

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.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.032

番茄自毒物质降解菌的筛选及其降解效果

何志刚, 娄春荣, 王秀娟, 董环, 赵颖

(辽宁省农业科学院植物营养与环境资源研究所, 辽宁沈阳 110161)

摘要:通过筛选用于降解番茄分泌自毒物质苯甲酸的菌株, 研究其降解效果。以苯甲酸为唯一碳源, 采用逐渐提高苯甲酸浓度的驯化方法, 筛选到3株能够高效降解苯甲酸的菌株, 经过鉴定分别为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 alkaliolerans*。3株菌株发酵培养的降解率分别为95.32%、91.63%和90.15%, 并且对番茄根系分泌的自毒物质(肉桂酸、香草酸等)均有较强的降解效果, 盆栽试验结果表明, 通过施加菌剂可以有效缓解自毒物质对番茄幼苗的抑制作用, 明显提高番茄苗期株高和叶绿素等生长指标, 根际自毒物质降解率最高达到98.69%, 后期增产效果显著, B2菌株增产达到16.20%。筛选到的3株菌株具有用于修复番茄连作障碍的微生物菌肥的潜力。

关键词:番茄; 自毒物质; 降解菌; 筛选; 降解效果

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)05-0114-03

设施农业连作障碍严重制约着我国番茄生产, 而引起连作障碍的原因主要为土传病害、根系分泌物的自毒作用以及土壤理化性质劣变^[1]。有研究表明, 酚酸类自毒物质具有化感抑制作用, 而酚酸类化合物已被鉴定是植物根系分泌物中的主要自毒物质^[2]。作物分泌的多酚类化合物能破坏细胞膜的功能, 抑制受体植物超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性, 导致体内活性氧含量增多, 启动膜质过氧化, 破坏膜结构。另有研究发现, 化感物质可明显抑制受体三磷酸腺苷(ATP)酶的活性, 从而影响受体的光合与呼吸作用^[3-4]。高浓度苯甲酸和肉桂酸能显著抑制番茄幼苗根系过氧化物酶(POD)活性, 大

幅度提高枯萎病发病率和病情指数^[5]。

有研究报道, 采用合理施肥、轮作倒茬、土壤消毒、种苗脱毒、施用有机改良剂以及接种生防菌剂等方法, 可以缓解营养元素失衡和病原菌增多引起的再植病害, 利用微生物制剂可缓解酚酸和丙烯酸对草莓、黄瓜的自毒危害^[6], 但目前尚未利用微生物制剂消除番茄自毒物质的报道。本研究探索了利用微生物菌剂降解番茄根系分泌自毒物质苯甲酸的可行性, 以期对番茄连作障碍微生态修复剂的研制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 培养基

试验采用无机盐培养基, 各组成成分及含量分别为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, Na_2HPO_4 1.3 g/L, 苯甲酸 100~1 000 mg/L, NaCl 5 g/L, 余量为水; pH值6.8~7.2。

1.2 菌株的分离

采用逐渐提高苯甲酸浓度的驯化方法, 将连作多年番茄根系土壤悬液按10%的接种量接种于含有100 mg/L苯甲酸的无机盐培养基中, 30℃摇床150 r/min, 培养3 d后, 以10%接种量转至苯甲酸浓度为300 mg/L的无机盐培养基中, 继续

收稿日期: 2016-02-15

基金项目: 国家现代农业产业技术体系“辽宁省设施蔬菜产业创新团队资助项目”辽宁省科技厅农业攻关项目(编号: 201215003、201315003、201415003)。

作者简介: 何志刚(1978—), 男, 辽宁沈阳人, 硕士, 副研究员, 主要从事土壤微生物研究。Tel: (024) 31023034; E-mail: hezhigang1227@sina.com。

通信作者: 娄春荣, 硕士, 研究员, 主要从事设施农业研究。Tel: (024) 31028118; E-mail: lerlys@126.com。

[10] 张春平, 何平, 曲志才, 等. 硝酸银对黄瓜雌性系的诱雄效应[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2007, 29(2): 49-52.

[11] 顾兴芳, 张圣平, 徐彩清, 等. 黄瓜雌性系诱雄方法研究[J]. 北方园艺, 2003(5): 41.

[12] 于晓莹, 宋铁峰. 黄瓜雌性系诱雄方法研究[J]. 吉林蔬菜, 2013(1): 48-49.

[13] 邬树桐, 李向英, 孙小镭, 等. 黄瓜雌性系硝酸银诱雄法试验简报[J]. 山东农业科学, 1983(1): 46-47.

[14] 金洪, 崔秀敏, 王志国, 等. 不同苗龄喷施硝酸银对黄瓜雌性系诱雄效果的研究[J]. 山东农业科学, 2010(1): 32-35.

[15] 艾辛, 何长征, 彭振春. 硝酸银诱导雌性黄瓜产生两性花的效应及其应用研究[J]. 湖南农业大学学报, 2000, 26(2): 93-96.

[16] 黄作喜, 卿东红, 刘兰. 生长调节剂诱导西葫芦、黄瓜雌花分化和发育的研究[J]. 北方园艺, 2007(5): 8-9.

[17] 曹毅, 任吉君, 李春梅, 等. 乙烯利和赤霉素对黄瓜性别表现的影响[J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(1): 42-44.

[18] 丁小涛, 郝婷, 金海军, 等. 硝酸银和赤霉素处理对黄瓜雌性系诱雄效果的比较[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2013, 31(6): 1-5, 29.

[19] 刘思宇, 刘剑辉, 詹云, 等. 农用有机硅助剂对全雌性早黄瓜诱雄效果影响的研究[J]. 中国林副特产, 2014(6): 17-20.

[20] 姜明仙, 张莲娣, 冯志红. 黄瓜雌性系选育及其利用[J]. 宁夏农林科技, 1989(2): 16-22.

[21] 李加旺, 张文珠. 植物生长调节剂与黄瓜化控栽培[J]. 北方园艺, 2000(5): 5-6.

培养。按此方式连续循环3次,直到苯甲酸浓度达到1 000 mg/L,然后进行平板涂布,将培养皿放于30 ℃恒温培养箱中培养72 h,挑取单菌落,转接入液体无机盐培养基中,反复涂布^[7]。

1.3 菌株的筛选与鉴定

1.3.1 初筛 将5 mL苯甲酸降解菌筛选液体培养基装入15 mm×150 mm试管中,121 ℃灭菌30 min,冷却后将分离得到的菌株悬液接种到液体培养基中,每菌株重复2管,28 ℃避光培养5 d,每24 h观察记录1次生长情况,根据生长状况初筛菌株。

1.3.2 复筛 将苯甲酸降解菌筛选液体培养基装入250 mL三角瓶中,每瓶50 mL,灭菌后冷却。将初筛试验得到的菌悬液接入三角瓶中,接种量为每瓶1 mL,对照接入1 mL无菌水,每处理重复3次,28 ℃避光培养10 d,检测苯甲酸残留量,计算降解率。

1.3.3 鉴定 对复筛获得的菌株进行16S rDNA序列测定。采用通用引物进行PCR扩增。取PCR产物1 μL进行1%琼脂糖凝胶电泳,EB染色后紫外检测。用琼脂糖凝胶纯化试剂盒(大连宝生物公司)切胶回收PCR产物进行测序分析。16S rDNA的测序工作由大连宝生物公司完成。将菌株的16S rDNA序列测序结果登录GenBank,并用BLAST与GenBank中的16S rDNA序列进行同源性比较。将得到的相似菌株的16S rDNA,利MEGA 5.0软件,构建系统发育树,分析各分离菌株的进化地位,同时利用生理生化指标进行进一步鉴定。

1.4 菌株对苯甲酸的降解试验

将50 mL苯甲酸作唯一碳源的降解液体培养基分别装入250 mL三角瓶中,灭菌冷却后接入复筛获得的菌悬液,接种量为每瓶1 mL,对照接入1 mL无菌水,每处理重复3次,28 ℃避光培养7 d后,检测苯甲酸残留量。

1.5 底物广谱性

取50 mL锥形瓶,每个锥形瓶中加入25 mL无机盐培养基,以不同的芳香化合物作为唯一碳源和能源进行培养,48 h后观察菌株的生长情况。

1.6 苯甲酸的测定方法

取待测液20 mL,加入到50 mL离心管中,充分搅拌后,摇床振荡2 h,然后室温下8 000 r/min离心10 min,取上清液置于51 ℃旋转蒸发仪蒸发至干,然后加高纯水定容至2 mL,

进样前过0.22 μm微孔滤膜作为进样品。标准样品苯甲酸为色谱纯,具体方法采用文献[8]方法,色谱柱为Agilent C₁₈柱(250 mm×4.0 mm×5 μm);柱温为30 ℃;紫外检测波长为230 nm;流动相为甲醇:0.02 mol/L乙酸铵=7:93;流速为1.0 mL/min;进样体积为10 μL。

标准曲线的制作:分别移取浓度为1.0 mg/mL的苯甲酸标准储备液0.25、0.50、1.00、2.00、5.00 mL,至100 mL容量瓶中,用水稀释成浓度分别为2.5、5.0、10.0、20.0、50.0 μg/mL的混合标准使用溶液,按上述的色谱条件进样分析,以标准浓度为横坐标、峰面积为纵坐标制作标准曲线。

1.7 盆栽试验

试验共设4个处理:对照(CK)、B2、A11、F2。菌株发酵后利用草炭吸附最终菌株的数量约10⁸ CFU/g。采用营养钵育苗的方法,每个营养钵装土300 g,播种前各处理施入等量氮、磷、钾,其中CK施化肥,其他处理按2%(质量分数)的施肥量拌入。营养钵育苗至2~3张真叶时移栽到盛有5 kg土的盆钵中(盆钵土壤加入0.6 mmol/L苯甲酸60 mL预处理),每盆栽种3株苗,每处理5盆(重复)。盆中菌肥的施用量均为0.5%(质量分数)。苗期测定株高、叶绿素含量、根际土壤中苯甲酸含量(方法同上),成熟期测定产量。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离筛选与鉴定

能在筛选培养基上良好生长的菌株即能以苯甲酸为唯一碳源,表明其对苯甲酸有降解能力。根据初筛生长状况,分离得到156株菌株,经复筛获得3株降解性能较强的菌株,编号分别为B2、F2及A11。经16S rDNA序列测定,将3种菌株的16S rDNA序列测序结果登录GenBank,并用BLAST与GenBank中16S rDNA序列进行同源性比较,发现菌株B2与*Bacillus* sp. CR-7的16S rRNA序列同源性达到100%,菌株F2与*Naxibacter* sp. OX3b1-S6的16S rDNA序列同源性达到100%,菌株A11与*Streptomyces* sp. Ank150的16S rDNA序列同源性达到100%。经过生理生化指标综合鉴定后B2为芽孢杆菌属枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*,A11为链霉菌属吸水链霉菌*Streptomyces hygrosopicus*,F2为纳西杆菌属耐碱纳西杆菌*Naxibacter alkalitolerans*。利用MEGA 5.0软件构建系统发育树如图1。

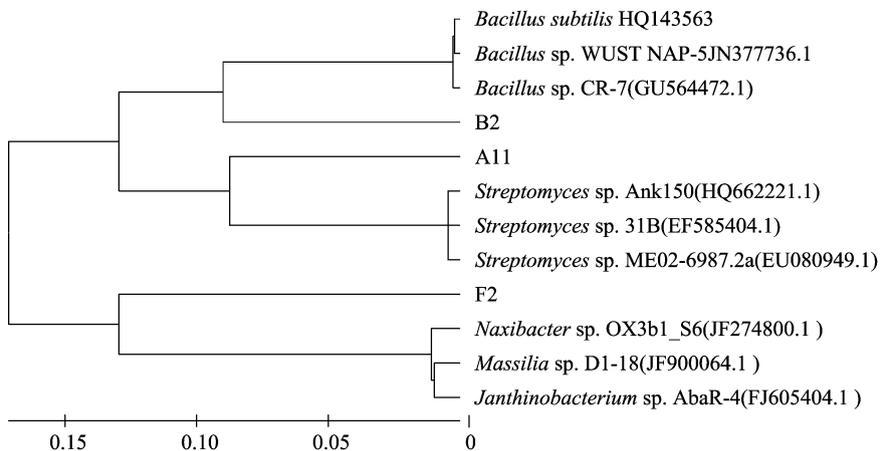


图1 菌株系统发育树

2.2 菌株对苯甲酸的降解率

从表1可知,在以苯甲酸为唯一碳源且其初始质量浓度为50 mg/L时,B2、F2及A11的降解率分别为95.32%、91.63%、90.15%。

表1 以苯甲酸为唯一碳源时菌株对其的降解率

处理	苯甲酸残留质量浓度 (mg/L)	降解率 (%)
CK	49.35	0
B2	2.34	95.32
F2	4.19	91.63
A11	4.93	90.15

2.3 底物广谱性

某些植物可通过地上部淋溶、根系分泌和植株残茬腐解等途径来释放一些物质对同茬或下茬同种或同科植物生长产生抑制作用,这种现象被称为自毒作用^[9]。目前,已在番茄、黄瓜和辣椒等多种设施园艺作物组织和根系分泌物中分离出包括苯甲酸、肉桂酸和水杨酸在内的10余种自毒物质^[10]。从表2中可以看到,B2除了对香草酸降解能力稍低外,对其他几种醛酸类物质都有一定降解能力,A11除对肉桂酸降解能力稍差外,对其他几种醛酸类物质都有较好的降解能力,F2对除了水杨酸以外的其他醛酸类物质都能降解。

表2 菌株对不同醛酸类物质利用的情况

处理	苯甲酸	对羟基苯甲酸	香草酸	水杨酸	肉桂酸
B2	+++	+++	+	++	+++
F2	++	++	++	-	++
A11	++	+++	++	++	+

注:“+++”、“++”、“+”、“-”表示完全降解、部分降解、少部分降解、不能降解。

2.4 菌株对番茄自毒作用的缓解效果

从表3、表4可以看出,不同处理对番茄幼苗的生物量及叶绿素含量的影响具有显著差异。CK处理的幼苗在各指标中处于最低值,并且与其他3组处理相比均差异显著,说明自毒物质对番茄幼苗有一定的抑制作用,通过添加菌肥可以降解一定量的自毒物质。从表4可见,菌株均可以降解添加的自毒物质,其中B2处理表现比较明显。从盆栽产量及经济效益观察,添加菌肥的经济产量和CK差异显著,其中B2增产16.19%。

表3 菌株对番茄自毒作用的缓解效果

处理	苗期株高 (cm)	苗期叶绿素 (SPAD值)	经济产量 (kg/hm ²)	经济效益 (元/hm ²)
CK	20.58b	48.65b	4 523.094c	22 615.47c
B2	27.21a	55.25a	5 255.603a	26 278.01a
F2	29.51a	52.84a	5 053.121b	25 265.6b
A11	28.55a	53.21a	4 977.190b	24 885.95b

注:同列数据后不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

表4 菌株对番茄自毒物质的降解率

处理	苯甲酸残留质量浓度 (μg/mL)	降解率 (%)
CK	34.08	5.33
B2	0.47	98.69
F2	0.80	97.78
A11	1.41	96.08

3 结论

作物连作障碍的产生原因是错综复杂的,是作物与土壤2个系统内部诸多因素综合作用结果的外观表现。由于作物种类和栽培条件不同,作物发生连作障碍的主要原因也可能不同。自毒物质通过影响植物生理生化代谢活动进而影响植物生长发育,根系是植物接触化感物质最早的器官^[11]。本研究结果表明,从土壤中可以筛选到能分解番茄根泌自毒物质苯甲酸、解除化感抑制作用的菌株。在实验室条件下,以苯甲酸为唯一碳源,供试菌株均对苯甲酸具有较强的降解作用,这些菌株具有作为番茄根泌自毒物质降解菌的潜力,可用于番茄连作障碍的微生物修复,至于这些具有解毒功能的菌株在番茄生产中的实际效果,尚待后续的生物试验证明。

参考文献:

- [1] 喻景权,杜尧舜. 蔬菜设施栽培可持续发展中的连作障碍问题[J]. 沈阳农业大学学报,2000,31(1):124-126.
- [2] 黄高宝,柴强,黄鹏. 植物化感作用影响因素的再认识[J]. 草业学报,2005,14(2):16-22.
- [3] Batish D R, Singh H P, Pandher J K, et al. Phytotoxic effect of Parthenium residues on the selected soil properties and growth of chickpea and radish[J]. Weed Biol Mgmt,2002,2(2):73-78.
- [4] 翟彩霞,张彦才,王占武,等. 土壤生态调控剂缓解酚酸类物质对番茄苗期生长抑制作用的效果[J]. 华北农学报,2006,21(增刊2):54-58.
- [5] 李华玮,赵绪永,李鹏坤. 作物连作障碍中酚酸类物质的生物降解研究[J]. 中国农学通报,2011,27(18):168-173.
- [6] 喻国辉,谢银华,陈燕红,等. 利用微生物缓解苯丙烯酸对黄瓜生长的抑制[J]. 微生物学报,2006,46(6):934-938.
- [7] 程丽娟,薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 西安:世界图书出版公司,2000.
- [8] 王刚,王文平,梁桂娟. 高效液相色谱法测定酱油及食醋中的苯甲酸和山梨酸[J]. 中国酿造,2012,31(6):182-184.
- [9] 薛泉宏,同延安. 土壤生物退化及其修复技术研究进展[J]. 中国农业科技导报,2008,10(4):28-35.
- [10] 邓天福,王建华,高扬帆,等. 番茄化感物质对几种蔬菜幼苗生长的影响[J]. 贵州农业科学,2010,38(8):43-44,47.
- [11] 扈金丽,尹宝重,甄文超,等. 防治草莓连作障碍的复合生防制剂的筛选[J]. 中国农学通报,2011,27(13):249-252.