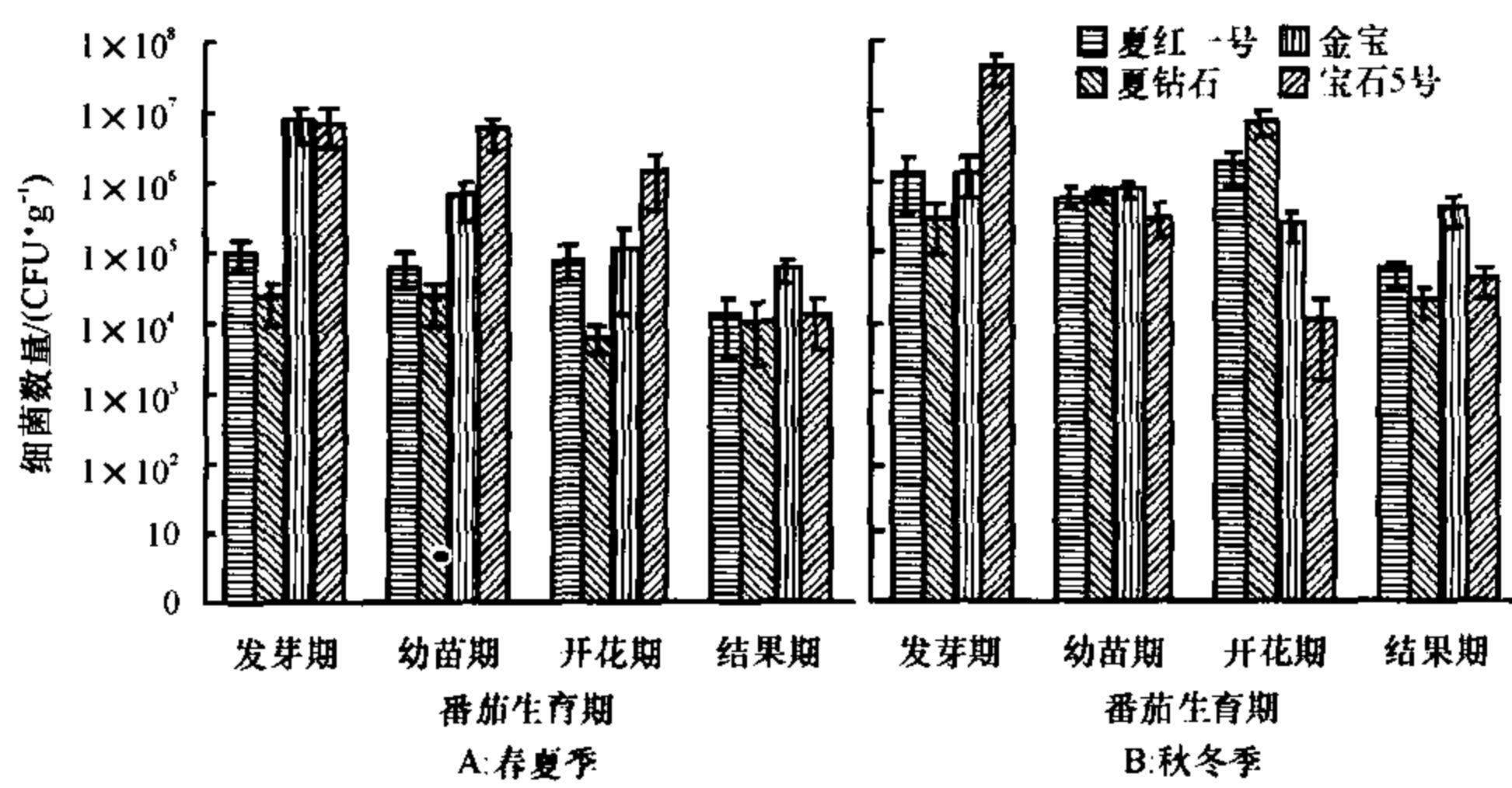


图4 春夏季和秋冬季番茄土壤好气性纤维素分解细菌数量变化
Fig.4 Changes of aerobic cellulose-decomposing bacteria in tomato soil in the spring-summer and autumn-winter

2.5 不同季节番茄土壤厌气性纤维素分解菌数量变化

在春夏季节中,高抗品种夏红一号在结果期厌气性纤维素分解菌数量增加,而在其他生育期数量变化不大,另3个品种在番茄不同的生育期厌气性纤维素分解菌数量波动较大(图5A).秋冬季节,抗、感品种之间在各生育期厌气性纤维素分解菌的数量差异不明显,开花期,该类细菌的数量较其他生育期低,在幼苗期和开花期,感病品种中厌气性纤维素分解菌的数量稍高于抗病品种(图5B).番茄土壤厌气

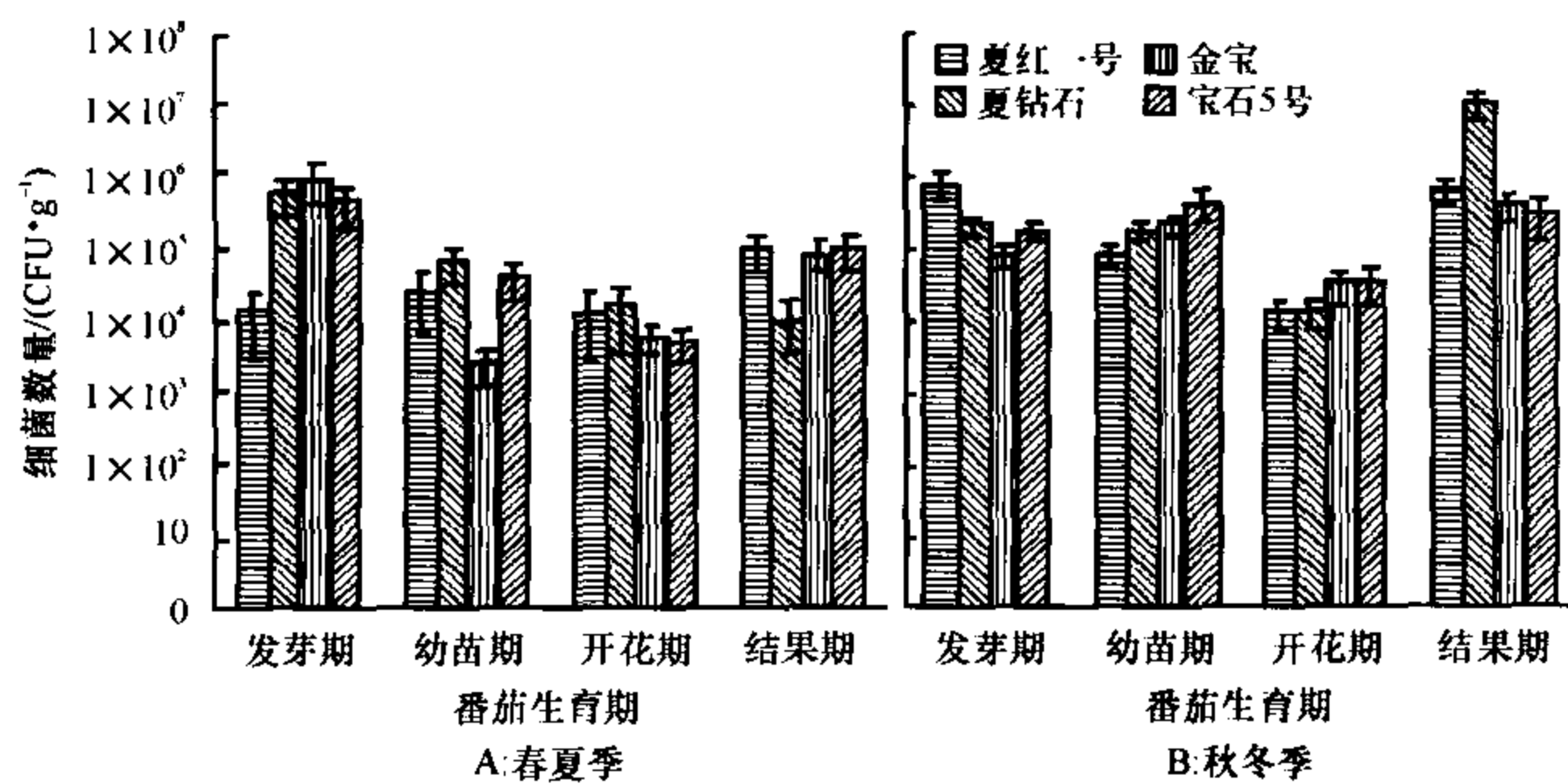


图5 春夏季和秋冬季番茄土壤厌气性纤维素分解细菌数量变化
Fig.5 Changes of anaerobic cellulose-decomposing bacteria in tomato soil in the spring-summer and autumn-winter

性纤维素分解菌的平均数量在秋冬季节中明显高于春夏季节.

2.6 不同季节番茄土壤硫化细菌数量变化

春夏季节,高抗和中抗品种在开花期硫化细菌的数量达最大值,且高于感病品种,发芽期,高抗品种夏红一号硫化细菌数量高于其他3个番茄品种,在幼苗期和结果期,4个番茄品种硫化细菌数量变化规律相似(图6A).秋冬季节幼苗期,抗病品种中硫化细菌的数量明显高于感病品种,其他生育期抗、感品种相差不大,而且均表现为数量逐渐增加的变化规律(图6B).表明硫化细菌数量变化与番茄品种抗性

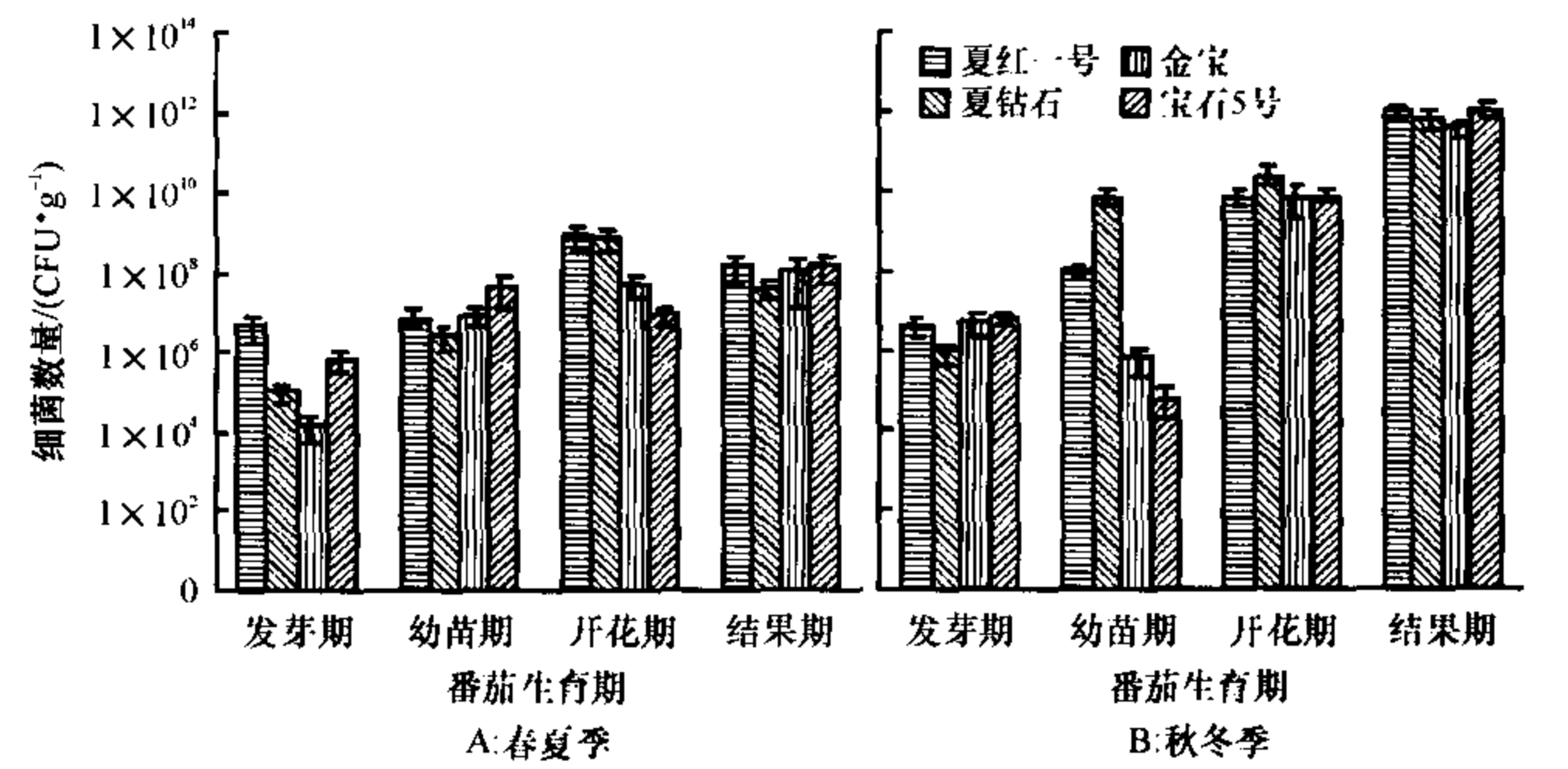


图6 春夏季和秋冬季番茄土壤硫化细菌数量变化
Fig.6 Changes of sulfate-reduction bacteria in tomato soil in the spring-summer and autumn-winter

2.7 不同季节番茄土壤反硫化细菌数量变化

春夏季节,抗病品种反硫化细菌数量各生育期表现出逐渐上升的趋势,而感病品种在开花期表现出数量降低,结果期又回升的趋势(图7A).秋冬季节,幼苗期,感病品种反硫化细菌的数量显著高于抗病品种,至开花期,抗病品种反硫化细菌的数量逐渐上升,感病品种则逐渐下降,结果期,抗、感品种都逐渐上升(图7B).表明番茄青枯病抗性与其土壤反硫化细菌的数量没有明显规律性,但季节的差异明显,其中夏季平均数量高于冬季.

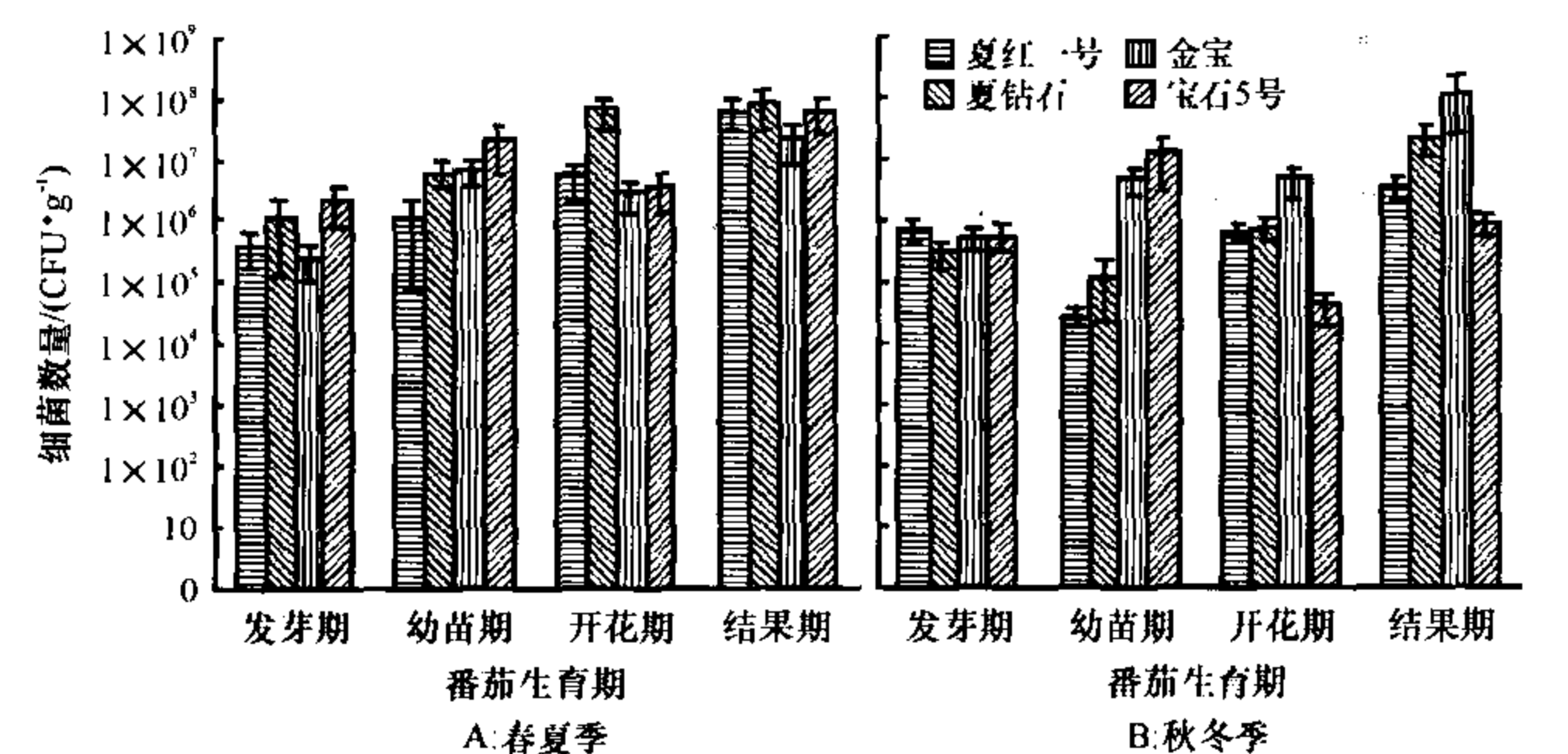


图7 春夏季和秋冬季番茄土壤反硫化细菌数量变化
Fig.7 Changes of anti-vulcanization bacteria in tomato soil in the spring-summer and autumn-winter

3 讨论

目前在农业生产上,对大豆的轮作/连作土壤,以及转基因抗虫棉土壤等的细菌生理群有报道^[12-13],但对番茄作物的土壤细菌生理群鲜见报道.本研究结果表明,番茄根际土壤细菌生理群数量的变化随品种抗性差异、生育期不同和季节的变化而变化,其中根际土壤氨化细菌、硝化细菌、好气纤维素分解细菌、固氮细菌和反硫化细菌等平均数量均表现为夏季高于冬季,而厌氧纤维素分解细菌和硫化细菌的数量则表现为冬季高于夏季.

植物根际微生物的数量、活性和群落结构与植物病害的发生密切相关.本研究中番茄青枯病菌主要从根部侵染,根际微生物的活动影响病菌的侵染,从而影响番茄的抗病表型.青枯病抗性不同的品种,由于基因型和生育期的不同,随着不同季节温度和其他气候条件的变化,其根际土壤微生物种群数量和结构也随着变化.由此说明,影响植物根际微生物种群和数量变化的因素复杂.

关于不同番茄品种对青枯病的发生及抗性机制有一些研究报道.朱红惠等^[14]研究发现,青枯病抗性不同的番茄品种根际拮抗菌存在差异,从抗病品种根际土壤中获得拮抗菌较多.刘琼光等^[15]研究番茄与青枯细菌的相互作用结果表明,番茄接种青枯细菌第4 d 抗病品种根际土壤细菌、真菌和放线菌的数量均高于感病品种.本研究结果表明,番茄抗病品种根际氨化细菌的数量高于感病品种,尤其在春夏季番茄中抗感青枯病品种差别更明显.

植物根际存在有大量的有益细菌,它们能够促进植物对矿质营养的吸收和利用,或者产生促进植物生长的代谢物,甚至抑制有害微生物,从而起到促进生长,防治病害的作用^[16],其中氨化细菌是最重要的一类.氨化细菌具有分解有机含氮化合物释放出氨的能力,即氨化作用.细菌中氨化作用较强的有假单胞菌属 *Pseudomonas*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、梭菌属 *Clostridium*、沙雷氏菌属 *Serratia* 及微球菌属 *Micrococcus* 中的一些种.在这些氨化细菌中,有不少假单胞菌属和芽孢杆菌属的生防菌对植物病害具有防病作用,且研究较多^[17-20].沙氏菌属 *Serratia* 对一些植物病害也具较好的生防作用^[21-22].本研究结果表明,夏季番茄抗病品种根际氨化细菌的数量明显高于感病品种,生产上番茄青枯病通常夏季发生严重,而抗病品种青枯病发生较轻,可能与抗病品种根际存在有较大数量、且具生防作用的氨化细菌有关,这有待于研究证实.本研究发现在番茄抗病品种中存在较

多数量的氨化细菌,这些细菌可能具有开发为青枯病生防菌的潜能.

青枯病不同抗性番茄品种根际土壤7大类细菌生理群在番茄不同生育期和不同季节之间数量变化的研究结果对于弄清番茄对青枯病的抗性机制和青枯病的微生物及生态防治具有参考价值.

参考文献:

- [1] HAYWARD A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanaceanua* [J]. *Ann Rev Phytopathol*, 1991, 29: 65-87.
- [2] SALANOUBAT M, GENIN S, ARTIGUENAVE F, et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* [J]. *Nature*, 2002, 415: 497-502.
- [3] 刘琼光, 曾宪明. 茄科蔬菜青枯病的综合防治技术 [J]. *中国蔬菜*, 1999, 6: 51-52.
- [4] GREY B E, STECK T R. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long term survival and plant infection [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (9): 3866-3872.
- [5] SOAD A A, XIE Guan-lin, LI Bin, et al. Comparative performance of *Bacillus* spp. in growth promotion and suppression of tomato wilt caused by *Ralstonia solanacearum* [J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2004, 30(6): 603-610.
- [6] 徐玲, 王伟, 魏鸿刚, 等. 多粘类芽孢杆菌 HY9622 对番茄青枯病的防治作用 [J]. *中国生物防治*, 2006, 22 (3): 216-220.
- [7] 肖焯, 易图永. 番茄青枯病生物防治研究进展 [J]. *中国生物防治*, 2006, 22(增刊): 174-178.
- [8] YOSHITAKA S, NISHIYAMA M, ONIZUKA T, et al. Comparison of bacterial community structures in the rhizoplane of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9): 996-001.
- [9] 蔡燕飞, 廖宗文, 董春, 等. 番茄青枯病的土壤微生态防治研究 [J]. *农业环境保护*, 2002, 21(5): 417-420.
- [10] 王国惠, 于鲁冀. 细菌生理群的研究及其生态学意义 [J]. *生态学报*, 1999, 19(1): 128-133.
- [11] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [12] 刘新晶, 许艳丽, 李春杰, 等. 大豆轮作系统对土壤细菌生理菌群的影响. [J] *大豆科学*, 2007, 26(5): 721-727.
- [13] 沈法富, 韩秀兰, 范术丽. 转 Bt 基因抗虫棉根际微生物区系和细菌生理群多样性的变化 [J]. *生态学报*, 2004, 24(3): 432-437.
- [14] 朱红惠, 姚青, 李浩华. 青枯病抗性不同的番茄品种根际拮抗菌拮抗能力差异研究 [J]. *微生物学杂志*, 2003, 23(4): 4-7.

3 结论

全长 cDNA 抑制缩减杂交技术是在 SSH 技术和 SMART cDNA 合成方法的基础上进行改良的方法。与 SSH 相比具有以下优点:仅需要较少的试验材料,通过 RT-PCR 方法获得足够的 cDNA(用单一引物 P_{sf} 扩增,避免 RT-PCR 时的偏态扩增),不需要纯化 mRNA 就可以进行缩减杂交;不选用 4 碱基限制性内切酶,得到的差异表达克隆也较长,甚至全长 cDNA。

在本研究获得的缩减杂交文库中,插入子的长度在 1~4 kb 范围内,主要集中在 1.5 kb 附近,说明该方法可以获得较长的差异 cDNA 克隆。但本研究获得的差异克隆 3G8 和 2G3 测序结果表明其长度分别为 1.6 和 2.7 kb,通过 NCBI 网站 Blast 分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)和 RGP 网站基因(<http://rgp.dna.affrc.go.jp/Analysis.html>)预测长度分别为 2.3 和 3.1 kb,说明可以得到较长片段的 cDNA 克隆。该方法对于快速获得目的基因全长片段有较好的效果,尤其以没有进行全基因组测序的物种作为试验材料时,可以减少 5'-RACE 或 3'-RACE^[5] 的试验过程。但研究结果未获得完整的 cDNA,这与 SMART cDNA 合成方法的特性有关,因为反转录酶在合成过程中,不能区分 mRNA 末端是断裂片段的末端,还是全长 mRNA 的末端,所以非全长的 cD-

NA 片段也会出现在缩减杂交文库内。为了减少非全长 cDNA 克隆,需要在实验材料和 cDNA 合成 2 个步骤严格控制,尽可能得到全长 cDNA 再进行缩减杂交。

参考文献:

- [1] WATANABE T, SEKIZAWA Y, SHIMURA M, et al. Effects of probenazole (Oryzemat) on rice plants with reference to controlling rice blast [J]. *J Pesticide Sci*, 1979, 4:53-59.
- [2] SHIMURA M, IWATA M, TASHIRO N, et al. Anti-conidial germination factors induced in the presence of probenazole and properties of four active substances [J]. *Agric Biol Chem*, 1981, 45:1431-1435.
- [3] DIATCHEBKO L, LAU Y, CAMPBELL A, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(12):6025-6030.
- [4] HARTUNG F, PUCHTA H. Molecular characterization of two paralogous SPO11 homologues in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(7):1548-1554.
- [5] FROHMAN M A, DUSH M K, MARTIN G R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1988, 85:8998-9002.

【责任编辑 李晓卉】

(上接第 33 页)

- [15] 刘琼光,杨艳. 番茄品种抗性与青枯菌和土壤微生物关系的研究 [J]. *仲恺农业技术学院学报*, 2006, 19(3): 31-34.
- [16] COOK R J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens [J]. *Ann Rev Phytopathol* 1993, 31:53-80.
- [17] KLOEPPER J W, RYU C M, ZHANG S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. [J]. *Phytopathology*, 2004, 94(11):1259-1266.
- [18] HAAS D, DEFAGO G. Biological control of soil-borne pathogens by *Fluorescent pseudomonas* [J]. *Nature Rev Microbiol*, 2005, 3:1-13.
- [19] CHANG W T, CHEN Y C, JAO C L. Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes [J]. *Bioresource Technology*,

2007, 98(6):1224-1230.

- [20] OUOBA L I, DIAWARA B, JESPERSEN L, et al. Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* during the fermentation of African locust bean for Soumbala production [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102(4):963-970.
- [21] KAMENSKY M, OVADIS M, CHET I, et al. Chernin soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* disease [J]. *Soil Biol Biochem*, 2003, 35:323-331.
- [22] 马迎新,刘晓光,高克祥,等. 根际细菌 *Serratia plymuthica* HRO-C48 的生防作用初探 [J]. *云南农业大学学报*, 2007, 22(1):49-53.

【责任编辑 周志红】