

不同青枯病抗性的番茄品种内生细菌 生理群数量研究

冯 杭 段栌钦 杨利平 周岗泉 刘琼光*

(华南农业大学 资源环境学院 广州 510642)

摘 要: 本论文对青枯病抗性不同的番茄品种其内生细菌生理群数量变化进行了研究, 结果表明, 番茄内生细菌生理群数量的变化随品种抗性、生育期和季节的不同而变化。在 7 大类生理群细菌中, 氨化细菌的数量最多, 且在幼苗期以后, 高抗青枯病番茄品种中数量明显高于高感品种, 初步认为, 氨化细菌可能是影响青枯病发生的关键性微生物。番茄抗病品种在不同生育期, 其内生细菌的总体数量要比感病品种多, 呈交替波动变化。氨化细菌、硝化细菌、固氮细菌和反硫化细菌平均数量均表现为在夏季高于冬季, 硫化细菌的数量则冬季高于夏季, 厌气性细菌数量最少。

关键词: 番茄, 青枯病, 抗性, 细菌生理群

Study on Population of Bacterial Physiological Groups in Tomato with Different Resistance to *Ralstonia solanacearum*

FENG Hang DUAN Lu-Qin YANG Li-Ping ZHOU Gang-Quan LIU Qiong-Guang*

(College of Natural Resource & Environment, South China Agricultural Univeristy, Guangzhou 510642)

Abstract: The population of bacterial physiological groups in tomato with different resistant to *Ralstonia solanacearum* was studied. The results suggested that endophytic bacterial communities and population in tomato variety changed with different resistant cultivars, different stages of tomato and seasons. It was conducted that the amount of ammoniation bacteria was the highest among the seven physiological bacterial groups. There were more ammoniation bacteria in high resistant tomato cultivars than that in high susceptible cultivars. It may indicate that ammoniation bacteria played a key role in the occurrence of tomato bacterial wilt. In addition, the total amount of physiological bacteria in resistant cultivars was more than that in susceptible cultivars in different stages of tomato, and the tendency of changing displayed fluctuation. The average level of quantities of the ammoniation bacteria, nitrifiers bacteria, erobic nitrogenfixing bacteria and desulphate reducer bacteria in summer were higher than that in winter, while the population of the sulphate reduced bacteria in winter was higher than that in summer. Furthermore, the amount of anaerobic bacteria was the least among them.

Keywords: Tomato, *Ralstonia solanacearum*, Resistance, Bacterial physiological group

* 通讯作者: ✉ qgliu@scau.edu.cn

收稿日期: 2008-01-08; 接受日期: 2008-03-17

由茄科劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的作物青枯病是一种世界性的重要细菌病害^[1],可侵染 50 多个科的 300 多种植物,并造成巨大的产量损失^[2]。由于该病菌能够在土壤中无寄主情况下存活很长时间^[3],给病害的轮作防治带来困难,目前尚无有效的防治药剂^[4]。利用抗病品种是防治番茄青枯病的理想方法,但在实践中,抗病品种的选育周期长,且往往由于品种抗病性状的丧失而导致病害的流行;此外,青枯菌菌系组成的变异,也使抗病品种的利用受到限制。利用有益微生物控制青枯病的发生目前受到世界广泛关注,且有一些文献报道^[5-8],但大部分的研究是从土壤中筛选拮抗细菌,由于生防微生物容易受到土壤环境变化的影响,往往防治效果不稳定。

细菌生理群是指相同或不同形态执行着同一种功能的一类细菌,各生理类群一方面表现需要特定的生长条件,另一方面表现在物质转化中具有特定的功能。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^[9],但在植物体的细菌生理群研究极少。内生细菌大量存在于健康和患病的植物组织中,与植物在进化过程中建立了一种和谐联合的关系,相互共存,相互制约,具有重要的生态作用,在农业和医学中也有很大的应用潜力^[10-12]。由于内生细菌存在于植物的细胞间隙或细胞内,受环境的影响较小,相对于其他生物防治因子而言,具有较大的优势^[10]。在国际上,内生细菌被认为是植物病害、尤其是化学防治较困难的病害生物防治的天然资源菌,并有一些内生细菌防治番茄青枯病的报道^[13-16]。与此同时,植物的抗病性与其内生细菌多样性研究也越来越引起人们的广泛兴趣^[17-20],但迄今,有关番茄内生细菌生理群的数量变化与青枯病抗性、生育期和季节之间的关系等研究未见报道。本文对此进行了探索,以期对番茄抗青枯病的机理研究奠定基础,也为番茄抗病育种和青枯病的微生物防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 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),由华南农业大学园艺开发总公司提供。

1.2 番茄种植

供试番茄均播于盆钵中,盆土采自山东淄博、济南,广东韶关、梅州、清远等地多种植物的根际土,土壤混匀后,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。播种番茄后的盆钵置于实验地开放的自然环境中,常规管理,定期取样分离内生细菌。

1.3 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。

1.4 取样

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(第一穗花开)和果实期(第一穗果变白)4 个时期取番茄根和茎组织,同一品种每个生育期各取 3 盆,每盆 3 株共 9 株,3 次重复。

1.5 番茄内生细菌生理群的分离和计数

称取 10 g 番茄根茎组织,表面消毒(70%酒精消毒 30 s,1%次氯酸钠消毒 15 min,无菌水洗 3 次),剪碎后研磨,加到 90 mL 无菌水中,按 10 倍稀释法制成 10^{-1} ~ 10^{-10} 的样品稀释液。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^[21]。对照“最大或然数统计表”确定菌数近似值。按计算式:活菌数/鲜重=(菌数近似值×数量指标第一位数的稀释度)×10,计算每克植株鲜重所含的活菌数。

2 结果与分析

2.1 不同季节番茄内生氨化细菌数量变化

在春夏季节中,从幼苗至结果期,抗病品种氨化细菌的数量均高于感病品种,尤其在开花期,抗、感品种之间差异较大(图 1-A)。秋冬季节中,抗性品种中氨化细菌的数量在 4 个生育期均高于感病品种,开花期数量达最大(图 1-B)。结果显示,番茄内生氨化细菌平均水平在春夏季节明显高于秋冬季节。

2.2 不同季节番茄内生反硝化细菌数量变化

在春夏季节中,番茄的各生育期均表现为抗病品种中反硝化细菌的数量高于感病品种,尤其是高抗品种与高感品种之间差异显著(图 2-A)。但在秋冬季节中,感病品种反硝化细菌数量却高于抗病品种,

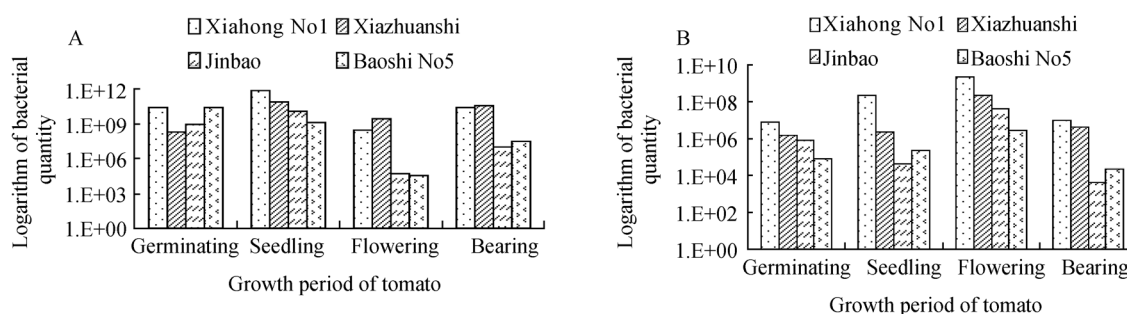


图 1 春夏季(A)和秋冬季(B)番茄内生氨化细菌数量变化

Fig. 1 Changes of ammoniation bacteria in tomato in the spring-summer (A) and autumn-winter (B) season

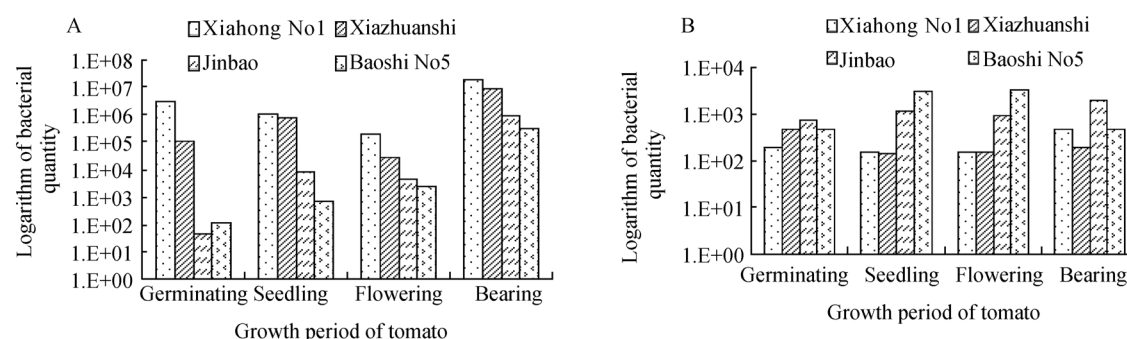


图 2 春夏季(A)和秋冬季(B)番茄内生反硝化细菌数量变化

Fig. 2 Changes of denitrifying bacteria in tomato in the spring-summer(A)and autumn-winter(B) season

其中, 幼苗期和开花期抗、感品种之间差异较大(图 2-B)。结果显示, 番茄内生反硝化细菌平均水平在春夏季节明显高于秋冬季节。

2.3 不同季节番茄好气性自生固氮菌数量变化

在春夏季节中, 番茄的 4 个生育期均表现为抗病品种好气性自生固氮菌的数量高于感病品种, 且在发芽期和幼苗期差异明显(图 3-A)。在秋冬季节, 中抗品种中好气性自生固氮菌的数量在开花期最大, 幼果期高感品种宝石 5 号未分离到该类细菌, 其他

品种之间差异不大(图 3-B)。结果显示, 番茄内生好气性自生固氮菌平均水平明在春夏季节中明显高于秋冬季节。

2.4 不同季节番茄内生好气性纤维素分解菌数量变化

在春夏季节中, 番茄的发芽期和幼苗期, 好气性纤维素分解菌在抗病品种中数量高于感病品种, 且在发芽期感病品种未能分离到该类细菌, 但在结果期感病品种数量增加, 特别是高感品种增加明显

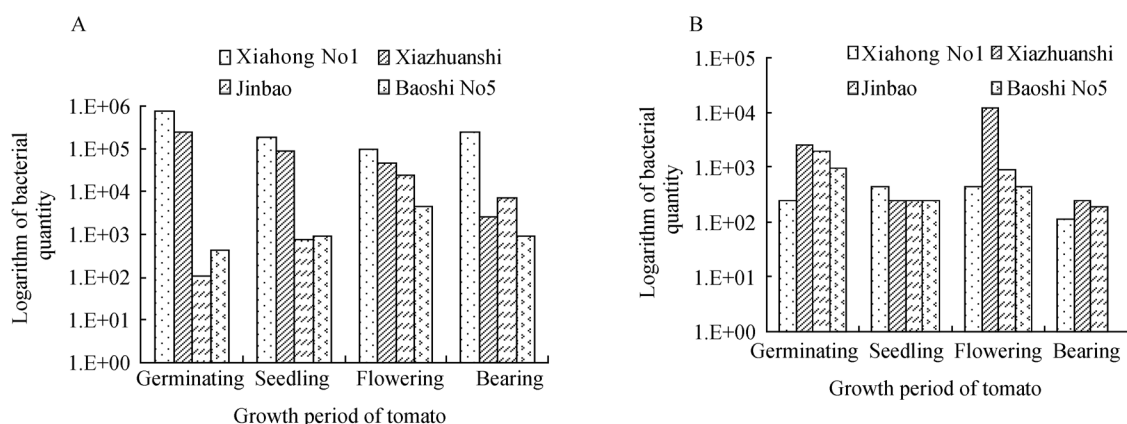
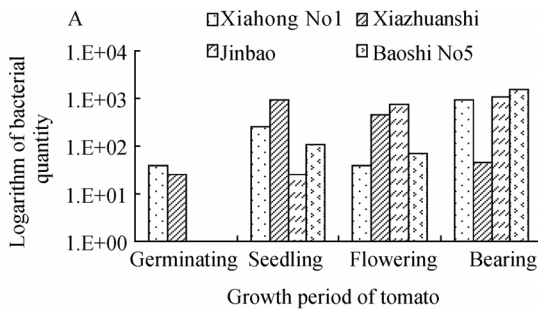


图 3 春夏季(A)和秋冬季(B)番茄内生好气性自生固氮菌数量变化

Fig.3 Changes of aerobic nitrogen-fixing bacteria in tomato in the spring-summer(A)and autumn-winter(B) season

(图 4-A)。原因可能是在番茄青枯病发病高峰的生长中后期, 纤维素质含量增加。在秋冬季节中, 只有夏钻石品种在发芽期能检测到, 夏钻石和金宝品种只在幼苗期能检测到。在开花期和结果期, 抗病品种中好气性纤维素分解菌的数量高于感病品种(图 4-B)。纤维素分解细菌在春夏季和秋冬季节抗感番茄品种数量变化没有明显规律性, 是否由于实验误差, 或者青枯病抗性与此类细菌无关, 还是其他原因导致, 有待于进一步研究。



2.5 不同季节番茄内生好气性纤维素分解菌数量变化

春夏季节番茄, 在发芽期, 厌气性纤维素分解菌只在 2 个抗病品种中分离到, 而在幼苗期, 只在高抗和中感品种中分离到; 开花期至结果期, 在 4 个番茄品种中均未能分离到(图 5-A)。秋冬季节的番茄仅有中感品种在幼苗期、高抗和中感品种在开花期能分离到该类细菌。表明厌气性纤维素分解菌在番茄的不同品种和不同生育期中其含量极低或者没有, 而且在抗感品种之间没有明显相关性(图 5-B)。

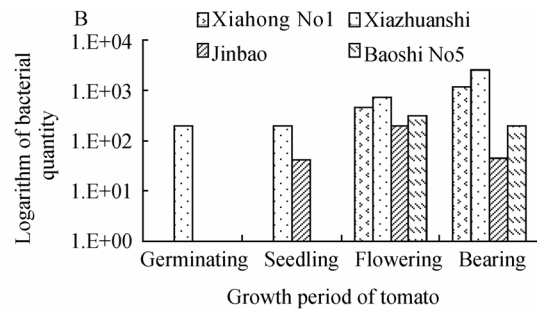


图 4 春夏季(A)和秋冬季(B)番茄内生好气性纤维素分解细菌数量变化

Fig. 4 Changes of aerobic cellulose-decomposing bacteria in tomato in the spring-summer(A)and autumn-winter(B) season

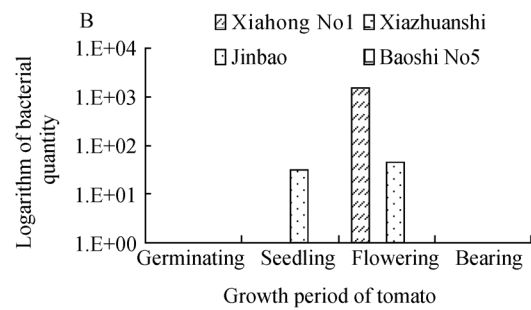
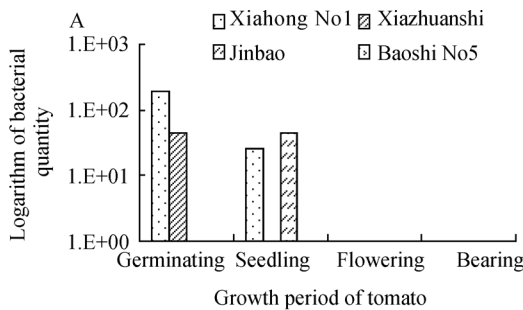


图 5 春夏季(A)和秋冬季(B)番茄内生厌气性纤维素分解细菌数量变化

Fig. 5 Changes of anaerobic cellulose-decomposing bacteria in tomato in the spring-summer(A)and autumn-winter(B) season

2.6 不同季节番茄内生硫化细菌数量变化

春夏季节番茄, 在发芽期, 感病品种硫化细菌数量要高于抗病品种, 在开花期, 只有中抗品种和中感品种能被检测到, 且中抗品种该菌的数量要低于中感品种, 其他 3 个生育期高抗品种硫化细菌数量差异不明显; 感病品种在发芽期数量最高, 开花期数量最低(图 6-A)。秋冬季节的番茄, 在发芽期, 抗病品种硫化细菌的数量明显高于感病品种, 在幼苗期, 高抗品种明显高于其他 3 个品种。冬季番茄整个生育期中, 4 个品种硫化细菌的数量在结果期均

高于其他 3 个生育期(图 6-B)。结果显示, 硫化细菌数量变化与番茄品种抗性及季节之间没有明显相关性。

2.7 不同季节番茄反硫化细菌数量变化

春夏季节的番茄在发芽期和幼苗期, 抗病品种反硫化细菌的数量明显高于感病品种, 其中发芽期高感品种中未能分离检测到该类细菌; 开花期, 抗病品种中数量下降到最低, 结果期又数量回升(图 7-A)。在秋冬季节中, 中抗品种在发芽期和结果期此类细菌数量最高, 其他生育期差异不明显(图 7-B)。

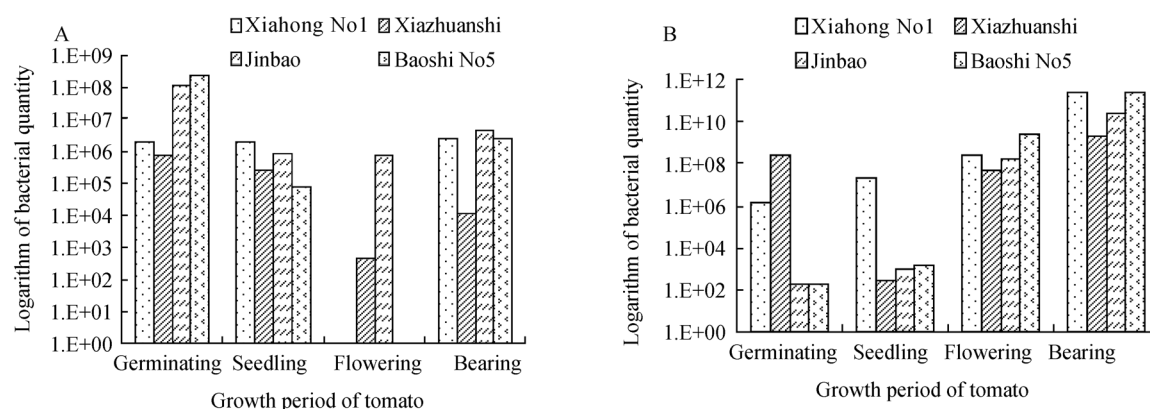


图 6 春夏季(A)和秋冬季(B)番茄内生硫化细菌数量变化

Fig. 6 Changes of sulfate-reduction bacteria in tomato in the spring-summer(A)and autumn-winter(B) season

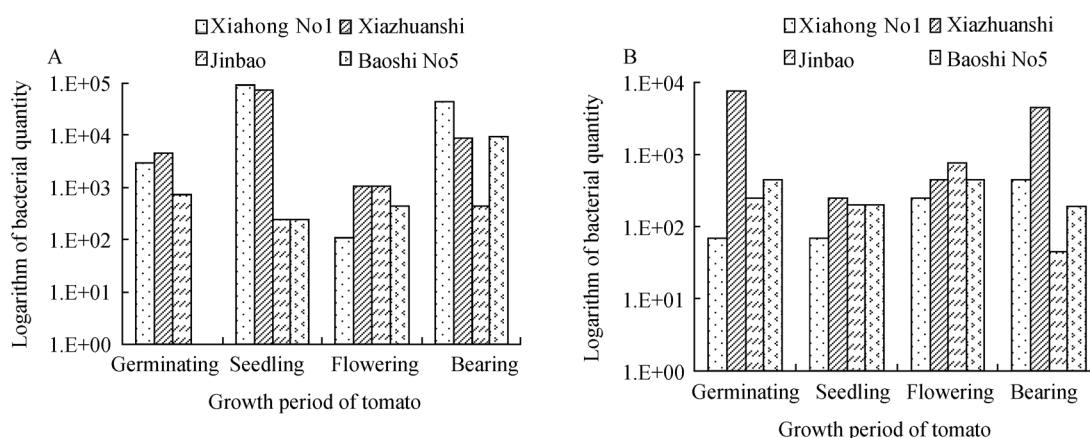


图 7 春夏季(A)和秋冬季(B)番茄内生反硫化细菌数量变化

Fig. 7 Changes of anti-vulcanization bacteria in tomato in the spring-summer(A)and autumn-winter(B) season

3 讨论

3.1 细菌生理群的数量动态变化

细菌生理群数量与相应化合物含量之间存在着一致性,说明其相应化合物是细菌生理群的存在及数量的决定因素,同时还受多种条件的影响^[9]。目前在农业生产上,主要研究集中在土壤中的细菌生理群,包括青枯病发生程度不同的烟草根际土壤^[22],大豆的轮作/连作土壤^[23],以及转基因抗虫棉的土壤等细菌生理群的研究^[24]。关于番茄的内生细菌生理群的数量变化,迄今未见报道。本研究结果表明,番茄内生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,在 7 大类细菌生理群中,氨化细菌的数量在番茄幼苗期以后的各生育期与品种抗性呈正相关,且平均数量最多,特别是生产上青枯病发病高峰的番茄开花和结果期,高

抗品种中氨化细菌数量明显高于高感品种,由此初步认为,番茄内生氨化细菌中可能含有较多的青枯病细菌拮抗性微生物,需进一步研究。

其他 6 类细菌生理群与番茄品种抗性的关系,则表现在不同的生育期和季节的关系上,在抗病品种中,夏季的氨化细菌、硝化细菌、固氮细菌和反硫化细菌平均数量水平高于冬季。生产上番茄青枯病在夏季发生往往比秋季严重,其原因可能由于夏季高温多雨季节有利于病原细菌和非病原细菌的大量繁殖,而在抗病品种中由于有益细菌的数量增加,控制了病原细菌的大量繁殖而表现为抗病。这些结果与匡传富等^[22]报道的不同青枯病发生程度的烟草根际土壤细菌生理群部分结果有相似之处,但本研究的作物对象和细菌生理群的来源与匡传富等^[22]不同。此外,本研究中厌气性的细菌数量最少,这与人分离番茄拮抗内生细菌的结果基本相符^[15]。进一

步分析表明,番茄抗病品种在不同生育期,其内生细菌的种类和数量比感病品种多,呈交替波动变化,随着植株生长发育,内生细菌种群数量也随之变化,这与玉米内生细菌种群变化规律基本一致^[25]。表明内生细菌生理群的变化与植物种类和生育期关系密切。

细菌生理群还受环境条件的影响。本研究中,秋冬季由于气温较夏季低,番茄某些内生细菌种类的变化幅度并不十分明显,且数量偏低。而夏季番茄的内生细菌变化较明显,特别在苗期和成株期,由于此期间温度适宜,雨水充足,植株处于一种快速生长期,合成的营养物质较多,各种内生细菌快速繁殖,数量急剧增加。

综上所述,影响番茄内生细菌生理群数量变化的因素复杂。

3.2 内生细菌多样性与植物抗病性关系

许多研究表明,内生细菌有利于植物的健康和生长,并且具有对病原真菌和细菌的拮抗作用^[26,27],因此,内生细菌在生物防治中具有极大的潜力和前景。关于植物内生细菌种群多样性与植物病害的关系吸引了人们的研究兴趣。王琦等^[28]在研究不同抗性棉花品种内生细菌的种群动态时发现,抗枯萎病品种的内生细菌数量明显高于感病品种。马冠华等^[17]研究表明,烟草不同抗性品种、不同栽培时期和不同组织内生细菌种群存在差异。BottomLy等^[29]通过对健康烟苗和被青枯菌侵染烟苗的内生细菌的多样性分布研究表明,抗性品种和感病品种烟草内生细菌种群存在差异,针对细菌群落的RFLP分析进一步证明品种影响烟草内生细菌种群分布。Araujo等^[19]比较了健康、未显症状和表现CVC (Citrus variegated chlorosis)症状的柑桔内生细菌种群数量,发现*Curtobacterium flaccumfaciens*仅在无症状的柑桔植株中出现较高频率,提出该内生细菌是柑桔抗CVC病害的关键细菌。Sturz等^[18]认为具有生物功能的内生细菌群体决定马铃薯对软腐细菌的抗性,定殖于马铃薯中内生细菌群体结构与病原细菌的存在与否明显相关^[30]。

本研究对番茄内生细菌生理群的数量变化进行了探索,结果表明,不同青枯病抗性的番茄,其内生细菌存在种群和数量的差异,特别是在抗病番茄品种中氨化细菌的数量在幼苗期以后的各生育期和

不同季节之间均高于感病品种。由此我们认为,内生细菌多样性与植物的抗病性存在密切关系,通过研究不同抗性品种的内生细菌的种群差异,为进一步研究如何减少植株病害的发生奠定了基础,将成为今后研究的热点。

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。在这些细菌中有不少的氨化细菌对植物病害具有防病作用,其中研究较多的芽孢杆菌属的一些种(*Bacillus* spp.)能产生抗生素,具有对番茄青枯病或其他植物病害的防治作用^[6,14,15,31,32]。本研究在番茄抗病品种中存在较多数量的氨化细菌,具有开发青枯病生物防治的潜能。

青枯病发生也与土壤微生物关系密切,不同青枯病抗性的番茄内生细菌生理群的变化规律是否与它们根际土壤中细菌生理群变化规律相似,以及青枯病的发生是否由内生细菌和根际细菌综合作用的结果,究竟哪种(或多种)细菌对青枯病发生起关键性调节作用,需要进一步研究。

本研究结果将为进一步认识番茄抗青枯病的机理、抗病育种和青枯病微生态防治提供参考。

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] Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, *et al*. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*, 2002, **415**: 497-502.
- [3] Grey BE, Steck TR. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long term survival and plant infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67** (9): 3866-3872.
- [4] 刘琼光, 曾宪铭. 茄科蔬菜青枯病的综合防治技术. *中国蔬菜*, 1999, **6**: 51-52.
- [5] Soad AA, Xie GL, Li B, *et al*. Comparative performance of *Bacillus* spp. in growth promotion and suppression of tomato wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Zhejiang University (Agric & Life Sci)*, 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. *中国生物防治*, 2006, **22**(3):

- 216–220.
- [7] 肖 烨, 易图永. 番茄青枯病生物防治研究进展. 中国生物防治, 2006, 22(增刊): 174–178.
- [8] 李伟杰, 姜瑞波. 番茄青枯病拮抗菌的筛选. 微生物学杂志, 2007, 27(1): 5–8.
- [9] 王国惠, 于鲁冀. 细菌生理群的研究及其生态学意义. 生态学报, 1999, 19(1): 128–133.
- [10] 韩继刚, 宋 未. 植物内生细菌研究进展及其应用潜力. 自然科学进展, 2004, 14(4): 374–379.
- [11] Sessitsch A, Reiter B, Berg G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50(4): 239–249.
- [12] Kavino M, Harish S, Kumar N, *et al.* Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39(5): 1087–1098.
- [13] 龙良鲲, 肖崇刚, 窦彦霞. 防治番茄青枯病内生细菌的分离与筛选. 中国蔬菜, 2003, 2: 19–21.
- [14] 黎起秦, 罗 宽, 林 纬, 等. 番茄青枯病内生拮抗菌的筛选. 植物病理学报, 2003, 33(4): 364–367.
- [15] 胡青平, 徐建国, 刘会龙, 等. 番茄茎内生细菌的分离鉴定及青枯病拮抗菌的筛选. 西北植物学报, 2006, 26(10): 2039–2043.
- [16] 赵 凯, 肖崇刚, 孔德英. 内生细菌对番茄青枯病的抗病作用及其抗菌谱. 西南农业大学学报(自然科学版), 2006, 28(2): 314–318.
- [17] 马冠华, 肖崇刚. 烟草内生细菌种群动态研究. 微生物学杂志, 2004, 24(4): 7–11.
- [18] Sturz AV, Christie BR, Matheson BC, *et al.* Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathol*, 1999, 48: 360–369.
- [19] Araujo WL, Marcon J, Maccheroni J, *et al.* Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied & Environmental Microbiology*, 2002, 68(10): 4906–4914.
- [20] Birgit R, Ulrike P, Helmut S, *et al.* Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(5): 2261–2268.
- [21] 赵 斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2004, pp.72–75.
- [22] 匡传富, 何志明, 汤若云, 等. 烟草青枯病土壤微生物数量及生理群的测定. 中国烟草科学, 2003, 1: 43–45.
- [23] 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. 大豆科学, 2007, 26(5): 721–727.
- [24] 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. 生态学报, 2004, 24(3): 432–437.
- [25] 高增贵, 庄敬华, 陈 捷, 等. 玉米根系内生细菌种群及动态分析. 应用生态学报, 2004, 15(8): 1344–1348.
- [26] Sturz AV, Christie BR, Nowak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable system of crop production. *Crit Rev Plant Sci*, 2000, 19: 1–30.
- [27] Lodewyckx C, Vangronsfeld J, Porteous R, *et al.* Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit Rev Plant Sci*, 2002, 21: 583–606.
- [28] 王 琦, 鲁素芸, 梅汝鸿. 棉花维管组织内生细菌分析之一——不同抗性品种含菌动态与土质和生育期的关系. 中国微生物学杂志, 1997, 9(1): 48–50.
- [29] Bottomly TS, Fortnum BA, Kurtz H, *et al.* Diversity of endophytic bacteria in healthy and *Ralstonia solanacearum* infected tobacco seedlings. *Agro Phyto Groups*, abstr, 2004, p.8.
- [30] Reiter B, Pfeifer U, Schwab H, *et al.* Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 2261–2268.
- [31] Chang WT, Chen YC, Jao CL. Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioresource Technology*, 2007, 98(6): 1224–1230.
- [32] Ouoba LI, Diawara B, Jespersen L, *et al.* Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* during the fermentation of African locust bean for Soumbala production. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102(4): 963–970.