



一株野生大豆内生真菌 YD-25 的筛选鉴定及其抗重金属活性研究

徐 萌¹, 王宇楠¹, 李滢璟¹, 李梦雪¹, 王兰兰¹, 于翠梅², 马莲菊¹

(1. 沈阳师范大学 生命科学院, 辽宁 沈阳 110034; 2. 沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 为了丰富野生大豆内生真菌资源, 探究野生大豆内生真菌的生物学活性。从野生大豆植株内分离筛选出 1 株内生真菌 YD-25, 通过形态学和分子生物学相结合的方式鉴定菌株; 采用控制单因素变量试验和正交试验确定菌株的最适生长条件; 通过对比胞内、胞外产物和对照组培养大豆幼苗的株高测定菌株的促生效果; 测定菌株抗重金属铜、铅、镉的能力和重金属胁迫下菌株的抗氧化酶活性变化。结果表明: YD-25 菌落初期为白色, 后期变为橘黄色, 菌丝分支且产孢; 经鉴定该菌株为黑附球菌(*Epicoccum nigrum*)。该菌株生长的最适 pH 为 3.0, 优化培养条件为可溶性淀粉 4%、酵母浸粉 0.5%、 KH_2PO_4 0.15%、 MgSO_4 0.05%, 培养 8 d。YD-25 菌株的胞外产物对大豆幼苗有较好的促生长作用, 第 4 天和第 6 天的促生率分别达到了 15.4% 和 18.1%。同时具有良好的耐重金属铜、铅、镉的能力, 除受 Cd^{2+} 胁迫的 YD-25 菌株的 SOD 活性之外, 受其它重金属胁迫的 YD-25 菌株各项酶活性均随着重金属浓度提高有不同程度的提高。

关键词: 野生大豆; 内生真菌; 促生长; 抗重金属

Screening and Identification of a Wild Soybean Endophytic Fungus YD-25 and Its Anti-heavy Metal Activity

XU Meng¹, WANG Yu-nan¹, LI Yan-jing¹, LI Meng-xue¹, WANG Lan-lan¹, YU Cui-mei², MA Lian-ju¹

(1. College of Life Science, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China; 2. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: In order to enrich the endophytic fungi resources of wild soybeans and explore the biological activities of endophytic fungi of wild soybeans. An endophytic fungus strain YD-25 was isolated from *Glycine soja* plants and identified by combining morphology with molecular biology. The optimum growth conditions of the strain were determined by controlling single factor variable experiment and orthogonal experiment. The growth promoting effect of the strain was determined by comparing the plant height of the soybean seedlings in the intracellular, extracellular, and control groups. The ability of the strain to resist heavy metals such as copper, lead and cadmium and the enzyme activity of the cells under heavy metal stress were determined. The results showed that the YD-25 colony was white at the beginning, and later turned into orange, the mycelium branched and sporulated. The strain was identified as *Epicoccum nigrum*. The optimal pH of the strain was 3.0, and the optimized culture conditions were soluble starch 4%, yeast dip powder 0.5%, KH_2PO_4 0.15%, MgSO_4 0.05%, and cultured for 8 d. The extracellular product of YD-25 strain had a good growth promoting effect on soybean seedlings, and the growth promoting rates on 4th and 6th day reached 15.4% and 18.1%, respectively. At the same time, it had good resistance to heavy metal cadmium, lead and copper. Except for the SOD activity of Cd^{2+} stressed YD-25 strain, the enzyme activities of YD-25 strains under other heavy metal stresses were increased in different degree with the increase of heavy metal concentration.

Keywords: *Glycine soja*; Endophytic fungus; Promoting growth; Heavy metal tolerance

植物内生真菌(endophytic fungi)是指在其生活的部分阶段或全部阶段寄生于健康的植物组织或器官内, 且对植物不表现出明显病害症状的一类真菌^[1]。大多数内生真菌寄生在宿主体内中不会使宿主呈现病态, 而是与宿主在一定程度上达到微调的动态平衡^[2], 从而形成内生真菌与宿主互利共生的关系。一方面在其生长过程中产生的次生代谢产物能够有效地提高宿主的抗逆性, 另一方面可以从宿主的体内汲取用于自身生长所需的营养物质^[3]。第一株植物内生真菌在 1898 年由 Guerin 等^[4]从黑麦草中分离得出, 直至 1993 年 Stroble 等^[1]从太平洋红豆杉的韧皮组织中分离出了一株能够产紫杉醇的内生真菌, 内生真菌才引起学者们

的广泛关注。植物内生真菌资源广阔, 种类繁多, 有研究表明几乎所有植物体内都含有 1 种或者多种内生真菌^[5], 根据内生真菌和宿主之间的专一性分析, 目前自然界至少有 100 多万种内生真菌^[6]。目前植物内生真菌的研究才刚刚起步, 关于其更深层次的研究有待进一步探讨。

野生大豆(*Glycine soja* Sieb. et Zucc)是大豆的近源祖先种, 我国是世界上保存野生大豆资源最多的国家^[7], 野生大豆资源约占世界野生大豆资源总数的 90%^[8], 且广泛分布于除青海、海南和新疆外的各个省区^[9]。野生大豆具有丰富的遗传多样性和复杂的遗传背景^[10], 在长期的进化过程中形成了抗重金属、抗逆境、以及抗病虫害等的强环境适应

收稿日期: 2018-11-27

基金项目: 国家自然科学基金(31270369, 31600314); 沈阳市科学技术计划(F16-205-1-50)。

第一作者简介: 徐萌(1994-), 女, 硕士, 主要从事资源与应用微生物学研究。E-mail: 269580564@qq.com。

通讯作者: 马莲菊(1969-), 女, 博士, 教授, 主要从事资源与应用微生物学研究。E-mail: malianju@163.com。

能力^[11],这些在进化上的特殊性和生态上的强适应性使野生大豆具有很高的研究和利用价值^[12]。研究表明,在大豆的进化过程中,体内的内生菌的多样性与野生大豆内生菌多样性相比逐渐降低,且失去了野生大豆原有的抗旱、耐盐、抗重金属等抗非生物胁迫的优良特性^[13-14]。筛选分离野生大豆内生真菌,并对其生物学活性进行探究,对于发掘野生大豆内生真菌在农业上的实际应用价值具有重要意义。近年来,对于野生大豆的研究着重于根瘤菌固氮促生、生物及非生物胁迫下野生大豆幼苗的生物酶活性等,而对野生大豆内生真菌生物学活性相关研究鲜有报道。对于重金属胁迫的研究对象也鲜少集中于植物内生真菌本身。本文以野生大豆内生真菌 YD-25 为研究对象,探究其对大豆幼苗的促生作用以及自身抗重金属的能力,旨在开发野生大豆内生真菌资源,发掘其潜在的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 分别于2016和2017年的9-10月于辽宁省沈阳市蒲河地区采集表面无明显病虫害的完整野生大豆植株,将其装入灭菌的自封纸袋中,于12 h内进行组织分离处理。

1.1.2 培养基 马铃薯葡萄糖固体培养基(PDA):马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂粉15~20 g、水1 000 mL,pH自然,121℃灭菌25 min;马铃薯葡萄糖液体培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、水1 000 mL,pH自然,121℃灭菌25 min。

1.1.3 试剂 真菌基因组DNA快速抽提试剂盒、ITS序列扩增引物(ITS1、ITS4)、Tap mix酶等药品及试剂购于上海生工生物工程股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 野生大豆内生真菌分离纯化 采用组织块法。选取野生大豆供试植株的根、茎、叶组织,用自来水冲洗掉组织表面的灰尘泥土,再用无菌水进一步清洗。根据组织的不同,分别用0.1%的升汞溶液浸泡消毒25~40 s,用无菌水冲洗4次,并将最后一次冲洗的无菌水均匀涂布于平板中作为无菌对照。用无菌剪刀和镊子将根、茎、叶等组织剪成边长0.3 cm的方形组织块放置于PDA培养基上。置于恒温培养箱中28℃避光培养,直至组织断面处长出真菌菌落,并观察其对照组是否污染。若无污染,则采用顶端纯化法挑取组织块周围的真菌边缘菌丝,于新的PDA培养基中进行传代培养,直至培养基内真菌菌落形态一致,4℃斜面编号保存备用。

1.2.2 YD-25菌株鉴定 形态学鉴定:内生真菌的形态观察主要包括菌落的大小、颜色、正反面特征、菌丝形态、产孢方式、孢子形态等。菌丝孢子形态观察

采取压片法,乳酸石炭酸棉兰染色,于光镜下观察形态特征,参照《真菌鉴定手册》^[15]进行初步鉴定。

分子生物学鉴定:挑取纯化的真菌菌丝于PDB培养基中摇瓶培养,抽滤菌丝放置于无菌研钵中,加入液氮冰冻菌丝并研磨,随时补加液氮保持低温,直至研磨至冻干粉状态。采用真菌基因组DNA快速抽提试剂盒(购于生工生物股份有限公司)提取DNA,于-20℃保存。分别以ITS1(5'-TCCG-TAGGTGAACCT-GCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCT-TAT-TGATATGC-3')为上游引物和下游引物,进行PCR扩增。送样至上海生工生物工程股份有限公司进行序列对比分析。根据测序比对结果,利用MEGA 7.0构建系统发育树。

1.2.3 YD-25菌株生长条件筛选

(1)菌株生长曲线测定 挑取菌丝至80 mL PDB培养基中,120 r·min⁻¹、28℃恒温震荡培养3 d,加入无菌转子,利用磁力搅拌器打碎制成菌悬液备用。以PDB培养基为基础培养基,150 mL锥形瓶装液量80 mL,接种量为1%,同等条件培养10 d,每天取一组样品编号冻存,每组3个平行。将称重所需的滤纸提前烘干至恒重并称重,抽滤菌体并用无菌水冲洗菌丝,40℃烘干称重,计算菌丝干重。

(2)最适pH筛选 以PDB培养基为基础培养基,100 mL锥形瓶装液量50 mL,pH分别为1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12(葡萄糖遇强碱发生脱氢反应,成分改变,故未设定pH为13和14处理),接种量为1%,每组3个平行,120 r·min⁻¹、28℃培养8 d,测量菌丝干重。

(3)最适碳源筛选 以不含葡萄糖的PDB培养基为基础培养基,150 mL锥形瓶装液量80 mL,分别加入2%的葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露醇和可溶性淀粉作为不同碳源,接种量为1%,每组3个平行,120 r·min⁻¹、28℃培养8 d,接菌于不含葡萄糖及额外碳源的PDB培养基作为空白对照组,测量菌丝干重。

(4)最适氮源筛选 以不含葡萄糖的PDB培养基为基础培养基,150 mL锥形瓶装液量80 mL,分别加入0.3%的酵母浸粉、蛋白胨、牛肉膏、KNO₃、(NH₄)NO₃作为不同氮源,接种量为1%,每组3个平行,120 r·min⁻¹、28℃培养8 d,接菌于不含葡萄糖及额外氮源的PDB培养基作为空白对照组,测量菌丝干重。

1.2.4 菌株培养基优化 以不含葡萄糖的PDB培养基为基础培养基,添加碳源(1%~4%)、氮源(0.1%~0.5%)、KH₂PO₄(0~0.2%)、MgSO₄(0~0.08%)、KCl(0~0.1%),进行5因素4水平正交试验。

1.2.5 YD-25胞内胞外产物促生长能力测定 接种YD-25到PDB培养基中,培养8 d使菌体充分产

生次生代谢产物。收集菌丝,无菌水冲洗后,加入生理盐水进行超声破碎,8 000 r·min⁻¹离心,取上清液作为胞内产物保存备用。发酵液用滤膜过滤,作为胞外产物保存备用。清水培养大豆幼苗,150 mL清水中分别加入 1 mL YD-25 胞内、胞外产物,以清水培养的大豆幼苗做空白对照。每组 3 个平行,每个平行 3 根幼苗。3 个实验组同等条件下培养 2,4,6 d,比较株高(子叶到植株形态学顶端的距离),计算促生率。

促生率(%) = $\Delta h_{(实验组)} / \Delta h_{(对照组)} \times 100\%$

1.2.6 3 种重金属对 YD-25 菌株的影响

(1)对菌丝生长的影响 以 PDB 培养基为基础培养基,用 CuSO₄ 调节培养基 Cu²⁺ 浓度,设置浓度分别为 0,0.10,0.20,0.60,1.00,1.25,1.50,2.00,2.50,3.00,3.50,4.00,5.00 mmol·L⁻¹ 处理,接种 1% YD-25 菌悬液,每个浓度 3 个平行组,120 r·min⁻¹、28℃ 恒温培养 8 d。用 CdCl₂ 调节培养基 Cd²⁺ 浓度,设置浓度分别为 0,0.5,1.0,2.5,5.0,7.5 mmol·L⁻¹ 6 个处理;用 PbC₄H₆O₄ 调节培养基 Pb²⁺ 浓度,设置浓度分别为 0,0.5,1.0,2.0,3.0,5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,7.5,10.0 mmol·L⁻¹ 12 个处理,培养方法同上。

过滤收集菌丝,40℃ 恒温烘干,测量菌丝干重。

(2)对菌株 SOD、CAT 活性的影响 测定 3 种不同浓度重金属胁迫的 YD-25 菌株的 SOD、CAT 活性。Pb²⁺ 浓度分别为 0,1,2,3,4 mmol·L⁻¹,Cd²⁺ 浓度分别为 0,1.0,1.5,2.0 mmol·L⁻¹,Cu²⁺ 浓度分别为 0,1,2,3,4 mmol·L⁻¹。超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)采用氯化硝基四氮唑蓝法^[16]测量,过氧化氢酶(CAT catalase)采用紫外分光光度计法^[17]测量。

2 结果与分析

2.1 YD-25 菌株的鉴定

2.1.1 形态学鉴定 YD25 菌株在固体培养基中菌落初期为白色,而后逐渐变为橘黄色,中央菌丝呈橘红色,菌丝呈绒状,菌落颜色正反一致,生长缓慢。菌丝分支,产分生孢子,孢子呈卵圆形(图 1)。

2.1.2 分子生物学鉴定 YD-25 菌株 16SrDNA 序列经 BLAST 基因库比对,结合形态学观察,可鉴定菌株为黑附球菌(*Epicoccum nigrum*),基因同源率达 99%,模式菌株为 KM434160.1。利用 MEGA 7.0 软件构建 YD-25 系统发育树(图 2)。

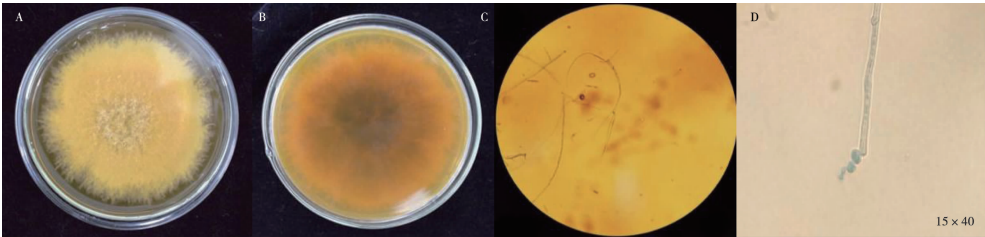


图 1 YD-25 菌落(A、B)、菌丝(C)、孢子(D)形态

Fig. 1 The morphology of colonies(A、B), hyphae(C) and spores(D) of YD-25

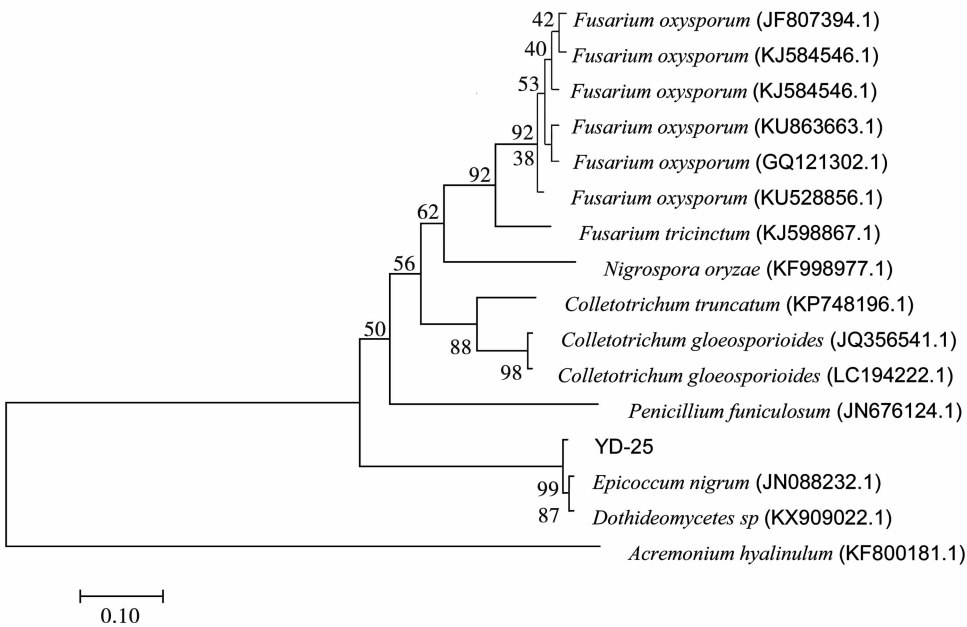


图 2 YD-25 菌株系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of YD-25 strain

2.2 YD-25 菌株培养条件优化

2.2.1 菌株生长曲线 由菌株生长曲线(图 3)可知,菌株在生长的第 2 天进入对数期,在第 8 天进入对数期最高点,第 8 天之后菌丝干重下降,进入衰亡期,发生菌体自溶。

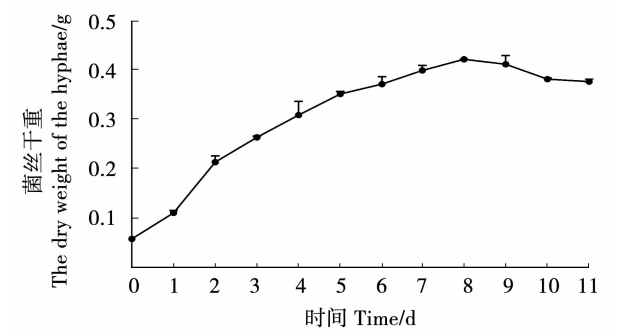


图 3 YD-25 菌株生长曲线

Fig. 3 Optimization of culture conditions for YD-25 strain

2.2.2 最适 pH 筛选 由图 4 可知,pH 为 1.0 ~ 2.0,菌体几乎不生长;pH 为 3.0 时,菌体达到最大生长点;pH 为 4.0 ~ 11.0 时,菌体生长相对稳定;pH 为 12.0 时,菌体生长状况逐渐变差。

2.2.3 最适碳源筛选 由图 5 可知,加入不同碳源后菌株的生长状况与不加入碳源的菌株生长状况相比差异显著。其中,以淀粉为唯一碳源的菌株生长状况最佳。

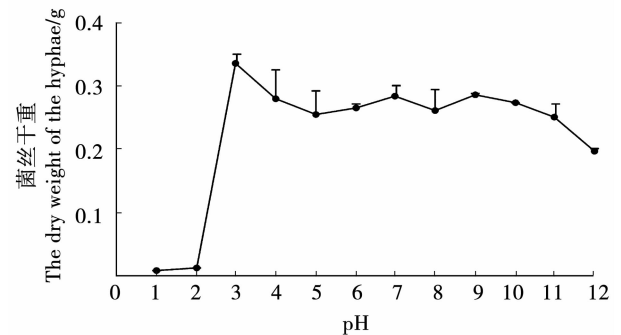


图 4 初始 pH 对 YD-25 菌株生长影响

Fig. 4 YD-25 strain optimum pH

2.2.4 最适氮源筛选 由图 6 可知,加入不同氮源后菌株的生长状况与不加入碳源的菌株生长状况相比,差异性较为显著。其中,以酵母浸粉为唯一氮源的菌株生长状况最佳。

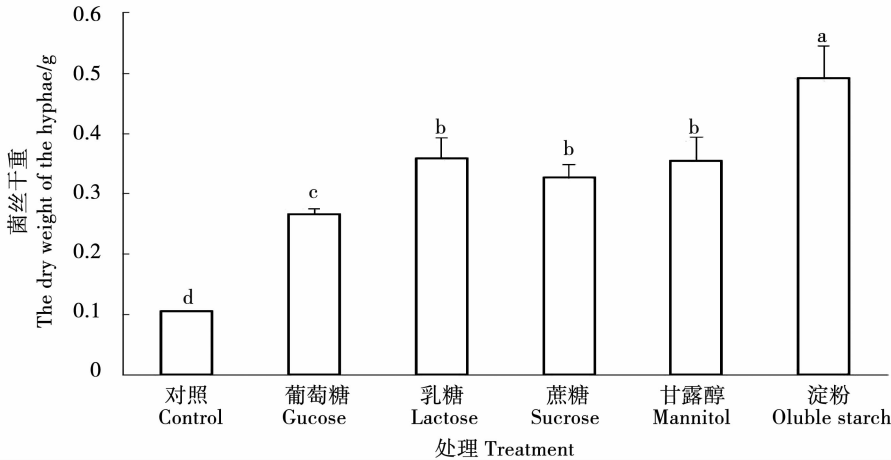


图 5 不同碳源对 YD-25 菌株生长影响

Fig. 5 Effects of different carbon sources on the growth of YD-25 strain

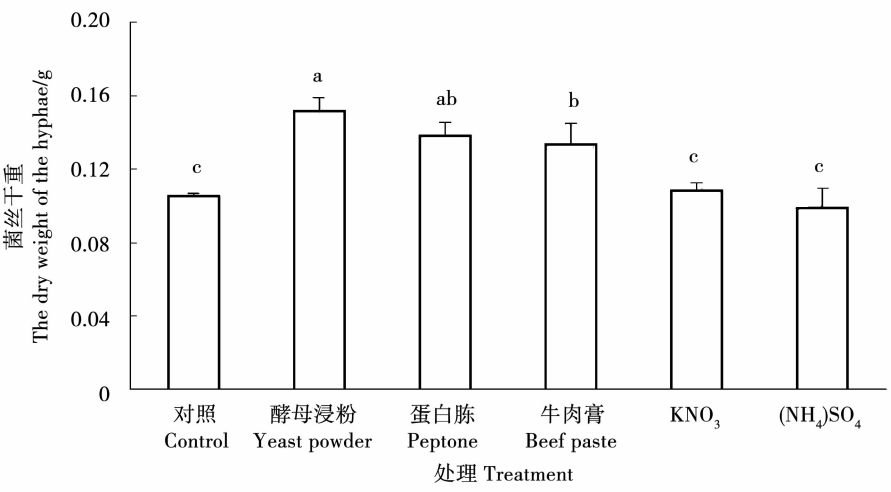


图 6 不同氮源对 YD-25 菌株生长影响

Fig. 6 Effects of different nitrogen sources on the growth of YD-25 strain

2.3 培养基优化

根据影响 YD-25 菌株生长的单因素检测结果,以可溶性淀粉为碳源,以酵母浸粉为氮源,同时选

取 KH_2PO_4 、 MgSO_4 、 KCl 设计 5 因素 4 水平正交试验 (表 1)。

表 1 5 因素 4 水平正交试验
Table 1 The five-factor and four-level orthogonal test of YD-25

	A 淀粉 Soluble starch	B 酵母浸粉 Yeast powder	C KH_2PO_4	D MgSO_4	E KCl
1	2%	0.30%	0%	0.08%	0.05%
2	3%	0.20%	0.10%	0.08%	0%
3	1%	0.10%	0%	0%	0%
4	4%	0.50%	0.10%	0%	0.05%
5	3%	0.30%	0.20%	0%	0.02%
6	4%	0.20%	0%	0.05%	0.02%
7	2%	0.10%	0.10%	0.03%	0.02%
8	4%	0.30%	0.15%	0.03%	0%
9	4%	0.10%	0.20%	0.08%	0.10%
10	3%	0.50%	0%	0.03%	0.10%
11	2%	0.50%	0.20%	0.05%	0%
12	1%	0.20%	0.20%	0.03%	0.05%
13	1%	0.50%	0.15%	0.08%	0.02%
14	3%	0.10%	0.15%	0.05%	0.05%
15	1%	0.30%	0.10%	0.05%	0.10%
16	2%	0.20%	0.15%	0%	0.10%
K_1	0.3197	0.3563	0.3456	0.3625	0.3708
K_2	0.3552	0.3689	0.3656	0.3602	0.3651
K_3	0.3837	0.3632	0.3823	0.3736	0.3606
K_4	0.4054	0.3758	0.3706	0.3678	0.3675
R	0.0857	0.0195	0.0367	0.0134	0.0102

由 R 值大小可得各因素作用的主次顺序依次为碳源(可溶性淀粉) > 无机盐(KH_2PO_4) > 酵母浸粉 > 无机盐(MgSO_4) > 无机盐(KCl)。由上述培养基正交试验结果中的 K 值可知:碳源可溶性淀粉的最适浓度为 4%,氮源酵母浸粉的最适浓度为 0.5%,无机盐 KH_2PO_4 的最适浓度为 0.15%,无机盐 MgSO_4 的最适浓度为 0.05%,无机盐 KCl 的最适浓度为 0。

由测定结果可知,YD-25 菌株的最佳培养基配方为:可溶性淀粉 4%、酵母浸粉 0.5%、 KH_2PO_4 0.15%、 MgSO_4 0.05%。

2.4 YD-25 胞内胞外产物促生长能力测定

YD-25 胞外产物与对照组相比,从第 4 天起开始有较为明显的促生效果,且随时间推移,经胞外

产物处理的植株株高与对照组株高差值逐渐增大,第 4 天和第 6 天的促生率分别达到了 15.4% 和 18.1%。YD-25 胞内产物处理过的植株与对照组植株相比,株高差值随时间推移逐渐增大,体现出抑制生长的效果(图 7)。

2.5 3 种重金属对 YD-25 菌丝生长的影响

YD-25 菌株耐重金属 Cu^{2+} 的性能良好,当溶液中 Cu^{2+} 浓度达到 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,菌体的耐性最好;当溶液中 Cu^{2+} 浓度达到 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,菌丝仍可缓慢生长。随着 Cd^{2+} 浓度逐渐增加,菌丝干重逐渐变小。当 Cd^{2+} 浓度达到 $7.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,菌丝生长缓慢。菌株耐重金属 Pb^{2+} 的性能良好,在铅浓度为 $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,菌体的耐性最好;在 Pb^{2+} 浓度为 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,菌丝仍可缓慢生长(图 8)。

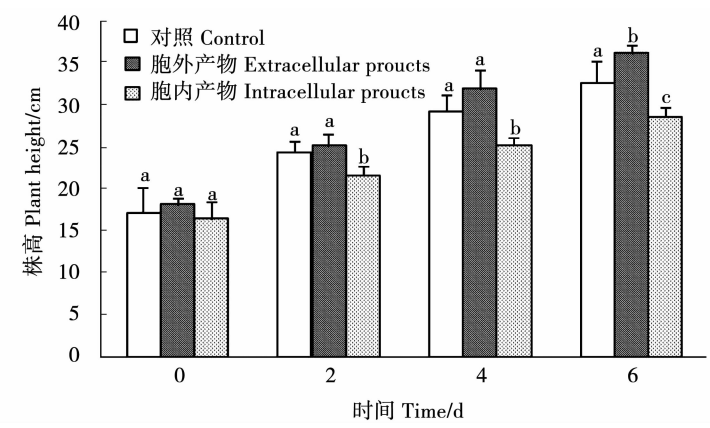


图 7 YD-25 胞内胞外产物促生长效果

Fig. 7 Comparison of growth promoting effects of intracellular and extracellular products of YD-25

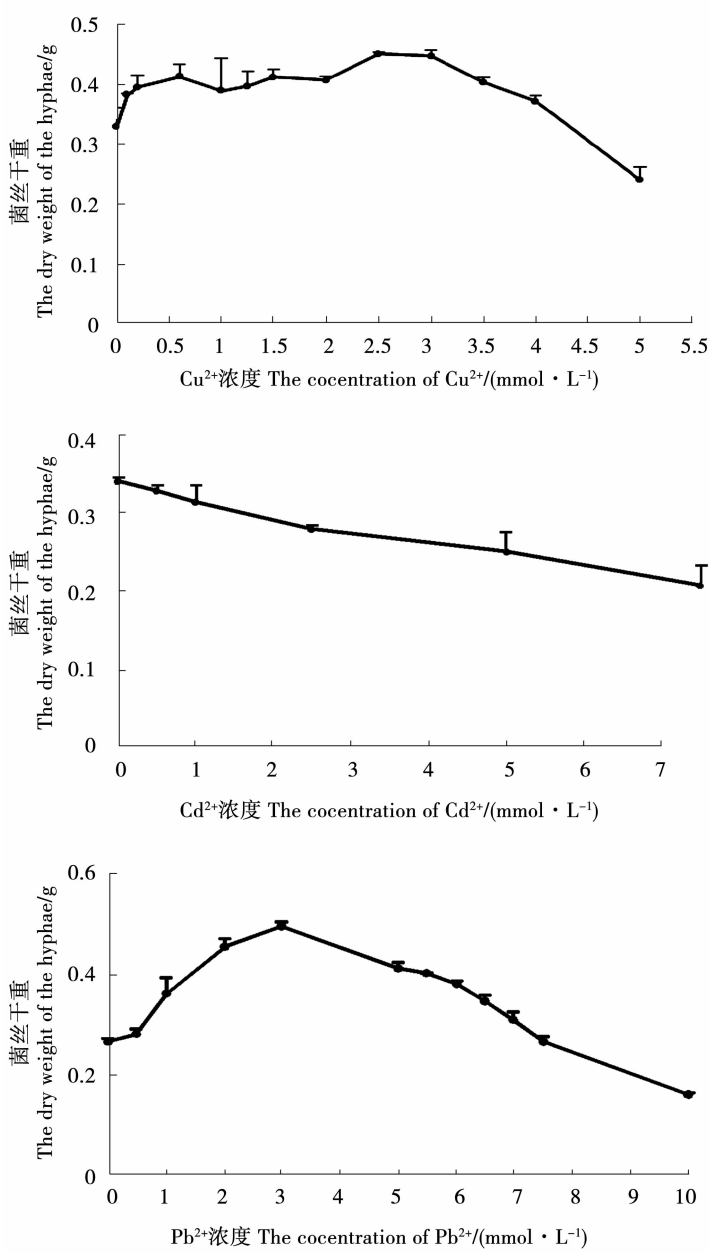


图 8 不同浓度 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 对 YD-25 菌株生长影响

Fig. 8 Effects of different concentrations of Cu^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} on the growth of YD-25 strain

2.5.2 3种重金属对 YD-25 菌株 SOD、CAT 活性影响 根据图 9 可知,随着 Cd^{2+} 浓度的增加,YD-25 菌株的 SOD 值随之下降,且显著性差异较为明显;在 Pb^{2+} 浓度为 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 YD-25 菌株的 SOD 活性最小,且与其它处理具有显著性差异;在 Cu^{2+} 为 $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 YD-25 菌株的 SOD 活性最大。

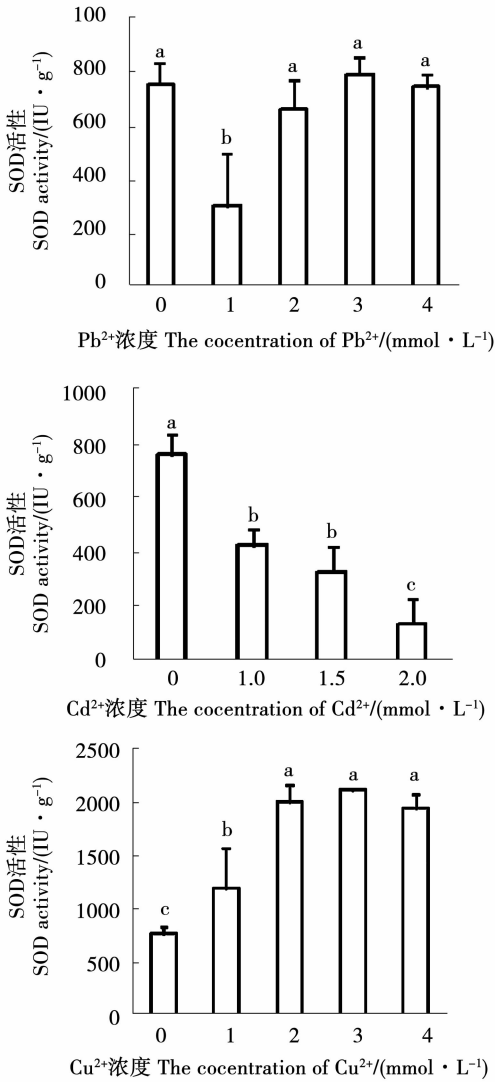


图 9 3 种不同浓度重金属下 YD-25 菌株 SOD 活性

Fig. 9 SOD activities of YD-25 strains under different concentrations of three heavy metals

由图 10 可知,随着 Cd^{2+} 浓度的增加,YD-25 菌株的 CAT 活性增加,但不同浓度之间的差异性不明显;当 Pb^{2+} 浓度达到 $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,YD-25 菌株内的 CAT 活性最高,且与其它浓度组有显著性差异。在 Cu^{2+} 为 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 YD-25 菌株的 CAT 活性最大,且与其它浓度组 CAT 活性差异性较显著。

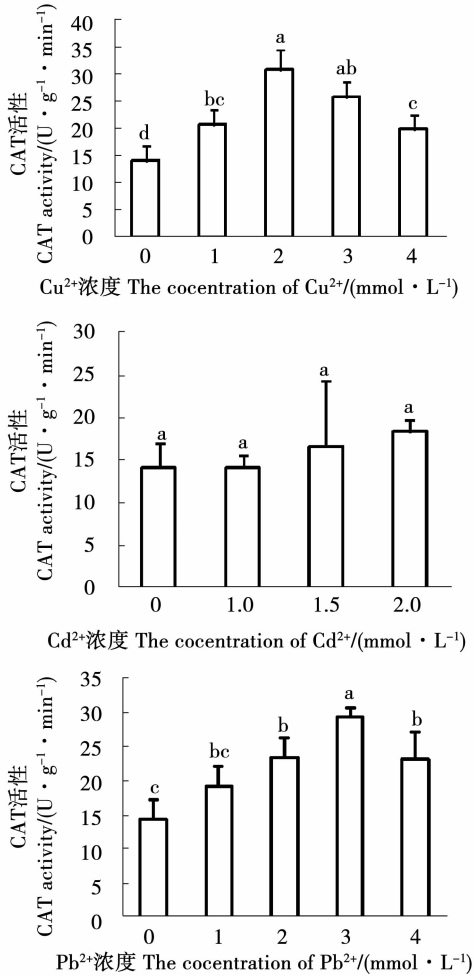


图 10 3 种不同浓度重金属下 YD-25 菌株 CAT 活性

Fig. 10 CAT activities of YD-25 strains under different concentrations of three heavy metals

3 讨论

大多数植物内生真菌及其自身代谢产物都可以直接或间接促进宿主植物生长。直接促进使植物内生真菌自身可产生 IAA 或 ACC 脱氨酶等物质,促进细胞伸长、刺激细胞加速分化,抑制植物体内产生过量乙烯,从而达到促进宿主植物生长的目的^[18]。詹寿发等^[19]在芒萁中分离的两株内生真菌同时具有解磷解钾和产 IAA 的能力,对玉米幼苗生长有明显促进作用。内生真菌也具有间接促生的方式,包括调整宿主植物的渗透压、气孔、根际形态^[20],协助固氮、提高叶绿素含量等。赵颖等^[21]从碱蓬中分离提取的内生真菌 JP3,菌株自身和其发酵液可以显著提高水稻幼苗叶片中的叶绿素含量,促进植物体内有机物的积累,处理 10 d 后水稻幼苗

株高的增幅约为 15.6%,与本文研究 YD-25 菌株对大豆幼苗的促生长效果相似。而本研究并未深层次研究菌株 YD-25 胞外产物具有促生长作用活性物质的种类以及其它可协助植物幼苗生长的方法,因此进一步探索可从以上两方面进行。

微生物在正常的生长状态下,可通过吸收微量的金属离子提高自身的生长量,但过量的重金属离子则会对微生物的生长产生毒害作用^[22]。但是有一部分微生物可以在含重金属相对较高的环境下存活,说明这类微生物具有抗重金属的作用。贾彤等^[23]从铜矿地区优势植被白羊草中分离出 *Epichloë* 属内生真菌均表现出对 8 mg·L⁻¹ Cd²⁺、240 mg·L⁻¹ Pb²⁺ 和 160 mg·L⁻¹ Cu²⁺ 有一定抗性。而 YD-25 菌株在以上 3 种重金属中的菌丝最大生长量浓度就远高于此,说明 YD-25 自身对于以上 3 种重金属有较高水平的抗性。在试验过程中,YD-25 菌株具有一定的产糖能力,且在一定浓度重金属胁迫下会大量分泌色素,根据姜敏等^[22]的结论,可猜想是由于菌丝分泌多糖类物质使重金属毒性降低,具体结论仍需进行深层次研究。豆科植物共生体系能够有效地促进重金属污染地的氮素循环和营养元素积累^[24]。以往研究表明,SOD 是生物体中起到核心作用的一种保护酶,通过清除生物氧化过程中产生的超氧化物自由基,催化超氧化物阴离子歧化成过氧化氢和氧气来解除自由基氧化过程中产生有害成分对机体造成伤害^[25]。CAT 则是生物体中其防御作用的一种关键酶,催化过氧化氢和氧气,维持活性氧代谢的平衡,保护细胞膜的完整性^[26]。本研究中,YD-25 体内的 SOD、CAT 在一定浓度的重金属胁迫下基本呈现先升高后下降的趋势,说明在一定浓度下,菌体内的抗氧化酶可利用氧化还原作用减轻重金属对菌体的损伤,但超过浓度范围则对抗氧化酶系统产生抑制作用,菌体受损。在本研究过程中并未检测出 POD 变化,具体原因仍需进一步试验进行探讨。

4 结 论

本试验从野生大豆中分离筛选得到 YD-25 菌株,经形态学与分子生物学鉴定,可确定该菌株为黑附球菌(*Epicoccum nigrum*)。该菌株生长的最适 pH 为 3.0,优化培养条件为:可溶性淀粉 4%、酵母浸粉 0.5%、KH₂PO₄ 0.15%、MgSO₄ 0.05%,培养 8 d。YD-25 菌株的胞外产物对大豆幼苗有较好的促生长作用,同时 YD-25 菌株本身具有良好的抗重金属

镉、铅、铜的能力,可考虑作为土壤重金属污染的修复菌株。

参考文献

[1] Strobel G, Stierle A, Stierle D, et al. Taxomyces andreanae, a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew (*Taxus brevifolia*) [J]. Mycotaxon, 1993, 47 (71): 71-80.

[2] Kogel K H, Franken P, Hückelhoven R. Endophyte or parasite-what decides? [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9 (4): 358-363.

[3] 官珊, 钟国华, 孙之潭, 等. 植物内生真菌的研究进展[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2005 (1): 61-66. (Guan S, Zhong G H, Sun Z T. Advances in endophytic fungi in plant [J]. Journal of Zhongkai Agrotechnical College, 2005(1): 61-66.)

[4] 黎万奎, 胡之璧. 内生菌与天然药物[J]. 中国天然药物, 2005(4): 193-199. (Li W K, Hu Z B. Endophytic bacteria and natural medicines [J]. Chinese Natural Medicines, 2005 (4): 193-199.)

[5] Tan R X, Zou W X. Endophytes: A rich source of functional metabolites [J]. Cheminform, 2001, 32(44): 448-459.

[6] Petrini O. Microbial ecology of leaves [M]. New York: Springer-Verlag, 1991: 179-197.

[7] 王果. 河南省野生大豆资源遗传多样性分析[D]. 陕西: 西北农林科技大学, 2006:1-2. (Wang G. Genetic diversity dnalysis of wild soybean resources in Henan province[D]. Shanxi: North-west University of Agriculture and Forestry Science and Technology, 2006:1-2.)

[8] 徐豹. 中国野生大豆(*G. soja*)研究十年[J]. 吉林农业科学, 1989(1): 5-13. (Xu B. Ten years of research on wild soybean (*G. soja*) in China[J]. Jilin Agricultural Sciences, 1989(1): 5-13.)

[9] 庄炳昌. 中国野生大豆研究二十年[J]. 吉林农业科学, 1999 (5): 3-10. (Zhuang B C. Twenty years of research on wild soybeans in China [J]. Jilin Agricultural Sciences, 1999 (5): 3-10.)

[10] 李润芳, 王栋, 李湛, 等. 我国野生大豆遗传多样性研究进展(英文)[J]. 农业科学与技术, 2017, 18(12): 2326-2330, 2334. (Li R F, Wang D, Li Z, et al. Advances in research on genetic diversity of wild soybean in China[J]. Agricultural Science & Technology, 2017, 18(12): 2326-2330, 2334.)

[11] 李娜娜, 孔维国, 张煜, 等. 野生大豆耐盐性研究进展[J]. 西北植物学报, 2012, 32(5): 1067-1072. (Li N N, Kong W G, Zhang Y, et al. Advances in salt tolerance of wild soybean [J]. Journal of Northwest Botany, 2012, 32(5): 1067-1072.)

[12] 王志友, 王昌陵, 董丽杰, 等. 辽宁省野生大豆种质资源及利用现状[J]. 杂粮作物, 2008(4): 241-243. (Wang Z Y, Wang C L, Dong L J, et al. Wild soybean germplasm resources and utilization status in Liaoning province [J]. Miscellaneous Crops, 2008(4): 241-243.)

[13] 高小宽, 刘国杰, 白丽荣. 聚乙二醇(PEG)模拟干旱胁迫对野生大豆与栽培大豆萌发的影响[J]. 大豆科学, 2012, 31(6): 1027-1029. (Gao X K, Liu G J, Bai L R. Effects of polyethylene glycol (PEG) simulated drought stress on germination of wild soybean and cultivated soybean [J]. Soybean Science, 2012, 31(6): 1027-1029.)

[14] 纪展波, 蒲伟凤, 李桂兰, 等. 野生大豆、半野生大豆和栽培大豆对苗期干旱胁迫的生理反应[J]. 大豆科学, 2012, 31(4): 598-604. (Ji Z B, Pu W F, Li G L, et al. Physiological responses of wild soybean, semi-wild soybean and cultivated soybean to drought stress at seedling stage [J]. Soybean Science, 2012, 31(4): 598-604.)

[15] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社出版, 1979. (Wei J C. Fungal identification manual[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979.)

[16] Rao K V M, Sresty T V S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh] in response to Zn and Ni stresses[J]. Plant Science, 2000, 157(1): 1-128.

[17] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2015. (Chen J X, Wang X F. Instruction for plant physiology experiments[M]. Guangzhou: South China University of Technology Press, 2015.)

[18] Sheng X F, Xia J J, Jiang C Y, et al. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape[J]. Environmental Pollution, 2008, 156(3): 1164-1170.

[19] 詹寿发, 卢丹妮, 毛花英, 等. 2株溶磷、解钾与产IAA的内生真菌菌株的筛选、鉴定及促生作用研究[J]. 中国土壤与肥料, 2017(3): 142-151. (Zhan S F, Lu D N, Mao H Y, et al. Screening, identification and growth promotion of two endophytic fungi strains solving phosphorus, potassium and producing IAA [J]. Soil and Fertilizer in China, 2017(3): 142-151.)

[20] 刘劲松, 张健君, 杨淑芳, 等. 内生菌参与植物/微生物联合修复重金属污染土壤的研究进展[J]. 中国植保导刊, 2014, 34(2): 27-30. (Liu J S, Zhang J J, Yang S F, et al. Advances in the study of endophytic bacteria participating in phyto-microbial remediation of heavy metal contaminated soils [J]. China Plant Protection Guide, 2014, 34(2): 27-30.)

[21] 赵颖, 于飞, 卜宁. 碱蓬内生真菌JP3的分离、鉴定及促生作用研究[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版), 2015(1): 116-120. (Zhao Y, Yu F, Bu N. Isolation, identification and growth promotion of endophytic fungus JP3 from *Suaeda salsa* [J]. Journal of Shenyang Normal University (Natural Science Edition), 2015(1): 116-120.)

[22] 姜敏, 曹理想, 张仁铎. 重金属抗性内生真菌与其宿主植物重金属抗性关系初探[J]. 农业环境科学学报, 2007(6): 2038-2042. (Jiang M, Cao L X, Zhang R D. Preliminary study on the relationship between heavy metal resistant endophytic fungi and heavy metal resistance in host plants [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2007(6): 2038-2042.)

[23] 贾彤, 王瑞宏, 曹苗文. 白羊草 *Epiclloë* 属内生真菌的分离鉴定及其重金属耐受性[J]. 生态学报, 2018, 38(18): 6623-6631. (Jia T, Wang R H, Cao M W. Isolation and identification of endophytic fungi from *epicllo* genus and its heavy metal tolerance [J]. Journal of Ecology, 2018, 38(18): 6623-6631.)

[24] Abril A, Zurdo-Pineiro J L, Peix A. Solubilization of phosphate by a strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolated from *Phaseolus vulgaris* in El Chaco Arido soil (Argentina) [J]. Developments in Plant and Soil Sciences, 2007(102): 135-138.

[25] 陈芳芳, 姜清华, 朱新开, 等. 氮肥运筹对生选6号籽粒产量及花后叶片衰老特性的影响[J]. 大麦与谷类科学, 2013(2): 1-6. (Chen F F, Jiang Q H, Zhu X K, et al. Effects of nitrogen fertilizer application on grain yield and senescence characteristics of post-floral leaves [J]. Barley and Cereal Science, 2013(2): 1-6.)

[26] 惠俊爱, 党志. 土壤不同镉浓度对玉米CT38生长及抗氧化酶活性的影响[J]. 生态环境学报, 2014, 23(5): 884-889. (Hui H A, Dang Z. Effects of different cadmium concentrations in soil on CT38 growth and antioxidant enzyme activities in maize [J]. Journal of Eco-Environment, 2014, 23(5): 884-889.)