

doi: 10.11838/sfsc.20170324

2 株溶磷、解钾与产 IAA 的内生真菌菌株的筛选、鉴定及促生作用研究

詹寿发, 卢丹妮, 毛花英, 熊蓉露, 黄丹, 陈晔*

(九江学院药学与生命科学学院, 江西 九江 332000)

摘要: 从钾矿区优势蕨类植物 - 芒萁内生真菌中筛选出具溶磷、解钾、分泌吲哚乙酸 (IAA) 的功能菌株, 并研究其对农作物的促生作用。采用菌株的形态学特性、培养特征及 5.8S rDNA、18S rDNA ITS 序列分析方法对菌株进行鉴定, 并结合液体培养和固体培养方法初步测定菌株的溶磷、解钾能力, 采用回接及盆栽试验研究它们对玉米幼苗的促生作用。从 42 株芒萁内生真菌中筛选得到 2 株具有高效溶磷、解钾、分泌 IAA 功能的内生真菌菌株 (编号为 MQ013 和 MQ039), 经鉴定 MQ013 菌株为泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*), MQ039 菌株为黑曲霉 (*Aspergillus niger*)。促生作用试验结果显示, MQ013、MQ039 菌株能有效提高玉米植株体内叶绿素及磷、钾含量。MQ013、MQ039 菌株具有一定的溶磷、解钾和分泌 IAA 活性, 并对玉米幼苗的生长有明显的促进作用, 该菌株在研制高效生物肥料接种剂方面可能具有较大潜力。

关键词: 溶磷; 解钾; 生长素; 内生真菌; 促生作用

中图分类号: Q949.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6257 (2017) 03-0142-10

磷、钾是植物的必需营养元素, 在植物生长发育过程中发挥重要的作用。土壤中含有丰富的磷、钾元素, 但绝大多数以难溶性盐的形式存在, 不能被植物直接吸收利用。如何将土壤中难溶性磷、钾转化成植物可以直接吸收的可溶性磷、钾倍受关注^[1-3]。吲哚乙酸 (IAA) 是一种植物体内普遍存在的内源生长素, IAA 通过不同的信号传导途径激发各种生理效应, 参与植物细胞伸长生长、细胞分裂、维管组织分化、顶端优势、向性、同化物的运输、叶片和花的脱落等许多生理生化过程的调节与控制, 促进植物的生长发育^[4-5]。

目前, 研究者从不同矿物表层、土壤、植物根际中筛选出部分对矿物具有浸溶作用或是具有分泌 IAA 活性的微生物菌株并进行有关促生作用研究。如葛菁萍等^[6]从土壤中筛选得到 3 株具有解磷、解钾、固氮能力的真菌, 龚明波等^[7]从植物根部土壤

中分离到一株高效溶磷青霉菌株 Z32, 刘文干等^[8]在花生根际分离到 1 株高效溶磷的黑曲霉菌株 B1-A, Michele 等^[9]从侧柏中分离得到产 IAA 的内生真菌 9143。但有关从植物体内筛选出对矿物具有浸溶作用及产 IAA 的内生真菌菌株鲜见报道。本试验以分离自钾矿区优势蕨类植物 - 芒萁 (*Dicranopteris linearis*) 内生真菌菌株为研究对象, 通过平板活性测定试验筛选出具有溶磷、解钾活性以及分泌 IAA 功能的活性菌株, 运用微生物发酵、回接技术研究菌株对植物的促生效应, 为植物内生真菌资源的开发利用并进一步探究植物内生真菌对植物在矿区适应机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

龙南钾矿区 (114°23' ~ 114°59' E, 24°29' ~ 25°1' N) 芒萁 (*D. linearis*) 内生真菌 42 株 (九江学院真菌研究室提供)。

1.1.2 矿样

钾长石样品 (鄱阳湖生态经济研究中心矿物研究室提供)。矿样主要化学组成为 K₂O 11.09%, Al₂O₃ 19.25%, SiO₂ 66.57%, 粉碎至过 0.15 mm 筛备用。

收稿日期: 2016-04-15; 最后修订日期: 2016-08-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31360064; 51264014); 2014 年江西省普通本科大学生创新创业教育计划项目 (赣财教指 [2014] 57 号)。

作者简介: 詹寿发 (1964-), 男, 江西都昌人, 硕士, 副教授, 研究方向为真菌多样性。E-mail: zhan9630@126.com。

通讯作者: 陈晔, E-mail: chenyejtc@126.com。

1.1.3 供试培养基

固体或液体马铃薯葡萄糖培养基 (PDA), 解磷无机磷培养基^[6], 金氏培养基 B (King 培养液)^[10]。

1.1.4 供试种子

承玉 11 玉米种子 (九江市种子管理局种子供应站购置)。

1.2 方法

1.2.1 溶磷内生真菌菌株筛选及测定

将芒萁内生真菌活化培养, 挑取活化后的内生真菌菌块 (菌块大小 Φ 0.5 cm) 接种至解磷无机磷培养基上, 28 °C 培养 48 ~ 72 h, 通过观察透明溶磷圈的出现并测量、计算溶磷圈直径 HD 值与菌落直径 CD 值的比值, 初步筛选出具有溶磷活性的菌株。将初选得到的溶磷菌株 (菌块大小 Φ 0.5 cm) 接种至解磷无机磷液体培养基 (150 mL 三角瓶中装液体培养基 50 mL) 上, 置恒温摇床 28 °C、150 r/min 发酵培养 5 ~ 7 d, 以灭活菌株摇瓶作对照, 每菌株重复 3 次。将培养液过滤, 测定培养液 pH 值; 采用文献 [6] 中的方法测定培养液中有效磷含量, 筛选出高效溶磷菌株。

1.2.2 溶磷内生真菌菌株的解钾活性测定

1.2.2.1 生长量的测定 将初选得到的溶磷菌株 (菌块大小 Φ 0.5 cm) 接种在解钾固体培养基 (PDA 培养基一侧撒上少量灭菌钾长石粉末, 另一侧接种菌株) 上, 28 °C 培养 48 ~ 72 h, 以菌丝生长速度、菌丝形态、菌落形态为考察指标, 用体视显微镜、倒置显微镜观察平板菌丝对含钾矿粉的趋化性和生长特征, 初步选出具有解钾活性的菌株。将初选解钾活性的菌株 (菌块大小 Φ 0.5 cm) 接种至在 100 mL PDA (加 1 g 钾长石矿粉) 培养液中, 菌株生物量的测定按 1.2.1 节的方法进行液体培养, 于 0、3、6、9、12、15 d 对培养液过滤得到的菌体干燥, 称重并记录作图。以不加钾长石矿粉培养作对照, 每组设 3 个重复, 共测定 5 次。

1.2.2.2 MQ013、MQ039 菌丝对钾长石矿粉作用观察 用体视显微镜、倒置显微镜观察加钾液体培养的菌球对含钾矿粉的亲和性和生长特征; 在不同时期用吸管从 1.2.2.1 节试验组培养瓶下部取 1 滴培养液置于扫描电镜样品支撑铜网上, 自然晾干后电镜观察 MQ013、MQ039 菌丝对钾长石矿粉颗粒的作用^[11]。

1.2.2.3 四苯硼酸钾重量法测定发酵液可溶性钾含量 在 100 mL PDA (加 1 g 钾长石矿粉) 培养液

中, 灭菌后接入 5 mL 初步筛选得到的具有解钾活性菌株种子液, 按 1.2.1 节的方法培养 30 d 后将培养液过滤, 用去离子水定容至 100 mL, 取 5 mL 培养液用四苯硼酸钾重量法测定培养液中可溶性钾的含量, 以加入 5 mL 灭活的菌株种子液 (与培养基一起灭菌) 作对照, 每组设 6 个重复。按下式计算实验组培养液中可溶性钾的含量, 以 K_2O mg/100 mL (培养液) 为单位:

$$K_2O(\text{mg}/100 \text{ mL}) = \frac{(M1 - M2) \times 0.1314}{5/100} \times 1000$$

式中: M1—试验所得沉淀的质量 (g);

M2—对照所得沉淀的质量 (g);

0.1314—四苯硼酸钾转换为氧化钾的转换系数。

浸出结束后, 用 SEM (TESCAN 公司, VEGA-ILSU) 与 EDS (英国牛津公司, IE250 + INCAX-ac 型) 观察经菌株作用后含钾矿物的表面微观形态及矿物组成变化。

1.2.3 溶磷、解钾内生真菌菌株产 IAA 活性鉴定与测定

采用 Salkowski 比色法^[12], 将活化后具溶磷、解钾功能的菌株接种到 King 培养液进行液体发酵, 分别取各菌株培养液上清液 100 μ L 置白色陶瓷板上, 加入等量氯化铁比色液 (PC 比色液), 暗处静置 0.5 h 后, 观察其颜色变化, 以无菌水的培养液为空白对照, 以 100 μ L IAA 标准液 (50 μ g/mL) 加等量 PC 比色液作阳性对照进行颜色比较。与标准液颜色相同为阳性, 表示该菌株能分泌 IAA (颜色越深表示 IAA 分泌量越多), 反之为阴性。初步筛选出具有 IAA 分泌能力的菌株。

配制 3-吲哚乙酸标准液, 按上述方法显色, 分光光度计 (波长 530 nm) 测定吸光度, 制作标准曲线, 得方程 $y = 0.0345x + 0.0135$ ($R^2 = 0.9987$)。将菌株接种至 King 培养基摇床培养 15 d, 按标准曲线制作方法测定发酵液中 IAA 含量。

1.2.4 菌株鉴定

1.2.4.1 形态学鉴定 依据相关文献^[13-14], 根据菌落形态、产孢方式、孢子形态特征和产孢结构对菌株进行形态学鉴定。

1.2.4.2 分子生物学鉴定 ①基因组 DNA 提取: 参考 Guo 等^[15]、曾东方等^[16]的方法, 利用反复冻融、SDS-CTAB 法提取基因组 DNA。②ITS 序列扩增: 用引物 ITS1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG

-3') 和 ITS4 (5' - TCCTCCGCTTATGATATGC - 3') 进行真菌 18S rDNA 和 5.8S rDNA 之间的序列的扩增, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 并用 DNA 凝胶回收试剂盒回收, 送上海生物工程有限公司测序。③系统进化树构建: 将测得的 5.8S、18S rDNA ITS 序列提交 NCBI 数据库, 并通过 Blast 进行相似性搜索, 下载相似性最高的典型菌株的序列, 用 Clustal W 对所有序列进行比对, 最后利用 MEGA 4.0 软件构建 N-J 系统进化树, 其 BootsVap 值设为 1 000 次重复。

1.2.5 菌株回接及盆栽试验

将筛选出的具有高效溶磷、解钾、分泌 IAA 菌株进行液体发酵^[17], 摇床转速 390 r/min, 28 °C 培养 15 d, 制成菌悬液备用。用 0.1% 高锰酸钾溶液对玉米种子 (承玉 11) 进行浸种。以蛭石 160 g + 钾矿渣 40 g + 磷酸三钙 1 g 为盆栽基质, 用自来水浸润后每盆种刚发芽的玉米种子 3 粒, 将 10 mL 菌悬液均匀施于种子周围, 以施 10 mL 无菌水作对照, 每组设 10 次重复。实验组每隔 15 d 加施 1 次 10 mL 菌悬液, 对照组为 10 mL 无菌水。观察记录植株的形态特征, 栽培 60 d 后, 检查菌株对玉米根部的侵染情况, 并进行植株相关生理指标的测定^[18]。

1.2.6 生理指标测定和植株体内有效磷、速效钾含量测定

1.2.6.1 菌株的侵染率测定 取盆栽实验中的玉米植株的根部清洗后用乳酸甘油酸性品红法染色后用显微镜观察^[19], 按公式: 菌株侵染率 (F) = 被侵染的菌根数/镜检的总根数 × 100% 计算侵染率。取上述已被菌株定殖的玉米根部做分离, 将培养出的菌株拍显微照片做形态鉴定, 看定殖的菌株是否为实验菌株。

1.2.6.2 光合指数 用 CI-340 光合仪在气温稳定, 晴天的状况下, 于 12:00 ~ 14:00 测定植株的部分光合指数 (玉米叶片的气孔导度、蒸腾速率、

细胞间 CO₂ 含量等) 并记录。

1.2.6.3 叶绿素含量测定 用分光光度计法测定叶绿素含量^[20]。

1.2.6.4 植株茎叶中钾、磷含量测定 称取 0.50 g 干玉米茎叶, 用 H₂SO₄ - H₂O₂ 消煮法^[21] 将其消煮完全, 消煮时做空白试验以校正试剂误差。消煮液冷却后转入 50 mL 的容量瓶用去离子水定容, 待用。采用四苯硼钠比浊法测定消煮液中钾的含量; 采用钼锑抗比色法测定消煮液中磷的含量。

1.3 数据分析

采用 Excel 2010、DPS V12.01 和 MEGA 4.0 软件进行数据统计与分析。

2 结果与分析

2.1 溶磷内生真菌菌株筛选及测定

运用溶磷圈法从钾矿区优势植物 - 芒萁 42 株内生真菌菌株中筛选出 2 株高效的溶磷能力内生真菌菌株 (菌株编号为 MQ013 和 MQ039), 见图 1。从溶磷圈大小可知, MQ013 菌株溶磷效果强于 MQ039 菌株。

将 MQ013 和 MQ039 菌株接种到磷酸三钙液体培养基, 进行发酵培养, 用钼锑抗比色法测定培养液有效磷含量, 结果见图 2。结果表明, MQ013、MQ039 菌株培养液中有有效磷含量均随培养时间增加而增加, 说明两菌株均具有溶磷作用, 但两者的溶磷效果存在差异, MQ013 菌株的溶磷效果明显大于 MQ039 菌株。从图 3 可见, 随培养时间的延长, 两菌株培养液 pH 值均呈下降趋势, 显示两菌株在培养过程中可能产生了酸性物质, 导致培养液 pH 值下降, 但 MQ013 菌株培养液的酸性强度整体比 MQ039 菌株培养液酸度大, 且两菌株培养液的酸性强度及其变化与培养液中可溶性磷含量的变化呈对应关系, 预示菌株的溶磷作用可能与其产生酸性物质有一定关系^[22]。

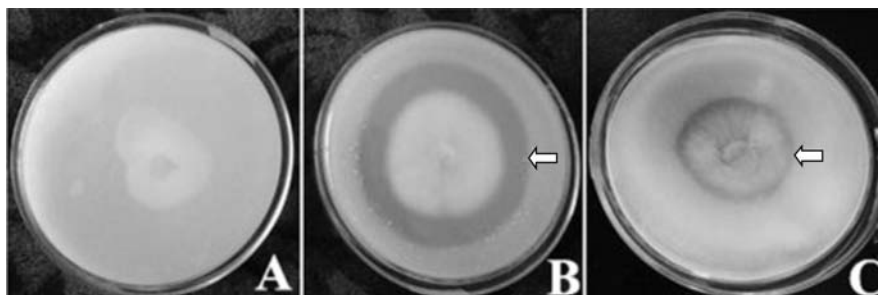


图 1 溶磷菌株筛选

注: ←: 指示溶磷圈; A: 无溶磷效果菌株 (对照); B: MQ013 菌株; C: MQ039 菌株。

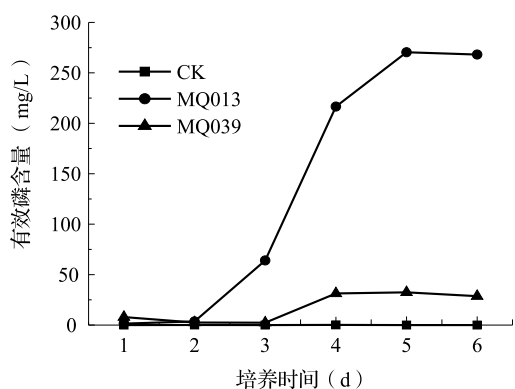


图2 MQ013、MQ039 溶磷能力测定

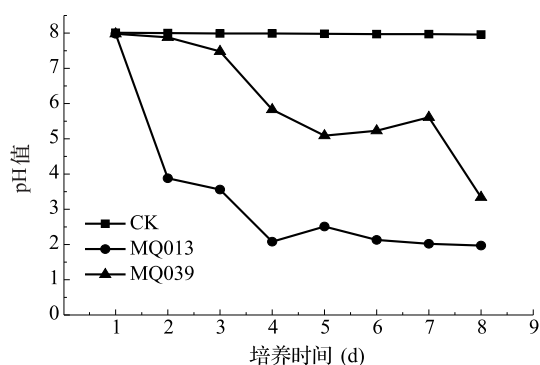


图3 MQ013、MQ039 发酵液中 pH 值变化

2.2 溶磷菌株解钾测定

2.2.1 溶磷菌株解钾能力初步鉴定

从图4可看出, MQ039、MQ013 菌株对钾长石粉末均存在趋向性生长, 但两菌株的菌丝趋向性生长速度存在差异, MQ039 菌丝对钾长石粉末趋向性生长速度快于 MQ013。

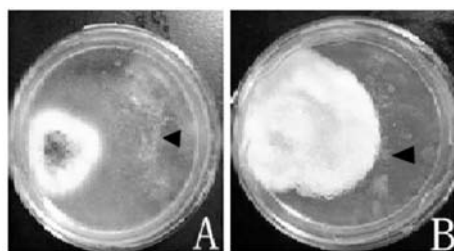


图4 菌株对钾长石趋向性

注: ▲: 指示钾长石; A: MQ013 菌株; B: MQ039 菌株。

2.2.2 菌株在含钾矿物培养基上生长量的测定

MQ013、MQ039 菌株在含钾矿物液体培养基上生物量变化情况见图5、6。从图中可以看出, 在培养初期 MQ013、MQ039 菌株在含钾培养基瓶中菌丝的生长与对照非常接近, 随着培养时间的延

长, 在含钾长石的培养瓶中菌丝生物量迅速上升, 培养12 d后, 生物量的增加趋缓。对照组菌丝生长趋势虽然与实验组相似, 但总生物量低于实验组, 显示 MQ013 和 MQ039 菌株的生长能吸收利用钾元素。

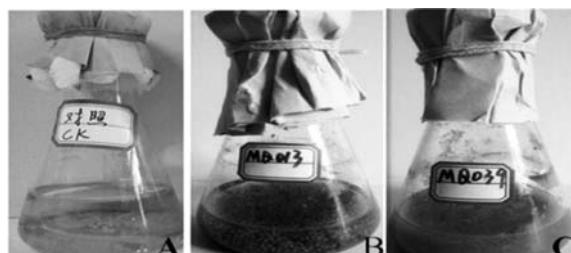


图5 MQ013、MQ039 菌株在含钾矿物培养基菌丝生长情况

注: A: 未加钾长石矿物; B: MQ013 菌株加钾长石培养; C: MQ039 菌株加钾长石培养。

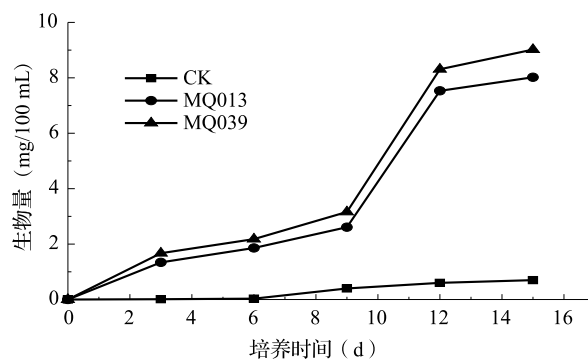


图6 在含钾矿物培养基上 MQ013、MQ039 菌株生物量变化曲线

2.2.3 菌株菌丝对钾长石矿物表面侵蚀作用观察

液体培养30 d后, 通过体视显微镜观察可见, 对照组菌丝球表面内壁均呈乳白色, MQ013、MQ039 菌丝对钾长石具有较好的亲和性, 菌丝球中包裹许多深褐色的矿粉颗粒。而两菌株菌丝能有效吸附钾长石矿粉颗粒, 形成真菌-矿物聚集体, 并不溶性的含钾矿物中获得生长所需的钾素, 但两菌株对钾长石吸附和包裹作用存在差异, MQ039 菌株对钾长石矿粉颗粒吸附能力比 MQ013 菌株强(图7、8)。扫描电镜观察显示, 对照组中钾长石矿样的棱角清晰, 表面圆滑, 晶体结构完整(图8、9), MQ013、MQ039 菌株菌丝能有效吸附和缠绕钾长石矿粉颗粒, 形成矿物-真菌聚集体, 但两菌株对钾长石吸附和包裹作用存在差异, MQ039 菌株对钾长石矿粉颗粒吸附能力比 MQ013 菌株强。

矿物颗粒被 MQ013、MQ039 作用后，表层被深度侵蚀，且其晶体结构基本被破坏；在胞外多聚物的作

用下，大量晶形不完整或非晶态物质相互黏连在一起，然后聚积到原矿物表面。

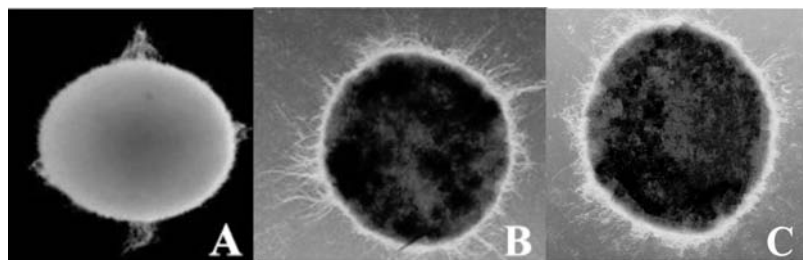


图7 菌丝与钾矿物形成的复合体

注：A：对照；B：MQ039 与钾矿物形成的复合体；C：MQ013 与钾矿物形成的复合体。

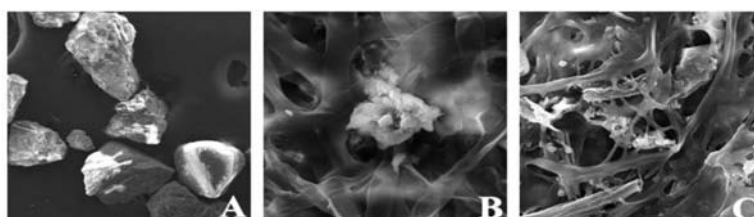


图8 MQ013、MQ039 菌株对钾长石作用电镜观察

注：A：对照；B：MQ013 真菌菌丝包裹矿物形成矿物菌丝体聚集体；C：MQ039 真菌菌丝包裹矿物形成矿物菌丝体聚集体。

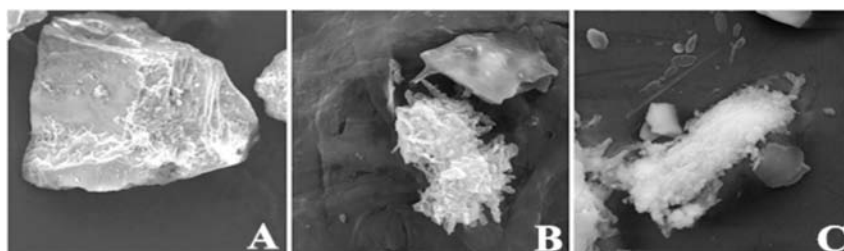


图9 MQ013、MQ039 菌株作用后钾长石矿物表面电镜观察 (培养 30 d)

注：A：对照；B：MQ013 菌株；C：MQ039 菌株。

2.2.4 菌株解钾能力测定

采用四苯硼酸钾重量法测定培养 30 d 后培养液中钾的含量，测定结果见表 1。从表中可以看出，在接种 MQ039、MQ013 菌株的培养瓶中，可溶性钾的含量明显高于对照，表明 MQ039、MQ013 菌株均

能将钾长石中难溶性钾溶出。MQ039、MQ013 菌株解钾作用产生的可溶性钾素除被菌体本身生长利用外，100 mL 培养液中可溶性钾的剩余量分别为 K_2O 15.36、13.27 mg，显示 MQ039、MQ013 菌株对钾长石中难溶性钾具有较好的浸出效果。

表1 MQ013、MQ039 菌株培养液中可溶性钾含量

菌株	沉淀质量 (g)					平均值	培养液中可溶性钾净增量 (K_2O mg/100 mL)
	1	2	3	4	5		
MQ039	0.348 2	0.353 4	0.348 9	0.354 8	0.355 7	0.356 8 a	15.36
MQ013	0.337 8	0.343 2	0.341 6	0.348 3	0.342 6	0.344 7 b	13.27
CK (接入灭活菌种)	0.309 2	0.327 3	0.330 4	0.332 7	0.338 6	0.331 3 c	—

注：同列数值不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

从 EDS 图谱中可以看出, 经 MQ039、MQ013 菌株作用后钾长石表面各离子特征峰的变化 (图 10), 基本能反映在 MQ039、MQ013 作用下矿物的

风化演变规律, 但两者对含钾矿物的转化程度存在差异, MQ039 菌株强于 MQ013 菌株。

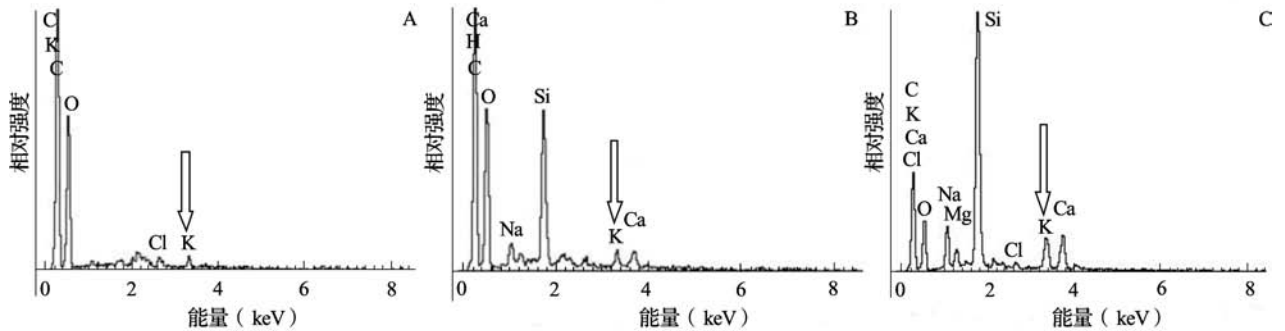


图 10 MQ013、MQ039 菌株作用后钾长石表面 EDS 图谱

注: ↓: 指示可溶性钾; A: 对照; B: MQ013; C: MQ039。

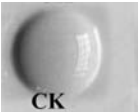
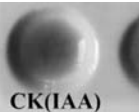
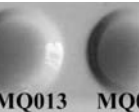

研究表明, 微生物促进矿物的风化机制主要是通过微生物新陈代谢产物和分泌的化学物质腐蚀岩石, 这些化学物质可能是无机酸, 也可能是各种有机酸及其他有机化合物^[22]。胡婕等^[23]、连宾等^[24]认为, 真菌除了可以分泌各种代谢物 (有机酸、铁载体等) 对矿物酸解和络解作用外, 还可以通过菌丝体的机械作用破坏矿物结构, 微生物对矿物表面的风化作用首先发生在其表面最脆弱的部位, 并逐渐向纵深推进。本实验发现, 两菌株对钾长石具有较好的亲和性, 其菌丝能有效吸附并与钾长石矿物形成真菌-矿物聚集体。化学测定和 EDS 图谱结果表明两菌株能将钾长石中难溶性钾溶出, 表现出较好的解钾活性; 同时发现, MQ013 和 MQ039 菌株的溶磷效果与其培养液的酸度成正相关, 预示其在培养过程中可能通过产生酸性物质, 促进难溶的磷酸盐分解。

2.3 溶磷、解钾内生菌株产 IAA 能力测定

采用 Salkowski 比色法^[12]对 MQ013、MQ039 两个菌株定性, 从显色结果可以看出, MQ013、MQ039 两个菌株均具有分泌 IAA 能力, MQ039 颜

色较深, 表明 MQ039 菌株 IAA 产生量高于 MQ013 菌株。定量测定结果显示, MQ013、MQ039 菌株 IAA 分泌量 (培养 15 d) 分别为 18.21、43.19 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 两者达到极显著差异 ($P < 0.01$), 与定性观察结果一致, 进一步确定 MQ039 菌株分泌 IAA 能力较 MQ013 强。

表 2 MQ013、MQ039 菌株分泌 IAA 定性定量测定

测定项目	CK (无菌水)	CK (IAA)	MQ013	MQ039
定性显色				
定量测定 (IAA $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.00	—	18.21 \pm 0.39	43.19 \pm 3.31

2.4 MQ013、MQ039 菌株鉴定

通过形态学和 5.8S、18S rDNA ITS 序列分析鉴定, MQ039 菌株为黑曲霉 (*Aspergillus niger*), MQ013 菌株为泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*), 见图 11、12。

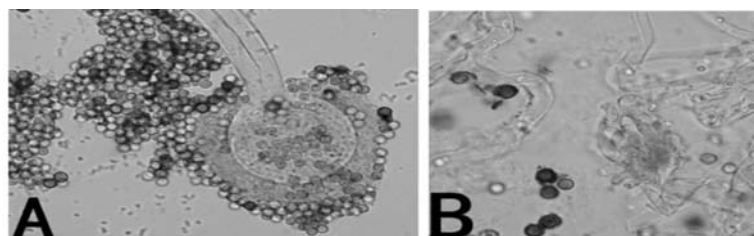


图 11 MQ013、MQ039 菌株显微观察

注: A: MQ013 菌株; B: MQ039 菌株。

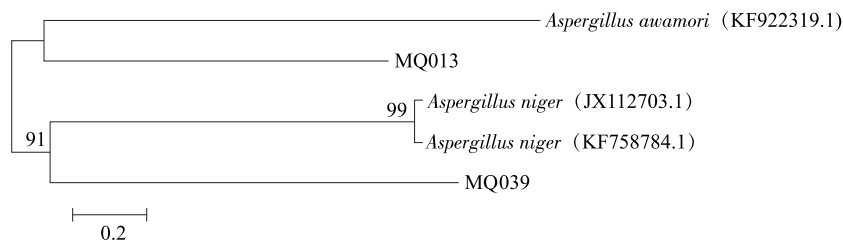


图 12 MQ013、MQ039 菌株 18S rDNA ITS 序列系统进化树

注：标尺表示每 100 个核苷中有 20 个核苷代替。

2.5 MQ013、MQ039 对玉米的促生作用

2.5.1 玉米根部菌株侵染观察

菌株对玉米根部侵染情况观察结果见图 13。由图可以看出，MQ013、MQ039 两菌株均能有效侵染玉米

根部组织并在玉米根部皮层薄壁细胞内定殖，统计结果显示，MQ013、MQ039 菌株对玉米根的侵染率分别达到 76% 和 69%。在重新分离被定殖的菌根后，得到两种菌株，经形态分析，与接种菌株相同（图 14）。

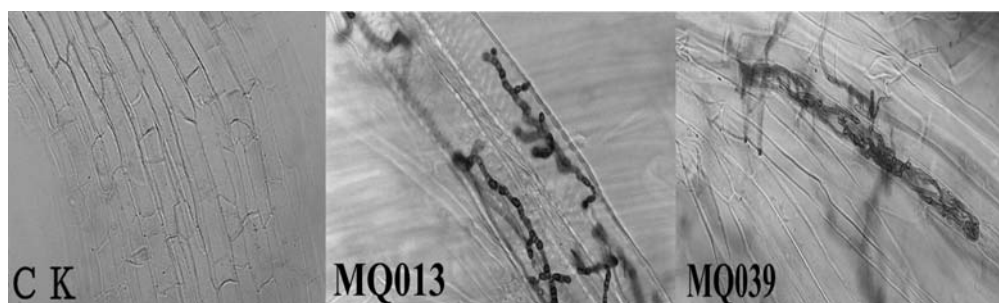


图 13 玉米根部组织菌株侵染观察

注：CK 为未受到真菌侵染的组织。

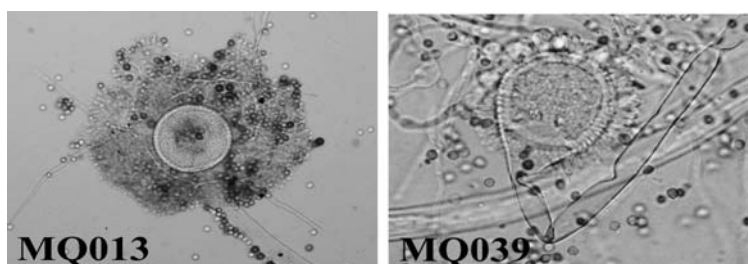


图 14 分离自盆栽试验的玉米根部组织的菌株显微观察

2.5.2 MQ039、MQ013 对玉米光合作用的影响

用 CI-340 光合仪测定接种 MQ039、MQ013 菌株的玉米幼苗光合速率、蒸腾速率、胞间 CO₂ 浓度、气孔导度等 4 项光合生理指标，结果见图 15。

由图 15 可以看出，接种 MQ039、MQ013 菌株的玉米叶片的气孔导度、蒸腾速率、细胞间 CO₂ 含量均显著高于对照组，差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。被 MQ039 侵染植株的气孔导度、蒸腾速率、细胞间 CO₂ 含量分别为 92.95 mmol/(m²·s)、4.99 g/(m²·h)、166.77 μmol/mol，被 MQ013 菌株侵染植株的气孔导度、蒸腾速率、细胞间 CO₂ 含量分别为 104.19 mmol/(m²·s)、4.27 g/(m²·h)、

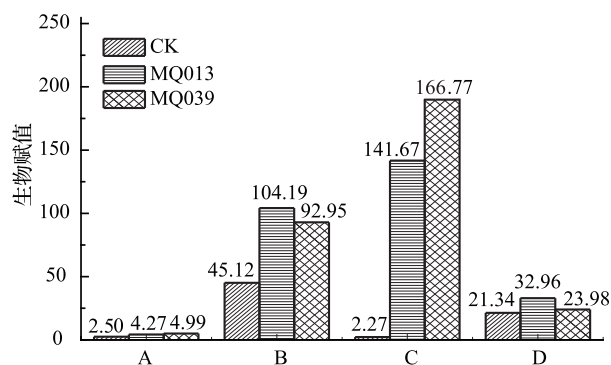


图 15 MQ013、MQ039 菌株对玉米幼苗光合作用的影响

注：A：蒸腾速率 g/(m²·h)；B：气孔导度 mmol/(m²·s)；C：细胞间 CO₂ 含量 μmol/mol；D：光合速率 CO₂ mg/(m²·s)。

141.67 $\mu\text{mol}/\text{mol}$ 。光合速率测定结果显示, 接种 MQ039、MQ013 菌株后植株的光合速率亦高于对照组, 说明 MQ039、MQ013 菌株侵染后能有效提高宿主的光合作用效率。比较 MQ039、MQ013 两菌株对玉米光合指标的影响, 被 MQ039 菌株侵染的植株在蒸腾速率、细胞间 CO_2 含量等指标比 MQ013 菌株侵染的植株高, 但其气孔导度、光合速率则稍低于 MQ013 菌株侵染的植株, 预示两菌株对宿主光合特性影响的方式有所不同^[25]。

2.5.3 MQ039、MQ013 菌株对玉米植株生长的影响

通过测定植物株高、植株干重、叶绿素含量和根冠比等指标研究 MQ013、MQ039 菌株的发酵菌液对玉米的促生效果, 结果显示, 与对照相比

MQ013、MQ039 菌株都能不同程度地提高玉米的株高、植株干重、根冠比以及叶绿素含量 (表 3)。

同时测定玉米茎叶的磷、钾含量, MQ013 菌株侵染植株, 其茎叶的磷、钾含量分别为 34.50、32.80 mg/g ; MQ039 菌株侵染植株, 其茎叶磷、钾含量分别为 29.78、36.45 mg/g , 处理组植株的磷和钾的含量均显著高于对照, 说明 MQ013、MQ039 菌株均能有效促进植物对磷、钾的吸收。有研究表明, 钾元素能够提高叶肉细胞渗透势, 增加植物叶片水势, 增加叶绿体内基粒, 促进光合电子传递及光合磷酸化, 提高光合速率和生物产量^[26]。本实验结果预示, 实验植株钾元素的增加可能与玉米幼苗生物量的增长存在一定相关性。

表 3 MQ013、MQ039 菌株对玉米的促生效果 ($n=5$)

菌株	植株干重 (mg)	株高 (cm)	根冠比 (g/g 干重)	叶绿素含量 (mg/g 鲜重)	茎叶 P 含量 (mg/g 干重)	茎叶 K 含量 (mg/g 干重)
CK (未接入菌种)	0.304 4 \pm 0.019 a	26.89 \pm 4.97 a	0.59 \pm 0.15 a	6.41 \pm 1.79 a	20.78 \pm 0.45 a	9.77 \pm 1.08 a
MQ013	0.414 4 \pm 0.024 b	34.77 \pm 2.42 c	0.81 \pm 0.22 b	11.68 \pm 2.37 b	34.50 \pm 0.43 c	32.80 \pm 1.77 b
MQ039	0.442 2 \pm 0.057 c	31.23 \pm 0.49 b	1.30 \pm 0.36 c	15.92 \pm 2.49 c	29.78 \pm 0.71 b	36.45 \pm 1.33 c

注: 同列数值不同小写字母表示处理间差异极显著 ($P < 0.01$)。

3 讨论

促生菌是指能够促进作物生长的细菌、放线菌和真菌的统称。根据其来源不同主要分为两类, 一类是从植物根际分离得到的菌株, 另一类是从植物组织中分离得到的菌株。据目前已有的文献报道, 绝大多数具有溶磷、解钾、分泌 IAA 活性的促生菌都来自植物根际^[27-28], 研究者从花生、小麦、苕麻^[29]等植物根际土壤中分离出高效溶磷的青霉 (棘孢青霉菌 Z3)、曲霉 (黑曲霉 B1-A 菌株) 以及一些溶磷、固氮、产 IAA 的细菌。近年来, 许多学者从葛根、小麦、珠芽蓼、乳白香青、生姜等^[30-32]植物组织分离得到具有溶磷、解钾或分泌 IAA 活性的内生菌株, 而这些菌株主要为植物内生细菌; 詹寿发等^[11]从山药分离得到高效解钾的棘孢曲霉 SYF-011 内生菌株, 目前未见有关具溶磷、解钾和分泌 IAA 能力的内生真菌的报道。

研究表明, 植物内生真菌对宿主植物的促生作用表现在许多方面, 如促进植物营养生长, 增强光合作用, 增加生物量, 提高宿主的抗逆性等^[33-34]。目前研究报道较多的根际或土壤的溶磷真菌为青霉

属和曲霉属, 溶磷能力大多在 200 ~ 400 mg/L 之间, 溶磷细菌则大多在 100 ~ 300 mg/L 之间。Vasilev 等^[35]也研究了黑曲霉溶解矿物磷酸盐的能力, 结果发现其溶解能力为 292 mg/L ; 李显刚等^[28]研究从葛根中分离的高效溶磷细菌溶磷能力, 发现其溶磷量在培养 7 d 后为 138.72 mg/L 。有溶磷能力的内生真菌菌株鲜见报道, 而本研究利用定量法测定 MQ013、MQ039 菌株溶磷量, 结果发现 MQ013 菌株培养 5 d 后发酵液中有效磷含量达到最大值, 为 270.39 mg/L , MQ039 菌株发酵液中有效磷含量在第 4 d 达最大值, 仅为 32.47 mg/L , 表明 MQ013 菌株具有高效的溶磷能力, MQ039 溶磷能力稍弱, 两菌株的溶磷能力差异大, 究其原因, 一方面可能是不同菌株对同一难溶性磷源的溶磷机制不同, 谌书等^[22]发现菌株的溶磷作用可能与其产生酸性物质有一定关系; 另一方面可能是不同植物根系或内生溶磷真菌的溶磷能力各异。龚明波等^[36]对草酸青霉 (*Penicillium aculeatum*) 和构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 溶磷菌株在玉米的应用研究中发现, 其能显著地提高土壤中的有效磷含量, 在第 49 d 时, 有效磷含量分别高于土壤初始含量的

28.05% 和 37.04% , 收获玉米干重比对照分别高 26.04% 和 20.21% , 而本研究的 MQ013 菌株和 MQ039 菌株定殖后的玉米苗干重比对照分别高 36.14% 和 45.27% , MQ013 菌株侵染的玉米植株茎叶的磷含量比对照高 66.03% , MQ039 菌株侵染的植株茎叶磷含量比对照高 43.31% , 这说明具有溶磷能力的曲霉属内生真菌对植物的生长有一定的促进作用。

在菌株的解钾能力研究中发现, 培养 30 d 后用四苯硼钾重量法测定培养液中钾的含量, 除被菌体本身生长利用外, MQ039 菌株的可溶性钾素是 15.36 mg/100 mL, MQ013 菌株是 13.27 mg/100 mL, 并通过生长量测定和 EDS 图谱结果都显示 MQ039、MQ013 菌株对可溶性钾具有较好的浸溶作用。此外 Lian 等^[37] 研究了烟曲霉 (*A. spergillus*) 的解钾作用机制; 胡婕等^[23] 对黑曲霉含钾矿物的解钾作用与机理的研究, 都提出了真菌对矿物的风化作用机理包括菌丝体对矿物的吸附、包裹、吸收, 菌体与矿物形成有机—矿物聚集体, 菌丝体对矿物的蚀刻作用及其代谢产物对矿物的化学降解作用的说法。本研究中泡盛曲霉和黑曲霉的实验结果为以上学者的研究提供了有力的支持。

Michele 等^[9] 不仅从侧柏叶分离一株内生真菌菌株 (鉴定为 *Pestalotiopsis* sp.) 产生 IAA, 而且研究发现, 当这内生真菌菌株与细菌形成内生真菌/细菌复合体时 IAA 产量显著增强, 并分析了内生真菌和细菌强烈影响 IAA 产生的共生机制, 为进一步探索内生真菌与植物的关系提供了新框架。本实验通过内生真菌回接方法, 观察到内生真菌可能通过分泌 IAA、改善宿主的光合特性 (如提高植株气孔导度、蒸腾速率、细胞间 CO₂ 含量、叶绿素含量)、促进植株对 P、K 的吸收等对宿主表现出明显促生效应, 为具有功能活性内生真菌资源的开发利用提供有益的参考。

4 结论

从 42 株芒萁内生真菌中筛选得到两株具有溶磷、解钾、分泌 IAA 活性的菌株 MQ013 和 MQ039, 经鉴定 MQ013 菌株为泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*), MQ039 菌株为黑曲霉 (*Aspergillus niger*)。两菌株均能在玉米根部有效定殖, 并对玉米幼苗的生长发挥明显的促进作用。其中, MQ013 菌株的溶磷活性大于 MQ039 菌株, MQ039 菌株的解钾能力和分泌

IAA 能力均高于 MQ013 菌株。通过菌株回接盆栽试验和化学测定发现, MQ039 菌株对玉米幼苗的总体促生效应大于 MQ013 菌株。实验结果在研制高效微生物肥料和矿区生态恢复等方面具有一定意义。

参考文献:

- [1] 蒋梅茵, 杨德涌, 熊毅. 中国土壤胶体研究——VI II. 五种主要土壤的粘粒矿物组成 [J]. 土壤学报, 1982, 19 (1): 61-70.
- [2] 徐晓燕, 马毅杰. 土壤矿物钾的释放及其在植物营养中的意义 [J]. 土壤通报, 2001, 32 (4): 172-178.
- [3] 潘大伟, 梁成华, 杜立宇. 土壤含钾矿物的释钾研究进展 [J]. 土壤通报, 2005, 36 (2): 253-258.
- [4] 吴翔, 甘炳成, 黄忠乾, 等. 一株产 IAA 菌株的筛选、鉴定及培养条件优化 [J]. 四川农业大学学报, 2015, (4): 432-435.
- [5] Reineke G, Heinze B, Schirawski J, et al. Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation [J]. *Mol Plant Pathol*, 2008, (9): 339-355.
- [6] 葛菁萍, 蔡柏岩, 宋刚, 等. 土壤中功能真菌的分离及其解磷能力的初步研究 [J]. 中国土壤与肥料, 2009, (6): 84-86.
- [7] 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.
- [8] 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]. 土壤通报, 2012, 49 (5): 988-995.
- [9] Michele T, Malkanthi K, Kithsiri W, et al. Endohyphal bacterium enhances production of indole-3-acetic acid by a foliar fungal endophyte [J]. *Plos One*, 2013, 8 (9): 1-7.
- [10] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [11] 詹寿发, 樊有赋, 甘金莲, 等. 1 株山药内生真菌的鉴定及解钾活性 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41 (10): 320-323.
- [12] Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61 (2): 793-796.
- [13] Keith S, Gareth M J, Walter G, et al. The genera of hyphomycetes [M]. CBS ~ KNAW Fungal Biodiversity Centre, P. O, 2011.
- [14] Barnett H L, Hunter B B. Illustrated genera of imperfect fungi (4 Edition) [M]. St. Paul: APS Press, 1998.
- [15] Guo L D, Hyde K D, Liew E C Y. Detection and identification of endophytic fungi with in frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequence [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2001, 20: 1-13.

- [16] 曾东方, 罗信昌, 傅伟杰. 松口蘑菇丝体的分离和 RAPD-PCR 分析 [J]. 微生物学报, 2001, (3): 278-286.
- [17] 徐文思, 姜琰, 李引, 等. 一株植物促生菌的筛选、鉴定及其对花生的促生效应研究 [J]. 土壤通报, 2014, 46 (1): 119-125.
- [18] 蔡磊, 李文鹏, 张克勤. 高效解磷菌株的分离、筛选及其对小麦苗期生长的促进作用研究 [J]. 土壤通报, 2003, 33 (1): 44-46.
- [19] 詹寿发, 彭琴, 陈晔, 等. 庐山石韦内生真菌多样性及地下部分显微结构观察 [J]. 南方农业学报, 2012, 43 (9): 1320-1324.
- [20] 李德孝, 郭月霞, 员海燕, 等. 玉米叶绿素含量测定方法研究 [J]. 中国农学通报, 2005, 16 (2): 97-100.
- [21] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000. 302-316.
- [22] 谌书, 刘丛强, 连宾. 一株黑曲霉对磷矿物的风化作用 [J]. 矿物学报, 2009, 29 (1): 103-108.
- [23] 胡婕, 郁建平, 连宾. 黑曲霉对含钾矿物的解钾作用与机理分析 [J]. 矿物岩石地球化学通报, 2011, 30 (3): 277-285.
- [24] 连宾, 陈骏, 傅平秋, 等. 微生物影响硅酸盐矿物风化作用的模拟实验 [J]. 高校地质学报, 2005, 11 (2): 181-186.
- [25] 苗丽, 巩彪, 聂文婧, 等. 外源 IAA 对 NaHCO₃ 胁迫下黄瓜幼苗光合特性和抗氧化系统的影响 [J]. 植物生理学报, 2014, 50 (6): 765-771.
- [26] 郑炳松, 程晓建, 蒋德安, 等. 钾元素对植物光合速率、Rubisco 和 RZA 的影响 [J]. 浙江林学院学报, 2002, 19 (1): 104-108.
- [27] 邓振山, 党军龙, 张海州, 等. 植物根际促生菌的筛选及其对玉米的促生效应 [J]. 微生物学通报, 2012, 39 (7): 980-988.
- [28] 李显刚, 姚拓, 王小利, 等. 一株分离自葛藤根际高效溶磷细菌特性研究及菌株鉴定 [J]. 中国土壤与肥料, 2012, (2): 87-91.
- [29] 谭石勇, 易永健, 汪洪鹰. 苕麻促生菌的筛选、鉴定及其促生效应 [J]. 微生物学报, 2015, 42 (3): 525-533.
- [30] 李振东, 陈秀蓉, 杨成德, 等. 乳白香青内生解磷菌的筛选鉴定及解磷特性研究 [J]. 草业学报, 2013, 22 (6): 150-158.
- [31] 李振东, 陈秀蓉, 李鹏, 等. 珠芽蓼内生菌 Z5 产 IAA 和抑菌能力测定及其鉴定 [J]. 草业学报, 2010, 19 (2): 61-68.
- [32] 王西祥, 徐坤, 张冬梅, 等. 5 株生姜促生菌的初步鉴定及产 IAA 和抑菌能力测定 [J]. 山东农业科学, 2015, 47 (1): 36-40.
- [33] Mehta P, Walia A, Kulshrestha S, et al. Efficiency of plant growth-promoting P-solubilizing *Bacillus circulans* CB7 for enhancement of tomato growth under net house conditions [J]. Journal of Basic Microbiology, 2015, 55 (1): 33-44.
- [34] Lugo M A, Reinhart K O, Menoyo E, et al. Plant functional traits and phylogenetic relatedness explain variation in associations with root fungal endophytes in an extreme arid environment [J]. Mycorrhiza, 2015, 25 (2): 85-95.
- [35] Vassilev N, Baca M T, Vassileva M, et al. Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste medium [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 44 (3-4): 546-549.
- [36] 龚明波, 范丙全, 金振国, 等. 适应玉米生产的溶磷真菌筛选及其应用 [J]. 微生物学报, 2010, 50 (12): 1619-1625.
- [37] Lian B, Wang B, Pan M, et al. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus* [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2008, 72: 87-98.

Isolation of two phosphate/potassium-solubilizing and IAA-producing strains of endophytic fungi and their plant growth promoting function

ZHAN Shou-fa, LU Dan-ni, MAO Hua-ying, XIONG Rong-lu, HUANG Dan, CHEN Ye* (School of Pharmacy and Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang Jiangxi 332000)

Abstract: Phosphate/potassium (K/P)-solubilizing and IAA-secreting strains of endophytic fungi were isolated from *dicranopteris dichotoma* as part of preponderant ferns growing in potassium deposit. And their growth promoting function on crops was researched. K/P-solubilizing endophytic fungi were isolated and identified using morphological and cultural characteristics and 5.8S, 18S rDNA ITS sequence analysis. The K/P-solubilizing capacity of strains were measured by Petri dishes and broth medium experiments. The growth promoting effect of strains on corn seedling was studied using tieback technology and soil pot experiment. Result showed that 42 strains of endophytic fungi were screened from *dicranopteris dichotoma*. There were two stains (MQ013, MQ039) among them with the ability of dissolving P/K and secreting IAA. Strain MQ013 was identified as *Aspergillus awamori*, and MQ039 as *Aspergillus niger*. The experiment of plant growth promoting function showed that strains MQ013, MQ039 effectively improved the content of chlorophyll, potassium and phosphate in body of corn plant. It was concluded that MQ013 and MQ039 have a certain capacity of solubilizing P/K and secreting IAA, and have a significant growth promoting effect on corn seedling.

Key words: phosphate solubilizing; potassium-dissolving; IAA; endophytic fungi; plant growth promoting function