

白芷根际促生真菌筛选及其促生效果研究

江美彦, 刘仁浪, 周杨, 刘思琴, 杨云舒, 姚菲, 杜宣, 陈银银,
冯冬菊, 徐东北, 吴卫*
(四川农业大学 农学院, 四川成都 611130)

[摘要] 化肥的过度施用已在白芷种植中造成产量下降、品质退化等诸多问题。为推动白芷绿色栽培模式,挖掘白芷根际真菌资源,该研究分别从道地及非道地产区白芷根际分离、筛选具有固氮、溶磷、解钾、产铁载体和产吲哚乙酸(IAA)促生特性的白芷根际真菌,结合形态特征及 ITS rDNA 序列对菌株进行综合鉴定,采用盆栽试验验证其促生效果。结果表明,通过各促生活性从道地和非道地白芷根际分离筛选获得了 37 株促生真菌,多为镰孢菌属 *Fusarium*,且道地产区白芷根际可培养的促生真菌种类较非道地产区的更为丰富多样。所有菌株中以黑曲霉 ZJ-17 的综合促生潜力最强,在室外不施肥的条件下,接种 ZJ-17 对种植于道地和非道地产区土壤的白芷的生长、产量和有效成分积累均有显著的促进作用,增产率分别为 73.59%、37.84%,一定程度上缓解了不额外施肥对白芷生长的限制。因此,黑曲霉 ZJ-17 在白芷增产保质、化肥减施上具有极大的应用前景,可实际应用于促进白芷生长,制备生物肥料上。

[关键词] 白芷; 根际真菌; 促生; 黑曲霉

Screening and promoting effect of grow-promoting fungi in rhizosphere of *Angelica dahurica* var. *formosana*

JIANG Mei-yan, LIU Ren-lang, ZHOU Yang, LIU Si-qin, YANG Yun-shu, YAO Fei, DU Xuan, CHEN Yin-yin,
FENG Dong-ju, XU Dong-bei, WU Wei*
(College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

[Abstract] Excessive application of chemical fertilizer has caused many problems in *Angelica dahurica* var. *formosana* planting, such as yield decline and quality degradation. In order to promote the green cultivation mode of *A. dahurica* var. *formosana* and explore rhizosphere fungus resources, the rhizosphere fungi with nitrogen fixation, phosphorus solubilization, potassium solubilization, iron-producing carrier, and IAA-producing properties were isolated and screened in the rhizosphere of *A. dahurica* var. *formosana* from the genuine and non-genuine areas, respectively. The strains were identified comprehensively in light of the morphological characteristics and ITS rDNA sequences, and the growth-promoting effect of the screened strains was verified by pot experiment. The results showed that 37 strains of growth-promoting fungi were isolated and screened from the rhizosphere of *A. dahurica* var. *formosana*, mostly belonging to *Fusarium*. The cultured rhizosphere growth-promoting fungi of *A. dahurica* var. *formosana* were more abundant and diverse in the genuine producing areas than in the non-genuine producing areas. Among all strains, *Aspergillus niger* ZJ-17 had the strongest growth promotion potential. Under the condition of no fertilization outdoors, ZJ-17 inoculation significantly promoted the growth, yield, and accumulation of effective components of *A. dahurica* var. *formosana* planted in the soil of genuine and non-genuine producing areas, with yield increases of 73.59% and 37.84%, respectively. To a certain extent, it alleviated the restriction without additional fertilization on the growth of *A. dahurica* var. *formosana*. Therefore, *A. niger* ZJ-17 has great application prospects in increasing yield and quality of *A. dahurica* var. *formosana* and reducing fertilizer application and can be actually applied in promoting

[收稿日期] 2023-03-20

[基金项目] 四川省科学技术厅重点研发项目(2022YFS0582);四川省中医药重点学科建设项目(2021-16-4);四川农业大学学科建设双支计划-学科创新团队项目(P202108)

[通信作者] * 吴卫, E-mail: ewuwei@sicau.edu.cn

the growth of *A. dahurica* var. *formosana* and producing biofertilizer.

[Key words] *Angelica dahurica* var. *formosana*; rhizosphere fungi; growth promotion; *Aspergillus niger*

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20230517.101

川白芷为著名川产道地中药材,其原植物为杭白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm) Benth. et Hook. f. var. *formosana* (Boiss) Shan et Yuan, 主要含挥发油类、香豆素类、氨基酸类等多种活性成分^[1]。白芷的传统栽培模式以施用化肥为主,但过量施用化肥(尤其氮肥)已造成品质退化及产量降低等现象^[2]。20世纪60年代以来,随着化肥的大量使用,农作物的产量短期内虽有所提升,但是化肥的使用导致土壤团粒结构破坏、土壤酸化板结,土壤中有益微生物死亡等问题,最终使作物产量下降,不利于可持续发展^[3]。

根际指的是植物根系周围受根系生长影响的土体,是植物根系、土壤和微生物相互联系的重要场所^[4]。大量存在于植物根际的微生物可通过矿质养分吸收、植物激素产生、拮抗、营养和空间位竞争,土壤环境改良和诱导植物系统抗性(ISR)等多种方式直接或间接地影响植物生长及健康^[5]。研究利用植物根际微生物资源,积极管理土壤菌群,可有效减少化肥的施用量,增加产量,提高品质,是农业可持续发展下化肥的有效补充^[6]。因此,从植物原生境中分离并利用有益的根际微生物资源是增产保质、减施化肥的有利途径。

本研究通过稀释涂布平板法,分别从种植于道地产区和非道地产区的“川芷2号”白芷品种根际土壤中分离、筛选并鉴定根际促生真菌,通过盆栽试验验证所筛促生真菌对白芷的促生效果,为白芷绿色高产和优质种植提供新途径。

1 材料

1.1 植物

四川农业大学吴卫教授选育的“川芷2号”白芷品种^[7],原植物为杭白芷 *A. dahurica* var. *formosana*。

1.2 土壤采集

于采收期选择具有代表性、健壮无病虫害植株,采用五点法及抖根法挖取白芷根系,分别采集种植于道地产区四川省遂宁市涪江流域(蓬溪县永益村)和白芷非道地产区四川省崇州市(四川农业大学现代研发基地)的“川芷2号”根际土壤。收集新鲜根际土样,样品分别命名为ZD和ZJ。

1.3 室外盆栽土壤

土壤分别采自于四川省遂宁市川白芷种植基地(船山区余建村)和四川省崇州市(四川农业大学现代研发基地)。遂宁市土壤理化性质:pH 7.5,有机质 39.67 g·kg⁻¹,碱解氮 31.80 mg·kg⁻¹,速效磷 17.35 mg·kg⁻¹,速效钾 70.12 mg·kg⁻¹。崇州市土壤理化性质:pH 6.4,有机质 49.41 g·kg⁻¹,碱解氮 100.86 mg·kg⁻¹,速效磷 15.42 mg·kg⁻¹,速效钾 114.45 mg·kg⁻¹。

1.4 仪器与试剂

JJ124BC型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂);MLS-3780高压蒸汽灭菌锅(日本SANYO公司);SHP-160型生化培养箱(上海三发科学仪器有限公司);SPX-150B型生化培养箱(上海琅轩实验设备有限公司);TS-2102全温双层培养基摇床(常州国宇仪器制造有限公司);SW-CJ-2FD无菌操作台(苏州安泰空气技术有限公司);Allegra X-30R型离心机(美国贝克曼库尔特公司);Multiskan Go酶标仪(美国Thermo Scientific公司);SHIMADZU LC-16高效液相色谱仪(日本岛津公司);Agilent 1100 Platisil DAD C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)(美国安捷伦科技公司)。

Ezup柱式真菌基因组DNA抽提试剂盒[生工生物工程(上海)有限公司]。欧前胡素(批号110826-201214)、异欧前胡素(批号PS0071-0020)购于中国食品药品检定研究院;色谱纯甲醇、乙腈(赛默飞世尔科技有限公司)。其他试剂为分析纯。

供试培养基有PDA培养基、PDB培养基;阿须贝培养基、溶解无机磷培养基、蒙金娜有机磷培养基、解钾培养基^[8]。

2 方法

2.1 根际真菌的分离纯化

采用稀释平板法对根际土壤真菌进行分离纯化^[9],准确称取10.0 g过孔径约2 mm筛后的土壤,加入装有90 mL无菌水的锥形瓶中,于28℃,150 r·min⁻¹条件下充分振荡30 min使其混匀后静置,将上清液梯度稀释后涂布于PDA培养基上,于28℃倒置培养3 d根据菌落的形状、颜色、边缘、高度、透

明度、干湿等特征,选取单个菌落,以“来源+数字”的格式命名。

2.2 促生真菌筛选

固氮、溶磷、解钾真菌的筛选:将真菌接种于固氮、无机磷、解钾培养基上,通过菌株在选择培养基上的生长情况和有无透明圈来判断菌株有无固氮、溶磷、解钾活性^[8]。

产铁载体真菌的筛选:采用铬天青比色法,用酶标仪在 630 nm 处测定吸光度,计算铁载体含量, $S_u = (A_r - A) / A_r \times 100\%$ (S_u 为铁载体含量; A_r 为对照反应后的吸光度; A 为菌液反应后的吸光度)^[10]。

产吲哚乙酸 (IAA) 真菌的筛选:采用 Salkowski 比色法,用酶标仪在 530 nm 处测定吸光度,计算各个菌株 IAA 产量 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)^[11]。

2.3 促生真菌鉴定

记录所筛促生真菌在培养基上的菌落、菌丝及培养基颜色,并进行显微观察菌丝及孢子类型^[12]。参照刘晔等^[13]的方法,使用真菌基因组提取试剂盒提取真菌 DNA,并用真菌 rDNA 通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增 (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAAC-CTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。将扩增后 PCR 产物送北京擎科生物科技股份有限公司测序,并将结果与 GenBank 数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) 中的已知序列进行同源性比对分析。结合形态学和分子生物学鉴定结果对促生菌株进行鉴定。

2.4 黑曲霉 ZJ-17 的促生效果

将 ZJ-17 真菌接种于 PDB 培养基中,28 ℃、120 r·min⁻¹ 培养 10 d,抽滤,收集菌丝体,用无菌滤纸吸干表面水分,置于研钵中研磨成匀浆,称取 2.0 g 匀浆于试管中加入 10.0 mL 无菌水,按此比例于涡旋仪上混匀备用^[12]。于 10 月播期在四川农业大学成都校区青浦园内进行白芷播种育苗,次年 3 月选择长势一致的白芷幼苗 (每株白芷幼苗保持在相似质量下)。流水冲洗后,将白芷根部浸泡于 75% 乙醇中 5 min,迅速用无菌水冲洗掉残余乙醇,重复 2 次后,移栽入盆。

设置共 4 组:遂宁土壤+无菌水;崇州土壤+无菌水;遂宁土壤+ZJ-17;崇州土壤+ZJ-17。每组 6 个重复,每个重复 5 株。4—6 月在白芷根部 3.0 cm 处浇灌菌液,每株 100 mL,每月浇菌 1 次,共 3 次,对照组浇等量无菌水。在 7 月下旬白芷采收期进行采收,统

计各组白芷株高、根长、根粗、地上鲜重和根鲜重,并以根鲜重衡量各组产量,计算增产率,参考 2020 年版《中国药典》测定欧前胡素和异欧前胡素含量^[14]。

2.5 数据分析

采用 Excel 2019、SPSS 20.0 和 GraphPad Prism 8.3.0 进行数据处理与分析。

3 结果与分析

3.1 白芷根际真菌分离

从 2 份白芷根际土壤中共分离纯化真菌 48 株,分别命名为 ZD-1~ZD-31, ZJ-1~ZJ-17 (见中国知网本文增强出版附加材料)。

3.2 川白芷根际促生真菌筛选

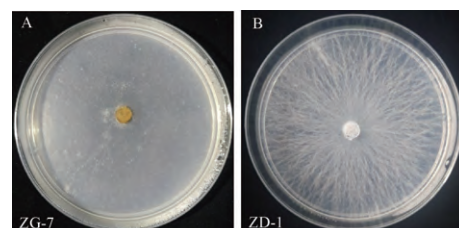
3.2.1 固氮活性菌株筛选 将 48 株真菌菌饼接种在固氮培养基上,3 d 后转接,经 3 次转接后,有 21 株真菌仍能生长,具有固氮能力 (表 1);其中有 6 株菌株在固氮培养基上长势较好,固氮能力较强 (图 1)。

表 1 白芷根际细菌和真菌菌株固氮活性筛选

Table 1 Screening of nitrogen-fixing activities of rhizosphere strains of *Angelica dahurica* var. *formosana*

No.	固氮能力	No.	固氮能力	No.	固氮能力
ZD-1	++	ZD-13	++	ZG-4	+
ZD-2	+	ZD-27	+	ZG-7	+
ZD-4	++	ZD-28	+	ZJ-2	+
ZD-5	+	ZE-3	+	ZJ-4	+
ZD-10	+	ZF-1	++	ZJ-14	+
ZD-11	++	ZG-2	+	ZJ-15	+
ZD-12	++	ZG-3	+	ZJ-17	+

注: +, 菌株能正常生长,具有固氮能力; ++, 菌株长势较好,固氮能力较强。



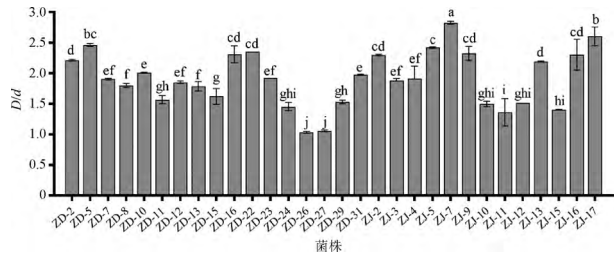
A. 长势一般; B. 长势良好。

图 1 白芷根际真菌菌株固氮效果

Fig. 1 Nitrogen fixation effect of rhizosphere fungi of *Angelica dahurica* var. *formosana*

3.2.2 溶无机磷活性菌株筛选 将 48 株真菌菌饼分别接种在无机磷培养基上培养 3 d,以透明圈直径 (D)/菌落直径 (d) 的值判断菌株溶磷能力。结果发现,30 株真菌在无机磷培养基上产生透明圈,具

有溶无机磷活性($D/d=1.03\sim 2.83$),其中,菌株 ZJ-7 溶解无机磷活性最强,其次为 ZG-1、ZJ-17、ZG-7 (图 2、图 3A)。



不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ (图 4、5、7、10 同)。

图 2 白芷根际真菌溶解无机磷活性 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Inorganic phosphorus-solubilizing activities of rhizosphere fungi of *Angelica dahurica* var. *formosana* ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

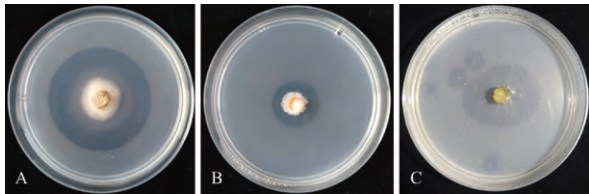


图 3 白芷根际真菌 ZJ-17 溶无机磷 (A)、溶有机磷 (B) 和解钾 (C) 效果

Fig. 3 Inorganic phosphorus (A), organic phosphorus (B), and potassium (C) solubilization effects of rhizosphere strain ZJ-17 of *Angelica dahurica* var. *formosana*

3.2.3 溶有机磷活性菌株筛选 将 48 株真菌菌饼分别接种在有机磷培养基上培养 3 d,以 D/d 的值判断菌株溶磷能力。结果发现,有 3 株真菌可在有机磷培养基上产生透明圈 (图 4A),具有溶有机磷活性($D/d=1.49\sim 1.82$),其中,菌株 ZJ-17 溶解有机磷活性最强 (图 3B)。

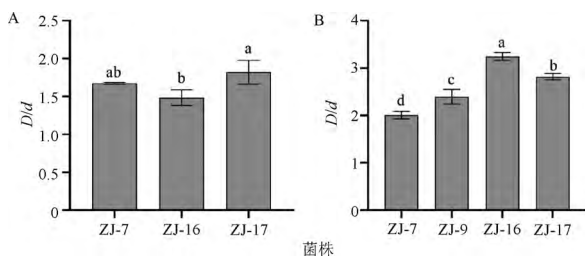


图 4 白芷根际真菌溶解有机磷 (A) 和钾 (B) 活性 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Organic phosphorus (A) and potassium (B)-solubilizing activities of rhizosphere fungi of *Angelica dahurica* var. *formosana* ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.2.4 溶钾活性菌株筛选 将 48 株真菌菌饼接种在解钾培养基上培养 3 d,以 D/d 的值判断菌株解钾能力。结果发现,大部分真菌均可在溶钾培养基上生长,但仅有 4 株真菌可产生透明圈 ($D/d=2.01\sim 3.25$),以 ZJ-16 溶钾活性最强,其次为 ZJ-17 (图 3C、4B)。

3.2.5 产铁载体菌株筛选 利用铬天青比色法初步筛选出能够产生铁载体的真菌,根据溶液变黄程度判断产铁载体能力,颜色越黄表示菌株产铁载体能力越强。48 株真菌中有 17 株真菌菌液变为黄色,具有较强的产铁载体能力 (图 5),经测定,17 株真菌产铁载体质量分数为 23.89%~58.10%,以 ZJ-2 的产铁载体能力最强 (图 6)。

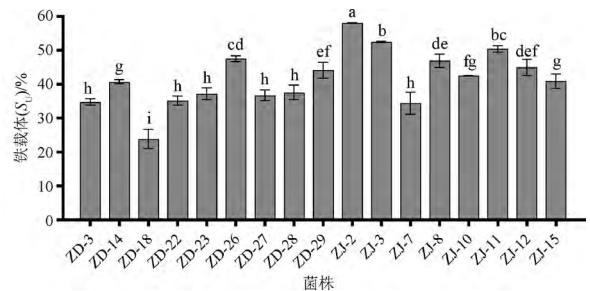
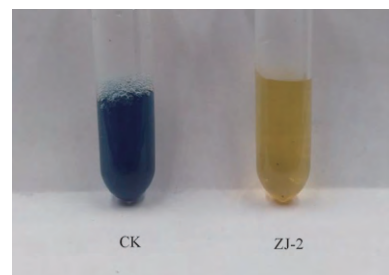


图 5 白芷根际真菌产铁载体能力 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Iron-producing carrier capacity of rhizosphere fungi of *Angelica dahurica* var. *formosana* ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



CK. 对照组 (图 8、10 同)。

图 6 白芷部分根际菌株产铁载体显色反应

Fig. 6 Color reaction of iron-producing carrier produced by rhizosphere strains of *Angelica dahurica* var. *formosana*

3.2.6 产 IAA 菌株筛选 利用 Salkowski's 比色液显色反应判断所筛菌株是否产生 IAA。以未接种培养液为阴性对照,以 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ IAA 溶液为阳性对照,根据反应后菌液颜色变粉红色程度进行判断。与 Salkowski's 比色液反应后 48 株真菌中仅有 4 株菌液变为淡粉色,产 IAA 能力较弱 (图 7、8)。使用酶标仪在 530 nm 处测定并计算细菌的 IAA 产量,结果表明,

4 株真菌的 IAA 分泌量仅为 1.35~2.94 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

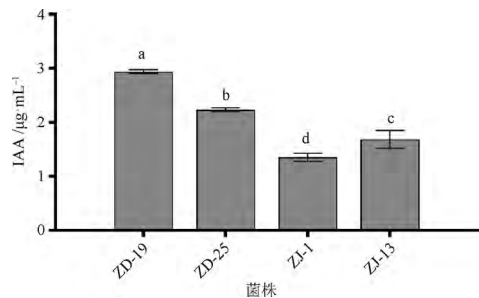


图 7 白芷根际真菌产 IAA 定量测定 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Fig. 7 Quantitative determination of IAA production by rhizosphere fungi of *Angelica dahurica* var. *formosana* ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

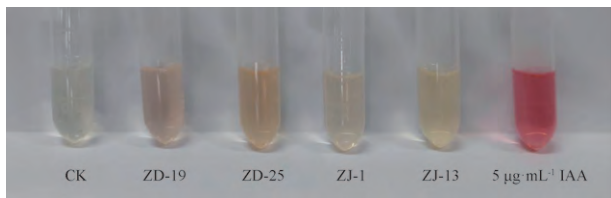


图 8 测定部分白芷根际真菌产 IAA 活性的显色反应
Fig. 8 Color reaction of IAA production activities of some rhizosphere fungi of *Angelica dahurica* var. *formosana*

3.3 川白芷根际促生真菌鉴定

根据固氮、溶磷、解钾、产铁载体和产 IAA 5 种促生特性筛选的结果,去除无促生潜力或促生潜力较弱的菌株,对剩下的 37 株真菌进行形态学和分子生物学鉴定。其中,选择综合促生潜力较强的真菌 ZJ-17 作为后续盆栽试验研究材料。

观察并记录了 37 株真菌的菌落颜色、菌丝类型、培养基颜色变化,并制片观察显微镜下真菌的菌丝隔膜、孢子类型(表 2)。其中,菌株 ZJ-17 在 PDA 培养基上蔓延迅速,初为白色绒毛,后变成黑色厚绒状,背面初为白色,后略带黄色,培养基无颜色变化;显微观察发现,ZJ-17 的菌丝有隔,分生孢子梗长短不一,不分枝,透明无色,顶囊头状,近球形,表面呈辐射状长满单列小瓶梗;瓶梗着生分生孢子;分生孢子串生,头球状,褐黑色(图 9)。

将 37 株真菌依次进行 DNA 提取、PCR 扩增和测序,测序后在 GenBank 数据库中进行比对分析,所筛大部分真菌比对结果同源性均大于 99%,可确定为同种;仅少数促生真菌同源性为 95%~99%,可确定为同属^[1]。在遂宁土壤中共获得 23 株白芷根

5176

表 2 白芷根际促生真菌的形态
Table 2 Morphological characteristics of rhizosphere fungi of *Angelica dahurica* var. *formosana*

菌株	菌落颜色	菌丝	培养基颜色	隔膜菌丝	孢子
ZD-1	白	白毛	无	无隔	无
ZD-2	紫白	絮状	无	有隔	分生孢子
ZD-3	绿	粉状	无	有隔	分生孢子
ZD-4	白	絮状	无	无隔	无
ZD-5	黄白	放射型絮状	粉	有隔	分生孢子
ZD-7	黄白	毛状	无	有隔	孢囊孢子
ZD-8	纯白	絮状	无	有隔	分生孢子
ZD-10	浅棕	放射型絮状	无	有隔	孢囊孢子
ZD-11	红棕	放射型絮状	红棕	无隔	厚垣孢子
ZD-12	黄棕	放射型絮状	无	有隔	分生孢子
ZD-13	黑	絮状	无	有隔	分生孢子
ZD-14	黄棕	絮状	无	有隔	分生孢子
ZD-15	黄白	毛状	无	无隔	分生孢子
ZD-16	黄白	絮状	无	有隔	厚垣孢子
ZD-18	黄棕	絮状	粉	无隔	分生孢子
ZD-22	棕黄	粉状	无	有隔	分生孢子
ZD-23	灰白	粉状	无	有隔	分生孢子
ZD-24	白	放射絮状	无	有隔	孢囊孢子
ZD-26	白	絮状	无	有隔	孢囊孢子
ZD-27	白	絮状	无	有隔	分生孢子
ZD-28	紫白	絮状	无	无隔	分生孢子
ZD-29	粉白	絮状	无	有隔	分生孢子
ZD-31	黄棕	放射絮状	无	有隔	分生孢子
ZJ-2	黄白	絮状	浅粉	无隔	分生孢子
ZJ-3	黄白	絮状	无	有隔	分生孢子
ZJ-4	黑	粉状	无	有隔	分生孢子
ZJ-5	白	絮状	无	有隔	分生孢子
ZJ-7	黑	毛状	浅粉	有隔	分生孢子
ZJ-8	浅绿	絮状	无	有隔	分生孢子
ZJ-9	黄绿	絮状	无	有隔	分生孢子
ZJ-10	白	絮状	无	有隔	分生孢子
ZJ-11	白	絮状	无	有隔	分生孢子
ZJ-12	白	絮状	无	有隔	分生孢子
ZJ-13	黄白	絮状	无	有隔	分生孢子
ZJ-15	白	毛状	无	有隔	分生孢子
ZJ-16	黑	毛状	无	有隔	分生孢子
ZJ-17	黑	毛状	无	有隔	分生孢子

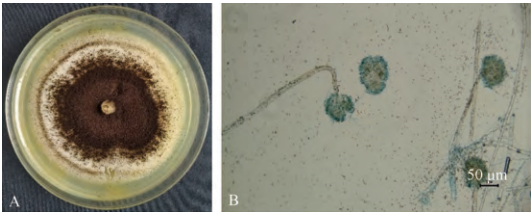


图 9 白芷根际真菌 ZJ-17 菌落(A)及显微镜下形态(B)
Fig. 9 Colony (A) and microscopic morphology (B) of rhizosphere fungus ZJ-17 of *Angelica dahurica* var. *formosana*

际促生真菌,其中有 8 株来源于镰孢菌属 *Fusarium*, 约占 34.78%,3 株来源于木霉属 *Trichoderma*,1 株来源于曲霉属 *Aspergillus*,2 株来源于烟管菌属 *Bjerkandera*,2 株来源于春孔菌属 *Earliella*,2 株来源于

赤壳菌 *Nectriaceae*,1 株来源于被孢霉属 *Mortierella*,1 株来源于平革菌属 *Phanerochaete*,1 株来源于柱孢霉属 *Cylindrocarpon*,1 株来源于粘帚霉属 *Clonostachys*,1 株来源于亚隔孢壳属 *Didymella*(表 3)。

表 3 真菌的 ITS rDNA 序列同源性分析

Table 3 Similarity analysis of partial ITS rDNA sequences of fungus strains

菌株	对比信息(登陆号)	相似性/%	系统类别
ZD-1	<i>Bjerkandera adusta</i> strain ZJLD 001 (MN856332.1)	100.00	<i>Bjerkandera</i>
ZD-2	<i>Fusarium oxysporum</i> strain CP23 (MH707084.1)	99.82	<i>Fusarium</i>
ZD-3	<i>Trichoderma koningiopsis</i> strain CEN758 (KC576726.1)	98.51	<i>Trichoderma</i>
ZD-4	<i>Bjerkandera adusta</i> strain ZJLD 001 (MK829590.1)	99.68	<i>Bjerkandera</i>
ZD-5	<i>Fusarium solani</i> strain KFS (KU951245.1)	95.07	<i>Fusarium</i>
ZD-7	<i>Mortierella alpina</i> isolate LiJF2 (MK014152.1)	99.52	<i>Mortierella</i>
ZD-8	<i>Phanerochaete</i> sp. strain WZ-69 (MN856233.1)	98.90	<i>Phanerochaete</i>
ZD-10	<i>Earliella scabrosa</i> strain F-102 (MF077247.1)	100.00	<i>Earliella</i>
ZD-11	<i>Cylindrocarpon olidum</i> strain F277834 (KC427019.1)	99.31	<i>Cylindrocarpon</i>
ZD-12	<i>Nectriaceae</i> sp. isolate MI286 (MW269011.1)	99.48	<i>Nectriaceae</i>
ZD-13	<i>Aspergillus niger</i> strain 7M1 (MT620753.1)	100.00	<i>Aspergillus</i>
ZD-14	<i>Fusarium verticillioides</i> isolate FM13 (MK790049.1)	97.79	<i>Fusarium</i>
ZD-15	<i>Clonostachys epichloe</i> strain 5-F30 (MW081370.1)	98.96	<i>Clonostachys</i>
ZD-16	<i>Didymella bellidis</i> isolate YS24 (MN443603.1)	99.63	<i>Didymella</i>
ZD-18	<i>Trichoderma harzianum</i> strain TH6 (KC403943.1)	97.52	<i>Trichoderma</i>
ZD-22	<i>Fusarium oxysporum</i> strain F1 (MN443603.1)	99.80	<i>Fusarium</i>
ZD-23	<i>Fusarium oxysporum</i> strain WZ-176 (MN856310.1)	100.00	<i>Fusarium</i>
ZD-24	<i>Earliella scabrosa</i> strain F-102 (MF077247.1)	100.00	<i>Earliella</i>
ZD-26	<i>Fusarium oxysporum</i> Fo5176 (CP053261.1)	100.00	<i>Fusarium</i>
ZD-27	<i>Fusarium oxysporum</i> strain WZ-94 (MN856252.1)	99.45	<i>Fusarium</i>
ZD-28	<i>Trichoderma harzianum</i> strain TH6 (KC403943.1)	97.28	<i>Trichoderma</i>
ZD-29	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate NDJ2 (MT323123.1)	100.00	<i>Fusarium</i>
ZD-31	<i>Nectriaceae</i> sp. isolate MI286 (MW269011.1)	99.82	<i>Nectriaceae</i>
ZJ-2	<i>Fusarium proliferatum</i> isolate A2S1-D96 (KJ767073.1)	99.82	<i>Fusarium</i>
ZJ-3	<i>Trichoderma hamatum</i> isolate T29 (LN846704.1)	99.83	<i>Trichoderma</i>
ZJ-4	<i>Aspergillus niger</i> strain 7M1 (MT620753.1)	100.00	<i>Aspergillus</i>
ZJ-5	<i>Trichoderma hamatum</i> strain THM (LN713971.1)	99.33	<i>Trichoderma</i>
ZJ-7	<i>Aspergillus niger</i> strain 7M1 (MT620753.1)	100.00	<i>Aspergillus</i>
ZJ-8	<i>Trichoderma hamatum</i> isolate T29 (LN846704.1)	99.66	<i>Trichoderma</i>
ZJ-9	<i>Talaromyces aculeatus</i> strain E3F (KY425714.1)	99.66	<i>Talaromyces</i>
ZJ-10	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate F403 (MG515306.1)	98.60	<i>Fusarium</i>
ZJ-11	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate F403 (MG515306.1)	99.13	<i>Fusarium</i>
ZJ-12	<i>Fusarium oxysporum</i> strain LZ51 (MN533762.1)	100.00	<i>Fusarium</i>
ZJ-13	<i>Fusarium fujikuroi</i> strain P-DZ-3-2-2 (KT192276.1)	99.47	<i>Fusarium</i>
ZJ-15	<i>Fusarium proliferatum</i> strain EB0732Z6 (MT372093.1)	99.64	<i>Fusarium</i>
ZJ-16	<i>Aspergillus niger</i> strain DZ-4-3-1 (KT192262.1)	99.67	<i>Aspergillus</i>
ZJ-17	<i>Aspergillus niger</i> isolate BBRP (MT123512.1)	100.00	<i>Aspergillus</i>

在崇州土壤中共获得 14 株白芷根际促生真菌,其中有 6 株来源于镰孢菌属 *Fusarium* 约占 42.86%,4 株来源于曲霉属 *Aspergillus*,3 株来源于木霉属 *Trichoderma*,1 株来源于踝节菌属 *Talaromyces*。其中,菌株 ZJ-17 与黑曲霉 *A. niger* 菌株同源相似性最高,达 100%,

结合菌落及显微形态特征,鉴定 ZJ-17 菌株为黑曲霉。

3.4 黑曲霉 ZJ-17 对白芷生长及有效成分含量的影响

盆栽试验结果表明,在不施肥的室外条件下,黑曲霉菌株 ZJ-17 可显著促进种植在 2 种土壤中白芷

的生长。接种菌株 ZJ-17 后,遂宁土壤白芷的株高、根粗、地上鲜重和根鲜重均显著增长,增产率达

73.59%;崇州土壤白芷的根长和根鲜重均显著增加,增产率达 37.84% (图 10)。

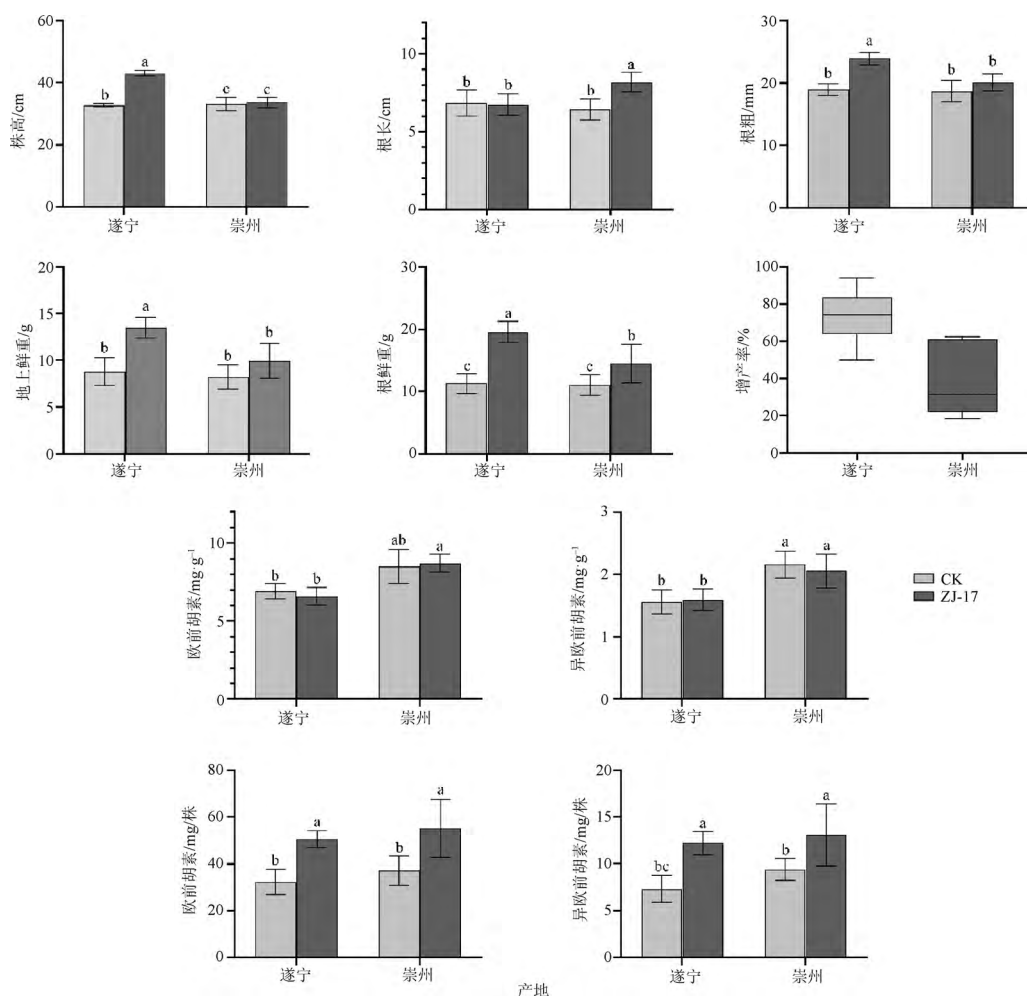


图 10 黑曲霉 ZJ-17 对白芷的促生效果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 10 Growth-promoting effect of *Aspergillus niger* ZJ-17 on *Angelica dahurica* var. *formosana* ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, $P<0.05$)

接种 ZJ-17 后,遂宁土壤白芷的欧前胡素和异欧前胡素含量无显著差异,但其单株总欧前胡素和异欧前胡素积累量显著增加,分别达 50.50、12.20 mg/株;同样,接种 ZJ-17 后崇州土壤白芷的欧前胡素和异欧前胡素含量无显著差异,但其单株总欧前胡素和异欧前胡素积累量显著增加,分别达 55.28、13.08 mg/株。这些结果表明,在室外不施肥的情况下,接种 ZJ-17 可显著促进不同土壤中白芷的生长及有效成分的积累,最高可增产 73.59%。

4 结果与讨论

本研究对白芷植株根际真菌进行促生功能研究,在 48 株真菌中,有 21 株真菌具有固氮活性,30

株真菌具有溶无机磷活性,3 株真菌具有溶有机磷活性,4 株真菌具有溶钾活性,17 株真菌具有产铁载体活性,4 株真菌可产 IAA 但活性较弱。结合菌株固氮、溶磷、溶钾、产铁载体和产 IAA 能力,共筛选获得促生真菌 37 株。不同的土壤环境及植物品种的根际促生真菌种类也不同,车欣宇^[15]通过分离鉴定发现丹参根际生防真菌以曲霉属 *Aspergillus* 真菌为主。孟玉^[16]从诸葛菜根际分离的溶磷真菌多以青霉属 *Penicillium* 真菌为主。李含放^[17]发现种植于黄河三角洲盐渍土壤中的小麦在中高盐胁迫中相对丰度最高的是白粉菌属 *Blumeria*,低盐胁迫中相对丰度最高的是被孢霉属 *Mortierella*。本研究在中

遂宁土壤中共分离到来自于 11 个不同属的促生真菌,在崇州土壤中分离到 4 种不同属的促生真菌,表明就可培养真菌而言,遂宁土壤中促生真菌种类可能比崇州土壤促生真菌更为丰富多样。同时,根际微生物组与中药道地性的生态环境成因密切相关^[18],这可能意味着道地产区土壤根际促生真菌群落结构及功能比非道地产区土壤根际群落结构及功能更加复杂多样。

本实验所筛促生真菌多为镰刀菌属,其次为木霉属和曲霉属。镰刀菌属、木霉属和曲霉属真菌都可以产生多种水解酶类,如果胶酶、纤维素酶等。镰刀菌可降解多种环境污染物,具有生物降解和环境保护的重要意义^[19],曲霉属和木霉属真菌则常用作饲料腐熟剂和生防菌剂^[20-21]。但同时,镰刀菌可通过破坏植物细胞结构和分泌毒素 2 种方式造成植物病害,具有广泛的致病性^[22],木霉属真菌作为一种极具应用价值的促生及生防菌株,常用于抑制镰刀菌引起的土传病害^[22-23]。木霉属真菌通过重寄生、竞争、协同拮抗、诱导植物抗性、分泌溶菌及抗性物质等多种方式促进植物生长并提高抗病性^[24],已广泛应用于滇牡丹^[25]、樟子松^[26]、石斛^[27]、西洋参^[28]、三七^[29]、白术^[30]和黄芪^[31]等多种药用植物中。这表明两类真菌间也许存在着某种拮抗关系,使得这些真菌在促进白芷吸收养分的同时保持根际微生物群的稳定与健康。因此,川白芷根际真菌在作为促生菌剂的开发利用方面具有广泛的应用前景,但同时部分菌株仍需检验其对各植物的致病性及原有微生物群的影响以确保施用的安全性。

所筛促生综合潜力最强的真菌 ZJ-17 为黑曲霉 *A. niger*。ZJ-17 具有较强的固氮、溶磷、溶钾活性,其溶无机磷能力达 2.60 (D/d),溶有机磷能力达 1.82 (D/d),溶钾能力达 2.82 (D/d)。通过盆栽试验进一步探究白芷根际促生真菌对白芷的促生效果。结果表明,在室外不施肥情况下,接种 ZJ-17 对种植于道地和非道地产区土壤的白芷的生长、产量和有效成分积累均有显著的促进作用,增产率分别为 73.59%、37.84%,尤以作用在道地产区土壤中的效果最好,具有深入研究川白芷和有益微生物互作机制的价值。黑曲霉是子囊菌门曲霉属真菌常见种,已有研究表明,黑曲霉无毒性,且生长较快,可用于生产酶制剂(蛋白酶、淀粉酶、果胶酶),有机酸(如柠檬酸、葡萄糖酸等),糖

化饲料,是广泛用于食品发酵工业、酶制剂、生物饲料的益生菌^[32]。作为促生菌,黑曲霉能在一定程度上将难溶性氮磷钾溶解转化为可被植物吸收利用的营养物质,增强花生的碳氮代谢活性^[33],促进毛竹的氮磷钾养分吸收利用^[34],促进盐碱土壤小麦生长^[35];同时,黑曲霉常作为肥料腐熟剂和饲料添加剂,可分泌淀粉酶、纤维素酶和果胶酶等多种酶类,快速降解秸秆等有机物料,改善饲料营养及土壤环境^[36]。因此,黑曲霉作为所筛川白芷根际最强的促生真菌,在白芷增产保质、化肥减施上具有极大的应用前景。

5 结论

通过固氮、溶磷和溶钾等特性从道地和非道地白芷根际分离筛选获得 37 株促生真菌,多为镰孢菌属。同时,道地产区白芷根际促生真菌种类较非道地产区更为丰富多样。黑曲霉 ZJ-17 综合促生潜力最强,具有较强的固氮、溶无机磷、溶有机磷、解钾活性。盆栽结果表明,接种 ZJ-17 对种植于道地和非道地产区土壤的白芷的生长、产量和有效成分积累均有显著的促进作用,增产率分别为 73.59%、37.84%。因此,黑曲霉 ZJ-17 一定程度上缓解了不施肥对白芷生长的限制,在白芷增产保质、化肥减施上具有极大的应用前景。

[参考文献]

- [1] 江美彦,周杨,刘仁浪,等. 白芷根际促生菌的筛选及其促生效果研究[J]. 生物技术通报, 2022, 38(8): 167.
- [2] 郑利,邓聪,冯亮,等. 遂宁川白芷产业发展现状与分析[J]. 农村经济与科技, 2020, 31(20): 181.
- [3] 袁旭,张家安,常飞杨,等. 我国肥料施用现状及化肥减量研究进展[J]. 农业与技术, 2022, 42(18): 20.
- [4] FIERER N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome[J]. Nat Rev Microbiol, 2017, 15(10): 579.
- [5] XIA Y, XU Q, LIN Y, et al. Research progress of mechanism of action of plant growth promoting rhizobacteria[J]. Agri Sci Tech, 2014, 15(1): 87.
- [6] 张万通,李超群,于露,等. 植物根际促生菌菌肥在高寒草甸替代化肥效应研究[J]. 草地学报, 2021, 29(7): 1423.
- [7] 杨凡. 白芷高产新品种“川芷 2 号”[J]. 农村百事通, 2014, 2(19): 33.
- [8] 刘长征,姜晓琳,蔡启忠,等. 何首乌根际促生菌的筛选及其对何首乌种子萌发的影响[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(20): 5247.
- [9] 孙卓,王妍,韩忠明,等. 防风根际真菌的分离鉴定及其生防潜力评价[J]. 生物技术通报, 2023, 39(1): 264.

- [10] 姜云, 冉超, 陈长卿, 等. 人参抗病、促生菌的筛选及田间效果评价[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2230.
- [11] 凌宇, 冯启佳, 孙小艳, 等. 耐盐促生菌的筛选及其对狗牙根耐盐性的影响[J]. 草业科学, 2022, 39(11): 2297.
- [12] 卜凡娜. 苍术病原菌鉴定及其内生真菌抑菌活性研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2020.
- [13] 刘晔, 刘晓丹, 张林利, 等. 花生根际多功能高效促生菌的筛选鉴定及其效应研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(10): 125.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [15] 车欣宇. 丹参根际拮抗真菌 RF15 的筛选鉴定及其促生效应研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.
- [16] 孟玉. 六株高效拮抗溶磷真菌对喀斯特植物诸葛菜的促生与抗逆性影响[D]. 贵阳: 贵州民族大学, 2022.
- [17] 李含放. 黄河三角洲滨海盐渍土耐盐解磷真菌的筛选和应用[D]. 郑州: 河南农业大学, 2022.
- [18] 何冬梅, 王海, 陈金龙, 等. 中药微生态与中药道地性[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(2): 290.
- [19] 王世伟, 王卿惠, 李小鹏, 等. 镰刀菌分子鉴定与重要应用的研究进展[J]. 微生物学通报, 2018, 45(4): 907.
- [20] 袁扬, 王胤晨, 韩玉竹, 等. 木霉菌在农业中的应用研究进展[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(3): 10.
- [21] 江北, 吕梦霞, 蒋冬花. 曲霉属真菌活性代谢产物及在农业生产中的应用研究进展[J]. 微生物学杂志, 2019, 39(2): 103.
- [22] 谢安娜, 徐浩飞, 张志林, 等. 致病镰刀菌的研究进展[J]. 湖北工程学院学报, 2020, 40(6): 37.
- [23] 方晶, 翁丽丽, 肖春萍, 等. 外源添加镰刀菌和木霉菌对农田栽参土壤真菌群落的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(6): 114.
- [24] 马明磊, 王秋霞, 马莹莹, 等. 木霉菌作用机制及其在药用植物上的应用研究进展和展望[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(8): 8.
- [25] 顾英杰, 王娟, 杨贵钗, 等. 3 种滇牡丹根际木霉的促生功能及其对幼苗生长的影响[J]. 南方农业学报, 2022, 53(9): 2487.
- [26] 魏金龙, 宋小双, 周琦, 等. 内生木霉对樟子松幼苗生长及抗病能力的影响[J]. 林业科技, 2022, 47(4): 6.
- [27] 黄位年, 曾华兰, 华丽霞, 等. 内生木霉菌与石斛相互作用关系的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(13): 57.
- [28] 李纪顺, 陈凯, 王贻莲, 等. 防治西洋参立枯病木霉菌株的筛选鉴定及其小区防治效果[J]. 山东科学, 2019, 32(5): 62.
- [29] 蒋妮, 白丹宇, 宋利沙, 等. 棘孢木霉 F₂ 菌株对三七灰霉病的生物防治作用[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(20): 94.
- [30] 倪方方, 徐红梅, 宋腾蛟, 等. 生防菌对白术根腐病菌的拮抗作用及盆栽防治效果[J]. 浙江中医药大学学报, 2017, 41(3): 179.
- [31] 滕艳萍, 梁宗锁, 陈蓉. 木霉防治黄芪根腐病初步研究[J]. 西北农业学报, 2006, 15(2): 69.
- [32] 董玉惠, 张丽霞, 韩晓阳, 等. 响应面法优化棕壤茶园专用解磷微生物菌剂制备工艺[J]. 山东农业科学, 2016, 48(3): 56.
- [33] 邹晓霞, 张甜, 王丽丽, 等. 黑曲霉菌肥施用对花生碳氮代谢、产量及籽仁品质的影响[J]. 植物生理学报, 2020, 56(9): 1974.
- [34] 吴高洋, 陈伏生, 万松泽, 等. 毛竹根际新黑曲霉的解磷特性及促生作用[J]. 林业科学研究, 2019, 32(4): 144.
- [35] 范延辉, 王君, 尚帅, 等. 两株根际真菌的耐盐、溶磷、促生效果及其分类鉴定[J]. 土壤通报, 2022, 53(1): 127.
- [36] 韩梦颖, 王雨桐, 高丽, 等. 降解秸秆微生物及秸秆腐熟剂的研究进展[J]. 南方农业学报, 2017, 48(6): 1024.

[责任编辑 吕冬梅]