第 50 卷 第 9 期
2014 年 9 月

林 业 科 学
SCIENTIA SILVAE SINICAE

Vol. 50, No. 9
Sep., 2014

doi:10.11707/j.1001-7488.20140911

马尾松根际高效解磷真菌的筛选鉴定及其促生效应*

魏 伟 吴小芹 乔 欢

(南京林业大学森林资源与环境学院 江苏省有害生物入侵预防与控制重点实验室 南京 210037)

摘 要: 从江苏南京和安徽黄山 12 份马尾松根际土样中分离出 45 株具有解磷能力的真菌,其中解磷能力较强的有 12 株。通过进一步测定,获得解磷能力强的 2 株真菌 JP-NJ1 和 JP-NJ4,其对 $Ca_3(PO_4)_2$ 的解磷能力分别为 1 051.69 和 872.18 $mg \cdot L^{-1}$。通过形态学和 18S rDNA 序列分析,2 株高效解磷真菌分别鉴定为泡盛曲霉和嗜松青霉。将 2 株高效解磷真菌接种马尾松苗,其菌悬液和代谢物都可明显促进植株生长,其中对根质量促生效果显著。

关键词: 马尾松; 解磷真菌; 解磷能力; 18S rDNA; 促生效应

中图分类号: S718.81 **文献标识码**: A **文章编号**: 1001-7488(2014)09-0082-07

Screening and Identification of Phosphate-Solubilizing Fungi of *Pinus massoniana* Rhizosphere and Its Application

Wei Wei Wu Xiaoqin Qiao Huan

(*College of Forest Resources and Environment*, *Nanjing Forestry University*
Jiangsu Provincial Key Laboratory for Prevention and Management of Invasion Species *Nanjing* 210037)

Abstract: Phosphorus supply shortage in soil is one of reasons for decline of *Pinus massoniana* stands in China. Phosphate-solubilizing fungi (PSF) are able to dissolve insoluble phosphorus, which is otherwise unavailable to plants, and transform it into soluble phosphorus. PSF can also promote plant growth to some extent. Since Masson pine stands are facing degradation of soil fertility in southern China, screening high-efficient PSF from rhizospheric soil of the forest and developing phosphate-solubilizing microbial fertilizers are an effective way to improve the soil nutrient and promote growth of the pine trees. To this end, in this work 45 phosphate-solubilizing fungi were isolated from 12 samples of *P. massoniana* rhizosphere in Nanjing Jiangsu and Huangshan Anhui of Eastern China, including 12 fungi that had strong capability to soluble phosphate. After a test of phosphate-solubilizing capability, two strains with strong phosphate-solubilizing capability were obtained: JP-NJ1 and JP-NJ4. Their solubilization of $Ca_3(PO_4)_2$ accounted for 1 051.69 $mg \cdot L^{-1}$ and 872.18 $mg \cdot L^{-1}$, respectively. They belonged to *Aspergillus awamori* and *Penicillium pinophilum*, as identified by morphological observation and analysis of 18S rDNA sequences. The two efficient phosphate-solubilizing fungal strains were inoculated on *P. massoniana* seedlings and it was found that both the fungal suspension and their metabolite could promote growth of *P. massoniana* obviously and the root weight of *P. massoniana* was enhanced notably.

Key words: *Pinus massoniana*; phosphate-solubilizing fungi; phosphate-solubilizing capability; 18S rDNA; effect of plant growth promoting

马尾松(*Pinus massaniana*)是我国南方地区的主要造林树种(阎传海等, 1995)。土壤磷素供应不足是目前马尾松林衰退现象较严重的原因之一。自然条件下,绝大部分土壤中磷源丰富,但土壤中 90% 以上都为无效磷,其转化成植物可以吸收利用的有效磷的速度很慢,难以满足林木生长需要。解磷微生物可以将土壤中难溶性磷转化成植物能够吸收利用的可溶性磷。解磷微生物种类繁多,有解磷细菌、解磷真菌和解磷放线菌等(杨慧, 2008)。目前的研究主要集中在解磷细菌。Hussain 等(2013)发现解磷伯克霍尔德氏菌(*Burkholderai* sp.)PS-01 具有较好的解磷能力,可促进玉米(*Zea mays*)根质量增加。Zhao 等

收稿日期: 2013-07-24; 修回日期: 2014-07-22。

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(201004061); 国家"十二五"科技支撑专题(2012BAD19B0703); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)。

* 吴小芹为通讯作者。

(2014)发现解磷芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)DZ-18 对杨树根部具有良好促生作用。解磷真菌数量和种类都少于解磷细菌，但解磷真菌的溶磷能力较强，甚至是细菌的几十倍，且遗传性状更加稳定，不易因连续培养而降低或丧失解磷能力(赵小蓉等，2002)。解磷真菌马昆德拟青霉(*Paecilomyces marquandii*)AA1 在不同培养条件下均有解磷能力(Ahuja *et al.*，2007)。李剑峰等(2010)发现霉菌及酵母对难溶性磷酸盐具有较好的溶解能力。近年来对解磷真菌研究较少，尤其是林地生态系统解磷真菌研究更少(Barroso *et al.*，2005；陈俊等，2009；朱颖等，2006)。因此，从林地根际土壤中筛选高效解磷真菌并研制成生物肥料，是解决林地磷素供应不足的一条有效途径。本研究从江苏和安徽马尾松林根际土壤中分离、筛选高效解磷真菌，并探讨其对马尾松的促生效应，为今后开发和利用高效的解磷生物菌肥及改善马尾松林地土壤的微生态环境提供参考依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料

1.1.1　采样土壤　分别从安徽黄山、南京紫金山、江苏省林业科学研究院和南京林业大学后山选取马尾松人工林进行采样(表 1)。

表 1　采样地点信息

Tab. 1　Information of sampling site

编号 No.	采样点 Sampling site	土壤类型 Soil type	采样日期 Sampling date
1	安徽黄山 Huangshan Mountain Anhui Province	黄壤 Yellow soil	2011－02－21
2	南京紫金山 Zijinshan，Nanjing	石灰岩土 Limestone soil	2011－03－15
3	南京林业大学后山 Nanjing Forestry University	黄棕壤 Yellow brown soil	2011－04－12
4	江苏省林业科学研究院 Academy of Forestry，Jiangsu Province	黄壤 Yellow soil	2011－09－05

1.1.2　供试培养基　无机磷培养基(NBRIP 培养基)(Shekhar，1999)：葡萄糖 10 g，$(NH_4)_2SO_4$ 0.1 g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g，$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 5.0 g，$Ca_3(PO_4)_2$ 5.0 g，蒸馏水1 000 mL，pH 6.8～7.2。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA 培养基)(杜秉海，1994)：马铃薯 200 g，蔗糖 20 g，琼脂 20 g，蒸馏水1 000 mL，自然 pH 值。

CYA 固体培养基(孔华忠，2007)：K_2HPO_4 1 g，查氏浓缩液 10 mL，酵母抽提物 5 g，蔗糖 30 g，琼脂 20 g，蒸馏水1 000 mL。

1.2　试验方法

1.2.1　马尾松根际土样采集　采用三点取样法分别采集上述各取样点马尾松根际土壤。采样时，在马尾松树体根部方圆半米内，选取采土点，铲去表层土后深挖 20～30 cm，以保证样本中包含较多的根际微生物。将马尾松根系上一些毛细根和黏附其上的土壤一起装入无菌袋中，注明采集地点、日期、土样号，取回，置于 4 ℃冰箱保存。

1.2.2　根际土壤解磷真菌分离　称取 10.0 g马尾松根际土壤，放入装有 90 mL 无菌水的250 mL锥形瓶中，室温下 180 $r \cdot min^{-1}$ 振荡 30 min，静置 10 min 后，将上清液梯度稀释至 10^{-4}，10^{-5} 和 10^{-6}，分别取 100 μL 涂布于无机磷培养基平板(NBRIP 培养基)上，重复 3 次，25 ℃培养 7～10 天。挑取平板上具有明显溶磷圈且长势良好的真菌菌落进行纯化并计算分离率，后转至马铃薯培养基(PDA)斜面培养 7～10天，置 4 ℃冰箱保存。

分离率(%)＝目标解磷真菌数/分离出解磷真菌总数×100。

1.2.3　解磷真菌菌株初筛　将上述分离得到的真菌分别接种到 NBRIP 平板上，25 ℃培养 7～10 天，测定菌落直径(D)和溶菌圈直径(d)，计算比值(d/D)。按表 2 对真菌解磷能力进行初步分级。一般比值越大，说明真菌的解磷能力越强。比值＞1 时，解磷真菌解磷能力最强，比值为 0.5～1 时解磷能力较强，比值＜0.5 时则解磷能力较弱。本试验选择溶磷圈相对大而透明且比值＞0.5 的菌株进行保存，置于 4 ℃冰箱保存。

1.2.4　高效解磷真菌的复筛　将上述初筛得到的菌株接种到 PDA 平板上活化培养 7 天，以无菌操作取 6 个直径 6 mm 菌块接种至 50 mL NBRIP 液体培养基中，以未接菌的空白 NBRIP 培养基为对照(CK)，每个待测菌株设 3 次重复，25 ℃，200 $r \cdot min^{-1}$ 振荡培养 7 天，过滤发酵液后采用钼锑抗比色法测上清有效磷含量，用 UV－160PC 紫外－可见光分光光度计在720 nm处比色并测定 OD 值(鲁如坤，1998)。计算上清液有效磷含量和解磷率(刘辉等，2010)。

解磷率(%)＝(接菌可溶性磷含量－对照可溶性磷含量)/加入无机磷源的量×100。

1.2.5　高效解磷真菌的形态学鉴定　在 CYA 培养基上接种从马尾松根际土壤筛选分离获得的高效解

磷真菌,25 ℃培养 1 ~ 2 周,观察并记录菌落、菌丝、孢子以及生理生化等特征(贺运春,2008; 孔华忠,2007; 齐祖同,1997; 陆家云,2001; 姚粟等,2006; 崔丽霞等,2007),对解磷真菌菌株进行初步鉴定。

1.2.6 真菌基因组 DNA 的提取 采用 CTAB 法提取待测菌株 DNA。将适量菌体采用液氮研磨至粉末状,加入 800 μL 已65 ℃预热的 CTAB 和 200 μL DTT,65 ℃水浴 45 min; 常温下 12 000 $r \cdot min^{-1}$离心 15 min,吸取上清液,加入等体积酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1)并振荡,常温下 12 000 $r \cdot min^{-1}$,15 min 离心; 吸取上清液,加入等体积氯仿 : 异戊醇(24 : 1)并振荡,常温下 12 000 $r \cdot min^{-1}$离心 15 min; 吸取上清液,加入 1/10 体积的醋酸钠和 2 倍体积 -20 ℃预冷的无水乙醇, -20 ℃沉淀过夜; 12 000 $r \cdot min^{-1}$离心 15 min 后弃上清液,加入 70% 的乙醇洗涤沉淀 3 次; 真空干燥洗涤 10 min; 风干后溶解于 50 μL 1 × ddH_2O, -20 ℃冻存。

1.2.7 真菌基因组 DNA 的 PCR 扩增检测及测序 选取通用引物 ITS1(TCCGTAGGTGAA CTGCGC)和 ITS4(TCCTCCGCTTATTGATATGC)(上海美吉测序公司合成)对供试菌株进行扩增。

取 8 μL PCR 扩增产物在含有 EB 的 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳,电泳后利用凝胶成像系统在紫外灯下观察结果。将 PCR 产物在自动测序仪上进行序列反应测序(北京六合华大基因科技公司)。

1.2.8 供试马尾松苗木培育 马尾松种子采自广州。用 1% 高锰酸钾溶液浸泡种子 1 h,再用自来水冲洗 12 h。浸种后将种子用纱布包好,并保持湿润,置于 20 ℃条件下 1 天左右进行催芽。育苗用土取自南京林业大学后山的黄棕壤,置于营养钵内。土壤高温灭菌(121 ℃,2 h)后将已开始萌发的马尾松种子撒在土壤表面,用厚约 1 ~ 2 cm 的灭菌(121 ℃,2 h)细沙覆盖,25 ℃培养。待苗高至 6 ~ 8 cm左右后连土移栽,装土量约为盆容积 2/3,每盆 1 株。置室温 20 ℃下进行培养,保持良好的光照和水分条件,待后期接菌。

1.2.9 高效解磷真菌菌剂制备及接种试验 将供试菌株于马铃薯葡萄糖液体培养基中 25 ℃振荡培养 7 天。发酵液离心 5 min(4 ℃,6 000 $r \cdot min^{-1}$),菌丝体用磁力搅拌器打碎后,作浓度梯度稀释,在显微镜下对菌丝片段计数,并用无菌生理盐水调节菌丝片段悬液($7 \times 10^{-8} \sim 8 \times 10^{8}$ $cfu \cdot mL^{-1}$)制成菌剂。离心后的上清液收集到无菌三角瓶中待用。

接种试验分为 4 种处理,每种处理 10 株马尾松苗,各施入 15 mL 对应处理物: A 为菌丝片段悬液,B 为供试菌株发酵液,C 为空白的马铃薯葡萄糖液体培养基(PD),D 为无菌生理盐水(CK)。每个处理 20 次重复,接种后的松苗置于温室(20 ℃)统一管理,适时浇水。接种处理的马尾松苗生长 150 天后,测定植株苗高、地径、植株鲜质量和根质量等指标,并计算平均值。

1.3 数据处理

运用 Microsoft Excel2003 和 Spss18.0 软件做统计分析,数据以 mean ± SD 表示。将测序得到的序列与 BLAST 数据库进行同源性分析,用 MEGA(4.0)程序包中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 解磷真菌分离与初筛

解磷真菌在 NBRIP 培养基上生长时大多会产生透明溶磷圈,从供试土样中共分离 45 株具有溶磷圈的解磷真菌,其中南京紫金山土样获得 6 株解磷真菌,南京林业大学后山土样获得 15 株解磷真菌,江苏省林业科学研究院土样获得 18 株解磷真菌,安徽黄山土样获得 6 株解磷真菌(表 2),说明解磷真菌在不同马尾松林分根际土壤中的分布数量不同。

表 2 马尾松根际解磷真菌分离情况

Tab. 2 Isolation ratio of phosphate-solubilizing fungi from *P. massoniana* rhizosphere

编号 No.	采样点 Sampling site	采样数 Samples	真菌数 Fungi number	$d/D > 0.5$	
				真菌数 Fungi number	分离率 Separation rate (%)
1	安徽黄山 Huangshan Mountain, Anhui Province	3	6	—	—
2	南京紫金山 Zijinshan, Nanjing	3	6	—	—
3	南京林业大学后山 Nanjing Forestry University	3	15	12	80
4	江苏省林业科学研究院 Academy of Forestry, Jiangsu Province	3	18	14	77.8
总计 Total	—	12	45	26	57.8

从表 2 可以看出，解磷能力较强菌株的分离率约为 57.8%。南京林业大学后山黄棕壤土样中分离率为 80%，江苏省林业科学研究院黄壤土样的分离率为 77.8%，说明黄壤和黄棕壤土样中的解磷真菌解磷能力较强，而紫金山石灰岩土样中的解磷真菌解磷能力较弱。在 45 株解磷真菌中，具有明显溶磷圈且 $d/D > 1$ 的强解磷菌株有 12 株。

2.2　解磷真菌复筛和解磷能力比较

将初筛获得的 12 株解磷真菌接种于 NBRIP 液体摇瓶培养基中，在 25 ℃，200 r·min^{-1}条件下培养 7 天后，测定发酵液中可溶磷的含量，结果(图 1)表明，12 株解磷真菌对 $Ca_3(PO_4)_2$ 的溶解力很强，发酵液中有效磷含量显著高于对照。各接菌处理发酵液中有效磷含量为 598.11 ~ 1 051.69 mg·L^{-1}，各菌株解磷率为 10.19% ~ 19.3%。其中，JP-NJ1 和 JP-NJ4 菌株的发酵液有效磷含量高达 1 051.69 和 1 042.98 mg·L^{-1}，解磷率分别为 19.3% 和 19.1%，显著高于其他菌株。

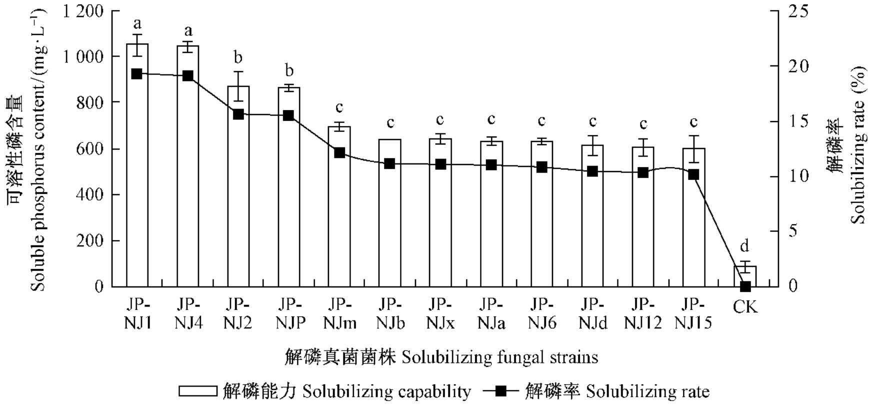

图 1　马尾松根际 12 株解磷真菌的解磷效果

Fig. 1　The phosphate-solubilizing effect of twelve fungi from *P. massoniana* rhizosphere ($P < 0.01$)

不同小写字母表示差异显著($P < 0.01$) Different smallletters mean significant difference ($P < 0.01$)

2.3　高效解磷真菌菌株主要形态学特征

对初筛获得的 12 株解磷真菌测定，筛选出 2 株解磷能力强的真菌菌株 JP-NJ1 和 JP-NJ4。JP-NJ1 菌株在 CYA 培养基上生长迅速，25 ℃培养 7 天，直径在 65 mm 左右。菌落黑褐色，具有辐射状沟纹，质地丝绒状(图 2A)；菌落反面稍呈淡黄色。分生孢子在菌落中间密集产生，呈黑褐色；分生孢子梗瓶梗状，约(600 ~ 800) μm × 10 μm，衰老时带淡褐色；产孢结构双层，分生孢子球形或近球形，直径 3.5 ~ 5 μm，壁平滑。该菌株在 NBRIP 培养基上生长较缓慢，25 ℃培养 7 天后菌落直径为 35 ~ 40 mm，溶磷圈大而透明，直径为 46 ~ 65 mm；菌落质地丝绒状，菌丝较稀疏；分生孢子产生较少，菌落中间最为密集，呈黑色；菌落反面无色。根据菌落的形态学分析以及显微观察，初步鉴定 JP-NJ1 为曲霉属一种(*Aspergillus* sp.)。

JP-NJ4 菌株在 CYA 培养基上 25 ℃培养 7 天，菌落直径约 30 mm。菌落平坦或中心有脐状突起，边缘整齐或不整齐，菌落呈颗粒状(图 2B)；分生孢子椭圆形，分生孢子面黄绿色；菌丝体黄色，有时有少量的淡褐色渗出液，菌落反面橙红色。该菌株在 NBRIP 上25 ℃培养 7 天，菌落直径为 26 ~ 30 mm。溶磷圈半透明，直径 18 mm 左右，生长前期菌落直径大于溶磷圈直径，至生长后期(12 天)溶磷圈直径大于菌落直径且更透明。菌落质地疏松，四周有呈放射状排列的绒毛状白色菌丝；菌落背面呈浅红褐色。根据菌落和菌体的形态学分析和显微观察，初步鉴定为青霉属一种(*Penicillium* sp.)。

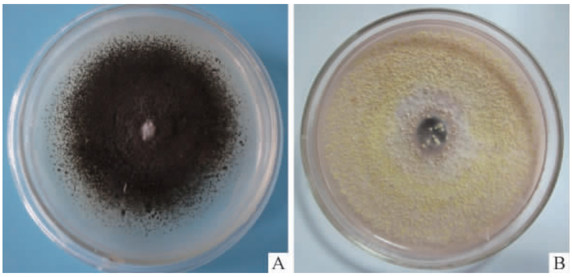

图 2　2 株高效解磷真菌在 CYA 培养基上的菌落特征

Fig. 2　Two phosphate-solubilizing fungal strains colony on CYA medium

A. JP-NJ1；B. JP-NJ4

2.4　高效解磷真菌菌株分子鉴定

2.4.1　解磷真菌 rDNA ITS PCR 扩增　以解磷真菌的 DNA 作为模板，利用通用引物 ITS1 和 ITS4，对目的基因片段进行 PCR 扩增，得到的产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测，并以 DNA Marker-DL 2000 作为对照。结果表明，2 株解磷真菌在 500 ~ 750 bp

处均有 1 条明显而亮的 DNA 条带，质量浓度约 100 ng•μL^{-1}，且没有其他非特异性条带。因此可以判断这些条带即为获得的目的 DNA 片断，可用来测序。

2.4.2 系统发育树的构建与分析 将 2 株高效解磷真菌菌株 18S rDNA 的间隔序列进行 PCR 扩增并测序，将测序得到的 18S rDNA ITS 区序列分别与 GenBank 中的菌株序列进行相似性分析，并用 Bioedit 软件进行多重序列比较，再用 Mega 4.0 软件 Neighbour-Joining method 法寻找最简约系统发育树，用 Bootstrap 进行验证。结果表明，JP-NJ1 菌株扩增片段大小为 590 bp，JP-NJ4 菌株为 573 bp。将它们分别进行 blast 比对发现：JP-NJ1 菌株与 Genbank 中各相似菌株的同源性都在 99% 以上，与黑曲霉（*Aspergillus niger*）和泡盛曲霉（*A. awamori*）序列的亲缘关系最近，同源性均为 100%（图 3）；结合 JP-NJ1 菌株形态学特征后，可认为 JP-NJ1 菌株为泡盛曲霉（齐祖同，1997）。JP-NJ4 菌株与 Genbank 中各相似菌株的同源性都在 98% 以上，其与嗜松青霉（*P. pinophilum*）（HQ392503.1）序列的亲缘关系最近，同源性最高（图 3），故解磷真菌 JP-NJ4 为嗜松青霉。

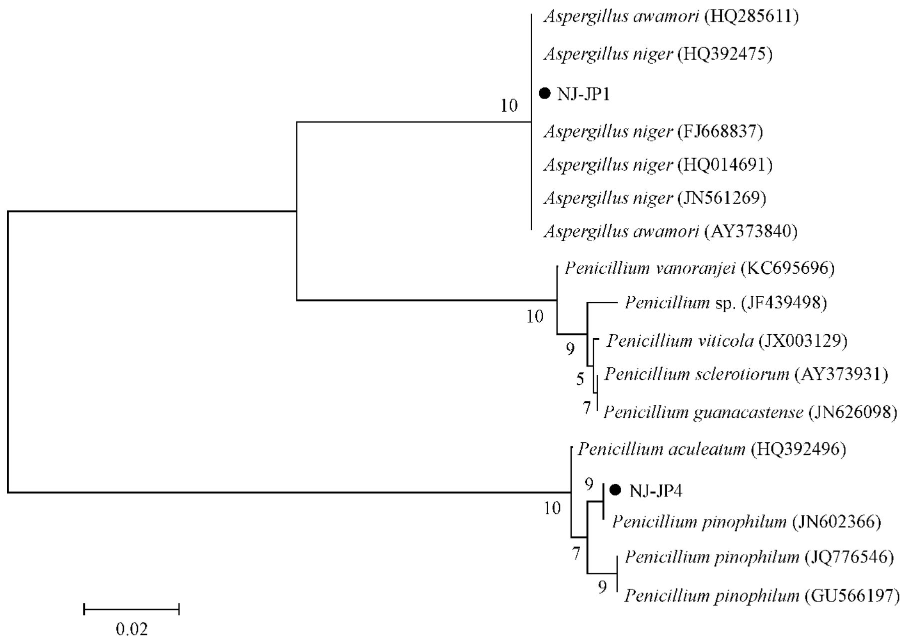

图 3 基于 18S rDNA ITS 序列的解磷真菌系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree of efficient phosphate-solubilizing fungi based on 18S rDNA ITS sequences

2.5 高效解磷真菌对马尾松生长的影响

2 株解磷真菌接种马尾松苗木 150 天后，对马尾松植株的生长状况以及生物量进行观察和测定。结果表明，2 株解磷真菌无论是菌悬液还是代谢物都对马尾松苗有明显的促生作用（表 3）。其中：JP-NJ1 菌株的菌悬液的促进作用最显著（$P < 0.05$），苗高和地径分别比 CK 增长 19.36% 和 27.83%，鲜质量和根质量分别比 CK 增长了 104.13% 和 153.12%。JP-NJ4 菌株代谢物对根质量的影响大于其菌悬液，与 CK 相比增加 59.38%。PD 培养基对马尾松苗高、地径、鲜质量和根质量的促生作用均不显著。

3 结论与讨论

本研究从江苏南京和安徽黄山 12 份马尾松根际土样中分离出 45 株可在 NBRIP 无机磷培养基上生长的真菌，这些真菌均具有一定的解磷作用。通过初筛从中得到了 12 株解磷能力较强的解磷真菌，分离率为 26.7%。其中，6 株来自南京林业大学后山土样，另外 6 株来自江苏省林业科学研究院土样，而南京紫金山土样和安徽黄山土样中未得到解磷能力较强的真菌菌株。不同地区根际土壤解磷真菌分布以及解磷能力存在差异，这可能与土壤类型以及土壤有机质等的影响有关。通过解磷能力进一步测定，复筛出 2 株对 $Ca_3(PO_4)_2$ 具有强解磷能力的真菌JP-NJ1和 JP-NJ4。经鉴定分别为泡盛曲霉与嗜松青霉。其中，JP-NJ1 菌株与黑曲霉和泡盛曲霉序列的亲缘关系均极为相近，但黑曲霉菌落呈炭黑色，菌落反面无色或黄褐色或微黄绿色，而 JP-NJ1 菌株菌落黑褐色，背面淡黄色，因此 JP-NJ1 菌株为泡盛曲霉。Whitelaw 等（1999）从小麦（*Triticum aestivum*）根际土壤中分离出的青霉（*P. radicum*），在培养 21

天(25 ℃)后，对 $Ca_3(PO_4)_2$ 的解磷能力为 360 mg·L^{-1}。与之相比，本研究筛选获得的 2 株解磷真菌对磷酸钙的解磷能力更强。

表 3　高效解磷真菌对马尾松生长的影响($P<0.05$)

Tab. 3　Effect of high efficient phosphate-solubilizing fungi on the growth of *P. massoniana* ($P<0.05$)

处理 Treatments	生长状况 Seedling growth				植株生物量 Seedling biomass			
	苗高 Height		地径 Ground diameter		鲜质量 Fresh mass		根质量 Root mass	
	测量值 Value/cm	增长率 Increase rate (%)	测量值 Value/mm	增长率 Increase rate (%)	测量值 Value/g	增长率 Increase rate (%)	测量值 Value/g	增长率 Increase rate (%)
JP-NJ1 菌悬液 JP-NJ1 fungal suspension	23.67 ±0.86a	19.36	2.71 ±0.19a	27.83	4.45 ±0.55a	104.13	1.62 ±0.36a	153.12
JP-NJ1 发酵液 JP-NJ1 fermentation broth	22.67 ±2.00a	14.32	2.5 ±0.29ab	17.92	3.24 ±0.36b	48.60	0.8 ±0.19b	25.00
JP-NJ4 菌悬液 JP-NJ4 fungal suspension	24.17 ±1.29ab	21.89	2.45 ±0.14b	15.57	3.6 ±0.25b	65.14	0.95 ±0.29bc	48.44
JP-NJ4 发酵液 JP-NJ4 fermentation broth	22.1 ±1.147ab	11.45	2.18 ±0.11b	2.83	2.9 ±0.31bc	33.03	1.02 ±0.23bc	59.38
PD 培养基 PD medium	22.42 ±1.52ab	13.06	2.19 ±0.22b	3.30	2.34 ±0.35cd	7.34	0.66 ±0.21c	3.13
CK	19.83 ±1.05b	—	2.12 ±0.15b	—	2.18 ±0.4d	—	0.64 ±0.18c	—

已有研究表明，解磷真菌主要有青霉菌(*Penicillium*)、曲霉菌(*Aspergillus*)、根霉(*Rhizopus*)、镰刀菌(*Fusarium*)、小菌核菌(*Sclerotium*)等，目前研究最多的是青霉和曲霉(李露莉等，2010)。本研究通过形态学和 18S rDNA ITS 序列分析，对 2 株马尾松根际解磷真菌 JP-NJ1 和 JP-NJ4 进行了鉴定，二者分别为泡盛曲霉和嗜松青霉。Mittal(2008)将一株泡盛曲霉接种鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)，发现植物根长、种子数以及质量等都有显著增加；有研究表明，解磷青霉对玉米促生作用显著，可以用来作为水稻(*Oryza sativa*)的壮秧剂(徐汉虹，2001)；同时解磷青霉还可产生吲哚乙酸以促进植物生长(刘志明等，2000)。本研究将 2 株高效解磷真菌对马尾松苗进行接种试验，结果表明，高效解磷真菌无论是菌悬液还是发酵液都可以明显促进马尾松生长，且菌悬液处理的促生效果高于代谢物的处理。Babana 等(2006)研究发现泡盛曲霉对小麦根质量增长率可达 60%，本试验中解磷曲霉 JP-NJ1 对马尾松苗根质量的增长率则远高于上述结果，JP-NJ1 菌株对马尾松根质量具有良好的促生效果。目前有关解磷菌剂的报导多集中于解磷细菌，解磷真菌研究较少；而且多是农作物上，林木方面关注较少(陈俊等，2009；朱颖等，2006)。本研究筛选获得的高效解磷真菌泡盛曲霉 JP-NJ1 和嗜松青霉 JP-NJ4 不仅丰富了解磷微生物的种质资源，并具有应用于林木微生物肥料开发研制的潜力。

参　考　文　献

陈　俊，陆俊锟，康丽华，等，2009. 红树林溶磷菌的初步鉴定、溶磷能力测定及其优化培养. 微生物学通报，36(8)：1183 – 1188.

崔丽霞，李君剑，2007. 青霉分类方法的研究进展. 山西化工，27(6)：31 – 34.

杜秉海. 1994. 微生物学实验. 北京：北京农业大学出版社，133 – 134.

贺运春. 2008. 真菌学. 北京：中国林业出版社.

孔华忠. 2007. 中国真菌志. 第三十五卷. 青霉属及其相关有性型属. 北京：科学出版社，53 – 54，187 – 188.

李剑峰，师尚礼，张淑卿，等. 2010. 解磷微生物肥料研究进展. 仲恺农业工程学院学报，23(1)：63 – 67.

李露莉，邱树毅，谢晓莉，等. 2010. 解磷真菌的研究进展. 贵州农业科学，38(7)：125 – 128.

刘志明，余玉冰，秦碧霞，等. 2000. 根结线虫幼虫致病细菌的筛选. 中国生物防治，16(3)：142.

陆家云. 2001. 植物病原真菌学. 北京：中国农业出版社.

鲁如坤. 1998. 土壤 – 植物营养学原理和施肥. 北京：化学工业出版社，152 – 157.

刘　辉，吴小芹，陈　丹. 2010. 4 种外生菌根真菌对难溶性磷酸盐的溶解能力. 西北植物学报，30(1)：143 – 149.

齐祖同，1997. 中国真菌志. 第五卷. 曲霉属及其相关有性型属. 北京：科学出版社，94 – 95，100 – 102.

王莉晶，高晓蓉，吕　军，等. 2009. 解磷真菌 C2 的分离鉴定及其在土壤中实际解磷效果的研究. 土壤通报，40(4)：771 – 775.

徐汉虹. 2001. 杀虫植物与植物性杀虫剂. 北京：中国农业出版社.

阎传海，张　绅，宋永昌. 1995. 南京地区森林植被性质的初步研究. 植物生态学报，19(3)：280 – 285.

杨　慧，范丙全，龚明波，等. 2008. 一株新的溶磷草生欧文氏菌的分离、鉴定及其溶磷效果初步研究. 微生物学报，48(1)：51 – 56.

姚 粟，李 辉，程 池. 2006. 23 株曲霉属菌种的形态学复核鉴定研究. 食品与发酵工业，32(12)：37－43.

赵小蓉，林启美，李保国. 2002. 溶磷菌对4 种难溶性磷酸盐溶解能力的初步研究. 微生物学报，42(2)：236,241.

朱 颖，姚 拓，李玉娥，等. 2006. 红三叶根际溶磷菌分离及其溶磷机制初探. 草地学报，17(2)：259－263.

Ahuja A，Ghosh S B，Souza S F. 2007. Isolation of a starch utilizing，phosphate solubilizing fungus on buffered medium and its characterization. Bioresource Technology，98(17)：3408－3411.

Babana A H，Antoun H. 2006. Biological system for improving the availability of Tilemsi phosphate rock for wheat（*Triticum aestivum* L.）cultivated in Mali. Nutrient Cycling in Agroecosystems，76(2):285－295.

Barroso C B，Nahas E. 2005. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. Applied Soil Ecology，29：73－83.

Hussain M I，Asghar H N，Akhtar M J，*et al*. 2013. Impact of phosphate solubilizing bacteria on growth and yield of maize. Soil and Environment，32(1)：71－78.

Mittal V，Singh O，Nayyar H，*et al*. 2008. Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains（*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*）on the yield of chickpea（*Cicer arietinum* L. cv. GPF2）. Soil Biology and Biochemistry，40(3)：718－727.

Shekhar N C. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. Federation of European Microbiological Societies，170 (1)：265－270.

Whitelaw M A，Harden T J，Helyar K R. 1999. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. Soil Biology and Biochemistry，31(5)：655－665.

Zhao L，Wu X Q，Ye J R，*et al*. 2014. Isolation and characterization of a mycorrhiza helper bacterium from rhizosphere soils of poplar stands. Biology and Fertility of Soils，50(4)：593－601.

（责任编辑 朱乾坤）