糜子溶磷内生真菌的筛选及其鉴定

杨 刚[1]，余仲东[2]，赵世伟[1,3]，郭威震[1]，李 喆[1]

（1.西北农林科技大学 资源环境学院，陕西 杨凌 712100；2.西北农林科技大学 林学院，陕西 杨凌 712100；3.西北农林科技大学 水土保持研究所，陕西 杨凌 712100）

摘 要：[目的] 从产自宁夏回族自治区、甘肃省的不同糜子品种中分离、筛选出具有高效溶磷能力的内生真菌菌株并在糜子中接种，旨在评价其溶磷促生效果。[方法] 采用溶磷圈和钼锑抗比色法测定糜子溶磷能力，同时通过盆栽试验测定其对糜子苗期生长、光合及磷素吸收累积的作用。[结果] 从糜子种子内分离的内生菌株中有 5 株具有溶磷能力。其中，2 株为来自甘肃省的 LM_1（*Talaromyces* sp. 黄丝曲霉属），LM_2（*Talaromyces* sp.），3 株为来自宁夏回族自治区 GM_1（*Talaromyces* sp.），GM_2（*Penicillium* sp. 青霉属），GM_3（*Penicillium chrysogenum* 产黄青霉）。GM_1，GM_3 号菌株溶磷圈直径（D）与菌落直径（d）的比值（D/d）较大，分别达到了 1.59，1.47；相同成分液体培养基中可溶性磷含量分别为 264.75 和 323.48 μg/ml，溶磷率分别达到 5.26%和 6.43%，显著（$p<0.05$）高于其他菌株；其 pH 值分别为 2.88 和 3.63，显著（$p<0.05$）低于其他菌株。5 个溶磷真菌的溶磷率与 pH 值呈极显著（$p<0.01$）负相关。盆栽试验中，当磷用量减少 75%和 50%并接种溶磷菌 GM3 时，糜子 SPAD 值（叶绿素相对含量的一个参数）分别为 20.63 和 21.46，净光合速率分别达为 23.2 和 25.87 μmol/(m^2 · s)。植株全磷含量分别为 10.08 和 12.39 mg/盆，均显著高于对照（CK）（$p<0.05$），表明接种 GM_3 对糜子促生作用表现明显。[结论] GM_3 为本试验得到的目标菌株，并且表现出良好的溶磷促生作用。

关键词：糜子；溶磷内生真菌；溶磷—促生效应

文献标识码：B **文章编号**：1000-288X(2020)04-0124-09 **中图分类号**：Q939.96

文献参数：杨刚，余仲东，赵世伟，等.糜子溶磷内生真菌的筛选及其鉴定[J].水土保持通报，2020，40(4)：124-132. DOI：10.13961/j.cnki.stbctb.20200514.001；Yang Gang，Yu Zhongdong，Zhao Shiwei，et al. Screening and identification of phosphorus-soluble fungi in *Panicum miliaceum* [J]. Bulletin of Soil and Water Conservation，2020，40(4)：124-132.

Screening and Identification of Phosphorus-soluble Fungi in *Panicum Miliaceum*

Yang Gang[1]，Yu Zhongdong[2]，Zhao Shiwei[1,3]，Guo Weizhen[1]，Li Zhe[1]

（1. *College of Nature Resources and Environment*，*Northwest A&F University*，*Yangling*，*Shaanxi* 712100，*China*；2. *Forestry College*，*Northwest A&F University*，*Yangling*，*Shaanxi* 712100，*China*；3. *Institute of Soil and Water Conservation*，*Northwest A&F University*，*Yangling*，*Shaanxi* 712100，*China*）

Abstract：[Objective] The endophytic strains with the ability of phosphorus-soluble were isolated and screened from the seeds of different *Panicum miliaceum* varieties from Ningxia Hui Autonomous Region and Gansu Province，and inoculated in *Panicum miliaceum* to evaluate the effects of phosphorus dissolution and growth promotion. [Methods] The phosphorous dissolving capacity was determined by phosphorous ring and molybdenum-antimony colorimetric method，at the same time，pot experiments were conducted to determine its effects on seedling growth，photosynthesis and phosphorus absorption. [Results] Among the endophytic fungal strains isolated from *Panicum miliaceum* seeds，five strains had the ability to dissolve phosphorus，two strains were from Gansu Province〔LM_1（*Talaromyces* sp.），LM_2（*Talaromyces* sp.）〕and 3 strains were from Ningxia〔GM_1（*Talaromyces* sp.），GM_2（*Penicillium* sp.），GM_3（*Penicillium chrysogenum*）〕. The ratio

收稿日期：2020-04-07 **修回日期**：2020-05-02

资助项目：“十二五”国家科技支撑计划子课题“特色小杂粮抗逆增产增收技术研究与示范”（2015BAD22B04-04）

第一作者：杨刚（1993—），男（汉族），山西省阳泉市人，硕士研究生，研究方向为土壤生态、作物栽培。Email：841286186@qq.com。

通讯作者：赵世伟（1962—），男（汉族），四川省荣县人，博士，研究员，主要从事旱作农田水土资源高效利用及土壤结构碳机理研究。Email：swzhao@ms.iswc.ac.cn。

of the diameter of solubilizing phosphorus circle (D) to the diameter of colony (d) of strain GM_1 and GM_3 was the largest, reaching 1.59 and 1.47; The content of soluble phosphorus in the liquid medium of the same composition was 264.75 μg/ml and 323.48 μg/ml, respectively, and the phosphorus dissolution rate reatched 5.26% and 6.43%, respectively, which was significantly higher than other strains ($p<0.05$); the pH value was 2.88 and 3.63, respectively, which was significantly lower than other strains ($p<0.05$); The phosphorus dissolution rate of the 5 fungis was negatively correlated with the pH value ($p<0.01$). In the pot experiment, when the phosphorus consumption was reduced by 75% and 50%, and inoculated with phosphorus-soluble fungi GM_3, the SPAD value (a parameter of chlorophyll relative content) of *Panicum miliaceum* was 20.63 and 21.46, respectively, net photosynthetic rate reached 23.2 and 25.87 μmol/(m^2 · s), the total phosphorus content of the plant was 10.09 and 12.39 mg/pot, respectively, which were significantly higher than the control (CK) ($p<0.05$). [Conclusion] Inoculation of GM_3 had obvious pro-growth effect on *Panicum miliaceum*. GM_3 was the target strain obtained in this experiment, and it showed a good effect of promoting the growth and dissolved phosphorus.

Keywords: ***Panicum miliaceum***; **phosphorus dissolving endophytic fungus**; **phosphorussoluble-promoting growth effect**

磷作为植物所需的 3 大营养元素之一,对作物的生长起着重要的作用[1]。植物生长发育所需的磷素来源途径通常有两种,一种为土壤磷库中的磷,另一种则是外施磷肥。植物吸收的磷仅有两种可溶性离子形式,即 $H_2PO_4^-$ 和 HPO_4^{2-},而土壤中 95%以上的磷以难溶的矿物态和固定态形式存在。大部分可溶性磷肥也易被土壤中的金属离子结合形成难溶性磷酸盐而无法被植物直接吸收利用[2],这些专性吸附及化学沉淀导致了大部分磷肥以无效态形式在土壤中累积,导致了作物对磷肥的当季利用率很低,仅为 5%～25%[3]。有资料显示,宁南、陇中地区的主要土壤类型为黄绵土和灰钙土,全磷含量在 20 mg/kg 左右,有效磷含量却只有 5～8 mg/kg,表明宁南、陇中土壤中地区土壤中有大量的无机磷难以被植物有效利用[4]。如何将土壤中这些固定的磷释放出来,提高其有效性,对减少磷肥用量,提高磷肥利用率有重要的意义。已有研究[5]表明,一些溶磷微生物可以将土壤中的矿物态磷释放出来,它们种类繁多,包括真菌、细菌、放线菌等,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[6-8]。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[9]。有研究[10]表明,内生菌能与植物形成互惠互利的共生关系,如产生多种植物激素、促进植物生长、增进宿主植物对氮、磷、钾等营养元素的吸收、提高植物代谢、抗逆以及抵抗病虫害的能力[11-12]。因此,溶磷、促生内生菌的筛选和应用已经成为了现代农业“减肥”、“减药”潜在的重要技术途径。

糜子(*Panicum miliaceum*)最早发源于中国,相较于其他农作物具有更悠久的历史。经过长期的自然选择和栽培驯化,糜子越来越能够适应干旱、半干旱地区的贫瘠和干涸,这使得它具有了抗旱、耐贫瘠的优点,并且由于它对氮、磷等营养元素的吸收性好而且生育期很短,使它成为了如今干旱、半干旱地区的主要农作物之一,在解决粮食问题的同时,糜子更为干旱、半干旱带来较为可观的经济效益,这使它成为了国家和人民重点种植推广的作物,并成为了我国抗灾备荒、增产增收必不可却的农作物[13-15]。近年来,由于干旱、半干旱地区磷肥及一些高浓度复合肥的大量使用,不仅使得土壤中磷素过剩,利用率低,还导致了一系列的环境污染问题。小麦、玉米、水稻等大众农作物根际土壤和植株体内的溶磷菌已被广泛筛选和开发利用,溶磷机理也逐步得到阐明[16],极大地促进了这些农产品的“绿色生产”,而对于糜子内生菌的开发利用目前尚无研究报道。本试验从产自宁夏回族自治区和甘肃省的糜子种子中分离、筛选出具有高效溶磷能力的菌株,通过盆栽试验研究了这些溶磷真菌对糜子苗期生长发育的影响及其解磷效果,以期为糜子的“绿色生产”和高效栽培提供技术依据。

1　材料与方法

1.1　材 料

选用产自宁夏回族自治区(固糜 21 号、宁糜 11 号、宁糜 14 号)和甘肃省(陇糜 9 号、陇糜 13 号、陇糜 14 号)两地不同品种健康饱满的糜子种子,于 2018 年 10 月采集后装于自封袋中,在实验室中 4 ℃保存,用于进行快速的分离培养。供试培养基包括:PDA 培养基(马铃薯 200 g,葡糖糖 20 g,琼脂 15 g,自来水 1 000 ml 自然 pH 值);NBRIP 培养基:葡萄糖 10 g,$Ca_3(PO_4)_2$ 5 g,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g,$MgCl_2$ ·

$6H_2O$ 5 g，KCl 0.2 g，$(NH_4)_2SO_4$ 0.1 g，蒸馏水 1 000 ml，琼脂 16 g，pH 值 6.5～7.5，液体培养基不加琼脂。营养琼脂培养基：蛋白胨 10 g，牛肉膏 3 g，氯化钠 5 g，琼脂 17 g，蒸馏水 1 000 ml，pH 值为 7.2。

1.2 方 法

1.2.1 溶磷真菌的分离 将采自宁夏（固糜 21 号、宁糜 11 号、宁糜 14 号），甘肃（陇糜 9 号、陇糜 13 号、陇糜 14 号）不同品种健康饱满的糜子种子在自来水下洗净后转移至超净台。消毒方法参考 López-López 等[17]的消毒方式并稍加改进。第一轮消毒，1 g种子首先用 40 ml 自来水冲洗 3 次，然后用 40 ml 蒸馏水冲洗 3 次。清洗后的种子用 40 ml 3.5%次氯酸钠溶液浸泡 5 min，然后用 50 ml 无菌蒸馏水洗涤 3 次。第 2 轮消毒，将种子浸泡在 40 ml 96%乙醇中 5 min，然后用 50 ml 无菌蒸馏水进行 5 次彻底清洗。检查表面消毒，将 100 μl 最终冲洗水在营养琼脂平板培养，在 28 ℃下培养 4 d，若无任何细菌真菌生长，则表明消毒完成。将表面消毒灭菌后的糜子种子分别接入 PDA 培养基（规格：90 mm 一次性培养皿），每个 PDA 培养皿中均匀放置 3 粒种子，5 次重复。在恒温培养箱中培养 7～12 d，温度设置为25 ℃，通过观察菌落形态的差异并进行纯化，直至得到单一的纯菌落。菌落编号后用斜面 PDA 保存于 4 ℃冰箱中备用。

1.2.2 溶磷真菌的筛选 将上述分离纯化得到的菌株分别接种于 NBRIP 固体平板培养基上，26 ℃恒温培养箱培养 20 d，测定菌落直径（d）和溶磷圈直径（D），并计算 D/d，对得到的菌株进行初步筛选。将初步筛选得到的具有溶磷作用的菌株接种于 PDA 培养基，恒温培养箱 26 ℃扩繁培养 10 d；将扩繁后的菌株在超净工作台进行无菌操作，取 5 个直径 5 mm 的菌块接种至盛有 50 ml 灭菌 NBRIP 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 3 个重复，恒温振荡仪振荡培养 7 d（27 ℃，120 r/min），振荡完毕后用定性滤纸过滤，用 pH 计测定 pH 值并采用钼锑抗比色法测上清液有效磷含量，用 UV-1800 紫外可见分光光度计在 880 nm 处测定 OD 值，计算上清液有效磷含量的溶磷率，结合溶磷圈大小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的可溶性磷含量）/加入的无机磷源的总磷量〕×100%

1.2.3 盆栽试验 将筛选后的溶磷内生菌打碎孢子团，加无菌水制作菌悬液，菌悬液分生孢子浓度 1.0×10^6 个/ml，将灭菌后的固糜 21 号种子，在菌悬液中浸泡 24 h 后播种，试验采用石英砂＋蛭石（体积比 2∶1）的混合灭菌基质每盆 1.55 kg，将磷酸三钙以 6 g/kg 混合施入基质（模拟土壤中的无机磷成分），装入规格为内径 18.5 cm，外径 21 cm，高 11.5 cm，底径 14 cm 的塑料花盆内。试验对 5 种供试溶磷真菌菌液和不加菌液的无菌水（对照）分别设置 4 磷素梯度即施加无 P，1/5 P，1/2 P，全 P Hoagland 灭菌营养液（见表 1），共 24 个处理，每处理 3 重复，共 72 盆。将浸泡后的固糜 21 号种子进行播种，每盆浇灌稀释 1/2 后的全 P 灭菌 Hoagland 营养液 500 ml 后覆膜，出苗一周后去掉薄膜选择长势相近的植株间苗（每盆保留 10 株）并进行磷素控制，各磷素梯度每10 d 浇灌灭菌 Hoagland 营养液 500 ml，各菌悬液500 ml。试验将于 2019 年 5 月 10 日于中国科学院固原生态试验站旱棚内进行，于 2019 年 6 月 20 日收获。

表 1 不同磷素（P）梯度 Hoagland 营养液

营养条件	营养元素	无 P	1/5 P	1/2 P	正常施 P
大量元素（mg/L）	$Ca(NO_3)_2$	945	945	945	945
	KNO_3	607	607	607	607
	$NH_4H_2PO_4$	—	23	57.5	115
	$MgSO_4$	493	493	493	493
	$(NH_4)_2SO_4$	132.10	105.68	66.05	—
铁盐（g/L）（pH＝5.5）	$FeSO_4\cdot H_2O$	5.56	5.56	5.56	5.56
	Na_2EDTA	7.46	7.46	7.46	7.46
微量元素（mg/L）（pH＝6.0）	KI	0.83	0.83	0.83	0.83
	$MnSO_4$	22.3	22.3	22.3	22.3
	Na_2MoO_4	0.25	0.25	0.25	0.25
	$CuSO_4$	0.025	0.025	0.025	0.025
	$CoCl_2$	0.025	0.025	0.025	0.025
	H_3BO_3	6.2	6.2	6.2	6.2
	$ZnSO_4$	8.6	8.6	8.6	8.6

1.2.4　测试指标　于 2019 年 6 月 20 日用叶绿素测定仪 LYS-A 型测试糜子 SPAD 值,用 LI-6800 便携式光合仪测试糜子净光合速率。采集糜子植株测其株高、鲜重,105 ℃下杀青 30 min,75 ℃烘干至恒重后测定干重。将植株干样粉碎后用 H_2SO_4-H_2O_2 消煮,钼黄比色法测定植株全磷含量。

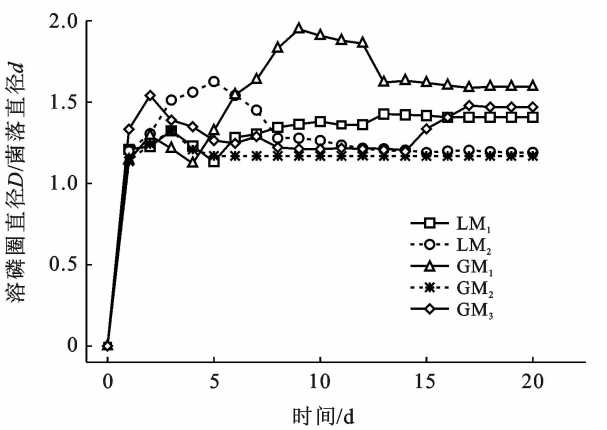
1.2.5　溶磷内生真菌的鉴定　利用通用引物 ITS1/ITS4(ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3',ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')对溶磷内生菌菌株核糖体基因转录间隔区进行扩增。PCR 体系为:Premix TaqTM 15 μl(Takara Biotechnology Co.,Ltd.,Dalian,China No. RR003A),DNA 2 μl,ITS1 引物 1 μl,ITS4 引物 1 μl,ddH_2O 11 μl。PCR 循环条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,54 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,40 次循环,72 ℃延伸 10 min。取 3 μl PCR 扩增产物,在混有 0.01% EB 核酸染剂的 1%琼脂糖凝胶上进行电泳,紫外凝胶成像仪下进行检测。PCR 扩增产物纯化后送上海生工生物技术有限公司测序。将测序所得结果通过 Chromas 软件进行校订,校订后的序列提交 GenBank 数据库,并在 NCBI 的 GenBank 数据库中用 Blast 程序与数据库中的序列进行比对,寻找匹配度最高的生物序列进行溶磷内生真菌的鉴定。初步确定溶磷内生菌的分类学地位。对溶磷效果明显的菌株,下载同源序列,用 Clastw 比对后,采用 MEGA 6.0 软件构建 NJ 系统树,拓扑树检验重复 1 000 次。

1.2.6　数据处理　运用 Excel 和 IBM SPSS Statistics 20.0 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;采用 Origin 2016 软件绘图,MEGA 6.0 软件构建系统树。

2　结果与分析

2.1　溶磷真菌的初步筛选

溶磷圈指的是在溶磷微生物的作用下,将无机磷固体培养基中的难溶性磷酸盐溶解,在菌落周围形成的透明地带,一般将溶磷圈直径(D)与菌落直径(d)的比值(D/d)视为初步筛选溶磷菌株能力大小的指标之一。D/d 值越大,其溶磷能力也就越强[18-19]。从宁夏、甘肃当地糜子种子内分离的内生真菌中,固糜 21 号分离得到 4 株,宁糜 11 号 5 株,宁糜 14 号 4 株,陇糜 9 号 3 株,陇糜 13 号 3 株,陇糜 14 号 6 株。在以磷酸三钙为唯一磷源的固体培养基中能产生溶磷圈的菌株有 5 株。其中 2 株来自甘肃省,编号为 LM_1 和 LM_2;3 株来自宁夏,编号为 GM_1,GM_2,GM_3。在连续观察 5 株菌株 20 d 内发现,5 株菌株生长至 16 d 时,D/d 值基本趋于稳定,整体表现为:$GM_1>GM_3>LM_1>LM_2>GM_2$,其中 GM_1,GM_3 号菌株 D/d 值达到了 1.59 和 1.47,初步判断这两株菌株溶磷能力强于其他菌株(见图 1)。



注:LM_1,LM_2 分别代表来自甘肃省糜子品种的 2 株菌株;GM_1,GM_2,GM_3 分别代表来自宁夏回族自治区糜子品种的 3 株菌株。下同。

图 1　溶磷真菌的初筛结果

2.2　溶磷真菌的复筛及溶磷能力的比较

将 5 株可溶性溶磷真菌在 NBRIP 液体培养基中培养,并测定其培养液中的可溶性磷含量及 pH 值(见表 2)。5 株溶磷内生真菌对 $Ca_3(PO_4)$ 的溶解能力很强,各菌株培养液中的可溶性磷含量及溶磷率均显著($p<0.05$)高于空白对照,各菌株可溶性磷含量在 164.88～323.48 μg/ml,溶磷率范围在 3.26%～6.43%。其中,GM_3 号菌株的溶磷效果最好,显著($p<0.05$)高于其他菌株,溶磷率为 6.43%,可溶性磷含量达到了 323.48 μg/ml。GM_1,GM_2,LM_1,LM_2 依次次之,溶磷率分别达到了 5.26%,4.36%,3.56%和 3.26%,可溶性磷含量分别为 264.75,219.65,180.03,164.88 μg/ml。这与初步筛选得到的结果基本一致,进一步确定 GM_3,GM_1 号菌株溶磷能力较强。

表 2　溶磷真菌对 $Ca_3(PO_4)_2$ 的溶解能力

处理	可溶性磷含量/(μg·ml^{-1})	溶磷率/%	培养液 pH 值
LM_1	180.03±15.33^{d}	3.56±0.31^{d}	4.10±0.05^{c}
LM_2	164.88±2.65^{d}	3.26±0.05^{d}	4.42±0.10^{b}
GM_1	264.75±0.36^{b}	5.26±0.51^{b}	2.88±0.10^{e}
GM_2	219.65±2.59^{c}	4.36±0.05^{c}	4.28±0.02^{bc}
GM_3	323.48±0.79^{a}	6.43±0.02^{a}	3.63±0.04^{d}
CK	4.20±0.39^{e}	0.04±0.00^{e}	7.71±0.04^{a}

注:同列数据后不同字母表示显著差异性($p<0.05$,$n=3$)。

从培养液中的 pH 值看,各处理均显著($p<0.05$)低于对照,其中 GM_1,GM_3 号菌株培养液的 pH

值最低，分别为2.88，3.63。LM_1，LM_2，GM_2 号菌株的培养液pH值在4.1～4.4。从溶磷率与pH值的变化趋势来看，随着溶磷率的提高，pH值大致呈下降的趋势。相关性分析表明，5株溶磷真菌溶磷率(X)与其pH值(Y)呈极显著负相关($r=-0.899^{**}$，$p<0.001$)，线性回归方程为：

$$Y=-0.678X+7.093$$

2.3 接种溶磷真菌对糜子苗期生理特征及植株全磷的影响

2.3.1 *接种溶磷真菌对糜子苗期生长的影响* 在不施P的情况下，GM_3 号处理下的糜子干重较对照增加178%(见表3)。在施1/5 P及常量施P时，不同菌株对糜子的苗期株高、鲜重、干重的影响不明显。在施1/2 P时，GM_3，GM_1 号菌株均能够显著($p<0.05$)增加糜子苗期株高和鲜重，株高较对照分别增加了24.9%和26.5%，鲜重较对照分别增加了44.52%，42.89%。

从5株溶磷真菌在4种不同磷素梯度下对糜子苗期株高、鲜重、干重的影响来看，GM_1，GM_3 号菌株较于其他菌株对糜子苗期的生长促进作用更大，而且在磷素梯度为1/2 P时对糜子株高、鲜重、干重的增加更加明显。

表3 不同磷素梯度下溶磷真菌对糜子苗期生长的影响

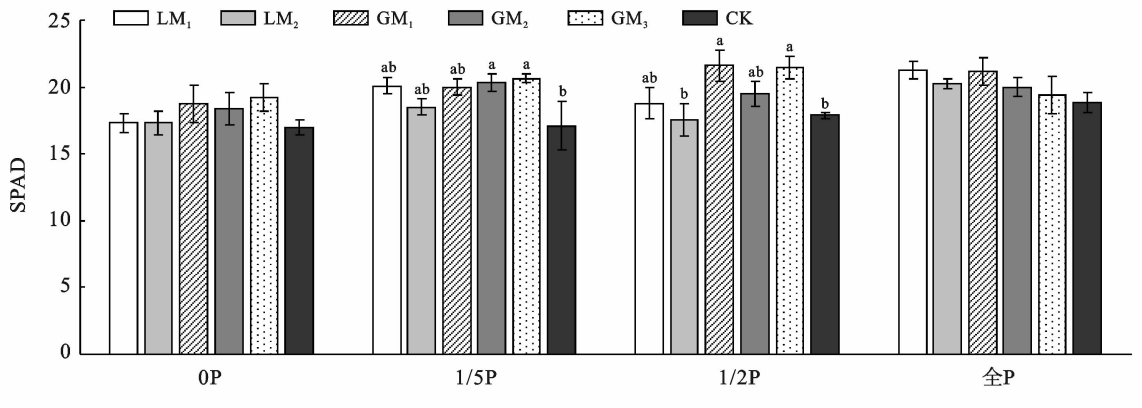
接种处理	株高/cm				鲜重/g				干重/g			
	0 P	1/5 P	1/2 P	全P	0 P	1/5 P	1/2 P	全P	0 P	1/5 P	1/2 P	全P
LM_1	24.53±1.3	26.15±1.1	30.57±0.8^{c}	30.71±1.5	27.41±1.8	30.5±7.4	38.94±2.4^{b}	39.57±0.8	2.03±0.5^{ab}	2.83±0.8	3.62±0.8	4.29±0.2
LM_2	24.35±0.6	25.49±3.9	31.94±2.1^{bc}	31.89±2.7	28.2±0.6	33.34±6.2	34.93±1^{b}	44.58±3.9	2.29±0.8^{ab}	2.93±0.7	3.43±0.1	4.4±0.2
GM_1	25.45±2.1	28.69±2.1	36.11±1.5^{a}	36.21±0.9	30.28±6.9	42.61±3	55.17±8.6^{a}	55.94±10.6	2.48±0.3^{ab}	3.06±0.9	4.46±1	5.51±0.6
GM_2	28.78±1.2	27.63±0.3	32.09±0.9^{abc}	36.34±2.7	30.61±2.7	35.82±1.5	46.58±0.5^{ab}	49.66±10.9	2.69±0.4^{ab}	3.8±0.4	4.1±1.4	4.58±0.4
GM_3	25.01±1.1	29.85±1.8	35.66±0.6^{ab}	35.84±2.6	29.51±1.4	43.46±8.3	55.8±1.4^{a}	60.68±8.1	3.65±1.1^{a}	4.19±0.3	5.33±0.2	5.38±0.3
CK	26.16±1	25.81±1.7	28.55±1^{c}	36.34±2.7	27.31±1.1	26.84±1.4	38.61±4^{b}	37.54±1	1.31±0.2^{b}	1.98±0.9	2.95±0.2	4.41±0.1
P	ns	ns	$p<0.05$	ns	ns	ns	$p<0.05$	ns	$p<0.05$	ns	ns	ns

注：同列数据后不同字母表示显著差异性($p<0.05$，$n=3$)，ns表示没有显著差异。

2.3.2 *溶磷真菌对糜子苗期叶绿素的影响* SPAD值是衡量植物叶绿素相对含量的一个参数。由图2可知，不施P时，各处理间糜子的SPAD值在16.97～19.21。常量施P时，各处理间糜子的SPAD值在18.88～21.29。在这两种磷素梯度下，各菌株处理下的SPAD值较对照虽有变化，但差异并不明显。施1/5 P时，GM_3，GM_2 号菌株处理下的糜子SPAD值显著($p<0.05$)高于对照，达到了20.63和20.3，较对照分别提高20.67%和18.71%。施1/2 P时，GM_3，GM_1 号菌株处理下的糜子SPAD值为21.46和21.6，与对照相比，增加22.28%，23.07%。整体来看，在不施P及常量施P的情况下，各菌株对糜子SPAD值的影响并不大。在施P为1/5，1/2时，GM_3 号菌株均能显著增加糜子SPAD值。

2.3.3 *溶磷真菌对糜子苗期净光合速率的影响* 如图3所示，不施P时，GM_1，GM_2，GM_3 号菌株处理下的糜子净光合速率较对照分别提高45.12%，48.92%和52.2%。施1/5 P时，GM_3 号菌株处理下的糜子净光合速率显著($p<0.05$)高于其他处理，达到了23.2 μmol/(m^2 · s)，较对照提高145.76%，同时，LM_1，GM_1，GM_2 处理下的糜子净光合速率均显著($p<0.05$)高于对照，分别提高48.47%，74.58%，69.49%。施1/2 P时，GM_3 号菌株处理下的糜子净光合速率为25.87 μmol/(m^2 · s)，显著($p<0.05$)高于其他处理，与对照相比提高104.18%，同时，LM_1，GM_1，GM_2 处理下的糜子净光合速率均显著($p<0.05$)高于对照，分别提高40.34%，60.22%，55.25%。常量施P时，GM_3 号菌株处理下的糜子净光合速率为25.47 μmol/(m^2 · s)，显著($p<0.05$)高于对照，较对照提高61.71%。整体看来，在不同磷素梯度下，各菌株处理下的糜子苗期净光合速率与对照相比有明显差异，GM_3 号菌株在4种磷素梯度下均能显著增加糜子净光合速率且增幅最大。

2.3.4 *溶磷真菌对糜子植株苗期全磷的影响* 由图4可以看出，不施P时，GM_3 号菌株能够显著($p<0.05$)增加糜子植株全磷含量，为8.87 mg，较对照增加290.74%。施1/5 P时，与对照相比，GM_3 号菌株处理下的糜子植株全磷显著($p<0.05$)增加了168.35%，含量达到了10.09 mg/盆。施1/2 P时，GM_3 号菌株处理下的糜子植株全磷含量为12.39 mg/盆，较对照显著提高121.25%。常量施P时，各处理下的糜子植株全磷与对照相比无显著差异。在缺磷或少磷情况下，GM_3 号菌株均能显著提高糜子植株全磷含量。



注:不同字母表示不同处理间差异达 0.05 显著水平,未标注则差异不显著。下同。

图 2　溶磷真菌对糜子苗期叶绿素的影响

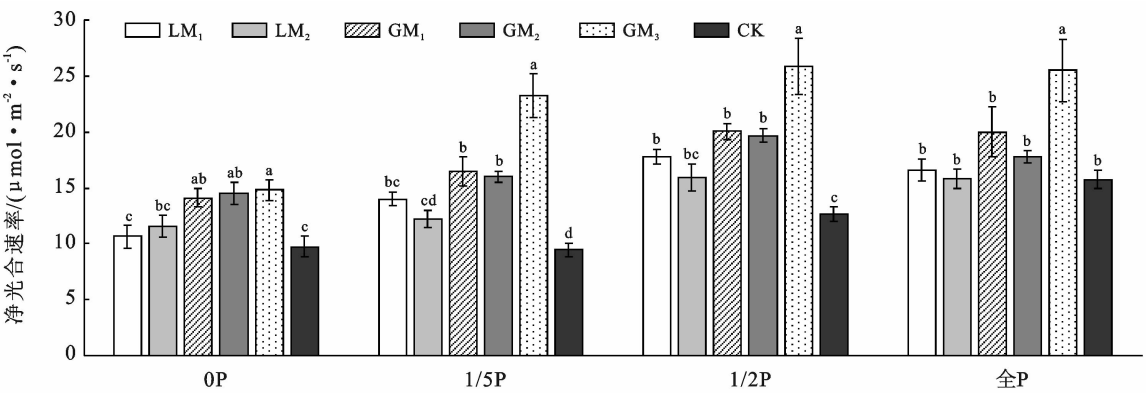


图 3　溶磷真菌对糜子苗期净光合速率的影响

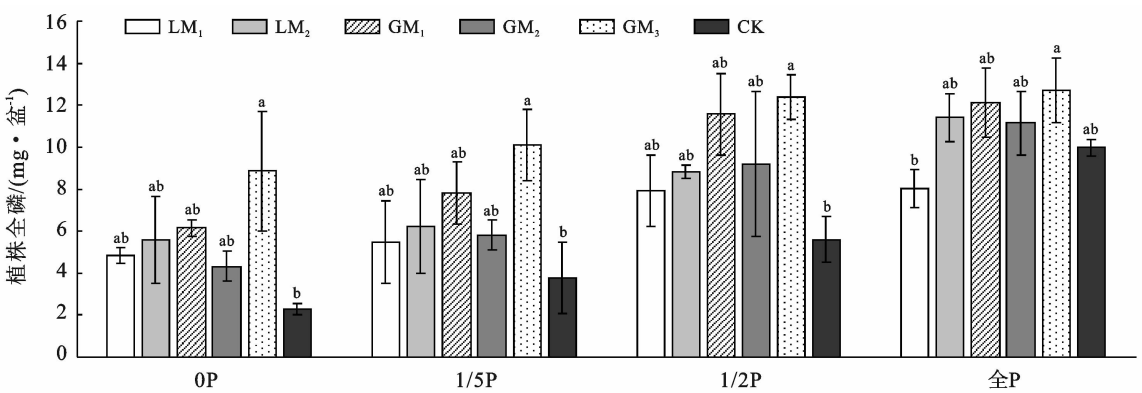


图 4　溶磷真菌对糜子植株苗期全磷的影响

2.4　溶磷真菌的初步鉴定

采用 CTAB 法分别提取 5 株溶磷真菌的 DNA,并利通用引物 ITS_1/ITS_4 对 5 株溶磷真菌菌株核糖体基因转录间隔区进行扩增。PCR 扩增产物纯化后送上海生工生物技术有限公司双向测序。

将测序所得结果通过 Chromas 软件进行校订后,将 5 株溶磷内生真菌的 18 SrDNA ITS 区序列分别与 GenBank 中的菌株序列进行相似性分析进行初步鉴定(结果见表 4)。

由表 4 可见,LM_1,LM_2,GM_1 为黄丝曲霉属(*Talaromyces* sp.),GM_2,GM_3 为青霉属(*Penicillium* sp.),初步确定了 5 株溶磷内生菌的分类学地位。从以上 5 种溶磷内生真菌在盆栽试验的综合表现来看,菌株 GM_3 号表现最为优异,为本试验得到的促生潜力菌株。

GM_3 的 ITS rDNA 经 PCR 扩增后,扩增产物长度为 500～520 bp。从 NCBI 数据中下载 GM_3 的同源序列,用 Clastw 比对后,采用 MEGA 6.0 软件使用临近(NJ)法对 GM_3 菌株及所下载相似度较高菌种的 ITS 序列构建系统发育树(见图 5),鉴定菌株

GM_3 为产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*),GenBank 序列登记号为 MT229079,系统发育树按一定比例绘制,分支长度用于推断系统发育树的进化距离。

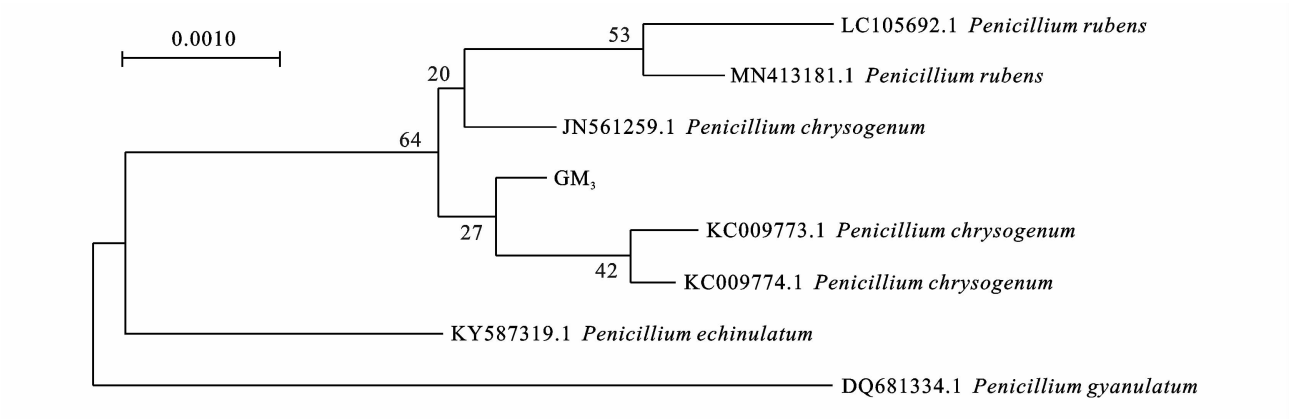


图 5 产黄青霉 GM_3 菌株的系统发育树

表 4 溶磷内生真菌初步鉴定结果

真菌菌株编号	菌 种
LM_1	黄丝曲霉属(*Talaromyces* sp.)
LM_2	黄丝曲霉属(*Talaromyces* sp.)
GM_1	黄丝曲霉属(*Talaromyces* sp.)
GM_2	青霉属(*Penicillium* sp.)
GM_3	青霉属(*Penicillium* sp.)

3 讨 论

通过溶磷圈直径、菌落直径及二者比值只能直观定的表示溶磷真菌的溶磷能力,只通过这种方式来判断溶磷能力大小并不准确和可靠[20-21],若想进一步确定溶磷能力的强弱还需要定量的测定培养液中的可溶性磷含量。如图 1 可以看出,GM_1,GM_3 号菌株 D/d 值达到了 1.59 和 1.47,而在表 2 中 GM_1,GM_3 号菌株可溶性磷含量分别为 264.75,323.48 μg/ml,两种方法得到的结果有差异,这可能是由于不同菌株对环境的适应性不同所致。

溶磷真菌类主要有青霉菌(*Penicillium*)、曲霉菌(*Asperillus*)、根霉(*Rhizopus*)、镰刀菌(*Fu-sarium*)、小菌核菌(*Selerotium*)等[22]。本研究从糜子种子内得到的 5 株溶磷真菌,其中:LM_1,LM_2,GM_1 为黄丝曲霉属(*Talaromyces* sp.),GM_2,GM_3 为青霉属(*Penicillium* sp.)。其中溶磷效果较好的 GM_3 号菌株经系统鉴定为产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)。溶磷微生物溶磷过程非常复杂,存在多种机理,主要机制包括质子的释放、有机酸的产生和酸性磷酸酶的生物合成作用[23-24]。微生物分泌有机酸机制是人们目前广泛接受的学术理论[25]。越来越多的研究表明,溶磷量与培养液中的 pH 值存在一定的负相关性[22,26]。在本试验中,从溶磷真菌复筛的结果中可以看出,各菌株培养液中的 pH 值均显著低于对照并且随着溶磷率的提高,pH 值大致呈下降的趋势。经相关性分析 5 株溶磷真菌的溶磷率与培养液中的 pH 值呈极显著负相关,这与徐冰等[27]、刘辉等[28]的研究结果基本一致。

在植物根系接种溶磷真菌不仅可以提高植物吸收磷素,转化难溶性磷为有效磷[9],还能够增强叶片的光合作用,提高植物的碳素营养,促进植物生长,增加植物的生物量或干重[29]。

在本次的盆栽试验中,供试的 5 个曲霉科菌株都对苗高、鲜重、叶绿素含量、光合速率、植株磷素累积有促进作用,其中 GM_3 效果较好。

在不施 P 的情况下,GM_3 号处理下的糜子干重较对照显著增加 178%。施 1/2 P 时,GM_3 号菌株能够显著($p<0.05$)增加糜子苗期株高和鲜重,株高较对照增加 24.9%,鲜重较对照增加 44.52%。叶绿素是植物进行光合作用的主要色素并且在光合作用的光吸收中起核心作用,而净光合速率指的是植物光合作用积累的有机物,很大程度上能反映出植物的营养状况和健康程度[30]。施 1/5 P 和 1/2 P 时,GM_3 号菌株处理下的糜子 SPAD 值分别达到了 20.63,21.46,净光合速率分别达到了 23.2 和 25.87 μmol/(m^2 · s)且显著($p<0.05$)高于对照。磷不但是植物体中许多重要化合物的成分,而且以多种方式参与植物的新陈代谢[1]。在缺 P,1/5 P 及 1/2 P 情况下,GM_3 号菌株较对照分别增加了 290.74%,168.35%,121.25%的植株全磷含量,这表明在缺磷或者少磷的情况下 GM_3 号菌株均能有效增加糜子的磷素累积。溶磷真菌将难溶的磷酸三钙中的磷释放出来,一部分供真菌

自身生长繁殖所需在菌体中积累起来,另一部分可被植物吸收利用[31]。在常量施 P 情况下,磷素对于苗期糜子的生长发育已经足够,溶磷菌株的作用可能很大程度被减弱甚至掩蔽。盆栽试验中虽然验证了溶磷真菌对糜子生理特征的影响,但其机理性仍需进一步的研究。

曲霉科真菌是 Class 1 型内生真菌,可通过种子进行垂直传播,对糜子适应干旱和半干旱环境具有重要的作用[32]。青霉和曲霉是沙漠植物常见的内生真菌,他们的菌丝含有明显的色素,又称为色素真菌[33-34],这些色素可以帮助植物吸收紫外线,提高植物耐高温和干旱的能力。本研究在分离的糜子中,20%的种子发现有这些真菌,他们在糜子适应性、产量和品质方面的作用尚需要进一步研究。

4　结 论

从宁夏、甘肃不同糜子品种内共分离得到 25 株内生真菌,其中的 5 个内生菌株属曲霉科真菌,它们具有一定的溶磷能力,经初步鉴定后发现 LM_1,LM_2,GM_1 为黄丝曲霉属(*Talaromyces* sp.),GM_2,GM_3 为青霉属(*Penicillium* sp.),其中 GM_3 经鉴定为产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)。GM1,GM3 号菌株为溶磷能力较强的菌株,可溶性磷含量分别为 264.75 和 323.48 μg/ml,溶磷率分别高达 5.26%和 6.43%。5 株溶磷真菌的溶磷率与 pH 呈极显著负相关($r=-0.899^{**}$,$p<0.001$),这表明溶磷菌的溶磷能力可能与其分泌的酸有关。在 1/5 P 和 1/2 P 处理下,GM_3 产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)处理下的糜子 SPAD 值分别为 20.63 和 21.46,较对照提高 20.67%,22.28%;净光合速率分别达为 23.2 和 25.87 μmol(m^2 · s),较对照提高 145.76%,104.18%;植株全磷含量分别为 10.09 和 12.39 mg/盆,较对照提高 168.35%,121.25%,均显著高于对照。表明 GM_3 对糜子促生作用明显,表现出了良好的溶磷效果,研究结果为旱地糜子生产实现"减肥减药"提供了一个新的技术途径。

[参 考 文 献]

[1] Ringeval B, Nowak B, Nesme T, et al. Contribution of anthropogenic phosphorus to agricultural soil fertility and food production [J]. Global Biogeochemical Cycles, 2014,28(7):743-756.

[2] Bhattacharyya P N , Jha D K. Plant growth-promoting rhizobacteria(PGPR): Emergence in agriculture [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2012, 28(4):1327-1350.

[3] 陈欣,宇万太,沈善敏,等.磷肥低量施用制度下土壤磷库的发展变化(Ⅱ):土壤有效磷及土壤无机磷组成[J].土壤学报,1997,34(1):81-88.

[4] 王恒俊,张淑光,蔡风岐等.黄土高原地区土壤资源及其合理利用[M].北京:中国科学技术出版社,1991.

[5] 赵小蓉,林启美,孙焱鑫,等.玉米根际与非根际解磷细菌的分布特点[J].生态学杂志,2001,20(6):62-64.

[6] Rmn K, Janzen H H, Leggett M E. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus [J]. Advances in Agronomy, 1989,42(08):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.

[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.

[9] Whitelaw M A, Harden T J, Bender G L. Plant growth promotion of wheat inoculated with *Penicillium radicum* sp. nov. [J]. Soil Research, 1997,35(2):291-300.

[10] Stone J K, Bacon C W, White J F. An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined, Microbial Endophytes [M]. Bacon C W, White J F(eds). New York: Marcel Dekker, 2000.

[11] Lyons P C, Evans J J, Bacon C W. Effects of the fungal endophyte *Acremonium coenophialum* on Nitrogen accumulation and metabolism in tall fescue [J]. Plant Physiology, 1990,92(3):726-732.

[12] Sirrenberg A, Gobel C, Grond S, et al. Pinformospo-raindica affects plant growth by auxin production [J]. Physiologia Plantarum, 2007,131(4):581-589.

[13] 张盼盼,冯佰利,王鹏科,等.糜子芽期抗旱性指标鉴选与利用研究[J].河北农业科学,2010,14(11):22-27.

[14] 王纶,王星玉,温琪汾,等.中国黍稷种质资源研究与利用[J].植物遗传资源学报,2005,6(4):474-477.

[15] 苏旺,张艳平,屈洋,等,不同覆盖方式对黄土高原旱地土壤水分及糜子生长、光合特性和产量的影响[J].应用生态学报,2014,25(11):3215-3222.

[16] 房玉林,宿景霞,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):1225-1234.

[17] Aline López-López, Rogel M A. Phaseolus vulgaris seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. [J]. Systematic & Applied Microbiology, 2010, 33(6):322-327.

[18] 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.

[19] 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):1183-1188.

[20] Jayandra K J, Sanjay S, Chandra S N. Occurrence of Salt, pH, and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils [J]. Current Microbiology, 1999,39(2):89-93.

[21] Louw H A, Webley D M. A study of soil bacteria dissolving certain mineral phosphate fertilizers and related compounds [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008,22(2):227-233.

[22] 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.

[23] Williamson B, Alexander I J. Acid phosphatase localised in the sheath of beech mycorrhiza [J]. Soil Biology & Biochemistry, 1975,7(3):195-198.

[24] Gimsing A L, Borggaard O K, Jacobsen O S, et al. Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralisation in Danish surface soils [J]. Applied Soil Ecology, 2004, 27(3):0-242.

[25] Jin H P, Bolan N, Megharaj M, et al. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil [J]. Journal of Hazardous Materials, 2011,185(2):829-836.

[26] 范丙全,金继运,葛诚.溶磷草酸青霉菌筛选及其溶磷效果的初步研究[J].中国农业科学,2002,35(5):525-530.

[27] Xu Bing, Li Bai, Qin Ling, et al. Solubilization of rock phosphate by different ectomycorrhizal fungi(in solution culture) [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2000,22(4):76-80.

[28] 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):149-155.

[29] 金术超,杜春梅,平文祥,等.解磷微生物的研究进展[J].微生物学杂志,2006,26(2):73-78.

[30] 张友胜.植物叶绿素特征及其在森林生态学研究中的应用[J].安徽农业科学,2008,36(3):1014-1017.

[31] 朱培淼,杨兴明,徐阳春,等.高效解磷细菌的筛选及其对玉米苗期生长的促进作用[J].应用生态学报,2007,18(1):107-112.

[32] Rodriguez R J, White J J, Arnold A E, et al. Fungal endophytes: Diversity and functional roles [J]. New Phytologist, 2009,182(2):314-330.

[33] Sun Yue, Wang Qi, et al. Endophytic fungal community in stems and leaves of plants from desert areas in China [J]. Mycological Progress, 2012,11(3):781-790.

[34] Suryanarayanan T S, Wittlinger S K, Faeth S H. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona [J]. Mycological Research, 2005,109(5):635-639.

(上接第115页)

[15] 操丽,邓清禄,耿丹,等.基于GIS与模糊逻辑法的川气东送管道地质灾害危险性评价[J].安全与环境工程,2013,20(6):38-42,48.

[16] 胡圣武.基于模糊理论和典型线路的地质灾害评价的GIS方法研究[J].测绘科学,2011,36(4):86-88,65.

[17] 张栋,范育青,辛程鹏.基于FAHP的高原山地滑坡危险性评价[J].环境工程,2014,32(10):133-136,144.

[18] 黄海亮,焦光伟,王亚超,等.基于GIS覆土油罐滑坡危险性模糊评价[J].后勤工程学院学报,2016,32(1):35-40.

[19] 刘海燕,庞小平.利用GIS和模糊层次分析法的南极考察站选址研究[J].武汉大学学报(信息科学版),2015,40(2):249-252,257.

[20] 曹璞源,胡胜,邱海军,等.基于模糊层次分析的西安市地质灾害危险性评价[J].干旱区资源与环境,2017,31(8):136-142.

[21] 沈志平,宋二祥,朱博勤,等. FAST开挖系统关键技术及安全性研究[M].北京:科学出版社,2018.

[22] 宋建波,刘宏,王文俊,等.大射电望远镜贵州选址理论与方法[M].北京:地质出版社,2006.

[23] 贵州省地质调查院.中国区域地质志/贵州志[M].北京:地质出版社,2017.

[24] 杨纶标,高英仪,凌卫新.模糊数学原理及应用[M].广州:华南理工大学出版社,2011.

[25] 张宁,万忠梅.基于层次分析法的梅河口市地质灾害易发性区划[J].山东农业大学学报(自然科学版),2016,47(2):250-253.

[26] 黄杏元,马劲松.地理信息系统概论[M].北京:高等教育出版社,2008.

[27] 高丽琰,余江宽,张幼莹,等.基于GIS的层次分析法在宁夏地质灾害易发性评价的应用[J].防灾科技学院学报,2017,19(4):8-15.

[28] 徐泽水,达庆利.衡量判断矩阵相容性的一个通用指标[J].东南大学学报(自然科学版),2001,31(6):94-97.