

doi:10.3969/j.issn.1673-9833.2022.06.009

凡口铅锌矿废弃地植物促生长内生真菌的筛选

郑秋桦, 李富鑫, 刘广源, 庞彦韬, 黎晓漩, 曾松荣

(韶关学院 英东生物与农业学院, 广东 韶关 512005)

摘要: 以粤北凡口铅锌矿废弃地优势植物香蒲 (*Typhaorientalis presl*)、苦楝 (*Melia azedarach*)、苕麻 (*Boehmeria nivea*) 和蓖麻 (*Ricinus communis*) 中分离筛选出的具有抗重金属铅、锌能力的 45 株内生真菌为研究材料, 利用 CAS 检测液显色反应、钼锑抗比色法和 Salkowski 法, 分别筛选出具有促进植物生长的产铁载体菌株 30 株、溶磷菌株 3 株和产吲哚乙酸 (IAA) 菌株 18 株。并选取具有产铁载体、溶磷或产 IAA 能力较强的菌株作为代表菌株进行形态学鉴定和 ITS 序列分析, 鉴定结果显示: WB-21 为曲霉属 (*Aspergillus*)、BM3 为旋孢腔菌属 (*Cochliobolus*)、BM5 为链格孢属 (*Alternaria*)、菌株 XP3.21 为刺盘孢属 (*Colletotrichum*)、ZMP5-3 为篮状菌属 (*Talaromyces*)。

关键词: 内生真菌; 铁载体; 溶磷; IAA; ITS 序列分析

中图分类号: X53; X172

文献标志码: A

文章编号: 1673-9833(2022)06-0055-07

引文格式: 郑秋桦, 李富鑫, 刘广源, 等. 凡口铅锌矿废弃地植物促生长内生真菌的筛选 [J]. 湖南工业大学学报, 2022, 36(6): 55-61.

Screening of Growth Promoting Endophytic Fungi in Abandoned Fankou Lead-Zinc Mine

ZHENG Qiuhua, LI Fuxin, LIU Guangyuan, PANG Yantao, LI Xiaoxuan, ZENG Songrong

(Henry Fok School of Biology and Agriculture, Shaoguan University, Shaoguan Guangdong 512005, China)

Abstract: With 45 endophytic fungi with the ability to resist heavy metal lead and zinc isolated from the dominant plants of *Typhaorientalis presl*, *Melia azedarach*, *Boehmeria nivea* and *Ricinus communis* in the Fankou lead and zinc mine wasteland in northern Guangdong as the research target, 30 iron producing carrier strains, 3 phosphorus solubilizing strains and 18 indoleacetic acid (IAA) producing strains, all with the ability to promote plant growth, are screened by using CAS detection solution color reaction, molybdenum antimony resistance colorimetry and Salkowski method, followed by a selection of the isolates with strong ability of producing iron carrier, dissolving phosphorus or producing indole acetic acid (IAA) as representative isolates for identification of morphological and ITS sequence analysis. The identification results show that WB-21 is under the category of *Aspergillus*, BM3 *Cochliobolus*, BM5 *Alternaria*, XP3.21 *Colletotrichum*, and ZMP5-3 *Talaromyces* respectively.

Keywords: endophytic fungi; iron carrier; solubilizing phosphorus; indole acetic acid (IAA); ITS sequence analysis

收稿日期: 2022-03-15

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (2016A030307047); 广东省韶关市科技计划基金资助项目 (2019sn062); 韶关学院大学生创新创业训练计划省级基金资助项目 (S201910576021)

作者简介: 郑秋桦 (1980-), 男, 广东汕头人, 韶关学院高级实验师, 硕士, 主要研究方向为植物组织培养和应用微生物学, E-mail: 110557778@qq.com

通信作者: 曾松荣 (1964-), 男, 湖南邵阳人, 韶关学院教授, 博士, 主要研究方向为资源与环境微生物学, E-mail: 422909380@qq.com

0 引言

矿业废弃地一般是指矿山开采活动产生的废石和选矿产生的尾矿等大量堆存,没有经过整治而无法使用的土地。这些废石和尾矿等经风化淋滤后将有害的重金属转移到土壤中,造成矿业废弃地土壤酸化、重金属毒性和氮、磷、钾等营养元素缺乏,植物无法生长。这种裸露的矿业废弃地因缺乏植被覆盖,水土流失严重,会成为持久的污染源,对下游及周边地区环境造成影响,导致严重的环境污染问题,并可能通过食物链危及人类健康。矿业废弃地的生态恢复已成为我国当前所面临的紧迫任务之一,其修复的关键是植被恢复,因为植被恢复能够增加地表稳定性,控制重金属和水土流失,还能改善土壤的营养状况。同时,植被恢复后的土壤中的重金属还避开了食物链,不会影响人体健康,因而植被恢复具有良好的环境、生态、社会和经济多方面的综合效益。然而废石堆和尾矿库等矿业废弃地因为严重酸化、重金属毒性和养分缺乏等众多的理化因素,限制了植物在废弃地上定居和生长,植被的自然恢复非常缓慢,只有对其采取积极的人工恢复措施加以干预,才能对土壤的重金属污染进行有效治理^[1]。

已有研究表明,植物内生菌可以通过它们自身的代谢活动促进宿主植物生长,提高植物抗逆性,增强植物重金属耐性^[2-3]。例如,铁载体是由微生物产生的高亲和力低分子量的金属螯合剂,除了螯合Fe外,铁载体还可与Pb、Zn和Cr等重金属离子形成配合物,影响重金属的存在方式,有利于植物根系对Fe等元素的吸收,促进植物生长发育^[4-6]。磷元素在土壤环境中以无机磷和有机磷两种形式为主,而环境中的溶磷微生物可产生特殊物质使土壤的无机磷溶解,从而有利于植物对磷的吸收,促进植物生长。同时,微生物还可以分泌植物生长素吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)等调节植物的生长与发育^[7]。

本研究的前期工作中,已从粤北地区凡口铅锌矿废弃地自然生长的优势植物中分离出内生真菌,并筛选出抗铅、锌重金属离子能力较强的抗性菌株。筛选出重金属抗性较强菌株的目的是为了将这些菌株开发成菌剂施用到被重金属污染的矿业废弃地土壤,有利于促生菌株抵御重金属的毒性,并能在土壤中存活,以及能顺利地进入宿主植物中。本研究拟以这些铅、锌重金属抗性菌株为研究对象,筛选出对植物有促生长作用的能产生铁载体、溶磷和IAA的内生真菌。此项工作的开展可为今后利用植物与其共生的内

生真菌联合修复矿区废弃地重金属污染,促进植物在重金属胁迫的不良环境下生长,加快矿业废弃地植被恢复,提高植被覆盖率及防止水土流失奠定一定的基础,对土壤重金属污染的生态治理有着重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株

采集粤北凡口铅锌矿废弃地的优势植物香蒲(*Typhaorientalis presl*)、苦楝(*Melia azedarach*)、苧麻(*Boehmeria nivea*)和蓖麻(*Ricinus communis*) 4种优势植物,从这些优势植物中分离筛选出具有抗重金属铅、锌能力的植物内生真菌45个菌株,本研究以这些重金属抗性菌株作为植物促生长菌株筛选的实验菌株。

1.1.2 培养基及主要试剂配制方法

1) 无机磷培养基。培养基中各物质的添加量如下: $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.03 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g/L, KNO_3 0.76 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 g/L, NaCl 0.3 g/L, KCl 0.3 g/L, 蔗糖 10 g/L, $Ca_3(PO)_4$ 5.0 g/L。并将培养基的pH值调整为7.5,配置后在115℃温度下灭菌处理30 min。若加入琼脂粉20 g/L,即可作为固体培养基。

2) 无铁查氏培养基。培养基中各物质的添加量如下: KCl 0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, 蔗糖 30 g/L, $NaNO_3$ 2.0 g/L, K_2HPO_4 1.0 g/L, 并于115℃温度下灭菌处理30 min。

3) Czapek培养基。培养基中各物质的添加量如下: KCl 0.5 g/L, $MgSO_4$ 0.5 g/L, $FeSO_4$ 0.01 g/L, 蔗糖 30 g/L, $NaNO_3$ 2.0 g/L, K_2HPO_4 1.0 g/L, 并于115℃下灭菌处理30 min。若加入琼脂粉20 g/L,即可作为固体培养基。

4) PDA (potato dextrose agar) 培养基。培养基中各物质的添加量如下: 马铃薯 200 g/L, 蔗糖 20 g/L, 琼脂粉 15~20 g/L, 并于115℃下灭菌处理30 min。

5) PDB (potato dextrose broth) 培养基。培养基中各物质的添加量如下: 马铃薯 200 g/L, 蔗糖 20 g/L, 并于115℃下灭菌处理30 min。

6) 含氨苄青霉素的LB (luria-bertani) 培养基。培养基中各物质的添加量如下: NaCl 10 g/L、蛋白胨 10 g/L、酵母膏 5 g/L, 并于121℃下灭菌处理20 min。待培养基冷却至55~60℃时,加入适量无菌氨苄青霉素溶液,使培养基中氨苄青霉素的最终质量浓度为100 mg/mL。若在此基础上加入15~20 g/L的琼脂粉,则可配制成固体培养基。

7) CAS (chromeazurol S) 检测液的配制。首先称取 60.5 mg 铬天青 S 并加入到 50 mL 蒸馏水中, 待完全溶解后倒入 10 mL 浓度为 1 mmol/L 的氯化铁和 10 mmol/L 的盐酸, 混合摇匀作为 A 液; 再量取 72.9 mg 十六氨基烷基溴化铵加入到 40 mL 蒸馏水中, 并在 45 °C 水浴锅中加热溶解至澄清透亮, 作为 B 液, 将 A 液和 B 液混合均匀即可得到 CAS 检测液。

8) 钼锑抗比色法试剂的配制。①钼锑储备液的配置: 量取 200 mL 蒸馏水倒入烧杯中, 将烧杯放置在冷水中, 然后沿着烧杯内壁边搅拌边缓慢加入 76.5 mL 浓硫酸, 冷却待用。称取 5 g 钼酸铵溶于 150 mL 蒸馏水中, 将冷却后的硫酸溶液缓慢倒入与钼酸铵溶液混匀, 再用移液管吸取 50 mL 质量浓度为 5 g/L 的酒石酸锑钾溶液与硫酸钼酸铵混合液混匀, 最后定容至 500 mL。②钼锑抗混合显色剂的配置: 称取 750 mg 左旋抗坏血酸于烧杯中, 并加入 50 mL 上述已经配制好的钼锑储备液, 搅拌均匀后保存在棕色瓶中, 此溶液的有效期为 1 d。

9) Salkowski 试剂的配制。称取 1.2 g 氯化铁置于烧杯中, 然后加入 30 mL 蒸馏水搅拌溶解, 之后边搅拌边沿着烧杯内壁缓缓倒入 42.97 mL 浓硫酸, 冷却定容至 100 mL。

1.1.3 药品与试剂

UNIQ-10 柱式真菌基因组抽提试剂盒、PCR (polymerase chain reaction) 扩增试剂盒和 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒, 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; pEASY-Blunt Cloning Kit 试剂盒和 Trans1-T1 感受态细胞, 购自北京全式金生物技术股份有限公司; L-色氨酸和吡啶乙酸, 购自上海展云化工有限公司; 磷元素标准溶液, 购自钢研纳克检测技术股份有限公司。硫酸锰、硫酸镁、硝酸钾、硫酸亚铁、硝酸铅、磷酸钙等均为国产试剂, 分析纯。

1.2 方法

1.2.1 产铁载体菌株的筛选及活力测定^[8-9]

1) 产铁载体菌株的初筛选。往每支试管中添加无铁查氏液体培养基 5 mL, 并用 115 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。冷却后, 把供试的内生真菌菌株接种至培养基中, 以空白培养基为对照, 一同放置在 28 °C 恒温培养箱中培养 7 d, 然后吸取 150 μL 培养液和等体积的 CAS 检测液于 96 孔板中混匀, 静置 1 min, 观察结果。以空白培养基和等体积的 CAS 检测液混匀后为阴性对照, 结果显示为蓝色; 以饱和 EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) 溶液和等体积 CAS 检测液混匀后为阳性对照, 结果显示为红色。若实验组显示为蓝色, 则说明培养液不含铁载体, 表

明该菌株不产生铁载体; 若实验组显示为红色或紫色, 则说明培养液中含有铁载体, 表明该菌株产生铁载体。

2) 铁载体活力测定。把初筛获得的产铁载体阳性菌株转接到无铁查氏液体培养基中, 在 28 °C、160 r/min 摇瓶培养 7 d, 然后滤纸过滤, 保留滤液。量取该过滤液 5 mL, 与等体积 CAS 检测液混匀, 室内静置 1 h, 然后用蒸馏水调零, 以分光光度计测定其 OD₆₈₀ 值, 记为 “A_s”; 用相同方法测定对照样品的 OD₆₈₀ 值, 记为 “A_r”, 对照样品为空白培养基与等体积 CAS 检测液混合的混合液。S_U (Siderophoreunit) 表示铁载体活力大小, 且 $S_U = [(A_r - A_s) / A_r] \times 100\%$ 。若 $A_s / A_r < 0.5$, 则表明菌株有较好的产铁载体功能。

3) 铁载体化学结构检测。将 5 mL 过滤液与等体积的质量分数为 2% 的氯化铁溶液混匀, 若在 420~450 nm 处有吸收值, 则表明培养液中含有异羟肟酸型铁载体。将 5 mL 过滤液与等体积的质量分数为 2% 的氯化铁溶液混匀, 若在 495 nm 处有吸收值, 则表明培养液中含有儿茶酚型铁载体。量取 3 mL 的过滤液, 并添加 1 mL 浓度为 250 mmol/L 的硫酸铜溶液和 2 mL pH 值为 4 的醋酸钠缓冲液混匀, 若在 190~280 nm 处有吸收值, 则表明溶液中含有羧酸型铁载体。

1.2.2 溶磷菌株的筛选及定量测定

1) 溶磷菌株的初筛。将菌株分别接种到无机磷平板上, 于 28 °C 下恒温培养 7 d, 然后用游标卡尺测量菌落直径 (*d*) 及溶磷圈直径 (*D*)。若 $D/d > 1$, 则表明该菌株有较好的溶磷效果^[10]。

2) 有效磷标准曲线的制作。用质量浓度为 100 μg/mL 的磷标准液, 分别配制出 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 μg/mL 的梯度溶液, 用钼锑抗比色法测出其 OD₆₆₀ 值, 绘制有效磷标准曲线。

3) 溶磷菌株的定量测定^[11]。将初筛获得的菌株接种到无机磷液体培养基中, 以空白培养基作为对照。将接种的摇瓶在 28 °C、160 r/min 摇床培养 9 d。每天用 pH 计测定培养液的 pH 值, 并用钼锑抗比色法测定培养液的 OD₆₆₀ 值, 连续测定 9 d。最后根据有效磷标准曲线求出有效磷浓度。

1.2.3 产吡啶乙酸 (IAA) 菌株的筛选及含量测定

1) 产 IAA 菌株的筛选。在已灭菌的盛有 5 mL Czapek 培养基的试管中, 添加 100 μL 浓度为 50 mmol/L 过滤除菌的 L-色氨酸溶液, 轻微摇匀, 使培养基中 L-色氨酸的质量浓度为 0.5 mg/mL, 并接种菌株。以空白培养基为对照组, 在 28 °C 下恒温培养 7 d, 然后吸取 150 μL Salkowski 液和等量的培养液

加入 96 孔板中混匀, 避光 20 min 后观察并记录最终的颜色。空白培养基为阴性对照, 并以质量浓度为 20 mg/L 的吲哚乙酸为阳性对照。溶液颜色变化越深, 表明 IAA 浓度越高^[12-13]。

2) IAA 的标准曲线制作。配制质量浓度依次为 0, 0.1, 0.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 mg/L 的吲哚乙酸溶液, 加入等体积 Salkowski 溶液混匀, 避光 30 min。然后用分光光度计以蒸馏水加等量 Salkowski 液调零, 测定混合液的 OD₅₃₀ 值, 绘制 IAA 标准曲线。

3) IAA 的定量测定。把初筛得到的菌株接种到 Czapek 培养基中, 并且以空白培养基为对照组, 在 28 °C、160 r/min 摇床培养 7 d。滤纸过滤除菌丝体, 保留上清液。吸取 3 mL 上清液和等量 Salkowski 液混匀, 避光 30 min 后用分光光度计测定其 OD₅₃₀ 值。根据 IAA 标准曲线求出培养液中 IAA 浓度^[12-13]。

1.2.4 菌株的形态学鉴定

选取产铁载体、溶磷和产 IAA 能力较强的菌株作为代表性菌株, 采用三点接法接种在 Czapek 平板, 28 °C 下恒温培养 57 d。依据光学显微镜所观察到的菌株个体形态特征并结合其菌落形态特征, 参照魏景超的《真菌鉴定手册》进行初步鉴定。

1.2.5 植物内生菌的 ITS 序列分析

对产铁载体、溶磷和产 IAA 能力较强的菌株做 ITS 序列分析, 以确定其种属关系。

采用 UNIQ-10 柱式真菌基因组抽提试剂盒抽提供试菌株的基因组, 通过 PCR 技术扩增目的基因, 再用 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒, 对 PCR 产物进行回收。回收后, 用 pEASY-Blunt Cloning Kit 试剂盒构建重组载体, 并转化至 Tans1-T1 感受态细胞中。转化结束后进行抗氨苄青霉素筛选。把抗性细菌进行菌液 PCR, 若存在目的基因, 则把菌液制成冻存管送至生工生物工程(上海)股份有限公司广州分公司做 ITS 序列测定。

用 BioEdit 剪切获取 ITS 序列, 输入 NCBI (National Coalition Building Institute) 数据库中 Blast, 选出相似度较高的基因序列。用 MEGA7.0 进行多序列比对, 采用邻接法获得目的菌株的系统发育树, 进而确定其种属关系。

2 结果与分析

2.1 产铁载体菌株的筛选

2.1.1 初筛结果

在实验组的 45 个植物内生真菌菌株中, 显示红色的说明培养液中含有铁载体, 所得实验结果如图 1 所示, 共筛选得到可以分泌产生铁载体的菌株 32 个。

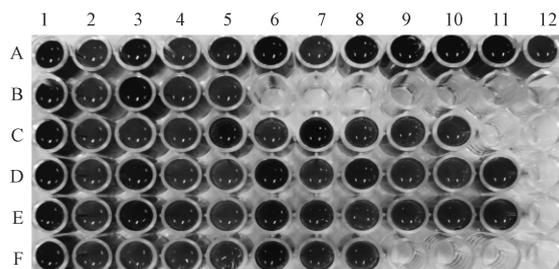


图 1 45 个菌株产铁载体初筛结果

Fig. 1 Preliminary screening results of 45 strains of producing iron carriers



图 1 中, 第一列为阴性对照组, 第二列为阳性对照组, 自 A3 从左到右对应的菌株为 XP3.2、XP3.3、XP3.4、XP3.14、XP3.17、XP3.18、XP3.20、XP4.1、XP4.5、XP4.7; 自 B3 从左到右对应的菌株为 XP4.8、XP4.10、XP6.1; 自 C3 从左到右对应的菌株为 XP2.1、XP2.8、XP2.9、XP3.21、XP4.3、XP4.12、XP4.30、XP5.4; 自 D3 从左到右对应的菌株为 WB-2、WB-3、WB-7、WB-9、WB-12、WB-14、WB-21、WB-22、WB-23; 自 E3 从左到右对应的菌株为 ZMP5-2、ZMP5-3、ZMP7-2、ZMZ5-3、ZMZ5-5、ZMZ5-7、ZMZ6-2、ZMZ6-5、ZMZ7-2; 自 F3 从左到右对应的菌株为 BM1、BM2、BM3、BM4、BM5、BM6。

2.1.2 铁载体活力测定与化学结构分析

对经过初筛得到的 32 个菌株再次进行筛选, 发现菌株 ZMP7-2 和 BM6 为假阳性菌株, 其余 30 个菌株产铁载体活力与铁载体化学结构测定结果见表 1。

表 1 30 个阳性菌株铁载体活力测定及类型鉴定结果
Table 1 Determination results of iron carrier activity with the type identification of 30 positive isolates

菌株编号	$S_0/\%$	A_s/A_t	铁载体类型	菌株编号	$S_0/\%$	A_s/A_t	铁载体类型
阴性对照	100	-	-	XP5.4	97.70	0.020	①
阳性对照	-	-	-	WB-9	97.30	0.030	①②
XP3.2	87.69	0.120	①②	WB-12	99.42	0.010	①②
XP3.3	98.74	0.010	①②	WB-14	83.92	0.160	①②
XP3.4	93.21	0.060	①②	WB-21	99.37	0.010	①②
XP3.17	98.02	0.010	①	WB-22	96.54	0.030	①②
XP3.18	88.14	0.110	待定	WB-23	98.88	0.010	①
XP4.7	96.94	0.030	①②	ZMP5-3	99.73	0.002	①②
XP4.10	95.46	0.040	①②	ZMZ5-7	99.55	0.004	①
XP2.1	98.83	0.010	①②	ZMZ6-2	98.61	0.010	①
XP2.8	96.94	0.030	①	ZMZ6-5	99.24	0.010	①②
XP2.9	13.65	0.860	①②	ZMZ7-2	50.22	0.490	②
XP3.21	94.83	0.050	①	BM1	92.41	0.080	①②
XP4.12	95.77	0.040	①	BM3	93.31	0.070	①②
XP4.30	90.97	0.090	①	BM5	71.02	0.290	①②

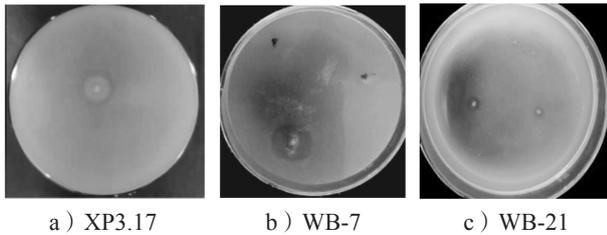
注: ①为异羟肟酸型; ②为儿茶酚型; ③为羧酸型; - 为空白。

由表 1 可知, 根据比较 A_s/A_t 值发现, 除 XP2.9 外, 其余菌株的 $A_s/A_t < 0.5$, 表明有 29 个菌株能产生活性

较好的铁载体分子。同时, 除 XP3.18 菌株外, 其余 29 个菌株所产的铁载体主要类型为异羟肟酸型和儿茶酚型, 或两种铁载体同时兼具型, 这表明植物内生菌可以产生一种或多种不同类型的铁载体。

2.2 溶磷菌株的筛选

经溶磷圈法筛选到 3 个具有较好的溶磷作用的菌株, 分别是菌株 XP3.17、WB-7 和 WB-21, 结果如图 2 所示, 平板中菌落边缘的透明圈即为溶磷圈。



a) XP3.17 b) WB-7 c) WB-21

图 2 菌株 XP3.17、WB-7 和 WB-21 溶磷筛选结果

Fig. 2 Screening results of phosphorus soluble strains XP3.17, WB-7 and WB-21

选取代表性菌株 XP3.17 测定其有效磷浓度。菌株 XP3.17 培养液中有效磷及 pH 值变化曲线见图 3, 可知培养液有效磷最大质量浓度为 72.864 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 最低 pH 值为 3.80。

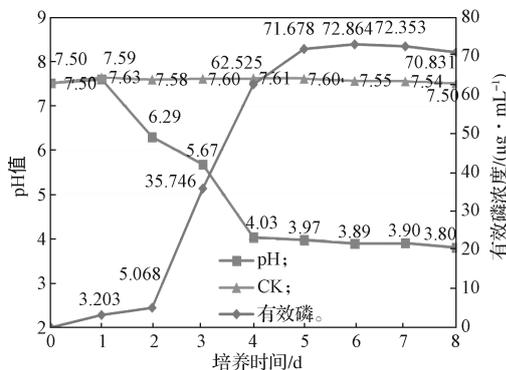


图 3 菌株 XP3.17 溶磷能力测定

Fig. 3 Determination of phosphorus solubility of strain XP3.17

从图 3 可知, 随着培养时间延长, 培养液 pH 值从第 2 d 开始快速下降, 在第 4 d 后趋于平缓, 不再发生剧烈变化, 然而有效磷浓度却随着培养时间延长而增加, 并在第 6 d 达到最大值。这一结果表明, XP3.17 菌株在培养过程中通过代谢产生了某种酸性物质, 引起培养液的 pH 值下降。然而有效磷浓度会随着 pH 值的下降而上升, 表明了引起 pH 值下降的酸性物质可以有效地溶解磷酸钙, 这就表明植物内生菌溶磷能力与其代谢产生的酸性物质存在一定关系。

2.3 产 IAA 菌株的筛选

将培养液与等体积 Salkowski 液混合均匀, 静置 30 min 后的显色结果如图 4 所示, 参照该图第 2 列

的阳性对照, 共筛选到 18 个具有产 IAA 能力的菌株。

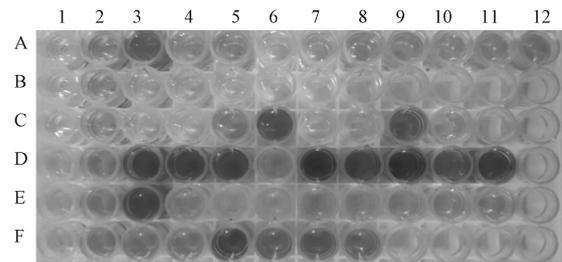


图 4 45 个菌株中产 IAA 菌株的筛选结果

Fig. 4 Screening results of 45 strains producing IAA



图 4 中, 第一列为阴性对照组, 第二列为阳性对照组, 自 A3 从左到右对应的菌株依次为 XP3.2、XP3.3、XP3.4、XP3.14、XP3.17、XP3.18、XP3.20、XP4.1、XP4.5、XP4.7; 自 B3 从左到右对应的菌株依次为 XP4.8、XP4.10、XP6.1; 自 C3 从左到右对应的菌株依次为 XP2.1、XP2.8、XP2.9、XP3.21、XP4.3、XP4.12、XP4.30、XP5.4; 自 D3 从左到右对应的菌株依次为 WB-2、WB-3、WB-7、WB-9、WB-12、WB-14、WB-21、WB-22、WB-23; 自 E3 从左到右对应的菌株依次为 ZMP5-2、ZMP5-3、ZMP7-2、ZMZ5-3、ZMZ5-5、ZMZ5-7、ZMZ6-2、ZMZ6-5、ZMZ7-2; 自 F3 从左到右对应的菌株依次为 BM1、BM2、BM3、BM4、BM5、BM6。

根据 IAA 标准曲线求得培养液 IAA 浓度, 结果如表 2 所示。

表 2 培养液 IAA 浓度

Table 2 IAA concentration of the culture medium

菌株编号	IAA 质量浓度 / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	菌株编号	IAA 质量浓度 / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
XP3.2	8.160	WB-22	22.197
XP3.21	45.240	WB-23	52.482
XP4.30	54.690	ZMP5-2	42.530
WB-2	52.316	BM1	10.410
WB-3	48.278	BM2	9.490
WB-9	44.549	BM3	45.080
WB-12	51.865	BM4	23.240
WB-14	41.698	BM5	38.240
WB-21	47.803	BM6	15.870

2.4 菌株的形态学鉴定

选取部分产铁载体、溶磷和产 IAA 能力较强的菌株进行个体形态特征观察及鉴定, 显微镜下观察到的部分菌株的个体形态 (40×10) 如图 5 所示。

图 5 中, 根据菌株形态, 将菌株 WB-21、BM3 和 BM5 分别鉴定为曲霉属 (*Aspergillus*)、旋孢腔菌属 (*Cochliobolus*)、链格孢属 (*Alternaria*)。菌株 XP3.21 和 ZMP5-3 特征不明显, 故暂时不能通过

形态特征确定其种属关系, 需要进一步分析以确定其种属关系。

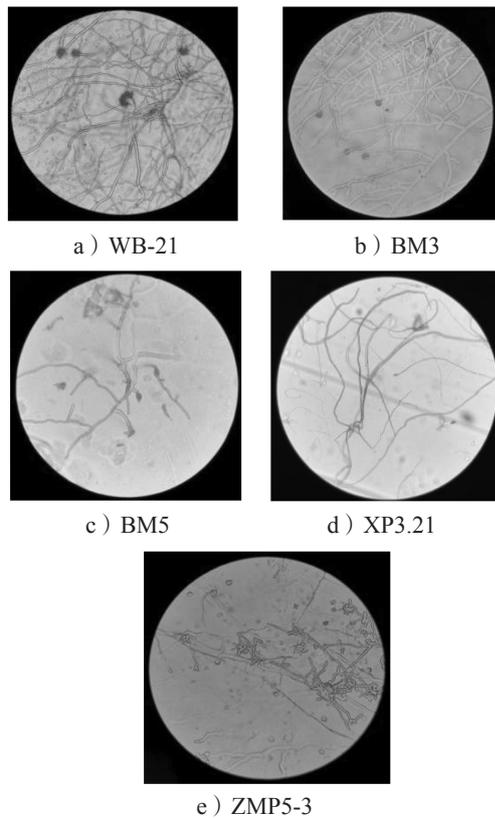


图5 部分菌株的个体形态

Fig. 5 Microscopic individual morphology of selected strains

2.5 ITS 序列分析及系统发育树构建

将上述 5 个代表菌株 ITS 序列输入 NCBI 数据库中 Blast, 选出相似度较高的基因序列。用 MEGA7.0 进行多序列比对, 采用邻接法获得目的菌株的系统发育树, 结果如图 6 所示。

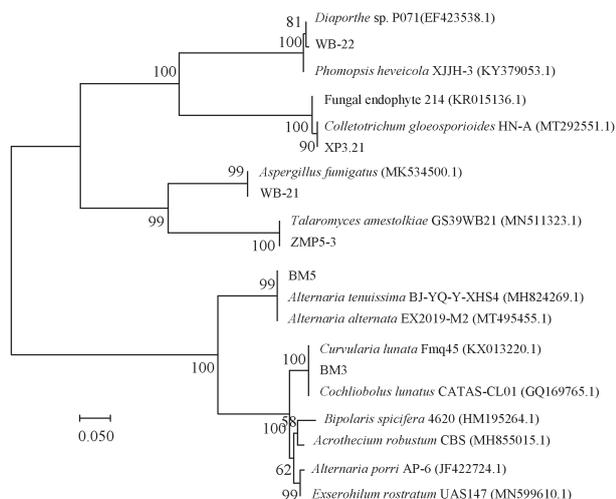


图6 基于 ITS 序列分析构建的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on ITS sequence analysis

由图 6 可知, WB-21 为曲霉属 (*Aspergillus*)、BM3 为旋孢腔菌属 (*Cochliobolus*)、BM5 为链

格孢属 (*Alternaria*)、菌株 XP3.21 为刺盘孢属 (*Colletotrichum*)、ZMP5-3 为篮状菌属 (*Talaromyces*)。可见 WB-21、BM3 和 BM5 菌株的分子鉴定结果与它们的形态学鉴定结果一致。

3 结论

通过 CAS 检测液显色反应、钼锑抗比色法和 Salkowski 法, 对在粤北凡口铅锌矿废弃地的 4 种优势植物香蒲、苦楝、蓖麻和苎麻中分离筛选出的具有抗铅、锌重金属能力的 45 株内生真菌, 进行促生作用筛选及对有促生作用较好的代表菌株进行分类鉴定, 得出以下结论:

1) 在促生菌株筛选方面, 得到产铁载体的菌株共 30 株, 占菌株总数的 66.67%; 有溶磷能力的菌株 3 株, 占菌株总数的 6.67%; 产 IAA 能力较好的菌株共 18 株, 占菌株总数的 40.00%。

2) 不同菌株可以产生不同的代谢产物, 同时体现出微生物代谢产物的多样性, 对今后继续开发利用植物内生菌资源有着重要的指导作用。

3) 通过对促生菌株的代表菌株进行形态学鉴定和 ITS 序列分析, 鉴定结果显示 WB-21 为曲霉属 (*Aspergillus*)、BM3 为旋孢腔菌属 (*Cochliobolus*)、BM5 为链格孢属 (*Alternaria*)、菌株 XP3.21 为刺盘孢属 (*Colletotrichum*)、ZMP5-3 为篮状菌属 (*Talaromyces*)。同时这些代表菌株分属于不同的属, 表现出一定的多样性。

4) 本研究经筛选获得的可以产生铁载体、溶磷和分泌产生 IAA 的内生真菌, 为今后利用植物-微生物联合修复技术对土壤重金属污染治理提供了理论依据, 同时, 还可为进一步探究植物内生真菌对植物促生长机理奠定一定的理论基础, 并以此推动内生真菌在植物修复重金属污染土壤工程中的应用。

参考文献:

- [1] 束文圣, 叶志鸿, 张志权, 等. 华南铅锌尾矿生态恢复的理论与实践 [J]. 生态学报, 2003, 23(8): 1629-1639.
SHU Wensheng, YE Zhihong, ZHANG Zhiquan, et al. Restoration of Lead and Zinc Mine Tailings in South China [J]. Acta Ecologica Sinica, 2003, 23(8): 1629-1639.
- [2] LINDBLOM S D, WANGELINE A L, VALDEZ B J R, et al. Fungal Endophyte *Alternaria Tenuissima* Can Affect Growth and Selenium Accumulation in Its Hyperaccumulator Host *Astragalus Bisulcatus* [J].

- Frontiers in Plant Science, 2018, 9(8): 1–12.
- [3] NAGATA S, YAMAJI K, NOMURA N, et al. Root Endophytes Enhance Stress-Tolerance of *Cicuta Virosa* L. Growing in a Mining Pond of Eastern Japan[J]. Plant Species Biology, 2015, 30(2): 116–125.
- [4] HAMIDPOUR M, KARAMOOZ M, AKHGAR A, et al. Adsorption of Cadmium and Zinc onto Micaceous Minerals: Effect of Siderophore Desferrioxamine B[J]. Pedosphere, 2019, 29(5): 590–597.
- [5] 董子阳, 胡佳杰, 胡宝兰. 微生物铁载体转运调控机制及其在环境污染修复中的应用[J]. 生物工程学报, 2019, 35(11): 2189–2200.
DONG Ziyang, HU Jiajie, HU Baolan. Regulation of Microbial Siderophore Transport and Its Application in Environmental Remediation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(11): 2189–2200.
- [6] 朱生翠, 曾晓希, 汤建新, 等. 产铁载体抗镉微生物的筛选[J]. 湖南工业大学学报, 2013, 27(1): 102–106.
ZHU Shengcui, ZENG Xiaoxi, TANG Jianxin, et al. Screening of Cadmium Resistance and Siderophores Strains[J]. Journal of Hunan University of Technology, 2013, 27(1): 102–106.
- [7] 康慧颖, 王伟, 刘佳莉, 等. 两株具促生作用的苜蓿内生菌的分离纯化与鉴定[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 280–288.
KANG Huiying, WANG Wei, LIU Jiali, et al. Isolation and Identification of Two Plant-Growth Promoting Endophytes from Alfalfa[J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 280–288.
- [8] 何翔, 张庆, 李楚, 等. 具铁载体活性病原细菌的筛选及铁摄取干预对其生长影响[J]. 植物保护, 2020, 46(3): 85–93.
HE Xiang, ZHANG Qing, LI Chu, et al. Screening of the Pathogenic Bacteria with Siderophore-Producing Activity and the Effect of Intervention in Iron Uptake on Its Growth[J]. Plant Protection, 2020, 46(3): 85–93.
- [9] 张孝龙. 四株具铁载体螯合活性真菌次级代谢产物初步研究[D]. 昆明: 云南大学, 2015.
ZHANG Xiaolong. Preliminary Studies on Secondary Metabolites of Four Fungal Strains with Siderophore Activity[D]. Kunming: Yunnan University, 2015.
- [10] 薛应钰, 叶巍, 杨树, 等. 一株溶磷菌的分离鉴定及溶磷促生作用[J]. 干旱地区农业研究, 2019, 37(4): 253–262.
XUE Yingyu, YE Wei, YANG Shu, et al. Isolation and Identification of P-Dissolving Fungi Strain and Its Effects on Phosphate-Solubilizing and Plant Growth Promotion[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2019, 37(4): 253–262.
- [11] 席琳乔, 王静芳, 马金萍, 等. 棉花根际解磷菌的解磷能力和分泌有机酸的初步测定[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(5): 70–74.
XI Linqiao, WANG Jingfang, MA Jinping, et al. Determination for Solubilizing Phosphate Ability and Organic Acids Secretion of Phosphobacteria in the Cotton Rhizosphere[J]. Journal of Microbiology, 2007, 27(5): 70–74.
- [12] 杨妍, 龙云川, 蒋娟, 等. 西双版纳保护区植物根际细菌的筛选及其促生能力研究[J]. 微生物学通报, 2019, 46(11): 2877–2885.
YANG Yan, LONG Yunchuan, JIANG Juan, et al. Screening of Plant-Growth Promoting Rhizosphere Actinomycetes in Xishuangbanna Reserve[J]. Microbiology China, 2019, 46(11): 2877–2885.
- [13] 韩如月, 李睿瑞, 杨帆, 等. 一株水稻根内生拮抗细菌 SM13 的分离及鉴定[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1030–1040.
HAN Ruyue, LI Ruirui, YANG Fan, et al. Isolation and Identification of an Endophytic and Antagonistic Bacterium from Rice Roots[J]. Microbiology China, 2019, 46(5): 1030–1040.

(责任编辑: 廖友媛)