

## 研究报告

## 盾状粉褶菌对难溶性磷的体外溶磷效应

郝宸, 王建瑞, 穆春风, 陈晓冉, 于欣妍, 刘宇\*

鲁东大学农学院, 山东 烟台 264000

郝宸, 王建瑞, 穆春风, 陈晓冉, 于欣妍, 刘宇. 盾状粉褶菌对难溶性磷的体外溶磷效应[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 505-516.

HAO Chen, WANG Jianrui, MU Chunfeng, CHEN Xiaoran, YU Xinyan, LIU Yu. Solubilizing effect of *Entoloma clypeatum* on insoluble phosphorus[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 505-516.

**摘要:** 【背景】外生菌根真菌(ectomycorrhizal fungi, ECMF)能够促进植物吸收土壤中难溶性磷。【目的】评价不同难溶性磷源下盾状粉褶菌(*Entoloma clypeatum*)菌丝生长和溶磷特点, 为该菌进一步研究和应用提供依据。【方法】对盾状粉褶菌进行组织分离纯化及内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)鉴定; 于纯培养条件下测定卵磷脂、磷酸铝、植酸钙和磷酸铁对该菌菌丝生长、有效磷含量、溶磷率、pH、柠檬酸含量和酸性磷酸酶含量等影响。【结果】经鉴定供试菌株为盾状粉褶菌, 其菌丝体在不同磷源固体和液体培养基均可正常生长, 前者菌丝生长缓慢, 而卵磷脂液体培养基中菌丝球干重最高; 含植酸钙的发酵液中有有效磷含量(75.029 mg/L)和溶磷率(9.31%)最高, 卵磷脂最低(25.880 mg/L、0.55%); 各培养发酵液 pH 值均降低; 4 种磷处理发酵液中, 柠檬酸含量以植酸钙条件下最高(19.4 mmol/L), 卵磷脂最低(12.4 mmol/L), 为对照组的 1.9–5.1 倍; 酸性磷酸酶含量是对照的 1.3–3.2 倍, 以植酸钙最高(0.006 7 U/mL), 显著高于其他 3 种处理( $P<0.05$ ); 有效磷含量与酸性磷酸酶含量呈正相关, 与溶磷率呈显著正相关( $P<0.05$ ), 与柠檬酸含量呈极显著正相关( $P<0.01$ ), 与 pH 和菌丝球干重呈负相关。【结论】盾状粉褶菌具有利用难溶性磷的能力, 是减少磷肥使用的优良选择, 这为开发利用盾状粉褶菌及进一步挖掘 ECMF 的溶磷机制提供了参考。**关键词:** 外生菌根真菌; 有效磷; 溶磷率; 柠檬酸; 酸性磷酸酶

资助项目: 山东省现代农业产业技术体系食用菌产业体系(SDAIT-07-03); 山东省科技型中小企业创新能力提升工程项目(2023TSGC0397)

This work was supported by the Shandong Province Modern Agricultural Industry Technology System Edible Fungi Industry System (SDAIT-07-03) and the Innovation Ability Promotion Project of Sci-tech Small and Medium-sized Enterprises in Shandong Province (2023TSGC0397).

\*Corresponding author. E-mail: liuyu8006@163.com

Received: 2023-07-19; Accepted: 2023-08-29; Published online: 2023-10-13

## Solubilizing effect of *Entoloma clypeatum* on insoluble phosphorus

HAO Chen, WANG Jianrui, MU Chunfeng, CHEN Xiaoran, YU Xinyan, LIU Yu\*

School of Agriculture, Ludong University, Yantai 264000, Shandong, China

**Abstract:** [Background] Ectomycorrhizal fungi (ECMF) can promote plants to absorb insoluble phosphorus in the soil. [Objective] To study the mycelial growth and phosphorus solubilization of *Entoloma clypeatum* with different insoluble phosphorus sources, so as to provide a basis for further research and application of the fungus. [Methods] An ECMF strain was isolated by the tissue culture method and identified based on the internal transcribed spacer (ITS) sequence. The effects of lecithin, aluminum phosphate, calcium phytate, and iron phosphate on the mycelial growth, available phosphorus content, phosphorus solubility, pH, citric acid content, and acid phosphatase content of the strain were determined under pure culture conditions. [Results] The strain was identified as *E. clypeatum*, and its mycelia grew normally in solid and liquid media with different phosphorus sources. The mycelial growth was slow in the solid media, and the dry weight of mycelial pellets in the liquid medium supplemented with lecithin was the highest. The available phosphorus content (75.029 mg/L) and phosphorus-solubilizing rate (9.31%) of the strain were the highest in the medium containing calcium phytate and the lowest (25.880 mg/L and 0.55%, respectively) in the medium supplemented with lecithin. The pH of each fermentation broth decreased over time. The citric acid content was the highest (19.4 mmol/L) in the medium supplemented with phytic acid calcium and the lowest (12.4 mmol/L) in the medium supplemented with lecithin, which were 1.9–5.1 times that of the control group. The acid phosphatase content in the media supplemented with different insoluble phosphorus sources was 1.3–3.2 times that of the control. It was the highest (0.006 7 U/mL) in the medium with calcium phytate as the insoluble phosphorus source, with significant differences from that in the other three treatments ( $P<0.05$ ). The available phosphorus content was positively correlated with phosphorus-solubilizing rate ( $P<0.05$ ) and citric acid content ( $P<0.01$ ) and negatively correlated with pH and mycelial pellet dry weight. [Conclusion] *E. clypeatum* capable of solubilizing insoluble phosphorus serves as an excellent choice to reduce the use of phosphate fertilizer. The findings provide a reference for the development and utilization of *E. clypeatum* and further research on the phosphorus-solubilizing mechanism of ECMF.

**Keywords:** ectomycorrhizal fungi; available phosphorus; phosphorus-rate; citric acid; acid phosphatase

磷是植物生长所必需的矿质营养元素和限制元素之一,在植物的生长、发育和繁殖过程中发挥重要作用<sup>[1-4]</sup>。然而在自然界中,植物生长易受到磷元素缺乏的胁迫,植物通过根系吸收利用土壤中游离态磷来满足生长需求,我国大部分土壤中含有较多的磷,但极易与  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  结合形成难溶性磷酸盐,多数植物不能利用<sup>[5-7]</sup>,以致植株矮小、结实率降低、品质下降。

许多植物是在缺磷环境中进化的,它们具有通过增加根系从土壤中获取磷的能力来应对缺磷的适应特征<sup>[8]</sup>。菌根广泛存在于自然界土壤中,是一种特定真菌菌丝体与高等植物根系所形成的联合体,是二者长期协同进化的产物<sup>[9-10]</sup>。研究表明,外生菌根真菌(ectomycorrhizal fungi, ECMF)可向根际分泌许多化合物,在与宿主共生过程中能够分泌胞外酶和有机酸,使土壤中难溶性磷转变为可被植物直接吸收利用的磷源<sup>[11-13]</sup>,促进植物的吸收。接种 ECMF 形成菌根后,板栗植物体内磷含量提高 39%–54%<sup>[14]</sup>;无籽刺梨株高、地径和叶等部位的生物量显著提高,对促进生长具有显著作用<sup>[15]</sup>;接种 ECMF 提高了 N、P 和 K 的吸收和种子质量指数,提高了根际土壤过氧化氢酶、脲酶、蔗糖酶和酸性磷酸酶活性,因种子质量指数与根、茎和叶对 N、P 和 K 的吸收呈显著正相关,也提高了幼苗质量<sup>[16]</sup>;这些酶活性的增加可能显著提高了有效磷、土壤全磷、土壤全氮和土壤全钾含量<sup>[17-19]</sup>。孙佳琦等以榉树实生苗为材料接种 4 种 ECMF 后,幼苗对营养元素的吸收能力提升,光合能力增强,促进幼苗生长<sup>[20]</sup>。

盾状粉褶菌(*Entoloma clypeatum*)隶属于担子菌门(*Basidiomycota*)伞菌纲(*Agaricomycetidae*)伞菌目(*Agaricales*)粉褶菌科(*Entolomataceae*)粉褶菌属(*Entoloma*)<sup>[21-22]</sup>,又名梨花菇,是一种 ECMF,能够与蔷薇科经济植物,如苹果、梨和

杏等果树共生形成菌根<sup>[23-26]</sup>。作者在野外调查时发现,盾状粉褶菌在烟台果树种植园中有广泛的分布,能够与果树根系形成菌根,促进树木生长发育。同时该菌是珍稀食用菌,是可发展果树林下经济的重要类群之一。果树业已成为我国农业的重要组成部分,可利用盾状粉褶菌与果树形成菌根,减少相关化肥的使用,降低生产成本,对促进山区经济发展和生态保护均具有重要意义。

本研究以山东烟台果树园林中采集的盾状粉褶菌为研究对象,通过组织分离获取菌种,并在不同难溶磷源培养基中进行纯培养,对其菌丝生长和溶磷指标进行测定,探究盾状粉褶菌对难溶性磷源的利用能力,为今后合理开发利用该菌提供基础以及深入挖掘 ECMF 的溶磷机制提供参考,同时为促进不同地区果木业发展提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

盾状粉褶菌(*E. clypeatum*)子实体采自山东省烟台市大东乔果园。

#### 1.1.2 供试培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose gar, PDA)培养基(g/L):马铃薯 200.0,葡萄糖 20.0,琼脂 16.0。

Potato-glucose-peptone-casein (PGPC)固体培养基(g/L):马铃薯 200.0,葡萄糖 20.0,干酪素 2.5,蛋白胨 2.5,琼脂 16.0。

Potato-glucose-peptone-casein (PGPC)液体培养基(g/L):马铃薯 200.0,葡萄糖 20.0,干酪素 2.5,蛋白胨 2.5。

难溶性磷酸盐(g/L):磷酸铝 0.8,磷酸铁 1.0,植酸钙 1.0,卵磷脂 5.0<sup>[27-28]</sup>。

### 1.1.3 主要试剂和仪器

Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 组织及血液酸性磷酸酶活性检测试剂盒和柠檬酸含量检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司。

电子天平, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 高速冷冻离心机, 上海力申科学仪器有限公司; 恒温水浴锅, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; 鼓风干燥箱, 上海福玛实验设备有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 供试材料鉴定

对子实体进行组织分离及纯化, 获取到菌丝体。采用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取子实体和菌丝体中脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA), 经过内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)扩增测序。PCR 引物为 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): ddH<sub>2</sub>O 20  $\mu$ L, 2 $\times$ SanTaq PCR Mix 25  $\mu$ L, 正、反向引物(10  $\mu$ mol/L)各 2  $\mu$ L, DNA (20–30 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 52  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min; 4  $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测后送生工生物工程(上海)股份有限公司青岛测序部测序。将序列上传于 GenBank 并与 GenBank 中的生物大分子序列比对搜索工具(basic local alignment search tool, BLAST)进行同源性比对。

### 1.2.2 固体菌种培养及测定

将在 PDA 培养基中活化好的菌种使用打孔器分割成 5 mm 大小的菌块, 分别接种于含有不同磷源的 PGPC 固体培养基中, 采用十字

划线法, 每隔 7 d 测量菌落直径, 避光培养 35 d, 刮取菌丝, 于 45–60  $^{\circ}$ C 烘箱中烘干至恒重, 用天平测量菌丝干重, 每个处理 5 个重复。

### 1.2.3 液体菌种培养及菌丝球干重测定

将在 PDA 培养基中活化好的菌种使用打孔器分割成 5 mm 大小的菌块, 分别接种于含有不同磷源的 PGPC 液体培养基中, 以不接菌的液体培养基为对照, 避光 140 r/min、22  $^{\circ}$ C 培养 21 d。将菌丝球用无纺布过滤, 发酵液 4  $^{\circ}$ C 保存待测, 菌丝球于烘箱中 45–60  $^{\circ}$ C, 烘干至恒重, 用天平测量菌丝球干重, 每个处理 5 个重复。

### 1.2.4 发酵液有效含磷量的测定及溶磷率的计算

取 20 mL 1.2.3 中发酵液于 50 mL 离心管中, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 5 mL, 采用钼锑抗分光光度法测定发酵液中有效磷含量, 每个处理 5 个重复。

溶磷率(%)=(接菌发酵液有效磷含量-对照发酵液有效磷含量)/加入磷含量 $\times 100$ <sup>[28]</sup>。

### 1.2.5 发酵液酸性磷酸酶含量测定

利用 1.2.3 中过滤获得的发酵液, 采用组织及血液酸性磷酸酶活性检测试剂盒测定酸性磷酸酶含量, 每个处理 5 个重复。

### 1.2.6 发酵液柠檬酸含量和 pH 测定

采用柠檬酸含量检测试剂盒测定 1.2.3 中过滤获得的发酵液中的柠檬酸含量; 使用 pH 计测定发酵液中 pH 值, 每个处理 5 个重复。

## 1.3 数据统计与分析

所有数据使用软件 Excel 2019 进行统计, 使用 SPSS 19 软件进行差异显著性分析, 使用软件 GraphPad Prism 8 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株分子鉴定

对子实体和菌丝体进行 DNA 提取后扩增获得 ITS (NCBI 核酸序列数据登录号分别为

OR294061 和 ON819567)序列, 于 GenBank 进行 BLAST 比对。子实体 ITS 序列比对结果为 100%, 与 He (JQ281479)<sup>[29]</sup>提供的材料相似, 菌丝体 ITS 序列与 Shishikura 等(LC533315)<sup>[30]</sup>提供材料相似率为 100%, 因此确定分离获得的菌丝体为 *E. clypeatum*。

## 2.2 菌丝在不同磷源下的生长特点

### 2.2.1 固体培养条件下的菌丝生长状况

盾状粉褶菌菌种在 4 种磷源固体培养基中均可以正常生长, 但生长缓慢, 且菌落直径和菌丝干重在不同磷源下无显著差异; 同一磷源各培养时间均无显著差异(图 1-3)。在培养 35 d

后菌落平均直径分别为磷源卵磷脂 2.35 cm, 磷源磷酸铝 2.53 cm, 磷源植酸钙 2.20 cm, 磷源磷酸铁 2.40 cm; 平均干重分别为 0.085、0.104、0.117 和 0.118 g。通过对菌落形态进行观察发现, 菌丝边缘不整齐; 在以卵磷脂为磷源的固体培养条件下, 菌丝黄白色, 较稀疏, 平伏; 其余 3 种磷源培养条件下, 菌丝白色, 中央常隆起, 向边缘质地逐渐变薄。

### 2.2.2 液体培养条件下菌丝生长状况

通过对菌丝球干重进行比较(图 4 和图 5), 以磷酸铁为磷源的液体培养基中菌丝球干重最低, 为 1.03 g, 与其余 3 种磷源培养下具有显著差异

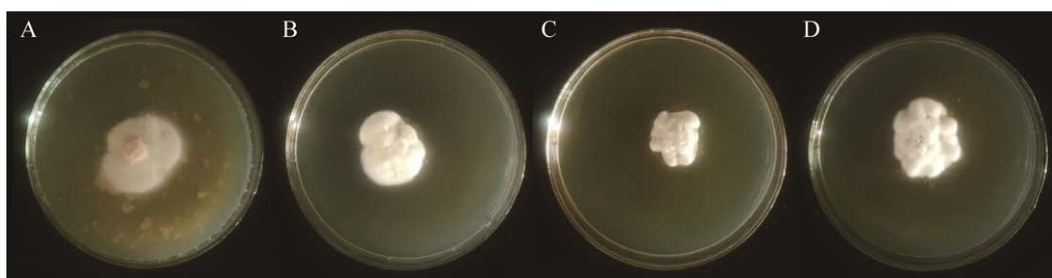


图 1 不同磷源下菌丝生长情况 A: 卵磷脂. B: 磷酸铝. C: 植酸钙. D: 磷酸铁

Figure 1 Mycelial growth under different phosphorus sources. A: Lecithin. B: Aluminum phosphate. C: Calcium phytate. D: Iron phosphate.

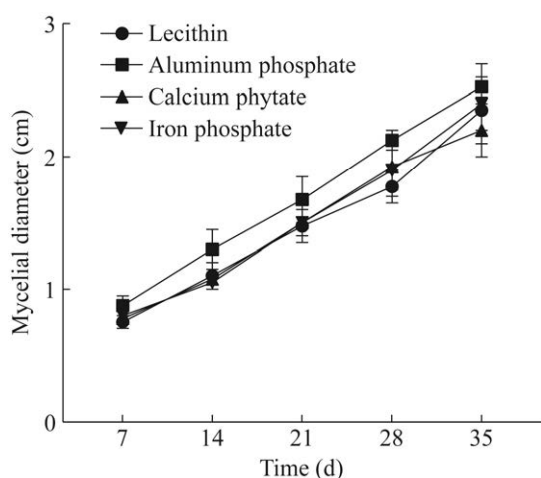


图 2 不同磷源下菌落直径大小

Figure 2 Mycelial diameter under different phosphorus sources.

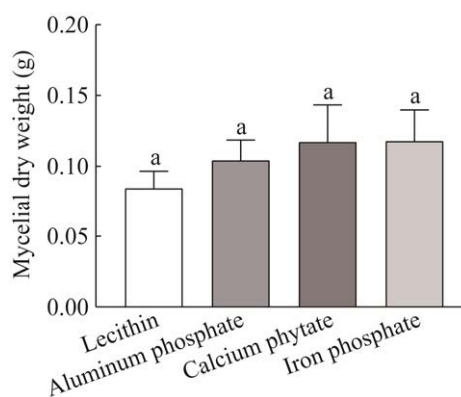


图 3 不同磷源对菌丝干重的影响 相同小写字母表示 0.05 水平无显著差异

Figure 3 Effects of different phosphorus sources on the dry weight of mycelial. Same lowercase letters mean no significant difference at 0.05 level.

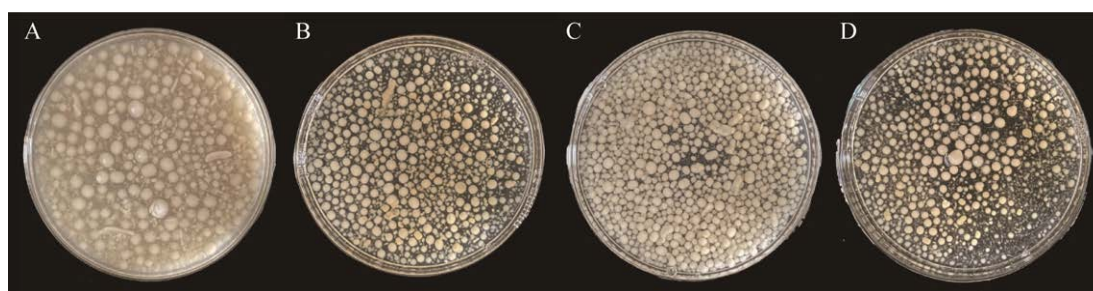


图4 不同磷源下菌丝球生长状况 A: 卵磷脂. B: 磷酸铝. C: 植酸钙. D: 磷酸铁

Figure 4 Growth of mycelial pellets under different phosphorus sources. A: Lecithin. B: Aluminum phosphate. C: Calcium phytate. D: Iron phosphate.

( $P < 0.05$ )。以卵磷脂为磷源时菌丝球干重最高, 为 2.16 g, 其次为含植酸钙培养时菌丝球干重为 1.97 g, 以磷酸铝为磷源时菌丝球干重为 1.96 g。盾状粉褶菌菌种可以利用难溶性磷, 在 4 种磷源液体培养基中均能够正常生长。

### 2.3 不同磷源对发酵液中有效磷含量、pH 和溶磷率的影响

在不同磷源发酵液中的有效磷含量和溶磷率各不相同, 对照组与处理组及各处理组间均

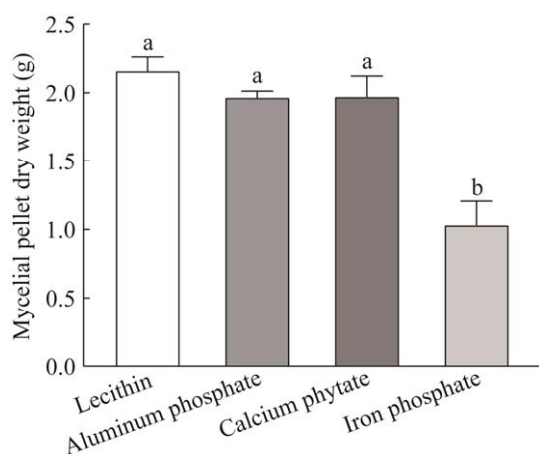


图5 不同磷源下对菌丝球干重的影响 不同小写字母表示 0.05 水平显著差异

Figure 5 Effects of different phosphorus sources on dry weight of mycelial pellets. Different lowercase letters mean significant difference at 0.05 level.

具有显著差异( $P < 0.05$ ) (表 1)。以植酸钙为磷源的发酵液中有有效磷含量和溶磷率最高, 分别为 75.029 mg/L, 9.31%; 其次为含磷酸铁的发酵液中有有效磷含量为 52.151 mg/L, 溶磷率 5.53%, 以磷酸铝为磷源的发酵液中有有效磷含量为 39.015 mg/L, 溶磷率 5.08%; 以卵磷脂为磷源的发酵液中的有效磷含量最低为 25.880 mg/L, 溶磷率最低为 0.55%。在不同处理下, 各发酵液的 pH 均不相同, 处理组相较对照组均降低, 分别为磷源卵磷脂 6.25、磷源磷酸铝 4.85、磷源植酸钙 5.75、磷源磷酸铁 5.15。

### 2.4 不同磷源对发酵液中柠檬酸含量的影响

在不同磷源条件下, 各处理组较对照组发酵液中柠檬酸含量均有增加且具有显著差异( $P < 0.05$ ) (图 6), 对照组发酵液中柠檬酸含量分别为磷源卵磷脂 4.3 mmol/L、磷源磷酸铝 3.0 mmol/L、磷源植酸钙 3.2 mmol/L、磷源磷酸铁 2.7 mmol/L; 以卵磷脂为磷源的处理组发酵液中柠檬酸含量最低(12.4 mmol/L), 植酸钙为磷源的处理组含量最高(19.4 mmol/L), 与磷源卵磷脂、磷源磷酸铝(13.5 mmol/L)、磷源磷酸铁(15.1 mmol/L)培养条件下柠檬酸含量具有显著差异( $P < 0.05$ ); 处理组为对照组的 1.9–5.1 倍。



表 1 发酵液在不同磷源下的有效磷含量、溶磷率和 pH

Table 1 Available phosphorus content, soluble phosphorus rate and pH of fermentation broth under different phosphorus sources

Phosphorus source	Available phosphorus content (mg/L)		Phosphate solubilization efficiency (%)		pH	
	CK	Treatment	CK	Treatment	CK	Treatment
Lecithin	5.266±0.15a	25.880±0.20b/d	0a	0.55b/d	7	6.25±0.25
Aluminum phosphate	8.240±0.28a	39.015±0.41b/c	0a	5.08b/c	5.5	4.85±0.15
Calcium phytate	6.954±0.08a	75.029±0.31b/a	0a	9.31b/a	7	5.75±0.25
Iron phosphate	10.412±0.51a	52.151±0.62b/b	0a	5.53b/b	5.5	5.15±0.15

/前不同小写字母表示同一磷源下对照组与处理组差异显著性( $P<0.05$ ); /后不同小写字母表示不同磷源下各处理组差异显著性( $P<0.05$ ). 下同

Different lowercase letters before / indicate that there is a significant difference between the control group and the treatment group under the same phosphorus source ( $P<0.05$ ); Different lowercase letters after / indicated that there were significant differences among the treatment groups under different phosphorus sources ( $P<0.05$ ). The same below.

## 2.5 不同磷源对发酵液中酸性磷酸酶含量的影响

酸性磷酸酶在不同磷源发酵液中均可产生, 在植酸钙为磷源的处理组发酵液中酸性磷酸酶含量最高, 与其余 3 种磷源发酵液含量具有显著差异( $P<0.05$ ) (图 7)。处理组含量均高于对照组, 以卵磷脂和植酸钙为磷源的发酵液中处理组(0.004 1 U/mL 和 0.006 7 U/mL)较对照组(0.001 3 U/mL 和 0.004 4 U/mL)具有显著差异( $P<0.05$ ), 处理组含量为对照组的 3.2 倍和 1.5 倍。以磷酸铝与磷酸铁为磷源的发酵液中处理组

(0.004 0 U/mL 和 0.003 9 U/mL)与对照组(0.002 9 U/mL 和 0.003 0 U/mL)无显著差异, 处理组含量是对照组的 1.4 倍和 1.3 倍。

## 2.6 生物量与生理特性相关性分析

通过综合对不同磷源条件下菌丝球干重、有效磷含量、溶磷率、pH、柠檬酸含量和酸性磷酸酶含量进行皮尔逊相关性分析发现(图 8), 菌丝球干重与有效磷含量、溶磷率和柠檬酸含量呈负相关, 与 pH 和酸性磷酸酶含量呈正相关; 有效磷含量与 pH 呈负相关, 与酸性磷酸酶含量呈正相关, 与溶磷率呈显著正相关( $P<0.05$ ), 与

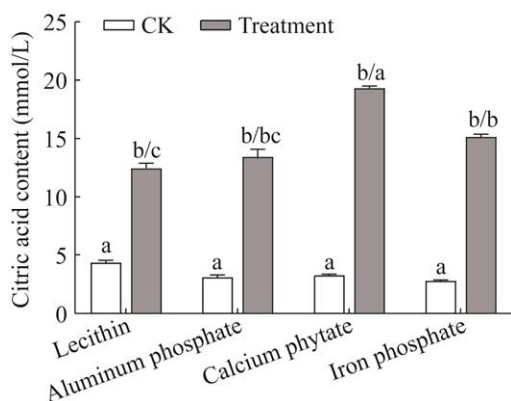


图 6 不同磷源下发酵液中柠檬酸含量

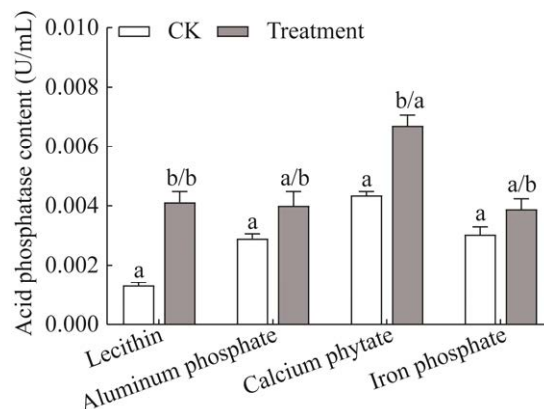
Figure 6 Citric acid content in fermentation broth under different phosphorus sources ( $P<0.05$ ).

图 7 不同磷源下发酵液中酸性磷酸酶含量

Figure 7 Acid phosphatase content in fermentation broth under different phosphorus sources ( $P<0.05$ ).

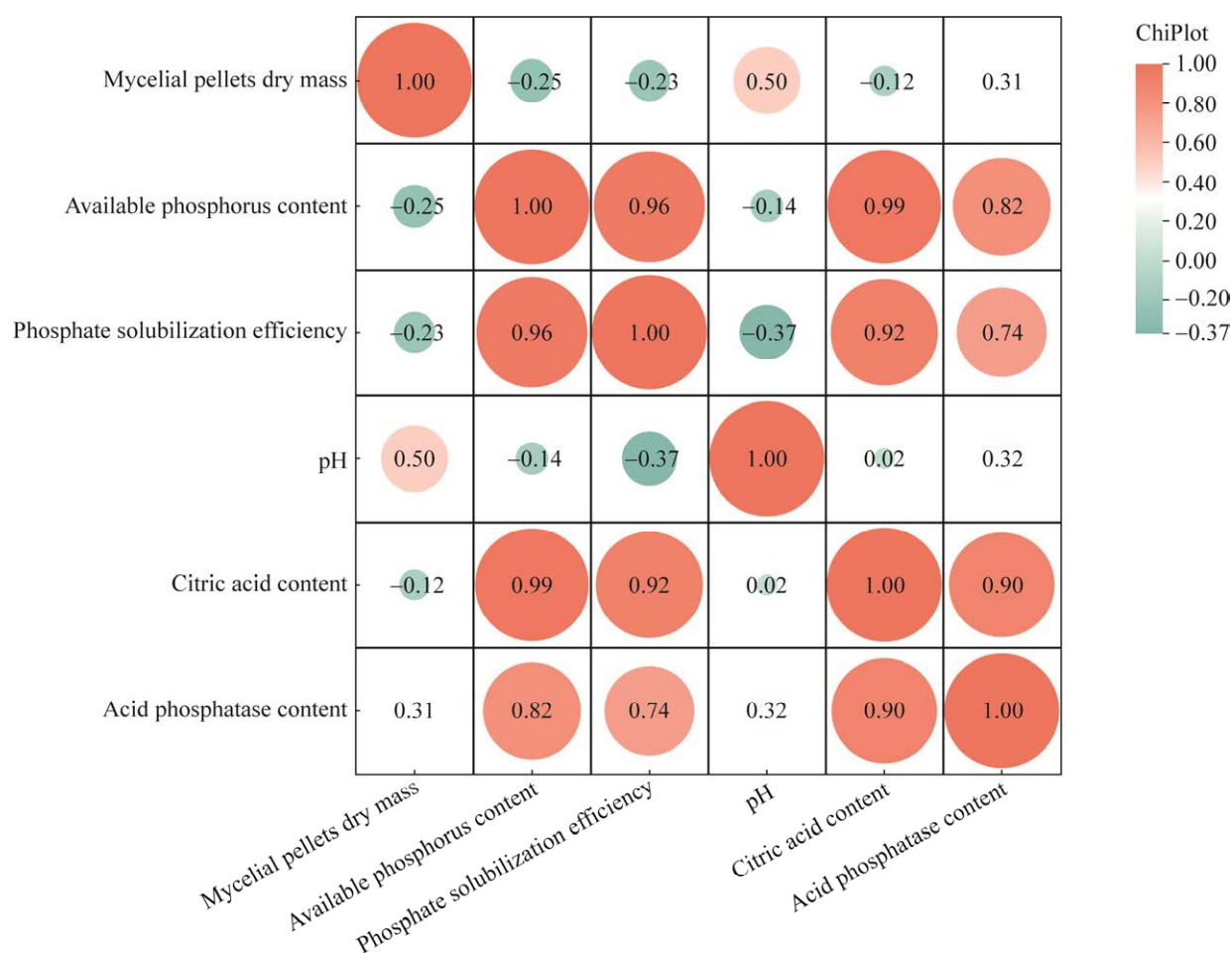


图 8 不同磷源下生物量与生理特性相关性分析

Figure 8 Correlation analysis of biomass and physiological characteristics under different phosphorus sources.

柠檬酸含量呈极显著正相关( $P < 0.01$ ); 溶磷率与 pH 呈负相关, 与柠檬酸含量和酸性磷酸酶含量呈正相关; pH 与柠檬酸含量和酸性磷酸酶含量呈正相关; 柠檬酸含量与酸性磷酸酶含量呈正相关。

### 3 讨论与结论

本研究对野外采集的子实体进行组织分离和纯化获取菌种, 提取子实体与菌丝体 DNA 进行分子鉴定, 均确定为盾状粉褶菌。该菌为粉褶菌属为数不多的可食野生外生菌根真菌 (ECMF), 可与蔷薇科植物尤其果树形成菌根。

ECMF 在生态系统中具有重要作用, 真菌菌丝通过侵入植物根系形成哈蒂氏网, 在土壤中分泌酶类和生长调节物质促进植物生长, 提高植物吸收营养元素和水分的的能力, 增强植物对逆境的防御<sup>[31]</sup>。

磷是土壤中植物生长的主要限制元素, 土壤中高达 90% 的磷植物无法获取<sup>[32-33]</sup>。植物对磷的主动吸收会使根系周围产生贫瘠区, ECMF 可以通过诱导多种形态、生理和生化适应来改善寄主植物的磷营养<sup>[34-36]</sup>。植物通过真菌菌丝获取磷酸盐, van Tichelen 等证实, 与无菌根植



物相比, 菌根植物根系对磷的吸收能力更强<sup>[37]</sup>。菌根植物中磷的积累与外部菌丝生长有关, 说明磷可直接从真菌转移到植物的根部<sup>[38]</sup>。在分子水平上, 菌丝通过表达质膜转运蛋白获得磷<sup>[39]</sup>。基于酵母 PHO84 和 PHO89 磷转运蛋白同源性, 在 ECMF 中发现几个可能编码磷转运蛋白的基因<sup>[40-41]</sup>。大多数测序的 ECMF 含有 3-5 个属于 Pht1 亚家族的假定  $H^+$ /Pi 协同转运子, 表明 ECMF 吸收磷的能力依赖于外界的 pH<sup>[42]</sup>。ECMF 通过分泌低分子量的有机酸和质子从不溶性矿物质中释放磷<sup>[43]</sup>, 通过利用磷矿石证实了 ECMF 的这种能力作为共生植物中磷积累的唯一来源<sup>[44-45]</sup>。ECMF 释放有机酸的能力也与真菌和植物种类有关, 因此在提高磷含量中具有高度可变性<sup>[46]</sup>。ECMF 还可以产生磷酸酶, 去除磷化合物中的磷酸盐基团<sup>[12]</sup>。在无菌培养中, 磷酸酶活性在低磷水平下得到增强<sup>[47]</sup>。当寄主植物需要磷时也有相同现象, 表明来自植物的分子信号可以触发共生真菌磷酸酶的表达<sup>[48-49]</sup>。但控制磷酸化合物获取、移动和递送到共生植物的分子参与者, 包括转运体和调节体仍然未知<sup>[42]</sup>。

因磷酸盐的形态不同, 其结构和成分具有很大差异, 致使真菌对其溶解能力不同。本研究对不同磷源条件下的菌丝生长情况和溶磷指标进行测定, 结果表明, 盾状粉褶菌菌种在不同磷源培养条件下均可正常生长, 接种菌种后处理组有效磷含量、溶磷率、柠檬酸和酸性磷酸酶含量高于对照组, 具有显著差异( $P<0.05$ ), 各处理组间也不相同; 各磷源条件培养后, 发酵液 pH 值均降低。pH 值降低可能会增加对磷的溶解, 提高磷的可用性<sup>[50]</sup>, 但具体原因尚不清楚; 柠檬酸会促进土壤中磷的释放, 外生菌根菌可分泌有机酸活化难溶性磷, 增加磷的亲

和性; 酸性磷酸酶会促进磷的水解<sup>[51]</sup>; 综合不同磷源条件下的特性发现, 有效磷含量与 pH 和菌丝球干重呈负相关, 这与徐冰等<sup>[52]</sup>、刘辉等<sup>[28]</sup>的研究结果一致, 与酸性磷酸酶活性呈正相关, 与溶磷率呈显著正相关( $P<0.05$ ), 与柠檬酸呈极显著正相关( $P<0.01$ )。菌丝在生长过程中, 柠檬酸和酸性磷酸酶含量增加能够降低发酵液的 pH 值, 从而促进难溶性磷的水解, 增加可溶性磷含量, 进而可提高植物对磷的吸收。

ECMF 和磷酸盐(Pi)均能促进植物生长, 但过度施入磷肥导致植物不能完全吸收会造成资源浪费和环境污染。然而 ECMF 可通过菌丝增加植物根系与土壤的接触面积, 促进植物对土壤中磷酸盐的吸收。ECMF 在保护环境、节约资源和降低生产成本等方面是一种较好的替代磷肥的育苗生产方式。不同 ECMF 对磷酸盐的利用程度不同, 同一菌株对不同磷酸盐的利用程度也存在差异。盾状粉褶菌具有利用难溶性磷源的能力, 可为开发利用盾状粉褶菌和进一步挖掘 ECMF 溶磷机制提供研究基础。

## REFERENCES

- [1] 倪亚兰. 酸性铝胁迫下外生菌根对无机难溶性磷的活化与利用[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2018. NI YL. Research on the activation of insoluble phosphorus by ectomycorrhizal fungi under acid aluminum stress[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2018 (in Chinese).
- [2] 梅言, 戴传超, 贾永. 外生菌根真菌及其菌根辅助细菌协同解磷的研究进展[J]. 生态学杂志, 2022, 41(8): 1619-1627. MEI Y, DAI CC, JIA Y. Research progress of synergistic phosphorus solubilization between ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizal helper bacteria[J]. Chinese Journal of Ecology, 2022, 41(8): 1619-1627 (in Chinese).
- [3] CHIOU TJ, LIN SI. Signaling network in sensing phosphate availability in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2011, 62: 185-206.

- [4] ZHANG L, FENG G, DECLERCK S. Signal beyond nutrient, fructose, exuded by an arbuscular mycorrhizal fungus triggers phytate mineralization by a phosphate solubilizing bacterium[J]. The ISME Journal, 2018, 12(10): 2339-2351.
- [5] 吕俊, 王晓娅. 溶磷微生物及其对植物促生作用的研究进展[J]. 中国土壤与肥料, 2023(1): 231-239.  
LÜ J, WANG XY. Research progress on phosphorus-solubilizing microorganisms and their effects on plant growth[J]. Soils and Fertilizers Sciences in China, 2023(1): 231-239 (in Chinese).
- [6] 杨顺, 杨婷, 林斌, 刘杏忠, 向梅春. 两株溶磷真菌的筛选、鉴定及溶磷效果的评价[J]. 微生物学报, 2018, 58(2): 264-273.  
YANG S, YANG T, LIN B, LIU XZ, XIANG MC. Isolation and evaluation of two phosphate-dissolving fungi[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(2): 264-273 (in Chinese).
- [7] 杨慧, 范丙全, 龚明波, 李全霞. 一株新的溶磷草生欧文氏菌的分离、鉴定及其溶磷效果的初步研究[J]. 微生物学报, 2008, 48(1): 51-56.  
YANG H, FAN BQ, GONG MB, LI QX. Isolation and identification of a novel phosphate dissolving strain P21[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(1): 51-56 (in Chinese).
- [8] D'AMICO M, ALMEIDA JP, BARBIERI S, CASTELLI F, SGURA E, SINEO G, MARTIN M, BONIFACIO E, WALLANDER H, CELI L. Ectomycorrhizal utilization of different phosphorus sources in a glacier forefront in the Italian Alps[J]. Plant Soil, 2020, 446: 81-95.
- [9] 冯万艳, 孙学广, 丁贵杰. 外生菌根预共生阶段信号识别机制研究进展[J]. 植物生理学报, 2021, 57(4): 749-758.  
FENG WY, SUN XG, DING GJ. Advance of ectomycorrhizal signal recognition mechanism in pre-symbiosis[J]. Plant Physiology Journal, 2021, 57(4): 749-758 (in Chinese).
- [10] 高程, 郭良栋. 外生菌根真菌多样性的分布格局与维持机制研究进展[J]. 生物多样性, 2013, 21(4): 488-498.  
GAO C, GUO LD. Distribution pattern and maintenance of ectomycorrhizal fungus diversity[J]. Biodiversity Science, 2013, 21(4): 488-498 (in Chinese).
- [11] READ DJ, PEREZ-MORENO J. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems-a journey towards relevance?[J]. New Phytologist, 2003, 157(3): 475-492.
- [12] MEEDS JA, MARTY KRANABETTER J, ZIGG I, DUNN D, MIROS F, SHIPLEY P, JONES MD. Phosphorus deficiencies invoke optimal allocation of exoenzymes by ectomycorrhizas[J]. The ISME Journal, 2021, 15(5): 1478-1489.
- [13] PLASSARD C, LOUCHE J, ALI MA, DUCHEMIN M, LEGNAME E, CLOUTIER-HURTEAU B. Diversity in phosphorus mobilisation and uptake in ectomycorrhizal fungi[J]. Annals of Forest Science, 2011, 68(1): 33-43.
- [14] 陈双双, 王腾, 朱丽静, 邢宇, 房克凤, 杨柳, 张卿, 曹庆芹, 秦岭. 菌根真菌处理下板栗对矿质元素的吸收和积累[J]. 北京农学院学报, 2015, 30(2): 28-34.  
CHEN SS, WANG T, ZHU LJ, XING Y, FANG KF, YANG L, ZHANG Q, CAO QQ, QIN L. Absorption and accumulation of mineral elements in *Castanea mollissima* inoculated with mycorrhizal fungi[J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2015, 30(2): 28-34 (in Chinese).
- [15] 张珍明, 贺红早, 张家春, 李青, 刘盈盈. 接种外生菌根菌对无籽刺梨生长和碳、氮、磷分布的影响[J]. 北方园艺, 2016(4): 151-154.  
ZHANG ZM, HE HZ, ZHANG JC, LI Q, LIU YY. Effect of ectomycorrhizal fungi on the seed growth of *Rosa sterilis* and carbon, nitrogen, phosphorus distribution[J]. Northern Horticulture, 2016(4): 151-154 (in Chinese).
- [16] ZUO RH, ZOU F, TIAN SY, MASABNI J, YUAN DY, XIONG H. Differential and interactive effects of *Scleroderma* sp. and inorganic phosphate on nutrient uptake and seedling quality of *Castanea henryi*[J]. Agronomy, 2022, 12(4): 901.
- [17] PRITSCH K, GARBAYE J. Enzyme secretion by ECM fungi and exploitation of mineral nutrients from soil organic matter[J]. Annals of Forest Science, 2011, 68(1): 25-32.
- [18] ALEXSSANDRA NERIS LINO I, dos SANTOS VM, ELENA COSTA ESCOBAR I, ALVES DA SILVA DK, de ARAÚJO ASF, MAIA LC. Soil enzymatic activity in *Eucalyptus grandis* plantations of different ages[J]. Land Degradation & Development, 2016, 27(1): 77-82.
- [19] ZHAO FZ, REN CJ, HAN XH, YANG GH, WANG J, DOUGHTY R. Changes of soil microbial and enzyme activities are linked to soil C, N and P stoichiometry in afforested ecosystems[J]. Forest Ecology and Management, 2018, 427: 289-295.
- [20] 孙佳琦, 曹文琪, 冷平生, 胡增辉. 接种 4 种外生菌根真菌对榿树幼苗生长、光合及营养元素含量的影响[J]. 中南林业科技大学学报, 2021, 41(10): 67-74, 101.

- SUN JQ, CAO WQ, LENG PS, HU ZH. Effect of four ectomycorrhizal fungi inoculation on the growth, photosynthesis, and nutrient element content of *Quercus dentata* seedlings[J]. Journal of Central South University of Forestry&Technology, 2021, 41(10): 67-74, 101 (in Chinese).
- [21] NOORDELOOS M. *Entoloma* subgenera *Entoloma* and *Allocybe* in the Netherlands and adjacent regions with a reconnaissance of their remaining taxa in Europe[J]. Persoonia, 1981, 11: 153-256.
- [22] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000.
- MAO XL. The Macrofungi in China[M]. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press, 2000 (in Chinese).
- [23] KOBAYASHI H, HATANO K. A morphological study of the mycorrhiza of *Entoloma clypeatum* f. *hybridum* on *Rosa multiflora*[J]. Mycoscience, 2001, 42(1): 83-90.
- [24] SHISHIKURA M, SUGAWARA R, TAKEMURA Y, SOTOME K, MAEKAWA N, NAKAGIRI A, ENDO N. First successful isolation of *Entoloma clypeatum* species complex from basidiospores[J]. Mycoscience, 2019, 60(4): 221-227.
- [25] KOBAYASHI H, DEGAWA Y, YAMADA A. Two new records of entolomatoid fungi associated with rosaceous plants from Japan[J]. Mycoscience, 2003, 44(4): 331-333.
- [26] 何晓兰. 中国粉褶蕈属分类及粉褶蕈科分子系统学研究[D]. 广州: 华南农业大学博士学位论文, 2012.
- HE XL. Taxonomy of *Entoloma* in China and molecular phylogeny on *Entolomataceae*[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [27] 徐润冰. 深色有隔内生真菌嗜鱼外瓶霉(*Exophiala pisciphila*)促进玉米磷吸收的机制研究[D]. 云南: 云南大学博士学位论文, 2017.
- XU RB. The mechanisms of maize phosphorus absorption enhanced by a dark septate endophyte (*Exophiala pisciphila*) colonization[D]. Yunnan: Doctoral Dissertation of Yunnan University, 2017 (in Chinese).
- [28] 刘辉, 吴小芹, 陈丹. 4 种外生菌根真菌对难溶性磷酸盐的溶解能力[J]. 西北植物学报, 2010, 30(1): 143-149.
- LIU H, WU XQ, CHEN D. Ability of dissolving insoluble phosphate by four ectomycorrhizal fungi[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2010, 30(1): 143-149 (in Chinese).
- [29] HE XL, LI TH, JIANG ZD, SHEN YH. Four new species of *Entoloma* s.l. (Agaricales) from southern China[J]. Mycological Progress, 2012, 11(4): 915-925.
- [30] SHISHIKURA M, TAKEMURA Y, SOTOME K, MAEKAWA N, NAKAGIRI A, ENDO N. Four mycelial strains of *Entoloma clypeatum* species complex form ectomycorrhiza-like roots with *Pyrus betulifolia* seedlings *in vitro*, and one develops fruiting bodies 2 months after inoculation[J]. Mycorrhiza, 2021, 31(1): 31-42.
- [31] 薛小平, 张深, 李海涛, 陈吉, 黄建国. 磷对外生菌根真菌松乳菇和双色蜡蘑草酸、氢离子和磷酸酶分泌的影响[J]. 菌物学报, 2008, 27(2): 193-200.
- XUE XP, ZHANG S, LI HT, CHEN J, HUANG JG. Effects of phosphorus on the excretion of oxalate, hydron and phosphatase by ectomycorrhizal fungi *Lactarius deliciosus* and *Laccaria bicolor*[J]. Mycosystema, 2008, 27(2): 193-200 (in Chinese).
- [32] YANG XJ, FINNEGAN PM. Regulation of phosphate starvation responses in higher plants[J]. Annals of Botany, 2010, 105(4): 513-526.
- [33] HINSINGER P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review[J]. Plant and Soil, 2001, 237(2): 173-195.
- [34] SMITH SE, READ DJ. Mycorrhizal Symbiosis[M]. 3rd ed. Amsterdam: Academic Press, 2008.
- [35] PLASSARD C, DELL B. Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees[J]. Tree Physiology, 2010, 30(9): 1129-1139.
- [36] CAIRNEY JWG. Ectomycorrhizal fungi: the symbiotic route to the root for phosphorus in forest soils[J]. Plant and Soil, 2011, 344(1): 51-71.
- [37] van TICHELEN KK, COLPAERT JV. Kinetics of phosphate absorption by mycorrhizal and non-mycorrhizal Scots pine seedlings[J]. Physiologia Plantarum, 2000, 110(1): 96-103.
- [38] TORRES AQUINO M, PLASSARD C. Dynamics of ectomycorrhizal mycelial growth and P transfer to the host plant in response to low and high soil P availability[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 48(2): 149-156.
- [39] GARCIA K, ANÉ JM. Comparative analysis of secretomes from ectomycorrhizal fungi with an emphasis on small-secreted proteins[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1734.
- [40] CASIERI L, LAHMIDI NA, DOIDY J, VENEULT-

- FOURREY C, MIGEON A, BONNEAU L, COURT Y PE, GARCIA K, CHARBONNIER M, DELTEIL A, BRUN A, ZIMMERMANN S, PLASSARD C, WIPF D. Biotrophic transportome in mutualistic plant-fungal interactions[J]. *Mycorrhiza*, 2013, 23(8): 597-625.
- [41] KOHLER A, KUO AL, NAGY LG, MORIN E, BARRY KW, BUSCOT F, CANBÄCK B, CHOI C, CICHOCKI N, CLUM A, COLPAERT J, COPELAND A, COSTA MD, DORÉ J, FLOUDAS D, GAY G, GIRLANDA M, HENRISSAT B, HERRMANN S, HESS J, et al. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists[J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(4): 410-415.
- [42] BECQUER A, GUERRERO-GALÁN C, EIBENSTEINER JL, HOUDINET G, BÜCKING H, ZIMMERMANN SD, GARCIA K. The ectomycorrhizal contribution to tree nutrition[M]//*Advances in Botanical Research*. Amsterdam: Elsevier, 2019: 77-126.
- [43] RINEAU F, GARBAYE J. Effects of liming on potential oxalate secretion and iron chelation of beech ectomycorrhizal root tips[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(2): 331-339.
- [44] SMITS MM, BONNEVILLE S, HAWARD S, LEAKE JR. Ectomycorrhizal weathering, a matter of scale?[J]. *Mineralogical Magazine*, 2008, 72(1): 131-134.
- [45] LIU Q, LOGANATHAN P, HEDLEY MJ, GRACE LJ. Effect of mycorrhizal inoculation on rhizosphere properties, phosphorus uptake and growth of pine seedlings treated with and without a phosphate rock fertilizer[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 2007, 31(1): 137-156.
- [46] COURT Y PE, BUÉE M, DIEDHIOU AG, FREY-KLETT P, LE TACON F, RINEAU F, TURPAULT MP, UROZ S, GARBAYE J. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(5): 679-698.
- [47] LOUCHE J, ALI MA, CLOUTIER-HURTEAU B, SAUVAGE FX, QUIQUAMPOIX H, PLASSARD C. Efficiency of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* to hydrolyse organic phosphorus in podzols[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 73(2): 323-335.
- [48] ALVAREZ M, HUYGENS D, DÍAZ LM, VILLANUEVA CA, HEYSER W, BOECKX P. The spatial distribution of acid phosphatase activity in ectomycorrhizal tissues depends on soil fertility and morphotype, and relates to host plant phosphorus uptake[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2012, 35(1): 126-135.
- [49] AARLE IMV, PLASSARD C. Spatial distribution of phosphatase activity associated with ectomycorrhizal plants is related to soil type[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(2): 324-330.
- [50] 薛小平. 磷对外生菌根真菌生长及草酸、氢离子和磷酸酶分泌的影响[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2007.
- XUE XP. Effects of phosphorus on the growth of ectomycorrhizal fungi and the secretion of oxalic acid, hydrogen ion and phosphatase[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2007 (in Chinese).
- [51] 黄宇, 张海伟, 徐芳森. 植物酸性磷酸酶的研究进展[J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(1): 148-154.
- HUANG Y, ZHANG HW, XU FS. Research progress on plant acid phosphatase[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2008, 27(1): 148-154 (in Chinese).
- [52] 徐冰, 李白, 秦岭, 李晓林. 不同外生菌根真菌对难溶性磷的活化[J]. *吉林农业大学学报*, 2000, 22(4): 76-80.
- XU B, LI B, QIN L, LI XL. Solubilization of rock phosphate by different ectomycorrhizal fungi (in solution culture)[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2000, 22(4): 76-80 (in Chinese).