

文章编号: 1674-7054(2022)06-0595-10



香草兰酚酸类自毒物质降解菌的 筛选和鉴定及其抑菌效果

王洁^{1,2}, 王蓓蓓¹, 尚方剑², 苏兰茜², 赵少官^{2,3}, 洪珊², 赵青云²

(1. 海南大学热带作物学院, 海口 570228; 2. 海南省热带香辛饮料作物遗传改良与品质调控重点实验室, 海南万宁 517533; 3. 河南农业大学农业资源与环境科学学院, 郑州 450000)

摘要: 为了探讨利用有益微生物降解根系自毒物质、缓解香草兰连作生物障碍, 并储备有益菌种资源, 采用传统分离培养方法筛选香草兰根际土壤酚酸类自毒物质降解菌株, 并测定其在液体培养基和连作土壤中对酚酸类物质的降解效果及其对病原菌的平板抑制能力。结果表明: 从香草兰连作种植园根际土壤筛选到6株可降解酚酸类自毒物质的菌株, 分别为真菌 BM-5、FD-21、BD-8 和细菌 ZD-4、ZH-19、ZH-20。菌株 FD-21 在摇瓶培养 72 h 时对苯甲酸、对羟基苯甲酸和水杨酸的降解率分别为 78.87%、89.5% 和 93.62%; 但在香草兰连作土壤中接种该菌株恒温培养 7 d 后降解率分别为 43.5%、34.2% 和 67.28%。平板抑菌效果试验表明, 该 6 株菌对香草兰土传枯萎病致病菌尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*) 具有一定拮抗作用, 其中菌株 ZH-19、ZH-20 对尖孢镰刀菌的抑制率最高, 分别达 82.87% 和 82.94%; FD-21 对尖孢镰刀菌的抑制率为 45.49%。16S rRNA 和 ITS 序列比对结果表明, ZD-4 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、ZH-19 为炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*)、ZH-20 为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、BM-5 为黄丝曲霉 (*Talaromyces* sp.)、FD-21 为青霉 (*Penicillium* sp.)、BD-8 为桔青霉 (*Penicillium citrinum*)。说明筛选到的微生物菌株可降解香草兰根系酚酸类自毒物质且对尖孢镰刀菌具有拮抗作用。

关键词: 香草兰; 自毒物质; 酚酸降解菌; 筛选; 鉴定

中图分类号: S476.19; S 573.9 **文献标志码:** A

引用格式: 王洁, 王蓓蓓, 尚方剑, 等. 香草兰酚酸类自毒物质降解菌的筛选和鉴定及其抑菌效果 [J]. 热带生物学报, 2022, 13(6): 595-604. DOI: 10.15886/j.cnki.rds wxb.2022.06.009

香草兰 (*Vanilla planifolia* Andrews) 属多年生藤本热带经济作物, 享有“香料之王”的誉称, 是制作各种高端食品和化妆品等的配香原料。香草兰用途广泛, 附加值高, 除制作香料外, 还具健胃、补肾、软化血管、促进脑功能改善等药用价值, 在国际市场上供不应求^[1]。香草兰经连续多年种植后, 其根际土壤中病原真菌尖孢镰刀菌相对丰度增加; 其根际土壤中与枯萎病病情指数呈显著负相关的根际促生菌 (PGPR) 如芽孢杆菌、木霉、慢生根瘤菌等相对丰度显著降低^[2-3]。香草兰经连续种植后, 香草兰植株生长受抑, 土传枯萎病高发,

出现连作生物障碍^[2-3]。根系分泌物能够影响植物根际微生物群落组成^[4]。植株根系分泌的酚酸类物质是引起根系自毒作用的主要物质, 其中酚酸类物质的可溶解部分和可逆吸附的组分是与自毒作用直接相关的^[5-6]。在连续种植的花生^[7]、甜瓜^[8]、烟草^[9]、黄瓜^[10] 的根系分泌物中均检测到酚酸类物质, 如苯甲酸、水杨酸、对羟基苯甲酸等。酚酸类物质对种子萌发、植株生长具有显著的抑制作用^[11]。西瓜根系分泌的酚酸类物质香草酸、水杨酸和对羟基苯甲酸可促进尖孢镰刀菌孢子萌发和菌丝生长^[12]。花生根系分泌物中的苯甲酸被

收稿日期: 2021-09-06

修回日期: 2022-04-12

基金项目: 海南省自然科学基金高层次人才项目 (2019RC324、321RC1100); 国家自然科学基金面上项目 (31871577)

第一作者: 王洁 (1995-), 女, 海南大学热带作物学院 2019 级硕士研究生. E-mail: wangjie9516@163.com

通信作者: 赵青云 (1983-), 女, 博士, 副研究员. 研究方向: 土壤微生物与肥料. E-mail: qingyun_022@163.com

单独添加到根际土壤中时增加了花生根际细菌和真菌群落的丰度,降低了真菌与细菌的比例值,增加了病原真菌尖孢镰刀菌的丰度,使花生的根茎腐病的发病率升高^[13]。利用有益微生物降解根系分泌的自毒物质,可降低或消除根系化感物质对土壤及植株的不利影响^[14]。刘云露^[15]从黄连种植园土壤中分离到能够降解阿魏酸的青霉菌(*Penicillium daleae*),该菌株培养 72 h 后对阿魏酸的降解率达 87.5%。在花生根际土壤中筛选到 1 株能够降解多种酚酸的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),经摇瓶培养 5 d 时,对酚酸类自毒物质如对羟基苯甲酸、肉桂酸、丁香酸、苯甲酸、阿魏酸等的降解率分别为 99.85%、17.44%、90.04%、98.69%、38.89%^[16]。孙秀等^[17]在黄瓜根际土壤中也筛选到了能够降解肉桂酸的高效菌株,其中,恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)在 12 h 内对肉桂酸的降解率达到了 99.35%;黑曲霉(*Aspergillus niger*)在 72 h 内对肉桂酸的降解率达到了 99.62%。目前,国内外对关于自毒物质降解菌的研究主要集中在大宗经济作物上,而较少关注热带经济作物,尤其在多年生热带香料饮料作物上鲜有研究报道。

本课题组前期研究表明,苯甲酸、水杨酸和对羟基苯甲酸是香草兰植株根系分泌的主要自毒物质。本研究从香草兰连作园中筛选到了可降解这 3 种自毒物质的微生物菌株,通过室内模拟实验研究其降解能力及其对病原菌尖孢镰刀菌的抑制作用,并对其进行了 16S rRNA 及 ITS 分子鉴定,为在生产上利用有益微生物缓解香草兰连作生物障碍提供理论基础和菌种资源储备。

1 材料与方 法

1.1 供试样品材料 土壤样品采集:选取海南省万宁市兴隆镇中国热带农业科学院香料饮料研究所香草兰种植园植株,参考 XIONG 等^[2]的方法,采集植株根际土壤,带回实验室 4 °C 冰箱保存备用。

供试病原菌:香草兰枯萎病致病菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* sp. *vanillae*)由中国热带农业科学院香料饮料研究所植物保护研究室提供。

标准品:苯甲酸、水杨酸、对羟基苯甲酸均购

自上海源叶生物有限公司。

1.2 培养基 马铃薯葡萄糖培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,蒸馏水 1 000 mL,琼脂粉 20 g, pH 7.0, 115 °C 高压蒸汽灭菌 30 min, 备用。

LB 培养基:酵母膏 5 g,蛋白胨 10 g,氯化钠 5 g,琼脂粉 20 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 备用。

无机盐培养基: NH_4NO_3 1.0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g; KH_2PO_4 0.5 g; NaCl 0.5 g; K_2HPO_4 1.5 g, 蒸馏水 1 000 mL; pH 7.0; 121 °C 灭菌 20 min, 备用。

1.3 香草兰根际土壤拮抗真菌、细菌分离纯化 称取 5 g 香草兰根际土壤,参照王辉等^[18]的方法制备土壤悬浊液,置于 28 °C 摇床振荡 30 min,静置 30 min,取土壤悬浊液上清液。对土壤悬浊液上清液进行梯度稀释,取 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 稀释液,分别吸取 100 μL ,涂布至 PDA 培养皿上;取 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 稀释液分别吸取 100 μL ,涂布至 LB 培养皿上。置 28 °C 培养箱中培养。待长出明显菌落后,观察菌落形态,分别挑选不同形态、颜色的单菌落至 PDA 和 LB 培养皿中进行纯化。连续纯化 5 次后挑取单菌落接种至 PDA、LB 培养基斜面,4 °C 冰箱保存备用。

1.4 酚酸类物质降解率测定

1.4.1 菌悬液制备 真菌菌悬液制备:取保存的真菌斜面,活化后挑取菌丝块,接种至 PDA 培养皿中培养 3 ~ 5 d,用接种铲刮取菌丝块,转移至装有玻璃珠的无机盐液体培养基中,180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床振荡 30 min,制得孢子悬液,调节孢子密度至 10^7 $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 备用。细菌菌悬液制备:取保存的细菌斜面,将菌落接种至 LB 液体培养基中,置恒温摇床 160 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 18 ~ 20 h,菌液经 8 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,倒掉上清液,收集菌体,用无菌水重悬,备用。

1.4.2 酚酸类物质降解率测定 取上述已制备的菌悬液 2 mL,接种至 100 mL 含 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 酚酸无机盐液体培养基中,160 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 30 °C 摇床振荡培养,分别于 0、12、24、36、48、60、72 h 取真菌、细菌酚酸降解液,以无菌水为空白对照,采用紫外分光光度计法测定酚酸含量,根据标准曲线计算酚酸浓度。

标准曲线:称取对羟基苯甲酸和苯甲酸 0、

25、50、75、100 mg, 水杨酸 0、50、100、150、200 mg, 定容至 100 mL, 测量 OD_{280} 吸光度, 并制作标准曲线, 得到对羟基苯甲酸的标准曲线 $y = 0.086 2x - 3.449 1$, $R^2 = 0.999 4$; 得到苯甲酸的标准曲线 $y = 0.300 3x - 0.586 2$, $R^2 = 0.999 2$; 得到水杨酸的标准曲线 $y = 0.224 3x - 0.592 1$, $R^2 = 0.999 4$ 。

降解率 (DR) = $(C_{ck} - C_t) / C_{ck} \times 100\%$,

式中, C_{ck} 为对照中酚酸剩余量, C_t 为处理中酚酸剩余量。

1.5 自毒物质降解模拟实验 取 100 g 香草兰连作土壤 (过 2 mm 筛, 土壤含水量 20%) 加入到 250 mL 三角瓶中。在三角瓶中按照 10% 的比例加入各供试降解菌的菌悬液, 调整各处理最终的土壤含水量为 40%。每处理设置 9 次重复, 以无菌水为对照, 用封口膜覆盖三角瓶口, 在培养箱中 30 °C 避光培养 7 d, 分别于处理后 3、5、7 d 取样, 并测定土壤中自毒物质含量。参考 LI 等^[19] 的方法萃取土壤中酚酸物质, 采用高效液相色谱法定量分析土壤中酚酸含量变化。

1.6 酚酸类物质降解菌对病原菌尖孢镰刀菌的抑制作用测定 参照 ZHAO 等^[20] 的方法检测可降解酚酸类物质菌株对病原菌尖孢镰刀菌的抑制能力。用接种铲挑取病原菌尖孢镰刀菌菌丝块, 置于 PDA 培养皿培养 5 d, 用打孔器在病原菌边缘打取圆形菌丝块, 置于新的 PDA 培养皿中。用接种针从培养皿上挑取已活化的待测细菌, 用打孔器打取已活化的待测真菌, 分别置于距离病原菌菌丝块 2 cm 处, 以只接种病原菌的培养皿为对照, 置 28 °C 培养箱培养 3~5 d。对病原菌的抑制作用采用抑制率表示。

抑菌率 = $[(\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}) / \text{对照菌落直径}] \times 100\%$ 。

1.7 酚酸类自毒物质降解菌的分子鉴定 采用 DNA 离心柱型试剂盒 (上海派森诺生物技术有限公司) 提取降解菌株 DNA, 以总 DNA 为模板, 以细菌特异性引物对 338F (5'-AATGATACGGCGA CCACCGAG-3') 和 806R (5'-GGACTACNVGGGT WTCTAAT-3')^[21] 及真菌特异性引物 ITS1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS2 (5'-TCC TCCGCTTATTGATATGC-3')^[22] 对 DNA 的内转录间隔区进行 PCR 扩增。反应体系共 25 μL : 2.5 μL 10 \times 反应缓冲液, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 每种引物,

2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP, 40 ng 模板和 0.625 单位的 Takara Pyrobest (日本 Takara 生物技术有限公司)。扩增在以下温度范围内进行: 在 94 °C 初始变性 4 min, 然后进行 35 个变性循环, 94 °C 持续 30 s, 50 °C 退火持续 45 s, 72 °C 延伸持续 1 min, 最后在 72 °C 延伸 7 min^[23]。使用 PCR Purification Kit (Axygen Bio, USA) 对 PCR 产物进行纯化^[24]。ITS 和 16S rRNA 测序工作由上海派森诺生物技术有限公司完成。根据测序结果, 利用 Genbank 中的 BLAST 软件对获得的 ITS 和 16S rRNA 序列进行同源性分析, 用 MEGA7.0 软件进行系统发育分析, 采用 Neighbor-joining 算法和 JukesCantor 模型构建系统发育树, 自展次数设定为 1000。

1.8 数据分析 采用软件 SPSS 22.0 对数据进行方差分析; 采用软件 Microsoft Excel 2010 进行数据处理和图表绘制。

2 结果与分析

2.1 酚酸类自毒物质降解菌的筛选 依据菌落形态特征差异, 从香草兰种植园根际土壤中分离挑选出 31 株真菌、84 株细菌。通过紫外分光光度法筛选出 6 株可降解苯甲酸、水杨酸和对羟基苯甲酸的菌株, 分别是 BM-5、FD-21、BD-8、ZD-4、ZH-19 和 ZH-20。由图 1 可知在摇瓶培养 72 h 后, 降解菌 ZH-20、FD-21 和 BD-8 均对对羟基苯甲酸的降解率超过 89%; ZH-19、ZD-4 均超过 87%; 而 BM-5 达到 78.46%。由图 2 可知, 在摇瓶培养 72 h 后, 降解菌 BM-5、FD-21、ZD-4、ZH-19 和 ZH-20 对苯甲酸的降解率超过 70%。由图 3 可知, 在摇瓶培养 72 h 后, FD-21、BM-5 对水杨酸的降解率超过了 90%, 分别为 93.62% 和 92.56%; ZD-4、BD-8、ZH-19、ZH-20 对水杨酸的降解率分别为 39.06%、16.91%、6.44%、4.64%。由此可知, 这 6 株菌均可降解酚酸类物质苯甲酸、水杨酸和对羟基苯甲酸, 其中, 在摇瓶培养条件下 ZH-20 对对羟基苯甲酸的降解能力较强, FD-21 对苯甲酸和水杨酸的降解能力均较强。

2.2 在连作土壤条件下菌株降解酚酸类自毒物质能力 在恒温培养 3 d 时, 这 6 株降解菌对连作土壤中的对羟基苯甲酸、水杨酸和苯甲酸均有一定的降解能力, 其中, ZH-20 和 ZH-19 对对羟基苯甲酸的降解率超过了 50%, 对水杨酸的降解率超

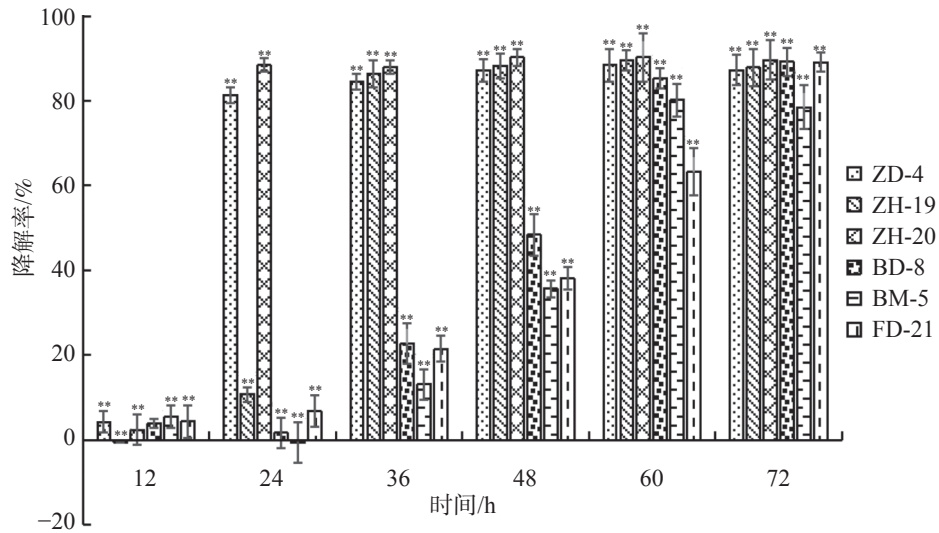


图1 6株降解菌降解对羟基苯甲酸的能力

**和*分别表示和对照相比在 $P<0.01$ 和 $P<0.05$ 水平显著性差异(下同)。

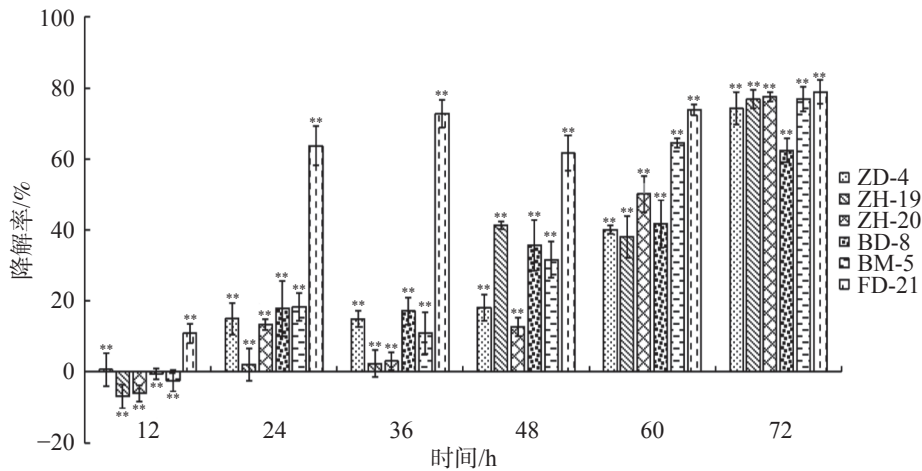


图2 6株降解菌降解苯甲酸的能力

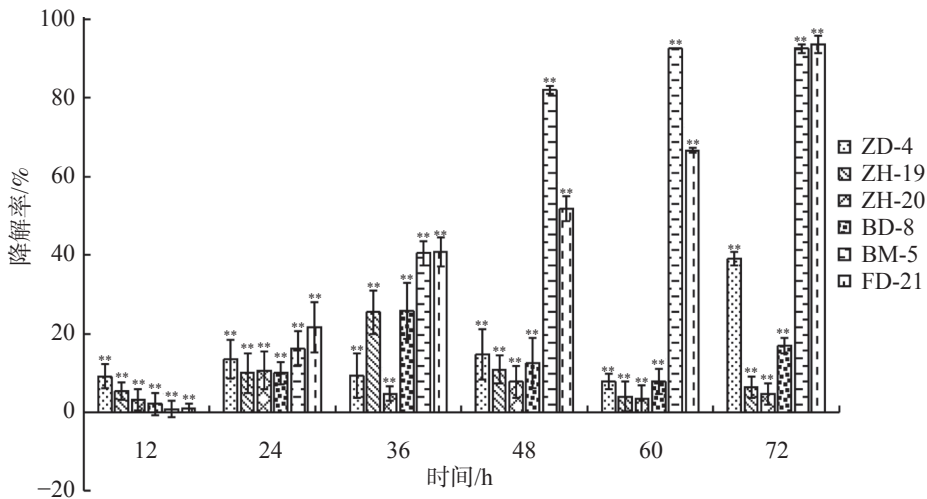


图3 6株降解菌降解水杨酸的能力

过了 60%; ZH-20、ZH-19 和 BD-8 对苯甲酸的降解率超过了 20%(图 4)。在恒温培养 5 d 时, FD-

21、ZH-19 和 BD-8 对对羟基苯甲酸的降解率约为 20%; FD-21 对水杨酸的降解率最高, 达到了

37.11%; ZH-19、BM-5 和 BD-8 对水杨酸的降解率超过了 20%, 其中, BM-5 的降解率达到了 27.5%; BD-8 对苯甲酸的降解率最高, 达到了 75.87%; ZH-20、ZH-19 和 BM-5 的降解率超过了 30%(图 5); 恒温培养 7 d 时, ZD-4 和 ZH-19 对对羟基苯甲酸的降解率超过了 80%, 其中, ZD-4 对水杨酸的降解率最高, 达到 85.35%; BD-8、ZH-19、ZD-4 对苯甲酸的降解率分别为 86.52%、73.39%、69.84%(图 6)。

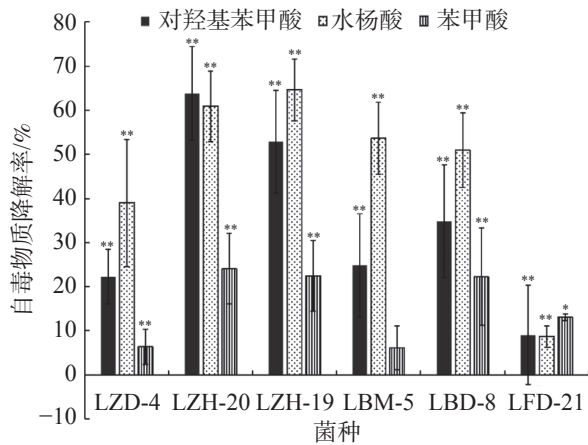


图 4 培养 3 d 时 6 株降解菌降解连作土壤中酚酸物质能力

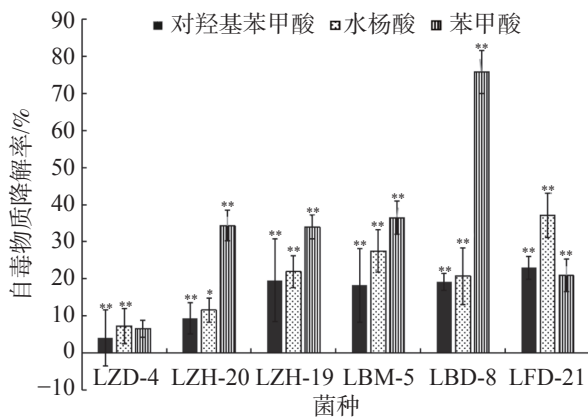


图 5 培养 5 d 时 6 株降解菌降解连作土壤中酚酸物质能力

2.3 酚酸类物质降解菌对尖孢镰刀菌的抑制效果

平板对峙实验结果表明, 菌株 ZH-20、ZH-19、ZD-4、BM-5 对香草兰枯萎病原菌尖孢镰刀菌都具有极显著抑制作用, 其中菌株 ZH-20、ZH-19 的抑菌率达到 80% 以上, 显著高于其他菌株(图 7)。菌株 FD-21 的抑菌率为 46%, 显著高于 BD-8, 但低于 3 株细菌 ZH-20、ZH-19、ZD-4 对尖孢镰刀菌的抑制效果。

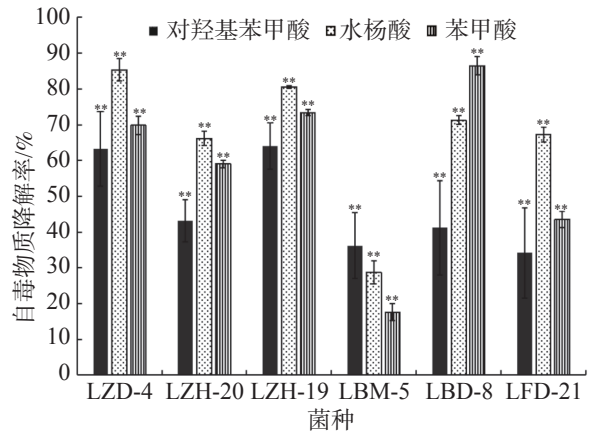


图 6 培养 7 d 时 6 株降解菌降解连作土壤中酚酸物质能力

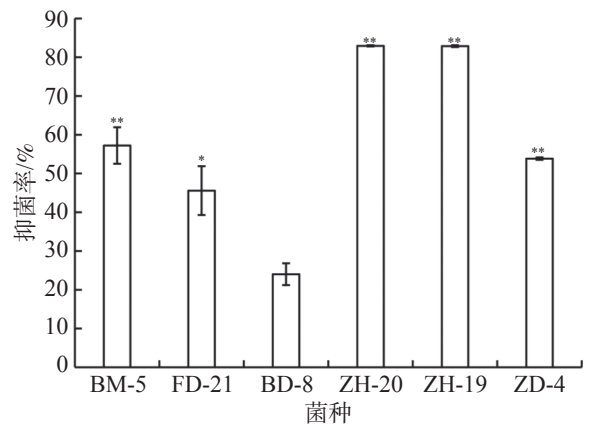
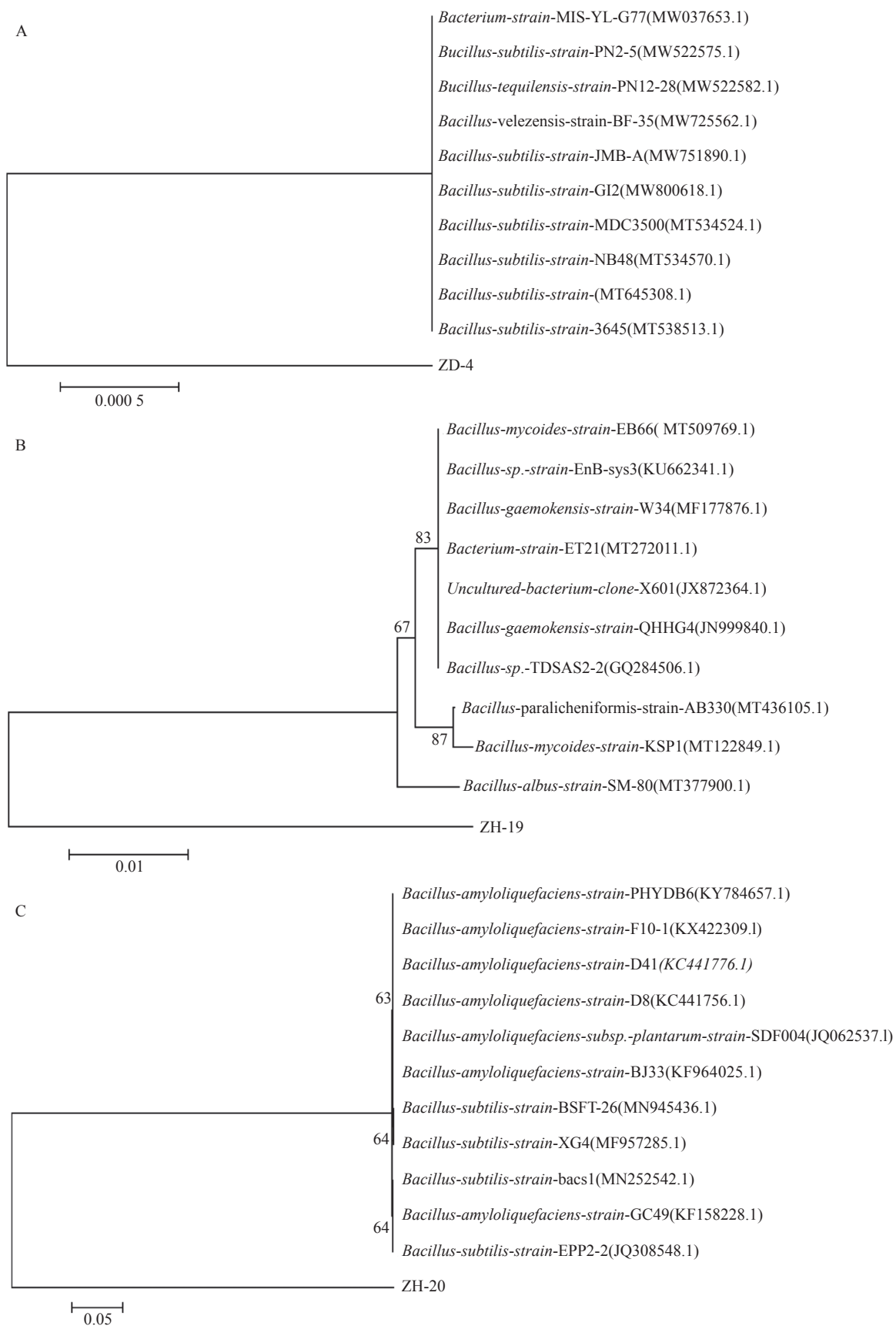


图 7 6 株菌对病原真菌尖孢镰刀菌的抑制率

2.4 酚酸物质降解菌分子鉴定

6 株降解菌经 16S rRNA 和 ITS 序列测定后, 将 3 株细菌 16S rDNA 序列和 3 株真菌 ITS 的测序结果登录 GenBank, 并用 BLAST 与 GenBank 中 16S rRNA 序列和 ITS 序列进行同源性比较, 结果发现, (1)6 株降解菌中的 3 株细菌中, ZD-4 与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*(MZ712061) 的 16S rRNA 序列同源性达到 99.64%; ZH-19 与炭疽芽孢杆菌 *Bacillus anthracis*(HQ670430) 的 16S rRNA 序列同源性达到 95.83%; ZH-20 与解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*(KY784657) 的 16S rRNA 序列同源性达到 93.48%。(2)6 株降解菌中的 3 株真菌中, BM-5 与黄丝曲霉属 *Talaromyces* sp.(MK368459) 的 ITS 序列同源性达到 99.81%; 菌株 FD-21 与青霉属 *Penicillium* sp.(MN701702) 的 ITS 序列同源性达到 99.45%; 菌株 BD-8 与桔青霉 *Penicillium citrinum*(MT529414) 的 ITS 序列同源性达到 99.81%。基于测序结果建立系统发育树如图 8 所示。



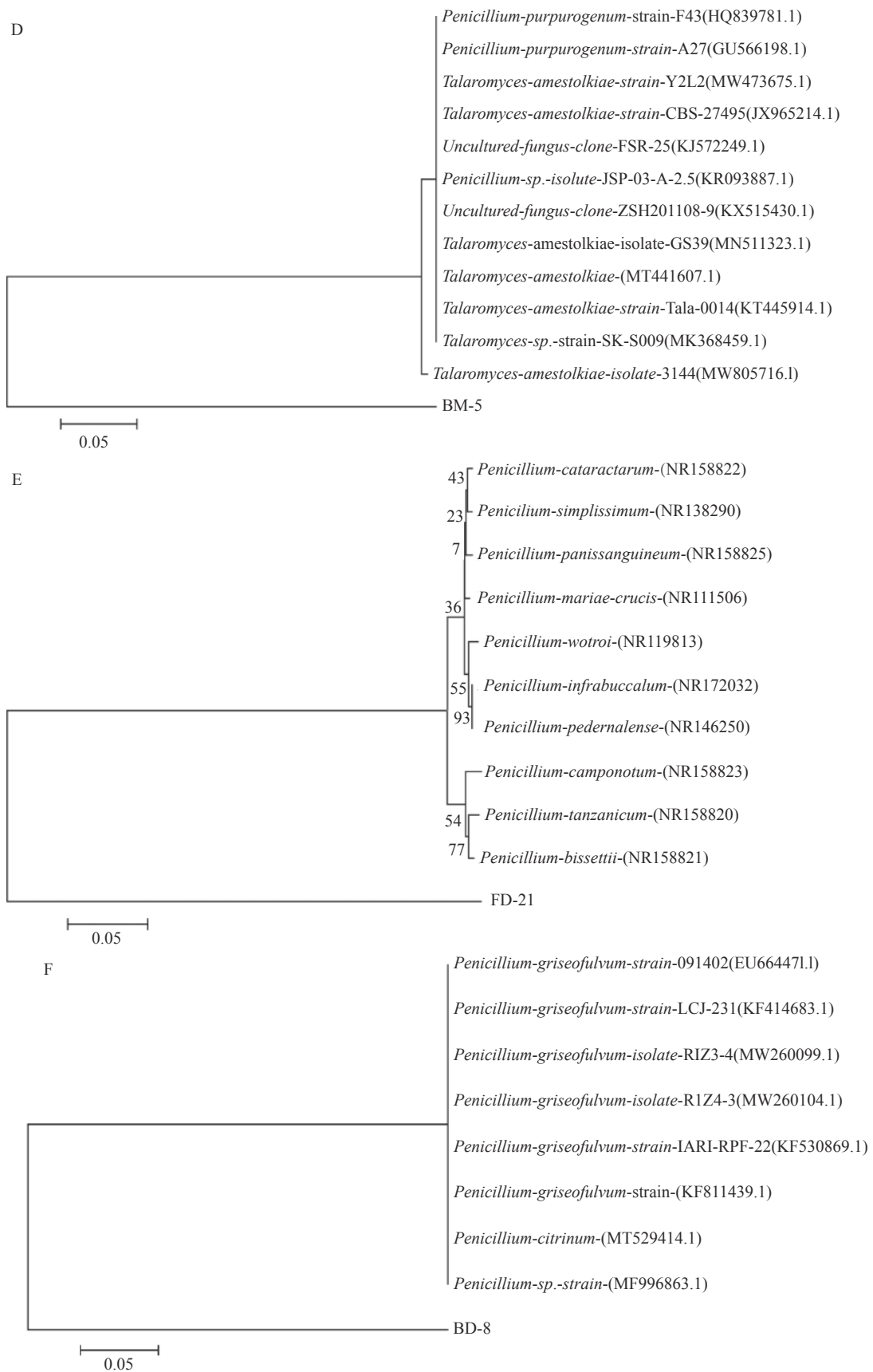


图 8 基于 16SrRNA 和 ITS 基因序列构建的系统发育树

A、B、C、D、E、F 分别表示菌株 ZD-4、ZH-19、ZH-20、BM-5、FD-21、BD-8 系统发育树, 分支上的数字表示 Bootstrap 值; 标尺表示分支长度

3 讨论

酚酸是植物重要的次生代谢产物,通过莽草酸-苯丙烷途径产生,是木质素和细胞壁聚合物的分解产物^[25]。这些化合物可以在植物-微生物和植物-植物的相互作用中发挥多功能作用^[26]。本研究结果表明,从香草兰根际土壤中筛选到的6株菌对苯甲酸、水杨酸和对羟基苯甲酸均有较强的降解能力,可作为根系酚酸类自毒物质降解菌应用于实际生产中,以消减自毒物质对香草兰根系生长及根际微生物群落装配产生的负面影响^[27]。张春杨等^[16]在花生根际土壤中筛选出木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylooxidans* HJ-2)和硝基还原假单胞菌(*Pseudomonas nitroreducens* HJ-3),均能够有效降解苯甲酸,同时这2株菌能够降解苯乙酮、硬脂酸、棕榈酸、乳酸、3,5-二甲基苯甲醛和丙三醇等化感物质。何志刚等^[28]在番茄的根际土壤中筛选出芽孢杆菌属枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、链霉菌属吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)、纳西杆菌属耐碱纳西杆菌(*Naxibacter alkalitolerans*),对苯甲酸、对羟基苯甲酸、水杨酸、肉桂酸以及香草酸都有一定的降解作用。在本研究中FD-21青霉菌(*Penicillium* sp.)在摇瓶实验中降解对羟基苯甲酸、水杨酸和苯甲酸的能力均较好,分别达到89.85%、93.62%和78.87%,但在连作土壤中对对羟基苯甲酸、水杨酸和苯甲酸降解率分别为34.2%、67.28%和43.5%,这可能是在土壤环境条件下微生物的生存空间较复杂,受其在土壤中利用不同碳氮源能力及定殖能力影响所致^[29]。

XIONG等^[30]的研究结果表明,连作香草兰根际土壤真菌多样性和植株发病率呈显著负相关,抑病型香草兰园根际土壤具有较高的真菌多样性,更易富集与植株健康密切相关的芽孢杆菌和青霉等有益微生物。本研究筛选出了对尖孢镰刀菌有显著抑制作用及可降解根系自毒物质酚酸的复合型功能菌株,它们为ZD-4枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、ZH-19炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、ZH-20解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、BM-5黄丝曲霉(*Talaromyces* sp.)、FD-21青霉(*Penicillium* sp.)、BD-8桔青霉

(*Penicillium citrinum*)。文献^[31]的研究结果表明,在改良具有连作障碍的苹果园土壤,单施有机肥土壤中黄丝曲霉属明显升高,推测黄丝曲霉可能有益于苹果植株健康生长,为连作土壤改良提供了新思路^[31]。另外,黄丝曲霉属可作为土壤高效解磷菌应用于实际生产中^[18]。文献^[32]的研究结果表明,在香草兰与胡椒轮作模式中,香草兰根际土壤中与植株密切相关的有益菌青霉的丰度显著增加^[32]。在本研究中发现青霉FD-21降解3种酚酸自毒物质的能力明显优于其他2株真菌,且对尖孢镰刀菌有显著抑制作用。

近年来,我国高度重视研发农业绿色投入品,助力为实现我国农业绿色优质发展,更趋向重视对农业绿色投入品的研发与应用。随着对高效功能型菌种资源的不断挖掘,多种有益功能微生物应用到农业生产中,利用复合型高效功能微生物降解自毒物质、抑制土传病害,是一种缓解作物连作生物障碍行之有效的方法。本研究筛选到了对苯甲酸、水杨酸和对羟基苯甲酸有显著降解作用且可抑制土传病原真菌尖孢镰刀菌的复合型功能微生物菌株枯草芽孢杆菌、黄丝曲霉等,丰富了酚酸类自毒物质降解菌及生防菌菌种资源,对缓解香草兰连作生物障碍提供了新的菌种资源。下一步,笔者拟基于生态功能互补及生物多样性原理,组合高效互作菌群,并研究适宜高效菌群生长扩繁的不同营养载体组合(益生源),研制高效复合菌剂,为调控香草兰连作土壤,有效阻控连作生物障碍提供支撑,同时,也为缓解其他经济作物连作生物障碍提供参考。

参考文献:

- [1] 赵青云,邢谄彰,王辉,等.解磷细菌 *Burkholderia* 的分离鉴定及对香草兰生长和P吸收的影响(英文)[J]. *热带作物学报*, 2018, 39(10): 1913-1919.
- [2] XIONG W, ZHAO Q, ZHAO J, et al. Different continuous cropping spans significantly affect microbial community membership and Structure in a vanilla-grown soil as revealed by deep pyrosequencing [J]. *Microbial Ecology*, 2015, 70: 209-218.
- [3] 赵青云,王辉,王华,等.种植年限对香草兰生理状况及根际土壤微生物区系的影响[J]. *热带作物学报*, 2012, 33(9): 1562-1567.
- [4] HAO W Y, REN L X, RAN W, et al. Allelopathic effects of root exudates from watermelon and rice plants on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* [J]. *Plant & Soil*,

- 2010, 336(1/2): 485 – 497.
- [5] JIN X, WU F, ZHOU X. Different toxic effects of ferulic and p-hydroxybenzoic acids on cucumber seedling growth were related to their different influences on rhizosphere microbial composition [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2020, 56 (Database Issue): 125-136.
- [6] ZWETSLOOT MJ, KESSLER A, BAUERLE TL. Phenolic root exudate and tissue compounds vary widely among temperate forest tree species and have contrasting effects on soil microbial respiration [J]. *New Phytol*, 2018, 218(2): 530 – 541.
- [7] LIU J, LI X, JIA Z, et al. Effect of benzoic acid on soil microbial communities associated with soilborne peanut diseases [J]. *Applied Soil Ecology*, 2016, 110(Complete): 34 – 42.
- [8] 张璐, 杨瑞秀, 王莹, 等. 甜瓜连作土壤中酚酸类物质测定及降解研究 [J]. *北方园艺*, 2017(9): 18 – 23.
- [9] 刘帅, 黄坤, 陈乐, 等. 烟草根系分泌物及其化感作用研究进展 [J]. *亚热带农业研究*, 2018, 14(1): 61 – 65.
- [10] ZHANG F G, MENG X H, YANG X M, et al. Quantification and role of organic acids in cucumber root exudates in *Trichoderma harzianum* T-E5 colonization. [J]. *Plant physiology and biochemistry*, 2014, 83: 250 – 7.
- [11] LIU J G, WANG X X, ZHANG T L, et al. Assessment of active bacteria metabolizing phenolic acids in the peanut (*Arachis hypogaea* L.) rhizosphere [J]. *Microbiological Research*, 2017, 205: 118 – 124.
- [12] HAO W Y, REN L X, RAN W, et al. Allelopathic effects of root exudates from watermelon and rice plants on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* [J]. *Plant and Soil*, 2010, 336(1-2): 485 – 497.
- [13] ZHOU X, YU G B, WU F Z. Responses of soil microbial communities in the rhizosphere of cucumber (*Cucumis sativus* L.) to exogenously applied p-hydroxybenzoic acid [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2012, 38(8): 975 – 983.
- [14] MANDAL SM, CHAKRABORTY D, DEY S. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses [J]. *Plant Signal Behav*, 2010, 5(4): 359 – 368.
- [15] 刘云露. 黄连土壤微生物多样性及其酚酸降解菌筛选与降解机制 [D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- [16] 张春杨, 于春雨, 高金山. 花生土壤酚酸降解菌的分离和鉴定 [J]. *安徽农业科学*, 2020, 48(5): 93 – 95.
- [17] 孙秀, 王秀峰, 魏珉, 等. 肉桂酸降解真菌的筛选及其降解液对黄瓜种子发芽的影响 [J]. *园艺学报*, 2014, 41(4): 765 – 772.
- [18] 王辉, 邢诒彰, 王华, 等. 解磷细菌筛选鉴定及其在香草兰上的应用效果研究 [J]. *热带作物学报*, 2016, 37(4): 660 – 664.
- [19] LI XG, DING CF, HUA K, et al. Soil sickness of peanuts is attributable to modifications in soil microbes induced by peanut root exudates rather than to direct allelopathy [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 78: 149 – 159.
- [20] ZHAO Q, DONG C, YANG X, et al. Biocontrol of *Fusarium* wilt disease for *Cucumis melo* melon using bio-organic fertilizer [J]. *Applied Soil Ecology*, 2011, 47(1): 67 – 75.
- [21] DERAKHSHNI HOOMAN, TUN HEIN, KHAFI-POUR EHSAN. An extended single-index multiplexed 16S rRNA sequencing for microbial community analysis on MiSeq illumina platforms [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2016, 56(3): 321 – 6.
- [22] WALI PR, AHLHOLM JU, HELANDER M, et al. Occurrence and genetic structure of the systemic grass endophyte *Epichloë festucae* in fine fescue populations [J]. *Microbial Ecology*, 2007, 53(1): 20 – 29.
- [23] KATAOKA M, UEDA K, KUDO T, et al. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 151: 249 – 255.
- [24] AUSUBEL F M. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998: 39-40
- [25] LANOUE A, BURLAT V, HENKES GJ, et al. De novo biosynthesis of defense root exudates in response to *Fusarium* attack in barley [J]. *New Phytol*, 2010, 185(2): 577 – 588.
- [26] MICHIELSE C B, REIJNEN L, OLIVAIN C, et al. Degradation of aromatic compounds through the β -keto adipate pathway is required for pathogenicity of the tomato wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(9): 1089 – 1100.
- [27] 赵青云, 赵秋芳, 王辉, 等. 根际促生菌 *Bacillus subtilis* Y-IVI 在香草兰上的应用效果研究 [J]. *植物营养与肥料学报*, 2015, 21(2): 535 – 540.
- [28] 何志刚, 娄春荣, 王秀娟, 等. 番茄自毒物质降解菌的筛选及其降解效果 [J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(5): 114 – 116.
- [29] BARDGETT RICHARD D, PUTTEN WIM H. Below-ground biodiversity and ecosystem functioning [J]. *Nature*, 2014, 515(7528): 505 – 11.
- [30] XIONG W, LI R, REN Y, et al. Distinct roles for soil fungal and bacterial communities associated with the suppression of vanilla *Fusarium* wilt disease [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 107: 198 – 207.
- [31] 李佳昊. 栽植年限对苹果园土壤肥力和生物学性状的影响及衰老果园土壤修复技术研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [32] XIONG W, ZHAO Q Y, XUE C, et al. Comparison of fungal community in black pepper-vanilla and vanilla monoculture systems associated with vanilla *Fusarium* wilt disease [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 117.

Screening, identification and antimicrobial activity of microbial strains degrading autotoxic phenolic acids in the rhizosphere of vanilla

WANG Jie^{1,2}, WANG Beibei¹, SHANG Fangjian², SU Lanxi²,
ZHAO Shaoguan^{2,3}, HONG Shan², ZHAO Qingyun²

(1. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 2. Hainan Key Laboratory of Genetic Improvement and Quality Control of Tropical Spice and Beverage Crops, Wanning, Hainan 517533; 3. College of Agricultural Resources and Environmental Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450000, China)

Abstract: In order to explore the use of beneficial microorganisms to degrade root autotoxic substances, alleviate the biological obstacles of continuous cropping of vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.), and reserve beneficial microbial resources, microbial strains degrading phenolic acids which are autotoxic substances in the rhizosphere of vanilla plantations were screened by using the traditional isolation and culture method. Degrading activity of the isolated microbial strains against the phenolic acids in culture medium and continuous cropping soil and their plate inhibition ability against pathogenic agents were determined, and 6 microbial strains were isolated from the rhizosphere of vanilla plantations with continuous cropping, which were labelled fungi BM-5, FD-21 and BD-8, and bacteria ZD-4, ZH-19 and ZH-20. The fungal strain FD-21 when cultured in shake flasks for 72 h, had degradation rates of 78.87%, 89.5% and 93.62% for p-benzoic acid, p-hydroxybenzoic acid and salicylic acid, respectively, but it had degradation rates of 43.5%, 34.2% and 67.28%, respectively, when thermostatically cultured for 7 days after its inoculation of the continuous cropping soil. The plate bacteriostatic effect test showed that the 6 strains had a certain antagonistic effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*, a pathogen of vanilla soil-borne Fusarium wilt disease. The bacterial strains ZH-19 and ZH-20 had the highest inhibition rates against *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, which were 82.87% and 82.94%, respectively, and the fungal strain FD-21 had an inhibition rate of 45.49% against *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*. 16S rRNA and ITS sequence alignment showed that the bacterial strain ZD-4 was identified as *Bacillus subtilis*, the bacterial strain ZH-19 as *Bacillus anthracis*, the bacterial strain ZH-20 as *Bacillus amyloliquefaciens*, the fungal strain BM-5 as *Talaromyces* sp., the fungal strain FD-21 as *Penicillium* sp., the fungal strain BD-8 as *Penicillium citrinum*. This indicates that the screened microbial strains can degrade autotoxic phenolic acids secreted by the vanilla roots and have an antagonistic effect on *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*.

Keywords: vanilla; autotoxic substance; phenolic acid degrading microbe; screening; identification

(责任编辑:谭正洪 责任编辑:叶 静)