

文章编号: 1674-7054(2012)02-0142-05

体内定殖木霉 H6 对香蕉苗生长的影响

王亚^{1,2}, 谭昕³, 汪军², 黄俊生²

(1. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海南 儋州 571737;
3. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海南 海口 571101)

摘 要: 对木霉 H6 进行抗药性标记, 通过盆栽试验, 研究其在香蕉体内定殖情况及其对香蕉苗生长的影响。结果表明, 木霉 H6 可在香蕉苗的根、球茎、假茎、叶中传导并稳定定殖; 体内定殖了木霉 H6 的香蕉苗的生长明显优于未定殖的香蕉苗, 说明木霉 H6 在香蕉体内的定殖促进了香蕉苗的生长。

关键词: 木霉 H6; 香蕉; 内生; 促生

中图分类号: Q 939.96

文献标志码: A

植物内生真菌的研究始于 19 世纪末, 但直至 1977 年 Bacon 等发现了高羊茅内生真菌与牛的中毒症状相关后, 有关内生真菌生物学作用方面的研究才正式开展起来^[1]。植物内生真菌能通过占据生态位和营养竞争等手段来抑制病原菌的生长和激活宿主免疫系统, 从而增强宿主植物的抗病性^[2]。此外, 还有一些植物内生真菌具有促进植物生长, 增加植株的株高、茎粗、根茎质量以及增强生长势等作用^[3]。木霉 (*Trichoderma* spp.) 属真菌属真菌界、双核菌门、半知菌亚门、丝孢纲、丛梗孢目、丛梗孢科, 是对多种植物病原菌具有拮抗作用的重要生防因子。因木霉广泛存在于土壤、腐烂的植物体中, 因而较早被人们认识并对其进行系统的研究, 但木霉作为内生真菌的研究起步较晚, 且目前研究较为深入的木霉生防机理, 大多集中在木霉与病原菌之间的相互作用, 忽略了木霉对寄主植物生理生化的影响。近年的研究^[4]表明, 某些木霉菌株可定殖于植株根部, 成为植株的共生体, 并促进植株的生长和诱导植株产生抗病性。笔者对供试木霉 H6 进行抗药性标记, 并通过盆栽试验研究其在香蕉体内的定殖情况及其对香蕉生长势的影响。这可进一步明确木霉 H6 的促生机理以及将其运用于田间防治的可行论证提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 供试的木霉菌 *Trichoderma* spp. H6 菌株为本实验室经多次室内拮抗药性测定和田间防效实验筛选获得。供试的香蕉苗为巴西蕉幼苗, 由中国热带农业科学院组培中心提供。

1.2 方法

1.2.1 木霉 H6 天然抗药性检测 分别使用卡那霉素 (Km)、链霉素 (Str)、红霉素 (Ery)、氯霉素 (Cm)、利福平 (Rif)、氨苄青霉素 (Amp) 对供试木霉 H6 进行天然抗药性检测, 用于检测木霉 H6 的抗生素及其浓度 (见表 1)。具体步骤^[5]: 将配好的 PDA 培养基定量装入三角瓶中, 灭菌后冷却至 50 ℃, 加入一定量的抗生素贮存液, 摇匀后迅速制成抗药性平板。将已在 28 ℃ 培养 2~3 d 的木霉 H6 菌种, 用无菌水制成悬浮液, 吸取 0.1 mL 木霉 H6 悬浮液接种于不同抗药性的 PDA 平板上, 用无菌的涂布棒涂布均匀, 重复 3 次。同时接种不加任何抗生素的平板作对照, 28 ℃ 恒温培养 3~5 d 后观察结果。

收稿日期: 2012-03-01

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (200903049); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2008HZS1J003); 农业部农作物病虫害疫情监测与防控 (ZBC200803) 资助

作者简介: 王亚 (1985-), 女, 云南普洱人, 海南大学农学院 2009 级硕士研究生。

通信作者: 黄俊生, 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所研究员, E-mail: H888111@126.com

表 1 检测木霉 H6 的抗生素及其质量浓度

抗生素	溶剂	贮存质量浓度/(g·L ⁻¹)	使用质量浓度/(mg·L ⁻¹)
Km	d ₂ H ₂ O	20	50
Str	d ₂ H ₂ O	30	100
Ery	d ₂ H ₂ O	50	50
Cm	d ₂ H ₂ O	25	50
Rif	φ(乙醇) = 95%	10	10 50
Amp	d ₂ H ₂ O	50	50

1.2.2 木霉 H6 对 Rif 抗药性的筛选 采用对供试菌株进行抗 Rif 突变体系统诱导的方法^[6]: 吸取 0.2 mL 在 28 ℃ 下培养 4 d 长势良好的木霉 H6 发酵液均匀地涂布在含有 Rif(10 mg·L⁻¹) 的 PDA 培养基上, 培养 4~5 d。用无菌牙签挑出生长良好, 直径大于 3 cm 的菌落, 接入含有 Rif(10 mg·L⁻¹) 的 PDA 液体培养基中继代 1 次, 再转入含有 Rif(20 mg·L⁻¹) 的 PDA 培养基上培养, 直至最后筛选出能在含有 Rif(400 mg·L⁻¹) 的 PDA 培养基上长势良好的突变体菌株。

1.2.3 木霉发酵液制备 将标记的木霉 H6 在 PDA 液体培养基中发酵培养, 使其孢子浓度达到 1×10⁶·mL⁻¹。

1.2.4 盆栽实验处理 选用经过炼苗处理的杯装苗进行定殖实验。设 2 个处理, 处理 1: 对香蕉苗进行伤根处理后, 施入清水处理(CK); 处理 2: 对香蕉苗进行伤根处理后, 施入 20 mL 标记的木霉 H6 发酵液(菌落浓度为 1×10⁶·mL⁻¹)。

1.2.5 木霉在香蕉苗体内定殖的测定 于施浇发酵液后第 5 天起, 每 5 d 取样 1 次, 观察内生菌的生长情况。每次随机选取 10 株盆栽实验处理的香蕉苗, 每株苗分别取 10 块根、球茎、假茎和叶的组织样品, 再从组织样品中分离木霉 H6。具体步骤: 1) 分别用自来水将香蕉苗的根、球茎、假茎和叶清洗后, 在超净台上将其切成 0.5 cm 长的小块, 并进行表面消毒(消毒步骤: 用 φ=75% 酒精消毒 5 min, φ=0.1% 升汞浸泡处理 2 min, 再将组织块放入无菌水中清洗 3 次, 每次 3 min, 最后用无菌滤纸吸干剩余的水分, 保留第 3 次洗涤后的无菌水备用)。2) 将组织小块平铺在含有 Rif(400 mg·L⁻¹) 的 PDA 培养基平板上, 每个平板放置 5 块样品。以第 3 次洗涤后的无菌水涂布普通 PDA 培养基作为对照(CK)。28 ℃ 培养 30 d, 用于验证消毒效果。

1.2.6 内生木霉对香蕉苗生长势的影响 施浇发酵液后第 30 天, 对香蕉苗进行随机取样, 处理 1 和处理 2 各取 20 株, 使用常规方法测定香蕉苗株高、地上部分干质量; TTC 比色法测定根系活力; 丙酮法测定叶片中叶绿素含量; 考马斯亮蓝法测定可溶性蛋白的含量^[3]。

2 结果与分析

2.1 木霉 H6 天然抗药性 木霉 H6 天然抗药性检测结果: 木霉 H6 能在含 Km(50 mg·L⁻¹) 和 Ery(50 mg·L⁻¹) 的抗药性平板上生长, 不能在含 Rif(10, 50 mg·L⁻¹), Str(100 mg·L⁻¹), Amp(50 mg·L⁻¹), Cm(50 mg·L⁻¹) 的抗药性平板上生长。这表明木霉 H6 对 Km 和 Ery 2 种抗生素具有不同程度的天然抗药性, 对 Rif, Str, Amp, Cm 不具备天然抗药性。为此, 笔者选择 Rif 作为木霉 H6 抗药性标记。

2.2 木霉 H6 Rif 抗药性筛选的结果 通过抗药性筛选, 获得能在含 Rif(400 mg·L⁻¹) 的 PDA 培养基中生长的木霉 H6 突变菌株, 将突变菌株与蕉园土壤微生物进行稀释涂布平板实验, 实验结果表明: 普通 PDA 培养基上, 涂布土壤稀释液能长出大量真菌, 而在含 Rif(400 mg·L⁻¹) 的 PDA 培养基上则没有菌长出。这表明土壤中的真菌对 Rif(400 mg·L⁻¹) 没有明显抗药性, 而木霉 H6 的突变菌株可在含 Rif(400 mg·L⁻¹) 的 PDA 培养基上较好地生长。因此, 可以利用木霉 H6 的突变菌株对 Rif 的抗药性进行筛选, 检测其在植株体内的定殖情况。

2.3 木霉 H6 在香蕉苗体内定殖的效果

2.3.1 香蕉组织表面消毒的效果 分别用香蕉根、球茎、假茎、叶组织表面消毒过程中第 3 次洗涤后的无菌水涂布于普通 PDA 培养基(CK)上, 28 ℃ 培养 5, 10, 15, 20, 25, 30 d 时, 平板上均未有菌生长, 说明本实验使用的组织表面消毒方法可靠。

2.3.2 木霉 H6 在香蕉根部的定殖及消长动态 在香蕉生长期, 笔者分别在 5, 10, 15, 20, 25, 30 d 时各检测了 10 株香蕉苗, 均测得木霉 H6 (见表 2)。从图 1 可见, 供试菌发酵液处理后第 10 天分离率达到最大为 45%, 随后呈现减的趋势。由此推测, 伤根处理使土壤中的供试菌能够通过香蕉根部的伤口侵入, 使其前期快速增长, 后期随着伤口的愈合, 其在香蕉根部的定殖趋于稳定。

表 2 伤根法接种后的香蕉苗组织中的木霉 H6 的再分离

组织	培养时间 / d					
	5	10	15	20	25	30
根	10 ^a /10 ^b	10 ^a /10 ^b	10 ^a /10 ^b	10 ^a /10 ^b	10 ^a /10 ^b	10 ^a /10 ^b
球茎	7 ^a /10 ^b	10 ^a /10 ^b	10 ^a /10 ^b	10 ^a /10 ^b	10 ^a /10 ^b	10 ^a /10 ^b
假茎	5 ^a /10 ^b	9 ^a /10 ^b	10 ^a /10 ^b	10 ^a /10 ^b	10 ^a /10 ^b	10 ^a /10 ^b
叶	0 ^a /10 ^b	0 ^a /10 ^b	3 ^a /10 ^b	10 ^a /10 ^b	10 ^a /10 ^b	10 ^a /10 ^b

注: a. 分离得到菌株的植株数量; b. 检测植株的数量。

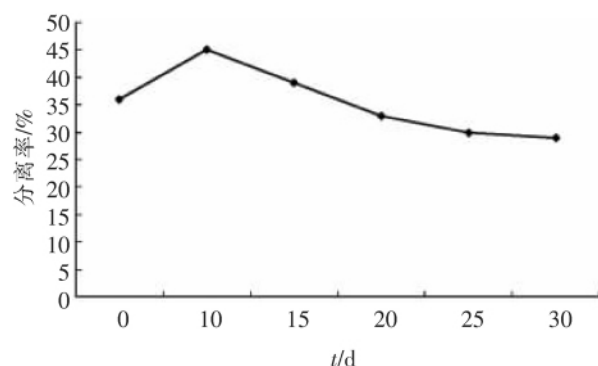


图 1 伤根法接种后香蕉根中供试木霉 H6 的消长动态

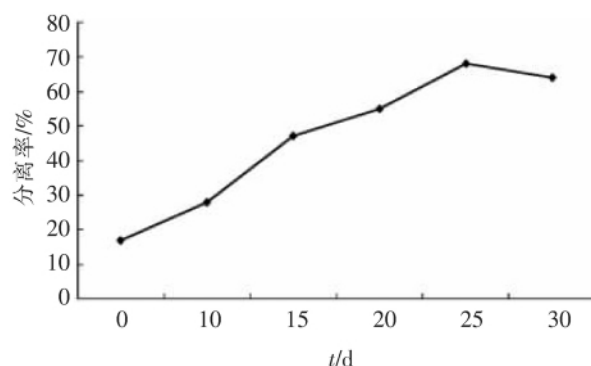


图 2 香蕉球茎中供试木霉 H6 的消长动态

2.3.3 木霉 H6 在香蕉球茎中的定殖及消长动态 供试菌发酵液处理后第 5 天取样检测, 在 3 株供试的香蕉苗球茎中未分离到供试菌, 其余 4 次检测供试植株球茎中均分离到供试菌 (表 2)。从图 2 可见, 随着培养时间的增长, 分离率呈逐步增加的趋势, 并在后期趋于稳定。据此推测, 地下球茎作为整个香蕉植株的养分贮存中心, 给供试菌的生长繁殖提供充足的养分及良好的生长环境, 使其可以快速稳定地繁殖。

2.3.4 木霉 H6 在香蕉假茎中的定殖及消长动态 供试菌发酵液处理后第 5 天取样检测, 5 株供试的香蕉苗假茎中未分离到供试菌, 第 10 天取样检测, 有 1 株未分离到, 其余 3 次检测的供试植株假茎中均分离得到供试菌 (表 2)。从图 3 可见, 从分离率来看, 随着培养时间的增长, 分离率呈现先增后减的趋势, 在第 4 次检测时, 分离率最大为 45%。据此推测, 也许是因为供试菌在香蕉体内自下而上进行传导, 需要一段时间方可从球茎传导至假茎, 因此, 在前 2 次检测时, 一些供试香蕉苗假茎中并未分离得到木霉 H6。

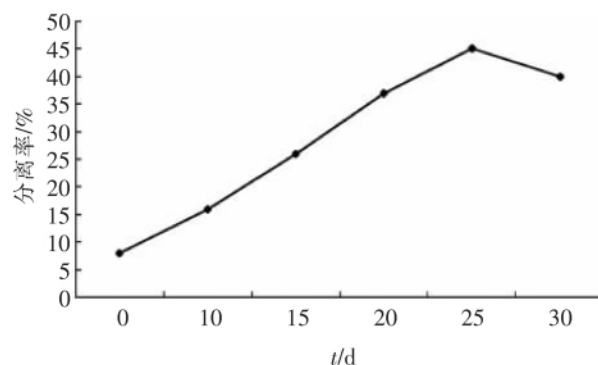


图 3 香蕉假茎中供试木霉 H6 的消长动态

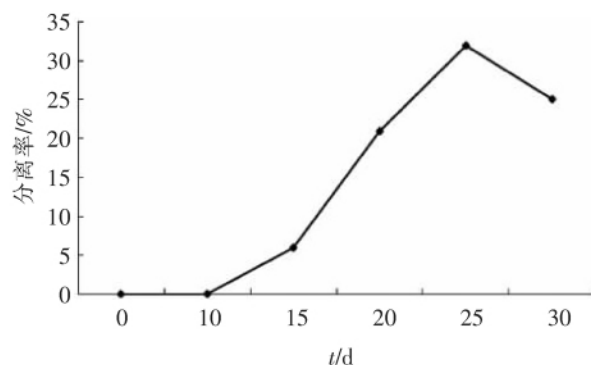


图 4 香蕉叶中供试木霉 H6 的消长动态

2.3.5 木霉 H6 在香蕉叶中的定殖及消长动态 供试菌发酵液处理后第 5 天和第 10 天取样检测, 所有供试香蕉苗叶片中均未分离到供试菌, 第 15 天取样检测, 有 3 株供试的香蕉苗假茎中未分离到供试菌, 其余 3 次取样检测, 供试植株均分离到供试菌 (见表 2)。从图 4 可见, 随着时间的增长, 分离率呈现先增后

减的趋势,在第 4 次检测时,分离率最大为 32%。与假茎相比,供试菌传导至叶片所需的时间要更多,因此,在第 15 天取样检测时才分离到供试菌株。

2.4 木霉 H6 对香蕉苗生长的影响 从表 3 可见,木霉 H6 发酵液处理后的香蕉苗生长明显优于只浇清水的对照组,处理组所测的各项指标值均显著或极显著高于对照。这说明供试木霉 H6 在香蕉体内的定殖,提高了香蕉苗根系活力,增强了香蕉苗从土壤中吸收水分、养分以及矿物质的能力;同时,叶绿素含量的增加,使香蕉苗光合作用的能力得到了增强,从而也增强了蛋白质的合成能力,促进了香蕉苗的生长(见图 5)。

表 3 内生木霉 H6 对香蕉生长势的影响

处理	苗高/cm	根系活力/ (mg·h ⁻¹)	地上部干质量/ (mg·株 ⁻¹)	叶绿素含量/ (mg·g ⁻¹)	可溶性蛋白含量/ (mg·g ⁻¹)
CK	14.54	0.47	34.51	4.34	1.89
H6	18.96 [*]	0.95 [*]	39.56 [*]	5.28 ^{**}	2.56 ^{**}

注:表中^{**},^{*}分别表示差异极显著和显著。

3 讨 论

目前,研究内生微生物在植株体内定殖的方法很多,如电镜观察法、抗血清法、免疫胶体金染色法、抗生素标记法、激光共聚焦显微技术、报告基因标记法等^[7-8],借助这些成熟的方法,可以对木霉菌在植物体内的定殖及作用进行深入的研究。笔者选择的抗生素标记跟踪供试菌方法的优点是操作简单、方便、成本低;缺点是无法准确定量和降低目标菌拮抗效果等。因此,建议在后续实验中采取荧光标记和实时荧光定量 PCR 等分子标记技术来对供试菌进行跟踪,以提高实验准确度及精确度。实验结果表明,木霉 H6 在香蕉体内的传导由根到球茎、假茎、叶依次进行。尖孢镰刀菌侵染香蕉植株的过程也是由根到球茎、假茎、叶^[9],这为研究如何应用木霉 H6 防治香蕉枯萎病提供了参考依据。



图 5 接种木霉 H6 和 CK 的香蕉苗的生长情况

近年来,在农业和土壤研究领域,人们利用内生真菌防治作物病害,促进了植株生长,降解了土壤中的有害物质^[10-11,13-14]。植物内生真菌促进植物生长有多种形式,可以通过产生多种生长调节物质(如植物生长素、赤霉素、细胞激动素等)直接促进宿主植物的生长;也可以在低水平氮源的土壤中添加宿主对氮元素的吸收;还可以提高宿主植物对非生物胁迫的抗性(如增加其抗旱、耐高温的能力)和增加宿主植物对病虫害的抵抗能力等^[15-16]。现有研究^[4]表明,许多木霉具有促进植物生长的能力,但木霉的促生能力及其机理常因木霉的种类、寄主植物不同而变化。本实验结果表明,木霉 H6 有较强的促进香蕉苗生长的作用,但这种作用机理是上述机理中的哪一种,还是多种机理共同作用的结果,仍有待进一步的深入研究。

参考文献:

[1] 任安芝,高玉葆.植物内生真菌——一类应用前景广阔的资源微生物[J].微生物学通报,2001,28(6):90-93.
[2] 李桂玲,王建锋,黄耀坚,等.几种药用植物内生真菌抗真菌活性的初步研究[J].微生物学通报,2001,28(6):64-68.
[3] VERMA S,VARMA A,REXER K H et al. *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov. a new root colonizing fungus[J]. Mycologia,1995,90:896-903.
[4] 赵蕾滕,安娜.木霉对植物的促生及诱导抗性研究进展[J].植物保护,2010,36(3):43-46.
[5] 吴蔼民,顾本康,傅正擎,等.内生菌 73a 在不同抗性品种棉花体内的定殖和消长动态研究[J].植物病理学报,2001,31(4):289-294.
[6] 郭小芳,宗兆锋,杨洪俊.6 种放线菌抗药性标记及其在植株体内定殖能力测定[J].西北农业学报,2005,14(2):69-73.
[7] 张志良,瞿伟箐.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2003:34-39,67-70.

- [8] 罗明, 芦云, 张祥林, 等. 内生拮抗细菌在哈密瓜植株体内的传导定殖和促生作用研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(4): 719–725.
- [9] 郭水木, 杨志明. 香蕉镰刀菌枯萎病的发生规律与综防措施[J]. 现代园艺, 2009, 14(2): 31–32.
- [10] 范晓静, 邱思鑫, 吴小平, 等. 绿色荧光蛋白基因标记内生枯草芽孢杆菌[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(4): 530–534.
- [11] SCHULZ B, BOYLE C, DRAGEGER S, et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites[J]. Mycological Research, 2002, 106: 996–1004.
- [12] PEREIRA J O, VIEIRA M L C, AZEVEDO J L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plant[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1999, 15: 3740.
- [13] PHOTTA W, LUMYONG S, LUMYONG P, et al. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui national park, Thailand[J]. Mycological Research, 2001, 105: 1508–1513.
- [14] SAMUELS G J, SUAREZ C, SOLIS K, et al. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*; two new species isolated from cacao in South America[J]. Mycological Research, 2006, 110: 381–392.
- [15] 武子敬, 杨小生, 朱海燕. 植物内生真菌的研究现状[J]. 江西中医学院学报, 2007, 19(1): 98–100.
- [16] 郭良栋. 内生菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148–152.

Colonization of *Trichoderma* H6 in Banana and its Effect on the Growth of Banana

WANG Ya^{1,2}, TAN Xin³, WANG Jun², HUANG Jun-sheng²

(1. College of Agronomy Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China; 3. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: *Trichoderma* H6 was tagged with antibiotic resistance, and inoculated into the potted banana plants to observe its colonization in the plants and its effect on the plant growth. The results showed that *Trichoderma* H6 was conducted and colonized in the roots, corms, pseudostems and leaves of the banana plants, and that the banana plants colonized *in vivo* with *Trichoderma* H6 grew obviously better than the control plants without *in vivo* colonization of *Trichoderma* H6, indicating *Trichoderma* H6 would improve the growth of banana plants when colonized in the banana plants.

Key words: *Trichoderma* H6; banana; endogenous; growth improvement