

巴登鲁希拉菌 TP-2 分离鉴定 及其对龙牙百合自毒物质的降解作用*

李润根, 李文静, 李嘉妮, 陈一亩, 卢其能, 李兴杰

(宜春学院 生命科学与资源环境学院/江西省作物生长发育调控重点实验室, 江西 宜春 336000)

【摘要】 龙牙百合连作后会导致根系分泌酚酸类等自毒物质, 该类物质是引起连作障碍和土传病害频发的主要因素. 为探讨利用有益微生物降解百合根系分泌物 2, 4-二叔丁基苯酚 (2, 4-DTBP), 缓解百合土传病害发生, 并储备有益菌种资源. 以 2, 4-DTBP 为唯一碳源的无机盐培养基筛选耐连作铁炮百合根际土菌株资源, 通过液体培养和土壤培养方法探究降解菌降解效率, 结合形态学、生理生化 and 16S rRNA 基因序列对菌株进行分类鉴定; 利用活体接种法研究其对百合和洋葱的致病性; 利用平板对峙试验, 探究降解菌对百合枯萎病等病菌的拮抗作用. 从铁炮百合根际土分离鉴定一株 2, 4-DTBP 的降解菌 TP-2, 液体培养时降解率可达 52.26%, TP-2 菌株生长良好, 菌液浓度 OD_{600} 达 1.72; 土壤培养时降解率可达 58.44%, 菌液孢子数达 9.23×10^8 CFU/g 土; 结合形态学和分子生物学鉴定该菌为巴登鲁希拉菌 *Rouxiella badensis*, 为革兰氏阳性菌, 对洋葱致病, 但对龙牙百合不致病, 且对百合茄腐镰刀菌和尖孢镰刀菌有一定的拮抗作用, 对大肠杆菌等无拮抗作用. 菌株 TP-2 (巴登鲁希拉菌) 为目前国内外首次报道的可较好降解百合自毒物质 2, 4-DTBP 的降解菌; 同时, 该菌作为洋葱致病菌的相关报道在国内也较为少见.

【关键词】 百合; 巴登鲁希拉菌; 降解菌; 连作障碍; 洋葱

【中图分类号】 Q948 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-5639 (2025) 06-0039-08

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2025.06.006

龙牙百合 (*Lilium brownii* var. *viridulum* Baker) 作为三大药食用百合之一^[1], 其市场需求持续增长, 产业规模不断扩大. 然而, 伴随种植年限增加而日益突出的连作障碍严重制约了该产业的可持续发展^[2]. 植物自毒作用被普遍认为是诱发连作障碍的关键因素之一^[3,4]. 研究表明, 龙牙百合根系分泌或残体分解产生的自毒物质主要包括邻苯二甲酸二丁酯 (DBP)^[5]、2, 4-二叔丁基苯酚 (DTBP)^[6-8]、抗氧化剂 2246^[6,8,9]、对苯二甲酸二辛酯 (DOTP)^[9]、乙酰柠檬酸三丁酯 (ATBC)^[8] 等. 其中, 2, 4-二叔丁基苯酚 (DTBP) 因其较强的自毒效应而被视为主要自毒物质之一^[6-8].

江西省万载县拥有逾 500 年的龙牙百合栽培历史^[10]. 历史上, 该地区在 20 世纪 80—90 年代主要采用水旱轮作模式, 曾有效缓解了连作障碍问题^[11]. 然而, 随着龙牙百合产业的快速发展和种植面积的急剧扩张, 严格执行轮作换茬制度愈发困难, 导致连作障碍问题日趋严峻.

筛选并应用高效的自毒物质降解菌株, 被认为是消减连作障碍、保障产品安全的重要生物措施之一, 对推动龙牙百合产业健康发展具有重要意义. 现有研究证实, 特定微生物能够高效降解多种酚酸类等自毒物质. 例如, 刘云露^[12]从黄连根际土壤中筛选出 10 株能降解阿魏酸等酚酸的菌株; 谢勇俊等^[13]分离鉴定出可降解人参酚酸类自毒物质的菌株; 张博洋^[14]则从兰州百合鳞茎及根际土壤中分离得到 7 株能降解邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 和 2, 4-二叔丁基苯酚 (DTBP) 的菌株. 这些降解菌不仅能有效分解土壤中的自毒物质, 往往还具有促进植物生长的潜能, 因此在防控黄连、人参、兰州百合等作物的连作障碍中展现出良好的应用前景^[12-14]. 这充分表明, 引入特定功能微生物以降低土壤自毒物质累积、改善根际

* **【收稿日期】** 2025-05-01

【作者简介】 李润根, 男, 江西新余人, 宜春学院教授, 研究方向为百合栽培及其连作障碍防治.

【基金项目】 江西省科技厅重点研发项目 (20212BBG73039); 国家自然科学基金项目 (32160674).

微环境,是解决连作障碍的有效途径之一。

巴登鲁希拉菌 *Rouxiella badensis* 是从泥炭藓土壤中分离出来的一种细菌,最初由 Le Flèche-Matéos 等^[15]在 2017 年发现,该细菌在美国^[16]和波兰^[17]曾引起洋葱鳞茎腐烂,是一种新的洋葱病原菌,但更多的研究认为它是一种新型益生菌^[18-20]。闫星^[21]从板栗中筛选到内生菌菌株 *R. badensis* BLJ B-52,发现其抑制禾谷镰孢霉菌丝生长效果好;范蓓等^[22]发现石斛内的巴登鲁希拉菌 SP-YTie-7 对石斛病原真菌罗尔阿太菌和露湿漆斑菌均具有优异的抑制活性,表明其对植物病原菌抑菌效果好;Yahfoufi N 等^[23,24]发现其具有调节免疫和肠道系统等功能。目前国内外关于巴登鲁希拉菌的报道还比较少,更鲜见其具有降解自毒物质作用的报道。

笔者前期研究发现铁炮百合较耐连作,而龙牙百合不耐连作^[25,26],铁炮百合耐连作是否因为其根际土含有自毒物质降解菌?本研究拟从生长良好的铁炮百合根际土中分离降解菌,利用形态学观察及分子生物学技术鉴定其种类,通过液体培养和土壤培养测定其自毒物质降解效果,同时利用活体接种法研究其对百合和洋葱的致病性,利用平板对峙测定其对百合枯萎病及大肠杆菌等病菌的抑菌活性,以期为根际促生菌在连作障碍治理方面的有效应用提供菌株及技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

试验材料为连作三年的铁炮百合根际土壤,将生长健康的铁炮百合连根带土挖出,进行“抖根”除去浮土后,用刷子将根上剩余的土壤移入无菌袋收集,放置 4℃ 的冰箱保存备用。

1.1.2 培养基

初筛固体培养基:1 L 培养基含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g、 CaCl_2 0.1 g、 NaH_2PO_4 0.5 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、2,4-二叔丁基苯酚(2,4-DTBP)(用无水甲醇溶解后,用 0.22 μm 滤膜过滤)500 mg,1 000 mL 蒸馏水,pH 7.2,固体培养基加入 15 g 琼脂粉。LB 液体培养:1 L 培养基含胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、氯化钠 10 g。

1.1.3 主要试剂和仪器

所用主要试剂:2,4-DTBP(质量分数为 99%,上海贤鼎生物科技有限公司)及其标准品(质量分数为 99.50%,LGC Labor GmbH), NaH_2PO_4 (质量分数 99%,上海麦克林生化科技有限公司)、 K_2HPO_4 (质量分数 98%,上海麦克林生化科技有限公司)。

所用主要仪器:万分之一电子分析天平(赛多利斯科学仪器(北京有限公司)ME204E)、全波长酶标仪(赛默飞世尔科技公司 Multiskan Sky)、紫外可见分光光度计(日本岛津公司 Multiskan Sky)、超速冷冻离心机(贝克曼库尔特有限公司 Optima L-80xp)、超纯水机(上海富诗特仪器设备有限公司 FST-JY-10)、恒温摇床(上海智城分析仪器制造有限公司 ZWY-2102c)、生化培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司 ZXSP-A0160)。

1.2 方法

1.2.1 降解菌的分离和纯化

称 5 g 根际土壤于 200 mL 锥形瓶中,加入 45 mL 无菌水中在 28℃、200 r/min 条件下摇晃 30 min,静置,取上清液。将土壤浸出液进行梯度稀释,稀释 $10^{-2} \sim 10^{-7}$ 倍,然后吸取 100 μL 稀释液均匀涂布在初筛固体培养基上,3 次重复,28℃ 培养 2~3 d。观察菌株生长情况,挑取生长状况良好菌落,挑取的单菌落在新的 LB 固体培养基上反复划线纯化 3 次以上。

1.2.2 自毒物质降解菌的鉴定

用 LB 培养基降解菌,并以革兰氏染色液试剂盒对其进行染色后,在显微镜下观察。将筛选出降解效果较强的菌株用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取其 DNA。使用通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')扩增细菌 16S rRNA 基因序列,对扩增片段进行回收后,送至上海生工测序。最后,将测序结果与 NCBI 官网已知明确种类的菌株序列进行同源性比

对, 确定分离的菌株种类.

1.2.3 菌株生理生化检测

参考张博洋^[10]实验方法, 进行甲基红实验, V-P 实验. 参考李庆天^[27]实验方法进行吲哚反应、淀粉水解、接触酶、明胶液化、解磷能力和解钾能力实验.

1.2.4 液体培养降解 2, 4-DTBP 试验

将分离纯化的降解菌加入到 LB 液体培养基中, 在 28 ℃、170 r/min 条件下摇床培养 2 d, 取菌液于 4 ℃、5 000 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清, 用无菌水将已分离菌体重悬至 OD_{600} 为 1, 以此作为母液. 将母液按 2% 的体积比接种到 30 mL 新鲜的含 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL 2, 4-DTBP 无机盐基础培养液中, 以不加 2, 4-DTBP 的处理作为对照, 3 次重复, 于 28 ℃、170 r/min 摇床培养, 分别在培养 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 h 时取样, 一部分样品用于测定 OD_{600} , 另一部分样品用紫外可见分光光度计测定样品吸光值, 计算 2, 4-DTBP 残留量.

2, 4-DTBP 标准曲线的绘制: 取 2, 4-DTBP 标准品配制母液质量浓度为 0.5 mg/mL, 分别取 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600 μ L 母液用超纯水定容至 2 mL, 用于标准曲线测定.

1.2.5 土壤培养降解 2, 4-DTBP 试验

参考何昊^[27]试验方法, 参试土壤为菜园土, 过筛, 且经过 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 1 h 后, 取 100 g 灭菌土加入 2, 4-DTBP 溶液, 使土壤中 2, 4-DTBP 质量浓度为 0.5 mg/mL. 取新鲜过夜培养的菌液, 于 4 ℃、5 000 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清, 用 0.85% NaCl 将已分离菌体重悬至 OD_{600} 为 1. 取 3 mL 菌液均匀加入到土壤中. 相同的条件下, 以等量的 0.85% NaCl 的处理作为对照, 重复 4 次. 土壤中的含水量保持在 15% 左右, 放置在 30 ℃ 培养箱中培养, 分别在培养 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 h 时取样. 取 5 g 土样用 5 mL 甲醇萃取两次, 每次 30 min, 静置取上清液, 用紫外可见分光光度计检测其在 265 nm 处吸光值, 计算 2, 4-DTBP 含量; 同时另取 5 g 土样用 10 mL 无菌水摇匀, 再将土壤悬浮液稀释 $10^{-5} \sim 10^{-8}$ 倍, 然后吸取 100 μ L 稀释液均匀涂布在 LB 固体平板上, 2~3 d 后记录菌落数目.

1.2.6 致病性及其拮抗作用

洋葱、百合致病性测定: 将 OD_{600} 为 1 的自毒物质降解菌菌液 10 μ L 刺伤接种在灭菌的健康洋葱和百合鳞片上, 以接种无菌水为对照. 接种后分别放置培养皿中, 25 ℃ 保湿培养, 定期观察, 及时记录并对其发病情况进行图像采集. 待洋葱发病后, 从其病健部位分离病原菌, 并与初分离获得的菌株性状进行分析比较.

拮抗真菌试验: 取活化好的病原真菌 (尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 和茄腐镰刀菌 *F. solani*) 用 5 mm 打孔器打取菌饼接种于 PDA 平板中央, 采用平板对峙法, 在距离病原菌约 2 cm 处点接待测菌种, 3 次重复, 以不接种待测菌的病原菌平板为对照. 28 ℃ 下培养 7 d, 观察其生长状况.

拮抗细菌试验: 采用琼脂平板 (LB 琼脂培养基) 打孔法检测 TP-2 菌株发酵液的抗病原细菌活性^[28], 取病原菌菌液 30 μ L (大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、副溶血性弧菌 *Vibrio parahaemolyticus*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、志贺氏菌 *Shigella Castellani*、产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes*、变形杆菌 *Proteus Mirabilis*、沙门氏菌 *Salmonella* $OD_{600}=0.6$) 均匀涂布在 LB 琼脂板上, 用无菌打孔器 (5 mm) 在 LB 平板上打孔后, 加入 TP-2 发酵液 50 μ L, 37 ℃ 孵育 24 h, 做三次重复, 观察并测定抑菌区直径, 阴性对照为无菌发酵液.

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 2, 4-DTBP 为唯一碳源, 表明其对 2, 4-DTBP 有降解能力. 根据初筛生长状况, 分离得到 72 株菌株, 经复筛获得 1 株降解性能较强的菌株, 编号为 TP-2, 在 LB 固体培养基上菌落呈淡黄色, 不规则型, 有光泽, 半透明 (图 1 (a)); 革兰氏染色试剂盒染色鉴定为阳性菌, 形状为杆状 (图 1 (b)); 扫描电镜下观察菌株呈杆状, 多单个存在, 长 1.06~1.91 μ m, 直径 0.64~0.78 μ m, 两端钝圆, 无鞭毛, 无芽孢 (图 1 (c)). 经 16S rDNA 序列测定, 基因序列长度为 1 479 bp, 其核酸序列数

据 NMDCN0006U2U 存储在国家微生物科学数据中心 (NMDC), 链接为 <https://nmdc.cn/resource/genomics/sequence/detail/NMDCN0006U2U>, 将菌株的 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, 发现菌株与 *R. badensis* DAR84756 的 16S rRNA 序列同源性达到 100%, 利用 MEGA 软件构建系统发育树菌株 TP-2 与模式菌株 *R. badensis* 323 NR 156931.1 聚在同一分支 (图 2), 鉴定 TP-2 为巴登鲁希拉菌 *Rouxiella badensis*.

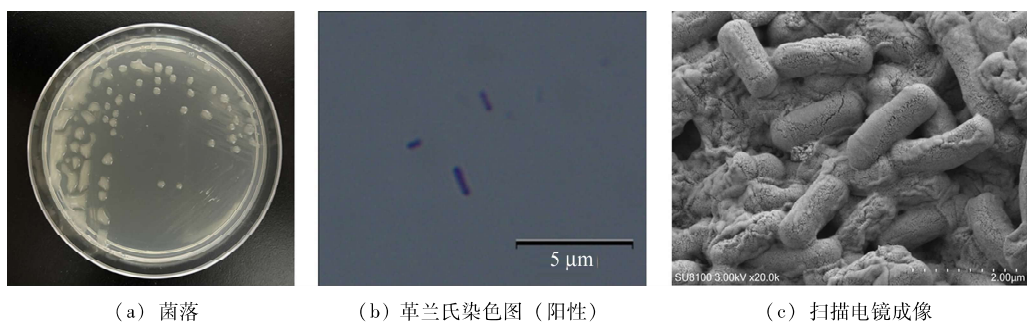


图 1 菌株 TP-2 菌落及菌体形态

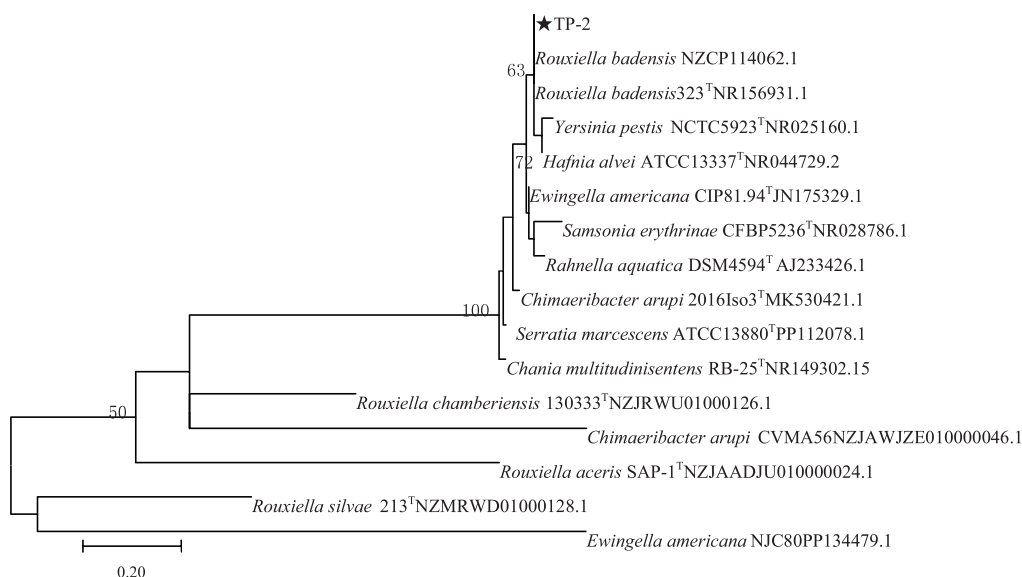


图 2 基于 16S rRNA 基因序列采用 ML 构建的 TP-2 系统发育树

2.2 细菌生理生化特征

将菌株进行 8 种生理生化检测, 结果表明: 菌株对甲基红反应呈阴性, V-P 实验呈阳性、淀粉水解反应呈阴性、接触酶反应呈阳性、吡啶反应呈阴性、明胶液化反应呈阴性; 菌株有解磷能力 (图 3 (a、b)), 解磷实验呈阳性; 菌株无解钾能力 (图 3 (c)), 解钾实验呈阴性。

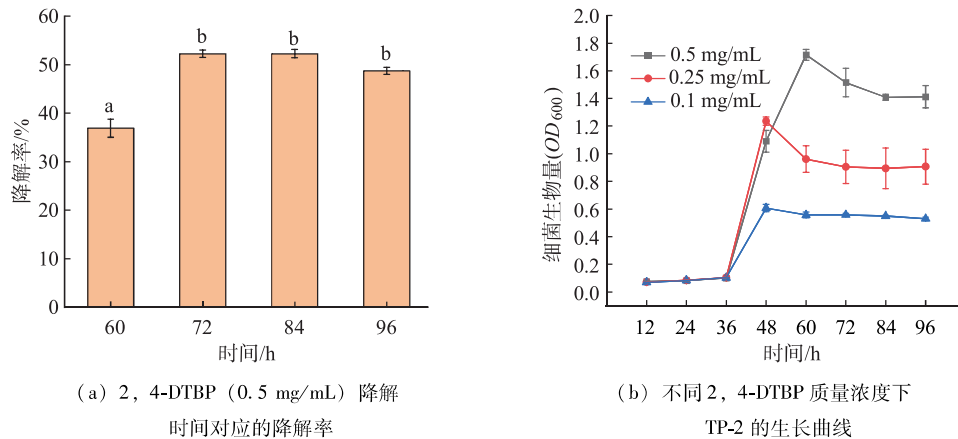


图 3 菌株 TP-2 解磷及解钾情况

2.3 2, 4-DTBP 降解菌的生长和降解能力

用 2, 4-DTBP 标准品在紫外分光光度计进行全波段扫描, 发现在 265 nm 处出峰且稳定, 并作出标准曲线方程为: $y = 0.0057x - 0.0055$, $R^2 = 0.9997$, 用于后续 2, 4-DTBP 浓度测定。

在液体培养条件下, 当 2, 4-DTBP 质量浓度为 0.5 mg/mL, 培养 60 h 时, TP-2 降解率为 36.92%, 培养 72 h 和 84 h 时降解率最高, 均为 52.26% (图 4 (a))。培养时长在 0~36 h 时, TP-2 在含有不同质量浓度自毒物质的环境中均生长较慢。在 2, 4-DTBP 质量浓度为 0.10 mg/mL 和 0.25 mg/mL 条件下, 培养 48 h 时, 该菌的生长量达最大, 其 OD_{600} 值分别为 0.607 和 1.236; 而在 2, 4-DTBP 质量浓度为 0.50 mg/mL 条件下, 该菌的生长量达最大的培养时长为 60 h, 其 OD_{600} 值为 1.715 (图 4 (b))。



注: 数据上不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下图同。

图 4 液体培养条件下 2, 4-DTBP 降解图和降解菌生长曲线

在土壤培养条件下, 初始 2, 4-DTBP 质量浓度为 0.5 mg/mL 时, 培养降解菌 12 h 后, 2, 4-DTBP 的降解率为 44.23%。而培养时长为 48 h 和 96 h 时, 其降解率最高, 分别为 58.43% 和 58.44% (图 5 (a))。降解率 24 h 高, 而 36 h 低, 之后随时间延长又升高。这可能是由 24 h 所取土样与降解菌混合不够均匀所致。2, 4-DTBP 质量浓度为 0.50 mg/mL 条件下, 观察 TP-2 的生长曲线 (图 5 (b)) 可知, 培养 36 h 之前其生长较慢, 而培养 96 h 时, 菌的生长量达最大 (菌落数为 9.23×10^8 CFU/g), 其 OD_{600} 值分别为 0.607 和 1.236。

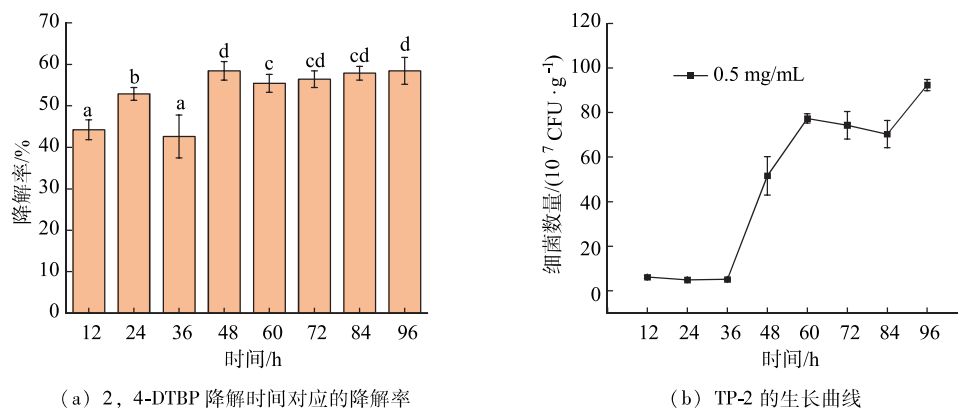


图 5 土壤培养条件下 2, 4-DTBP (0.5 mg/mL) 降解图和降解菌生长曲线

2.4 TP-2 的致病性及其拮抗作用

将 TP-2 接种至洋葱鳞片 3 d, 洋葱组织开始腐烂, 之后病斑不断扩大, 而接无菌水的对照组无腐烂发生 (图 6 (a、b))。从其病健部位分离的病原菌与初分离获得的菌株性状一致, 说明 TP-2 对洋葱致病。类似的试验发现其对龙牙百合不致病 (图 6 (c、d))。

拮抗真菌、细菌试验 (图 6 (e、f)) 表明, 降解菌 TP-2 对尖孢镰刀菌和茄腐镰刀菌具有一定的拮抗作用, 但其对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、枯草芽孢杆菌、志贺氏菌、产气肠杆菌、变形杆菌 (图 6 (g)) 和沙门氏菌 (图 6 (h)) 均无拮抗作用。

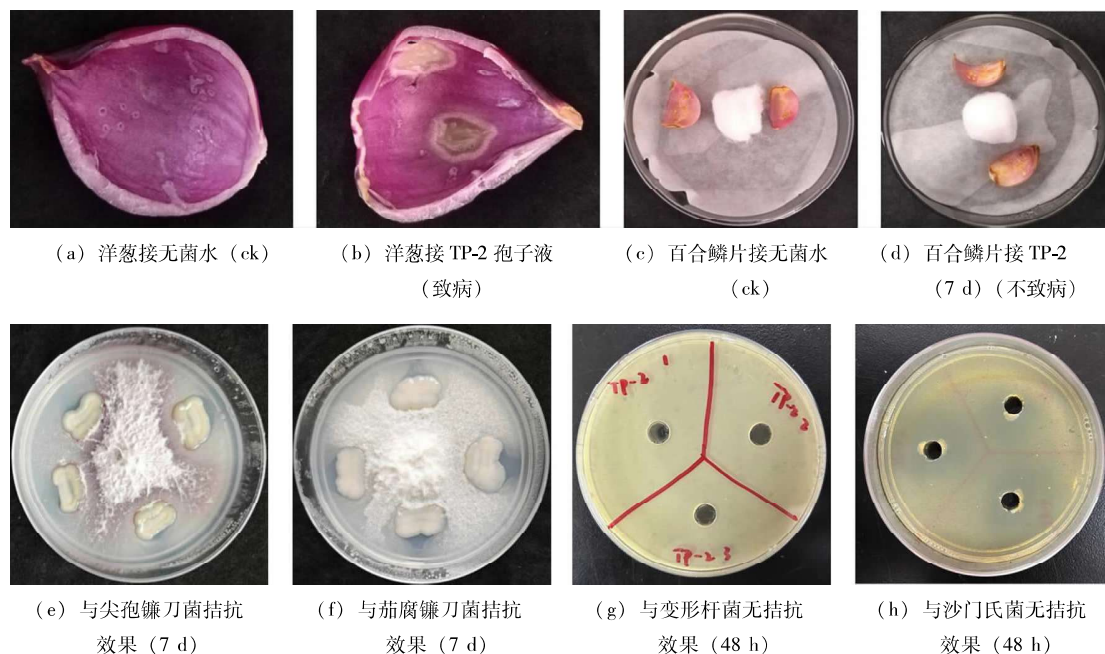


图 6 自毒物质降解菌 TP-2 致病性及其拮抗作用

3 小结与讨论

本研究在铁炮百合连作土壤中发现了一株可降解百合主要自毒物质 2, 4-DTBP 的降解菌, 为解决百合连作障碍, 改善作物根际土壤微生物、配制微生物复合菌剂具有重要作用。目前已报道的自毒物质降解菌的种类主要有伯克霍尔德菌属细菌^[13]、放线菌^[29,30]、橙色微杆菌^[31]、链霉菌、芽孢杆菌^[32]、希瓦氏菌^[14]、寡养单胞菌属^[33]等。本研究首次报道 *R. adensis* (TP-2) 为作物自毒物质降解菌, 拓展了该菌的生态应用潜力。此前文献中, *R. adensis* 的致病性仅在美国和波兰的洋葱病害中被报道, 本研究在国内首次确认了其对于洋葱的致病性, 提示其在农业生产中可能存在的风险。此外, 现有文献普遍将 *R. adensis* 归类为革兰氏阴性菌, 然而, 本研究显示, TP-2 菌株呈现革兰氏阳性反应, 首次报道其为革兰氏阳性菌。该菌的已知分离来源包括植物体, 如蓝莓^[18]、枇杷^[19]、板栗^[21]和石斛^[22], 动物体内和泥炭土, 而本研究首次从作物根际土中分离获得该菌, 且研究表明, 该菌存在“有益-致病”双面性, 推广使用时需充分评估其对目标作物的安全性。Yahfoufi 等^[26,27]研究发现 *R. adensis* 对肠道菌群有抑制作用, 但本研究发现, TP-2 菌株对大肠杆菌等人体常见病原菌未表现明显拮抗作用, 这可能是由菌株不同而引起的差异。

综上, 本研究从铁炮百合根际土壤中分离并鉴定出一株可降解 2, 4-DTBP 的菌株 TP-2。该菌对 2, 4-DTBP 的降解效果良好。结合形态学和分子生物学, 该菌被鉴定为巴登鲁希拉菌 *R. badensis*, 为革兰氏阳性菌, 对洋葱致病, 但龙牙百合不致病, 且对百合茄腐镰刀菌和尖孢镰刀菌有一定的拮抗作用, 对大肠杆菌等无拮抗作用。TP-2 菌株具有消除连作土壤中酚酸类自毒物质的潜力, 可为土传病害的生物防治和连作土壤修复提供微生物资源。然而, 本研究发现其对洋葱产生病害, 研究结果也为合理应用和开发 *R. adensis* 提供了理论依据。

〔参考文献〕

- 〔1〕 国家药典委员会. 中华人民共和国药典〔M〕. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 137-138.
- 〔2〕 赵信林, 宁甲兴, 胡清湘, 等. 百合连作障碍成因及防治技术研究进展〔J〕. 南方农业学报, 2023, 54 (6): 1753-1761.

- [3] UTKHEDE R S. Soil sickness, replant problem or replant disease and its integrated control [J]. *Allelopathy Journal*, 2006, 18 (1): 23-38.
- [4] BENNETT A J, BENDING G D, CHANDLER D, et al. Meeting the demand for crop production: the challenge of yield decline in crops grown in short rotations [J]. *Biological Reviews*, 2012, 87 (1): 52-71.
- [5] 李元鹏, 牟晓玲, 马家易, 等. 邻苯二甲酸二丁酯对镰刀菌化感抑制机制研究 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2023, 58 (5): 113-121.
- [6] ZHONG S, GUO C, SU L, et al. Physiological and transcriptomic analyses provide preliminary insights into the autotoxicity of *Lilium brownii* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15: 1330061.
- [7] 黄炜. 2, 4-二叔丁基苯酚与镰刀菌在兰州百合枯萎病发生过程中的协同作用研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2018.
- [8] 于鑫, 李丽娜, 黄琪, 等. 龙牙百合根际土壤中自毒物质的鉴定及其对幼苗的化感作用 [J]. *中药材*, 2024, 47 (9): 2154-2159.
- [9] HUANG Y F, ZHANG E H, ZHANG X H, et al. Autotoxic compounds from rhizosphere soil of Lanzhou lily extracts: Identification and biological activity [J]. *Allelopathy Journal*, 2021, 53 (1): 111-126.
- [10] 朱业斌, 黎似勤, 张以莉, 等. 龙牙百合大棚提早高效栽培技术 [J]. *中国蔬菜*, 2012 (19): 51-52.
- [11] 李润根, 杨世平, 王小文. 万载百合及其栽培技术 [J]. *中国蔬菜*, 1995 (4): 42-43.
- [12] 刘云露, 郑守豪, 叶磊鑫, 等. 黄连土壤阿魏酸降解菌的筛选及降解特性 [J]. *西南大学学报 (自然科学版)*, 2019, 41 (1): 46-50.
- [13] 谢勇俊, 潘小卓, 陈福慧, 等. 人参酚酸类自毒物质降解菌的筛选鉴定及生防研究 [J]. *中国农业科技导报*, 2024, 26 (7): 147-155.
- [14] 张博洋. 兰州百合自毒物质的典型降解菌株筛选及降解效应研究 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学硕士学位论文, 2024.
- [15] LE FLÈCHE-MATÉOS A, KÜGLER J H, HANSEN S H, et al. *Rouxiella badensis* sp. nov. and *Rouxiella silvae* sp. nov. isolated from peat bog soil and emendation description of the genus *Rouxiella* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67 (5): 1255-1259.
- [16] ZHAO M, TYSON C, GITAITIS R, et al. *Rouxiella badensis*, a new bacterial pathogen of onion causing bulb rot [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1054813.
- [17] MIKICIŃSKI A, PUŁAWSKA J. First report on *Rouxiella badensis* causing bulb rot on onion in Poland [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2024, 106 (3): 1407-1408.
- [18] SALVETTI E, TREMBLAY J, ARBOUR M, et al. Complete PacBio single-molecule real-time sequence of a novel probiotic-like bacterium, *Rouxiella badensis* subsp. *acadiensis*, isolated from the biota of wild blueberries in the Acadian forest [J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2023, 12 (5): 0134022.
- [19] 付龙威. 枇杷根际微生物多样性及促生作用研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆大学硕士学位论文, 2020.
- [20] MORALES-CEDEÑO L R, DE LOS SANTOS-VILLALOBOS S, SANTOYO G. Functional and genomic analysis of *Rouxiella badensis* SER3 as a novel biocontrol agent of fungal pathogens [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 709855.
- [21] 阎星. 板栗果实内生菌群及果腐病拮抗细菌筛选 [D]. 北京: 中国林业科学研究院硕士学位论文, 2022.
- [22] 范蓓, 刘佳萌, 王凤忠, 等. 一种石斛内生巴登鲁希拉菌 SP-YTie-7 及其应用: CN112063549B [P]: 2022-05-03.
- [23] YAHFOUFI N, ALSADI N, MALLET J F, et al. Immunomodulation and intestinal morpho-functional aspects of a novel gram-negative bacterium *Rouxiella badensis* subsp. *acadiensis* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 569119.
- [24] SHAHBAZI R, YASAVOLI-SHARAH H, MALLET J F, et al. Novel probiotic bacterium *Rouxiella badensis* subsp. *acadiensis* (Canan SV-53) modulates gut immunity through epigenetic mechanisms [J]. *Microorganisms*, 2023, 11 (10): 2456.
- [25] 李润根, 曾慧兰, 李兴杰, 等. 连作龙牙百合与铁炮百合根际土壤真菌群落结构的差异分析 [J]. *生态科学*, 2022, 41 (4): 189-195.
- [26] 李润根, 曾慧兰, 曾建梅. 基于高通量测序的连作百合土壤细菌群落多样性研究 [J]. *宜春学院学报*, 2021, 43 (3): 85-91.
- [27] 李庆天. 延胡索根际解磷菌解钾菌的分离纯化与鉴定 [D]. 重庆: 重庆三峡学院硕士学位论文, 2023.
- [28] 何昊. 桃根泌自毒物质苯甲酸降解菌的分离鉴定及应用潜力研究 [D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2019.
- [29] 黄倩. 八角莲内生菌的分离及抗菌活性物质的研究 [D]. 成都: 成都大学硕士学位论文, 2023.

- [30] 王晓辉. 西瓜自毒物质阿魏酸降解放线菌筛选及其降解效果研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2011.
- [31] 吴佩佩, 袁秀丰, 丰景. 一株对羟基苯甲酸降解菌的降解条件优化及缓解黄瓜根际对羟基苯甲酸胁迫效应 [J]. 微生物学报, 2024, 64 (7): 2465-2478.
- [32] 廖永琴, 王楠, 申云鑫, 等. 三株酚酸降解菌的筛选与鉴定及其生物活性 [J]. 微生物学通报, 2024, 51 (6): 2193-2214.
- [33] 向维, 韦小兰, 曹科鑫, 等. 三七皂苷类自毒物质降解细菌分离及其降解特性 [J]. 广西植物, 2023, 43 (7): 1173-1181.

Isolation and Identification of *Rouxiella badensis* TP-2 and Its Degradation Effect on Autotoxic Substances of *Lilium brownii* var. *viridulum*

LI Rungen, LI Wenjing, LI Jiani, CHEN Yizhou, LU Qineng, LI Xingjie
(School of Life Sciences and Environmental Resources/Jiangxi Key Laboratory of Crop
Growth and Regulation, Yichun University, Yichun, Jiangxi, China 336000)

Abstract: The consecutive cultivation of *Lilium brownii* var. *viridulum* results in the secretion of autotoxic substances such as phenolic acids by its root system. These substances are the primary factors causing frequent soil-borne diseases and continuous cropping obstacles. To explore the utilization of beneficial microorganisms to degrade 2, 4-di-tert-butylphenol (2, 4-DTBP), an exudate of lily roots, alleviate the occurrence of soil-borne diseases in lilies, and reserve beneficial microbial species resources. Strains from the rhizosphere soil of continuously cropped *L. brownii* var. *viridulum* were screened using an inorganic salt medium with 2, 4-DTBP as the sole carbon source. The degradation efficiency of the degrading bacteria was investigated through liquid culture and soil culture methods. The strains were taxonomically identified by combining morphology, physiological and biochemical characteristics, and 16S rRNA gene sequences. The pathogenicity of the strains to *Lilium lancifolium* and *Allium cepa* was studied using the live inoculation method. The antagonistic effect of the degrading bacteria on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* and *F. oxysporum* was investigated by the plate confrontation test. A degrading bacterium TP-2 capable of degrading 2, 4-DTBP was isolated and identified from *L. longiflorum*, the degradation rate reached 52.26% in liquid culture, with the bacterial liquid concentration OD_{600} reaching 1.72. In soil culture, the degradation rate reached 58.44%, and the spore count of the bacterial liquid was 9.23×10^8 CFU. Based on morphology and molecular biology, this bacterium was identified as *Rouxiella badensis*, a Gram-positive bacterium. It is pathogenic to onion but not to *L. brownii* var. *viridulum*, and has a certain antagonistic effect on *F. oxysporum* f. sp. *lilii* and *F. solani*. but no antagonistic effect on *Escherichia coli* and others. The strain TP-2 *Rouxiella badensis* is the first reported bacterium demonstrating effective degradation of lily autotoxic substance 2, 4-di-tert-butylphenol (2, 4-DTBP), while domestically there have been few reports identifying this bacterial species as a pathogen of onions.

Key words: Lily; *Rouxiella badensis*; degradation bacteria; continuous cropping obstacle; onion

(责任编辑: 陈伟超)