

阳春砂仁根内生真菌解磷功能评价及分类学鉴定

曹冠华, 张 雪, 马诗婷, 王希付, 俞 捷, 顾 雯, 赵荣华*, 贺 森*

云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500

摘 要: **目的** 对产自于云南的阳春砂仁根内生真菌进行分离、纯培养、解磷功能评价及分类学鉴定。**方法** 通过 PDA 和 MEA 培养基分离砂仁根内生真菌, 并纯化培养; 利用无机磷源 Pikovaskaia's (PVK) 固体和液体培养基筛选具有解磷功能的内生真菌, 并通过生长圈直径、生物量、有效磷含量、pH 值、磷酸酶活性来分析菌株解磷能力和解磷机制; 通过核糖体 18 S PCR 扩增, 对具有解磷效果的菌株进行分子鉴定。**结果** 研究发现, 分离自阳春砂仁根部的 24 株内生真菌, 有 10 株为深色有隔内生真菌 (dark septate endophytes, DSE)。通过难溶性 PVK 固体培养基筛选发现, 共有 8 株菌可形成解磷生长圈, 其中 JP-20 和 JP-23 生长直径均大于 9 cm, 其次为 JP-15, 生长圈直径为 6.06 cm; PVK 液体培养基筛选结果显示, 菌株 JP-23 具有较强的解磷效果, 生物量显著高于可溶性磷源, 液体基质中有效磷含量显著升高, pH 明显下降, 酸性磷酸酶活性增加。经分子鉴定, 初步认定菌株 JP-23 为枝孢属 *Cladosporium* sp. 菌株 (GenBank: MK629004)。**结论** 菌株 JP-23 可通过调节基质 pH 值和分泌酸性磷酸酶来分解、吸收难溶性磷源。为研究植物-微生物磷吸收作用机制及砂仁生态种植提供数据支持和理论依据。

关键词: 阳春砂仁; 内生真菌; 解磷能力; 分子鉴定; 深色有隔内生真菌

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)05-1316-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.05.031

Phosphate-solubilizing function evaluation and taxonomic identification of endophytic fungi separated from roots of *Amomum villosum*

CAO Guan-hua, ZHANG Xue, MA Shi-ting, WANG Xi-fu, YU Jie, GU Wen, ZHAO Rong-hua, HE Sen

School of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To study the characteristics of endophytic fungi separated from the roots of *Amomum villosum* grown in Jinping County of Yunnan Province, including the culture, evaluation of phosphorus-solubilizing ability and taxonomic identification of target strains. **Methods** Endophytic fungi in the roots of *A. villosum* were separated by culturing in the mediums of PDA and MEA, and purely cultured in PDA. The endophytic fungi with phosphorus-solubilizing ability were screened by solid and liquid mediums of Pikovaskaia's (PVK) prepared with inorganic phosphorus source. Then, the phosphorus-solubilizing capacity and reasonable mechanism were analyzed by growth circle, biomass, effective phosphorus content, pH value, and phosphatase activity. Moreover, molecular identification of target strains with the capacity of phosphorus-solubilizing would be carried out by ribosome 18 S PCR amplification. **Results** The results showed that 24 endophytic fungi were separated from the roots of *A. villosum* in total, 10 of which were dark septate endophytes (DSE). Eight strains could grow on PVK solid medium and produce phosphorus-dissolved growth circle. The growth circle diameters of JP-20 and JP-23 were larger than others, and more than 9 cm, followed by JP-15 with the growth circle of 6.06 cm. Furthermore, it was shown that JP-23 had a strong ability of phosphate-solubilizing due to presenting a high biomass in the PVK liquid medium instead of the medium prepared by soluble phosphorus source. The content of effective phosphorus of JP-23 in PVK liquid medium was significantly increased with an obviously

收稿日期: 2019-11-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81560612); 国家重点研发计划“基于群落立体种植的中药材生态农业研究与应用” (2017YFC1700704); 南药协同创新研究中心项目 (30270100500); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目” (2060302); 云南省科学技术厅—云南中医学院应用基础研究联合专项 [2017FF116(-019), 2017FF117(-014)]; 云南省应用基础研究计划面上项目 (2019FB122)

作者简介: 曹冠华, 博士, 高级实验师, 主要从事中药资源与菌根微生物的研究。E-mail: cgh20031695@163.com

***通信作者** 赵荣华, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药资源开发的研究。E-mail: 1019735105@qq.com

贺 森, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药资源与分子生物学的研究。E-mail: sunbelt123@163.com

decreasing pH and a sharply rising of acid phosphatase (ACP) activity. Moreover, the strain JP-23 was preliminarily identified as *Cladosporium* sp. (GenBank: MK629004) by molecular identification. **Conclusion** An assumption was concluded that strain JP-23 could decompose and use insoluble phosphorus sources by adjusting the pH value and secreting ACP in medium. Our findings would provide data support and theoretical basis for studying the phosphate absorption mechanism of plant-microbial symbiosis system and the ecological plantation of *A. villosum*.

Key words: *Amomum villosum* Lour.; endophytic fungi; phosphate-solubilizing ability; molecular identification; dark endophytic fungi

砂仁(中药)是姜科豆蔻属阳春砂 *Amomum villosum* Lour.、绿壳砂 *A. villosum* Lour. var. *xanthioides* T. L. Wu et Senjen 或海南砂 *A. longiligulare* T. L. Wu 的干燥成熟果实,为四大“南药”之一^[1]。砂仁归脾、胃、肾经,有化湿开胃、温脾止泻、安胎理气之功效^[2]。临床医学表明,砂仁在治疗胃肠道疾病、妇科疾病,抗肿瘤等方面具有显著的功效^[3]。砂仁以阳春砂仁的品质最好,现主要分布于广东、广西、海南、云南等地^[1]。

磷是植物生长所需最主要的大量元素之一。调查显示,我国 74% 耕地土壤缺乏有效磷,土壤中 95% 以上的磷以无效态形式存在,而严重缺乏能被植物直接吸收利用的有效磷^[4-5]。通过具有解磷功能的根际微生物将难溶性磷转化成有效磷供植物吸收利用是植物吸收磷素主要方式之一^[6]。研究发现,植物内生真菌(endophytic fungi)中的丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)、深色有隔内生真菌(dark septate endophytes, DSE)以及部分细菌均具有解磷效果,在植物磷吸收中发挥着重要作用^[7-9]。

DSE 是指一类定殖于植物根内、菌丝颜色较深、具横隔,常以无性态存在的小型内生真菌,但分类学地位尚不明确^[10]。研究显示,DSE 可以提高宿主植物的胁迫抗性,如重金属、高盐、低磷等^[11-13]。由于 DSE 在离体条件下可进行纯培养,其功能及与宿主间的作用机制逐渐被认知和发掘。目前对砂仁内生真菌研究报道极少,尤其对内生真菌功能的研究更是鲜有报道。张云霞等^[14]对阳春砂仁健康植株 444 块根、茎、叶组织中共分离得到 273 株内生真菌,形态学鉴定了 269 株,分属于 13 个分类单元。

本实验以产自云南省红河州金平县的阳春砂仁新鲜根样为研究材料,通过马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)和麦芽提取物琼脂培养基(malt extract agar, MEA)分离根内生真菌,并纯化培养;利用无机磷源 Pikovaskaia's (PVK)

固体和液体培养基筛选具有解磷功能的内生真菌,并通过生物量、有效磷含量、pH 值、磷酸酶活性、生长圈直径来分析其解磷能力和解磷机制;同时通过核糖体 18 S PCR 扩增,对具有解磷效果的菌株进行分类学鉴定。本实验对植物-微生物磷吸收机制的研究及砂仁生态种植提供了数据支持和理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

本实验所需材料于 2017 年 9 月 15 日采集于云南省红河州金平县砂仁种植基地为健康、无病害的阳春砂新鲜根样,经云南中医药大学赵荣华教授鉴定为阳春砂 *Amomum villosum* Lour. 的根。将采集后的新鲜根样(含土)迅速运到实验室,小心去除附着土,将样品分成 2 份,一份于 -80 °C 冰箱保存;一份用于内生真菌的分离。

1.2 仪器

Axio Lab A1 型生物显微镜,德国蔡司公司;WFZ UV-4802H 型紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;CS1011 型电热鼓风干燥箱,重庆实验设备厂;JJ1000 型精密电子天平,美国双杰(兄弟)有限公司;MJ 型恒温恒湿培养箱,上海一恒科技有限公司;DYY-10C 型电泳仪,北京市六一仪器厂;D2012 型台式高速小型离心机,赛洛捷克公司;ProFlex PCR 扩增仪,美国 ABI 公司;YXQ-LS-50SII 型立式压力蒸汽灭菌锅,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;CHA-S 型气浴恒温摇床,金坛市易晨仪器制造有限公司。

2 方法

2.1 阳春砂仁根内生真菌的分离

本实验采用 PDA 和 MEA 2 种培养基分离阳春砂仁根内生真菌,参考余鑫^[15]实验方法。

2.1.1 培养基准备 以含有 0.1% 青霉素和 0.1% 链霉素的 PDA(马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 1.8%、水 1 L, 121 °C 灭菌 21 min)和 MEA(麦芽浸粉 30g、蛋白胨 5 g、琼脂 1.8%、水 1 L, 10% 乳酸调 pH 为

5.4±0.2, 115 °C 灭菌 10 min) 固体平板为分离培养基; 倒板、冷却, 凝固后用无菌手术刀分切为 8~12 块 1~2 cm² 不相接的培养基小块。

2.1.2 样品处理 用流动的清水多次清洗根样; 剪成 8~10 cm 小段; 滤纸吸干, 消毒。

2.1.3 表面消毒 75%乙醇浸没根段 5 min; 无菌水漂洗 2 次; 3%的次氯酸钠溶液浸没根段 5 min, 无菌水漂洗 4 次, 无菌滤纸吸干多余水分。

2.1.4 内生真菌分离培养 将表面消毒后的根段用无菌剪刀除去两端后, 剪成 5 mm 左右小段后置于已备好的 PDA 和 MEA 培养基小块上, 标记相应编号, 25 °C 培养 60 d, 期间挑取根段两端长出的内生真菌于 PDA 平板纯化培养, 并及时剔除污染的杂菌。

2.2 解磷功能菌株的筛选

用 PVK 固体和液体培养基筛选具有解磷功能的内生真菌, 并以相应的可溶性磷源培养基作对照, 通过生物量、有效磷含量、pH 值、磷酸酶活性、生长圈直径分析菌株解磷能力和解磷机制, 具体操作参考徐润冰^[16]方法。

2.2.1 初筛 将纯化后的内生真菌分别接种至 PVK 固体培养基 [葡萄糖 10 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, MgSO₄ 0.3 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, MnSO₄ 0.03 g, FeSO₄ 0.03 g, Ca₃(PO)₄ 5 g, 琼脂 1.8%, pH 6.5]、可溶性磷源培养基 [葡萄糖 10g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, MgSO₄ 0.3 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, MnSO₄ 0.03 g, FeSO₄ 0.03 g, KH₂(PO)₄ 5 g, 琼脂 1.8%, pH 6.5]、无磷培养基 (其他不变, 去掉磷源), 28 °C 黑暗培养; 观察菌落生长状况, 14 d 后用游标卡尺以十字相乘法测量菌落直径。

2.2.2 解磷功能评判 将初步筛选具有解磷功能的菌株按一定的量分别接种至 PVK 液体培养基、可溶性磷源培养基, 28 °C、180 r/min 摇床培养 14 d; 测定生物量 (菌丝干质量)、发酵液 pH 值、可溶性磷含量及磷酸酶活性。每个处理设 4 个重复。

菌丝干质量的测定参照 Zhan 等^[17]的方法, 过滤至已知质量的滤纸上, 去离子水洗脱 3 次, 60 °C 干燥 48 h, 测定菌丝干质量。发酵液 pH 值用 pH 计直接测定; 可溶性磷含量测定采用钼锑抗比色法测定^[18-19], 测得标准曲线为 $Y=0.464\ 3\ X+0.015\ 9$, $r^2=0.993\ 4$ 。磷酸酶活性测定参考 Ho 等^[20]方法。

2.3 菌株鉴定

具有解磷功能的菌株通过形态学和分子手段对

其分类地位进行鉴定。形态学鉴定主要通过 PDA 及插片培养观察典型菌落形态、显微结构, 并与《中国真菌志》相应描述进行比对; 显微形态结构采用 Scope.A1 型生物学显微镜拍照 (ZEISS 公司)。分子手段主要通过通用引物扩增目标序列, 构建系统发育树, 从而确定种属。分子鉴定方法: (1) 采用真菌通用引物对核糖体 18 S 进行扩增, 引物为 3NDF: 5'-GGCAAGTCTGGTGCCAG-3'; V4R: 5'-ACGGTATCTAGATCAGTCTTCG-3'。(2) 菌株 DNA 的提取参考天根基因组 DNA 提取试剂盒 (批号 DP302-02) 说明书; PCR 扩增程序为预变性: 94 °C、4 min; 变性 94 °C、30 s, 退火: 53 °C、40 s, 延伸: 72 °C、1 min, 35 个循环; 后延伸: 72 °C、7 min; 4 °C 保存。PCR 酶为 2×Pfu PCR MasterMix (批号 KP201-02)。(3) PCR 产物测序由云南涛擎生物科技有限公司完成。(4) 采用 Mega 4 构建系统发育树。(5) 提交扩增序列至 BankIT, 获取 GenBank 号。

2.4 数据处理

数据分析采用软件 SPSS 21.0。方差分析时, 若方差齐性, 采用单因素方差分析 (One-way Anova) 中的 Turkey HSD 检验进行差异显著性分析 ($P<0.05$), 方差齐性采用 Levene 检验。数据图采用软件 Sigmaplot 11.0 完成。

3 结果与分析

3.1 阳春砂仁内生真菌分离和形态学描述

通过 PDA 和 MEA 培养基从阳春砂仁根部共分离、纯化得到 24 株内生真菌, 根据菌落形态和显微结构 (图 1), 初步确定菌株 JP-3、JP-4、JP-6、JP-9、JP-12、JP-13、JP-15、JP-16、JP-19、JP-23 为 DSE, 具备 DSE 典型形态结构, 即定殖于根内、菌丝颜色较深、具横隔^[10]。24 株菌落形态描述见表 1。

3.2 解磷功能内生真菌筛选

3.2.1 PVK 固体培养基筛选解磷功能菌株 难溶性磷源 PVK 固体培养基筛选结果显示, 共有 8 株菌可在难溶性磷源培养基中生长 (图 2), 其中 JP-6、JP-9、JP-12、JP-13、JP-15、JP-19 和 JP-23 均为 DSE。

此外, 在难溶性磷源培养基中, JP-9、JP-13、JP-15、JP-20 和 JP-23 的生长圈直径均大于可溶性磷源培养基菌落直径, 且 JP-13、JP-20 和 JP-23 差异显著 (表 2)。培养 14 d 后, 在难溶性磷源培养基中, JP-20 和 JP-23 生长圈直径最大, 已覆盖整个平板;



图 1 阳春砂仁根内生真菌菌落形态和显微结构

Fig. 1 Colonial morphology and microstructure of endophytic fungi separated from roots of *A. villosum*

表 1 分离自阳春砂仁 24 株内生真菌菌落形态和典型结构描述

Table 1 Colonial morphology and microstructure description of 24 endophytic fungi separated from roots of *A. villosum*

编号	特征描述	编号	特征描述
JP-1	菌落呈米黄色, 中心颜色深, 边缘为白色; 菌丝短而致密; 表面呈绒毛状, 有皱折; 菌丝具横隔; 有散落孢子	JP-13	菌落颜色呈灰褐色, 中间凸起, 表面呈毡状; 菌丝有横隔; 生长较慢
JP-2	颜色为灰褐色, 中心颜色深, 边缘颜色浅; 菌丝较长, 有横隔; 表面呈棉絮状; 有散落孢子	JP-14	菌落颜色呈白色, 中间凸起, 向边缘展开; 表面呈棉絮状; 菌丝较长, 无横隔, 有散落孢子
JP-3	菌落颜色呈现灰褐色, 中间有凸起, 呈褶皱状展开; 表面呈毡状; 菌丝具横隔	JP-15	颜色为深灰色; 表面呈毡状。有大量脂类代谢物存在; 菌丝较短, 有联锁状结构存在, 有横隔
JP-4	菌落颜色为灰白色, 同心环状展开; 表面呈绒毛状; 菌丝具横隔, 隔较短; 有散落孢子	JP-16	菌落颜色为白色; 中间隆起; 表面呈绒毛状; 分泌红色色素类物质; 菌丝有横隔, 隔较长
JP-5	菌落颜色呈米黄色, 中间有褶皱向外生长; 表面呈毡状; 菌丝无横隔, 有散落孢子	JP-17	菌落颜色呈粉白色; 中间凸起; 分泌红色色素类物质, 表面呈绒毛状; 菌丝无横隔, 有散落孢子
JP-6	菌落颜色为深灰色, 中间凸起, 有褶皱, 向外生长, 表面呈毡状; 菌丝具横隔, 隔较短, 有散落孢子	JP-18	菌落颜色呈白色, 中间乳头状; 菌落呈放射状展开; 表面呈棉絮状; 菌丝无横隔, 有散落孢子
JP-7	菌落颜色呈灰绿色, 边缘白色; 表面光滑; 菌丝短而致密, 无横隔; 有散落孢子	JP-19	菌落颜色呈灰色; 菌落湿润, 有脂类代谢产物分泌; 表面呈毡状; 菌丝具横隔, 隔较短
JP-8	菌落颜色呈金黄色, 中间凸起; 表面潮湿, 有多种颜色脂类物质形成; 菌丝无横隔	JP-20	菌落颜色为白绿色; 呈地毯式平铺展开, 有缘毛; 表面呈绒毛状; 菌丝; 菌丝无横隔, 有散落孢子
JP-9	菌落颜色为灰色, 中间有凸起, 表面呈绒毛状; 菌丝具横隔, 隔较短	JP-21	菌落颜色为灰白色, 中间凸起, 呈地毯式平铺, 表面呈棉絮状; 菌丝无横隔
JP-10	菌落颜色为呈白色, 地毯式展开, 呈棉絮状; 分泌红色脂类物质; 菌丝较长, 无典型横隔	JP-22	菌落颜色为灰褐色, 中间凸起, 边缘颜色浅; 表面呈棉絮状; 菌丝无横隔
JP-11	菌落中间呈黄色, 边缘淡砖红色; 菌落凸起, 表面呈绒毛状; 无典型横隔; 有散落孢子	JP-23	菌落颜色呈棕褐色, 中间凸起, 边缘颜色浅; 表面呈绒毛状; 菌丝有典型横隔, 无散落孢子
JP-12	菌落颜色为棕褐色; 表面呈毡状, 菌丝较短, 有横隔; 最外层分泌有脂类代谢物	JP-24	菌落颜色呈白色, 中间凸起; 分泌黄色色素; 表面呈绒毛状; 菌丝无横隔, 有散落孢子

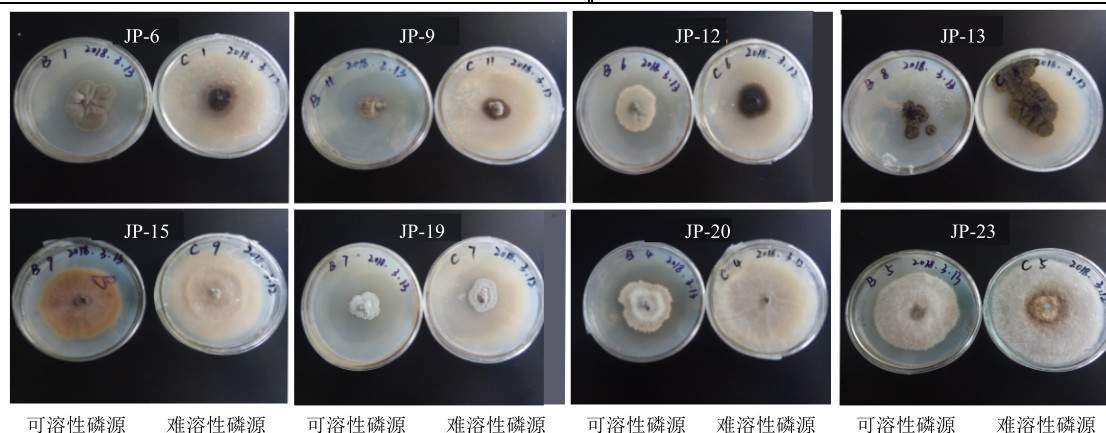


图 2 8 株阳春砂仁根内生真菌在可溶性和难溶性磷源固体平板中生长状况

Fig. 2 Growth status of eight endophytic fungi separated from roots of *A. villosum* on plates with soluble and insoluble phosphorus sources

其次为 JP-15 (6.06 ± 0.11) cm; 后面依次为 JP-12 (2.59 ± 0.19) cm、JP-13 (2.54 ± 0.17) cm、JP-6 (2.50 ± 0.10) cm、JP-9 (1.73 ± 0.11) cm 和 JP-19 (1.56 ± 0.07) cm; 而在可溶性磷源条件下, 生长最快的菌株为 JP-15 (5.43 ± 0.02) cm 和 JP-23 (5.05 ± 0.05) cm; 生长最慢的为 JP-13 (1.46 ± 0.27) cm。

3.2.2 PVK 液体培养基筛选解磷功能菌株及解磷机

制分析 通过测定、比较不同磷源培养条件下 8 株菌丝干质量, 从而初步判定菌株利用难溶性磷的能力。

由表 3 可知, 与 PVK 固体培养基解磷功能菌株筛选结果不同, JP-9、JP-12、JP-13 和 JP-19 在 PVK 液体培养基中均无法生长, 而 JP-6、JP-15 和 JP-20 虽能生长, 但与可溶性磷源相比, 菌丝干质量极低; 仅有 JP-23 可以生长, 且生物量高于可溶性磷源, 差异显著。

表 2 可溶性和难溶性磷源固体平板中阳春砂仁根内生真菌生长圈直径 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Growth ring diameter of endophytic fungi separated from roots of *A. villosum* plates with soluble and insoluble phosphorus sources ($\bar{x} \pm s$)

编号	生长圈直径/cm	
	可溶性磷源	难溶性磷源
JP-6	2.56±0.32	2.5±0.10
JP-9	1.53±0.06	1.73±0.11
JP-12	3.01±0.09	2.59±0.19
JP-13	1.46±0.27*	2.54±0.17
JP-15	5.43±0.02	6.06±0.11
JP-19	2.01±0.09	1.56±0.07
JP-20	3.82±0.15*	>9
JP-23	5.05±0.05*	>9

与可溶性磷源比较: * $P < 0.05$, 下同* $P < 0.05$ vs insoluble phosphorus sources, same as below表 3 8 株供试菌在可溶性和难溶性磷源液体培养基中菌丝干质量测定结果 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Results of mycelial dry weight of eight endophytic fungi cultured in different medium prepared with soluble and insoluble phosphorus sources ($\bar{x} \pm s$)

编号	菌丝干质量/g	
	可溶性磷源	难溶性磷源
JP-6	0.127±0.05*	0.055±0.005
JP-9	0.179±0.02*	0
JP-12	0.237±0.11*	0
JP-13	0.183±0.08*	0
JP-15	0.251±0.08*	0.033±0.03
JP-19	0.122±0.03*	0
JP-20	0.264±0.07*	0.012±0.004
JP-23	0.148±0.03*	0.539±0.010

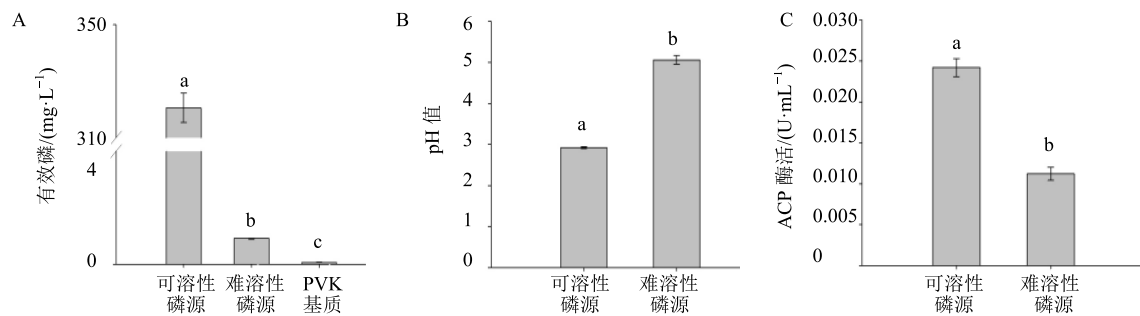
不同字母表示差异显著, $P < 0.05$ Different letters indicate significant differences, $P < 0.05$

图 3 菌株 JP-23 解磷能力和解磷机制评价指标分析

Fig. 3 Evaluation index analysis of phosphate-solubilizing ability and mechanism of strain JP-23

由图 3 可知, 菌株 JP-23 具有一定的解磷能力。有效磷含量测定结果显示, 菌株 JP-23 可以分解难溶性的 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 使 PO_4^{3-} 游离出来, 变成易被吸收利用的有效磷源。经 30 °C, 120 r/min 摇床培养 14 d 后, 菌株 JP-23 可将 PVK 液体培养基中的有效磷质量浓度从 0.06 mg/L 提升到 0.91 mg/L, 差异显著 (图 3-A)。现代研究显示, 微生物通过分泌有机酸, 降低基质 pH 值, 从而分解难溶性磷源, 并分泌酸性磷酸酶 (acid phosphatase, ACP) 来促进吸收利用难溶性磷源^[21-22]。图 3-B、C 显示, 经菌株 JP-23 发酵后, 可溶性磷源、难溶性磷源基质 pH 值从 7.00 分别降到 2.93、5.06, 二者之间差异显著; 而基质 ACP 活性则分别为 2.42、1.12 U/100 mL。以上结果显示, 菌株 JP-23 可通过调节基质 pH 和分泌酸性磷酸酶来分解难溶性磷源、从而帮助菌株吸收利用有效磷源。

3.3 解磷功能内生真菌分子鉴定

以菌株 JP-23 18 S 扩增序列进行 BLAST 比对, 收集一致性较高的其他物种序列构建 Neighbour-Joining (NJ) 系统发育树文本, 并以鳃弧菌 *Vibrio anguillarum* 作为外群构建系统发育树 (图 4); 结果显示, 菌株 JP-23 18 S 扩增序列 (GenBank 号: MK629004) 与枝孢属菌株 *Cladosporium* sp. 聚为一枝, 同源性 100%, 初步判定菌株 JP-23 为枝孢属真菌。

4 讨论

磷作为植物最重要的营养元素之一, 被植物大量需求。在自然环境条件下, 土壤中的有效磷易流失、固化, 剩余的磷常以固态难溶性磷存在^[23]。研究显示, 植物利用磷的方式主要有直接和间接 2 种形式, 前者是指通过根表皮细胞和根毛直接将环境

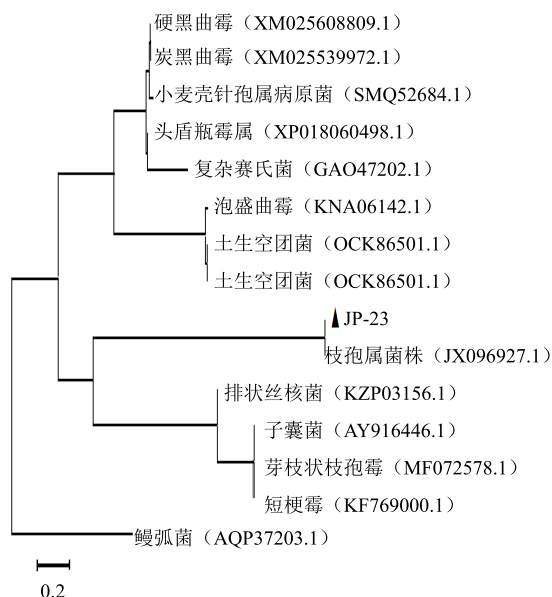


图 4 基于核糖体 18 S 氨基酸序列菌株 JP-23 系统进化树分析
Fig. 4 Neighbour-Joining tree analysis of strain JP-23 based on ribosome 18 S amino acid sequences

中的磷酸根离子跨膜转运到植物体内，该途径是植物获取磷的主要方式；后者是指植物与内生真菌形成共生菌根，从而分解、吸收难溶性磷，该途径是磷胁迫条件下植物吸收磷的主要方式^[22]。DSE 作为一类重要的根内生真菌，其解磷作用逐渐被大家所认识，Della 等^[8]研究发现，4 个不同属的 DSE 对磷酸三钙磷源具有一定的解磷能力。本实验从 24 株阳春砂仁内生真菌中共分离得到 1 株具有较强解磷效果的菌株，初步鉴定为枝孢属菌株 *Cladosporium* sp. (GenBank 号：MK629004)，对其解磷机制分析，认为其通过降低基质 pH 值和分泌酸性磷酸酶来分解吸收难溶性磷源，与 Della 等^[8]、Illmer 等^[22]、信文娟^[24]研究结果相似。

参考文献

- [1] 郭岩伟, 彭艳琼, 张 婷, 等. 云南金平县阳春砂仁传粉昆虫与传粉效率研究 [J]. 中药材, 2018, 41(9): 1796-1800.
- [2] 罗 杏, 唐永祥. 砂仁入肝肾经之理论探析 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(5): 708-709.
- [3] 黄崇才. 砂仁的化学成分、药理作用及临床应用的研究进展 [J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(Z1): 210-212.
- [4] Son H J, Park G T, Cha M S, *et al.* Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt-and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere [J]. *Bioresource Technol*, 2006, 97(2): 204-210.
- [5] 吉 蓉. 土壤解磷微生物及其解磷机制综述 [J]. 甘肃农业科技, 2013(8): 42-45.
- [6] Smith S E, Manjarrez M, Stonor R, *et al.* Indigenous arbuscular mycorrhizal (AM) fungi contribute to wheat phosphate uptake in a semi-arid field environment, shown by tracking with radioactive phosphorus [J]. *Appl Soil Ecol*, 2015, 96: 68-74.
- [7] Della Mónica I F, Stefanoni Rubio P J, Cina R P, *et al.* Effects of the phosphate-solubilizing fungus *Talaromyces flavus* on the development and efficiency of the *Gigaspora rosea*-*Triticum aestivum* symbiosis [J]. *Symbiosis*, 2014, 64(1): 25-32.
- [8] Della M I F, Saparrat M C N, Godeas A M, *et al.* The co-existence between DSE and AMF symbionts affects plant P pools through P mineralization and solubilization processes [J]. *Fungal Ecol*, 2015, 17: 10-17.
- [9] Zhang L, Xu M, Liu Y, *et al.* Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium [J]. *New Phytol*, 2016, 210(3): 1022-1032.
- [10] 刘茂军, 张兴涛, 赵之伟. 深色有隔内生真菌 (DSE) 研究进展 [J]. 菌物学报, 2009, 28(6): 888-894.
- [11] Priyadharsini P, Muthukumar T. The root endophytic fungus, *Curvularia geniculata*, from *Parthenium hysterophorus* roots improves plant growth through phosphate solubilization and phytohormone production [J]. *Fungal Ecol*, 2017, 27: 69-77.
- [12] Zhang Y, Li T, Zhao Z W. Colonization characteristics and composition of dark septate endophytes (DSE) in a lead and zinc slag heap in Southwest China [J]. *J Soil Contamin*, 2013, 22(5): 532-545.
- [13] Wang J L, Li T, Liu G Y, *et al.* Unraveling the role of dark septate endophyte (DSE) colonizing maize (*Zea mays*) under cadmium stress: Physiological, cytological and genic aspects [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 22028.
- [14] 张云霞, 杨 杰, 黄江华, 等. 阳春砂仁内生真菌多样性分析 [J]. 仲恺农业工程学院学报, 2010, 23(1): 15-17.
- [15] 余 鑫. 云南募乃铅锌矿区陆生和水生芦竹 DSE 多样性及其功能初探 [D]. 昆明: 云南大学, 2016.
- [16] 徐润冰. 深色有隔内生真菌嗜鱼外瓶霉 (*Exophiala pisciphila*) 促进玉米磷吸收的机制研究 [D]. 昆明: 云南大学, 2017.
- [17] Zhan F, He Y, Li T, *et al.* Tolerance and antioxidant response of a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*, to cadmium stress [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2015, 94(1): 96-102.

- [18] Watanabe F S, Olsen S R. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO₃ extracts from soil [J]. *Soil Sci Society Am J*, 1965, 29(6): 677-678.
- [19] 李儒发, 付玉明, 莫亮猷. 水中痕量元素磷的测定—有机相钼锑抗比色法 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 1979(2): 76-84.
- [20] Ho I, Zak B. Acid phosphatase activity of six ectomycorrhizal fungi [J]. *Canadian J Bot*, 1979, 57(11): 1203-1205.
- [21] Asea P E A, Kucey R M N, Stewart JWB. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil [J]. *Soil Biol Biochem*, 1988, 20(4): 459-464.
- [22] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms [J]. *Soil Biol Biochem*, 1995, 27(3): 257-263.
- [23] Withers P J A, Edwards A C, Foy R H. Phosphorus cycling in UK agriculture and implications for phosphorus loss from soil [J]. *Soil Use Manag*, 2001, 17(3): 139-149.
- [24] 信文娟. 不同磷水平下菌根真菌与解磷菌、根瘤菌对紫云英生长影响及其相互作用 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.