



撕裂蜡孔菌 HG2011 对光叶紫花苕结瘤固氮的影响及其潜在机制

隋宗明¹, 刘海², 殷洁¹, 宁诗琪¹, 袁玲^{1*}

1 西南大学资源环境学院, 重庆 400715

2 贵州财经大学工商管理学院, 贵州 贵阳 550025

隋宗明, 刘海, 殷洁, 宁诗琪, 袁玲. 撕裂蜡孔菌 HG2011 对光叶紫花苕结瘤固氮的影响及其潜在机制[J]. 微生物学报, 2023, 63(9): 3546-3559.

SUI Zongming, LIU Hai, YIN Jie, NING Shiqi, YUAN Ling. Effects of *Ceriporia lacerata* HG2011 on nodulation and biological nitrogen fixation of *Vicia villosa* Roth. and the underlying mechanisms[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(9): 3546-3559.

摘要:【目的】在我国南方尤其是西南地区, 光叶紫花苕(*Vicia villosa* Roth.)作为重要的青饲和绿肥两用豆科作物被广泛种植, 有助于提高土壤氮素和后茬作物的产量品质。接种有益微生物是促进豆科作物生物固氮和生长的重要措施之一。为此, 本文研究了一株自主分离获得的白腐真菌——撕裂蜡孔菌(*Ceriporia lacerata* HG2011)对光叶紫花苕结瘤固氮和生长的影响, 并揭示其潜在机制。

【方法】采用微生物培养、植物培养和田间试验, 研究 *C. lacerata* 磷铁活化能力、代谢产物构成、与根瘤菌 *Rhizobium sophorae* S3 的相互作用, 及其对光叶紫花苕结瘤、生长、产量、品质和土壤有效磷铁的影响。【结果】*C. lacerata* 和根瘤菌之间无拮抗作用。液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)分析发现, *C. lacerata* 发酵液含有氨基酸、有机酸和类黄酮等化感物质, 能增强根瘤菌的趋化性并促进生物膜形成。此外, *C. lacerata* 还能释放生长素、赤霉素、水杨酸和铁载体, 活化难溶性有机和无机磷。在植物培养试验中, 单独接种 *C. lacerata* 或根瘤菌均能促进光叶紫花苕生长, 但以共接种处理效果最佳。*C. lacerata* 定殖于光叶紫花苕根际, 导致根长、根系表面积和结瘤数显著增加。田间试验发现, 接种 *C. lacerata* 显著提高了光叶紫花苕单株根瘤数、根瘤质量和固氮酶活性, 以及土壤有效磷铁含量和磷酸酶活性, 产量比常规施肥处理增加 12.15%且品质无显著变化。【结论】*C. lacerata* 能够在光叶紫花苕根际定殖, 通过

资助项目: 重庆市研究生科研创新项目(CYB20097); 重庆市科委社会民生类重点研发项目(cstc2018jscx-mszdX0011)
This work was supported by the Scientific Innovation Project for Postgraduates of Chongqing (CYB20097) and the Key Research and Development Projects of Social and Livelihood of Chongqing Science and Technology Commission (cstc2018jscx-mszdX0011).

*Corresponding author. E-mail: daphnia_007@163.com

Received: 2022-12-28; Accepted: 2023-02-20; Published online: 2023-02-24

分泌化感物质、生长素和活化土壤磷铁等机制促进结瘤固氮和生长发育。*C. lacerata* 易于培养, 菌剂制备成本低廉, 施用简便, 对提高豆科作物产量品质具有一定应用价值。

关键词: 植物促生微生物; 真菌代谢产物; 根瘤菌; 土壤养分活化; 产量

Effects of *Ceriporia lacerata* HG2011 on nodulation and biological nitrogen fixation of *Vicia villosa* Roth. and the underlying mechanisms

SUI Zongming¹, LIU Hai², YIN Jie¹, NING Shiqi¹, YUAN Ling^{1*}

1 College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 College of Business Administration, Guizhou University of Finance and Economics, Guiyang 550025, Guizhou, China

Abstract: [Objective] *Vicia villosa* Roth. is widely grown as important forage and green manure in Southwest China, which is beneficial to improving soil nitrogen and the yield and quality of succeeding crops. Inoculation of beneficial microorganisms is one of the important strategies to promote biological nitrogen fixation and legume crop growth. Thus, a plant growth-promoting fungus *Careporia lacerata* HG2011 was selected to study its effects on biological nitrogen fixation and growth of *V. villosa* Roth. and the underlying mechanisms. [Methods] Microbial culture, plant culture, and field trials were carried out to investigate the mobilization capacity of phosphorus and iron, metabolite composition, and interaction with *Rhizobium sophorae* S3 of *C. lacerata* and its effects on nodulation, growth, yield, quality of *V. villosa* Roth., and soil available phosphorus and iron. [Results] There was no mutual antagonism between *C. lacerata* and rhizobia. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis found that *C. lacerata* fermentation broth contained allelochemicals such as amino acids, organic acids, and flavonoids, which enhanced the chemotaxis and biofilm formation of rhizobia. In addition, this fungus could release gibberellins, salicylic acid, siderophores, and mobilize insoluble organic and inorganic phosphorus. In the plant culture experiment, inoculation with either *C. lacerata* or rhizobia alone promoted the growth of *V. villosa* Roth., but co-inoculation had the highest plant biomass. *C. lacerata* was able to colonize the roots of *V. villosa* Roth. and significantly increased root length, surface area, and nodule number. Field trials showed that the number of root nodules, nodule mass, nitrogenase activity, soil available iron, and phosphorus content, as well as phosphatase activity, were improved after *C. lacerata* inoculation. Compared with the conventional fertilization treatment, *C. lacerata* application increased the yield of *V. villosa* Roth. by 12.15%, and there were no negative effects on plant quality. [Conclusion] *C. lacerata* can colonize in the rhizosphere and promote nodulation, nitrogen fixation, and growth of *V. villosa* Roth. by secreting allelochemicals, auxin, siderophores, and mobilizing soil phosphorus and iron. *C. lacerata* inoculant is easy to

prepare and use, which is valuable for improving the yield and quality of legume crops.

Keywords: plant growth-promoting microorganisms; fungal metabolites; rhizobium; soil nutrient mobilization; yield

光叶紫花苕(*Vicia villosa* Roth.)是一年生或越年生豆科巢菜属草本植物,干草粗蛋白含量超过 20%,产量较高且适口性好,是一种优质牧草^[1]。此外,光叶紫花苕能进行生物固氮,耐受贫瘠,常作为冬季绿肥广泛种植于我国南方尤其是西南地区,有利于保持土壤肥力,促进烤烟和玉米等后茬作物的生长^[2-3]。

根瘤菌侵染豆科植物根系形成根瘤,类菌体利用宿主植物提供的能源将大气中的 N_2 还原为 NH_3 供植物利用,谓之“生物固氮”^[4]。在一个生长季节内,光叶紫花苕的生物固氮量超过 100 kg/hm^2 ,经翻压还田或畜禽过腹还田后可提高土壤氮素含量^[5]。在玉米-绿肥种植体系中,长期种植光叶紫花苕显著增加云南高原红壤的有机质和速效养分含量^[6];在烤烟-绿肥种植体系中,翻压光叶紫花苕可替代 30%化学氮肥^[7]。然而,作物品种、根瘤菌种类、土壤环境(尤其是 pH 和磷铁养分)等因素常影响豆科作物的根瘤形成和生物固氮能力^[8]。目前,人们通过接种根瘤菌、增施磷肥、补充铁钼微量元素等方法来促进豆科作物结瘤固氮和生长发育,但其效率有待进一步提高。值得注意的是,同时接种丛枝菌根真菌与根瘤菌能够促进白三叶草的生长,根瘤数量增加 17%–73%^[9];溶磷菌与根瘤菌复合接种显著提高了大豆产量和百脉根粗蛋白含量^[10];花生接种内生真菌枫香拟茎点霉(*Phomopsis liquidambari*) B3 后,根瘤数和植株含氮量的增幅高达 28.25%和 29.71%^[11]。以上研究表明,有益微生物、根瘤菌和豆科植物之间存在协同效应,对提高豆科植物结瘤固氮具有积极作用。因此,筛选易于培养、成本

低廉、兼具活化土壤磷铁和促进植物生长的有益微生物,探究其促生效应及内在机制,对提高光叶紫花苕产量品质具有一定实际意义。

撕裂蜡孔菌(*Ceriporia lacerata*)是一种白腐真菌,属担子菌门、伞菌纲、多孔菌目、耙齿菌科^[12]。它能产生多种具有免疫调节、抗癌和抗衰老等功能的次生代谢产物,常用于医疗保健领域^[13-14];同时还能够释放纤维素酶、木质素酶和锰过氧化物酶等,被用于制浆造纸、染料废水处理和生物修复等领域^[15-16]。本团队在重庆市缙云山国家自然保护区分离获得一株 *C. lacerata* HG2011。前期研究发现,该菌株能分泌蛋白酶、氢离子、有机酸和磷酸酶等,能够活化土壤氮磷,促进蚕豆、油菜和茄子等的生长,提高养分吸收量和产量^[17-19]。然而,目前仅针对蚕豆一种豆科作物进行了研究,很有必要拓展至其他作物,并进一步揭示有关机制。为此,以西南地区广泛种植的光叶紫花苕为对象,通过微生物培养、植物培养和田间试验探究 *C. lacerata* HG2011 对结瘤固氮的影响及其潜在机制,从而提高豆科绿肥的生物固氮量和产量,为减施氮肥、保育耕地和促进农业、畜牧业的可持续发展提供新策略。

1 材料与方法

1.1 供试材料

(1) 供试菌株: 1) 撕裂蜡孔菌(*Ceriporia lacerata*) HG2011,由课题组自主分离获得,保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心(保藏号:CGMCC 14215),NCBI 登录号为 MT675050.1。取活化后的 *C. lacerata*,接种至马铃薯葡萄糖糖

液体培养基(potato dextrose broth, PDB), 28 °C、150 r/min 培养 7 d, 获得 *C. lacerata* 发酵液(*C. lacerata* broth, CLB)。将 CLB 接种于盛有灭菌基质(谷壳:玉米粉:水=100:5:70)的食用菌栽培袋(38 cm×60 cm×6 cm)中, 22–27 °C 室温培养至菌丝完全长满基质(约 30 d), 制备出 *C. lacerata* 固体菌剂(*C. lacerata* inoculant, CLI, 2.0×10^8 CFU/g)。

2) 根瘤菌 *Rhizobium sophorae* S3, 分离自光叶紫花苜蓿根瘤, 并经回接试验和 16S rRNA 基因测序鉴定, 保藏于西南大学微生物实验室, NCBI 登录号为 OP787988。将活化后的根瘤菌接种于甘露醇酵母汁液体培养基(yeast mannitol broth, YMB)中, 28 °C、150 r/min 培养 48 h, 制备出根瘤菌液体菌剂(*R. sophorae* inoculant, RI, 1.0×10^9 CFU/mL)。

(2) 供试土壤: 重庆市北碚区歇马镇西南大学农场的紫色土, pH 7.23, 有机质和全氮、磷、钾含量分别为 17.83、1.05、0.74 和 18.51 g/kg, 有效氮、磷、钾含量依次是 85.62、16.33 和 103.2 mg/kg, 高压蒸汽灭菌后备用。

(3) 供试作物: 光叶紫花苜蓿(*Vicia villosa* Roth.), 购于重庆市北碚区农资公司。

1.2 *C. lacerata*、根系分泌物与根瘤菌的相互作用

对峙培养试验: 采用划线法在甘露醇酵母汁琼脂培养基(yeast mannitol agar, YMA)一侧接种根瘤菌, 在另一侧接种一个直径为 6 mm 的 *C. lacerata* 菌块, 逐日观察二者生长情况。对照处理为单独接种根瘤菌或 *C. lacerata*。

趋化性和生物膜形成试验: 采用毛细管法和结晶紫染色法^[20]测定 CLB 对根瘤菌趋化性和生物膜形成的影响, 设置 2.5% PDB 和 2.5% CLB 两个处理。此外, 利用“1.4 植物培养试验”中 CK (未接种 *C. lacerata* 的光叶紫花苜蓿)和 CLI (接种 *C. lacerata* 的光叶紫花苜蓿)处理制备的根

系分泌物, 分别处理根瘤菌。

1.3 *C. lacerata* 溶磷能力及代谢产物鉴定

溶磷能力测定: 分别以卵磷脂和磷酸三钙为磷源, 配制 PVK 液体培养基^[21], 取 50 mL 分装于 100 mL 三角瓶中, 蒸汽灭菌。冷却后每瓶接种 3 个直径为 6 mm 的 *C. lacerata* 菌块, 150 r/min、28 °C 黑暗培养 7 d, 10 000×g 离心, 钼蓝比色法测定上清液中的可溶性磷含量^[22]。

发酵液代谢产物鉴定: CLB 经 0.22 μm 滤膜过滤, 取 30 mL 滤液经冷冻干燥后, 送至上海美吉生物医药科技有限公司进行非靶向液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)分析, 比对数据库 METLIN (<https://metlin.scripps.edu>)、HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)和美吉生物公司自建数据库, 对 *C. lacerata* 代谢产物进行鉴定。此外, 分别利用高效液相色谱法和铬天青法测定 CLB 中的吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)^[23]和铁载体含量^[24]。

1.4 *C. lacerata* 的根际定殖及其对光叶紫花苜蓿生长的影响(植物培养试验)

试验设置 4 个处理: (1) 对照, 不接种根瘤菌和 *C. lacerata* (CK); (2) 接种 *C. lacerata* 固体菌剂(CLI); (3) 接种根瘤菌(RI); (4) 共接种 CLI 和 RI (RI+CLI)。每个处理 10 钵, 每钵盛灭菌土 1 kg。在接种根瘤菌的处理中(RI 和 RI+CLI), 将表面灭菌后的光叶紫花苜蓿种子浸于根瘤菌液中 1 h; 在不接种根瘤菌的处理中(CK 和 CLI), 将表面灭菌的种子浸于无菌水中 1 h。播种时, 将 10 g CLI 置于种子下部(CLI 和 RI+CLI)或施等量灭菌 CLI (CK 和 RI), 每钵播种 8 粒种子, 在人工气候培养箱中培养 25 d (光/暗周期 16/8 h, 光照强度 10 000 lx, 昼/夜温度 25/20 °C)。当株高达 8 cm 左右时, 每钵保留 4 株长势一致的幼苗, 培养期间适时浇水, 常规管理。上述试验在预实验的基础上, 连续进行 2 次; 由于结果

趋势总体类似, 论文仅报道第一次试验结果, 第二次试验结果见附表 1 [期刊附件数据 NMDCX0000170, 存储在国家微生物科学数据中心(NMDC), 链接为 <https://nmdc.cn/resource/genomics/attachment/detail/NMDCX0000170>, 下同]。

将各处理的 10 钵植物随机分为 2 组。在第一组的 5 钵中, 每钵随机选取 1 株植物, 无菌水洗净, 滤纸吸干。称重并记录根瘤数量后, 剪取根系, 用根系分析扫描仪(Expression 4990, 爱普生)扫描, 并利用 WinRHIZO 软件(version 2012)计算根系长度、表面积、体积和根尖数量。其余植株经无菌水洗净后, 随机取一部分根系采用台盼蓝染色法观察 *C. lacerata* 的定殖情况^[25]。另一部分根系置于 PVK-Ca₃(PO₄)₂ 固体培养基表面(因 *C. lacerata* HG2011 具有良好的溶磷能力, 故以此进行初步鉴定), 28 °C 黑暗培养, 挑取萌发菌丝送至北京擎科生物科技有限公司进行菌种鉴定。

在第二组的 5 钵中, 植株经无菌水洗净后, 将根系浸于 50 mL 无菌水中, 培养 48 h (根部避光, 培养条件同上), 制备出含根系分泌物的溶液, 冷冻干燥后置于 -80 °C 冰箱保存, 供“1.2 *C. lacerata*、根系分泌物与根瘤菌的相互作用”使用。

1.5 *C. lacerata* 对光叶紫花苕结瘤、土壤养分和产量品质的影响(田间试验)

试验于 2020 年 11 月–2021 年 4 月和 2021 年 11 月–2022 年 4 月在西南大学农场(29°45'N, 106°22'E, 海拔 312 m)进行。当地年均气温 18.3 °C, 年均降雨量 1 156 mm, 年均日照时数 1 014 h, 无霜期 335 d。试验设置 3 个处理: (1) 对照(CK, 不施肥和 *C. lacerata* 固体菌剂); (2) 施用 *C. lacerata* 固体菌剂(CLI); (3) 常规施肥(CF); (4) 常规施肥配施 *C. lacerata* 固体菌剂(CF+CLI)。采用随机区组设计, 小区面积 30 m²,

重复 3 次。光叶紫花苕播种量为 60 kg/hm²。在施肥处理中, 氮(N)、磷(P₂O₅)、钾(K₂O)用量同当地大田生产, 分别为 30、45 和 30 kg/hm², 由尿素、过磷酸钙和硫酸钾提供。CLI 施用量为 900 kg/hm², CK 和 CF 处理施用等量灭菌 CLI。常规田间管理。由于 2 年试验结果总体趋势一致, 论文仅报道 2020–2021 年试验结果(NMDCX0000170, 附表 2–5)。

每个小区随机挖取 10 株植物, 记录单株根瘤数量和根瘤鲜重, 并用乙炔还原法测定根瘤固氮酶活性^[26]。取植株根系, 用 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)法测定根系活力^[27]。取根际土壤, 用原子吸收光谱法测定土壤有效铁, 钼蓝比色法测定土壤 Olsen 磷和水溶性磷含量, 磷酸苯二钠比色法测定土壤磷酸酶活性^[22]。

在作物收获时, 测定各小区产量。植株经 105 °C 杀青 30 min, 65 °C 烘干至恒重, 常规分析样品氮、磷、钾含量, 并计算养分吸收量。采用灰化法、酸碱洗涤法和索氏提取法分别测定植株粗灰分、粗纤维和粗脂肪含量。粗蛋白含量=植株氮含量×6.25。无氮浸出物(%)=100%–粗灰分–粗纤维–粗脂肪–粗蛋白^[28]。

1.6 数据处理

利用 Microsoft Excel 2019 和 SPSS 22.0 (IBM Corp)对试验数据进行统计分析。2 组数据比较采用独立样本 *t* 检验; 多组数据比较采用单因素方差分析, 组内多重比较方差齐性时采用 Duncan 法检验, 方差不齐时采用 Dunnett's T3 法检验, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 *C. lacerata*、根系分泌物和根瘤菌之间的相互作用

如图 1 所示, 根瘤菌与 *C. lacerata* 之间无

拮抗作用。此外, 与 2.5% PDB 相比, 由 PDB 制备的 *C. lacerata* 发酵液(CLB, 稀释至 2.5%) 显著增强了根瘤菌的趋化性, 并促进了生物膜形成(图 2A、2B)。在不接种 *C. lacerata* 的光叶

紫花苜蓿处理(CK)中, 其根系分泌物对根瘤菌的趋化性为 2.36×10^5 CFU/mL, 而接种 *C. lacerata* 处理(CLI)增加至 2.82×10^5 CFU/mL, 生物膜形成比 CK 提高了 11.48% (图 2C、2D)。

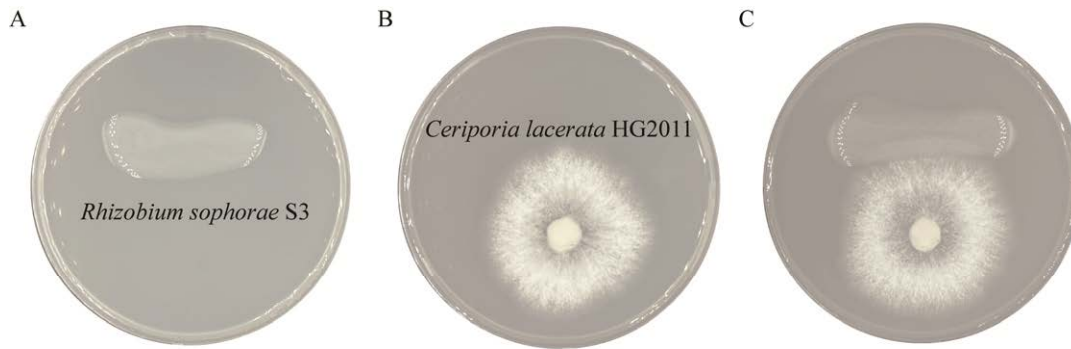


图 1 根瘤菌与 *Careporia lacerata* 的相互作用

Figure 1 Interactions between rhizobium and *Careporia lacerata*. A: Sole *Rhizobium* culture. B: Sole *C. lacerata* culture. C: Dual culture.

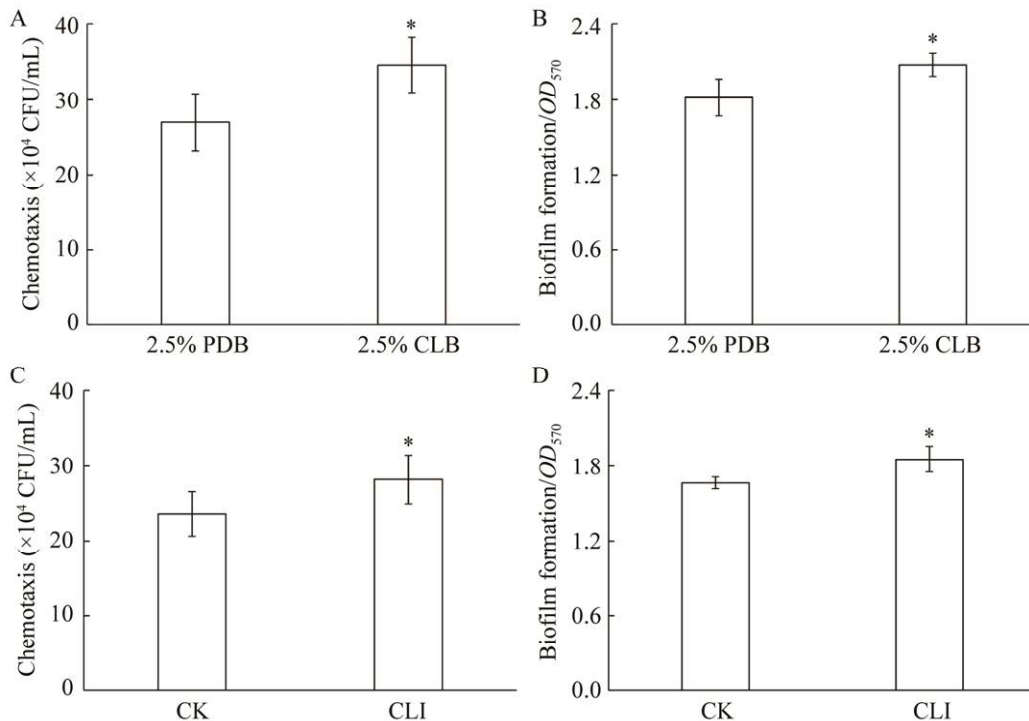


图 2 *Careporia lacerata* 发酵液和光叶紫花苜蓿根系分泌物对根瘤菌趋化性和生物膜形成的影响

Figure 2 Effects of *Careporia lacerata* fermentation broth and *Vicia villosa* root exudates on rhizobia chemotaxis and biofilm formation. A, C: Rhizobia chemotaxis. B, D: Rhizobia biofilm formation. PDB: Potato dextrose broth; CLB: *C. lacerata* broth; CK: Root exudates of non-inoculation treatment; CLI: Root exudates of *C. lacerata* inoculation treatment. Bars represent standard deviation. * represent significant difference at $P < 0.05$.

2.2 *C. lacerata* 的溶磷能力及其代谢产物

C. lacerata 能将难溶性有机和无机磷转化为可溶性无机磷。以卵磷脂为磷源培养 7 d 后, 培养液中的可溶性磷比培养初始值增加 37.64 mg/L; 以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 为磷源培养 7 d 后, 培养液中的可溶性磷从 0.09 mg/L 增加至 507.90 mg/L。在 *C. lacerata* 发酵液中, 检测到的 IAA 含量为 2.14 mg/L, 铁载体相对活性为

68.65% (见 NMDCX0000170, 附表 6)。

通过 LC-MS 分析, 在 *C. lacerata* 发酵液中 共检测出 802 个已知物质, 主要包括 294 种脂质和类脂质化合物、124 种有机酸及其衍生物、108 种有机杂环化合物、81 种有机氧化化合物、61 种苯甲酸酯类、41 种糖苷、29 种苯丙烷和聚酮化合物以及 27 种内酯等(图 3)。其中, 检测到的植物激素及促生相关物质有吲哚乙酸、

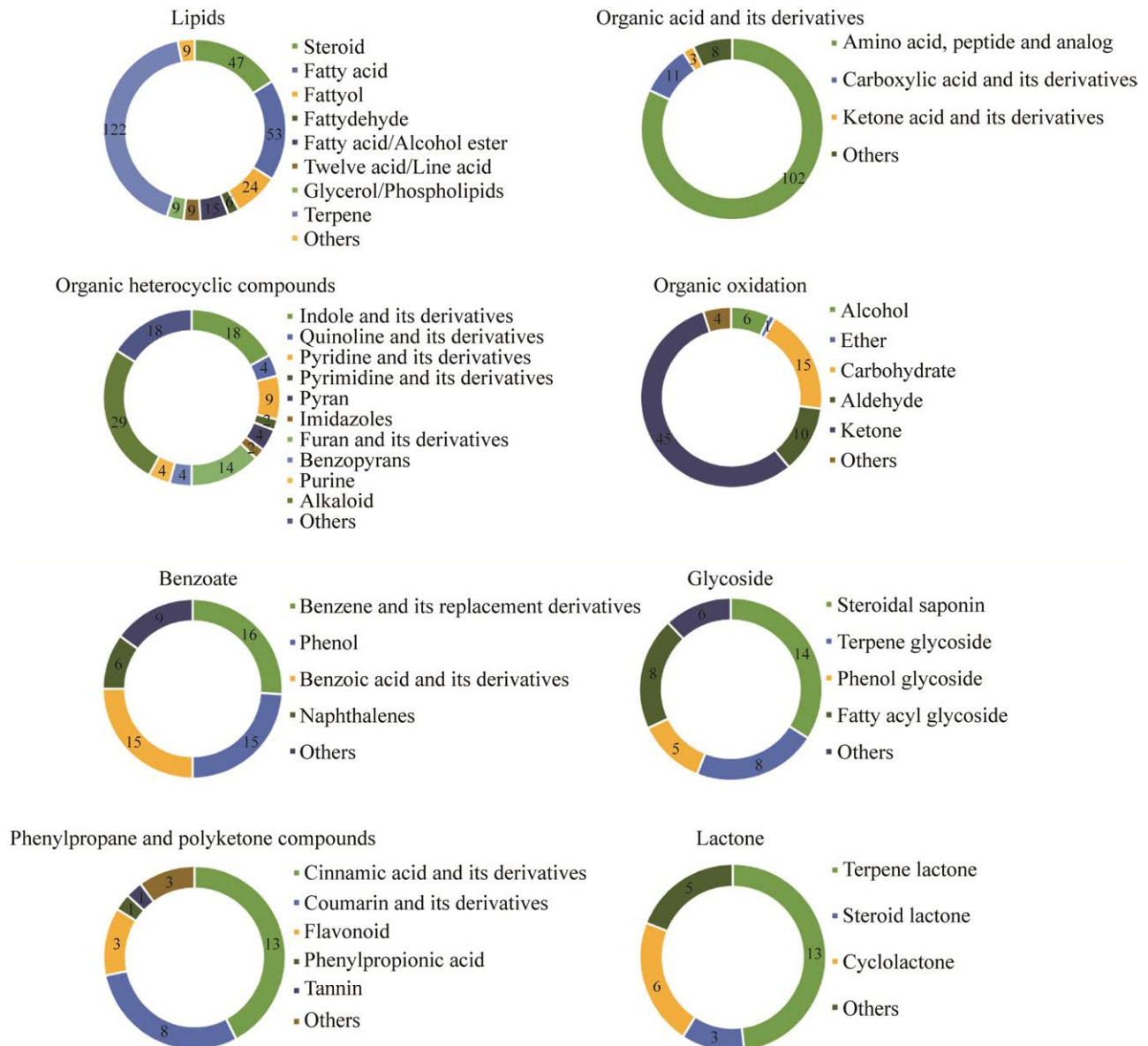


图 3 *Careporia lacerata* 发酵液代谢产物鉴定结果

Figure 3 Composition of known metabolites in *Careporia lacerata* fermentation broth.

赤霉素和水杨酸及其衍生物;与根瘤菌趋化性相关的物质包括亮氨酸、酪氨酸、草酸、柠檬酸、苹果酸和类黄酮等。

2.3 *C. lacerata* 的根际定殖及其对光叶紫花苜蓿生长的影响(植物培养试验)

如图 4 所示,在 CK 和 RI (根瘤菌接种)处理中,光叶紫花苜蓿根系表面和根内均未发现着色菌丝;而在 CLI (*C. lacerata* 接种)和 RI+CLI 处理观察到着色菌丝。将根系放置于 PVK 固体培养基表面,自根系萌发出的真菌经 ITS 鉴定为 *C. lacerata*。

与 CK 相比,接种根瘤菌或 CLI 均显著提高了植株鲜重。在不接种或接种根瘤菌的条件下,接种 CLI 显著提高了植株鲜重和根系表面积,增幅分别为 7.61%–11.50%和 14.01%–15.07%。与

RI 处理相比,RI+CLI 处理显著增加了根长和根瘤数(表 1)。

2.4 *C. lacerata* 对光叶紫花苜蓿生长、土壤养分和产量品质的影响(田间试验)

如表 2 所示,在不施肥条件下,接种 CLI 的单株根瘤数和单株根瘤质量比 CK 有所增加,但未达显著水平。在施肥条件下,CF+CLI 处理的单株根瘤数、单株根瘤质量、根瘤固氮酶活性和根系活力依次为 85 个、369.6 mg、7.90 mmol C₂H₂/(g·h)和 83.94 mg TTC/(g·h),依次比 CF 处理增加了 11.22%、20.39%、22.67%和 25.96%。

由图 5 可见,CF+CLI 处理的光叶紫花苜蓿根际土的有效铁、水溶性磷和磷酸酶活性比 CF 显著增加,但 Olsen 磷的增幅未达显著水平。

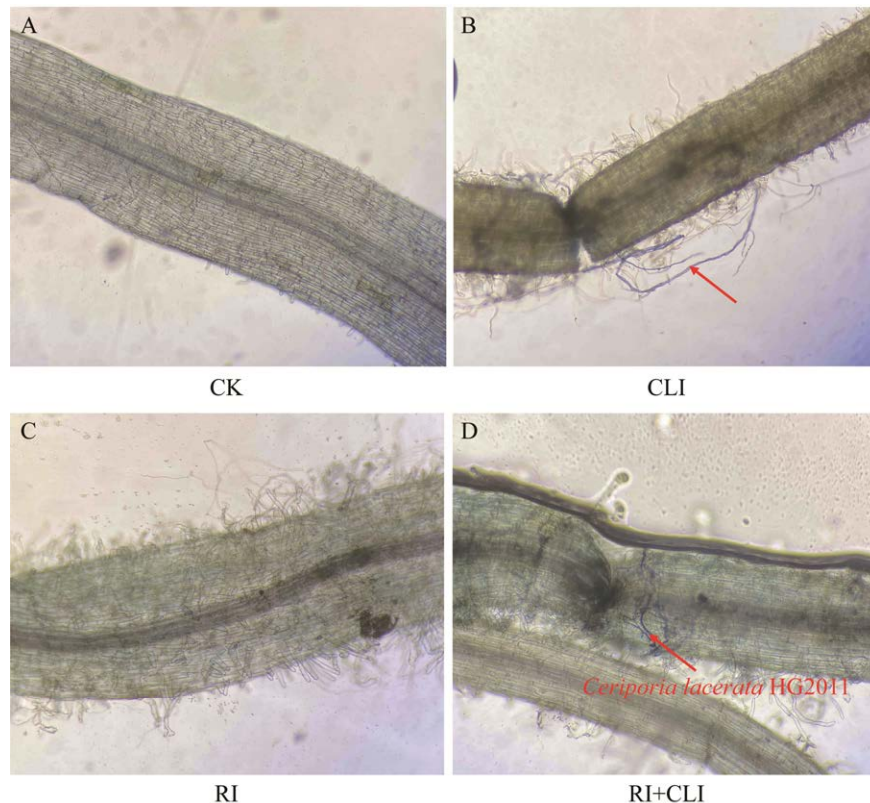


图 4 *Careporia lacerata* 在光叶紫花苜蓿根系的定殖情况

Figure 4 Colonization of *Careporia lacerata* on *Vicia villosa* Roth. roots. CK: Non-inoculation; CLI: *C. lacerata* inoculation; RI: Rhizobium inoculation; RI+CLI: Co-inoculation of rhizobium and *C. lacerata*.

表 1 灭菌土壤条件下接种根瘤菌和 *Careporia lacerata* 对光叶紫花苜蓿生长和结瘤的影响Table 1 Effects of rhizobia and *Careporia lacerata* inoculation on the growth and nodulation of *Vicia villosa* Roth. in sterilized soil

Treatment	Plant fresh biomass (mg/plant)	Root length (cm)	Root surface area (cm ²)	Root tips (No./plant)	Nodule number (No./plant)
CK	598.4±31.59c	214.9±22.29b	32.69±1.92b	72.20±8.11b	–
CLI	667.2±28.85ab	221.3±25.97b	37.27±2.66a	82.60±8.44a	–
RI	646.6±27.63b	228.3±13.20b	33.66±3.22b	83.60±6.95a	12±3
RI+CLI	695.8±32.04a	268.0±18.98a	38.73±2.12a	92.60±5.86a	17±3*

CK: Non-inoculation; CLI: *C. lacerata* inoculation; RI: Rhizobium inoculation; RI+CLI: Co-inoculation of rhizobium and *C. lacerata*. In each column, different lowercase letters or * mean significant difference among treatments ($P<0.05$), – indicates no data available.

表 2 光叶紫花苜蓿的根瘤数量、质量、固氮酶活性和根系活力

Table 2 Number, biomass, and nitrogenase activity of nodules and root vigor of *Vicia villosa* Roth.

Treatment	Nodule number per plant (No./plant)	Nodule biomass per plant (mg/plant, fresh weight)	Nodule nitrogenase activity (mmol C ₂ H ₂ /(g·h))	Root vigor (mg TTC/(g·h))
CK	61±7c	248.8±65.63c	5.48±0.55b	63.95±8.20b
CLI	66±11c	272.3±39.77bc	5.81±0.61b	70.22±5.59ab
CF	77±14b	307.0±69.92b	6.44±0.67b	66.64±7.16b
CF+CLI	85±15a	369.6±80.46a	7.90±0.52a	83.94±8.32a

CK: Control; CLI: *C. lacerata* inoculant; CF: Conventional fertilization; CF+CLI: Conventional fertilization+*C. lacerata* inoculant. In each column, different lowercase letters mean significant difference among treatments ($P<0.05$).

CLI 处理的有效铁比 CK 显著增加, Olsen 磷、水溶性磷和磷酸酶活性的增幅未达显著水平。

施用 *C. lacerata* 固体菌剂可提高光叶紫花苜蓿干草产量和氮、磷吸收量(表 3)。与 CF 处理相比, CF+CLI 处理的干草产量和氮、磷积累量依次增加 12.15%、12.89%和 13.64%, 增幅达到显著水平。与 CK 相比, 干草产量和氮、磷积累量有所增加, 但增幅未达显著水平。此外, 施用 CLI 对光叶紫花苜蓿钾积累量和品质无影响(见 NMDCX0000170, 附表 7)。

3 讨论与结论

就生长而言, 根瘤菌和 *C. lacerata* HG2011 之间无拮抗作用。在结瘤过程中, 豆科植物根系能分泌化感物质, 诱导根瘤菌向根系表面运动和富集, 并通过质膜内陷建立侵染线并形成根瘤^[29]。趋化性和生物膜的形成可以反映根瘤菌的

运动和定殖能力。与对照(PDB)相比, *C. lacerata* 发酵液(CLB)显著提高了根瘤菌的趋化性和生物膜形成。研究表明, 氨基酸、有机酸、糖类和类黄酮等能诱导根瘤菌产生趋化运动^[30]。LC-MS 分析发现, CLB 含有亮氨酸、酪氨酸、草酸、柠檬酸、苹果酸和类黄酮等, 这可能是 CLB 增强根瘤菌趋化性和促进生物膜形成的重要原因之一。*C. lacerata* 还能分泌 IAA、赤霉素和水杨酸及其衍生物等, 亦可促进根瘤菌感染根系形成根瘤。其中, 添加外源 IAA 显著提高了豆科植物印度黄檀的根瘤数^[31], 这可能是由于 IAA 能软化根毛细胞壁而有助于根瘤菌对根系的侵染^[32]。赤霉素同样也具松弛细胞壁的功能^[29]。此外, 根毛表面的伤口也可作为根瘤菌的侵染点。纤维素酶能分解细胞壁中的纤维素, 并被视作根瘤菌感染根系早期所必需的酶类之一^[33]。作为白腐真菌, *C. lacerata* HG2011 能

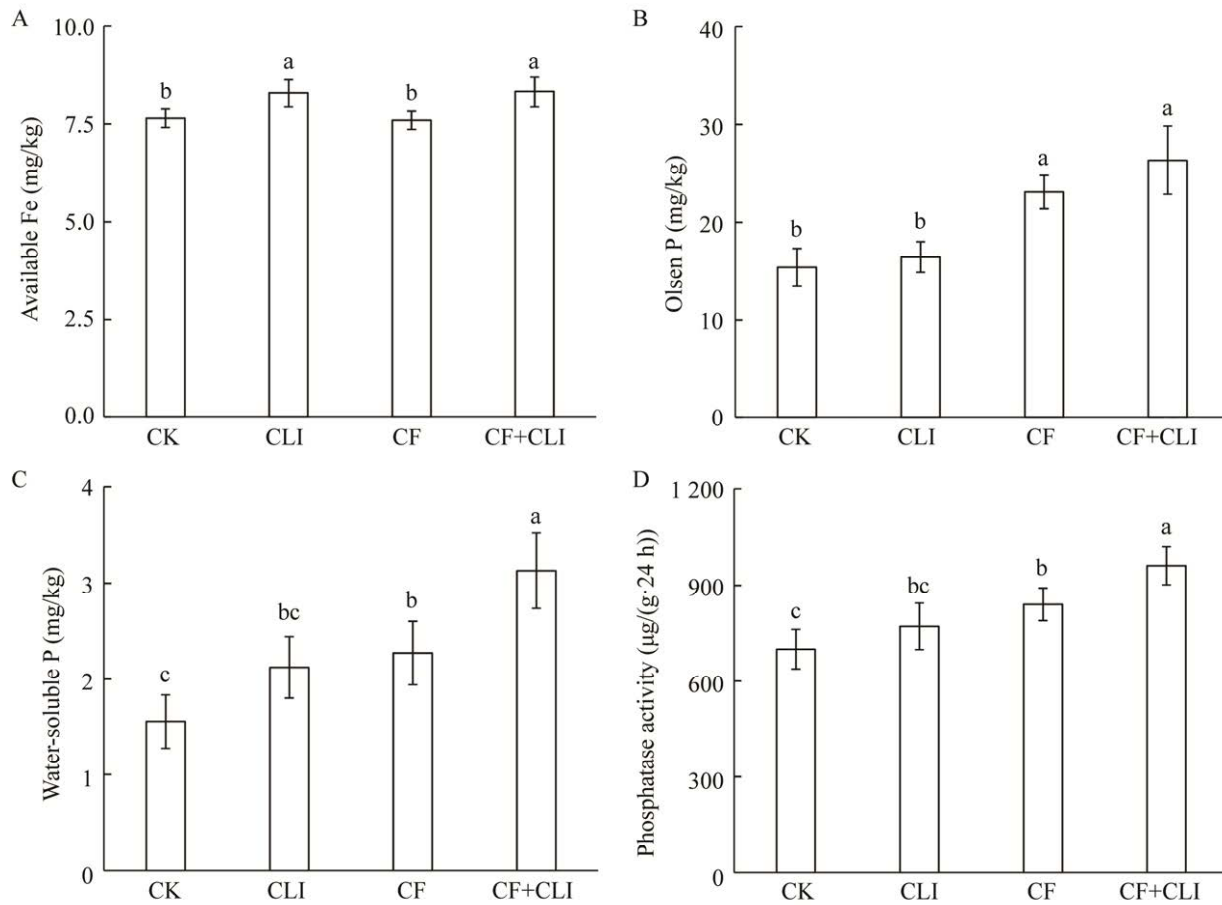


图 5 光叶紫花苜蓿根际土壤有效磷铁含量和磷酸酶活性

Figure 5 Changes in the content of available Fe and P as well as the activity of phosphatase in the rhizosphere of *Vicia villosa* Roth.. A: Soil available Fe. B: Soil Olsen P. C: Soil water-soluble P. D: Soil phosphatase activity. CK: Control; CLI: *C. lacerata* inoculant; CF: Conventional fertilization; CF+CLI: Conventional fertilization+*C. lacerata* inoculant. Bars represent standard deviation. Different lowercase letters near the bars represent significant difference at $P < 0.05$.

表 3 光叶紫花苜蓿的产量和养分吸收量

Table 3 Influence of *Careporia lacerata* application on the yield and nutrient uptake of *Vicia villosa* Roth.

Treatment	Yield (kg/hm ² , dry weight)	Nutrient uptake (kg/hm ²)		
		N	P	K
CK	4 246±155.6c	161.0±5.35c	11.56±0.52c	132.9±5.99b
CLI	4 532±299.5c	171.9±12.23c	12.74±0.69c	139.2±9.41b
CF	5 295±455.3b	202.9±13.15b	16.08±1.04b	169.0±12.40a
CF+CLI	5 938±324.0a	229.1±14.14a	18.27±1.23a	189.0±13.52a

CK: Control; CLI: *C. lacerata* inoculant; CF: Conventional fertilization; CF+CLI: Conventional fertilization+*C. lacerata* inoculant. In each column, different lowercase letters mean significant difference among treatments ($P < 0.05$).

分泌纤维素酶、果胶酶、蛋白酶和磷酸酶等^[19],也可能有益于分解根毛细胞壁和细胞膜形成感染位点。胡小加等^[34]发现,利用果胶酶和纤维素酶混合液处理油菜幼苗的根系,也能促使根瘤菌感染非豆科植物。*C. lacerata*分泌的次生代谢产物较多,其特定成分对根瘤菌的影响尚待进一步解析。

在植物培养试验中,通过台盼蓝染色法清晰地观察到光叶紫花苜蓿根系表面存在大量*C. lacerata*菌丝,说明*C. lacerata*能定殖在供试植物根际。与其他白腐真菌类似,*C. lacerata*存在于土壤、朽木和枯枝落叶层,但近来人们还从海滨锦葵^[35]和蛇足石杉^[36]植株体内分离出*C. lacerata*,这意味着*C. lacerata*株系繁多,能适应多种不同的生态环境,这可能是供试菌株定殖于植物根际的原因之一。光叶紫花苜蓿接种*C. lacerata*后,其根系分泌物明显地增强了根瘤菌的趋化性,并促进了生物膜形成。说明接种*C. lacerata*可能改变了植株根系分泌物的成分,促进根瘤菌向根系运动、富集与定殖,有利于增加根瘤数量。与之类似,接种内生放线菌之后,鹰嘴豆根系分泌物的成分发生变化,增强了根瘤菌 *Mesorhizobium ciceri* CC1192 的趋化性^[37];接种内生真菌 *Phomopsis liquidambari* B3 显著提高了花生根系分泌酚类、黄酮类和有机酸的速率,最终使结瘤数增加^[38]。此外,*C. lacerata*还促进了光叶紫花苜蓿生长,使根长和根表面积增加,可为根瘤菌提供更多的潜在感染位点,从而提高单株根瘤数。本研究还发现,接种根瘤菌也可以促进光叶紫花苜蓿生长,共接种*C. lacerata*和根瘤菌的植株生物量最大,表明二者对光叶紫花苜蓿的生长存在正交互效应。光叶紫花苜蓿的良好生长也意味着光合速率的提高,可为根瘤提供更多能源以增加生物固氮量。

在田间试验中,尽管未设置根瘤菌接种处

理,但光叶紫花苜蓿根系仍有大量根瘤着生,说明土著根瘤菌能有效侵染供试作物并结瘤。在常规施肥+接种*C. lacerata*的处理中,其单株根瘤数显著高于常规施肥处理,说明接种*C. lacerata*能改善根瘤菌—光叶紫花苜蓿共生体系的结瘤状况。据报道,根瘤大小与生物固氮量呈正相关^[39]。施用*C. lacerata*增加了根瘤鲜重,提高了根瘤固氮酶活性,意味着根瘤固氮能力增强。一般而言,土壤尤其是供试碱性土壤的磷铁有效性较低,豆科植物和根瘤对这两种营养元素的需求量高于禾本科植物和豆科植物的其他器官^[40]。这是因为固氮是高耗能的生物学过程,需要大量的ATP和NADPH^[41]。铁是固氮酶中铁蛋白和钼铁蛋白的组成成分,通过 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 化合价之间的变化传递电子,将 N_2 还原成 NH_3 ^[42]。因此,施用磷肥或提高土壤磷铁的生物有效性通常能促进豆科植物固氮。*C. lacerata*除分泌植物生长活性物质(如IAA、赤霉素和水杨酸等)外,还能释放磷酸酶、有机酸和铁载体,活化土壤中的难溶性磷铁,改善植物磷铁营养,这有助于增加生物固氮和产量,田间试验结果也印证了以上推论。

综上所述,*C. lacerata* HG2011与根瘤菌之间无拮抗作用,前者分泌的氨基酸、有机酸和类黄酮等化感物质有利于增强根瘤菌的趋化性和生物膜形成。该白腐真菌定殖于光叶紫花苜蓿根际,释放植物激素,活化土壤磷铁,促进根系发育、结瘤固氮并提高产量。*C. lacerata* HG2011易于培养,菌剂制备施用简便,为提高光叶紫花苜蓿及其他豆科作物产量品质提供了新策略。

参考文献

- [1] 陈鹏飞,白史且,杨富裕,干友民. 添加剂和水分对光叶紫花苜蓿青贮品质的影响[J]. 草业学报, 2013, 22(2): 80-86.

- CHEN PF, BAI SQ, YANG FY, GAN YM. Effects of additive and moisture content on fermentation quality of smooth vetch silage[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2013, 22(2): 80-86 (in Chinese).
- [2] 郭云周, 尹小怀, 王劲松, 雷素芬, 戴茨华, 温三明, 杜东英, 刘建香. 翻压等量绿肥和化肥减量对红壤旱地烤烟产量产值的影响[J]. *云南农业大学学报(自然科学版)*, 2010, 25(6): 811-816.
GUO YZ, YIN XH, WANG JS, LEI SF, DAI CH, WEN SM, DU DY, LIU JX. Effects of equal quantity green manure application and different fertilizer rates on yield and output value of flue-cured tobacco in red soil of upland in Yunnan[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2010, 25(6): 811-816 (in Chinese).
- [3] 陈检锋, 梁海, 王伟, 陈华, 尹梅, 王志远, 刘俊, 陈军, 高嵩涓, 曹卫东, 付利波. 玉米-绿肥轮作体系下光叶紫花苜蓿的氮肥替代和土壤肥力提升效应[J]. *植物营养与肥料学报*, 2021, 27(9): 1571-1580.
CHEN JF, LIANG H, WANG W, CHEN H, YIN M, WANG ZY, LIU J, CHEN J, GAO SJ, CAO WD, FU LB. Effects of smooth vetch (*Vicia villosa* Roth. var. *glabrescens*) incorporation on nitrogen fertilizer replacement and soil fertility improvement in a maize-green manure rotation system[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2021, 27(9): 1571-1580 (in Chinese).
- [4] BOHLOOL BB, LADHA JK, GARRITY DP, GEORGE T. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: a perspective[J]. *Plant and Soil*, 1992, 141(1): 1-11.
- [5] ALAM F, KIM TY, KIM SY, ALAM SS, PRAMANIK P, KIM PJ, LEE YB. Effect of molybdenum on nodulation, plant yield and nitrogen uptake in hairy vetch (*Vicia villosa* Roth.)[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2015, 61(4): 664-675.
- [6] 刘建香, 郭树芳, 雷宝坤, 郭云周. 绿肥生产利用方式对云南高原红壤理化性状及玉米产量的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2022, 28(2): 237-246.
LIU JX, GUO SF, LEI BK, GUO YZ. Effects of green manure production and utilization on the physiochemical properties of red soil and maize yield in Yunnan Plateau[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2022, 28(2): 237-246 (in Chinese).
- [7] 赵文军, 杨继周, 尹梅, 陈检锋, 薛开政, 胡保文, 付利波, 王伟, 王志远, 杨艳鲜, 陈华. 绿肥模式下减量施氮对烤烟产量与品质的影响[J]. *中国农业科技导报*, 2023, 25(4): 189-196.
ZHAO WJ, YANG JZ, YIN M, CHEN JF, XUE KZ, HU BW, FU LB, WANG W, WANG ZY, YANG YX, CHEN H. Effect of combined application of green manure with reduced nitrogen fertilizer on yield and quality of flue-cured tobacco[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2023, 25(4): 189-196 (in Chinese).
- [8] LIU YY, WU LH, BADDELEY JA, WATSON CA. Models of biological nitrogen fixation of legumes[M]//Sustainable Agriculture Volume 2. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011: 883-905.
- [9] XIE MM, ZOU YN, WU QS, ZHANG ZZ, KUČA K. Single or dual inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia regulates plant growth and nitrogen acquisition in white clover[J]. *Plant, Soil and Environment*, 2020, 66(6): 287-294.
- [10] 曾庆飞, 王茜, 陆瑞霞, 刘正书, 吴佳海, 王小利. 大豆根际促生菌的分离筛选及其对大豆和百脉根生长与品质的影响[J]. *草业学报*, 2017, 26(1): 99-111.
ZENG QF, WANG Q, LU RX, LIU ZS, WU JH, WANG XL. Identification of soybean growth-promoting rhizobacteria and their effects on the growth and quality of *Glycine max* and *Lotus corniculatus*[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2017, 26(1): 99-111 (in Chinese).
- [11] ZHANG W, WANG HW, WANG XX, XIE XG, SIDDIKIE MA, XU RS, DAI CC. Enhanced nodulation of peanut when co-inoculated with fungal endophyte *Phomopsis liquidambari* and *Bradyrhizobium*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 98: 1-11.
- [12] CUI BK, WEI YL. Polypores from Zijin Mountain, Jiangsu Province[J]. *Mycosystema*, 2006, 25(1): 9-14.
- [13] KIM JE, KIM HJ, LEE SP. Hyperglycemic effect of submerged culture extract of *Ceriporia lacerata* in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2012, 21(6): 1685-1693.
- [14] KIM JH, AN C, HWANG SD, KIM YS. *Ceriporia lacerata* mycelium culture medium as a novel anti-aging microbial material for cosmeceutical application[J]. *Cosmetics*, 2021, 8(4): 101.
- [15] AL-HAWASH AB, AL-QURNAWI WS, ABOOD HA, HILLO NA, GHALIB HB, ZHANG XY, MA FY. Pyrene-degrading fungus *Ceriporia lacerata* RF-7 from contaminated soil in Iraq[J]. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 2022, 42(1): 40-48.
- [16] LIN YH, HE XB, HAN GM, TIAN QJ, HU WY. Removal of crystal violet from aqueous solution

- using powdered mycelial biomass of *Ceriporia lacerata* P2[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2011, 23(12): 2055-2062.
- [17] YIN J, SUI ZM, LI Y, YANG HJ, YUAN L, HUANG JG. A new function of white-rot fungi *Ceriporia lacerata* HG2011: improvement of biological nitrogen fixation of broad bean (*Vicia faba*)[J]. *Microbiological Research*, 2022, 256: 126939.
- [18] SONG XP, LI Y, YIN J, CHEN DM, HUANG JG. Mobilization of soil phosphorus and enhancement of canola yield and phosphorus uptake by *Ceriporia lacerata* HG2011[J]. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2022, 68(9): 1229-1238.
- [19] 殷洁, 范倩, 黄建国. 撕裂蜡孔菌的新功能: 防治茄子绵疫病及促生效应[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(12): 2300-2310.
- YIN J, FAN Q, HUANG JG. New functions of *Ceriporia lacerata* in *Phytophthora* blight control and growth promotion of eggplants[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(12): 2300-2310 (in Chinese).
- [20] ZHANG N, WANG DD, LIU YP, LI SQ, SHEN QR, ZHANG RF. Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains[J]. *Plant and Soil*, 2014, 374: 689-700.
- [21] PIKOVSKAYA RI. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species[J]. *Mikrobiologiya*, 1948, 17: 362-370.
- [22] PANSU M, GAUTHEYROU J. *Handbook of Soil Analysis: Mineralogical, Organic and Inorganic Methods*[M]. Berlin: Springer, 2006.
- [23] QI BB, WU C, LIANG HL, CUI KH, FAHAD S, WANG ML, LIU BY, NIE LX, HUANG JL, TANG H. Optimized high-performance liquid chromatography method for determining nine cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid[J]. *Sustainability*, 2021, 13(13): 6998.
- [24] MURAKAMI C, TANAKA AR, SATO Y, KIMURA Y, MORIMOTO K. Easy detection of siderophore production in diluted growth media using an improved CAS reagent[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2021, 189: 106310.
- [25] PHILLIPS JM, HAYMAN DS. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection[J]. *Transactions of the British Mycological Society*, 1970, 55(1): 158-161.
- [26] VESSEY JK. Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: in defense of the acetylene reduction assay[J]. *Plant and Soil*, 1994, 158(2): 151-162.
- [27] 曹建康, 姜微波, 赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007.
- CAO JK, JIANG WB, ZHAO YM. *Guidance on Postharvest Physiological and Biochemical Experiments of Fruits and Vegetables*[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2007 (in Chinese).
- [28] 杨剑虹, 王成林, 代亨林. 土壤农化分析与环境监测[M]. 北京: 中国大地出版社, 2008.
- YANG JH, WANG CL, DAI HL. *Soil Agrochemical Analysis and Environmental Monitoring*[M]. Beijing: China Land Press, 2008 (in Chinese).
- [29] FERGUSON BJ, MATHESIUS U. Phytohormone regulation of legume-rhizobia interactions[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2014, 40(7): 770-790.
- [30] COMPTON KK, SCHARF BE. Rhizobial chemoattractants, the taste and preferences of legume symbionts[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 686465.
- [31] NIRANJAN R, MOHAN V, RAO VM. Effect of indole acetic acid on the synergistic interactions of *Bradyrhizobium* and *Glomus fasciculatum* on growth, nodulation, and nitrogen fixation of *Dalbergia sissoo* Roxb[J]. *Arid Land Research and Management*, 2007, 21(4): 329-342.
- [32] DATTA C, BASU PS. Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*[J]. *Microbiological Research*, 2000, 155(2): 123-127.
- [33] ROBLEDO M, JIMÉNEZ-ZURDO JI, VELÁZQUEZ E, TRUJILLO ME, ZURDO-PIÑEIRO JL, RAMÍREZ-BAHENA MH, RAMOS B, DÍAZ-MÍNGUEZ JM, DAZZO F, MARTÍNEZ-MOLINA E, MATEOS PF. *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(19): 7064-7069.
- [34] 胡小加, 李阜棣. 非豆科作物—油菜人工根瘤的诱发研究[J]. *生物学杂志*, 1991, 8(1): 18-19.
- HU XJ, LI FD. Study on the induction of artificial nodules of non-leguminous crops-rape[J]. *Journal of Biology*, 1991, 8(1): 18-19 (in Chinese).
- [35] 柳丹华. 棘孢木霉和撕裂蜡孔菌共接种对大豆促生机理的研究[D]. 郑州: 郑州大学硕士学位论文,

- 2018.
- LIU DH. Effects of co-inoculation with *Trichoderma asperellum* and *Ceriporia lacerata* on the growth of soybean seedlings[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Zhengzhou University, 2018 (in Chinese).
- [36] YING YM, SHAN WG, ZHANG LW, ZHAN ZJ. Ceriponols A–K, tremulane sesquiterpenes from *Ceriporia lacerata* HS-ZJUT-C13A, a fungal endophyte of *Huperzia serrata*[J]. *Phytochemistry*, 2013, 95: 360-367.
- [37] XU T, VO QAT, BARNETT SJ, BALLARD RA, ZHU Y, FRANCO CMM. Revealing the underlying mechanisms mediated by endophytic actinobacteria to enhance the rhizobia-chickpea (*Cicer arietinum* L.) symbiosis[J]. *Plant and Soil*, 2022, 474(1): 299-318.
- [38] WANG HW, MA CY, XU FJ, LU F, ZHANG W, DAI CC. Root endophyte-enhanced peanut-rhizobia interaction is associated with regulation of root exudates[J]. *Microbiological Research*, 2021, 250: 126765.
- [39] WEISZ PR, SINCLAIR TR. A rapid non-destructive assay to quantify soybean nodule gas permeability[J]. *Plant and Soil*, 1988, 105(1): 69-78.
- [40] ROTARU V, SINCLAIR TR. Interactive influence of phosphorus and iron on nitrogen fixation by soybean[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2009, 66(1): 94-99.
- [41] VANCE CP, GRAHAM PH, ALLAN DL. Biological nitrogen fixation: phosphorus-a critical future need?[M]//PEDROSA FO, HUNGRIA M, YATES G, NEWTON WE ed. *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity* (Part of the book series: Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, vol 38). Dordrecht: Springer, 2000.
- [42] KIM J, REES DC. Nitrogenase and biological nitrogen fixation[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(2): 389-397.