



一株耐盐日本曲霉的筛选及其溶磷促生作用

江红梅, 殷中伟, 史发超, 刘彩月, 范丙全*

中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081

摘要:【目的】从内蒙古种植葵花的盐碱地中筛选高效溶磷真菌, 为盐碱地增产节肥开发生物肥料提供溶磷菌种资源。【方法】利用 ITS rDNA 序列鉴定菌株、固体培养基测定耐盐性, 液体摇床培养与盆栽试验结合分析菌株溶磷能力, 盆栽和田间试验明确菌株 M1 促进作物生长和增产作用; LC-MS 技术测定菌株 M1 在液体培养基中分泌有机酸和植物激素含量, 明确菌株 M1 的溶磷和促生机理。【结果】溶磷菌株 M1 鉴定为日本曲霉(*Aspergillus japonicus*)。液体培养基接种菌株 M1 培养 6 d, 以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 为磷源时上清液有效磷达 1020.89 mg/L, 溶解率为 63.30%; 以 AlPO_4 为磷源时有效磷达 995.69 mg/L, 溶解率为 48.59%; 以贵州开阳磷矿粉、江苏锦屏磷矿粉、云南晋宁磷矿粉、河北钒山磷矿粉和云南昆阳磷矿粉为磷源接种菌株 M1, 从晋宁磷矿粉释放的有效磷浓度最高, 达到 363.64 mg/L。菌株 M1 可耐受 10% NaCl。将 M1 制备的菌剂分别接种于施用 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 AlPO_4 和开阳磷矿粉 3 种磷源的 4 种盆栽试验土壤包括北京石灰性潮土、安徽黏性潮土、安徽水稻土和山东沿海盐潮土。结果显示, 菌株 M1 对玉米植株促生效果显著, 玉米植株鲜重比对照提高 2.14%–90.91%、干重增加 22.15%–268.28%; 土壤有效磷提高 21.81–24.27 mg/kg。菌株 M1 与 4 种土壤的适配性均高于对照菌株 DSM 821。田间小区花生产量结果显示, 接种溶磷菌剂 M1 增产效果最好, 花生果实产量达 4.46 t/hm², 比不接种菌剂的对照处理增加 0.81 t/hm², 增产 22.19%。菌株 M1 在含有磷酸三钙、磷酸铝和开阳磷矿粉 3 种难溶磷培养液中经过 6 d 培养, 均产生 7 种有机酸, 其中草酸和柠檬酸含量最高, 分别为 616.16 mg/L 和 413.69 mg/L; 培养液均能检测到吲哚乙酸(IAA)和玉米素, IAA 含量为 15.45–77.58 mg/L, 玉米素浓度为 0.06–0.11 mg/L。【结论】获得了一株高效溶解多种难溶磷的日本曲霉菌 M1, 它能显著增加土壤有效磷、促进玉米生长和花生增产, 与 4 种典型土壤适配性好, 具有良好的农业应用前景。

关键词: 日本曲霉菌, 溶磷作用, 促生效果, 有机酸, 植物激素

基金项目: 国家“863 计划”(2013AA102801-7); 农业部“948”重点项目(2011-G25)

*通信作者。Tel/Fax: +86-10-82106212; E-mail: bqfan@caas.ac.cn

收稿日期: 2017-07-04; 修回日期: 2017-09-28; 网络出版日期: 2017-11-21

磷素是植物生长必需的三大营养元素之一, 磷肥使用是粮食增产的重要措施。施入土壤的磷肥 90% 以上转化为难溶磷, 不易被植物吸收利用, 是磷肥利用效率低的主要成因^[1-2]。迄今, 世界各国依靠大量消费磷肥确保作物增产, 保障粮食安全, 从而导致磷矿资源的消费量逐年增加。我国 90% 以上的磷矿为中低品位, 按现有的年消费量, 我国的磷矿使用年限将不足 20 年^[3]。今后, 提高磷肥和磷矿资源的使用效率、提高土壤磷库的有效性, 延长磷矿资源的使用寿命, 对世界各国农业可持续发展具有重要意义^[4-5]。

溶磷微生物能有效转化土壤难溶磷、提高磷肥利用率、促进作物增产、提高作物吸磷量, 从而减少磷肥投入量^[6]。因此, 溶磷生物肥料是一种高效、经济、环境友好的活化土壤难溶磷的生物措施, 具有巨大应用潜力。溶磷微生物依靠自身产生有机酸^[7-8]、分泌 H^+ 质子^[9-10], 将难溶磷转化为有效磷, 同时通过自身产生植物促生物质^[11], 在磷素的生物有效性和作物增产中起着重要作用。自 1903 年 Staltrom^[12] 从土壤中成功分离到溶磷细菌以来, 溶磷微生物一直受到科学家的高度重视, 国内外相继开展了溶磷微生物的大量筛选研究^[13-15], 期望通过接种溶磷微生物制剂提高土壤难溶磷的有效性和磷肥利用效率^[7,16]。由于不同种类的溶磷菌或不同菌株之间的溶磷能力和接种效果差异悬殊, 所以, 高效溶磷菌株的筛选显得尤为重要。已有报道显示, 真菌的溶磷能力大于细菌^[12], 世界各国科学家分离了大量溶磷真菌, 其中, 青霉菌(*Penicillium* sp.)、曲霉菌(*Aspergillus* sp.)、木霉菌(*Trichoderma* sp.)、链格孢菌(*Alternaria* sp.)、镰刀菌(*Fusarium* sp.) 和踝节菌(*Talaromyces* sp.) 6 个属都具有溶磷能力。溶磷曲霉菌是一类重要的

溶磷微生物资源, 迄今已经报道的溶磷曲霉菌有黑曲霉(*A. niger*)^[14]、棘孢曲霉(*A. aculeatus*)^[17]、烟曲霉(*A. fumigatus*)^[18]、泡盛曲霉(*A. awamori*)^[18]、棒曲霉(*A. clavatus*)^[19]、焦曲霉(*A. ustus*)^[19]、构巢曲霉(*A. nidulans*)^[19]、黄曲霉(*A. flavus*)^[20]、臭曲霉(*A. foetidus*)^[21]、灰绿曲霉(*A. glaucus*)^[22]、聚多曲霉(*A. sydowii*)^[22]、蜂蜜曲霉(*A. melleus*)^[23]、土曲霉(*A. terreus*)^[24]和塔宾曲霉(*A. tubingensis*)^[25] 14 个种。

众所周知, 绝大多数溶磷菌株是从作物根际土壤中获得, 但有些溶磷菌是从特殊环境中分离, 以便利用此类菌株具有溶磷功能和兼具适应土著环境的特性。Chatli 等^[26] 从低温沙漠地区分离了溶磷青霉菌株 FC28、FC39, 溶磷黑曲霉菌株 AF; Naveenkumar 等^[24] 从槟榔壳废弃物中获得了溶磷黑曲霉菌株 Strain-1; Bhattacharya 等^[27] 从蚯蚓粪便中分离到溶磷构巢曲霉菌株 V1; 李海云等^[28] 从猪粪堆肥中筛选到溶磷产黄青霉菌株 PSM-1; Nath 等^[29] 从茶树叶中分离出溶磷青霉菌株(AF014929)。

我国耕地仅有 18 亿亩, 盐碱地面积占 10%, 充分利用耐盐溶磷增产的微生物资源及其生物肥料对于提高粮食产量十分重要。世界各国科学家开展了大量筛选耐盐溶磷菌的工作, 其中, 溶磷草酸青霉菌(*Penicillium oxalicum*) QL1501^[30]、红酵母菌(*Rhodotorula* sp.) PS4^[31]、木霉菌 TRC3^[32] 和疣孢蓝状菌(*Talaromyces verruculosus*) P10^[33] 等菌株的耐盐能力尤为突出。

迄今为止, 溶磷微生物研究取得了丰硕成果, 揭示了溶磷微生物及其生物肥料的可利用价值。大量研究证明, 溶磷微生物具有增加土壤有效磷^[34-35]、促进磷素吸收和减少磷肥用量^[4,36]、促进磷矿石的生物有效性^[34,37], 以及促进作物生长和提高作物

产量的作用^[38-39]。毋庸置疑,溶磷微生物及其生物肥料在溶解难溶磷、减少磷肥投入和提高作物产量方面潜力巨大。因此,在溶磷微生物筛选和应用研究过程中,应该注重选择既能高效溶解难溶磷、又能显著提高作物产量的溶磷菌株。

本研究旨在筛选耐盐的高效溶磷真菌,并对其溶磷耐盐能力、促生增产效果及其机理进行研究,为开发耐盐溶磷生物肥料提供高效真菌资源。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤来源: 采自内蒙古五原县轻中度盐碱农田的向日葵根围土壤样品共 150 个。盆栽土壤来自北京市石灰性潮土、安徽省阜阳黏性潮土、安徽水稻土和山东沿海盐潮土。土壤理化性状见表 1。

1.1.2 培养基: (1) 菌株筛选与培养: 无机磷培养基, PDA 培养基, 牛肉膏蛋白胨培养基等^[10]。(2) Pikovskaya 改良培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, (NH₄)₂SO₄ 0.5, 酵母抽提物 0.5, KCl 0.2, FeSO₄·7H₂O 0.001, MnSO₄·4H₂O 0.001, Ca₃(PO₄)₂ 5.0, MgSO₄·7H₂O 0.1, pH 7.0, 115 °C, 灭菌 30 min^[40]。(3) PDY 培养基: 土豆 200 g 与 1 L 蒸馏水混合煮沸 20 min 过滤, 滤液补水至 1 L, 加入蔗糖 10 g、酵母粉 1 g。(4) PDYA 培养基: PDY 加琼脂 18 g/L。(5) 耐盐培养基: PDYA 加 NaCl。分别配制 NaCl 含量为 0、5.0%、7.5%、10.0%和

12.5%的培养基。

1.1.3 供试磷源: (1) 分析纯磷酸三钙[Ca₃(PO₄)₂ (P₂O₅ 45.78%)]、分析纯磷酸铝[AlPO₄ (P₂O₅ 58.18%)]、购于天津科密欧试剂公司。(2) 磷矿粉: 贵州开阳磷矿粉(Kaiyang rock phosphate, Kaiyang RP, P₂O₅ 33.87%)、江苏锦屏磷矿粉(Jinping rock phosphate, JPRP, P₂O₅ 34.37%)、云南晋宁磷矿粉(Jinning rock phosphate, JNRP, P₂O₅ 33.79%)、河北钒山磷矿粉(Fanshan rock phosphate, FSRP, P₂O₅ 33.91%)和云南昆阳磷矿粉(Kunyang rock phosphate, Kunyang RP, P₂O₅ 34.13%), 磷矿石均粉碎过 100 目(149 μm)筛。(3) 钒钼黄比色法测定磷矿粉全磷含量, 钼锑抗比色法测定有效磷含量。Kaiyang RP、JPRP、JNRP、FSRP 和 Kunyang RP 有效磷含量(P₂O₅)分别为 0.37%、0.31%、0.29%、0.38%和 0.34%。

1.1.4 液质联用(Liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)试剂: (1) 有机酸标准品: 酒石酸(DL-Tartaric acid)、草酸(Oxalic acid)、柠檬酸(Citric acid)、苹果酸(DL-Malic acid)、乳酸(L(+)-Lactic acid)、琥珀酸(Succinic acid)和延胡索酸(Fumaric acid), 购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。(2) 植物激素标准品: 生长素(Auxin)、玉米素(Zeatin), 购于德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。磷酸二氢钾和磷酸为国产优级纯, 甲酸铵、丙酸和甲醇(Methyl alcohol)为色谱纯(美国 Tedia 公司)。实验用水为超纯水(电阻率为 18.20 MΩ·cm)。

表 1. 供试土壤理化性状

Table 1. The physico-chemical properties of test soils

Code	Soil types	Organic matter/(g/kg)	Total N/(g/kg)	Total P/(g/kg)	Total K/(g/kg)	Available nutrients/(mg/kg)	
						P	K
1	Paddy soils	17.46	1.55	0.63	21.28	5.58	185.99
2	Viscous fluvo-aquic soils	10.96	1.03	0.44	13.84	6.01	219.81
3	Salinized fluvo-aquic soils	21.61	0.43	0.76	22.17	5.94	318.43
4	Calcareous fluvo-aquic soils	31.22	1.03	0.82	19.74	8.26	129.63

1.1.5 Hoagland 培养液配方 (mol/L): K_2SO_4 8×10^{-4} , $MgSO_4$ 6.5×10^{-4} , KCl 1×10^{-4} , $Ca(NO_3)_2$ 2×10^{-3} , $CuSO_4$ 1×10^{-7} , $MnSO_4$ 1×10^{-6} , $EDTA-Fe$ 1×10^{-7} , H_3BO_3 1×10^{-5} , $ZnSO_4$ 1×10^{-6} , $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 5×10^{-9} 。用 0.01 mol/L NaOH 溶液和 0.01 mol/L HNO_3 溶液调节 pH 至 5.8^[41]。

1.1.6 供试菌株: 日本曲霉(*Aspergillus japonicus*) 菌株 M1 为本试验筛选菌株; 黑曲霉(*Aspergillus niger*) 菌株 DSM 821(ATCC 9142), 购自德国 Leibniz 研究所 DSMZ 微生物保藏和细胞培养中心(德国不伦瑞克)。黑曲霉菌 DSM 821 作为对照菌株。

1.1.7 主要试剂和仪器: 真菌总 DNA 提取试剂盒、*Taq* 酶和 dNTP 购自天根生化科技有限公司; 引物为 ITS1 和 ITS4 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 其他试剂为国产分析纯购自国药集团化学试剂有限公司。培养箱为 DHP-9162 型购自上海一恒科技有限公司; PCR 仪为 GeneAmp PCR System 9700; 高速离心机为 Heraeus 公司的 Sorvall Biofuge Stratos; 光学显微镜为 OLYMPUS BH-2; 扫描电子显微镜为 FEI-QUANTA200; 紫外分光光度仪为天美科技有限公司 UV-7501。三重串联四极杆液质联用仪器(美国 Agilent): 主机 Agilent LC 1290 Infinity2, Agilent QQQ 6470; 工作站: Agilent Masshunter。

1.2 溶磷菌株的分离鉴定

采用梯度稀释法获得系列稀释倍数的土壤菌悬液。称取 1 g 保藏于 4 °C 冰箱的新鲜土壤, 用 0.85% 灭菌的生理盐水将土壤样品稀释至 10^{-2} – 10^{-5} 倍, 分别吸取 0.1 mL 土壤悬液涂布于无机磷培养基平板上, 每个浓度土壤悬液重复涂布 3 个平板。置于培养箱中 28 °C 倒置培养, 选择溶磷圈较大的菌株, 转接到 PDA 固体培养基平板上, 纯化后接入 PDA 斜面保藏。

扫描电镜观察菌体形态在清华大学医学测试中心进行。主要步骤为: 离心后的菌体用 2.5% 戊二醛固定过夜, 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液漂洗 3 次, 每次 14 min; 依次用浓度为 50%、70%、80% 和 90% 的乙醇梯度脱水 14 min, 再用 100% 的乙醇脱水 3 次, 每次 14 min; 最后用叔丁醇:乙醇=1:1 和纯叔丁醇各洗 1 次, 每次 14 min。样品经冷冻干燥后做喷金处理, 固定于电导胶上置于 FEI-QUANTA200 型扫描电镜下观察。

1.3 供试菌株对难溶磷源的溶解效果研究

将 100 mL 含 5 g/L 难溶磷的 Pikovskaya 培养液盛入三角瓶中, 难溶磷磷源分别为磷酸三钙、磷酸铝、开阳磷矿粉(Kaiyang RP)、锦屏磷矿粉(JPRP)、晋宁磷矿粉(JNRP)、钒山磷矿粉(FSRP)和昆阳磷矿粉(Kunyang RP)。于 121 °C、 1.01×10^5 Pa 高压灭菌 30 min, 接种 1 mL 溶磷菌悬液于无菌培养基中。试验处理包括: (1) 对照(CK): 不接菌; (2) 黑曲霉菌 DSM 821: 第二对照; (3) 日本曲霉菌 M1。每个处理 3 次重复。置于 28 °C、160 r/min 摇床培养, 分别于 3、6、9 d 取菌液 5 mL, 12000 r/min、4 °C 离心 5 min, 取上清液测定有效磷含量。

1.4 供试菌株在磷酸三钙、磷酸铝和磷矿粉中溶磷过程的 pH 值变化

试验设置同 1.2.2 的方法, 分别测定在磷酸三钙、磷酸铝和 5 种磷矿粉中接种菌株 M1、DSM 821 时溶液 pH 值的变化。

1.5 供试菌株耐盐性测定

用无菌接种环从长满菌丝体的 PDY 培养液中挑取一个较大的小球体接入固体耐盐培养基中央, 置于 28 °C 恒温培养箱中, 从 3 d 开始每日观察并记录菌丝在不同含量 NaCl 的 PDYA 平板中的生长状况。

1.6 溶磷菌剂的制备

将若干草炭置于 5 L 三角瓶中, 121 °C、 1.01×10^3 Pa, 高压灭菌 30 min。供试溶磷菌株 M1、DSM 821 分别接种于 PDY 液体培养基中, 28 °C、170 r/min 摇床培养, 每日进行平板计数, 当菌液浓度达到 10^8 CFU/mL 时, 供试菌株与灭菌草炭混合均匀, 菌剂的干湿度为手攥成团、一碰即散。置于 28 °C 培养, 待菌数达 5×10^8 CFU/g 菌剂, 用于盆栽试验。

1.7 液质联用(LC-MS)测定日本曲霉 M1 溶磷过程中产生的有机酸

在 200 mL 三角瓶中装入 100 mL 的 Pikovskaya 液体培养基, 磷源分别为磷酸三钙、磷酸铝和开阳磷矿粉三种。灭菌后接种 1 mL 10^6 CFU 溶磷真菌 M1 的孢子悬液, 28 °C、170 r/min 摇床振荡培养 6 d。将菌液 12000 r/min 离心 2 min 取上清, 加入 2 滴 0.05% 百里酚以抑制微生物活动并防止有机酸分解。将菌液过水相 0.22 μ m 滤膜后上机测试。

1.7.1 有机酸标准液配制: 分别精确称取酒石酸(Tartaric acid)、草酸(Oxalic acid)、苹果酸(Malic acid)、柠檬酸(Citric acid)、乳酸(Lactic acid)、延胡索酸(Fumaric acid)和琥珀酸(Succinic acid) 7 种有机酸的标准品(精确至 0.0001 g), 用流动相 A 溶解稀释, 用孔径 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤, 定容于 50 mL 容量瓶中, 配制质量浓度为 100 mg/L 的储备液, 4 °C 冷藏。

1.7.2 标准曲线绘制: 根据文献及实际操作中紫外吸收灵敏度, 将草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、延胡索酸、琥珀酸按照 2.5 : 5.0 : 5.0 : 5.0 : 5.0 : 0.5 : 15.0 的比例配制混标, 逐级稀释成 5、10、20 倍分别为 a、b、c 和 d 级别的标准液, 现配现用。其中 a 级别标准溶液的质量浓度为 56.0、120.0、140.0、103.0、150.0、10.8、300.0 mg/L。

(1) 高效液相条件: 流动相 A 配制: 精确称量 KH_2PO_4 (精确至 0.0001 g), 用超纯水溶解配制浓度为 0.01 mol/L, 加入适量 H_3PO_4 调节 pH 值至 2.73, 经水系孔径为 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤, 超声脱气后备用。动相 B 为 0.1% 丙酸水: 甲醇=80 : 20, 经超声脱气后备用。色谱柱为 ZORBAX SB C₁₈ (5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm), 流速为 0.5 mL/min, 柱温为 25 °C, 进样量 10 μ L, 运行时间 10 min。

(2) 质谱条件: 负离子扫描, SIM 模式, 干燥气温度 300 °C, 鞘气温度 250 °C, 毛细管电压 3500 V, 喷嘴电压 500 V。

1.8 液质联用(LC-MS)测定日本曲霉 M1 溶磷过程中分泌的植物激素

试验设计同 1.2.6 的方法。植物激素标准液配制: 分别精确称取生长素(Auxin)和玉米素(Zeatin)标准品(精确至 0.0001 g), 以甲醇溶解稀释, 用孔径 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤, 定容于 50 mL 容量瓶中, 配制质量浓度为 100 mg/L 的储备液, 4 °C 冷藏。

(1) 高效液相条件: 流动相为 5 mmol 甲酸铵水: 甲醇=70 : 30。色谱柱为 Eclipse XDB C₁₈ (3.5 μ m, 2.1 mm \times 150 mm), 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 25 °C, 进样量 10 μ L, 运行时间 6 min。

(2) 质谱条件: 正离子扫描, MRM 模式, 干燥气温度 300 °C, 鞘气温度 250 °C, 毛细管电压 3500 V, 喷嘴电压 500 V。

1.9 不同类型土壤与溶磷菌株匹配性盆栽试验

玉米种子 0.4% 的次氯酸钠表面灭菌, 灭菌蒸馏水冲洗 4 次除去次氯酸钠, 再用 55 °C 灭菌蒸馏水浸种, 在 30 °C 温箱培养过夜后将种子转入灭菌纱布上催芽。试验使用塑料盆(18 cm \times 15 cm \times 15 cm), 每盆装土壤 750 g。菌剂处理为: (1) 对照(CK)。不接菌, 施用难溶磷; (2) 溶磷菌 DSM 821。接菌, 施用难溶磷; (3) 溶磷菌 M1。接菌, 施用难

溶磷。供试磷源为 3 种, 分别是 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 AlPO_4 和开阳磷矿粉(KYRP), 每种磷源用量为 1.0 g/kg 土壤。菌剂使用量为 5 g/kg 土壤, 菌剂与土壤混合均匀。试验采用完全随机设计方案, 在水稻土(1)、黏性潮土(2)、盐潮土(3)和石灰性潮土(4), 添加难溶磷磷酸三钙、磷酸铝和开阳磷矿粉(KYRP), 分别接入溶磷菌 M1、DSM 821, 以不接菌为对照 CK。每个处理重复 4 次, 共计 144 盆。温室种植(2014 年 3 月 28 日种植, 5 月 4 日收获, 北京白天平均 28 °C, 夜间平均 18 °C), 每盆播种 2 粒发芽的玉米种子。生长期间每 10 d 浇灌植物营养液 100 mL/盆。采集玉米根际土壤样品和收获玉米植株, 测定植株鲜重、干重和土壤有效磷含量。玉米品种为郑单 958。

1.10 溶磷菌株小区试验

2014 年 5 月在北京市唐家岭布置了田间小区试验。供试菌株为 M1、DSM 821 和 ATCC20851 为对照菌株, 小区试验地面积为 10 m×4 m, 将其划分为 1.8 m×0.8 m 的小区, 每个小区接种菌剂 300 g, 菌剂处理为: (1) 对照(CK)、不接种溶磷菌剂; (2) 接种 ATCC20851 溶磷菌剂; (3) 接种 DSM 821 溶磷菌剂; (4) 接种 M3 溶磷菌剂; (5) 接种 M1 溶磷菌剂。每

个处理重复 4 次, 溶磷菌剂与表层 15 cm 土壤混合均匀后培垄(200 cm×20 cm×20 cm), 每个垄种植花生 16 棵, 155 d 收获。测定花生植株鲜重和干重、花生果实鲜重和干重。将小区产量折合为每公顷的产量, 收获时采集花生根部土壤测定土壤有效磷含量。

1.11 数据统计分析方法

采用 SAS 9.2 统计软件对数据进行统计分析(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)。

利用 SPSS 19.0 软件中的一般线性模型(General Lineral Model for Univariate, GLM-Univariate)进行多因素方差分析。

2 结果和分析

2.1 溶磷菌的筛选、鉴定

从向日葵根围土壤样品中共分离到 5 株溶磷真菌, 其中真菌 M1 在无机磷培养基上生长良好(图 1-A), 5 d 能够将 9 cm 培养皿内的无机磷全部溶解, 说明该菌具有较强的溶磷能力, 故选择菌株 M1 作为本试验的供试菌株。菌株 M1 在 PDA 培养基中 28 °C 培养(图 1-B), 菌落生长迅速, 菌丝为白色, 2 d 后出现棕色分生孢子, 5 d 时分生

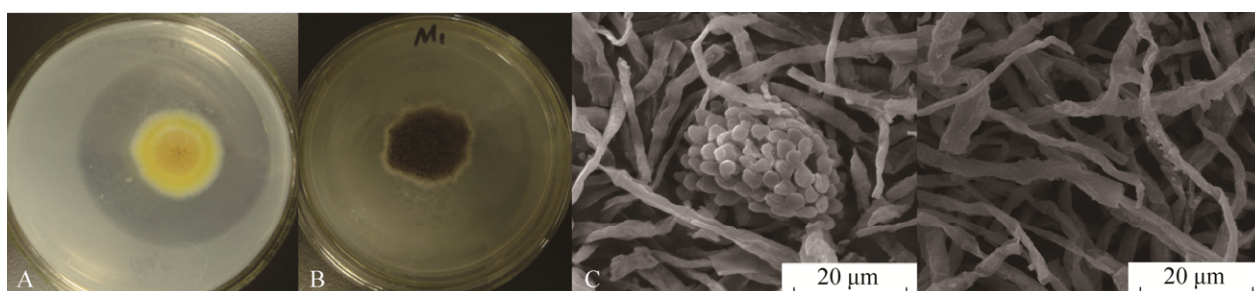


图 1. 日本曲霉菌 M1 形态特征

Figure 1. Characteristics of *Aspergillus japonicus* isolate M1. A: colony grew of strain M1 on PDA medium; B: a phosphate solubilization clear halo of isolate M1 on PVK plate; C: observed the hyphae and conidial heads of isolate M1 under Scanning Electron Microscope.

孢子多且易脱落,颜色变深为棕褐色,有少量渗出液,无明显气味,背面为浅黄色。扫描电镜观察菌株 M1 的孢子为椭圆形(图 1-C),直径约 5 μm ,脱水过程中孢子大量脱落,菌丝无隔断。

利用 ITS rDNA 特异引物对菌株进行 PCR 扩增得到 538 bp 的目的 DNA 片段,提交到 GenBank (登录号 MF073328)。利用 BLAST 软件与 GenBank 的序列进行同源性比较,结果显示菌株 M1 与日本曲霉(*Aspergillus japonicus*)的同源性达到 99%。利用 MEGA 6.0 的 Neighbor-Joining 软件进行系统发育树的构建(图 2),菌株 M1 与 *Aspergillus japonicus* 处于相同的发育地位,说明菌株 M1 与 *Aspergillus japonicus* 在 ITS rDNA 序列上具有高度的相似性,即为某一共同祖先经过趋异进化而形成的不同序列。因此,形态学和 ITS 序列鉴定结果一致,菌株 M1 为日本曲霉。

2.2 溶磷菌株 M1 的溶磷效果研究

2.2.1 溶磷菌株对不同难溶磷酸盐的作用效果:

接种溶磷菌株的溶磷量明显高于对照(图 3, 图 4)。以磷酸三钙为磷源的处理中,接种溶磷菌株摇瓶中培养 3 d,菌株 M1 处理下溶液有效磷含量为

579.37 mg/L,DSM 821 菌株处理的溶液有效磷含量为 341.75 mg/L;摇瓶中接种菌株 6 d,菌株 M1 处理的溶液有效磷达到 1020.89 mg/L,DSM 821 处理的培养液中有有效磷含量达到 696.18 mg/L,与 3 d 相比分别增加 441.49 mg/L 和 354.43 mg/L,CK 处理有效磷含量仅为 24.05 mg/L;摇瓶培养 9 d 时,接种菌株 M1 的处理有效磷达到 980.89 mg/L,比 DSM 821 的有效磷增加 294.16 mg/L,磷酸三钙的溶解率为 60.82%,菌株 DSM 821 对磷酸钙的溶解率仅为 42.58%。以磷酸铝为磷源的液体培养试验中,接种菌株摇瓶培养 3 d 时,菌株 M1 比 DSM 821 的有效磷增加 106.15 mg/L;接种菌株摇瓶培养 6 d 时,菌株 M1 处理的溶液有效磷含量达到 995.69 mg/L (比 3 d 增加 633.13 mg/L),DSM 821 处理的有效磷含量达到 772.86 mg/L (比 3 d 增加 516.45 mg/L),CK 有效磷含量仅为 21.28 mg/L;摇瓶接种菌株 9 d 时,菌株 M1 有效磷含量达到 976.49 mg/L,比菌株 DSM82 的有效磷增加 260.59 mg/L,M1 对磷酸铝的溶解率为 47.65%,菌株 DSM 821 对磷酸铝的溶解率为 34.93%。可见菌株 M1 对磷酸三钙和磷酸铝的溶解能力大于菌株 DSM 821,更显著高于对照。

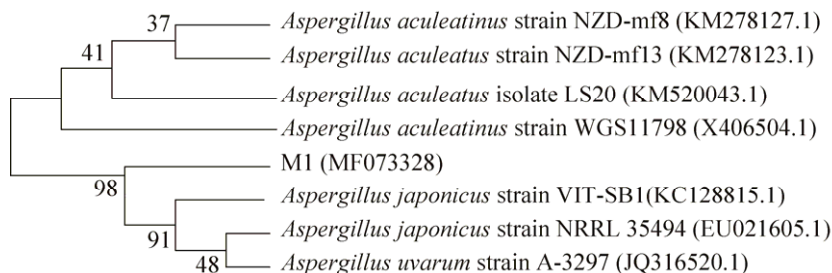


图 2. 菌株 M1 基于 ITS rDNA 序列同源性构建的系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree of M1 and reference *Aspergillus* species. Evolutionary distances showed in the figure 1 were calculated by MEGA 6.0; Bootstrap=1000. Bar, 0.05 substitution per nucleotide. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap.

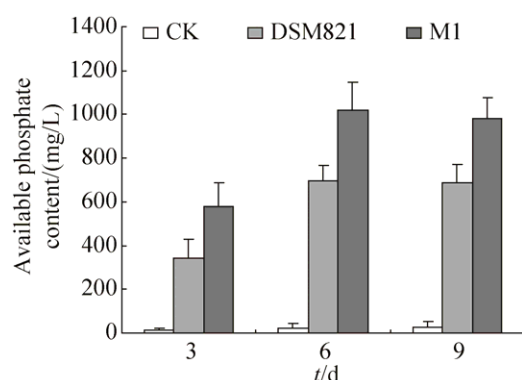


图 3. 菌株 M1 和 DSM 821 对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的溶解量
Figure 3. Soluble phosphorus content in $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ broth medium by strain M1 and DSM 821.

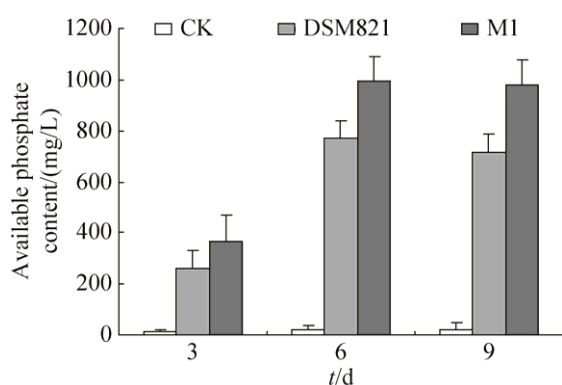


图 4. 菌株 M1 和 DSM 821 对 AlPO_4 的溶解量
Figure 4. The soluble phosphorus content in AlPO_4 by strain M1 and DSM 821.

2.2.2 溶磷菌株对不同磷矿粉的作用效果：液体摇床培养条件下，以我国 5 种磷矿粉为磷源，接种菌株 M1 与菌株 DSM 821，结果显示，2 株溶磷菌株的溶磷能力显著高于对照，菌株 M1 的溶磷量显著大于菌株 DSM 821 (表 2)，摇床培养 6 d 时，菌株 M1 对开阳、昆阳和晋宁磷矿粉中溶磷量分别达到 236.98、220.33、363.64 mg/L，比对照分别增加 233.57、216.37、359.59 mg/L，锦屏和钒山磷矿粉中溶磷量与对照之间没有差异；菌株 DSM 821 对磷矿粉的溶磷能力略低于菌株 M1，比对照增加 113.94–359.59 mg/L，而 DSM

表 2. 菌株对不同来源磷矿粉的溶解量(6 d)

Table 2. Soluble P content released from RP by fungi in 6 d.

Strains	Soluble phosphate content/(mg/L)				
	Kaiyang RP	JPRP	FSRP	Kunyang RP	JNRP
CK	3.51c	3.39 b	4.05 b	3.86 c	4.05 c
DSM 821	117.45 b	18.62 a	20.12 a	206.33 b	281.64 b
M1	236.98 a	5.92 b	4.78 b	220.33 a	363.64 a
Signif (P)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

The letters indicate the significant difference at 5% level.

821 对锦屏和钒山磷矿粉的溶磷量分别为 18.62 mg/L 和 20.12 mg/L，比对照增加 15.24 mg/L 和 16.07 mg/L，差异达到显著水平。与菌株 DSM 821 相比，菌株 M1 接种开阳磷矿粉处理的溶液有效磷增加 119.53 mg/L，接种昆阳磷矿粉处理的溶液有效磷增加 14 mg/L，接种晋宁磷矿粉处理的溶液有效磷增加 82 mg/L。由此说明，菌株 M1 对于开阳、昆阳和晋宁磷矿粉的溶磷能力高于对照菌株 DSM 821。

综上所述，菌株 M1 在磷酸三钙、磷酸铝开阳磷矿粉、昆阳磷矿粉、晋宁磷矿粉的溶解能力大于菌株 DSM 821；对磷酸三钙的溶解能力大于磷酸铝和磷矿粉。

2.3 磷菌株对难溶磷培养液 pH 值的影响

2.3.1 无机难溶磷液体培养基中 pH 值变化：在起始 pH 值为 7.0 的磷酸三钙和磷酸铝培养液中 (图 5)，菌株 M1、DSM 821 与 CK 相比，溶液 pH 值明显下降且差异显著。磷酸三钙培养液中，菌株 M1 培养 7 d 时溶液 pH 值降至最低为 3.36，降幅大于菌株 DSM 821，差异达显著水平。磷酸铝培养液中，菌株 M1 培养 7 d 时溶液 pH 值降至最低为 2.98，降幅小于菌株 DSM 821，差异不显著。

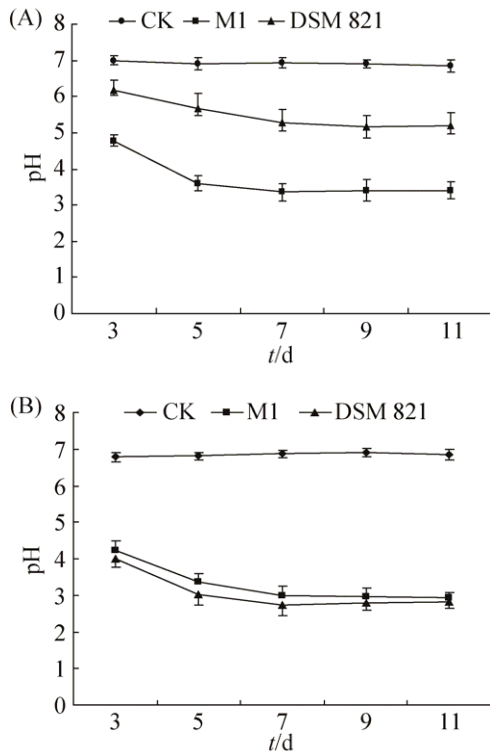


图 5. Pikovskaya 培养液[难溶磷分别为 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (A)、 AlPO_4 (B)]接种菌株 M1 后 pH 值的变化

Figure 5. pH value change in $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (A) and AlPO_4 (B) mediated PVK broth inoculated with isolate M1.

2.3.2 溶磷菌株对磷矿粉液体培养基 pH 值的影响: 溶磷菌 M1 和 DSM 821 接种于分别使用 5 种磷矿粉的液体培养基中, 结果显示, 所有接种处理的溶液 pH 值均比 CK 显著下降(表 3)。菌株 M1 在开阳磷矿粉中 pH 值下降至最低(3.97), 菌株 DSM 821 在晋宁磷矿粉中 pH 值最低(4.18)。菌株 M1 使得 5 种磷矿粉的溶液 pH 值均低于菌株 DSM 821, 差异显著。

2.4 溶磷菌株耐盐性能力测定

溶磷菌株 M1、DSM 821 分别接入耐盐培养基中(表 4), 与 CK (NaCl 含量为 0)相比, 在盐含量为 5% 的培养基中菌株 DSM 821 的生长受抑制, 而菌株 M1 的生长状况与 CK 中相似; 在盐含量为

7.5% 时, 菌株 DSM 821 的生长严重被抑制, 菌株 M1 的抑制程度低于 DSM 821; 在盐含量为 10% 时, 菌株 DSM 821 无生长, 菌株 M1 被严重抑制。可见, 溶磷真菌 M1 耐盐胁迫能力较好, 最高可耐受 10% 的盐浓度。

2.5 不同难溶磷对溶磷菌产酸的影响

菌株 M1 接入分别含磷酸三钙、磷酸铝或开阳磷矿粉的 Pikovskaya 培养液中, 利用 LC-MS 法测定溶液中有机的种类和浓度(图 6)。结果显示, 菌株在不同难溶磷培养液中, 产生有机酸的种类相同, 但浓度有差异。菌株 M1 在 3 种难溶磷的培养液中, 以分泌草酸和柠檬酸为主, 其次为苹果酸、乳酸和琥珀酸, 微量的酒石酸和延胡索酸。菌株 M1 在不同难溶磷培养条件下, 总有机酸分泌量 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{AlPO}_4 > \text{磷矿粉}$, 分别为 1161.63、984.10、940.77 mg/L。

表 3. 接种溶磷菌株 6 d 后培养液的 pH 值

Table 3. pH value of RP-containing liquid medium with fungi after 6 d incubation

Strains	Insoluble rock phosphate				
	Kaiyang RP	JPRP	FSRP	Kunyang RP	JNRP
CK	7.69 a	7.84 a	7.85 a	7.91 a	6.94 a
M1	3.97 c	4.03 c	4.17 c	4.34 c	3.99 c
DSM 821	4.21 b	4.38 b	4.32 b	4.54 b	4.18 b

The letters indicate the significant difference at 5% level.

表 4. 溶磷菌 M1、DSM 821 接入 PDYA 耐盐培养基生长状况(5 d)

Table 4. Isolate M1 and DSM 821 growth on NaCl containing PDYA plate at 5 d

Strains	NaCl content/%				
	0	5.0	7.5	10.0	12.5
M1	+++	+++	++	+	-
DSM 821	+++	++	+	-	-

-, +, ++, +++ represent no colony, colonies inhibited severely, colonies inhibited slightly, colonies thriving, respectively.

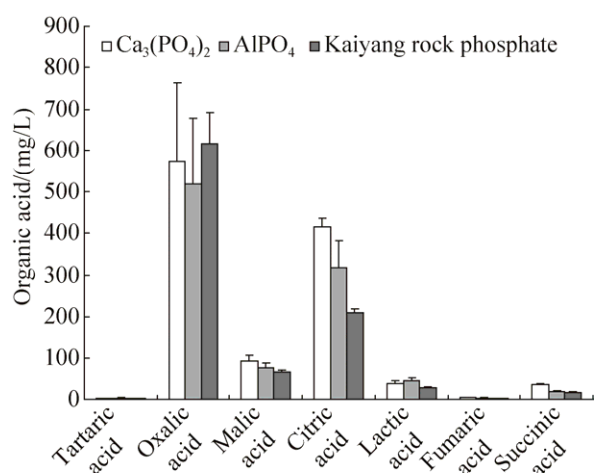


图 6. $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 AlPO_4 、开阳磷矿粉对溶磷真菌 M1 产生有机酸(6 d)的影响

Figure 6. Effects of organic acids produced by isolate M1 in different phosphate sources (6 d).

2.6 不同难溶磷对溶磷菌分泌植物激素的影响

菌株 M1 接入分别含磷酸三钙、磷酸铝和开阳磷矿粉的 Pikovskaya 培养液中, 利用 LC-MS 法测定溶液中生长素和玉米素(表 5)。结果表明, 菌株 M1 在不同难溶磷中分泌生长素的含量差异显著, 而分泌玉米素含量无明显差异。菌株 M1 生长素分泌量 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ >磷矿粉> AlPO_4 , 分别为 77.58、32.29、18.45 mg/L; 分泌玉米素含量磷矿粉> $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ > AlPO_4 , 分别为 0.11、0.07、0.06 mg/L。

表 5. $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 AlPO_4 和开阳磷矿粉对溶磷真菌 M1 产生植物激素(6 d)的影响

Table 5. Effects of phytohormone produced by isolate M1 in different phosphate sources (6 d)

Treatment	c(phytohormone)/(mg/L)	
	Auxin	Zeatin
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	77.58 a	0.07 a
AlPO_4	18.45 b	0.06 a
KYRP	32.29 b	0.11 a
Signif (P)	0.05	0.05

The letters indicate the significant difference at 5% level.

2.7 溶磷真菌与难溶磷及不同土壤适配性研究

2.7.1 溶磷菌株对玉米盆栽土壤难溶磷的溶解效果

接种菌剂 M1 和 DSM 821 明显提高土壤中有有效磷含量, 与 CK 相比, 差异均达显著性水平(表 6)。菌剂 M1 分别接种于 4 种土壤, 结果显示, 所有 4 种土壤的有效磷含量皆高于对照和 DSM821, 而菌剂 DSM821 有效磷含量高于对照。以土壤种类为主要因素, 对所有接种菌剂和不同磷源处理下的数据进行平均, 结果显示, 4 种土壤中以 1 号水稻土有效磷含量最高, 平均为 33.08 mg/kg, 表明溶磷菌剂 M1 和 DSM821 在水稻土活化难溶磷的能力最强; 4 号石灰性潮土中有效磷含量最低, 为 31.40 mg/kg, 说明菌剂 M1 和 DSM821 在该土壤中溶磷效果较差, 表明菌剂 M1 和 DSM821 在水稻土中溶解难溶磷的能力高于其他 3 种土壤。接种菌剂和不接菌(CK)处理下, 接种菌剂 M1 土壤有效磷含量最高(33.22 mg/kg), CK 土壤有效磷含量最低(9.59 mg/kg), 接种菌剂 M1 比对照增加 23.61 mg/kg; 接种菌剂 DSM 821 土壤有效磷含量为 30.91 mg/kg, 比对照增加 21.32 mg/kg。不同磷源处理下, 以磷酸铝为磷源的土壤有效磷含量最高, 为 32.31 mg/kg; 以开阳磷矿粉为磷源的土壤有效磷含量最低, 为 31.58 mg/kg, 表明菌剂 M1 和 DSM821 在土壤中活化磷酸铝的能力最强, 优于磷酸三钙和磷矿粉。

4 种土壤、2 种菌剂和 3 种难溶磷源共 36 个处理中, 以磷酸铝为磷源的水稻土接种菌剂 M1 的处理, 土壤有效磷含量最高(37.13 mg/kg), 与 CK、DSM 821 相比差异显著, 比 CK 增加 27.56 mg/kg, 增长率为 287.98%; 而黏性潮土则以开阳磷矿粉为磷源的 CK 处理的土壤有效磷含量最低, 仅 8.92 mg/kg, 表明磷矿粉在不接菌剂的条件下, 土壤自身对磷矿粉的活化能力较弱。

表 6. 玉米盆栽试验中土壤有效磷含量

Table 6. Soil available P influenced by soil, insoluble P and fungi in corn pot experiment

Soil No.	Strains	Treatment	Available phosphorus/(mg/kg)	Mean/(mg/kg)	Increase rate/%
1	M1	Ca ₃ (PO ₄) ₂	32.40 g	33.73	298.52
		AlPO ₄	37.13 a		287.98
		KYRP	31.66 i		272.91
	DSM 821	Ca ₃ (PO ₄) ₂	31.77 hi	32.45	290.77
		AlPO ₄	35.74 c		273.46
		KYRP	29.83 n		251.35
	CK	Ca ₃ (PO ₄) ₂	8.13 w	8.73	—
		AlPO ₄	9.57 s		—
		KYRP	8.49 v		—
2	M1	Ca ₃ (PO ₄) ₂	36.42 b	34.49	243.58
		AlPO ₄	35.03 d		229.85
		KYRP	32.02 h		258.97
	DSM 821	Ca ₃ (PO ₄) ₂	31.75 i	29.94	199.53
		AlPO ₄	27.81 p		161.86
		KYRP	30.25 m		239.13
	CK	Ca ₃ (PO ₄) ₂	10.60 q	10.05	—
		AlPO ₄	10.62 q		—
		KYRP	8.92 u		—
3	M1	Ca ₃ (PO ₄) ₂	31.35 j	32.51	235.29
		AlPO ₄	32.87 f		223.84
		KYRP	33.31 e		228.50
	DSM 821	Ca ₃ (PO ₄) ₂	30.53 l	30.60	226.52
		AlPO ₄	29.42 o		189.85
		KYRP	31.84 hi		214.00
	CK	Ca ₃ (PO ₄) ₂	9.35 st	9.88	—
		AlPO ₄	10.15 r		—
		KYRP	10.14 r		—
4	M1	Ca ₃ (PO ₄) ₂	33.01 f	32.17	260.77
		AlPO ₄	31.02 k		232.12
		KYRP	32.47 g		204.60
	DSM 821	Ca ₃ (PO ₄) ₂	31.32 j	30.66	242.30
		AlPO ₄	29.42 o		214.99
		KYRP	31.23 jk		192.96
	CK	Ca ₃ (PO ₄) ₂	9.15 tu	9.72	—
		AlPO ₄	9.34 st		—
		KYRP	10.66 q		—

The letters indicate the significant difference at 5% level.

对玉米盆栽试验中土壤有效磷含量进行多因素方差分析, 结果表明溶磷菌株、土壤类型、难溶磷及其交互作用, 差异显著。在统计中由于偏 Eta 方(Partial Eta Squared, η^2)值表示主效应或交互效应的大小, 上述因素及其交互作用对土壤有效磷含量效应的大小次序为溶磷菌剂

($\eta^2=0.966$)>难溶磷($\eta^2=0.880$)>溶磷菌剂×难溶磷($\eta^2=0.825$)>溶磷菌剂×土壤×难溶磷($\eta^2=0.712$)>土壤($\eta^2=0.485$)>土壤×难溶磷($\eta^2=0.357$)>溶磷菌剂×土壤($\eta^2=0.353$)。溶磷菌剂、难溶磷单因素及两者互作效应值分别为 0.966、0.880 和 0.825, 土壤类型单因素效应值仅为 0.485。因此, 溶磷菌剂、难

溶磷及其交互作用是影响土壤有效磷含量的决定性因素。

综上说明, 菌剂 M1 比菌剂 DSM 821 对提高土壤有效磷的含量具有显著优势, 菌剂 M1 与水稻土适配性最佳, 菌剂 DSM 821 与黏性潮土适配

性较差, 菌剂 M1 与 4 种土壤的适配性均高于菌剂 DSM 821, 具有较强应用潜力。

2.7.2 溶磷菌株对玉米盆栽植株的促生效果: 对玉米生物量的影响与土壤有效磷含量相同, 接种菌剂 M1 和 DSM 821 能提高玉米生物量(表 7)。同

表 7. 溶磷菌株、难溶磷和土壤类型对玉米生物量的影响

Table 7. Effect of P-solubilizing fungi, insoluble phosphate and soil types on corn biomass

Soil No.	Strains	Treatment	Shoot fresh weight/g	Increase rate/%	Shoot dry weight/g	Increase rate/%
1	M1	Ca ₃ (PO ₄) ₂	35.17 a	90.91	6.27 a	268.28
		AlPO ₄	35.06 ab	90.27	6.10 a	255.69
		KYRP	29.93 bcde	48.95	5.93 a	232.82
	DSM 821	Ca ₃ (PO ₄) ₂	29.72 cde	61.31	4.37 bc	156.83
		AlPO ₄	31.15 abcd	69.05	4.65 b	170.85
		KYRP	26.72 cdef	32.96	3.78 c	112.20
	CK	Ca ₃ (PO ₄) ₂	18.42 hijk	—	1.70 def	—
		AlPO ₄	18.43 hijk	—	1.72 def	—
		KYRP	20.10 hij	—	1.78 def	—
2	M1	Ca ₃ (PO ₄) ₂	31.26 abc	45.03	6.01 a	214.66
		AlPO ₄	31.12 abcd	44.44	5.94 a	205.13
		KYRP	30.07 abcde	33.89	5.91 a	207.55
	DSM 821	Ca ₃ (PO ₄) ₂	26.11 defg	21.15	3.92 bc	105.24
		AlPO ₄	26.83 cdef	24.54	4.28 bc	119.77
		KYRP	25.25 efg	12.42	3.59 c	86.98
	CK	Ca ₃ (PO ₄) ₂	21.55 ghi	—	1.91 de	—
		AlPO ₄	21.55 ghi	—	1.95 d	—
		KYRP	22.46 fgh	—	1.92 de	—
3	M1	Ca ₃ (PO ₄) ₂	16.67 ijklm	53.53	1.82 def	46.28
		AlPO ₄	16.98 ijkl	48.87	1.80 def	39.34
		KYRP	15.62 jklmn	48.64	1.69 def	30.81
	DSM 821	Ca ₃ (PO ₄) ₂	14.39 klmno	32.49	1.71 def	37.83
		AlPO ₄	11.94 lmno	4.67	1.45 def	12.40
		KYRP	11.49 no	9.32	1.42 def	10.27
	CK	Ca ₃ (PO ₄) ₂	10.86 no	—	1.24 def	—
		AlPO ₄	11.40 no	—	1.29 def	—
		KYRP	10.51 no	—	1.29 def	—
4	M1	Ca ₃ (PO ₄) ₂	11.72 mno	21.68	1.29 def	27.16
		AlPO ₄	12.53 lmno	5.45	1.39 def	22.15
		KYRP	10.85 no	2.14	1.31 def	26.88
	DSM 821	Ca ₃ (PO ₄) ₂	11.67 mno	21.13	1.29 def	27.16
		AlPO ₄	12.16 lmno	2.34	1.21 def	5.70
		KYRP	10.74 no	1.11	1.13 ef	9.20
	CK	Ca ₃ (PO ₄) ₂	9.63 o	—	1.01 f	—
		AlPO ₄	11.88 lmno	—	1.14 def	—
		KYRP	10.62 no	—	1.03 f	—

The letters indicate the significant difference at 5% level.

种土壤中,接种菌剂 M1 的玉米生物量均高于菌剂 DSM 821。4 种土壤中接种菌剂和不同磷源处理下,1 号水稻土中玉米生物量最高,鲜重、干重分别为 31.29 g 和 5.18 g,表明菌剂 M1 和 DSM 821 在水稻土中对玉米的促生效果最好;4 号石灰性潮土中玉米生物量最低,鲜重、干重分别为 11.61 g 和 1.27 g,说明菌剂 M1 和 DSM821 在石灰性潮土中促生效果较差。接种菌剂和不接菌(CK)处理下,接种菌剂 M1 的玉米生物量最高,鲜重、干重分别为 23.08 g 和 3.79 g;CK 处理的玉米生物量最低,鲜重、干重分别为 15.61 g 和 1.50 g。

水稻土中使用磷酸三钙的同时接种菌剂 M1 处理,植株干重增长率最大,为 268.28%;石灰性潮土中接种菌剂 DSM 821 以开阳磷矿粉为磷源的处理中,植株鲜重增长率最小,为 1.11%。接入菌剂 M1 与 DSM821 相比,M1 的植株干重和鲜重都有增加。表明菌剂 M1 在 4 种土壤中对玉米生物量的促生效果好于菌剂 DSM 821。

对盆栽试验中玉米生物量进行统计,结果表明溶磷菌株、土壤类型、难溶磷及其交互作用,差异达显

著性水平(图 7)。其对玉米生物量最大效应值为:菌剂(鲜重 $\eta^2=0.952$ 、干重 $\eta^2=0.960$)、难溶磷(鲜重 $\eta^2=0.774$ 、干重 $\eta^2=0.922$),而土壤效应值较低(鲜重 $\eta^2=0.110$ 、干重 $\eta^2=0.078$)。可见,溶磷菌剂、难溶磷及其交互作用是影响玉米生物量的决定性因素。

综上所述,菌剂 M1 对玉米生物量的作用效果优于菌剂 DSM821,菌剂 M1 与 4 种土壤的适配性均高于菌剂 DSM 821。

2.8 溶磷菌剂对小区试验花生生产量的影响

接种菌剂对花生的生长有明显促生效果,施加菌剂花生植株的鲜重和干重比对照增加显著,对花生生产量的促生效果为菌剂 M1>DSM 821>ATCC20851>CK (图 8)。

添加菌剂 M1 对花生的干重、鲜重促生作用最好,与 CK 相比,菌剂 M1 处理的植株鲜重、干重分别增加 43.92%和 27.67%,达 13.50 t/hm²和 6.69 t/hm²;施加菌剂 ATCC20851,植株鲜重、干重比 CK 分别增加 13.96%和 16.60%,达到 10.69 t/hm²和 6.11 t/hm²;菌剂 DSM 821 处理的植株鲜重、干重比 CK 分别增加 18.87%和 14.31%,达 11.15 t/hm²

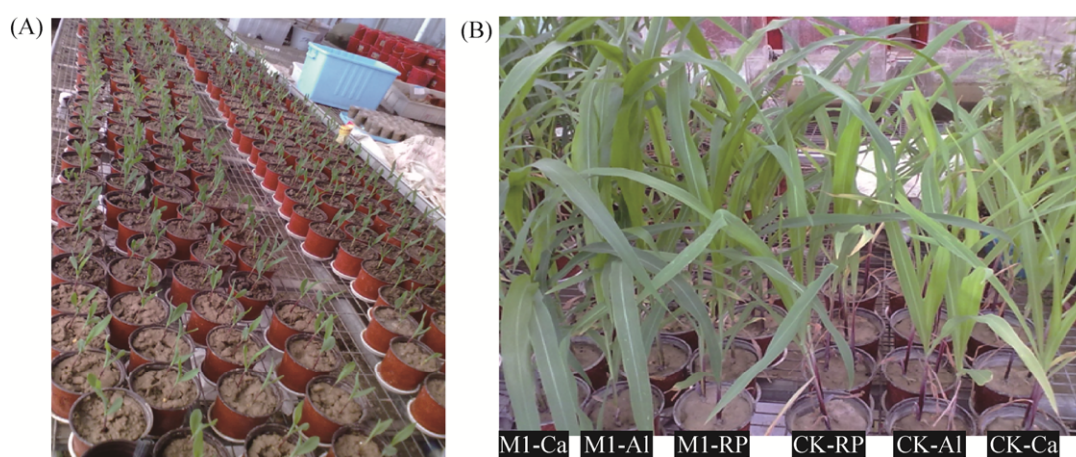


图 7. 溶磷菌株对玉米促生效果的盆栽试验(37 d)

Figure 7. Inoculated with soluble phosphate fungi for crop growth promotion in pot experiment (37 d). A: the period of seeding emergence; B: jointing stage.

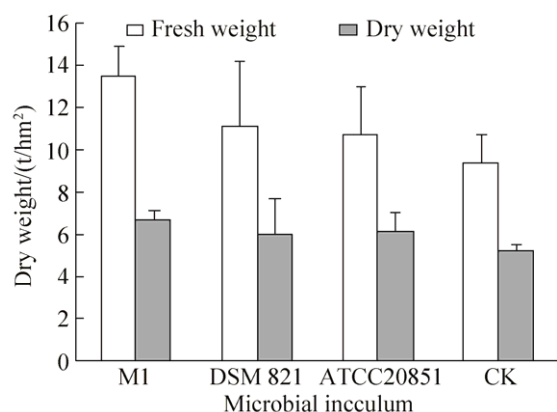


图 8. 不同菌株处理下的花生植株鲜干重

Figure 8. The shoot fresh and dry weight of peanut with different strains.



图 9. 溶磷菌株对花生的促生效果

Figure 9. Inoculated with soluble phosphate strains for peanut growth promotion in field experiment.

和 5.99 t/hm²。添加不同的菌剂对花生植株的促生效果不同, 菌剂 M1 与 ATCC 20851 相比, 植株鲜重提高 2.81 t/hm², 干重提高 0.58 t/hm²; 菌剂 M1

与菌剂 DSM 821 相比, 植株的鲜重、干重分别增加 2.35 t/hm² 和 0.70 t/hm²。综上表明, 添加菌剂 M1 对小区试验花生生物量的促生效果最好。

2.9 小区试验供试菌株对花生果实产量及土壤有效磷的影响

研究结果表明(表 8), 施加菌剂与 CK 相比, 花生果实鲜重与干重差异显著。对花生果实的促生效果为菌剂 M1>ATCC20851>DSM 821>CK。对花生果实产量影响最大的为菌剂 M1, 比 CK 花生果实鲜重、干重增产 1.39 t/hm² 和 0.81 t/hm², 达 5.35 t/hm² 和 3.65 t/hm²; 菌剂 ATCC20851 处理下的花生果实鲜重、干重, 比 CK 增产 0.80 t/hm² 和 0.50 t/hm², 达 6.15 t/hm² 和 4.15 t/hm²。菌剂 M1 比菌剂 ATCC20851 处理的花生果实鲜重、干重增加 9.59% 和 7.47%。

添加菌剂能显著提高土壤中有有效磷含量(表 8), 与对照相比差异显著。对土壤中有有效磷含量影响最大的为菌剂 M1, 与 CK 比增加 91.67% 达 35.58 mg/kg; 菌剂 DSM 821 与 CK 比土壤有效磷含量增加 9.58 mg/kg, 达到 28.14 mg/kg; 菌剂 ATCC 20851 与 CK 比, 土壤有效磷含量增加 42.02%, 达 26.36 mg/kg。菌剂处理之间土壤有效磷含量差异显著, 菌剂 M1 与 ATCC20851 相比, 土壤有效磷含量增加 34.98%。综上可见, 菌剂 M1 在小区试验中对花生产量以及土壤磷养分促进效果最好。

表 8. 不同溶磷菌株对花生产量和土壤有效磷的作用效果

Table 8. Effects of P-solubilizing strains on peanut yield and soil available phosphorus

Treatment	Fresh weight/(t/hm ²)	Dry weight/(t/hm ²)	Dry weight growth rate/%	Soil available phosphorus/(mg/kg)	Increased rate/%
CK	5.35 d	3.65 c	—	18.56 d	—
ATCC 20851	6.15 b	4.15 b	13.70	26.36 c	42.02
DSM 821	5.75 c	4.05 b	10.96	28.14 c	51.56
M1	6.74 a	4.46 a	22.19	35.58 a	91.67

The letters indicate the significant difference at 5% level.

3 讨论

溶磷微生物具有提高土壤有效磷含量、促进作物生长的作用,已报道的溶磷微生物有 36 个属、89 种,以及数以万计的溶磷菌株^[42]。目前,溶磷真菌筛选报道的主要是曲霉菌(*Aspergillus*)、青霉菌(*Penicillium*)、木霉菌(*Trichoderma*)、酵母菌(*Saccharomyces*)、正青霉菌(*Eupenicillium*)、篮状菌(*Talaromyces*)、根霉菌(*Rhizopus*)、镰刀菌(*Fusarium*)、小菌核菌(*Sclerotium*)和轮枝菌(*Verticillium*)等,其中绝大部分为青霉菌和曲霉菌。研究人员已从世界各地不同类型土壤中分离到大量高效溶磷曲霉,研究人员从美国哥伦比亚和墨西哥种植咖啡的酸性红壤和热带氧化土壤中筛选到曲霉菌 O1-12 和 O1-40^[43]、在夏威夷火山灰土中分离到黑曲霉^[44];从锡金农田土壤中筛选到烟曲霉^[45];从中国北方石灰性土壤中分离到黑曲霉 P85^[14],印度、伊拉克、加拿大、埃及等国科学家从石灰性土壤中分离到塔宾曲霉^[25]、黑曲霉^[11]、泡盛曲霉菌^[18]和臭曲霉^[46]等高效溶磷菌。本研究获得的具有耐盐、溶磷特性的真菌 M1,鉴定为日本曲霉,迄今未见溶磷耐盐功能的报道。

溶磷菌株对难溶磷源具有特异性选择,但能溶解的磷源种类越多,能力越强,应用前景越好。日本曲霉菌 M1 在液体摇瓶培养和土壤条件下,对多种难溶磷都表现出较强的溶解能力。现已报道的溶解磷酸三钙较强的曲霉菌株有 P85 (*A. niger*)^[14]、S36 (*A. niger*)^[47]和 FS1 (*A. niger*)^[48],换算成培养基中加入磷酸三钙 5 g/L,培养液中最大可溶性磷含量分别为 706.85、312、537.5 mg/L。菌株 M1 在加入 5 g/L 磷酸三钙培养液中,有效磷最大浓度为 1020.89 mg/L,在溶解磷酸三钙上要

优于上述菌株。以往研究表明,多数溶磷菌株对磷酸三钙的溶解能力高于磷酸铝和磷矿粉^[47-48]。溶解磷酸铝较好的溶磷真菌菌株已有较多报道,其中,菌株 B1-A (*A. niger*)^[49]、菌株 FS1 (*A. niger*)^[48]和菌株 Z60 (*A. niger*)^[50]对磷酸铝溶解能力较强,水溶性磷最大浓度分别为 942.3、713.0、624.1 mg/L,其他能溶解磷酸铝的曲霉菌株,可溶性磷含量大多约 100 mg/L^[48-49],日本曲霉 M1 对磷酸铝的溶解量为 995.69 mg/L,菌株 M1 对磷酸铝的溶解能力优于菌株 B1-A、FS1 和 Z60。一般而言,液体培养条件下溶磷曲霉菌溶解磷矿粉的能力为 28-266 mg/L^[10,14,51],菌株 M1 在晋宁磷矿粉中可溶性磷最高含量为 363.64 mg/L。显而易见,日本曲霉 M1 对磷矿粉的溶解能力显著高于大多数已报道的溶磷菌株,略低于黑曲霉 An2^[8]。黑曲霉 An2 溶解磷酸铝(培养液中折合成 5 g/L 的加入量)的有效磷达 1178 mg/L,高于菌株 M1,但对磷酸三钙和磷矿粉的溶解能力明显低于菌株 M1,An2 的最大溶解量分别为 861 mg/L 和 89.5 mg/L;同时菌株 M1 对 NaCl 的最大耐受力为 10%,而菌株 An2 仅能耐受 5%的 NaCl。耐盐能力较好的菌株 *P. oxalicum*^[30]、*Saccharomyces*^[31]和 *Trichoderma*^[32]当培养液中 NaCl 浓度为 0.4%-1.5%时,菌落生长明显受抑制。比较而言,菌株 M1 不仅表现出高效的溶磷能力,而且耐盐能力皆高于目前已报道的溶磷曲霉菌菌株。

我们对筛选获得的日本曲霉 M1 与 4 种典型土壤的适配性进行了研究,结果显示了菌剂 M1 将土壤难溶磷转化为有效磷的高效性。4 种土壤接种菌剂 M1 对玉米生物量最大增加率达 268.28%,凸显了菌剂 M1 优良的促生效果。大量报道显示,溶磷曲霉菌在土壤中转化难溶磷具有良好的效

果, 能促进植株的生长^[34-35], 然而, 溶磷微生物与不同难溶磷、多种土壤的适配性的研究未见报道。Yin 等^[14]在盆栽试验土壤中添加磷矿粉、接种菌剂 P85 (*A. niger*), 与对照相比土壤有效磷含量增加 98.01%、玉米植株生物量增加 9.31%。Xiao 等^[51]接种菌剂 WHAK1 (*A. niger*)并施加磷矿粉于土壤中, 与对照相比有效磷含量增加 37.04%, 小麦植株干重增加 36.8%。Mittal 等^[38]在盆栽土壤中添加磷酸三钙并接入混合菌剂 VH1 (*A. awamori*)+VQ2 (*A. awamori*), 有效磷含量增加 26%, 鹰嘴豆种子和植株总生物量增加 61.11%。接种剂 M1 于 4 种土壤中, 所有接菌 M1 处理的土壤有效磷均显著增加, 增加率最大值为 287.98% (表 7), 我们的研究表明菌株 M1 与我国黏性潮土配合时生物量和有效磷含量最高, 其次是与水稻土配合, 因此, M1 在上述 2 种土壤中都能够高效溶解土壤磷和外界加入的难溶磷, 为未来生产中高效使用 M1 生物肥料提供了重要依据。

目前, 关于溶磷菌的溶磷过程一般被认为是菌株在生长过程中产生低分子量有机酸, 这些有机酸通过羟基或羧基与难溶性磷酸盐上的钙、铁、铝、镁、锌等金属离子螯合, 从而将难溶磷转化成可溶性磷^[7,42]。溶磷真菌产生的有机酸种类主要有: 葡萄糖酸、柠檬酸、乳酸、苹果酸、乙酸、丙酸和琥珀酸等^[8,14-15]。Schneider 等^[52]检测到黑曲霉 ATCC 9142 在溶解磷矿粉时主要分泌葡萄糖酸(36.9 mg/L)。范丙全等^[15]研究表明菌株 P8 在溶解磷矿粉时主要分泌苹果酸(56.6 mg/L)、乙酸(69.3 mg/L)和丙酸(42 mg/L); Yin 等^[14]研究结果与之相似, 其还检测到大量柠檬酸(98.24 mg/L)和其他 7 种少量有机酸, 如甲酸(29.19 mg/L)、乙酸(67.97 mg/L)、酒石酸(56.37 mg/L)、乳酸(37.48 mg/L)、

延胡索酸(0.33 mg/L)、琥珀酸(33.99 mg/L)、草酸(11.27 mg/L)。Li 等^[8]测定黑曲霉 An2 在难溶磷源磷酸钙、磷酸镁、磷酸铝、磷酸铁和磷矿粉中主要分泌的有机酸为草酸、酒石酸和琥珀酸, 菌株在不同磷源中产生有机酸的含量差异较大。日本曲霉 M1 在磷酸钙、磷酸铝和磷矿粉培养液中检测到 7 种有机酸, 其中含量最高的为草酸(616.16 mg/L)和柠檬酸(413.69 mg/L), 难溶磷种类影响菌株 M1 分泌总有机酸的含量, M1 分泌有机酸的总含量为 940.77–1161.63 mg/L。已有报道显示, 曲霉菌菌株分泌有机酸的含量为 12–1620 mg/L^[8,14,52]。溶磷菌黑曲霉 An2 产生酒石酸的含量为 880 mg/L, 酒石酸为二羧酸, 有机酸对难溶磷的溶解是依靠羧基来螯合磷源中的金属离子而释放有效磷, 有机酸中含有羧基愈多则螯合能力愈强^[53]。而本研究中菌株 M1 分泌的大量柠檬酸为三羧酸, 此酸能大量螯合难溶磷中的金属离子, 从而有效释放水溶性磷, 可能是导致菌株 M1 高效溶磷能力的主要因素。

研究表明, 溶磷微生物作为促生菌的一类, 同样能够分泌一定量的植物激素(主要为 IAA、赤霉素 GA 和细胞分裂素), 促进作物生长^[54]。目前植物激素的测定方法主要有生物鉴定法、免疫分析法和色谱分析法三大类。质谱法较前三类方法具有确定物质分子量、灵敏度更高的优点。本研究利用 LC-MS 法测定菌株 M1 在磷酸三钙、磷酸铝和磷矿粉供应条件下分泌生长素和玉米素的含量最大值分别为 77.58 mg/L 和 0.11 mg/L。已报道的溶磷菌株分泌 IAA 含量较高的菌种包括 *Penicillium*、*Aspergillus*、*Pseudomonas*、*Rhizopus* 和 *Trichoderma* 等, 其中溶磷曲霉菌分泌生长素的含量为 2.50–42.53 mg/L^[32,55-56], 且大多研究中仅

测定溶磷菌株接入一种难溶磷培养液中吲哚乙酸(IAA)的分泌量, 菌株 M1 分泌生长素的能力高于已报道的溶磷菌株。目前, 还未见溶磷曲霉菌分泌玉米素的研究报道。溶磷菌株 M1 具有高效的溶磷效果和分泌促生物质生长素、玉米素, 从而表现出对玉米和花生良好的促生增产效果。因此, 集溶磷、促生和耐盐多功能于一体的日本曲霉 M1 作为有潜力的菌种资源, 有望在农业生产中发挥重要的增产节肥作用。

参考文献

- [1] Raychaudhuri M, Ngachan SV, Raychaudhuri S, Singh AL. Yield response of groundnut (*Arachis hypogaea*) to dual inoculation and liming of an acid hill Ultisol of Manipur. *Indian Journal of Agricultural Science*, 2003, 73(2): 86–88.
- [2] Wang H, Appan A, Gulliver JS. Modeling of phosphorus dynamics in aquatic sediments: II-examination of model performance. *Water Research*, 2003, 37(16): 3939–3953.
- [3] Wu PF, Zhang DM, Hao LH, Qi ZP. Status quo and prospects of phosphate-soluble microorganisms. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2008, 10(3): 40–46. (in Chinese)
吴鹏飞, 张冬明, 郝丽虹, 漆智平. 解磷微生物研究现状及展望. 中国农业科技导报, 2008, 10(3): 40–46.
- [4] Singh H, Reddy MS. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *European Journal of Soil Biology*, 2011, 47(1): 30–34.
- [5] Son H-J, Park G-T, Cha M-S, Heo M-S. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology*, 2006, 97(2): 204–210.
- [6] Yao Q, Li XL, Feng G. Mobilization of sparingly soluble inorganic phosphates by the external mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant and Soil*, 2001, 230(2): 279–285.
- [7] de Oliveira Mendes G, de Freitas ALM, Pereira OL, da Silva IR, Vassilev NB, Costa MD. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(1): 239–249.
- [8] Li XL, Luo LJ, Yang JS, Li BZ, Yuan HL. Mechanisms for solubilization of various insoluble phosphates and activation of immobilized phosphates in different soils by an efficient and salinity-tolerant *Aspergillus niger* strain An2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 175(5): 2755–2768.
- [9] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates—solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 1995, 27(3): 257–263.
- [10] Xu RK, Zhu YG, Chittleborough D. Phosphorus release from phosphate rock and iron phosphate by low-molecular-weight organic acids. *Journal of Environmental Sciences*, 2004, 16(1): 5–8.
- [11] Hussein KA, Joo JH. Isolation and characterization of rhizomicrobial isolates for phosphate solubilization and indole acetic acid production. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2015, 58(6): 847–855.
- [12] Stalstrom VA. Beitrag Zur Kenntniss der einwirkenden sterilizer and in garung befindlicher striffe any dil loslieshkeit der phosphorus are destrical cum phosphours. *Zbt Bakt Abt II*, 1903, 11: 724–732.
- [13] Zhao XR, Lin QM. A review of phosphate-dissolving microorganisms. *Soil and Fertilizer*, 2001, (3): 7–11. (in Chinese)
赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展. 土壤肥料, 2001, (3): 7–11.
- [14] Yin ZW, Shi FC, Jiang HM, Roberts DP, Chen SF, Fan BQ. Phosphate solubilization and promotion of maize growth by *Penicillium oxalicum* P4 and *Aspergillus niger* P85 in a calcareous soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 2015, 61(12): 913–923.
- [15] Fan BQ, Jin JY, Ge C. Isolation of *Penicillium oxalicum* oxalicum and its effect on solubilization of insoluble phosphate under different conditions. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(5): 525–530. (in Chinese)
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. 中国农业科学, 2002, 35(5): 525–530.
- [16] Kanse OS, Whitelaw-Weckert M, Kadam TA, Bhosale HJ. Phosphate solubilization by stress-tolerant soil fungus *Talaromyces funiculosus* SLS8 isolated from the Neem rhizosphere. *Annals of Microbiology*, 2015, 65(1): 85–93.
- [17] Narsian V, Patel HH. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(4): 559–565.
- [18] Mahamuni SV, Wani PV, Patil AS. Isolation of phosphate solubilizing fungi from rhizosphere of sugarcane & sugar beet using Tc^p and Rp solubilization. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, 2012, 2(1): 1–5.

- 237–244.
- [19] Singh R, Algh GS, Singh S. Screening of phosphorus solubilizing *Aspergilli* from unusual habitats of Agra region. *Indian Journal of Life Sciences*, 2012, 2: 165–168.
- [20] Priya S, Panneerselvam T, Sivakumar T. Evaluation of indole-3-acetic acid in phosphate solubilizing microbes isolated from Rhizosphere soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2013, 2(3): 29–36.
- [21] Singal R, Gupta R, Saxena RK. Rock phosphate solubilization under alkaline conditions by *Aspergillus japonicus* and *A. Foetidus*. *Folia Microbiologica*, 1994, 39(1): 33–36.
- [22] Rinu K, Malviya MK, Sati P, Tiwari SC, Pandey A. Response of cold-tolerant *Aspergillus* spp. to solubilization of Fe and Al phosphate in presence of different nutritional sources. *ISRN Soil Sci*, 2013, 2013: Article ID 598541.
- [23] Chakraborty BN, Chakraborty U, Saha A, Sunar K, Dey PL. Evaluation of phosphate solubilizers from soils of North Bengal and their diversity analysis. *World Journal of Agricultural Sciences*, 2010, 6(2): 195–200.
- [24] Naveenkumar KJ, Thippeswamy B, Shivakumar PB, Thirumalesh BV. Lignolytic and phosphate solubilizing efficiency of fungal species isolated from Arecanut husk waste. *Journal Research Biology*, 2012, 2: 143–151.
- [25] Relwani L, Krishna P, Sudhakara RM. Effect of carbon and nitrogen sources on phosphate solubilization by a wild-type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. *Current Microbiology*, 2008, 57(5): 401–406.
- [26] Chatli A, Beri V, Sidhu BS. Isolation and characterisation of phosphate solubilising microorganisms from the cold desert habitat of *Salix alba* Linn. in trans Himalayan region of Himachal Pradesh. *Indian Journal of Microbiology*, 2008, 48(2): 267–273.
- [27] Bhattacharya S S, Barman S, Ghosh R, Duary RK, Goswami L, Mandal NC. Phosphate solubilizing ability of *Emericella nidulans* strain V1 isolated from vermicompost. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2013, 51(10): 840–848.
- [28] Li HY, Niu SQ, Kong WB, Da WY, Geng H, Han CH, Yan WR. Screening and identification of a phosphate solubilizing strain isolated from pig manure compost and determination of its phosphate solubilizing capacity. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(5): 1464–1470. (in Chinese)
李海云, 牛世全, 孔维宝, 达文燕, 耿晖, 韩彩虹, 阎薇如. 猪粪堆肥中一株溶磷菌的筛选鉴定及溶磷能力初步测定. 环境科学学报, 2015, 35(5): 1464–1470.
- [29] Nath R, Sharma G, Barooah M. Efficiency of tricalcium phosphate solubilization by two different endophytic *Penicillium* sp. isolated from tea (*Camellia sinensis* L.). *European Journal of Experimental Biology*, 2012, 2(4): 1354–1358.
- [30] Li XP, Ren JY, Zou ML. Phosphate-solubilizing ability of a saline-alkali fungus strain and effects on the growth of corn in sensitive period. *Research of Soil and Water Conservation*, 2015, 22(5): 276–278. (in Chinese)
李学平, 任加云, 邹美玲. 一株耐盐解磷菌的解磷能力及对玉米敏感期生长的影响. 水土保持研究, 2015, 22(5): 276–278.
- [31] Mundra S, Arora R, Stobdan T. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel temperature-, pH-, and salt-tolerant yeast, *Rhodotorula* sp. PS4, isolated from seabuckthorn rhizosphere, growing in cold desert of Ladakh, India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27: 2387–2396.
- [32] Kumar K, Manigundan K, Amaresan N. Influence of salt tolerant *Trichoderma* spp. on growth of maize (*Zea mays*) under different salinity conditions. *Journal of Basic Microbiology*, 2017, 57(2): 141–150.
- [33] New MT, Yu SS, Latt ZK. Study on phosphate solubilization of salt tolerant soil yeast isolates and effects on maize germination and growth. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 2013, 4(3): 524–533.
- [34] Kucey RMN, Janzen HH, Leggett ME. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Advances in Agronomy*, 1989, 42: 199–228.
- [35] Shi FC, Yin ZW, Jiang HM, Fan BQ. Screening, identification of P-dissolving fungus P83 strain and its effects on phosphate solubilization and plant growth promotion. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(11): 1333–1343. (in Chinese)
史发超, 殷中伟, 江红梅, 范丙全. 一株溶磷真菌筛选鉴定及其溶磷促生效果. 微生物学报, 2014, 54(11): 1333–1343.
- [36] Nakayan P, Hameed A, Singh S, Young L-S, Hung M-H, Young C-C. Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. *Plant and Soil*, 2013, 373(1/2): 301–315.
- [37] Kaur G, Reddy MS. Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. *Pedosphere*, 2015, 25(3): 428–437.
- [38] Mittal V, Singh O, Nayyar H, Kaur J, Tewari R. Stimulatory

- effect of phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). *Soil Biological and Biochemistry*, 2008, 40(3): 718–727.
- [39] Ghosh P, Rathinasabapathi B, Ma LQ. Phosphorus solubilization and plant growth enhancement by arsenic-resistant bacteria. *Chemosphere*, 2015, 134: 1–6.
- [40] Gupta R, Singal R, Shankar A, Kuhad RC, Saxena RK. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *Journal of General and Applied Microbiology*, 1994, 40(3): 255–260.
- [41] Hoagland DR, Arnon DI. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station, Circular*, 1950, 347(2): 2–32.
- [42] Rivas R, Trujillo ME, Sanchez M, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E. *Microbacterium ulmi* sp. nov., a xylanolytic, phosphate-solubilizing bacterium isolated from sawdust of *Ulmus nigra*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(2): 513–517.
- [43] Posada RH, Heredia-Abarca G, Sieverding E, Prager MS. Solubilization of iron and calcium phosphates by soil fungi isolated from coffee plantations. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2013, 59(2): 185–196.
- [44] Habte M, Osorio NW. Effect of nitrogen form on the effectiveness of a phosphate-solubilizing fungus to dissolve rock phosphate. *Journal of Biofertilizers and Biopesticides*, 2012, 3: 127.
- [45] Sharma K. Inorganic phosphate solubilization by fungi isolated from agriculture soil. *Journal of Phytology*, 2011, 3(4): 11–12.
- [46] Salih HM, Yahya AI, Abdul-Rahem AM, Munam BH. Availability of phosphorus in a calcareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate-dissolving fungi. *Plant and Soil*, 1989, 120(2): 181–185.
- [47] Jain R, Saxena J, Sharma V. Differential effects of immobilized and free forms of phosphate-solubilizing fungal strains on the growth and phosphorus uptake of mung bean plants. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(4): 1523–1534.
- [48] de Oliveira Mendes G, de Freitas ALM, Pereira OL, da Silva IR, Vassilev NB, Costa MD. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(1): 239–249.
- [49] Liu WG, He YQ, Zhang K, Fan JB, Cao H. Isolation, identification and characterization of a strain of phosphate-solubilizing bacteria from red soil. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(3): 326–333. (in Chinese)
刘文干, 何园球, 张坤, 樊建波, 曹慧. 一株红壤溶磷菌的分离、鉴定及溶磷特性. *微生物学报*, 2012, 52(3): 326–333.
- [50] Qiao ZW, Gong JP, Xie YH, Li LX, Ren ZX. Screening, identification and dissolving characteristics of a strong phosphorus solubilizing fungi in calcareous soil. *Chinese Journal of Applied Environmental Biology*, 2013, 19(5): 873–877. (in Chinese)
乔志伟, 洪坚平, 谢英荷, 李林轩, 任振兴. 一株石灰性土壤强溶磷真菌的分离鉴定及溶磷特性. *应用与环境生物学报*, 2013, 19(5): 873–877.
- [51] Xiao CQ, Zhang HX, Fang YJ, Chi R. Evaluation for rock phosphate solubilization in fermentation and soil-plant system using a stress-tolerant phosphate-solubilizing *Aspergillus niger* WHAK1. *Applied and Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169(1): 123–133.
- [52] Schneider KD, Van Straaten P, De Orduña RM, Glasauer S, Trevors J, Fallow D, Smith PS. Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(1): 366–374.
- [53] Sperber J. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1958, 9(6): 778–781.
- [54] Xue XY, Feng RH, Guan DW, Li J, Cao FM. Screening and analysis for efficient co-inoculation system of soybean rhizobia and plant growth-promoting rhizobacteria. *Soybean Science*, 2011, 30(4): 613–620. (in Chinese)
薛晓昀, 冯瑞华, 关大伟, 李俊, 曹凤明. 大豆根瘤菌与促生菌复合系筛选及机理研究. *大豆科学*, 2011, 30(4): 613–620.
- [55] Banic S, Dey BK. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. *Plant and Soil*, 1982, 69(3): 353–364.
- [56] Resende MP, Jakoby ICMC, dos Santos LCR, Soares MA, Pereira FD, Souchie EL, Silva FG. Phosphate solubilization and phytohormone production by endophytic and rhizosphere *Trichoderma* isolates of guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess). *African Journal of Microbiology Research*, 2014, 8(27): 2616–2623.

Isolation, identification of a salt-tolerant, phosphate-solubilizing and crop-growth promoting *Aspergillus japonicus*

Hongmei Jiang, Zhongwei Yin, Fachao Shi, Caiyue Liu, Bingquan Fan*

Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: [Objective] To isolate high effective phosphate-solubilizing microbial strains from growing sunflower in saline-alkali soils for bio-fertilizer production. [Methods] Phosphate-solubilizing fungus M1 was isolated by petri-dish methods and identified using ITS rDNA sequence homology analysis. The phosphate-solubilizing capacity of M1 was measured by broth medium and soil pot experiment. The effect of isolate M1 on plant growth promotion was studied in field experiment. Organic acids and phytohormone produced by isolate M1 were analyzed by means of LC-MS. [Results] Isolate M1 was identified as *Aspergillus japonicus* and had a strong ability to dissolve insoluble phosphates. The rate of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ dissolved by M1 was 63.30% and the concentration of available phosphorus was 1020.89 mg/L at 6 d shaking incubation. Soluble phosphorus in AlPO_4 liquid culture by M1 was lower than in $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ added medium, the content concentration of available phosphorus was 995.69 mg/L and the solubilized rate of AlPO_4 was 48.59%. The greatest concentration of available phosphorus dissolved by isolate M1 from Jinning rock phosphate was 363.64 mg/L after 6 d shaking incubation. Isolate M1 combining salt resistance properties as well, the greatest content of NaCl was 10%. In greenhouse pot experiment, isolate M1 had a significant growth-promoting effect on corn in four kinds of soils (paddy soil, viscous fluvo-aquic soil, salinized fluvo-aquic soil and calcareous fluvo-aquic soil) under three kinds of insoluble phosphates treatment such as $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 and Kaiyang rock phosphate with 4 replicates per treatment. Compared with control (CK), inoculation with M1 increased the fresh weight of corn biomass by 2.14%–90.91% and dry weight of corn biomass by 22.15%–268.28%, and soil available phosphorus content increased 21.81–24.24 mg/kg. The adaptability of isolate M1 with four kinds of soils is greater than strain DSM 821. Field experiment showed that isolate M1 had a greater effect on enhancement of peanut yield, the yield was average 4.46 t/hm² and increased 22.19% being greater over control. 7 organic acids and 2 phytohormones were analyzed in liquid culture of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 and Kaiyang rock phosphate. Out of seven acids, significant increases in the concentration of oxalic acid (616.16 mg/L) and citric acid (413.69 mg/L) were recorded in 3 liquid cultures by isolate M1, respectively. The concentration of indole acetic acid (IAA) was 15.45–77.58 mg/L, zeatin was 0.06–0.11 mg/L. [Conclusion] One new phosphate-solubilizing isolate M1 was obtained and identified as *Aspergillus japonicus*. Isolate M1 could solubilize insoluble phosphates in petri dishes, broth medium as well as pot experiments and increased soil available phosphate and corn biomass significantly in pot condition. So *Aspergillus japonicus* M1 strain have a better potential for bio-fertilizer production in the future.

Keywords: *Aspergillus japonicus*, phosphate solubilization, plant growth promotion effect, organic acid, phytohormone

(本文责编: 李磊)

Supported by the National High Technology Research and Development of China (2013AA102801-7) and by the 948 Agricultural Project (2011-G25)

*Corresponding author. Tel/Fax: + 86-10-82106212; E-mail: bqfan@caas.ac.cn

Received: 4 July 2017; Revised: 28 September 2017; Published online: 21 November 2017