

不同处理方法对内生细菌 TS-3 在 2 种蔬菜体内定殖的影响

马同锁¹, 袁红楼², 赵士豪¹, 王浩¹ (1. 河北经贸大学, 河北石家庄 050061; 2. 华北制药集团维尔康有限公司, 河北石家庄 050000)

摘要 [目的]了解蔬菜源内生细菌 TS-3 菌株的生物学效应。[方法]采用涂抹叶片、菌悬液浸种和浇灌 3 种方法, 将利福平(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 标记的内生细菌 TS-3 接种到生菜和甜椒 2 种蔬菜中, 其后测定定殖情况。[结果]采用 4×10^5 cfu/ml 的菌悬液对生菜进行涂抹叶片接种, 3 d 后叶片中菌株数量达到高峰, 根中第 7 天达高峰; 在接种甜椒叶片后的第 7 天, 茎和叶中的含菌量均达到最高峰, 并稳定在 10^4 cfu/ml, 而根系中含菌量无明显变化。采用浇灌接种生菜, TS-3 菌株在 3 d 后达高峰, 在甜椒茎、叶中第 9 天达高峰, 而后该菌的定殖数量稳定在 10^4 cfu/ml。采用菌悬液浸种, TS-3 菌株在生菜叶中的定殖量在 1.1×10^4 cfu/ml, 根中的定殖量在 1.5×10^4 cfu/ml, 而在甜椒中, 其定殖量是根 > 茎 > 叶, 但定殖量都在 10^3 cfu/ml 数量级。[结论]鉴于 TS-3 菌株在 2 种蔬菜中都能定殖, 且不同的接种方法对其定殖量无数量级上的影响, 所以采用较简单的浇灌接种方法较好。

关键词 内生细菌; 标记; 蔬菜; 定殖

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)27-11013-03

in vivo Colonization Effect of Different Treatment Methods on The Endophytic Bacteria TS-3 in Two Kinds of Vegetables

MA Tong-suo et al (Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang, Hebei 050061)

Abstract [Objective] The aim was to understand biological effect of endophytic bacteria TS-3. [Method] In order to test the colonization, the labeled endophytic bacteria TS-3 of Rifampicin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was inoculated into lettuce and pepper with different treatment methods of smearing inoculation method, watering inoculated method and soaking bacterial suspension method. [Result] After the 4×10^5 cfu/ml of bacteria suspension was inoculated on the lettuce leaf by using smearing inoculation method, the number of strains which were isolated from the leaf reached the peak after three days, but the number of strains form roots reached peak after seven days. While using the same method to inoculate bacteria in pepper, the numbers of strains form roots and leaf reached the peak simultaneously after seven days. After the strain TS-3 was inoculated by using watering inoculated method, the strain TS-3 of lettuce reached the peak at the fifth day, while the peak came at the ninth day in the stem and leaf of sweet pepper. With soaking bacterial suspension method, the colonization of strain TS-3 in lettuce leaf were 1.1×10^4 cfu/ml and 1.5×10^4 cfu/ml in roots, but the colonization in pepper was root > stem > leaf. [Conclusion] There was less effect between the three treatment methods, so when the TS-3 is inoculated in lettuce or pepper, using the watering inoculated method is the most economical and practical.

Key words Endophytic; Mark; Vegetable; Colonization

我国是一个农业大国, 长期以来, 农业的增产增收靠得是使用大量的农药和化肥, 但由此而造成的病虫抗药性、农产品污染等农业环境问题日益恶化, 急待改善。研究表明, 微生物制剂, 特别是植物内生菌制剂具有一定的增肥、防病作用, 且无毒无害无污染, 具有很好的环境亲和性, 其生产成本低、工艺技术简单, 所以是农业可持续发展的重要途径^[1]。

内生细菌 TS-3 是河北经贸大学微生物实验室从蔬菜源分离到的一株腊样芽孢杆菌, 初步研究发现其对部分蔬菜病害有一定的生防和促生作用, 为系统了解该菌株的生物学效应, 笔者研究了不同的浸种及接种方法对其在生菜和甜椒中定殖的影响, 以期开发该菌株的植物微生态制剂提供理论依据。

1 材料与方

1.1 材料 抗利福霉素 TS-3 突变株^[2] (采用梯度平板法筛选到的能抗 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 利福霉素的稳定突变株) 由河北经贸大学微生物学实验室保存; 冀研 12 号甜椒种子、奶油生菜种子均购于河北省石家庄市农业科学院; 利福霉素; LB 培养基等。

1.2 方法

1.2.1 抗利福霉素 TS-3 突变株的接种方法^[3]。

1.2.1.1 浸种接种。将 TS-3 抗性菌株接种于 LB 液体培养基中, 振荡培养 (28 $^{\circ}\text{C}$, 170 r/min) 24 h, 然后用含菌量为 8×10^5 cfu/ml 的菌悬液浸泡供试蔬菜种子 24 h, 播种于室内装有无菌土的花盆中, 常规育苗, 待子叶完全展开后, 每隔一定时间取样分离。以不接种为空白对照。

1.2.1.2 浇灌接种。用无菌水浸泡供试蔬菜种子 24 h, 播种于无菌土的花盆, 常规方法育苗, 当长出真叶后, 用 8×10^5 cfu/ml 的菌悬液浇灌蔬菜, 接种 3、6 d 后取样分离。以不接种为空白对照。

1.2.1.3 涂抹叶片接种。按常规方法育苗, 待真叶展开后, 用无菌棉签蘸取菌悬液涂抹真叶片, 于接种后 3、6 d 后取样分离。以不接种为空白对照。

1.2.2 内生细菌 TS-3 在生菜和甜椒体内的定殖回收方法^[4]。分别取 2 种供试蔬菜的根、茎、叶各 1 g, 用无菌水清洗 3 次, 然后先用 70% 乙醇消毒, 再用 0.1% HgCl_2 浸泡 1 min, 无菌水清洗 3 次并晾干。将经表面消毒的供试材料加入 9 ml 无菌水, 并在无菌操作条件下充分研磨。取研磨液 100 μl 加入冷却至 45 $^{\circ}\text{C}$ 含 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 利福霉素的固体 LB 培养基中, 充分摇匀, 冷却后 25 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 48 h, 每样品 3 次重复, 求其菌落平均数。按平板菌落计数法计数, 计算定殖数量: 每克样品含菌量 = 3 个平皿的菌落总数 / $3 \times 10 \times 10$ 。

2 结果与分析

2.1 涂抹叶片接种方式对 TS-3 菌株定殖的影响 由于生菜的特殊性, 只从其根和叶中进行了分离。由图 1 可知, 接

基金项目 河北省科技支撑计划项目 (12222907); 河北省高等学校科学研究重点项目 (ZD20131042)。

作者简介 马同锁 (1968 -), 男, 河北行唐人, 副教授, 硕士, 从事微生物基础及应用研究, E-mail: mts-2000@163.com。

收稿日期 2013-07-11

种后 3 d,叶中分离到的 TS-3 菌株数量几乎达到最高峰,而从根中分离到的菌株数量到第 7 天才达高峰,两者存在时间差,这是由于生菜还未长出茎,TS-3 菌株只能通过根部才能向其他叶片扩散。该菌株在根和叶中分别达到最高峰后,菌株的数量开始下降,基本都维持在 $10^4 \sim 10^5$ 数量级,说明该菌株能在生菜中稳定存在,这为发挥其生物学作用奠定了基础。

由图 2 可知,在接种甜椒叶片后的第 7 天,茎和叶中的含菌量达到最高,之后开始下降,并稳定在 10^4 数量级,而在根中的含菌量一直较稳定,且比茎、叶中稍低。这说明 TS-3 菌株是通过接种的叶片向其他部位扩散。

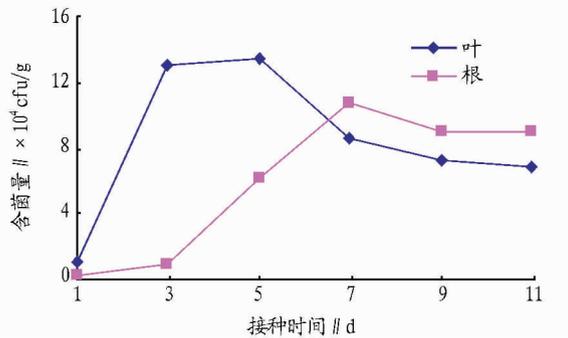


图 1 TS-3 涂抹叶片接种生菜的分离结果

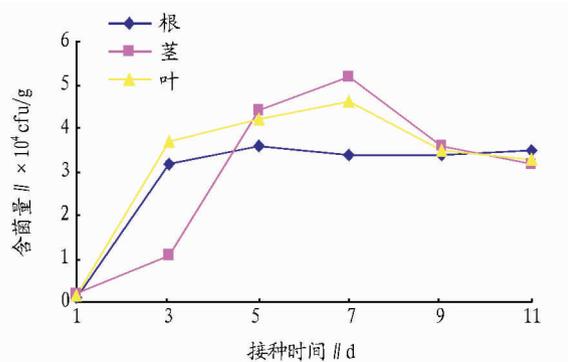


图 2 TS-3 涂抹叶片接种甜椒的分离结果

2.2 浇灌接种方式对 TS-3 菌株定殖的影响 从图 3 可知,浇灌接种生菜,TS-3 菌株首先在根部聚集,并且菌株含量相当稳定,随后向植株上部传导,前 3 d 内从叶中分离的菌株还很少,第 3~5 天菌株数量快速增加,5 d 后基本达到高峰,并处于较稳定的状态。浇灌接种甜椒,TS-3 菌株的分离结果与生菜中类似(图 4),由于根部的持续吸收和菌株的不断侵染,其组织中的菌株分离量保持在 $4.4 \times 10^5 \sim 6.8 \times 10^5$,在茎和叶中前 5 d 分离到的数量较少,而在第 5 天后菌株的数量上升较明显,在第 9 天后达到高峰,而后基本处于稳定状态。但茎中分离到的菌株数量始终高于叶中,原因可能是茎起到的主要是运输作用,而菌株在叶中的定殖能力较差。

2.3 菌悬液浸种对 TS-3 菌株定殖的影响 由图 5 和图 6 可知,采用菌悬液浸种,TS-3 菌株在根茎叶中相似度很高,不同之处是:在生菜叶中 TS-3 菌株的定殖较根中要多,而在甜椒中其定殖量是根 > 茎 > 叶。这再次验证了该菌株在不同的植物中定殖能力不同,在同一植物的不同组织中其定殖能

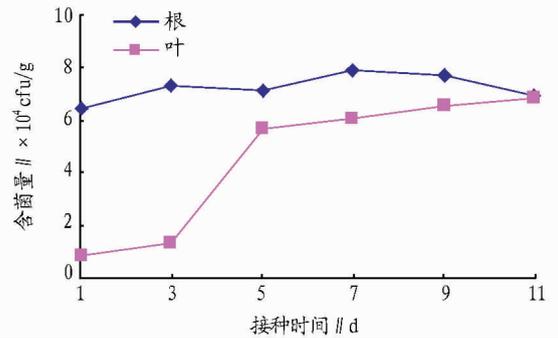


图 3 TS-3 浇灌接种生菜的分离结果

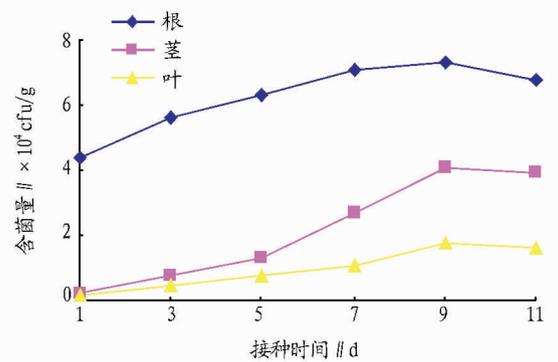


图 4 TS-3 浇灌接种甜椒的分离结果

力也不同,其中较易定殖在生菜的叶片中,在甜椒叶片中的定殖能力则较差。

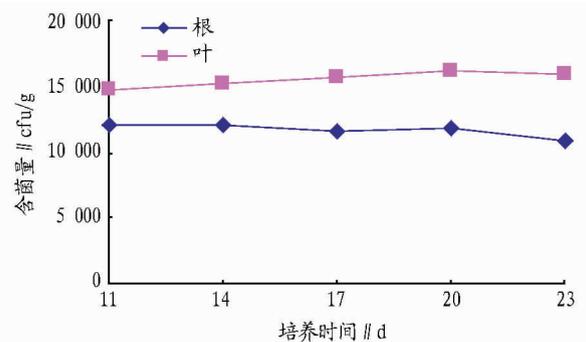


图 5 TS-3 菌悬液浸种生菜的分离结果

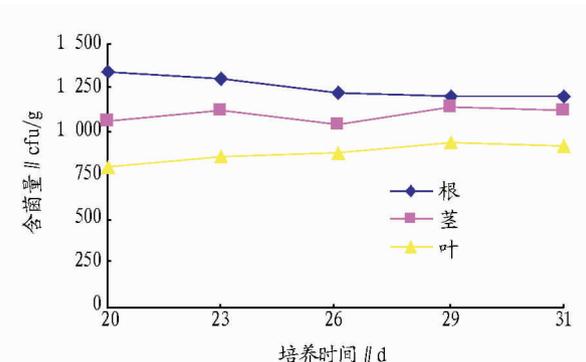


图 6 TS-3 菌悬液浸种甜椒的分离结果

3 结论与讨论

TS-3 菌株是一株蔬菜源内生菌。该研究表明,无论采用浸种、浇灌还是涂抹叶片的接种方式,其都能在生菜和甜椒

中定殖;不同的接种方式,其定殖的高峰期出现的时间都较相近,采用涂抹叶片接种,无论是生菜还是甜椒都出现在第 5~7 天,采用浇灌接种方式,在生菜和甜椒中定殖高峰出现在第 7~9 天,说明采用涂抹接种方式效果更好,在实际生产中采用喷雾接种较方便;而采用浸种的方式,其定殖率无论是在生菜还是在甜椒中变化都不大,只是在生菜中更易维持较高数量。

蔬菜源分离到的内生细菌 TS-3 无论采用何种接种方式,都能在生菜和甜椒中定殖、传导,而且定殖率较高,说明其寄主具有一定的广泛性,但在不同寄主的体内定殖量却有所不同,在生菜中的定殖量高于甜椒,可能存在种属特异性^[5]。

Mahaafee 等报道内生细菌在植物体内的定殖点与接种点的距离较短,一般只有 4 cm^[6],而 Bugbee 等则报道甜菜中的腐烂棒形杆菌(*Clavibacter sepedonicum*)^[7]和杨海莲等^[8]报道水稻中的成团肠杆菌(*Enterbacter agglomerans*)都可在植物的整个生育期存在。该研究结果表明,TS-3 菌株在接种生菜和甜椒的试验过程中,11~23 d 都能分离到目的菌,这与杨海莲等^[8]的报道基本吻合。由此推测:一是不同菌株与其寄主间存在一定的特异性,所以存在能否定殖、定殖时间长短的问题;二是与目的菌的分离方法,尤其是菌株标记有一定关系,如该研究采用了抗生素标记的方法,内生菌在寄主体内不断增殖,逐渐适应寄主体内的生理环境,抗生素的选择

压力减小,抗性不断下降至消失,若再用含抗生素的培养基分离,则分离不到。但究竟是何种原因,还有待深入研究。

参考文献

- [1] 丁秀琦. 增产菌处理马铃薯地增产效应研究[J]. 马铃薯杂志,1996,10(1):143-146.
- [2] 蔡学清,何红,胡方平. 双抗标记法定植枯草芽孢杆菌 BS-2 和 BS-1 在辣椒体内的定殖动态[J]. 福建农林大学学报,2003,32(1):41-45.
- [3] 孟庆果. 内生菌球毛壳 NDB5 在寄主植物中的侵染过程及其定殖后对植物的影响与分子检测[D]. 泰安:山东农业大学,2009.
- [4] 叶小梅,常忠州,季国军,等. 番茄拮抗内生细菌 102 菌株的分离及其防病促生作用[J]. 江苏农业学报,2005,12(4):294-297.
- [5] 易婷,缪煜轩,冯永君. 内生菌与植物的相互作用:促生与生物薄膜的形成[J]. 微生物学通报,2008,35(11):1774-1780.
- [6] MAHAFFEE W F, KLOEPPER J W, VAN VUURDE J W L, et al. Endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Pseudomonas fluorescens* strains 89B-27 and *Enterobacter asburiae* strain JM22[M]//RYDER M H, STEPHENS P M, BOWEN G D. Improving plant productivity in *Rhizosphere bacteria*. Melbourne, Australia; CSIRO Publications, 1997:180.
- [7] BUGBEE W M, GUDMESTAD N C. Sugar beet as a symptomless host for *Corynebacterium*[J]. Phytopathol,1987,77:765-770.
- [8] 杨海莲,孙晓璐,宋未. 植物内生细菌的研究[J]. 微生物学通报,1998,25(4):224-227.
- [9] 芦云,赵林同,王海燕. 新疆设施栽培黄瓜内生细菌研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(30):18599-18600.
- [10] 奚家勤,林碧莲,莫明和,等. 烟草内生细菌 ZY-9-13 菌株的鉴定及其对植物病原真菌的拮抗性[J]. 西南农业学报,2013(2):612-616.
- [11] 张淑颖,曲田丽,孙阳,等. 剑麻内生细菌 JM-3 对苹果腐烂病抑制作用的研究[J]. 华北农学报,2013(4):208-213.
- [12] 郭纯,许召贤,吕晶森,等. 黄芩内生细菌的分离及抑菌研究[J]. 湖南农业科学,2011(21):8-9.

(上接第 11012 页)

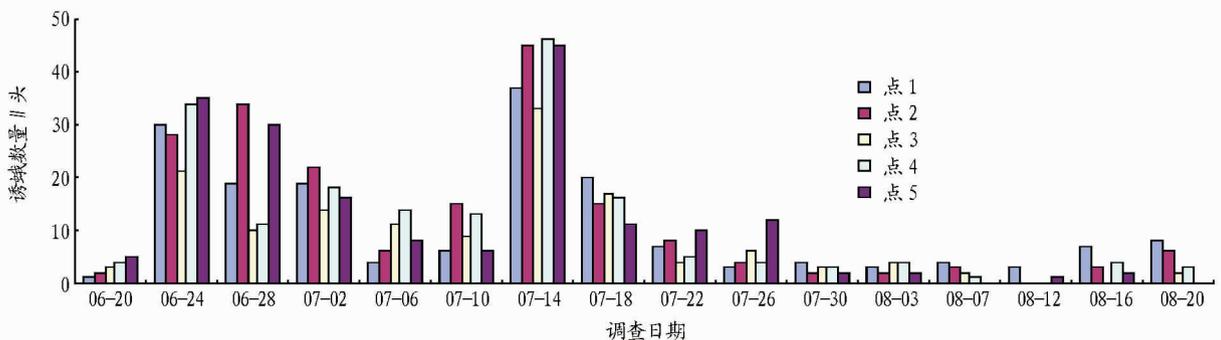


图 2 重复 2 不同时期诱杀二化螟数量

群数量,也可检测二化螟的发生动态,为防治二化螟工作提供理论依据。该试验调查了不同时间和不同放置点性诱剂诱捕器诱捕二化螟数量,诱蛾数量的多少可能与天气等因素有关,雨天可影响二化螟的行为及性诱剂的扩散距离。该试验仅调查了诱捕器的诱蛾数量,诱捕器对二化螟的防治效果还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 盛成发,杨辅安,韦永保,等. 性诱剂诱杀二化螟的田间效果试验[J]. 植物保护,2000,26(5):4-5.

- [2] 叶生海,卢增斌,程年娣,等. 二化螟性引诱剂田间防治效果初步研究[J]. 湖北植保,2008(6):39-40.
- [3] 洪峰,张艳菊,张洪文,等. 性诱剂防治二化螟效果的研究[J]. 黑龙江农业科学,2009(6):72-73.
- [4] 谭章建,易光辉. 不同厂家性诱剂及不同诱捕器诱杀蔬菜害虫的效果研究[J]. 湖南农业科学,2011(22):33-36.
- [5] 盛忠雷,王晓庆,彭萍,等. 茶毛虫和茶细蛾性诱剂的田间防控效果研究[J]. 西南农业学报,2011(5):1775-1778.
- [6] WANG A M, HONG G Y, WEI Z J. Cloning, sequencing and molecular phylogenetic analysis of the mitochondrial *Cytochrome oxidase I* gene of *Chilo suppressalis*[J]. Agricultural Science & Technology,2011,12(5):674-677.