

DOI: 10.5846/stxb201308132074

谢星光, 戴传超, 苏春沧, 周佳宇, 王宏伟, 王兴祥. 内生真菌对花生残茬腐解及土壤酚酸含量的影响. 生态学报, 2015, 35(11): 3536-3845.

Xie X G, Dai C C, Su C L, Zhou J Y, Wang H W, Wang X X. Effects of an endophytic fungus on decay of peanut residues and phenolic acid concentrations in soil. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(11): 3536-3845.

内生真菌对花生残茬腐解及土壤酚酸含量的影响

谢星光¹, 戴传超¹, 苏春沧¹, 周佳宇¹, 王宏伟¹, 王兴祥^{2,3,*}

1 南京师范大学生命科学学院, 江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心, 江苏省微生物与功能基因组学重点实验室, 南京 210023

2 中国科学院土壤环境与修复重点实验室(南京土壤研究所), 南京 210008

3 中国科学院红壤生态实验站, 江西省红壤生态研究重点实验室, 鹰潭 335211

摘要: 土壤中花生残茬是导致连作障碍的原因之一。为了探讨施加内生真菌 *Phomopsis liquidambari* (B3) 对加速花生残茬腐解、改善连作花生土壤环境、缓解花生连作障碍的作用及其可能机理, 通过向土壤中添加花生 (*Archis hypogaea*) 残体, 利用盆栽试验探讨了施加 B3 对花生残茬腐解率、土壤部分酚酸物质和酶活性的影响。结果表明: 与 CK 相比, 在萌发期和苗期, 添加 B3 处理显著加快残茬腐解, 提高纤维素木质素降解率, 增加土壤中对羟基苯甲酸、香草酸和香豆酸的含量; 在花生整个生育期, 施加 B3 显著调节了土壤中漆酶、锰过氧化物酶 (Manganese peroxidase, MnP)、木质素过氧化物酶 (Lignin peroxidase, LiP) 和多酚氧化酶 (Polyphenol oxidase, PPO) 活性的动态变化, 这种变化有利于花生残茬快速腐解和酚酸类化感物质的及时转化。开花期之后施加 B3 处理土壤酚酸含量显著降低, 花生荚果增产 19.9%。实时定量 PCR 结果表明内生真菌 B3 在土壤中 30 d 内可以被检测, 并对复杂多样的酚酸类物质具有广谱高效的降解能力。由此说明, 施加内生真菌 B3 可以显著加快连作土壤中花生残茬腐解, 进而通过减少土壤酚酸含量来缓解由残茬腐解引起的连作障碍。

关键词: 花生残茬; 连作障碍; 酚酸; 内生真菌; 土壤酶活

Effects of an endophytic fungus on decay of peanut residues and phenolic acid concentrations in soil

XIE Xingguang¹, DAI Chuanchao¹, SU Chunlun¹, ZHOU Jiayu¹, WANG Hongwei¹, WANG Xingxiang^{2,3,*}

1 Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomics, Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Industrialization of Microbial Resources, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China

2 Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

3 Jiangxi Key Laboratory of Ecological Research of Red Soil, Ecological Experimental Station of Red Soil, Chinese Academy of Sciences, Yingtan 335211, China

Abstract: Peanut residue in the soil is considered to be an obstacle to peanut replanting. We aimed to understand the effect of applying an endophytic fungus [*Phomopsis liquidambari* (B3)] on accelerating peanut residue decay, improving the micro-ecological environment in the soil, and alleviating an obstacle to peanut replanting as well as its possible mechanism. We investigated the dynamics of peanut residue decay, phenolic acid concentrations, and enzyme activities during peanut growth in a pot experiment, where peanut residues were added into soil. Results showed that applying endophytic fungus B3 (treatment B3+) significantly accelerated the decay of peanut residue at the peanut germination and seedling stages; the decay rate increased by 12.0%—14.7% and the degradation rate of cellulose and lignin increased by 13.7%—17.8% and 21.2%—26.0%, respectively, compared with controls (CK). From the flowering to maturation stages, the decay rate of

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目(2012BAD05B04); 国家自然科学基金资助项目(31370507, 30970523); 江苏省高校自然科学研究重大项目(13KJA180003); 南京市科委工程中心创新能力提升项目(201105058)

收稿日期: 2013-08-13; **网络出版日期:** 2014-06-12

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xxwang@issas.ac.cn

peanut residues gradually decreased in treatment B3+, but remained higher than that in CK. In addition, the concentrations of *p*-hydroxybenzoic acid (4-HBA), vanillic acid (VA), and *p*-coumaric acid (*p*-CA) in treatment B3+ were significantly greater than those in CK at the germination and seedling stages. This indicated that application of endophytic fungus B3 significantly promoted the release of phenolic acids during decay of peanut residues before the seedling stage.

The concentrations of the three kinds of phenolic acids in CK were much greater than those in treatment B3+ from flowering to maturation stages, which were critical stages for peanut formation and disease control; a high concentration of phenolic acids was harmful to peanut growth. In treatment B3+, the activities of laccase, manganese peroxidase, lignin peroxidase, and polyphenol oxidase were all significantly greater than those in CK at the corresponding peanut growth period, and peanut pod yield increased by 19.9%, compared with CK. Increases in activities of soil enzymes, which were associated with decay of peanut residues in treatment B3+, should be beneficial to decay of peanut residues and accelerate conversion of harmful phenolic acid allelochemicals. However, there was no significant difference in the decay rate of peanut residues, phenolic acids concentrations, enzyme activities, and peanut pod yield between treatment B3 (applying sterilized endophytic fungus B3) and CK, indicating that the availability of the endophytic fungus B3 in soils is important. To further demonstrate the availability of B3 and its role in degradation of phenolic acids, a real-time quantitative polymerase chain reaction technique was used to monitor dynamics of endophytic fungus B3 during peanut growth. The biodegradability of B3 was also investigated in pure culture. The results showed that endophytic fungus B3 could adapt to a non-host environment and survive for about 30 d in soil containing higher amounts of peanut residues under natural conditions after detaching from its host. With 200 mg/L VA and *p*-CA as the sole carbon source, the degradation rate of VA for 96 h and *p*-CA for 120 h reached 99% after inoculation with B3, and the biomass of B3 increased gradually with time after inoculation. The results suggested that promoting the rapid degradation of peanut residues and regulating dynamics of phenolic acids should be important mechanisms for B3 to alleviate obstacles in peanut replanting.

Key Words: peanut residues; continuous cropping obstacles; phenolic acids; endophytic fungus; soil enzyme activity

花生是我国重要的油料作物,2011 年我国花生播种面积 450 多万 hm^2 , 约占油料作物总面积的 35%^[1]。由于长期连作,花生连作障碍比较普遍^[2]。导致花生连作障碍的因素多种多样^[3-5],其中前茬花生残体及其腐解物往往造成土壤功能和特性下降^[6]、微生物区系失衡^[7]、影响种子萌发和幼苗生长^[8-9]以及土传病原菌增加等往往是抑制花生生长的主要因素^[2,10-11]。土壤酚酸类化感物质积累是作物残茬腐解产生连作障碍的直接原因,主要通过影响植物细胞膜通透性^[12]、矿质元素吸收^[13]、光合作用^[14]及蛋白质和 DNA 合成^[15]等多种途径直接抑制作物生长。

内生真菌是指生长于植物组织细胞间,宿主不表现出感染症状的一类真菌^[16]。前期发现,接种内生真菌 *Phomopsis liquidambari* (B3) 15 d 后,秸秆表面出现空洞和缝隙以及入侵到秸秆表面的 B3 菌体,木质素的阻碍被去除从而显著增强还田秸秆降解^[17-18]。B3 在促进茅苍术 (*Atractylodes lancea*) 凋落物快速降解的初期阶段还加快了 4-羟基苯甲酸 (*p*-hydroxybenzoic acid, 4-HBA)、香草酸 (Vanillic acid, VA) 和香豆酸 (*p*-Coumaric acid, *p*-CA) 的释放^[19];连作花生土壤中施加内生真菌 B3 可以显著提高花生产量、增加花生根瘤数及改善土壤微生态环境^[20]。但连作土壤施加内生真菌 B3 后花生增产与秸秆腐解之间有无关系仍不清楚。因此,本文从施加内生真菌 B3 在加速花生残茬秸秆腐解、减少土壤酚酸含量的角度,进一步探索其缓解花生连作障碍的机理。

1 材料与方法

1.1 供试材料

香草酸 (Vanillic acid, VA) 和香豆酸 (*p*-Coumaric acid, *p*-CA) 均购自 Sigma 公司,乙腈为色谱纯,其它试

剂为分析纯。

供试土壤:盆栽土壤取自江西省鹰潭市中国科学院红壤生态实验站,为红黏土发育的红壤(5—20 cm),多年连作花生。土壤基本理化性质:有机质 18.43 g/kg,全氮 0.83 g/kg,全磷 0.62 g/kg,全钾 9.24 g/kg,碱解氮 2.45 mg/kg,速效磷 19.46 mg/kg,速效钾 243.52 mg/kg,pH 值 5.6(1:2.5 H₂O)。

花生(*Archis hypogaea*):为江西省鹰潭市常规品种赣花 5 号。

花生残体:2011 年 9 月收获赣花 5 号花生秸秆并晒干,将花生秸秆(粗蛋白 13.2%,粗脂肪 3.3%,粗纤维 32.5%)剪成 1 cm 大小用于盆栽试验。

内生真菌 B3:为拟茎点霉属(*Phomopsis liquidambari*),分离自大戟科重阳木(*Bischofia polycarpa*)茎内皮。内生真菌菌种 B3 从 PDA(马铃薯葡萄糖固体培养基)斜面转接至 PDB(马铃薯葡萄糖液体培养基)培养基,28 ℃,180 r/min 培养 2 d,培养好后一部分用于摇瓶降解试验,另一部分抽滤获得菌丝,蒸馏水洗涤 3 次,取部分菌丝 60 ℃烘干 48 h 测量干重,剩余部分用于 DNA 提取和施加到试验土壤中。

1.2 试验设计

1.2.1 盆栽试验设计

盆栽试验地点位于南京师范大学植物园(N 31°14',E 118°22'),试验盆钵直径 28 cm,高 23 cm。盆栽试验土壤自然风干后过 2 mm 筛(土壤未作灭菌处理)。2012 年 5 月 15 日装土,每盆装土 6 kg,每盆施加尿素 1.5 g、Ca₃(PO₄)₂ 3 g、KCl 2.5 g。盆钵埋入土壤,盆口距离地面 2 cm。试验分为两部分:A 组用于探讨花生残茬腐解效果及木质素纤维素降解率,共设 3 个处理:对照(CK);土壤中添加内生真菌 B3(B3+);土壤中添加灭活内生真菌 B3(B3-)。每盆折合菌丝干重 2 g,同时用 5 cm × 5 cm 网格袋(孔径 1 mm)装花生秸秆残体 5 g,每盆放 3 袋,置于表层土 0—15 cm 之间,网格袋之间不重叠。B 组用于检测土壤酚酸含量(检测的酚酸为花生连作土壤中含量相对较高的 4-羟基苯甲酸、香草酸和香豆酸^[21])、降解酶活性、内生真菌 B3 含量及花生农艺性状,同样设 3 个处理:对照(CK);土壤中添加内生真菌 B3(B3+);土壤中添加灭活内生真菌 B3(B3-)。每盆折合干菌丝 2 g,同时添加 15 g 花生残体并与深度 0—15 cm 的表层土壤拌匀。试验所有处理每个时间取样点均设 3 个重复。随后立即播种花生,每盆两粒,保证日照和水分。

分别在播种前(第 0 天)、花生萌发期(第 10 天)、苗期(第 30 天)、开花期(第 60 天)、结荚期(第 90 天)和成熟期(第 110 天)从 A 组土壤取出网袋,每盆 3 袋全部取出、混合作为一个重复,用于检测残茬的残留量及木质素纤维素降解率。用内径 2 cm 土钻在相同时期从 B 组取 0—15 cm 深的混合土样,同时在播种第 20 天时从 B 组也取土样用于内生真菌 B3 含量分析。土壤样品分为两部分:用于测定土壤酚酸含量及降解酶活性的样品 4 ℃保藏,用于 PCR 定量分析的土壤样品冻干后-20 ℃保藏。

1.2.2 酚酸类物质的摇瓶降解

内生真菌 B3 对 4-羟基苯甲酸(*p*-hydroxybenzoic acid, 4-HBA)的降解先前已经研究,证明了内生真菌 B3 可以对其高效降解^[22]。但是,不同酚酸有着复杂的结构多样性,内生真菌 B3 是否对土壤多样的酚酸类物质具有广谱高效的降解能力,还需要直接的研究证据,因此本文设计以下试验(选用酚酸同 1.2.1):

取 2 mL 菌丝悬浮液(1.1)分别接种到 2 种不同碳源的矿物盐培养基中(2 g/L NaNO₃,1 g/L K₂HPO₄,0.5 g/L KCl,0.5 g/L MgSO₄,0.01 g/L FeSO₄,pH 值 6.0),碳源分别为 50 mg/L 香草酸(VA)和 50 mg/L 香豆酸(*p*-CA),28 ℃,180 r/min 培养 2 d。一部分菌丝抽滤,60 ℃烘干 48 h 测干重,另一部分菌丝作为相应酚酸类物质降解的种子液。取 2 mL 种子液(大约 1.1—1.2 mg/L 的 B3 菌丝),接种到 50 mL 分别以 200 mg/L VA 和 *p*-CA 作为唯一碳源的矿物盐培养基中,28 ℃ 180 r/min 培养,每 24 h 收集 1 次发酵液检测酚酸的残留量,同时过滤获得 B3 菌丝,蒸馏水洗涤 3 次后 60 ℃烘干 48 h 测真菌生物量。以不添加内生真菌 B3 作为对照,所有的试验组每个时间取样点均设 3 个重复。

1.3 分析方法

1.3.1 花生残茬的残留量及木质素纤维素含量检测

网袋取出后,将网袋中剩余花生残茬置于 60 ℃条件下烘干至恒重,称量并计算残茬的残留量。残茬中木

质素和纤维素含量分别采用浓硫酸法和浓硫酸水解定糖法检测^[23]。

1.3.2 土壤及发酵液中酚酸含量检测

土壤中酚酸类物质浸提方法参照 Hartley^[24],土壤浸提液和摇瓶试验收集的发酵液过 0.22 μm 纤维素薄膜后使用 HPLC 测定^[22]。

1.3.3 土壤降解酶活性检测

漆酶(Laccase)、锰过氧化物酶(Manganese peroxidase, MnP)和木质素过氧化物酶(Lignin peroxidase, LiP)活性检测分别取 1 g 新鲜土样置于 50 mL 离心管,注入 9 mL 相应缓冲液(漆酶:磷酸盐缓冲液,pH 值 6.0;MnP:乙酸-乙酸钠缓冲液,pH 值 4.0;LiP:酒石酸钠缓冲液,pH 值 3.0),摇床震荡 10 min (28 $^{\circ}\text{C}$ 180 r/min),取出后离心 5 min (3500 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$),上清液即为粗酶液。

酶活测定体积为 6 mL。漆酶检测体系包括缓冲液 3.7 mL,10 mmol/L ABTS (2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑磷-6-磺酸))0.3 mL,粗酶液 2 mL。MnP 测定体系包括相应缓冲液,0.2 mmol/L MnSO_4 ,0.1 mmol/L H_2O_2 ,0.4 mmol/L 愈创木酚,2 mL 粗酶液。LiP 测定体系包括相应缓冲液,20 mmol/L 藜芦醇,54 mmol/L H_2O_2 ,2 mL 粗酶液。所有反应均在 28 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中反应 3 min,随后立即转入冰水中终止反应。紫外分光光度计测定 420 nm、465 nm 和 310 nm 处吸光值的变化来分别反应漆酶、MnP 和 LiP 活性。定义 1 min 氧化 1 μmol ABTS 所需的酶量为 1 个漆酶活力,1 min 氧化 1 μmol 愈创木酚所需的酶量为 1 个 MnP 活力,1min 氧化藜芦醇产生 1 μmol 藜芦醛所需的酶量为 1 个 LiP 活力,单位为 U/g 干土。每个样品 3 个重复,以煮沸灭活粗酶液为对照^[25-26]。

多酚氧化酶(Polyphenol oxidase, PPO)活性检测取 1 g 新鲜土样,置于 50 mL 三角瓶中,注入 10 mL 1%邻苯三酚溶液,震荡(30 $^{\circ}\text{C}$ 180 r/min)2 h。取出后加 4 mL pH 值 4.5 柠檬酸-磷酸缓冲液,再加入 35 mL 乙醚,用力摇荡数次,萃取 30 min。最后,将含溶解的紫色没食子素的乙醚相进行比色,比色波长为 430 nm。PPO 活性以 2 h 后 1 g 土壤中紫色没食子素的毫克数来表示。每个样品 3 个重复,以石英砂作为对照^[27]。

1.3.4 DNA 提取和实时定量 PCR

为了探究内生真菌 B3 在土壤中的存活状况及花生不同生长时期土壤中含量的变化趋势,设计如下试验:

内生真菌 B3 DNA 提取方法参照 Shishido^[28],提取的内生真菌 B3 基因组 DNA 稀释 10 倍以减少 PCR 扩增的抑制物。使用 UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit(Mo BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA)提取土壤总 DNA。使用特异性引物 Bf1(5'-CTG GCC CCC TCG GGG TCC CTG G-3')和 Br1(5'-TTT CAG GGC CTG CCC TTT TAC AGG C-3')扩增 B3 菌的一段 ITS 序列(转录间隔区;B3 菌株 ITS 序列号 HQ285146)^[22],扩增片段为长度为 320 bp。实时定量 PCR 扩增使用定量 PCR 仪(ABI step one, USA),标准曲线制作及扩增反应体系参照文献^[29]。

1.3.5 花生农艺指标检测

花生收获时,测定花生株高、主根长、分支数、荚果产量(干重)、秸秆质量(干重)和根瘤数,荚果产量为每盆花生荚果的总质量,根瘤数为每盆花生的总根瘤数。

1.4 数据处理

使用 Excel2003 进行数据统计和作图。采用 SPSS13.0 软件进行方差分析(One-Way ANOVA)分别检验不同处理和不同时间段之间的差异显著性,并用 Duncan 法进行多重比较。

2 结果

2.1 施加内生真菌 B3 对花生残茬腐解的影响

表 1 可知,整个取样时期 CK 和 B3-处理在残茬残留量、纤维素木质素降解率之间无显著差异。CK、B3-和 B3+处理残茬腐解的变化趋势相似,残茬分解主要都集中在萌发期和苗期,而从开花期至成熟期,残茬腐解

率增加速度都较为缓慢。但是, B3+处理在萌发期和苗期就表现出显著加速残茬分解的作用, 比 CK 分别提高了 12.0% 和 14.7%; 成熟期残茬腐解率达到 84.5%, 比 CK 提高了 19.8%。同时, B3+处理花生残茬纤维素和木质素的降解率也显著大于 CK, 在萌发期纤维素和木质素降解率分别为 43.1% 和 30.4%, 比 CK 提高了 13.7% 和 21.2%; 在苗期比 CK 分别提高了 17.8% 和 26.0%; 成熟期花生残茬纤维素和木质素降解率分别为 85.2% 和 71.6%, 比 CK 提高了 11.4% 和 13.8%。上述结果说明施加内生真菌 B3 可以在较短的时间内加快土壤中花生残茬腐解。

表 1 土壤中施加 *Phomopsis liquidambari* (B3) 对花生残茬腐解的影响
Table 1 Effects of *Phomopsis liquidambari* (B3) on peanut residues decay in soil

项目 Item	处理 Treatments	萌发期 Germination	苗期 Seedling	开花期 Flowering	结荚期 Podding	成熟期 Maturity
残茬残留量/% Residual quantity	CK	80.36±2.31bE	65.42±2.22bD	52.82±2.33bC	43.73±2.82bB	35.22±1.78bA
	B3-	79.56±3.23bE	66.03±2.50bD	52.55±2.83bC	44.46±1.87bB	34.36±2.68bA
	B3+	68.34±4.05aE	50.76±2.33aD	36.09±3.11aC	25.43±2.81aB	15.46±1.99aA
纤维素降解率/% Cellulose degradation rate	CK	29.39±0.90aA	44.36±1.73aB	50.61±2.30aC	66.11±2.48aD	73.81±2.61aE
	B3-	30.03±2.90aA	44.07±1.70aB	50.70±2.92aC	65.91±2.17aD	73.38±1.45aE
	B3+	43.13±2.75bA	62.18±3.99bB	74.38±1.98bC	80.07±2.26bD	85.23±2.09bE
木质素降解率/% Lignin degradation rate	CK	9.16±1.54aA	24.97±2.52aB	40.06±2.55aC	49.43±2.11aD	57.73±1.51aE
	B3-	9.09±0.71aA	25.00±1.79aB	39.74±3.07aC	49.97±2.31aD	58.71±1.62aE
	B3+	30.40±2.45bA	51.01±2.75bB	57.23±1.16bC	65.07±1.33bD	71.57±1.48bE

小写字母代表不同处理相同时期差异性, 大写字母代表相同处理不同时期差异性 ($P<0.05$)

2.2 施加内生真菌 B3 对土壤酚酸含量的影响

表 2 可知, 花生整个生育期 B3-处理土壤中 4-羟基苯甲酸 (4-HBA)、香草酸 (VA) 和香豆酸 (*p*-CA) 含量变化与 CK 间无显著差异。从萌发期到结荚期, CK 和 B3+处理土壤中 4-HBA 含量在各生育期之间发生显著变化, CK 中 4-HBA 的释放量随时间延长而增加并在结荚期达到最大值, 比播种前增加了 44.9%。B3+处理 4-HBA 含量则在苗期达到最大值 (比 CK 同期增加 46.4%), 随后逐渐下降, 结荚期时含量与播种前基本相似。CK 和 B3+处理不同生育期土壤中 VA 和 *p*-CA 含量也发生显著变化, 主要区别为从播种前至结荚期, CK 土壤中 VA 和 *p*-CA 含量随着生育期延长而显著增加并在结荚期达到最大值, 成熟期时 VA 和 *p*-CA 含量与结荚期相比显著降低, 但仍比播种前分别增加了 32.0% 和 34.7%。B3+处理土壤中 VA 和 *p*-CA 含量从萌发期开始逐渐增加, 并都在苗期都达到最大值, 随后都显著下降, 且成熟期与播种前相比 VA 和 *p*-CA 含量分别下降了 14.7% 和 13.5%。总体看来花生不同生育期土壤中酚酸含量随着花生残茬腐解程度差异而不同; 在相同生育期, 土壤酚酸含量则显著受到接种内生真菌 B3 的影响, 且与 CK 相比, 苗期之前 B3+处理显著加快残体中酚酸类物质的释放, 开花期及之后, B3+处理土壤酚酸含量显著降低。

表 2 施加 *Phomopsis liquidambari* (B3) 对土壤酚酸含量的影响
Table 2 Effects of *Phomopsis liquidambari* (B3) on phenolic acids in soil

项目 Item	处理 Treatment	播种前 Presowing	萌发期 Germination	苗期 Seedling	开花期 Flowering	结荚期 Podding	成熟期 Maturity
4-HBA/ (mg/kg 干土)	CK	2.65±0.06aA	2.74±0.09aA	3.02±0.15aB	3.49±0.14bC	3.84±0.20bD	3.86±0.14bD
	B3-	2.64±0.14aA	2.73±0.16aA	3.12±0.26aB	3.58±0.23bC	3.65±0.16bC	3.98±0.12bC
	B3+	2.65±0.14aA	3.22±0.38bB	4.42±0.30bC	3.07±0.27aB	2.63±0.19aA	2.46±0.24aA
VA/(mg/kg 干土)	CK	1.53±0.10aA	1.83±0.12aB	1.98±0.12aBC	2.00±0.15bC	2.39±0.18bD	2.02±0.07bC
	B3-	1.51±0.09aA	1.75±0.13aA	2.03±0.09aB	2.06±0.15bB	2.31±0.18bC	1.95±0.08bB
	B3+	1.50±0.07aB	2.96±0.12bD	3.12±0.18bE	1.93±0.08aC	1.52±0.15aB	1.28±0.09aA
<i>p</i> -CA/(mg/kg 干土)	CK	3.14±0.18aA	3.53±0.24aB	3.94±0.18aC	4.49±0.32bE	5.95±0.24bF	4.23±0.21bD
	B3-	3.20±0.14aA	3.40±0.25aB	3.80±0.14aC	4.63±0.32bE	5.72±0.24bF	4.19±0.15bD
	B3+	3.18±0.23aB	4.77±0.22bD	6.25±0.35bE	3.41±0.46aC	3.27±0.33aC	2.75±0.13aA

4-HBA: 4-羟基苯甲酸 4-hydroxybenzoic acid; VA: 香草酸 Vanillic acid; *p*-CA: 香豆酸 *p*-Coumaric acid; 小写字母代表不同处理相同时期差异性, 大写字母代表相同处理不同时期差异性 ($P<0.05$)

2.3 施加内生真菌 B3 对土壤中降解酶活性的影响

表 3 可知,3 种酶活性变化趋势在 CK 和 B3-处理之间无显著性差异。在花生不同生长阶段,CK 和 B3+处理土壤漆酶、锰过氧化物酶(MnP)和木质素过氧化物酶(LiP)活性均发生显著改变,表明相同处理下不同生育期土壤酶活性大小不同。从播种前到结荚期,CK 中土壤漆酶和 LiP 活性随着花生生育期缓慢增加并达到最大值,与 CK 相比,B3+处理则增加较快并在苗期达到最大值,而 CK 和 B3+处理土壤 MnP 活性的最大值均在开花期。除此之外,B3+处理土壤漆酶、MnP 和 LiP 的活性均显著高于同期的 CK,说明内生真菌 B3 的施加可以显著增加土壤中残茬降解酶系的活性,尤其是在苗期和开花期,在花生生长后期与 CK 相比 B3+处理仍然保持相对较高的土壤酶活性。

表 3 可知,CK 和 B3-处理土壤 PPO 的活性大小及变化趋势基本相似。在 CK 和 B3+处理中,从萌发期至成熟期,花生不同生育阶段土壤 PPO 活性大小显著不同,主要趋势为土壤 PPO 活性逐渐增加并在结荚期达到最大值(比 CK 同期提高了 47.2%),随后开始下降,同时可以看出各生长阶段 B3+处理 PPO 活性均显著大于 CK,以及在花生成熟时 B3+处理的 PPO 活性仍然相对较高,由此说明随着花生生长土壤中内生真菌 B3 的施加有益于土壤 PPO 活性的增加。

表 3 施加 *Phomopsis liquidambari* (B3) 对土壤中漆酶、锰过氧化物酶、木质素过氧化物酶和多酚氧化酶活性的影响

Table 3 Effects of <i>Phomopsis liquidambari</i> (B3) on laccase, MnP, LiP and PPO activities in soil							
项目 Item	处理 Treatment	播种前 Presowing	萌发期 Germination	苗期 Seedling	开花期 Flowering	结荚期 Podding	成熟期 Maturity
漆酶 Laccase/ (U/g 干土)	CK	0.29±0.03aA	0.38±0.05aB	0.43±0.05aC	0.79±0.05aC	0.87±0.07aD	0.32±0.02aAB
	B3-	0.29±0.03aA	0.36±0.03aB	0.45±0.03aC	0.82±0.01aD	0.90±0.04aE	0.36±0.04aB
	B3+	0.27±0.02aA	0.80±0.06bC	2.03±0.08bF	1.26±0.05bE	0.99±0.07bD	0.45±0.03bB
锰过氧化物酶 MnP / (U/g 干土)	CK	0.16±0.02aA	0.35±0.03aB	0.64±0.02aC	1.20±0.04aF	1.07±0.04aE	0.95±0.02aD
	B3-	0.18±0.02aA	0.34±0.03aB	0.68±0.04aC	1.19±0.02aF	1.09±0.03aE	0.93±0.05aD
	B3+	0.17±0.02aA	0.54±0.05bB	0.85±0.06bC	1.60±0.07bF	1.14±0.02bE	1.08±0.02bD
木质素过氧化物酶 LiP / (U/g 干土)	CK	0.27±0.02aA	0.34±0.03aB	0.46±0.03aC	0.55±0.04aD	0.66±0.05aE	0.45±0.05aC
	B3-	0.26±0.02aA	0.34±0.02aB	0.43±0.04aC	0.56±0.04aD	0.64±0.04aE	0.44±0.03aC
	B3+	0.26±0.02aA	0.47±0.03bB	0.87±0.05bD	0.75±0.02bC	0.71±0.02bC	0.47±0.05aB
多酚氧化酶 PPO mg g ⁻¹ 干土 2h ⁻¹	CK	0.92±0.05aA	0.86±0.02aA	1.22±0.02aB	1.79±0.06aD	2.31±0.08aE	1.67±0.06aC
	B3-	0.90±0.03aA	0.88±0.05aA	1.28±0.04aB	1.79±0.04aD	2.37±0.07aE	1.71±0.04aC
	B3+	0.89±0.04aA	1.27±0.03bB	2.37±0.04bD	2.77±0.05bE	3.40±0.08bF	1.93±0.03bC

MnP: Manganese peroxidase; LiP: Lignin peroxidase; PPO: Polyphenol oxidase; 小写字母代表不同处理相同时期间差异性,大写字母代表相同处理不同时期间差异性($P<0.05$)

2.4 土壤中内生真菌 B3 含量的检测

从 CK、B3-和 B3+ 3 个处理土壤中分别提取土壤总 DNA 进行 RT-PCR。在取样的所有时间点内,CK 和 B3-处理都没有检测到内生真菌 B3 的存在,而在 B3+处理,接种前并没有检测到内生真菌 B3 的基因组 DNA,接种后检测到 B3 的基因组 DNA,并在第 10 天时达到最高值 5.43 log(pg DNA/g 干土),随后土壤内生真菌 B3 的基因组含量逐渐下降,在第 30 天时下降到 0.21 log(pg DNA/g 干土),而在第 60 天的土壤样品中未能检测到内生真菌 B3 的基因组 DNA 的存在(图 1)。

2.5 纯培养条件下内生真菌 B3 对酚酸类物质的降解

表 4 显示分别接种 96 h 和 120 h 后内生真菌 B3 对香草酸(VA)和香豆酸(*p*-CA)的降解率都达到 99% 以上,真菌生物量分别从 1.2 mg/L 和 1.1 mg/L 增加到 556.7 mg/L 和 450.0 mg/L,同时未添加内生真菌 B3 的 CK 中 VA 和 *p*-CA 的浓度没有显著性改变。可以看出内生真菌 B3 对 VA 和 *p*-CA 的大量降解以及自身生物量的增加主要集中在 24—72 h,0—24 h 可能是内生真菌 B3 对新环境的调节适应阶段,而 72—96 h 则主要集中于对 VA 和 *p*-CA 降解产物的进一步降解。由此说明内生真菌 B3 对花生连作土壤中多种酚酸类化感物质

具有广谱高效的降解能力。

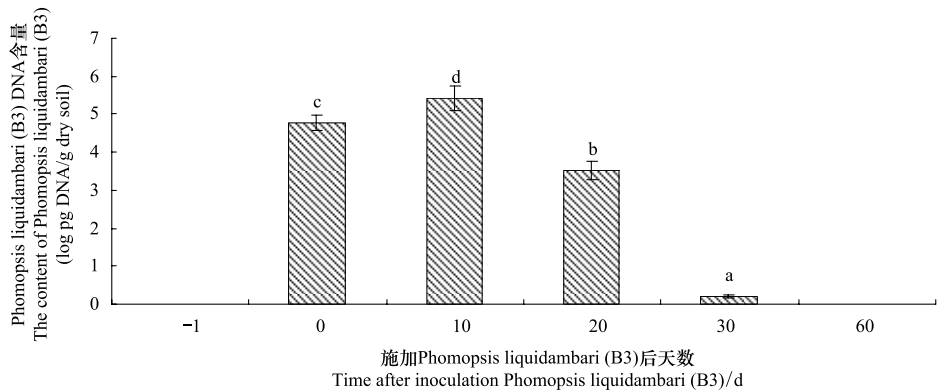


图1 B3+处理组土壤中 *Phomopsis liquidambari* (B3) DNA 含量
Fig.1 Quantification of *Phomopsis liquidambari* (B3) measured by RT-PCR in B3+ soil

表4 *Phomopsis liquidambari* (B3) 对 VA 和 *p*-CA 的摇瓶降解

Table 4 Degradation of VA and <i>p</i> -CA induced by <i>Phomopsis liquidambari</i> (B3) in liquid culture							
项目 Item		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
VA	CK	201.21±7.55aA	203.42±10.82bA	203.12±10.15bA	200.33±9.87bA	202.33±8.60bA	—
	B3+	204.33±10.0aE	130.53±7.12aD	70.33±7.51aC	23.33±5.04aB	0.62±0.10aA	—
	真菌生物量/(mg/L)	1.20±0.10A	7.93±0.47A	260.00±26.50B	483.33±15.28C	556.67±50.33D	—
<i>p</i> -CA	CK	200.67±9.9aA	202.67±5.5bA	201.00±7.21bA	203.33±10.50bA	202.13±9.5bA	198.67±5.00bA
	B3+	200.33±9.1aF	182.33±8.02aE	99.67±10.50aD	34.67±5.03aC	15.00±2.32aB	1.07±0.30aA
	真菌生物量/(mg/L)	1.10±0.10A	36.00±6.00B	140.00±10.00C	226.68±15.28D	396.68±23.09E	450.00±10.00F

小写字母代表不同处理相同时间差异性,大写字母代表相同处理不同时间差异性($P<0.05$)

2.6 施加内生真菌 B3 对花生农艺性状的影响

表5可知,CK和B3-处理花生农艺性状之间的差异并不显著。与CK相比,B3+处理花生主根长、荚果产量、秸秆干重以及根瘤数都有显著的增加,其中荚果产量、秸秆干重和根瘤数分别增加了19.9%、16.1%和21.9%。

表5 高花生残茬土壤中施加 *Phomopsis liquidambari* (B3) 对花生农艺性状的影响

Table 5 Effects of <i>Phomopsis liquidambari</i> (B3) on agronomic characters of peanut in soil with high peanut residues						
处理 Trement	株高 Height/(cm/株)	主根长 Root length/(cm/株)	分支数 Tillers/株	荚果产量 Pod yield/(g/盆)	秸秆 Straw/(g/盆)	根瘤数 Root nodules/盆
CK	44.36±0.91a	14.20±0.44a	6.33±0.58a	64.71±2.51a	39.17±1.06a	65.13±3.98a
B3-	44.45±0.97a	13.58±0.14a	6.33±1.53a	65.50±2.56a	38.34±1.15a	64.68±3.44a
B3+	46.25±1.08a	17.17±0.70b	6.00±1.00a	77.58±2.42b	45.48±0.72b	79.37±3.15b

小写字母代表不同处理间差异性($P<0.05$)

3 讨论

3.1 高花生残茬土壤中施加内生真菌 B3 改善花生农艺性状的机理

Berg和McClaugherty把凋落物分解划为早期阶段、后期阶段和限值阶段^[30]。自然环境中,作物残茬腐解速率的快慢受多种因素制约,包括残体自身的物理化学性质、气候条件以及土壤微生物群落结构等^[31],其中残茬本身木质素的含量是影响其分解速率和降解过程的重要因素,因为土壤中含有大量降解纤维素菌群,而降解木质素的微生物群体却相对较少^[18,32]。实验表明在苗期之前B3+处理土壤内生真菌B3含量较高并

显著促进花生残茬腐解,残茬腐解直接为土壤提供可溶性碳氮和其它营养元素,促进花生生长的同时也为土壤微生物的繁殖提供了丰富的营养。因此,内生真菌 B3 的施加可能优化了土壤微生物区系,残茬腐解过程中具有降解酶分泌能力的微生物群体大量增加,所以,即使苗期之后土壤内生真菌 B3 含量下降,但这种优化作用基本已经完成并有助于土壤中对花生残茬腐解起关键作用的漆酶、MnP 和 LiP 活性的提高。作物生长后期土壤中内生真菌 B3 已经死亡以及先前添加的作物残茬基本降解完全,土壤养分降低,使得具有降解酶分泌能力的微生物数量下降,酶活性降低,但是在花生成熟期土壤中降解酶活性与播种前相比仍然较高,主要原因可能是植株生长后期地上部分已开始衰老、枯死,植株本身的凋落物以及微生物菌群进入土壤,这些凋落物是后期多种微生物生长的能量来源,所以植株生长后期其土壤中降解酶的活性仍然相对较高。在苗期处理组,花生残茬腐解产生的酚酸量达到最大值,显著高于同期的 CK,主要归因于内生真菌 B3 自身对花生残茬的降解能力及其对土壤微生物区系的调节功能。通常情况下,酚酸类物质作为化感物质当其含量超过阈值范围时会显著影响土壤微生态活性^[33-34],进而对作物的生长产生较强的抑制作用^[34],然而本研究发现内生真菌 B3 的施加促进了花生残茬的快速腐解,相应的土壤中对酚酸具有降解作用的酶类以及转化酚类物质的 PPO 活性都显著的增加,这些酶活性的增加对土壤中酚酸类自毒物质的降解及转化具有重要的作用^[35-36],同时花生收获时发现 B3+处理花生荚果产量及根瘤数均比 CK 有显著增加。已有报道土壤酚酸类物质的浓度在一定范围内对植物生长具有调节作用^[37],土壤中短暂高浓度的酚酸类物质对幼苗的生长影响较小^[19],但是,从开花期至成熟期,CK 土壤酚酸的含量逐渐增多,此时持续高浓度的酚酸类物质可能表现出较强的化感抑制作用因而被认为是花生产生连作障碍的主要原因之一^[38]。然而在 B3+处理,开花期和结荚期土壤酚酸含量与 CK 相比显著降低,从而减少了化感物质的负面作用。花生开花期至结荚期根系开始被根瘤菌侵染逐渐形成根瘤,这一时期酚酸类化感物质的减少具有重要的意义^[39]。因此,高花生残茬土壤中施加内生真菌 B3 可以有效缓解残茬腐解对花生生长的负面影响,主要通过减少酚酸的浓度、促进营养循环、调节土壤微生态环境从而改善花生的农艺指标,达到减轻花生连作障碍的目的。

3.2 内生真菌 B3 短暂的腐生生活和潜在的生态调节功能

Osono 和 Promputtha 指出不可能所有的内生真菌都能发展成为腐生生物,但是内生真菌在特殊的条件下可以转换它们的生态角色并适应腐生生活,其在真菌分解者中比例大约为 0—92%^[40-41]。自然条件下内生真菌 B3 离开宿主后可以进行营腐生生存,并且在农业生态系统中具有较强的环境修复能力,主要包括改善土壤微生物群落结构、提高土壤酶活性、增加微生物量 CN、减少病原菌数量及增加作物抗性和产量等^[20,42-44]。本研究表明高花生残茬土壤中施加内生真菌 B3 可以显著加快残茬腐解并促进酚酸类物质释放,调节残茬降解及酚酸转化相关酶系,同时摇瓶降解表明内生真菌 B3 对连作土壤多种酚酸类物质具有较强的降解效率。即使在复杂的土壤环境中,内生真菌 B3 一方面自身可以降解酚酸类化感物质,另一方面也可以改善土壤微生物区系进一步有利于多种微生物联合对自毒物质的降解,缓解作物连作障碍的发生。由于农业生态系统的高度复杂性,现阶段关于内生真菌 B3 如何缓解作物连作障碍的机制还不完全清楚。推测可能原因如下:(1) 内生真菌 B3 减轻了化感物质对植物生长的影响;(2) 内生真菌 B3 的添加有利于农业生态系统中微生物群落多样性的恢复,改善土壤微生态环境,提供适合作物生长的土壤微生态体系;(3) 内生真菌 B3 在体外分泌一些营养物质促进作物生长^[45]。

参考文献(References):

- [1] 农业部种植业管理局. 中国种植业信息网-农作物数据库. 2011, <http://zzys.agri.gov.cn/>.
- [2] 王兴祥, 张桃林, 戴传超. 连作花生土壤障碍原因及消除技术研究进展. 土壤, 2010, 42(4): 505-512.
- [3] 孙秀山, 封海胜, 万书波, 左学青. 连作花生田主要微生物类群与土壤酶活性变化及其交互作用. 作物学报, 2001, 27(5): 617-621.
- [4] 徐瑞富, 王小龙. 花生连作田土壤微生物群落动态与土壤养分关系研究. 花生学报, 2003, 32(3): 19-24.
- [5] Li P D, Dai C C, Wang X X, Zhang T L, Chen Y. Variation of soil enzyme activities and microbial community structure in peanut monocropping system in subtropical China. African Journal of Agricultural Research, 2012, 7(12): 1870-1879.

- [6] Kumar K, Goh K M. Crop residues and management practices: effects on soil quality, soil nitrogen dynamics, crop yield, and nitrogen recovery. *Advances in Agronomy*, 1999, 68: 197-319.
- [7] Huang L F, Song L X, Xia X J, Mao W H, Shi K, Zhou Y H, Yu J Q. Plant-soil feedbacks and soil sickness: From mechanisms to application in agriculture. *Journal of Chemical Ecology*, 2013, 39(2): 232-242.
- [8] Kayode J, Ayeni J. Allelopathic effects of some crop residues on the germination and growth of maize (*Zea mays* L.). *Pacific Journal of Science and Technology*, 2009, 10(1): 345-349.
- [9] Lovett J V, Jessop R S. Effects of residues of crop plants on germination and early growth of wheat. *Crop and Pasture Science*, 1982, 33(6): 909-916.
- [10] Bonanomi G, Antignani V, Barile E, Lanzotti V, Scala F. Decomposition of medicago sativa residues affects phytotoxicity, fungal growth and soil-borne pathogen diseases. *Journal of Plant Pathology*, 2011, 93(1): 57-69.
- [11] 刘苹, 王梅, 杨力, 于淑芳, 万书波. 花生根系腐解物对根腐镰刀菌和固氮菌的化感作用研究. *安徽农业科学*, 2011, 39(35): 21701-21703.
- [12] Li Z H, Wang Q, Ruan X, Pan C D, Jiang D A. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, 2010, 15(12): 8933-8952.
- [13] 吕卫光, 张春兰, 袁飞, 彭宇. 化感物质抑制连作黄瓜生长的作用机理. *中国农业科学*, 2002, 35(1): 106-109.
- [14] Alsaadawi I S, Ai-Hadithy S M, Arif M B. Effects of three phenolic acids on chlorophyll content and ions uptake in cowpea seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, 1986, 12(1): 221-227.
- [15] Baziramakenga R, Leroux G D, Simard R R. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. *Journal of Chemical Ecology*, 1995, 21(9): 1271-1285.
- [16] Yuan Z L, Dai C C, Chen L Q. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. *African Journal of Biotechnology*, 2007, 6(11): 1266-1271.
- [17] 史央, 戴传超, 吴耀春, 袁志林. 植物内生真菌强化还田秸秆降解的研究. *环境科学学报*, 2004, 24(1): 144-149.
- [18] 陈晏, 戴传超, 王兴祥, 张波, 鞠群. 施加内生真菌拟茎点霉(*Phomopsis* sp.)对茅苍术凋落物降解及土壤降解酶活性的影响. *土壤学报*, 2010, 47(3): 537-544.
- [19] Chen Y, Wang H W, Li L, Dai C C. The potential application of the endophyte *Phomopsis liquidambari* to the ecological remediation of long-term cropping soil. *Applied Soil Ecology*, 2013, 67: 20-26.
- [20] 王宏伟, 王兴祥, 吕立新, 肖逸, 戴传超. 施加内生真菌对花生连作土壤微生物和酶活性的影响. *应用生态学报*, 2012, 23(10): 2693-2700.
- [21] 李培栋, 王兴祥, 李奕林, 王宏伟, 梁飞燕, 戴传超. 连作花生土壤中酚酸类物质的检测及其对花生的化感作用. *生态学报*, 2010, 30(8): 2128-2134.
- [22] Chen Y, Peng Y, Dai C C, Ju Q. Biodegradation of 4-hydroxybenzoic acid by *Phomopsis liquidambari*. *Applied Soil Ecology*, 2011, 51: 102-110.
- [23] 熊素敏, 左秀凤, 朱永义. 稻壳中纤维素、半纤维素和木质素的测定. *粮食与饲料工业*, 2005, 8(2): 40-41.
- [24] Hartley R D, Buchan H. High-performance liquid chromatography of phenolic acids and aldehydes derived from plants or from the decomposition of organic matter in soil. *Journal of Chromatography A*, 1979, 180(1): 139-143.
- [25] Niladevi K N, Prema P. Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolourization. *Bioresource Technology*, 2008, 99(11): 4583-4589.
- [26] Meza J C, Auria R, Lomascolo A, Sigoillot J C, Casalot L. Role of ethanol on growth, laccase production and protease activity in *Pycnoporus cinnabarinus* ss3. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41(1): 162-168.
- [27] Perucci P, Casucci C, Dumontet S. An improved method to evaluate the o-diphenol oxidase activity of soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(13): 1927-1933.
- [28] Shishido M, Yoshida N, Usami T, Shinozaki T, Kobayashi M, Takeuchi T. Black root rot of cucurbits caused by *Phomopsis sclerotoides* in Japan and phylogenetic grouping of the pathogen. *Journal of General Plant Pathology*, 2006, 72(4): 220-227.
- [29] 肖逸, 戴传超, 王兴祥, 刘付燕, 王宏伟. 内生真菌角担子菌 B6 对连作西瓜土壤尖孢镰刀菌的影响. *生态学报*, 2012, 32(15): 4784-4792.
- [30] Berg B, McClaugherty C. *Plant Litter: Decomposition, Humus Formation, Carbon Sequestration*. Heidelberg: Springer, 2008.
- [31] Aerts R. Climate, leaf litter chemistry and leaf litter decomposition in terrestrial ecosystems: a triangular relationship. *Oikos*, 1997, 79(3): 439-449.
- [32] Wang X, Sun B, Mao J, Sui Y, Cao X. Structural convergence of maize and wheat straw during two-year decomposition under different climate conditions. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(13): 7159-7165.
- [33] Qu X H, Wang J G. Effect of amendments with different phenolic acids on soil microbial biomass, activity, and community diversity. *Applied Soil*

- Ecology, 2008, 39(2): 172-179.
- [34] Zhou X, Wu F, Gilbert J A. *p-Coumaric* acid influenced cucumber rhizosphere soil microbial communities and the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* Owen. PLoS One, 2012, 7(10): e48288.
- [35] Rodríguez Couto S, Toca Herrera J L. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. Biotechnology Advances, 2006, 24(5): 500-513.
- [36] Toscano G, Colarieti M L, Greco G. Oxidative polymerisation of phenols by a phenol oxidase from green olives. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33(1): 47-54.
- [37] Makoi J H J R, Ndakidemi P A. Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. African Journal of Biotechnology, 2007, 6(12): 1358-1368.
- [38] Chen S L, Zhou B L, Lin S S, Li X, Ye X L. Accumulation of cinnamic acid and vanillin in eggplant root exudates and the relationship with continuous cropping obstacle. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(14): 2659-2665.
- [39] Bhattacharya A, Sood P, Citovsky V. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. Molecular Plant Pathology, 2010, 11(5): 705-719.
- [40] Osono T. Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer fungal communities and decomposition processes of leaf litter. Canadian Journal of Microbiology, 2006, 52(8): 701-716.
- [41] Promputtha I, Lumyong S, Dhanasekaran V, McKenzie E H C, Hyde K D, Jeewon R. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. Microbial Ecology, 2007, 53(4): 579-590.
- [42] Dai C C, Chen Y, Wang X X, Li P D. Effects of intercropping of peanut with the medicinal plant *Atractylodes lancea* on soil microecology and peanut yield in subtropical China. Agroforestry Systems, 2013, 87(2): 417-426.
- [43] Dai C C, Xie H, Wang X X, Li P D, Zhang T L, Li Y L, Tan X. Intercropping peanut with traditional Chinese medicinal plants improves soil microcosm environment and peanut production in subtropical China. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(16): 3739-3746.
- [44] 戴传超, 谢慧, 王兴祥, 李培栋, 李奕林, 张桃林. 间作药材与接种内生真菌对连作花生土壤微生物区系及产量的影响. 生态学报, 2010, 30(8): 2105-2111.
- [45] 袁志林, 戴传超, 史央, 王安琪, 张德珍. 内生真菌 B3 促进水稻生长的机理研究. 江苏农业科学, 2004, (2): 10-13.