文章编号:1000-7601(2019)04-0253-10 **doi**:10.7606/j.issn.1000-7601.2019.04.34

一株溶磷菌的分离鉴定及溶磷促生作用

薛应钰,叶 巍,杨 树,李 培,徐秉良

(甘肃农业大学植物保护学院/甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室,甘肃 兰州 730070)

摘 要:为了提高土壤磷素利用率,为微生物磷肥开发提供高效菌种资源,采用平板分离法从荒漠绿洲过渡带白刺根际土壤分离筛选出一株溶磷能力强的真菌 P-1407,对其溶磷特性、产酸特性和耐盐碱特性进行研究。结果表明,液体条件下培养 10 d,菌株 P-1407 对 $Ca_3(PO_4)_2$表现出高效的溶解能力,最大溶磷量为 557 μg · mL^{-1};其溶磷量和 pH 值变化呈显著负相关,溶磷过程中分泌的有机酸种类主要为葡萄糖酸、草酸及甲酸;在高浓度 NaCl 和较高的 pH 值条件下仍保持较高的溶磷能力;结合培养性状、显微形态特征和 ITS rDNA 序列分析,鉴定菌株 P-1407 为草酸青霉(*Penicillium oxalicum*);盆栽试验表明,P-1407 菌株对番茄的促生作用较对照显著提高,番茄种子发芽率提高了2.53%,番茄植株的株高、根长、地上部鲜重、地上部干重、地下部鲜重和地下部干重分别增加了 109.27%、78.41%、82.95%、121.69%、94.74%和 64.71%。因此,P-1407 是一株展现良好应用前景的高效溶磷菌种,有望为土壤的改良和生物菌肥的开发提供种质资源。

关键词:溶磷真菌;溶磷特性;促生作用;番茄

中图分类号:S154.3;X172 **文献标志码**:A

Isolation and identification of P-dissolving fungi strain and its effects on phosphate-solubilizing and plant growth promotion

XUE Ying-yu, YE Wei, YANG Shu, LI Pei, XU Bing-liang

(*College of Plant Protection, Gansu Agricultural University/Biocontrol Engineering Laboratory of Crop Diseases and Pests of Gansu Province, Lanzhou, Gansu* 730070, *China*)

Abstract: In order to improve phosphorus of soil and provide P-solubilizing microbial resource for biofertilizer production, a fungi P-1407 with strong phosphate-solubilizing ability was isolated from rhizosphere soil of Nitraria tangutorum in Minqin desert-oasis ecotone by using flat plate separation method. The dissolving characteristics, acid production, and resistance to salt-alkaline of strain P-1407 were also studied.The results showed that the strain P-1407 had high-efficiency of phosphate-solubilizing capability for $Ca_3(PO_4)_2$ during a 10d shaking incubation. The maximum activity of phosphate-dissolving was reached at 557 μg · mL^{-1}. Also, Its P solubilizing capacity was negatively related to soil pH.It was revealed that the strain P-1407 mainly secreted gluconic acid, oxalic acid, and formic acid using HPLC analysis.The strain P-1407 was stable under alkaline and high salt conditions. According to its cultural characteristics, micromorphological characteristics, and ITS rDNA sequence, the strain P-1407 was identified as Penicillium oxalicum.The pot culture experiment results showed that the germination rate of tomato seed treated with P-1407 increased by 2.53% compared with that of the control, and the plant height, root length, fresh weight of aboveground parts, dry weight of aboveground parts, fresh weight of underground parts and dry weight of underground parts were increased by 109.27%, 109.27%, 82.95%, 121.69%, 82.95%, and 121.69%, respectively.Therefore, the strain P-1407 is a promising microbial resource for development of high efficiency biological phosphorus fertilizer of soil in the future.

收稿日期:2018-09-19 **修回日期**:2018-12-04

基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFD0201100);甘肃省高校基本科研业务费(甘财教[2012]129 号);甘肃省教育厅高校科研项目(2013A-061);甘肃农业大学科技创新基金(GAU-CX1014)

作者简介:薛应钰(1978-),男,甘肃镇原人,博士,副教授,研究方向为植物病害生物防治。E-mail:xueyy@ gsau.edu.cn

通信作者:徐秉良(1962-),女,浙江桐乡人,博士,教授,研究方向为植物病害综合治理。E-mail:xubl@ gsau.edu.cn

Keywords: phosphate-solubilizing fungi; dissolving characteristics; promoting effect; tomato

磷素是植物生长发育所必需的三大矿质营养元素之一,它对植物的生长发育和品质提高有重要意义[1]。然而,自然条件下土壤中 90%以上的磷通常是以难溶的金属螯合物形式存在的无效磷,植物难以直接吸收利用[2],施用磷肥(包括有机和化学磷肥)是土壤磷素的主要来源,但是,施入的磷肥当季利用率仅为 5%~25%,大部分由于很快发生专性吸附和化学沉淀固定作用而形成 Ca-P,Fe-P 和 Al-P 等难溶性磷酸盐(无效态)积累在土壤中[3-4],土壤有效磷的缺乏已成为限制植物生长的主要因素之一。因此,挖掘土壤潜在的磷库资源,寻求新的方法提高磷肥利用率迫在眉睫。研究表明,植物根际土壤中存在的大量溶磷微生物(Phosphate-soluble microorganisms,PSMs)可以将土壤中难溶性磷转化成植物能够吸收利用的可溶性磷,自 Staltrom[5]发现土壤中存在溶磷微生物以来,至今已报道的溶磷微生物达 36 个属,89 个种[6],且真菌的溶磷能力大于细菌,溶磷性能稳定[7]。溶磷微生物拥有溶解难溶磷的能力,被公认为安全、经济、高效的活化土壤难溶磷的生物措施,具有重大的开发应用价值。

土壤溶磷微生物种类繁多,生态环境、土壤类型、作物根际等条件下的差异均会导致溶磷微生物的分布不同[8]。易艳梅等[9]对不同生态环境土壤中溶磷微生物的研究发现,磷矿区溶磷微生物数量多、种类丰度高;盐渍土溶磷细菌的优势种群单一;重金属污染区最少,且以巨大芽孢杆菌为主。溶磷微生物在土壤中的数量、种类在不同的土壤类型中也有差异。各类土壤中溶磷微生物的数量分布呈现:黑钙土>黄棕壤>白土>红壤>砖红壤>瓦碱土[10];黄伟等[11]发现,我国热带亚热带的黄棕壤和红壤中溶磷细菌种类繁多,东北黑钙土中溶磷细菌的数量很多,但丰度低,以芽孢杆菌(*Bacillus*)和假单胞菌(*Pseudomonas*)为主。种植不同植物的土壤中主要溶磷微生物的分布有差异。林启美等[12]通过对不同植物根际土壤溶磷菌的数量及种群结构的分析发现菜地土壤溶磷细菌的数量和种类最多,农田、菜地和草地的土壤以假单胞菌属为主,但农田土壤有一半是沙雷氏菌属(*Serratia*),而菜地约有 50%是欧文氏菌属(*Erwinia*),草地土壤有大量的芽孢杆菌属和固氮菌属(*Azotobacter*)。林地土壤没有假单胞菌属、芽孢杆菌属和固氮菌属。不同植物根际溶磷微生物的分布也有所不同。小麦根际溶磷菌主要为假单胞菌属和埃希氏菌属(*Escherichia*)[13],水稻根际主要为芽孢杆菌属和土壤单胞菌属(*Agromonas*)[14],玉米根际溶磷微生物主要是欧文氏菌属[15]。而且,根际土壤中溶磷菌的丰富度比非根际土壤更加复杂[16]。

目前,绝大多数溶磷菌株是从作物根际土壤中获得,而有些溶磷菌是从特殊环境中分离,以期更好地利用此类菌株具有溶磷功能和兼具适应土著环境的特性[17]。Chatli 等[18]从低温沙漠地区分离了溶磷青霉菌株 FC28、FC39,对磷酸三钙的溶解量分别为 136.9 mg·L^{-1} 和 103.3 mg·L^{-1};Bhattacharya 等[19]从蚯蚓粪便中分离到溶磷黑曲霉(*Aspergillus niger*)菌株 V1,对磷矿粉最大溶解率为 36%;Naveenkumar 等[20]从槟榔壳废弃物中获得了构巢曲霉(*Spergillus nidulans*)菌株 Strain-1,对磷酸三钙的溶解量为 200 mg·L^{-1};Rinu 等[21]从海拔 1 800~3 610 m 的喜马拉雅山脉土壤中分离到溶磷菌株 ITCC2546、ITCC4210 和 ARIFCC771,在盆栽实验中使玉米种子干重分别增加 10.71%、33.33% 和 21.43%;李海云等[22]从猪粪堆肥中筛选到溶磷产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)菌株 PSM-1,对磷酸三钙的溶解量为 138.36 mg·L^{-1}。可见,在特定环境条件下溶磷菌具有其特有性和多样性。目前,针对民勤荒漠绿洲过渡带特殊的地理区域,关于溶磷菌筛选的研究报道较少。

因此,以生长在民勤荒漠绿洲过渡带植物白刺为研究物种,对其根际土壤中的根际溶磷菌进行分离和筛选,并对筛选获得的高效溶磷菌株进行 ITS 序列分析,确定其分类学地位,研究溶磷特性及促生作用,以期为植物根际促生菌的开发利用和土壤改良提供优良菌种资源。

1 材料与方法

1.1 土壤样品来源

采样点位于甘肃省民勤县薛百乡沙井子,地理位置 E103°36′17.3″,N38°44′27.2″,海拔为 1 378 m,属典型的温带大陆性极干旱荒漠气候区,是民勤绿洲向巴丹吉林沙漠过渡的地带。年平均降水量 113.2 mm,年平均蒸发量 2 604.3 mm,年平均气温 7.6℃,土壤类型为棕漠土,储水能力弱,土壤有机质含量低,属白刺(*N. tangutorum*)集中分布地带。于 2014 年 8 月采用五点取样法采集白刺灌丛根际土样,采样时,选取采土点后铲去表层土后深挖 20~30 cm,以保证样本中包含较多的根际微生物。将白刺根系上一些细根和黏附其上的土壤一起装入事先

准备的无菌塑料袋,带回实验室,剔除石块、植物残根等杂物贮存于塑料袋内,置 4℃冰箱中保存备用。

1.2 培养基

1.2.1　溶磷培养基(NBRIP 培养基)　$(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g,NaCl 0.3 g,KCl 0.3 g,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 g,$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.03 g,$Ca_3(PO_4)_2$ 5 g,葡萄糖 10.0 g,pH7.0~7.5,固体培养基加 2%的琼脂粉,115℃ 30 min 灭菌备用。

1.2.2　PDA 培养基　马铃薯 200 g,葡萄糖 20.0 g,琼脂 18.0 g,蒸馏水定容至 1 000 mL。

1.3　方法

1.3.1　溶磷真菌的分离筛选　采用稀释分离法,称取 10 g 土样加到盛有 90 mL 无菌水的三角瓶中,加入玻璃珠,置于 180 r·min^{-1}的摇床上 28℃恒温振荡培养 48 h,然后用 10 倍稀释法分别配制 10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}的土壤悬液,取 0.1 mL 分别接种到 NBRIP 固体平板上涂布均匀,每个浓度涂布 3 个平板。倒置于培养箱中,28℃培养 7 d,记录溶磷圈直径(D')与菌落直径(D)。采用溶磷圈法(D'/D 值)对溶磷菌的溶磷性能进行定性测试,筛选出 D/d 值最大的菌株,转接到 PDA 平板上进行纯化,将纯化后的菌株转接到 PDA 斜面,4℃保藏。

1.3.2　溶磷特性研究

(1)固体培养条件下溶磷能力测定　将灭菌后的培养基在倒平板之前加入 Triton X-100 溶液,每 100 mL 培养基加入 5 mL 的 1% Triton X-100,然后挑取菌株 P-1407 孢子分别接种于 NBRIP 平板培养基上,置于 28℃光照培养,每隔 1d 观察菌落周围有无透明圈,测量记录溶磷圈直径(D')与菌落直径(D),共测量 10 d,并计算 D'/D 值。

(2)液体培养条件下溶磷能力测定　采用磷钼蓝分光光度法[23],略作修改。制取菌株 P-1407 孢子悬浮液(10^8 cfu·mL^{-1}),取 1 mL 菌液接种于盛有 100 mL NBRIP 液体培养基的三角瓶中,设不接菌为对照,每个处理重复 3 次,置于 28℃,150 r·min^{-1}摇床培养 10 d,分别培养 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 d 后过滤取上清液,将菌液 6 000 r·min^{-1}离心 30 min,吸取上清液 1 mL,加入准备好的试管中,另准备一支试管加入 1 mL 蒸馏水做对照,再向试管中加入 2 mL 水,2 mL 反应终止液,摇匀后 37℃水浴加热 10 min,利用 UV3010 紫外可见分光光度计在 415 nm 处通过比色法测定吸光光度值(OD)并记录数据,每个处理隔 5 s 测量 1 次,共测 3 次,取平均值;ΔOD_{415}=样品 ΔOD_{415}-对照 ΔOD_{415},根据标准曲线方程计算出菌液中可溶性磷的含量;同时用 pHS-29A 型酸度计直接测定培养液的 pH 值并记录数据。

1.3.3　有机酸种类及含量的测定　采用乔志伟[24]和乔欢[25]等的方法。取 1.3.2 中(2)的培养液 1 mL,在 4℃,12 000 r·min^{-1}、离心 10 min,取上清液过滤,采用 Agilent1200 液相色谱仪进行 HPLC 分析,确定有机酸的种类和浓度。

有机酸色谱条件为:色谱柱反相 C18 柱;流动相—甲醇和 1 mmol·L^{-1} KH_2PO_4(V/V)3∶97;流速 0.8 mL·min^{-1};测定波长:203 nm;进样量 20 μL;柱温 25℃;出峰顺序依次为草酸、甲酸、酒石酸、乳酸、琥珀酸。

葡萄糖酸色谱条件为:色谱柱:AgilentZORBAX SB-Phenyl,4.6 mm×250 mm,5μm;流动相:A:0.1% H_3PO_4,B:CH_3CN;流速:1 mL·min^{-1};梯度:0~4 min;B 相:40%;5~7 min;B:90%;测定波长:203 nm;进样体积:2 μL;柱温 25℃。

1.3.4　盐碱度对溶磷真菌解磷能力的影响　将菌株 P-1407 在 PDA 液体培养基中振荡培养 3 d 后,取 1 mL 分别接种至 0%、2%、4%、6%、8%、10% NaCl 和 pH 值为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的 NBRIP 液体培养基中,30℃、160 r·min^{-1}振荡培养 7 d,采用钼锑抗比色法测定各处理的可溶性磷含量。

1.3.5　溶磷菌株的鉴定

(1)形态学鉴定 将保存的高效溶磷菌株转接到 PDA 平板上,28℃培养 7 d,对菌落生长速率、正反面颜色、气味等培养性状以及无性型的产孢结构、分生方式、孢子形态、颜色、大小、瓶梗形态、数目和着生方式等显微形态进行观察并记录,进行初步鉴定。

(2)rDNA-ITS 序列分析　将高效溶磷菌株取其孢子转接于 PDA 液体培养基中,振荡培养 48 h,过滤,干燥,研磨,并用螯合树脂法提取 DNA。利用真菌通用引物 ITS1、ITS4 对提取的 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 10×PCR buffer 5.0 μL,dNTPs 4.0 μL,Taq 酶 0.5 μL,10 mmol·L^{-1} ITSl/ITS4 1.0 μL,模板 2.0 μL,ddH_2O 36.5 μL。反应程序为 94℃变性 3 min,94℃变性 40 s,55℃退火 40 s,72℃延伸 1 min,30 个循环;最后,72℃延伸 10 min,4℃保存。扩增产物经 1%琼脂糖进行电泳检测,纯化后送上海生物工程有限公司进行序列测定。将获得的 DNA 序列,输入 GenBank,与数据库中的所有序列进行 Blast 比对,选取同源性 95%以上的菌株序列,并利用 MEGA5.0 构建系统发育树。

1.3.6　菌株 P-1407 对番茄促生作用　(1)菌株 P-1407 发酵液的制备　将预先分离纯化得到的菌株

P-1407 接种于 PDA 培养基,置于 28℃培养箱中,28℃光暗交替(12 h/12 h)培养 5 d 后,加入 5 mL 无菌水和 1 滴 Tween-80 配制分生孢子悬浮液,利用血球计数板计数其浓度,无菌水稀释,最终使其浓度为 1×10^7 cfu · mL^{-1},取 1 mL 悬浮液于 50 mL NBRIP 液体培养基,置于 150 r · min^{-1}的摇床 25℃振荡培养 7 d,然后通过双层滤膜过滤,将得到的滤液分别用无菌水稀释为 50、100 倍和 200 倍液。以 NBRIP 液体培养基加入 1 mL 无菌水和 1 滴 Tween-80 为对照,处理和对照均为 3 个重复。

(2)菌株 P-1407 对番茄种子的影响　将供试的番茄种子经 5%NaClO 溶液进行消毒处理 5 min,消毒后将其通过无菌水充分冲洗 5 次,然后将其置于直径为 9 cm 的培养皿内进行种子处理。处理的过程中培养皿中含有一层纱布和两层滤纸进行保湿处理,各处理和对照均为 100 粒种子,重复 6 次。然后将配制好的不同浓度 P-1407 发酵液分别加 15 mL 于每个处理中,对照加入等量的 NBRIP 滤液,于温度为 25℃和光照为 16 h/8 h 的培养箱中进行培养。处理后待种子的胚根长度超过种子长度一半时开始统计种子的发芽率、发芽指数和活力指数[26]。

发芽率(%)=(发芽种子总数/供试种子总数)×100

$$发芽指数 = \sum Gt/Dt$$

式中,Gt 为 t 时间内的发芽数,Dt 为相应的发芽天数。

活力指数=发芽指数×单株平均干重

(3)温室试验　将经过 5%NaClO 消毒(5 min)处理的番茄种子,经无菌水充分冲洗后种植于装入灭菌土壤的塑料钵中(100 粒 · 钵$^{-1}$)。种植后待幼苗生长到两叶一心期时,分别将配制的发酵液(20 mL)浇灌于植株根系周围的土壤中,以浇灌等量的 NBRIP 滤液为对照。试验在温度为 25℃,光照为 16 h/8 h 的温室中进行,且各处理和对照均重复 6 次。处理后第 30 天,从每个处理和对照中分别随机抽取 60 株幼苗,测定番茄幼苗形态指标、叶绿素和丙二醛含量。根长和株高采用刻度尺进行测量,整株鲜重采用电子天平称量。同时将新鲜的植株通过干燥箱进行杀青处理,处理温度为 105℃,时间为 30 min,然后调节温度为 80℃烘干,并称量干重[27]。番茄幼苗叶绿素含量测定采用分光光度法[28],丙二醛含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法[29]。

2　结果与分析

2.1　溶磷菌株的分离

从民勤荒漠绿洲过渡带白刺根际土壤样品中筛选到具有溶磷效果的真菌 13 株。在 NBRIP 固体平板上培养 7 d,菌株 P-1407 溶磷圈直径(D')最大,达 5.25 cm,菌落直径(D)为 2.14 cm,溶磷菌圈直径与菌落直径之比(D'/D)最大为 2.45,其余 12 个菌株的 D'/D 值均小于 2(表 1)。因此,选取菌株 P-1407 进一步进行分子鉴定以及溶磷特性研究。

由表 2 可以看出,菌株 P-1407 在 NBRIP 固体平板上培养了 10 d,可以形成肉眼可见的透明溶磷圈,而且其溶磷圈直径(D')和菌落直径(D)均随着培养时间而不断增大,菌落直径由第 1 天的 0.73 cm 增大到第 10 天的 2.61 cm,溶磷圈直径由第 1 天的 0.75 cn 增大到第 10 天的 5.79 cm。但是通过计算 D'/D 值发现,培养 7 d 的 D'/D 值最大,为 2.52,表明该菌株在溶磷固体培养基上生长良好,其溶磷能力较好。

表 1　13 株真菌在固体培养条件下溶磷能力测定结果

Table 1　Phosphate solubilization capacity of 13 strains fungi incubated on solid medium

菌株 Strain	溶磷圈直径(D')/cm Diameter of P-solubilizing circle	菌落直径(D)/cm Colony diameter	D'/D
P-1401	2.19	2.01	1.09c
P-1402	2.67	2.32	1.15c
P-1403	2.33	2.08	1.12c
P-1404	4.99	2.52	1.98b
P-1405	5.16	2.85	1.81b
P-1406	2.88	2.69	1.07c
P-1407	5.25	2.14	2.45a
P-1408	4.42	2.35	1.88b
P-1409	3.58	2.89	1.24c
P-1410	2.61	2.23	1.17c
P-1411	2.17	2.07	1.05c
P-1412	2.86	2.31	1.24c
P-1413	2.42	2.07	1.17c

注:同一列不同字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

Note: The different letters in the same row indicate significant difference at $P<0.05$ level. The same below.

表 2　菌株 P-1407 在固体培养条件下溶磷能力

Table 2　Phosphate solubilization capacity of strain P-1407 incubated on solid medium

项目 Items	培养时间 Culture time/d									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
溶磷圈直径(D') Phosphate solubilization zone diameter	0.75	1.27	1.89	2.71	4.21	4.89	5.32	5.4	5.62	5.79
菌落直径(D) Colony diameter	0.73	1.18	1.43	1.7	1.87	2.04	2.11	2.24	2.47	2.61
D'/D	1.03	1.08	1.32	1.59	2.25	2.40	2.52	2.41	2.28	2.22

2.2　菌株 P-1407 溶磷能力的测定

液体培养条件下溶磷能力试验结果表明(图 1),菌株 P-1407 在 NBRIP 液体培养基中的溶磷能力随振荡培养时间而变化,在一定时间范围内达到最高值后,可溶性磷含量开始下降,也就是说随着培养时间的延长,菌株 P-1407 发酵液中的可溶性磷含量逐渐增多,最初 1~2 d 内,发酵液中可溶性磷含量增加较慢,在 2~6 d 增加较快,在 7 d 时达到最大值 557 μg · mL^{-1}。此后发酵液可溶性磷含量略有降低,液溶磷量基本稳定,而对照组中由于没有接种解磷菌株,其发酵液里的可溶性磷含量很低,而且基本一直维持在最初的低水平。

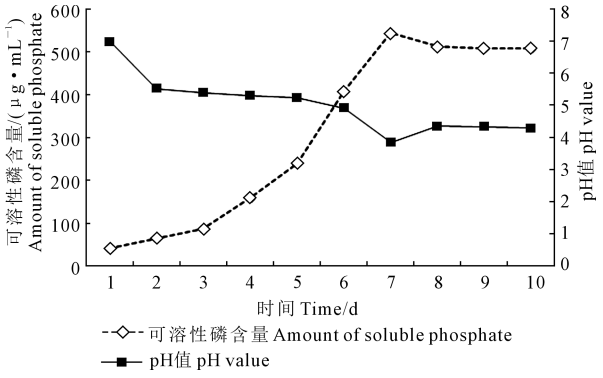


图 1　菌株 P-1407 在液体培养条件下溶磷效果和发酵液 pH 值变化

Fig.1　Variation of phosphate solubilization capacity and pH value of P-1407 in liquid medium

2.3　不同培养时间下发酵液的 pH 值变化

由图 1 可以看出,NBRIP 液体培养基接种菌株 P-1407 后,发酵液的 pH 值随着培养时间的延长而不断变化,总体呈现出一个先降低,然后基本稳定的趋势,在最初的 7 d 有明显的下降趋势,在第 7 天时 pH 值降到最低为 3.7,但到第 8 天后 pH 值略有回升并稳定在 4.5 左右。与未接种培养液(pH=7)相比,整个培养周期内接种菌株发酵液的 pH 值都有下降趋势。

综合 2.2 和 2.3,发现在整个培养周期内,发酵液液 pH 值与溶磷菌株 P-1407 溶磷量呈线性负相关,其线性方程为 $y=-203.14x+1037.6$,$R^2=0.910$,达极显著负相关($P<0.01$)。随着溶磷量的增大,pH 值呈明显下降趋势,后期虽然变化幅度不大,但仍保持在较低水平,表明菌株 P-1407 在培养过程中会分泌弱酸性物质。

2.4　菌株 P-1407 分泌有机酸种类及含量

高效液相色谱分析结果表明,菌株 P-1407 在溶磷过程中主要分泌 3 种有机酸,即葡萄糖酸、草酸和甲酸,其总量为 8.4 g · L^{-1}。其中葡萄糖酸含量最高,为 5.7 g · L^{-1},占所产有机酸总量的 67.85%;其次是草酸为 2.3 g · L^{-1},占 27.38%,甲酸含量最少,仅为 0.4 g · L^{-1}(表 3)。

2.5　NaCl 浓度对溶磷真菌解磷能力的影响

将菌株 P-1407 接种到含有不同浓度 NaCl 的 NBRIP 液体培养基培养 7 d,结果表明,NaCl 浓度对菌株 P-1407 的溶磷能力有一定的影响。菌株 P-1407 在含有 NaCl 的发酵液中可溶性磷含量与对照(540.32 μg · mL^{-1})相比均有不同程度的下降,而且随着 NaCl 浓度的升高,菌株 P-1407 的溶磷能力不断下降, NaCl 浓度为 0~6%范围内,发酵液中的可溶性磷含量减少幅度较小,NaCl 浓度为 6%时,可溶性磷含量仍保持在对照的 80%左右,达 468.29 μg · mL^{-1},而且与对照相比差异不显著,但是当 NaCl 浓度高于 6%时,发酵液中可溶性磷含量迅速下降,NaCl 浓度为 10%时,发酵液中可溶性磷含量仅为 305.33 μg · mL^{-1},仍达对照的 56.51%,说明低浓度的盐溶液对菌株 P-1407 的解磷能力影响较小。

表 3　菌株 P-1407 分泌有机酸的种类和含量

Table 3　The type and concentration of organic acids secreted by strain P-1407

菌株 Strain	有机酸 Organic acid/(g · L^{-1})						总含量 Total acids /(g · L^{-1})
	葡萄糖酸 Glucose acid	草酸 Oxalic acid	甲酸 Formic acid	酒石酸 Citric acid	乳酸 Acetic acid	琥珀酸 Succinate acid	
P-1407	5.7	2.3	0.4	-	-	-	8.4

菌株 P-1407 在含有不同浓度 NaCl 液体培养基培养 7 d,发酵液的 pH 值与对照相比均有所升高,而且随着 NaCl 浓度的增大,pH 值升高幅度也增大,即随着 NaCl 浓度的升高,发酵液的 pH 值逐渐升高,当 NaCl 浓度为 2%时,发酵液 pH 值为 4.02,当 NaCl 浓度升至 10%时,发酵液 pH 值为 4.97,表明高浓度 NaCl 抑制菌株 P-1407 产酸,溶磷能力降低。

2.6　碱性条件对溶磷真菌解磷能力的影响

由图 3 可以看出,碱性条件下,随着培养基 pH 值的升高,菌株 P-1407 的溶磷能力逐渐降低,pH 值为 7.5、8 和 8.5 时,发酵液中的可溶性磷含量分别为 489.27、469.02 μg · mL^{-1}和 433.19 μg · mL^{-1},但是与对照(pH=7)之间无显著差异;当培养基 pH 值

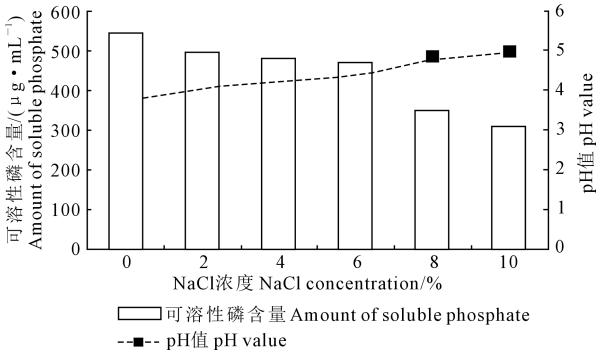


图 2 NaCl 浓度对菌株 P-1407 溶磷能力和发酵液 pH 值的影响

Fig.2 Effects of different NaCl concentration on phosphate solubilization capacity and pH value of P-1407

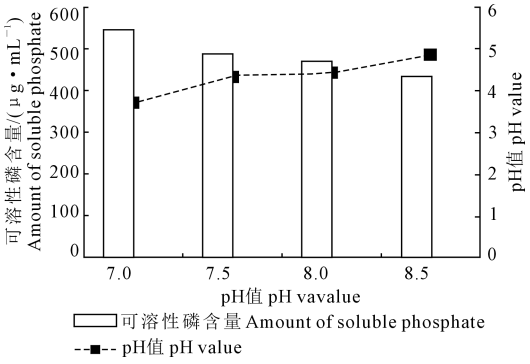


图 3 培养基 pH 值对菌株 P-1407 溶磷能力和发酵液 pH 值的影响

Fig.3 Effects of different pH value on phosphate solubilization capacity and pH value of P-1407

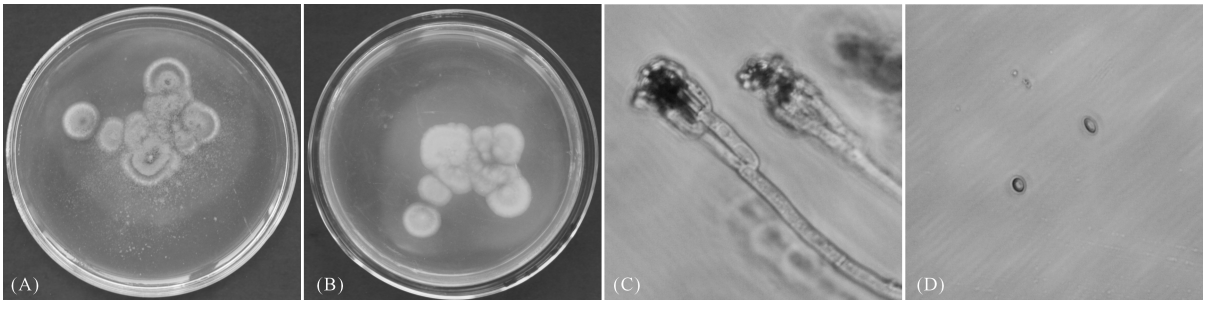
为 9 时,培养基中可溶性磷含量急剧下降,仅为 151.71 μg·mL^{-1},显著低于对照。

发酵液的 pH 值随着培养基 pH 值的升高而升高,培养基 pH 值为 7.5、8 和 8.5 时,发酵液 pH 值分别为 4.32、4.43 和 4.85,与对照(pH=7)相比差异不显著,而且增幅较小,分别为 0.61、0.72 和 1.14,但是,当培养基 pH 值为 9 时,发酵液 pH 值急剧升高,达 5.98,增幅为2.27,显著高于对照。

2.7 溶磷菌株 P-1407 的鉴定

2.7.1 培养性状和形态特征 在 PDA 培养基上菌丝生长迅速,28℃培养,初期产生白色菌丝,无色素,后期分生孢子结构大量产生,呈灰绿色至暗绿色,无渗出液。7 d 直径为 2.0~3.0 cm,正面灰绿色,背面灰黄色。分生孢子梗有隔膜,呈扫帚状,在顶囊上生出 2 层小梗,下面一层为梗基,每个梗基上再着生几个小梗,从每个小梗的顶端相继生出一串分生孢子,分生孢子灰绿色,圆形或椭圆形,直径 3.0~5.6 μm。初步确定为青霉属一种(*Penicillium* sp)。

2.7.2 分子鉴定 以溶磷真菌 P-1407 的 DNA 作为模板,利用通用引物 ITS1 和 ITS4,进行 PCR 扩增,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测结果表明,在 500~700 bp 之间得到一条明亮的条带,且没有其他非特异性条带(图 1)。切胶回收目的片段并进行 ITS 序列测定,得到长度为 567bp 的序列。通过 Blast 将该序列与 GenBank 数据库中序列进行同源性比对,结果表明,解磷菌株 P-1407 与草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)的同源性为 99%,其同源性系统进化树如图 5。综合形态特征和 ITS 基因序列同源性分析,将菌株 P-1407 鉴定为草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)。



注:A 菌落正面;B 菌落背面;C 分生孢子梗(40×);D 分生孢子(40×)。

Notes: A: The front of colony; B: The back of colony; C: Conidiophore(40×); D: Conidium(40×).

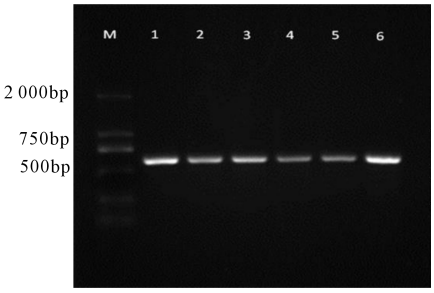
图 4 溶磷菌株 P-1407 培养性状和显微形态特征

Fig.4 The cultural characteristics and micromorphological characters of phosphate-solubilizing strain P-1407

2.8 溶磷菌株 P-1407 对番茄促生作用

2.8.1 菌株 P-1407 发酵液对番茄种子的影响 菌株 P-1407 发酵液对番茄种子活性有显著的影响,不同浓度的发酵液处理番茄种子以后,其发芽率、发芽指数和活力指数均显著提高,尤其是 100×发酵液处理后,番茄种子的发芽率、发芽指数和活力指数均最高,分别为 96.54%、14.56 和 9.78,分别较对照提高了 2.53%、49.33%和 105.89%(表 4)。

2.8.2 菌株 P-1407 发酵液对番茄幼苗生长的影响 由表 5 可以看出,菌株 P-1407 发酵液对番茄幼苗有明显的促生作用,且与对照相比不同稀释倍数发酵液对幼苗生长的影响存在显著的差异,不同浓



注:M: DNA marker DL2000; 1~3: PCR 产物。

Notes: M: DNA marker DL2000; 1~3: PCR amplification product.

图 5　溶磷菌株 P-1407 的 PCR 扩增产物电泳图

Fig.5　PCR amplification product electrophoretograms of phosphate-solubilizing strain P-1407

度的发酵液处理幼苗后,幼苗的株高、根长、地上部鲜重、地上部干重、地下部鲜重和地下部干重显著高于对照,其中 100×稀释液处理后效果最好,幼苗的株高、根长、地上部鲜重、地上部干重、地下部鲜重和地下部干重分别为 20.3 cm、18.3 cm、1.61 g、0.184 g、1.11 g 和 0.112 g,分别增加了 109.27%、78.41%、82.95%、121.69%、94.74%和 64.71%,显著高于对照。

2.8.3　菌株 P-1407 发酵液对番茄幼苗叶绿素和丙二醛含量的影响　由图 7 可以看出,不同浓度的菌株 P-1407 发酵液对番茄叶片中的叶绿素含量影响较大,各个浓度梯度相较对照的叶绿素含量均有较大提高,其中 100×处理后的叶片叶绿素含量最高,达 3.22 mg·g^{-1}, 显著高于对照(2.45 mg·g^{-1}),提高了 31.4%。

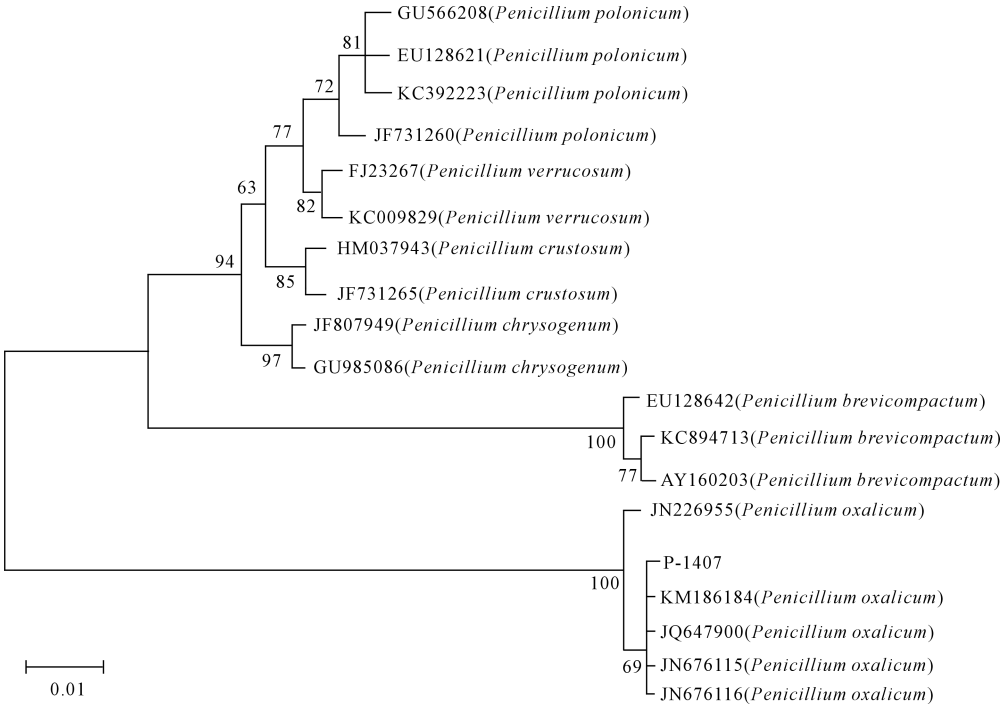


图 6　基于 18S rDNA ITS 序列的溶磷菌株 P-1407 系统发育树

Fig.6　The phylogenetic tree of efficient phosphate-solubilizing strain P-1407 based on 18S rDNA ITS sequences

表 4　菌株 P-1407 发酵液对番茄种子活性的影响

Table 4　Effects of the fermentation medium of strain P-1407 on the seed activity of tomato

浓度 Concentration	发芽率/% Germination rate	提高率/% Increasing rate	发芽指数 Germination index	提高率/% Increasing rate	活力指数 Vigor index	提高率/% Increasing rate
200×	93.33±2.31b	2.02	10.38±0.98c	6.46	5.38±0.92c	13.26
100×	96.54±2.69a	5.53	14.56±0.57a	49.33	9.78±1.03a	105.89
50×	94.04±2.47b	2.80	12.32±0.98b	26.36	6.95±0.63b	46.32
原液 Stock solution	93.58±1.87b	2.30	11.59±0.49bc	18.87	6.07±0.94bc	27.79
对照 Control	91.48±1.05c	0	9.75±0.81d	0	4.75±0.59c	0

表 5 菌株 P-1407 发酵液对番茄幼苗生长的影响

Table 5 Effects of the fermentation medium of strain P-1407 on the activity of tomato seedlings

浓度 Concentration	株高/cm Plant height	根长/cm Root length	茎叶鲜重/g Leaf and shoot fresh weights	茎叶干重/g Leaf and shoot dry weights	根鲜重/g Root fresh weights	根干重/g Root dry weights
200×	14.8±1.21c	14.7±1.13c	1.25±0.27bc	0.110±0.03bc	0.89±0.07bc	0.083±0.05c
100×	20.3±2.15a	18.3±1.54±a	1.61±0.51a	0.184±0.06a	1.11±0.28a	0.112±0.01a
50×	16.3±2.13b	15.8±1.27b	1.31±0.18b	0.142±0.04b	0.96±0.58b	0.098±0.04b
原液 Stock solution	15.2±0.88b	14.3±0.74c	1.05±0.39c	0.097±0.08c	0.89±0.08bc	0.084±0.01c
对照 Control	9.7±0.45d	10.2±1.01d	0.88±0.08d	0.083±0.04d	0.57±0.04c	0.068±0.02d

菌株 P-1407 发酵液处理，对番茄叶片丙二醛含量有较明显的影响，不同浓度发酵液处理后，番茄叶片的丙二醛含量均出现不同程度的减少，其中 100×处理后叶片中丙二醛含量最低，为 1.85 mmol · g^{-1}，与对照(2.84 mmol · g^{-1})差异显著(图 8)。

3 讨论与结论

土壤中的微生物是土壤肥力的核心，数量巨大，种类繁多，而且部分种类对土壤氮、磷和钾等养分的转化和供给起到非常重要的作用[30]。土壤中的溶磷微生物主要有细菌、真菌和放线菌，与细菌相比，真菌的溶磷能力强而且稳定，因此，挖掘可利用的溶磷真菌资源受到人们的高度重视。目前已报道的溶磷真菌主要有青霉(*Penicillium*)、曲霉(*Aspergillus*)、根霉(*Rhizopus*)、镰刀菌(*Fusarium*)、小丝核菌(*Sclerotium*)等[31]，其中以曲霉和青霉的研究居多，尤其青霉达 26 种之多[17]。本研究从甘肃民勤荒漠绿洲过渡带白刺根际土壤中分离到一株溶磷菌株 P-1407，结合形态学特征和分子生物学特性鉴定为草酸青霉。

溶磷圈法和液体培养是判定菌株是否具有溶磷能力以及解磷能力大小常用的方法。多数的研究表明，同一菌株而言，*D/d* 值大小与菌株在液体振荡培养条件下的溶磷量没有必然的相关性，溶磷圈法只能对菌株有无溶磷能力作定性判断，而液体培养法测出的菌株溶磷能力，理论上更为合理和科学[32]。本试验采用溶磷圈法和液体培养对 P-1407 不同培养时间的溶磷效果进行研究，发现不同培养时间的 *D/d* 值大小与液体培养发酵液中可溶性磷含量的变化趋势一致，说明对于 P-1407 菌株来说，通过测定其 *D/d* 值可以直观反映出其溶磷能力的强弱。

菌株的溶磷能力与菌株种类、土壤环境、植物种类和根系分泌物不同有关[33]，因此，不同植物或

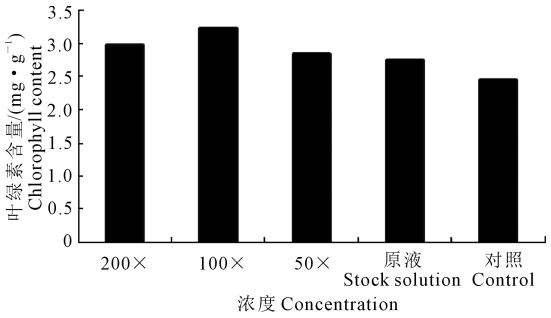


图 7 菌株 P-1407 发酵液对番茄叶片叶绿素含量的影响

Fig.7 Effect of strain P-1407 on chlorophyll content of tomato plant

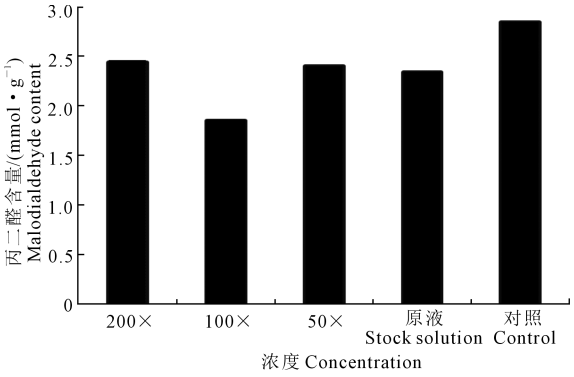


图 8 菌株 P-1407 发酵液对番茄叶片丙二醛含量的影响

Fig.8 Effect of strain P-1407 on malodialdehyde content of tomato plant

同一植物根际溶磷菌的溶磷能力差异较大。范丙全等[34]筛选得到 2 株具有溶磷作用的草酸青霉菌 P8 和 Pn1 对磷酸钙的溶解能力分别为 194.2 μg · mL^{-1}和 136.4 μg · mL^{-1}；王莉晶[35]测定的草酸青霉 C2 菌株对于磷酸钙的溶解量为 557.68 μg · mL^{-1}，史发超[1]测定的斜卧青霉(*Penicillium decumbens*) P83 菌株对磷酸钙的溶解能力达 956 μg · mL^{-1}。本试验分离的草酸青霉 P-1407 菌株对磷酸钙的最高

溶磷量达 541.32 μg · mL^{-1},虽然溶磷能力低于 P83 菌株,但显著优于 P8 和 Pn1 菌株,也优于 Chatli 等[18]从低温沙漠地区分离的溶磷青霉菌株 FC28(136.9 mg · L^{-1})、FC39(103.3 mg · L^{-1}),与 C2′菌株解磷能力相当,说明其具有良好的溶磷能力。

溶磷微生物培养液溶磷量与培养液 pH 值的变化关系比较复杂,有研究表明溶磷能力与溶液 pH 值及可滴定酸含量相关[36-37],但也有些结果证明两者间不存在显著相关性[38-39]。本研究显示,草酸青霉 P-1407 菌株在培养时间内,其溶磷能力与发酵液 pH 值呈显著负相关,当培养 7d 的溶磷量达最大值,此时其 pH 值最低,这说明溶磷真菌能够分泌可滴定酸来溶解难溶磷源。多种研究表明,溶磷菌的溶磷机理具有多样性[34]。一般认为,溶磷真菌在生长过程中分泌低分子量有机酸类物质是其溶磷的主要机理之一[40]。目前,溶磷菌产生的有机酸主要有葡萄糖酸、草酸、乳酸、甲酸、乙酸、丙酸、柠檬酸、富马酸、丙二酸和琥珀酸等[41-42],这些有机酸通常一方面能够降低培养液 pH 值,另一方面可与 Fe^{3+}、Ca^{2+}和 Al^{3+}等金属离子螯合,从而使不溶性磷或难溶磷转化为有效磷[43-44]。而且,不同溶磷菌所分泌的有机酸数量和种类差异很大。乔欢[25]等研究得出嗜松青霉(*P. pinophilum*)分泌的葡萄糖酸和草酸在对磷酸钙和磷酸铝的溶解发挥了较大的作用。Cunnin-gham [45]认为,拜莱青霉(*P.bilaii*)产生的草酸和柠檬酸是溶解磷酸钙的主要机制。本研究使用液相色谱分析表明,草酸青霉 P-1407J 菌株可以分泌 3 种有机酸,其中葡萄糖酸含量最高,其次为草酸,说明该菌株对磷酸钙溶解过程中,葡萄糖酸及草酸发挥了重要作用。与王莉晶等[20]报道的 *P. oxalicum* 在代谢过程中产生苹果酸和酒石酸结果不一致,这可能是由于溶磷菌株的筛选地不同,其地理环境的差异所造成的。

另外,在自然条件恶劣的环境中,传统物理化学技术难以发挥作用的情况下,溶磷微生物在改良土壤和推进植被群落结构演替中可发挥独特的作用[46]。溶磷真菌不但能够改良盐碱土壤的磷素营养供应,还可以降低盐碱土的 pH 值,对盐碱土壤的改良具有重要的作用。本试验分离得到的草酸青霉 P-1407 菌株在 NaCl 浓度小于 6%、pH<8.5 时其溶磷能力所受影响不大,这对寻找发现可在盐碱土壤中有效定殖的菌株,改善磷循环有实际的意义。以后应该通过培养和非培养相结合的方法来关注长期定位实验解磷菌的定殖效果以及与土壤土著微生物群落的相互作用。

参 考 文 献:

[1] 史发超,殷中伟,江红梅,等. 一株溶磷真菌筛选鉴定及其溶磷促生效果[J].微生物学报,2014,54(11):1333-1343.

[2] Hongyang Sun, Yanhong Wu, Jun Zhou, et al. Incubation experiment demonstrates effects of carbon and nitrogen on microbial phosphate-solubilizing function[J]. Science China, 2017, 60(4):436-438.

[3] Fernondez L A, Zalba P, Gomez M A. Phosphate solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions [J]. Biology and Fertility of Soils, 2007, 43(6):805-809.

[4] 余旋,朱天辉,刘旭. 不同解磷菌剂对美国山核桃根际微生物和酶活性的影响[J].林业科学,2012,48(2):118-123.

[5] Stalstrom VA. Beitrag Zur Kenntrusder einwinsking sterilizer and in garung befindlieher striffe any dil loslieshkeit der phosphorus are destrical cum phosphours [J]. Zbt Bakt Abt II, 1903, 11:724-732.

[6] Rivas R, Peix A, Mateos P F, et al. Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils [J]. Plant and Soil, 2006, 287(1-2):23-33.

[7] 胡山,牛世全,龙洋,等. 河西走廊盐碱土壤中一株高效溶磷菌的鉴定及条件优化[J].微生物学通报,2017,44(2): 358-365.

[8] 江红梅,殷中伟,史发超,等. 一株耐盐日本曲霉的筛选及其溶磷促生作用[J]. 微生物学报,2018, 58(5): 862-881.

[9] 易艳梅,黄为一. 不同生态区土壤溶磷微生物的分布特征及影响因子[J]. 生态与农村环境学报,2010,26(5): 448-453.

[10] 尹瑞龄. 我国旱地土壤的溶磷微生物[J]. 土壤,1988, 20(5) : 243-246.

[11] 黄伟,黄欠如,胡锋,等. 红壤溶磷菌的筛选及溶磷能力的比较[J]. 生态与农村环境学报,2006,22(3): 37-40.

[12] 林启美,孙焱鑫. 四种不同生态系统的土壤溶磷细菌数量及种群分布[J].生态环境学报,2000,9(1): 34-37.

[13] Guzel R. Kudoyarova, Lidiya B. Vysotskaya, Tatiana N. Arkhipova, et al. Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2017, 39(11):253-260.

[14] 陶涛,叶明,刘冬,等. 无机解磷细菌的筛选、鉴定及其溶磷能力研究[J].合肥工业大学学报(自然科学版), 2011, 34(2) : 304-308.

[15] Jesús A. Ibarra-Galeana, Claudia Castro-Martínez, Rosario A. Fierro-Coronado, et al. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria exhibiting the potential for growth promotion and phosphorus nutrition improvement in maize (*Zea mays* L.) in calcareous soils of Sinaloa, Mexico [J]. Annals of Microbiology, 2017, 67:801-811.

[16] 马文文,姚拓,蒲小鹏,等. 东祁连山 7 种禾草根际溶磷菌筛选及其溶磷特性[J].草业科学,2015,32(4) :515-523.

[17] 江红梅,殷中伟,史发超,等. 一株耐盐溶磷真菌的筛选、鉴定及其生物肥料的应用效果[J]. 植物营养与肥料学报 2018,24(3): 728-742.

[18] Chatli A, Beri V, Sidhu B. Isolation and characterisation of phosphate

solubilising microorganisms from the cold desert habitat of Salix alba Linn in trans Himalayan region of Himachal Pradesh [J]. Indian Journal of Microbiology,2008,48(2): 267-273.

[19] Bhattacharya S,Barman S,Ghosh R. Phosphate solubilizing activity of Emericella nidulans V1 isolated from vermicompost [J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2013, 51(10):840-848.

[20] Naveenkumar K, Thippeswamy B, Banakar S. Lignolytic and phosphate solubilizing efficiency of fungal species isolated from Arecanut husk waste [J]. Journal of Research Biology,2012,2(2):143-151.

[21] Rinu K,Malviya M,Sati P,et al. Response of cold-tolerant Aspergillus spp. to solubilization of Fe and Al phosphate in presence of different nutritional sources [J]. Isrn Soil Science,2013:135-143.

[22] 李海云,朱世全,孔维宝,等.猪粪堆肥中一株溶磷菌的筛选鉴定及溶磷能力初步测定[J].环境科学学报,2015,35(05):1464-1470.

[23] 任嘉红,刘辉, 吴晓蕙,等. 南方红豆杉根际溶无机磷细菌的筛选、鉴定及其促生效果[J].微生物学报,2012, 52(3):295-303.

[24] 乔志伟,洪坚平,谢英荷,等. 一株石灰性土壤强溶磷真菌的分离鉴定及溶磷特性[J].应用与环境生物学报,2013,19(5):873-877.

[25] 乔欢,吴小芹,王早. 一株嗜松青霉 JP-NJ4 的解磷特性[J].微生物学通报,2014,41(9):1741-1748.

[26] 吴楠,王飞,田治国,等. NaCl 胁迫对变异紫叶三叶草种子萌发及保护酶活性的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2013,41(2):117-122.

[27] 刘建新,王瑞娟,王鑫,等. $Na(NO3)_3$对盐胁迫下黑麦草幼苗生长及抗逆生理特性的影响[J].中国生态农业学报,2011,19(2):353-357.

[28] 陈毓荃.生物化学实验方法和技术[M].北京:科学出版社,2002.

[29] 李合生, 孙群, 赵世杰. 植物生理生化试验原理与技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000.

[30] 贺梦醒 ,高毅 ,胡正雪,等. 解磷菌株 B25 的筛选、鉴定及其解磷能力[J].应用生态学报,2012,23(1):235-239.

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

[32] 刘文干,何园球,张坤,等. 一株红壤溶磷菌的分离、鉴定及溶磷特性[J].微生物学报,2012,52(3):326-333.

[33] 赵小蓉. 微生物的解磷机理及其影响因素 [D].北京:中国农业大学,2001.

[34] 范丙全,金继运,葛诚. 溶磷草酸青霉筛选及其溶磷效果的初步研究[J].中国农业科学,2002,35(5):525-530.

[35] 王莉晶,高晓荣,吕军,等. 解磷真菌 C2 的分离鉴定及其在土壤中实际解磷效果的研究[J].土壤通报,2009,40(4):771-775.

[36] 万璐,康丽华,廖宝文,等. 红树林根际解磷菌分离、培养及解磷能力的研究[J].林业科学研究 2004,17(1):89-94.

[37] 张丽珍,樊晶晶,牛伟,等. 盐碱地柠条根围土中黑曲霉的分离鉴定及解磷能力测定[J].生态学报,2011,31(24):7571-7578.

[38] 王光华,周克琴,金剑,等. 黑土区高效溶磷真菌筛选及其溶解磷矿粉效果的研究[J].中国生态农业学报,2004,12(3):143-145.

[39] Villegas J,Fortin JA. Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NO_3^- as nitrogen source [J]. Botany, 2002, 80(5):571-576.

[40] Behbahani M. Investigation of biological behavior and colonization ability of Iranian indigenous phosphate solubilizing bacteria [J]. Sci. Hort. 2010, 12(4):393-399.

[41] 赵小蓉,林启美. 微生物解磷的研究进展[J].土壤肥料,2001,5(3):7-11.

[42] Patel DK,Archana G,Kumar GN. Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by Citrobacter sp. DHRSS in the presence of different sugars [J]. Current Microbiology, 2008, 56(2):168-174.

[43] Chen G C,He Z L, Wang Y J. Impact of pH on microbial biomass carbon and microbial biomass phosphorus in red soils [J]. Pedosphere, 2004, 14(1):9-15.

[44] 燕红,代英杰,彭显龙. 微生物资源及利用[M].哈尔滨:哈尔滨工程大学出版社,2012:279.

[45] Cunnubgham J E. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by Penicillium bilaii [J].Applied and Environmental Microbiology,1992,58(5):1451.

[46] 巩文峰,邢瑜琪,卓玛曲措,等. 一株色季拉山长鞭红景天根际溶磷菌的分离、鉴定及其低温适应性分析[J]. 南方农业学报,2018,49(2):280-286.