

# 古国槐叶片溶磷内生真菌的筛选 及其促生潜力初探

侯姣姣, 布芳芳, 余仲东, 康永祥\*

(西北农林科技大学 林学院, 陕西杨陵 712100)

**摘 要:** 该试验从周公庙古国槐叶片内分离、筛选具有溶磷能力的内生真菌, 采用溶磷圈法和钼锑抗比色法测定其溶解无机磷的能力, 同时测定其回接后对国槐无菌苗叶绿素、可溶性蛋白质、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性的影响, 探究内生真菌的溶磷能力及其促生效应。结果表明: (1) 从古国槐叶片中分离出的 55 株内生真菌中, 28 株具有溶磷能力, 其中溶磷能力较强的活性菌株有 12 株; ZG-7 为拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis* sp.), ZG-9、ZG-23、ZG-32、ZG-36 和 ZG-53 为镰刀菌(*Fusarium* sp.), ZG-15 和 ZG-34 为曲霉(*Aspergillus* sp.), ZG-39 和 ZG-51 为链格孢(*Alternaria* sp.), ZG-42 为木霉(*Trichoderma* sp.), ZG-48 为附球菌(*Epicoccum* sp.)。 (2) 曲霉属真菌 ZG-15 和 ZG-34 的溶磷圈直径( $d$ )及其与菌落直径( $D$ )的比值  $d/D$  均高于其他菌株, 对  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  的溶解能力最强( $1\,238.28$  和  $941.22\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 并极显著高于其他菌株( $P < 0.01$ )。 (3) 4 株内生真菌 ZG-7、ZG-9、ZG-15 和 ZG-48 回接至国槐无菌苗 10 d 后, 可从苗根组织的皮层细胞中观察到内生菌丝, 其中黑曲霉(*Aspergillus niger*) ZG-15 可显著提高国槐无菌苗的叶绿素含量、可溶性蛋白质含量、SOD、POD 活性( $P < 0.05$ ), 从而维持幼苗的正常生长和提高其抗逆能力, 为该试验得到的促生潜力优势内生真菌, 可为古国槐的有效保护及林木溶磷生物菌肥的生产提供依据。

**关键词:** 古国槐; 内生真菌; 溶磷真菌; 无菌苗; 促生

**中图分类号:** Q93-331; S718.81 **文献标志码:** A

## Screening of Phosphate-Solubilizing Endophytic Fungi from Ancient *Sophora japonica* Leaves and Their Potential for Plant Growth-Promoting

HOU Jiaojiao, BU Fangfang, YU Zhongdong, KANG Yongxiang\*

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** To explore the phosphate-solubilizing ability of endophytic fungi and their plant growth-promoting potential, we evaluated the phosphate-solubilizing capability of endophytic fungi from ancient *Sophora japonica* leaves in Zhonggongmiao by the method of dissolved phosphorus cycle and molybdenum-bule, and detected the effects of inoculated sterile host plantlet on chlorophyll, soluble protein contents, SOD and POD activities. The results showed that, there were 28 out of 55 fungi strains from ancient *S. japonica* leaves with phosphate-solubilizing capability, and twelve strains among twenty-eight endophytic fungi displayed strong capability of dissolving phosphate of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  by a test of phosphate-solubilizing

收稿日期: 2016-03-14; 修改稿收到日期: 2016-06-20

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(201404302); 西北农林科技大学校重点科研专项(Z109021310)

作者简介: 侯姣姣(1989—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事古树名木保护相关研究。E-mail: 985755362@qq.com

\* 通信作者: 康永祥, 男, 教授, 博士, 主要从事树木学及古树名木保护技术研究。E-mail: yxkang@nwsuaf.edu.cn

capability, they were *Pestalotiopsis* sp. (ZG-7), *Fusarium* sp. (ZG-9, ZG-23, ZG-32, ZG-36 and ZG-53), *Aspergillus* sp. (ZG-15 and ZG-34), *Alternaria* sp. (ZG-39 and ZG-51), *Trichoderma* sp. (ZG-42) and *Epicoccum* sp. (ZG-48). Two strains with strong phosphate-solubilizing capability were then picked up, ZG-15 and ZG-34, belonged to *Aspergillus* spp.. Their diameter of phosphorus solubilizing circle ( $d$ ) and  $d/D$  ( $D$ , colony diameter) were both higher than that of others, and their solubilization of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  accounted for  $1\,238.28\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $941.22\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively, which were significantly higher than that of others and control ( $P < 0.01$ ). Four strains (ZG-7, ZG-9, ZG-15 and ZG-48) from different genera were inoculated into aseptic *S. japonica* seedlings bottle to ensure their contact upon with each other. Mycelium was observed infecting into the cortex cells and around the surface epidemical cells of root tissue; under the treatment by *Aspergillus niger* ZG-15, *S. japonica* seedlings' chlorophyll content, soluble protein content, SOD and POD net activities were all obviously higher than that of control ( $P < 0.05$ ), so, ZG-15 could maintain healthy seedling growth and improve seedling resilience, which showed a great potential for ancient *S. japonica* protection and a potential application as an organism-fertilizer for forest tree.

**Key words:** ancient *Sophora japonica*; endophytic fungi; phosphate-solubilizing fungi; aseptic seedling; growth promoting.

磷是植物生长过程中所必需的三大营养元素之一,对促进植物的生长发育和新陈代谢有重要作用。自然条件下,绝大部分土壤全磷含量很高,可供植物吸收的有效磷含量却很低,难以满足植物生长需要。已有研究表明,自然界中存在着一类溶磷微生物,广泛存在于土壤、植物根际、磷矿区等生境中<sup>[1-3]</sup>,它们可以将土壤中难溶性磷转化为植物能够吸收利用的可溶性磷,从而促进植物对磷素的吸收利用<sup>[4]</sup>。溶磷微生物种类繁多,包括真菌、细菌、放线菌等<sup>[5]</sup>,一般认为溶磷真菌在遗传稳定性和溶磷效率方面明显优于溶磷细菌和放线菌<sup>[6-8]</sup>。目前,人们对植物根际土壤中的溶磷真菌进行了溶磷效应、溶磷机制及其应用效果等方面的研究<sup>[9]</sup>,且主要集中在农作物方面<sup>[10]</sup>,树木溶磷真菌资源的研究也越来越多<sup>[11-12]</sup>,但关于树木叶片内生真菌的溶磷作用研究较少。内生真菌不仅具有一定的溶磷作用<sup>[13]</sup>,也可与宿主植物长期共存,分泌植物激素等,影响生理代谢,刺激植物生长以及提高植物的环境适应性<sup>[14-15]</sup>。

国槐(*Sophora japonica*),为豆科槐属落叶大乔木,是防风固沙、用材及经济林兼用的树种,也是城乡良好的遮荫树和行道树种,对二氧化硫、氯气等有毒气体有较强的抗性。陕西省岐山县周公庙内古国槐不仅是重要的园林景观,也是珍贵的自然遗产,对其进行科学的保护非常重要。本试验从周公庙古国槐(1 700 a)叶片中分离、筛选出具有高效溶解无机磷能力的菌株,并研究其回接国槐无菌苗后的促生效应,以期为国国槐的有效保护及溶磷菌肥的生产提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

内生真菌分离自陕西省岐山县周公庙古国槐(1 700 a)的健康叶片,叶片于 2014 年 10 月采集后分装于自封袋中,带回实验室,4 ℃ 冰箱保存,并快速分离。供试培养基包括:PDA 培养基<sup>[16]</sup>(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,自来水 1 000 mL,自然 pH);NBRIIP 培养基<sup>[17]</sup>(葡萄糖 10 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5 g, KCl 0.2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1 g,蒸馏水 1 000 mL,琼脂 16 g,pH 6.5~7.5,液体培养基不加琼脂);MS 培养基(MS 粉 4.74 g,蔗糖 30 g,琼脂 7 g,pH 5.8~6.0,蒸馏水 1 000 mL)。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 内生真菌的分离纯化** 将采集的健康古国槐叶片在自来水下冲洗干净,转移至超净台,进行表面消毒灭菌(先用 10%次氯酸钠浸泡 2 min,然后用无菌水漂洗 3 次,每次 1 min)。将灭菌后的叶片接入 PDA 平板培养基上,置于 26 ℃ 恒温培养箱培养 7~12 d,根据菌落形态的差异进行纯化,直至得到单一菌落,4 ℃ 冰箱保存。

**1.2.2 溶磷内生真菌的筛选** 将分离纯化后的内生真菌分别接种于 NBRIIP 平板培养基上,26 ℃ 恒温培养箱培养 7 d,测定菌落直径( $D$ )和溶磷圈直径( $d$ ),并计算比值( $d/D$ );将初筛得到的溶磷能力较强的菌株( $d/D \geq 0.4$ )接种于 PDA 培养基,26 ℃ 扩繁培养 10 d;无菌操作取 5 个直径 5 mm 的菌块接种至盛有 50 mL NBRIIP 液体培养基的锥形瓶中

(锥形瓶规格:150 mL),以接种无菌 PDA 培养基块为对照(CK),每个菌株设 5 个重复,恒温振荡仪振荡培养(7 d,27 ℃,120 r·min<sup>-1</sup>),过滤后采用钼锑抗比色法测上清液有效磷含量<sup>[18]</sup>,用 UV-1800 紫外可见分光光度计在 880 nm 处比色并测定 OD 值,计算上清液有效磷含量和溶磷率<sup>[19]</sup>,来确定不同菌株对无机磷的溶解能力。

溶磷率(%)=[(接菌培养基中可溶性磷含量-接培养基的对照组中可溶性磷含量)/加入无机磷源的总磷量]×100%。

**1.2.3 溶磷内生真菌的鉴定** 根据菌株的形态特征和培养特征,对分离到的内生真菌进行初步鉴定<sup>[20-21]</sup>。并对高效溶磷真菌菌株进行分子鉴定:采用 CTAB 法提取所分离到内生真菌的 DNA,利用通用引物 ITS1 和 ITS4 对菌株目的基因片段进行扩增,PCR 扩增产物送上海生工生物技术有限公司测序后,将测序所得结果通过 Chromas 软件进行校对,校对后的序列提交 GenBank 数据库,并在 NCBI 的 GenBank 数据库中用 Blast 程序与数据库中的所有序列进行比较分析。

**1.2.4 国槐无茵苗的快速培育** 国槐种子采自陕西杨陵。选取颗粒饱满均匀、具有光泽的种子,在超净台上用 10%次氯酸钠消毒 5 min、无菌水清洗 3 次后,浸泡在 100 mL、70 ℃ 无菌水中,并不断搅动至水温降至室温,然后用解剖刀小心剥去种皮,保留完整的子叶与胚,无菌水润洗 3 次后,接入盛有 MS 固体培养基的组培瓶中,每瓶 1 颗,于光照度 1 500 lx、光照时间 12 h、温度 26 ℃ 的环境下培养。当无茵苗生长 40 d 左右,选择长势良好、大小形态一致的无茵苗回接内生真菌。

**1.2.5 溶磷内生真菌在国槐无茵苗中的回接** 将待回接的每个菌株在 PDA 平板培养基上活化 7 d 后,取 1 个直径 5 mm 的菌块回接至无茵苗培养基上,设 5 个重复,以接入无菌 PDA 块为对照(CK),共培养 10 d 后,待菌落长满培养基,取上述回接内生真菌的国槐苗根,制作徒手切片,通过棉蓝染色法,在显微镜下观察苗根组织的侵染结构<sup>[22]</sup>。

**1.2.6 生理指标测定** 国槐苗叶片由液氮迅速研磨后,-20 ℃ 保存备用,叶绿素含量测定采用 95%乙醇提取法<sup>[23]</sup>;制备粗酶液 4 ℃ 保存,并进行生理指标测定<sup>[24-26]</sup>;可溶性蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝 G-250 法,超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮蓝四唑(NBT)光还原法,过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法。

### 1.3 数据处理

运用 Microsoft Excel 2003 和 IBM SPSS Statistics 22 软件进行数据处理和统计分析,LSD 法进行多重比较,判断差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 古国槐叶片溶磷内生真菌的初筛

溶磷圈是指在溶磷微生物的作用下,无机磷固体培养基中的难溶性磷酸盐被溶解,而在菌落周围形成的透明圈,溶磷圈直径(*d*)和菌落直径(*D*)比值越大,溶磷能力越强<sup>[10, 27]</sup>。本试验结果(表 1)显示,从供试古国槐叶片中共分离出 55 株内生真菌,编号为 ZG-1~ZG-55,在以磷酸钙为唯一磷源的固体平板上,具有溶磷圈的溶磷真菌为 28 株,其中 15 株  $d/D \geq 0.5$ ,3 株  $d/D$  介于 0.4~0.5 之间,10 株  $d/D < 0.4$ ;菌株 ZG-34 和 ZG-15 的溶磷圈直径(*d*)分别为 66 和 60 mm,溶磷圈直径和菌落直径的比值( $d/D$ )分别为 1.22 和 1.20,均高于其他菌株,初步判断其溶磷能力强于其他菌株。

### 2.2 古国槐叶片溶磷内生真菌复筛及溶磷能力的比较

对可正常扩繁的  $d/D \geq 0.4$  的 12 株溶磷真菌进行 NBRIP 液体培养基培养,测定发酵液中可溶性磷含量。结果表明(图 1),12 株溶磷内生真菌对  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  的溶解能力很强,NBRIP 液体培养基上清液中有有效磷含量高于对照,有效磷含量在 113.61~1 238.28 mg·L<sup>-1</sup> 之间,各菌株溶磷率为 1.20%~23.69%。其中,菌株 ZG-15 的发酵液中有有效磷含

表 1 溶磷内生真菌的初筛结果( $d/D \geq 0.4$ )

Table 1 Preliminary screening results of the phosphate-solubilizing endophytic fungi( $d/D \geq 0.4$ )

菌株 Strain	<i>D</i> /mm	<i>d</i> /mm	<i>d</i> / <i>D</i>	菌株 Strain	<i>D</i> /mm	<i>d</i> /mm	<i>d</i> / <i>D</i>
ZG-7	58	23	0.40	ZG-36	25	27	1.08
ZG-9	32	33	1.03	ZG-39	33	35	1.06
ZG-13	33	33	1.00	ZG-42	50	25	0.50
ZG-15	50	60	1.20	ZG-43	15	17	1.13
ZG-18	36	37	1.03	ZG-48	40	16	0.40
ZG-23	23	23	1.00	ZG-50	25	25	1.00
ZG-26	17	15	0.88	ZG-51	36	15	0.42
ZG-32	20	22	1.10	ZG-52	23	25	1.09
ZG-34	54	66	1.22	ZG-53	29	29	1.00

注:*d*:溶磷圈直径;*D*:菌落直径

Note: *d*. Diameter of phosphorus solubilizing circle; *D*. Colony diameter.

量高达 1238.28 mg · L<sup>-1</sup>,溶磷率为 23.69%;ZG-34 的溶磷能力次之,发酵液中有效磷含量达到 941.22 mg · L<sup>-1</sup>,溶磷率为 17.75%;菌株 ZG-15 和 ZG-34 的溶磷能力均极显著高于其他菌株和对照(CK),并达到极显著水平( $P<0.01$ )。另外,菌株 ZG-53、ZG-51、ZG-48、ZG-32、ZG-42、ZG-9 和 ZG-23 的发酵液中有效磷含量虽极显著低于菌株 ZG-15 和 ZG-34,但极显著高于对照( $P<0.01$ )。

2.3 古国槐叶片溶磷内生真菌的初步鉴定

将溶磷内生真菌的 18S rDNA ITS 区序列分别与 GenBank 中的菌株序列进行相似性分析,并结合形态学对获得的 12 株溶磷内生真菌进行初步鉴定,结果如下(表 2):ZG-7 为拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis* sp.);ZG-9、ZG-23、ZG-32、ZG-36、ZG-53 为镰刀菌(*Fusarium* sp.);ZG-15、ZG-34 为曲霉(*Aspergillus* sp.);ZG-39、ZG-51 为链格孢(*Alternaria* sp.);ZG-42 为木霉(*Trichoderma* sp.);ZG-48 为附球菌(*Epicoccum* sp.)。

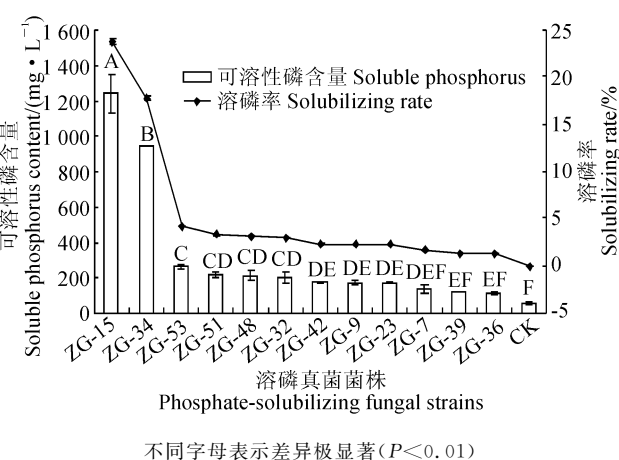


图 1 12 株溶磷内生真菌的溶磷效果

Different letters mean significant difference among strains at 0.01 level

Fig. 1 The phosphate-solubilizing effect of twelve endophytic fungi strains

2.4 古国槐叶片溶磷内生真菌在无菌苗中的定殖

挑选不同溶磷效果、不同属的内生真菌 ZG-7 (*Pestalotiopsis* sp.)、ZG-9 (*Fusarium* sp.)、ZG-15 (*Aspergillus* sp.)和 ZG-48 (*Epicoccum* sp.) ,分别接入国槐无菌苗,10 d 后菌落长满培养基表面,国槐苗生长正常。接种内生真菌的国槐苗根部横切组织中可观察到内生真菌菌丝(图 2),其主要侵染部位为皮层细胞,在中柱鞘细胞和凯氏带细胞中也发现有不同程度的侵染,表明接种的内生真菌和国槐无菌苗根系建立了良好的共生关系。

2.5 溶磷内生真菌对国槐无菌苗生理特征的影响

2.5.1 叶绿素含量 叶绿素(Chl)是植物光合作用最主要的色素,且其含量与叶色呈正相关,能大致反映出植物的营养状况,影响植物的光合速率<sup>[28]</sup>。4 株溶磷内生真菌对国槐无菌苗叶绿素含量的影响差异明显(表 3):菌株 ZG-15 处理的国槐幼苗 Chl a、Chl b、Chl (a+b) 含量均高于其他菌株处理,且分别比 CK 增加 35.8%、23.8%和 10.0%,差异达到显著水平( $P<0.05$ );菌株 ZG-7 处理次之,除了 Chl b 与 CK 差异不显著外,其 Chl a 和 Chl (a+b)均显著高于 CK( $P<0.05$ );菌株 ZG-9 和 ZG-48 处理的叶绿素含量与 CK 无显著差异。另外,从 Chl a/b 比值来看,仅接种菌株 ZG-9 的国槐幼苗 Chl a/b 比值显著高于 CK ( $P<0.05$ ),接种其他菌株对 Chl a/b 比值的作用效果不明显。本试验中溶磷内生真菌菌株 ZG-7 和 ZG-15 可能通过提高国槐无菌苗的叶绿素含量来增强其光合作用。

2.5.2 可溶性蛋白质含量 可溶性蛋白质是植物体内多种参与调节代谢的酶组成成分,直接影响植物体的呼吸作用分解糖类供能、构成细胞、催化各种化学反应等,具有重要的生理作用<sup>[29]</sup>。4 株内生真菌对国槐无菌苗可溶性蛋白质含量影响不同(表 3)。其中,接种菌株 ZG-15 和 ZG-48 的国槐幼苗可溶性蛋白质含量显著高于 CK( $P<0.05$ ),且分别比

表 2 12 株溶磷内生真菌的初步鉴定

Table 2 Identification of the 12 phosphate-solubilizing endophytic fungi strains

菌株编号 Strain No.	菌种 Strain	菌株编号 Strain No.	菌种 Strain
ZG-7	拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis</i> sp.	ZG-36	镰刀菌 <i>Fusarium</i> sp.
ZG-9	镰刀菌 <i>Fusarium</i> sp.	ZG-39	链格孢 <i>Alternaria</i> sp.
ZG-15	曲霉 <i>Aspergillus</i> sp.	ZG-42	木霉 <i>Trichoderma</i> sp.
ZG-23	镰刀菌 <i>Fusarium</i> sp.	ZG-48	附球菌 <i>Epicoccum</i> sp.
ZG-32	镰刀菌 <i>Fusarium</i> sp.	ZG-51	链格孢 <i>Alternaria</i> sp.
ZG-34	曲霉 <i>Aspergillus</i> sp.	ZG-53	镰刀菌 <i>Fusarium</i> sp.

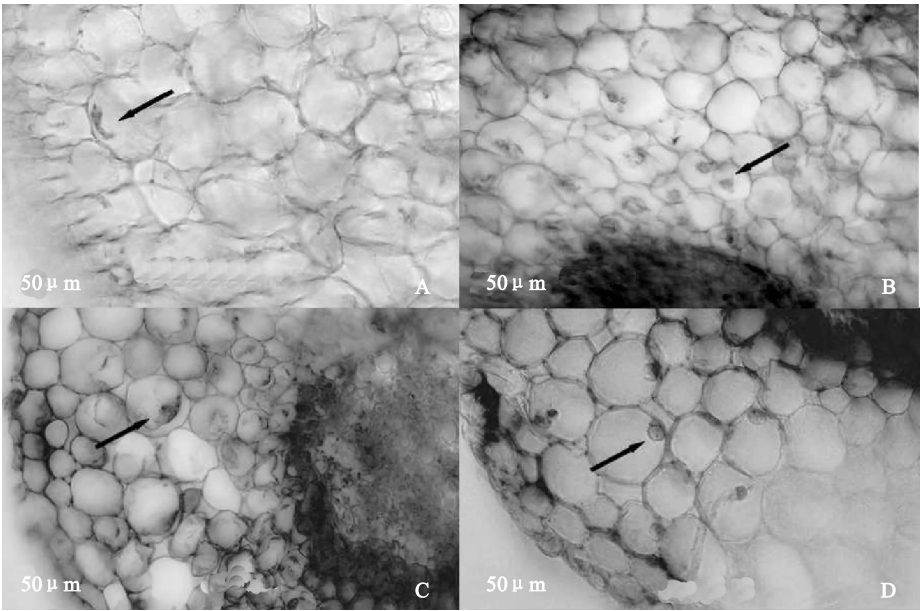


图 2 溶磷内生真菌菌丝体(箭头所指)在国槐中的定殖

A. ZG-7(*Pestalotiopsis* sp.); B. ZG-9(*Fusarium* sp.); C. ZG-15(*Aspergillus* sp.); D. ZG-48(*Epicoccum* sp.)

Fig. 2 Colonization of mycelium of endophytic fungi in *S. japonica*

表 3 接种溶磷内生真菌的国槐幼苗生理指标变化

Table 3 The physiological indexes of *S. japonica* seedlings inoculated the phosphate-solubilizing endophytic fungi

菌株 Strains No.	叶绿素含量及比值 Chlorophyll content and their ratio/(mg · g <sup>-1</sup> )				可溶性蛋白含量 Soluble protein content/(mg · g <sup>-1</sup> )	SOD 活性 SOD activity (U · g <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )	POD 活性 POD activity (U · g <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )
	Chl a	Chl b	Chl(a+b)	Chl a/b			
CK	2.32±0.10c	1.22±0.07b	3.54±0.17c	1.90±0.03b	6.01±0.39c	275.87±27.69cd	1 050.62±123.82c
ZG-7	2.76±0.05b	1.33±0.07ab	4.09±0.12b	2.09±0.08ab	5.34±0.15c	303.95±40.77bc	1 206.64±63.85c
ZG-9	2.56±0.05bc	1.17±0.02b	3.74±0.07bc	2.19±0.02a	5.93±0.31c	231.13±34.77d	1 487.92±143.10ab
ZG-15	3.15±0.10a	1.51±0.05a	4.66±0.15a	2.09±0.05ab	6.84±0.59b	381.34±10.77a	1 430.60±36.76b
ZG-48	2.38±0.08c	1.15±0.09b	3.53±0.17c	2.08±0.11ab	7.71±0.25a	341.03±25.92ab	1 693.39±160.41a

注:同列不同字母表示在 0.05 水平存在显著性差异

Note: Different letters in the same column mean significant difference at 0.05 level

对照增加了 13.72%和 28.16%;而接种菌株 ZG-7 和 ZG-9 的国槐幼苗可溶性蛋白质含量与 CK 相比无明显变化,说明接种菌株 ZG-15 和 ZG-48 可有效提高国槐无菌苗的可溶性蛋白质含量,促进无菌苗的正常生理代谢。

**2.5.3 SOD 和 POD 活性** 抗氧化酶 SOD、POD 可有效地控制植物体内活性氧的积累,维持植物的正常生长和抵抗逆境的能力<sup>[30]</sup>。接种不同溶磷内生真菌对国槐幼苗 SOD 和 POD 活性影响程度不同,且同一种内生真菌处理下 SOD 和 POD 活性的变化趋势也有差异(表 3)。其中,接种菌株 ZG-7 的国槐幼苗 SOD、POD 活性与对照相比均变化不明显;接种菌株 ZG-9 的国槐幼苗 SOD 活性无明显变化,其 POD 活性则显著高于 CK( $P<0.05$ );接种菌株 ZG-15 和 ZG-48 的国槐幼苗 SOD、POD 活性均

显著高于 CK( $P<0.05$ ),它们的 SOD 活性分别比对照提高 38.23%和 23.62%,POD 活性分别比 CK 提高 36.17%和 61.18%。可见,在 4 个供试菌株中,ZG-15 和 ZG-48 为可提高国槐无菌苗 SOD 和 POD 活性的高效菌。

**2.6 溶磷内生真菌 ZG-15 的系统鉴定**

从以上 4 个溶磷内生真菌回接国槐无菌苗的综合表现来看,菌株 ZG-15 表现最为突出,为本试验得到的促生潜力优势菌。ZG-15 的 ITS rDNA 经 PCR 扩增后,扩增产物长度为 514 bp,在 GenBank 中的序列登记号为 KT192384.1,将菌株序列与模式菌株序列进行比对,发现其与黑曲霉(*Aspergillus niger*)同源性达 100%,采用 MEGA6.0 软件构建该菌的系统发育进化树(图 3),结合该菌的形态特征与培养特性,鉴定菌株 ZG-15 为黑曲霉(*Aspergillus niger*)。

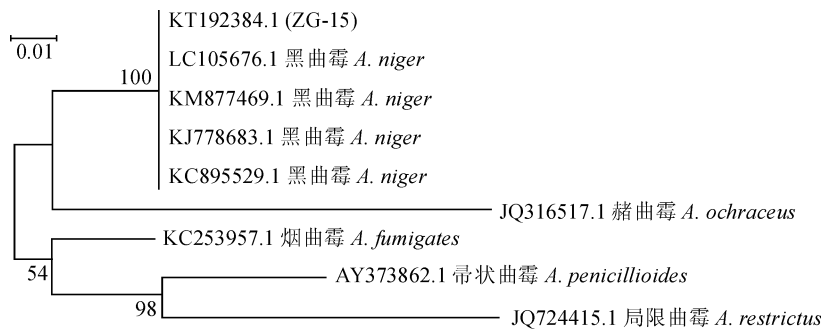


图 3 菌株 ZG-15 的 ITS 系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain ZG-15 and related trees based on ITS sequence

3 结论与讨论

本研究利用溶磷圈法和钼锑抗比色法对古国槐叶片内生真菌溶磷特性进行了测定,发现采用溶磷圈观察法测定菌株的溶磷圈直径( $d$ )、溶磷圈直径与菌落直径比值( $d/D$ )和溶磷量差别的变化趋势相同,在菌株的初步筛选过程中,可将  $d$ 、 $d/D$  值作为菌株溶磷能力初步筛选的定性判断标准值,这与朱颖等<sup>[31]</sup>的研究结果表现一致。菌株能溶解的难溶磷源越多,则其溶磷特性越好<sup>[32]</sup>。本试验从古国槐叶片中分离出了具有溶磷作用的内生真菌 28 株,其中溶磷能力较强的有 12 株,且曲霉属内生真菌(*Aspergillus* sp.)在不同溶磷真菌中的溶磷活性最高,这与 Narsian 等<sup>[33]</sup>的研究结果一致。梁艳琼等<sup>[34]</sup>从热带作物根际筛选到的黑曲霉 PSFM 溶解  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  的能力为  $511.28\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;史发超<sup>[35]</sup>从农田土壤中筛选到的黑曲霉 P43 溶解  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  的能力为  $818.71\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,溶磷率为 36.55%;刘文干等<sup>[36]</sup>从红壤花生根际发现的黑曲霉 BI-A 溶解  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  的能力为  $418.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;魏伟等<sup>[11]</sup>从马尾松根际筛选出的泡盛曲霉 JP-NJ1 溶解  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  的能力为  $1\,051.69\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,溶磷率为 19.3%。本试验得到的溶磷能力最强的是菌株 ZG-15(*Aspergillus niger*)和 ZG-34(*Aspergillus* sp.),对  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  的溶解能力分别为  $1\,238.28$  和  $941.22\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,溶磷率分别为 23.69% 和 17.75%,具有较强的溶磷优势。目前,大量报道认为,溶磷真菌的溶磷作用与微生物产生有机酸有关,一方面有机酸可使土壤 pH 值局部降低,使难溶态

磷酸盐在酸性条件下溶解;另一方面,这些有机酸能与铝、铁、钙、镁等金属离子结合,从而使磷酸根释放出来,发挥溶磷作用<sup>[37]</sup>。本研究筛选的高效溶磷内生真菌的溶磷机制有待进一步研究。

溶磷内生真菌不仅具有溶磷特性,也可与宿主在长期共处中形成互利共生关系,直接或诱导植物产生毒素或抗生素物质而提高其抗病虫害能力,也可通过影响宿主植物体内的物质代谢、产生生理活性的物质(如生长素、赤霉素以及其它活性物质)来促进宿主植物的生长,提高其对环境的适应性<sup>[38-39]</sup>。研究表明,分离自杨树的球毛壳 ND35 菌株可侵染宿主,定殖在杨树幼根,促进生长,并提高防御酶活性,增强植物抗逆性<sup>[40-41]</sup>。叶绿素(Chl)是植物光合作用最主要的色素,且其含量越高,越有利于植物的光合速率<sup>[28]</sup>;可溶性蛋白质直接影响植物体的呼吸作用,并分解糖类供能、构成细胞、催化各种化学反应等<sup>[29]</sup>;而抗氧化酶 SOD、POD 可有效地控制植物体内活性氧的积累,维持植物的正常生长和提高抵抗逆境的能力<sup>[30]</sup>。本试验结果表明,4 株溶磷内生真菌 ZG-7、ZG-9、ZG-15 和 ZG-48 回接至国槐无菌苗,均可侵染宿主根部组织,建立共生关系,并可影响宿主的叶绿素含量、可溶性蛋白质含量、相关防御酶活性等。其中,菌株 ZG-15(*Aspergillus niger*)可有效提高国槐无菌苗的叶绿素含量,增强光合作用,也可显著提高国槐无菌苗体内可溶性蛋白含量和 SOD、POD 活性,维持幼苗的正常生长和适应环境的能力,为本试验得到的促生潜力优势菌,可为古国槐的有效保护及溶磷菌肥的生产提供依据,值得进一步研究。

参考文献:

[1] 龚明波,范丙全,王洪媛.一株新的溶磷棘孢青霉菌 Z32 的分

离、鉴定及其土壤定殖与溶磷特性[J].微生物学报,2010,50(5):580-585.

GONG M B, FAN B Q, WANG H Y. Isolation and identification of a novel phosphate-dissolving strain *Penicillium aculeatum* Z32 and its colonization and phosphate-dissolving characteristics in soil[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, **50**(5): 580-585.

[2] 易艳梅, 黄为一. 不同生态区土壤溶磷微生物的分布特征及影响因子[J]. 生态与农村环境学报, 2010, **26**(5): 448-453.

YI Y M, HUANG W Y. Distribution of phosphate-solubilizing microbes in soils of different ecological zones and its affecting factors[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2010, **26**(5): 448-453.

[3] COUTINHO F P, FELIX W P, YANO-MELO A M. Solubilization of phosphates *in vitro* by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. [J]. *Ecological Engineering*, 2012, **42**(9): 85-89.

[4] WHITELAW M A, HARDEN T J, BENDER G L. Plant growth promotion of wheat inoculated with *Penicillium radicum* sp. Nov. [J]. *Australian Journal of Soil Research*, 1997, **35**(2): 291-300.

[5] 赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展[J]. 中国土壤与肥料, 2001, (3): 7-11.

ZHAO X R, LIN Q M. A review of phosphate-dissolving microorganisms[J]. *Soils and Fertilizer*, 2001, (3): 7-11.

[6] KUCEY R M N, JANZEN H H, LEGGETT M E. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus[J]. *Advances in Agronomy*, 1989, **42**: 199-228.

[7] 林启美, 王 华, 赵小蓉, 等. 一些细菌和真菌的解磷能力及其机理初探[J]. 微生物学通报, 2001, **28**(2): 26-30.

LIN Q M, WANG H, ZHAO X R, *et al.* Capacity of some bacteria and fungi in dissolving phosphate rock[J]. *Microbiology*, 2001, **28**(2): 26-30.

[8] 王光华, 周克琴, 金 剑, 等. 黑土区高效溶磷真菌筛选及其溶解磷矿粉效果的研究[J]. 中国生态农业学报, 2004, **12**(3): 143-145.

WANG G H, ZHOU K Q, JIN J, *et al.* Choose of phosphate-solubilizing fungal strains with high efficiency in black soil[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2004, **12**(3): 143-145.

[9] 房玉林, 宿霞霞, 郑 颖, 等. 西北地区溶磷真菌对‘红地球’葡萄促生效应因子分析[J]. 园艺学报, 2012, **39**(7): 1 225-1 234.

FANG Y L, SU J X, ZHENG Y, *et al.* Effects of eight strains of Phosphate-solubilizing fungi in northwest area on ‘red globe’ grape growth-based on factor analysis method[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, **39**(7): 1 225-1 234.

[10] RAM H, MALIK S S, DHALIWAL S S, *et al.* Growth and productivity of wheat affected by phosphorus-solubilizing fungi and phosphorus levels[J]. *Plant Soil & Environment*, 2015, **61**(3): 122-126.

[11] 魏 伟, 吴小芹, 乔 欢. 马尾松根际高效解磷真菌的筛选鉴定及其促生效应[J]. 林业科学, 2014, **50**(9): 82-88.

WEI W, WU X Q, QIAO H. Screening and identification of phosphate-solubilizing fungi of *Pinus massoniana* rhizosphere and its application[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2014, **50**(9): 82-88.

[12] BARROSO C B, NAHAS E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates[J]. *Applied Soil Ecology*, 2005, **29**(1): 73-83.

[13] 刘 燕. 野生越橘内生真菌的分离鉴定及对栽培种的促生作用研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2010.

[14] 易 婷, 缪煜轩, 冯永君. 内生菌与植物的相互作用: 促生与生物薄膜的形成[J]. 微生物学通报, 2008, **35**(11): 1 774-1 780.

YI T, MIAO Y X, FENG Y J. Plant-endophyte interaction: growth-promoting effect of endophytes and their biofilm formation[J]. *Microbiology*, 2008, **35**(11): 1 774-1 780.

[15] 姚颂爱, 胡之璧, 王莉莉, 等. 植物内生菌与宿主关系研究进展[J]. 生态环境学报, 2010, **19**(7): 1 750-1 754.

YAO L A, HU Z B, WANG L L, *et al.* Research development of the relationship between plant endophyte and host[J]. *Ecology and Environment*, 2010, **19**(7): 1 750-1 754.

[16] 杜秉海. 微生物学实验[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1994: 133-134.

[17] SHEKHAR N C. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms[J]. *Federation of European Microbiological Societies*, 1999, **170**(1): 265-270.

[18] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.

[19] 刘 辉, 吴小芹, 陈 丹. 4 种外生菌根真菌对难溶性磷酸盐的溶解能力[J]. 西北植物学报, 2010, **30**(1): 143-149.

LIU H, WU X Q, CHEN D. Ability of dissolving insoluble phosphate by four ectomycorrhizal fungi [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2010, **30**(1): 143-149.

[20] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.

[21] 孔华忠, 王 龙. 中国真菌志[M]. 北京: 科学出版社, 2007.

[22] GAO K, MENDGEN K. Seed-transmitted beneficial endophytic *Stagonospora* sp. can penetrate the walls of the root epidermis, but does not proliferate in the cortex, of *Phragmites australis*[J]. *Canadian Journal of Botany*, 2006, **84**(6): 981-988(8).

[23] 王元军. 黑豆芽苗菜叶绿素的提取方法[J]. 食品研究与开发, 2010, **31**(2): 27-29.

WANG Y J. Research on extraction methods of chlorophyll from black bean sprout[J]. *Food Research and Development*, 2010, **31**(2): 27-29.

[24] HODGES D, FORNEY C, PRANGE R J, *et al.* Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds[J]. *Planta*, 1999, **207**(4): 604-611.

[25] 郝再彬, 苍 晶, 徐 仲. 植物生理实验[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004.

[26] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.

[27] 陈 俊, 陆俊锟, 康丽华, 等. 红树林溶磷菌的初步鉴定、溶磷能力测定及其优化培养[J]. 微生物学通报, 2009, **36**(8): 1 183-1 188.

CHEN J, LU J K, KANG L H, *et al.* Primary identification, capability of phosphate-solubilization and optimization of medium of some microorganism from mangrove[J]. *Microbiology*, 2009, **36**(8): 1 183-1 188.

[28] 张友胜, 张苏峻, 李镇魁. 植物叶绿素特征及其在森林生态学中的应用[J]. 安徽农业科学, 2008, **36**(3): 1 014-1 017.

ZHANG Y S, ZHANG S J, LI Z K. Characteristics of plant chlorophyll and the prospects for its use in forest ecological study[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, **36**(3): 1 014-1 017.

[29] BERRY J A, DOWNTON W J. Environmental regulation of photosynthesis [M]// GOVINDJEEED. Photosynthesis (Vol. II). New York: Academic Press, 1982, 294-306.

[30] FOYER C H, DESOURVIÈRES P, KUNERT K J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants[J]. *Plant Cell & Environment*, 1994, **17**(5): 507-523.

[31] 朱 颖, 姚 拓, 李玉娥, 等. 红三叶根际溶磷菌分离及其溶磷机制初探[J]. 草地学报, 2009, **17**(2): 259-263.

ZHU Y, YAO T, LI Y E, *et al.* Screening of phosphate-solubilizing bacteria and their acting mechanisms in the rhizosphere of red clover[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2009, **17**(2): 259-263.

[32] GOTHWAL R K. Phosphate solubilization by rhizospheric bacterial isolates from economically important desert plants[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2006, **46**(4): 355-361.

[33] NARSIAN V, PATEL H H. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer[J]. *Soil Biol. Biochem.*, 2000, **32**(4): 559-565.

[34] 梁艳琼, 雷照鸣, 贺春萍, 等. 一株溶磷真菌的分离鉴定及其溶磷能力的初步研究[J]. 热带作物学报, 2011, **32**(6): 1 116-1 121.

LIANG Y Q, LEI Z M, HE C P, *et al.* Phosphate-solubilizing mechanism of PSFM and preliminary study on solubilization capacity of insoluble phosphates[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2011, **32**(6): 1 116-1 121.

[35] 史发超. 高效溶磷真菌的筛选鉴定及溶磷促生效果研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.

[36] 刘文干, 曹 慧, 樊建波, 等. 一株红壤花生根际溶磷真菌的分离、鉴定及溶磷能力的研究[J]. 土壤学报, 2012, **49**(5): 988-994.

LIU W G, CAO H, FAN J B, *et al.* Isolation, identification and characterization of a phosphate-solubilizing strain of fungi in rhizosphere of peanuts growing in red soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*. 2012, **49**(5): 988-994.

[37] PICCINI D, AZCON R. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the utilization of Bayovar rock phosphate by alfalfa plants using a sand-vermiculite medium[J]. *Plant & Soil*, 1987, **101**(101): 45-50.

[38] 文 先. 内生真菌 *Epichloë bromicola* 菌种分离鉴定及其发酵物对拟南芥幼苗生长的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2015.

[39] SIRRENBURG A, GÖBEL C, GROND S, *et al.* Piriformospora indica affects plant growth by auxin production[J]. *Physiologia Plantarum*, 2007, **131**(4): 581-589.

[40] 孟庆果, 刘晓光, 高克祥, 等. 球毛壳 ND35 在杨树的定植及对酶活性的影响[J]. 植物保护学报, 2009, **36**(1): 91-92.

MENG Q G, LIU X G, GAO K X, *et al.* *Chaetomium globosum* ND35 colonization and influence on enzymes activities in Poplar[J]. *Journal of Plant Protection*, 2009, **36**(1): 91-92.

[41] 丛国强, 尹成林, 何邦令, 等. 水分胁迫下内生真菌球毛壳 ND35 对冬小麦苗期生长和抗旱性的影响[J]. 生态学报, 2015, **35**(18): 6 120-6 128.

CONG G Q, YIN C L, HE B L, *et al.* Effect of endophytic fungus *Chaetomium globosum* ND35 on the growth and resistance to drought of winter wheat at the seedling stage under water stress[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, **35**(18): 6 120-6 128.

(编辑:裴阿卫)