

陈娥,杜兴媛,张朝阳,等.1株芬芳镰刀菌的筛选鉴定及其提硒降镉效应[J].华中农业大学学报,2024,43(2):99-108.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.02.012

1株芬芳镰刀菌的筛选鉴定及其提硒降镉效应

陈娥¹,杜兴媛¹,张朝阳¹,马世龙¹,黄子艺²,陈永波¹,杨宝红³

1. 湖北省恩施土家族苗族自治州农业科学院,恩施 445000;
2. 华南理工大学生命科学与工程学院,广州 511400; 3. 湖北省地质局第二地质大队,恩施 445000

摘要 为解决农作物硒镉共积累难题,采用选择性培养基从高硒镉背景值的植物根际土壤(土壤硒总含量50.187 mg/kg,土壤镉总含量50.311 mg/kg)中分离、筛选获得了1株功能真菌,经鉴定为芬芳镰刀菌(*Fusarium redolens*),利用土壤模拟试验和盆栽试验测定土壤中有效硒、有效镉的变化和植物可食用部位Se含量、Cd含量,根据硒/镉富集和转运系数来评价真菌活硒抑镉的效果。土壤模拟试验结果显示,接种真菌后,活硒率与培养时间呈正相关,抑镉率与之相反;活硒率在第5天达到最高,为60.9%;抑镉率在第3天最高,为41.2%,第5天最低,为27.3%。盆栽试验结果显示,添加10⁸ cfu/mL真菌,土壤pH值比对照显著降低了0.35个单位;对碎米荠幼苗生长无不良影响,平均株高为7.4 cm,平均根长为9.6 cm,平均生物量为2.9 g,均高于对照;土壤中有效硒的含量显著提高,活硒率最高达到24.8%,而有效镉的含量显著降低,抑镉率达到24.7%;碎米荠地上/地下部分总硒含量分别增加25.6%和36.8%,总镉地上/地下部分含量分别降低32.7%和11.6%。结果表明,真菌对天然高硒镉背景值土壤具有活硒抑镉能力,且添加浓度为10⁸ cfu/mL时效果最好,有助于碎米荠的富硒降镉。

关键词 硒;硒镉伴生;碎米荠;真菌;硒镉有效性

中图分类号 Q939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)02-0099-10

中国富硒土壤中硒元素主要来源于黑色岩系,硒通常与重金属镉等伴生;而在一些非黑色岩系分布地区,如碳酸岩地区,土壤中的硒含量也达到富硒标准,也同时伴有重金属镉等元素^[1-2]。相关性分析显示,镉-硒相互作用较强,存在显著的伴生现象^[3],致使一些富硒地区的重金属含量超标,在南方一些富硒稻田中,土壤硒与汞、镉、铅和砷已呈现极显著或显著正相关^[4]。还有研究显示,在较高镉含量(12 mg/kg)情况下,土壤施硒反而促进植物根系对镉的吸收和积累^[5]。在安徽池州石台县、海南富硒土壤区和陕南富硒区,均发现富硒土壤镉伴生现象,潜在生态危害系数达到98.89,属于强生态危害^[6-8]。宋明义等^[9]发现在浙西富硒地区中土壤及农产品富硒而镉含量超标是由母岩黑色岩系的硒、镉含量较高所致。王锐等^[10]对恩施市沙地乡的主要农作物(玉米、辣椒、土豆等)进行分析,发现各类农作物中硒含量

均较高,但部分作物存在一定程度的镉超标情况。土壤中的镉可对土壤质量、农作物土壤生态功能产生一定程度的危害和影响,且土壤是农作物富集吸收硒、重金属等微量元素的主要来源,土壤镉污染可造成农产品食用健康风险,从而制约了富硒土壤资源的开发利用^[11]。

我国的天然富硒区域主要集中在湖北恩施、陕西安康、广西等地。湖北省具有非常丰富的硒资源,特别是恩施地区,拥有全世界唯一探明的独立沉积型硒矿床,并被誉为“世界硒之都”^[12]。堇叶碎米荠(*Cardamine violifolia*)属于十字花科多年生草本植物,在湖南省西部及湖北西部等地都有分布,无毒且营养价值高,是一种药食同源植物,由于其富集作用,尤其是堇叶碎米荠的超级富硒能力已成为近年来研究硒资源的热点与焦点之一^[13]。为了降低碎米荠植株中的镉含量,湖北省恩施土家族苗族自治州

收稿日期: 2023-02-06

基金项目: 农业绿色发展固定检测试验站建设项目(恩施州财函2023293号);国家土壤质量基础性长期性观测监测项目(ZX02S181400);湖北省恩施州农科院博士后科研工作站建设项目(恩施州农业科学院青年创新基金项目)(118-2-80)

陈娥, E-mail: 1960086871@qq.com

通信作者: 陈永波, E-mail: 545529518@qq.com

农业科学院(以下简称恩施州农科院)成功研发野转家栽培技术,采用无土栽培,为企业提供了部分原料,但无土栽培生产成本居高不下,规模十分有限,且抛弃了恩施州天然富硒土壤资源的优势,浪费了宝贵的土壤硒资源。如恩施市新塘乡双河鱼塘坝硒矿区土地(土壤硒总含量50.187 mg/kg,土壤镉总含量50.311 mg/kg)在自然条件下生长的碎米荠叶片总硒含量为10.392 mg/kg,而叶片总镉含量高达84.900 mg/kg,碎米荠在自然高硒高镉伴生土壤上生长,富硒的同时也存在着重金属镉污染的现象,严重制约了硒资源的开发利用。

植物的根际是一个特殊的生态环境,其中聚居着大量的微生物,土壤中硒与镉的生物有效性、形态及迁移均受到土壤微生物的影响。目前,有关硒-镉相互关系的研究,主要关注外源硒肥料对水稻中镉累积的拮抗作用机制,以及外源硒药剂干预条件下人体内镉、硒的相互关系^[14-15]。关于天然硒镉高背景区土壤中功能微生物的筛选鉴定和评价应用研究报道还不多见。因此,本研究从恩施州硒矿区附近的蒲儿草根际土壤中筛选到1株能够耐受一定浓度硒镉的真菌菌株,通过室内评价真菌的活硒抑镉能力并结合盆栽试验,最终挖掘具有活硒抑镉功能的微生物资源,以期为开发利用硒资源、后续活硒抑镉机制研究和菌剂的开发提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1)供试植物。堇叶碎米荠(*Cardamine violifolia*)穴盘幼苗由恩施州农科院提供,经测定,幼苗地上部分总硒含量为1.470 mg/kg,总镉含量为1.944 mg/kg;幼苗地下部分总硒含量为2.404 mg/kg,总镉

含量为0.996 mg/kg。

2)供试土样。筛选真菌的土样Pec,于2020年5月12日采集于恩施市新塘乡双河鱼塘坝硒矿区,土壤总硒、土壤有效硒分别为2.218、0.092 mg/kg,土壤总镉、土壤有效镉分别为1.620、0.665 mg/kg,Pec对应植物蒲儿草叶片总硒、总镉分别为3.107、0.925 mg/kg。用于土壤模拟试验、盆栽试验的土样MF于2020年7月9日采集于恩施市沐抚办事处,土壤总硒、土壤有效硒分别为10.28、0.26 mg/kg,土壤总镉、土壤有效镉分别为6.02、1.98 mg/kg。

3)试验主要试剂。引物、真菌基因组DNA提取试剂盒和无毒核酸染料均购于上海生物工程股份有限公司,其他化学试剂均为国产分析纯或生物试剂级,购于湖北华升科学器材有限公司。10%吡虫啉可湿性粉剂购于江苏丰山集团股份有限公司,双面粘虫黄板购于山东曲阜市圣邦机械设备有限公司。

1.2 真菌筛选

称取Pec土样2 g,接种于新鲜的100 mL液体查彼克培养基中,28 °C、150 r/min振荡培养3~5 d。含SeO₄²⁻和Cd²⁺的液体查彼克培养基浓度设置见表1。吸取1.0 mL(带菌丝或3~5个菌球)培养液按照表1质量浓度设置依次以同样的培养条件转接培养,连续共转接富集培养4次。采用稀释平板分离法在马丁孟加拉红培养基上涂布分离培养(真菌可以取10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴),培养3~5 d,肉眼初步观察菌落形态再显微观察菌丝形态,标记出所有不同的菌种并编号、描述和拍照。挑取单菌落,继续分离纯化培养,多次分离直到菌落大小、形态和颜色一致且无杂菌污染时,用马丁孟加拉红斜面培养基保存二级真菌菌株。

表1 含SeO₄²⁻和Cd²⁺的液体查彼克培养基质量浓度设置

Table 1 Settings of liquid inorganic salt medium concentrations containing SeO₄²⁻ and Cd²⁺(in Se/Cd)

次数 Times	硒/(mg/L) Concentration in terms of Se	SeO ₄ ²⁻		Cd ²⁺	
		每100 mL培养基中0.1 g/mL SeO ₄ ²⁻ 添加量/μL 0.1 g/mL SeO ₄ ²⁻ additions per 100 mL of medium	镉/(mg/L) Concentration in terms of Cd	每100 mL培养基中0.1 g/mL Cd ²⁺ 添加量/μL 0.1 g/mL Cd ²⁺ additions per 100 mL of medium	
1	0.5	1.2	5	8	
2	1.0	2.4	10	16	
3	1.5	3.6	15	24	
4	2.0	4.8	20	32	

1.3 真菌分子生物学鉴定

利用真菌基因组DNA提取试剂盒说明书,从培

养3 d的菌丝体中提取菌株总DNA,采用真菌ITS通用引物序列ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACT-

GCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3'),按照常规设置 PCR 反应体系进行扩增,将 PCR 产物送广东美格基因科技有限公司测序,测序结果整理后提交 NCBI,选取同源性较高和形态相近的菌株序列,用 MEGA7.0 中的邻接法构建系统发育树。

1.4 室内土壤模拟试验

1)灭菌。将 10 g MF 土样分装于 250 mL 三角锥形瓶中,在 126 ℃下灭菌 1 h,灭菌 3 次,备用。

2)接种。将本文“1.2”分离保存的二级真菌菌株进行 2 次活化后,在无菌操作条件下,用直径为 5 mm 的打孔器在活化培养的菌落周围生长旺盛的部分打取菌饼,接种到灭菌马丁孟加拉红培养液中,500 mL 三角锥形装液量为 150 mL/瓶,菌饼接种量为 3 个/

$$\text{真菌活硒(或抑镉率)} = \frac{\text{处理土壤有效硒(或镉浓度)} - \text{对照土壤有效硒(或镉浓度)}}{\text{对照土壤有效硒(或镉浓度)}} \times 100\%$$

1.5 盆栽试验

选用高 12 cm、直径 15 cm 的圆形塑料花盆,将已准备好的 MF 土壤装盆,每盆装 1.5 kg。试验设 8 个处理(表 2)。每个处理 3 个重复,共计 24 盆。使土壤全部浸湿,置于旱棚中平衡 2 周,期间定期补水,将含水量保持在田间最大持水量的 60%。种植碎米荠前,将微生物均按照原始菌液(10^{11})、 10^{10} 、 10^8 cfu/mL 的浓度梯度,每个浓度按照 5 mL/盆的添加量一次性浇灌到盆栽土壤中并喷施 10 mL/盆(同浓度),不添加真菌的原始土壤作为对照 1(CK1),只种植碎米荠的作为对照 2(CK2)。每盆栽种 5 株碎米荠穴盘幼苗,在碎米荠生长过程中定期补充水分,使土壤水分一直保持在田间持水量的

瓶,将其置于恒温振荡仪中,于 25 ℃、120 r/min 振荡培养 3 d。

3)查彼克液体培养基制备。取 50 mL 查彼克液体培养基添加至步骤 1) 锥形瓶中,备用。

4)将步骤 2)中的种子液摇匀后,按照 2% 的接种量,取 10 mL 菌液(含有少量菌丝或 2~3 个菌球)接种至步骤 3) 锥形瓶中,于 28 ℃、150 r/min 下培养 3~5 d,设置 3 次重复,以不接菌液为对照。分别在第 3 天和第 5 天摇匀后各取样 30 mL,离心取上清液 5 mL 进行消化,用原子荧光光度计测定水溶态硒含量,剩余上清液通过中速定量滤纸过滤后,用 ICP-MS 测定水溶态镉含量。因元素水溶态属于元素有效态的一部分,因此,试验在液体培养基中进行,测定上清液水溶态硒/镉量换算出土壤有效态硒/镉量。

60%,且每 2 周更换盆栽位置,使每个盆栽光照均匀且充足。在碎米荠生长 30 d 时第 2 次施菌,施菌方式和浓度与种植前相同,种植 63 d 后植株成熟,收获碎米荠,并分成地上部分和地下部分,用自来水冲洗后再用去离子水冲洗干净,测量碎米荠根长、株高,碎米荠地上部分和地下部分在 105 ℃下杀青 30 min,然后在 70 ℃下烘至恒质量并测定碎米荠生物量,用于地上部分和地下部分总硒、总镉测定。另外,从每个盆中采集混合均匀的土壤样本约 100 g,经自然风干、研磨并分别过孔径 0.85、0.25 和 0.15 mm 尼龙筛后,用于土壤 pH、总硒、总镉、有效硒、有效镉测定。

表 2 盆栽试验设计与处理

Table 2 Experimental design

处理 Treatments	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	cfu/mL
10^{11} 菌液 10^{11} bacterial solution	—	✓	—	—	—	✓	—	—	
10^{10} 菌液 10^{10} bacterial solution	—	—	✓	—	—	—	✓	—	
10^8 菌液 10^8 bacterial solution	—	—	—	✓	—	—	—	✓	
碎米荠 <i>Cardamine violifolia</i>	—	—	—	—	✓	✓	✓	✓	
	CK1				CK2				

注:“—”表示不做任何处理,“✓”表示做了相应处理,即 1.5 kg 土壤、浇灌 5 mL 并喷施 10 mL 对应浓度菌液。Note:— means no treatment, ✓ means corresponding treatment is done, which means 1.5 kg of soil, irrigated with 5 mL and sprayed with 10 mL of corresponding concentration of bacterial solution.

土壤 pH 测定:准确称量经过预处理的土壤样品(2.0 ± 0.0005) g 于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 去离子水(土水质量比为 1:10),振荡 30 min,取出静置 30 min,测定上清液的 pH。

碎米荠生物量测定:将碎米荠在 70 ℃下烘干至恒质量,称取干质量。植株总硒测定参照 GB5009.93—2017《食品安全国家标准 食品中硒的测定》进行。植株总镉测定参照标准 GB5009.15—2014《食品安全国

家标准食品中镉的测定进行。土壤总硒参照尹明等^[16]的方法进行。土壤总镉测参照文献[17]进行。土壤有效硒测定参照NY/T 3420—2019《土壤有效硒的测定-氢化物发生原子荧光光谱法》进行。土壤有效镉测定参照HJ 804—2016《土壤8种有效态元素的测定二乙基三胺五乙酸浸提-电感耦合等离子体发射光谱法》进行。

1.6 数据处理

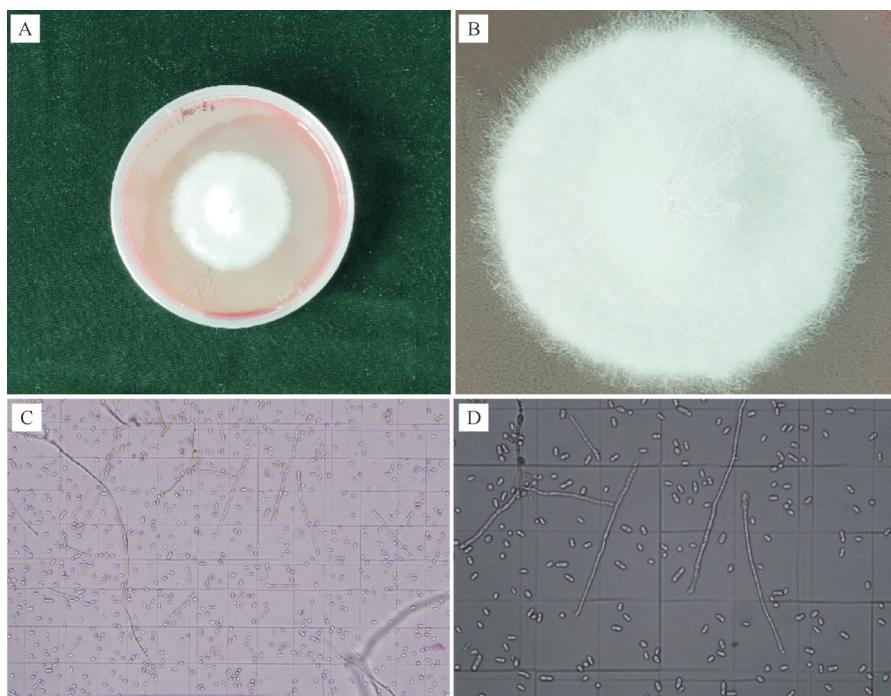
采用 Microsoft Excel 2010 软件处理数据,用

GraphPad Prism 8 软件制作图表,用 SPSS17.0 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 真菌筛选与分离

本研究从 Pec 根际土壤中分离获得 1 株真菌,并编号为 Pec-z3,用于后续试验。在马丁孟加拉红固体培养基上,菌落致密呈白色绒毛状,分生孢子镰刀型、多胞、无色(图 1)。



A:真菌平板培养;B:真菌菌落;C:真菌孢子显微观察($\times 200$);D:真菌孢子和菌丝显微观察($\times 400$)。A: Fungal plate culture; B: Fungal colony; C: Microscope magnifies fungal spores 200 times; D: Microscope magnifies fungal spores and hyphae 400 times.

图 1 真菌菌落形态和孢子菌丝显微照片

Fig. 1 Morphology of the fungus colony, spore and hyphae

2.2 真菌分子生物学鉴定

真菌菌株 Pec-z3 经 rDNA-ITS 基因测序,在 NCBI 中进行 BLAST 比对分析,选取同源性较高的序列与 Pec-z3 构建系统发育树(图 2),发现菌株 Pec-z3 与芬芳镰刀菌(*Fusarium redolens*) X94169.1 聚在同一个分支,序列同源性为 98%;另外,菌株 Pec-z3 形态特征与芬芳镰刀菌(*F. redolens*)一致。因此,Pec-z3 菌株为芬芳镰刀菌(*F. edolens*)。

2.3 真菌室内土壤模拟试验结果

在含土培养基中接种真菌,结果(图 3)显示,在培养第 3 天时,真菌菌株 Pec-z3 对土壤活硒率达到 18.08%,抑镉率为 41.19%;在培养第 5 天时,活硒率达到 60.89%,抑镉率为 27.31%。第 5 天活硒率显著

高于第 3 天,活硒率增加了 42.81 百分点;与活硒率相反,第 3 天抑镉率显著高于第 5 天,抑镉率第 3 天达到最大,但第 3 天和第 5 天抑镉率均超过 20%。

2.4 盆栽试验结果

1) Pec-z3 菌株对盆栽土壤 pH 值的影响。盆栽试验进行 63 d 后,采集不同处理的土样测定土壤 pH 值,由图 4 可见,处理组 D6、D7、D8 与 D5(CK1)pH 值差异显著,分别比对照低 0.13、0.27、0.35 个单位,说明添加不同浓度的真菌菌液不同程度地降低了土壤 pH 值。CK2(D9) pH 值显著低于 D5(CK1),降低 0.22 个单位,说明种植碎米荠也可以降低土壤 pH 值。处理组 D10、D11、D12 与 D9 存在显著性差异且均低于 D9,其中 D12 显著低于 D5 和 D9,pH 分别降

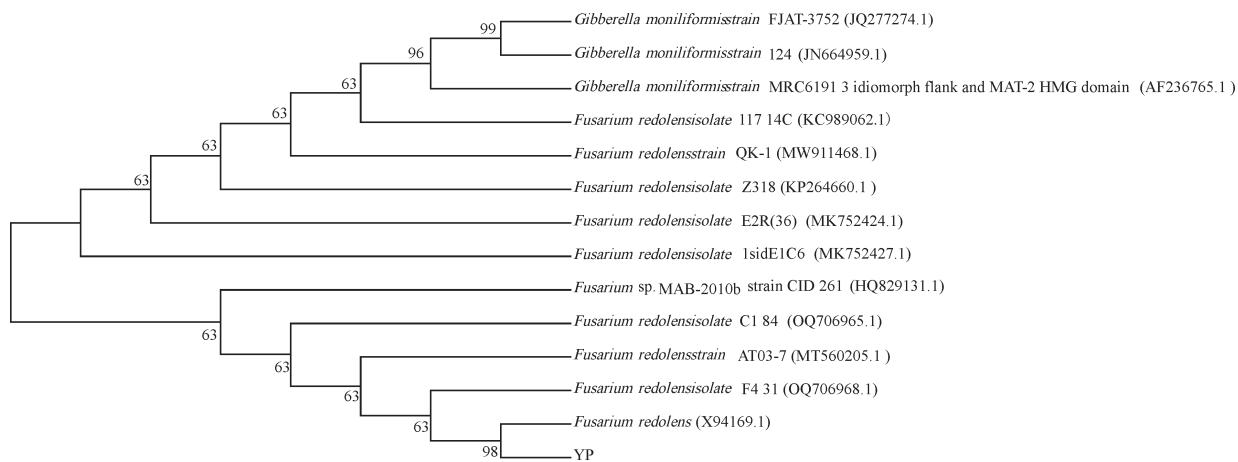


图2 基于ITS序列邻近法构建的真菌系统发育树

Fig. 2 Neighbour-joining phylogenetic tree of fungus based on ITS gene sequences

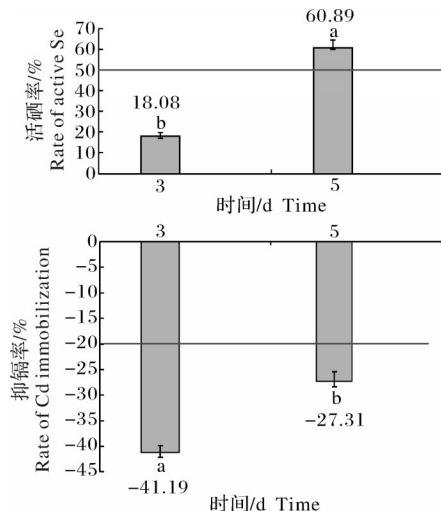


图3 土壤模拟试验评估 Pec-z3 菌株的活硒抑镉效果

Fig. 3 Effect of the additional fungus on Se release and Cd immobilization in a soil simulation experiment

低0.47和0.25个单位,说明种植碎米荠并添加 10^8 cfu/mL的真菌菌液,土壤pH降低程度最大。

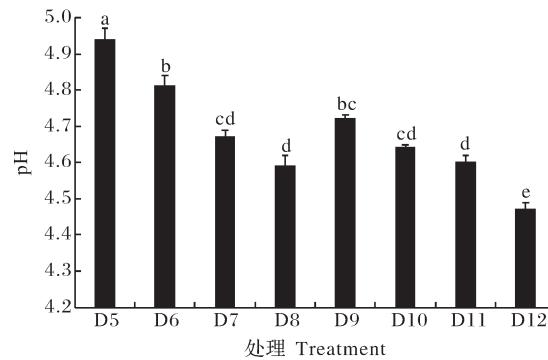


图4 不同处理下盆栽土壤pH值

Fig. 4 pH of potted soil under different treatment

2) Pec-z3 菌株对碎米荠幼苗生长的影响。由图5可见,添加不同浓度的真菌对碎米荠的株高没有显著影响;添加 10^8 cfu/mL的真菌菌液处理(D12),碎米荠根长显著高于(D9),生物量与D9(CK2)无显著性差异。表明 Pec-z3 菌株对碎米荠生长无不良影响。

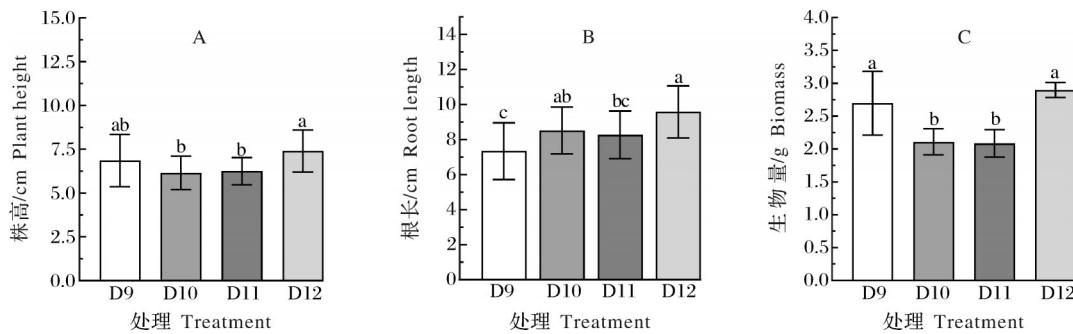


图5 不同处理下碎米荠幼苗株高(A)、根长(B)和生物量(C)

Fig. 5 Plant height(A), root length(B) and biomass(C) of *Cardamine violifolia* seedlings under different treatment

从碎米荠盆栽表型结果(图6)可见,碎米荠在整个种植周期内正常生长,叶片颜色鲜绿,均无病害发

生。虫害主要为蚜虫和潜叶蝇,种植期间分别采用叶面喷施70%吡虫啉水分散粒剂(施药1次,稀释



图6 各处理与对照碎米荠盆栽表型对比

Fig. 6 Comparison of phenotypes between different treatments and control in potted *Cardamine violifolia* plants

2 000倍)和黄板诱杀,喷施吡虫啉未影响碎米荠的生长。

3) Pec-z3菌株对土壤有效硒、有效镉的影响。由图7A可以看出,处理D6、D7、D8与D5(CK1)相比,土壤有效硒含量呈逐渐升高趋势,处理D10、D11、D12与D9(CK2)相比,土壤有效硒含量同样为逐渐升高趋势。处理D9、D10、D11、D12与处理D5(CK1)、D6、D7、D8比较,各组之间差异不显著。处理D9与D5差异不显著但高于D5,与D5相比,活硒率为4.82%。D12中的土壤有效硒显著地高于处理D5,与D5相比,活硒率为24.84%,D12与其他处理

差异不显著但高于其他处理,与D9相比,活硒率为19.05%。由图7B可以看出,处理D6、D7、D8与对照D5相比,土壤有效镉含量呈逐渐降低趋势,处理D10、D11、D12与对照D9相比,土壤有效镉含量同样呈逐渐降低趋势。处理D7、D8显著地低于D5,与D5相比,抑镉率分别为7.35%、10.65%。处理D9、D10、D11、D12与处理D5、D6、D7、D8比较,抑镉率分别为16.92%、18.85%、16.42%、15.78%。处理D12显著地低于D9,与D9相比,抑镉率为9.42%,与D5相比,抑镉率为24.74%

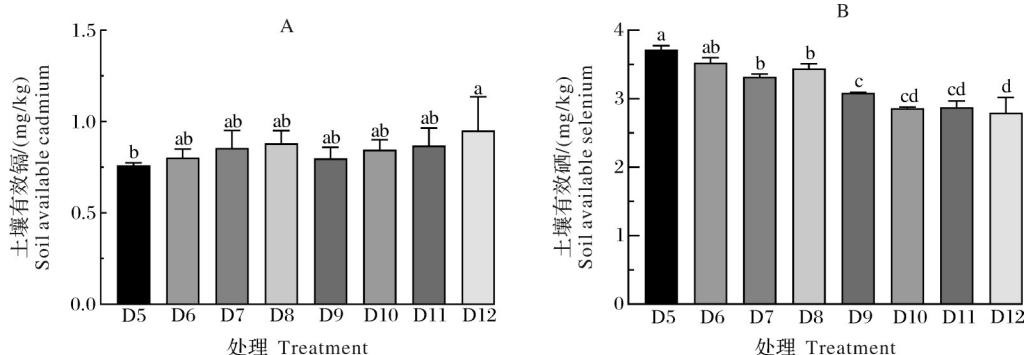


图7 不同处理下土壤有效镉(A)/硒(B)

Fig. 7 Soil available cadmium(A)/selenium(B) under different treatments

4) Pec-z3菌株对碎米荠地上和地下部分总硒、总镉的影响。由图8A可以看出,不同浓度的Pec-z3菌株处理后,D12碎米荠地上部分的硒总含量为3.715 mg/kg,显著高于D9(CK2),硒总含量比D9高出25.64%;与D9相比,碎米荠地下部分硒总含量呈向上升趋势且均高于对照D9,其中D12最高,比D9(CK2)高出36.82%。由图8B可以看出,不同浓度的真菌处理后,碎米荠地上部分的镉总含量均低于对照D9,其中D12显著地低于D9,镉总含量比D9低32.72%;不同浓度的真菌处理后,与对照D9相比,碎米荠地下部分镉总含量呈下降趋势,且均低于对照D9,其中D12最低,比对照D9低11.63%。

5) Pec-z3菌株对碎米荠富集和转运硒、镉能力的影响。由表3可知,加入真菌后,碎米荠对Se的富集系数均低于临界值(1.00),对Cd的富集系数均高于1,表明相较Se而言,碎米荠对Cd具有更好的富集能力。不同浓度的真菌处理后,碎米荠对Se的富集系数各处理组均大于对照组D9,碎米荠对Cd的富集系数各处理组均小于对照组,从侧面说明真菌对土壤中的硒具有活化作用、对镉具有抑制作用,添加 10^8 cfu/mL真菌对土壤的活硒抑镉能力影响最大。向土壤中施加不同浓度的真菌后,碎米荠对Se的转运系数均小于1且均低于对照组,说明Se元素主要富集在碎米荠根部,添加不同浓度的真菌后抑制了

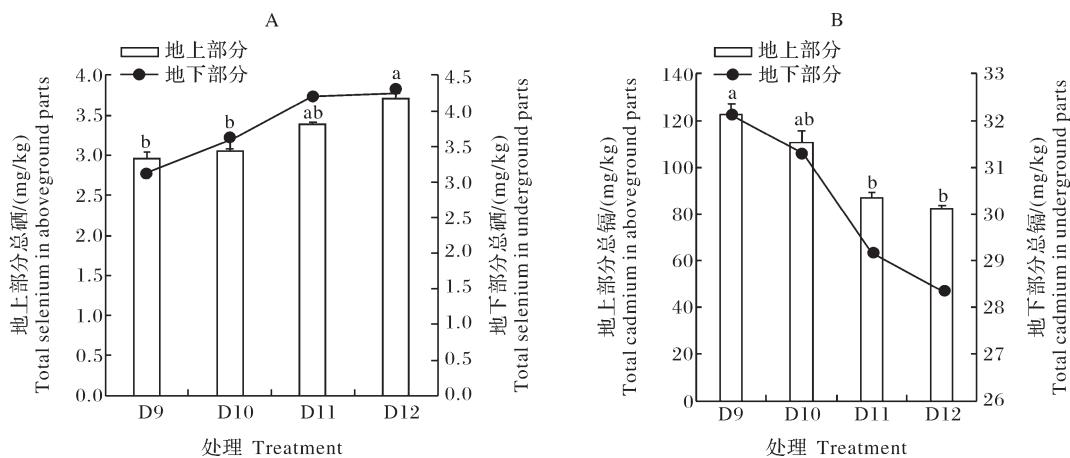


图8 不同处理下碎米茅地上和地下部分总硒、总镉

Fig. 8 Total selenium/cadmium in above and below ground of *Cardamine violifolia* under different treatments

Se从地下部分到地上部分的转移能力;碎米茅对Cd的转运系数均大于1且均低于对照组,说明Cd元素主要富集在碎米茅叶部,添加不同浓度的真菌后抑制Cd元素从地下部分到地上部分的转移能力,且影响碎米茅对Cd的转运能力强于Se,说明在天然高硒高镉的土壤上,碎米茅地上和地下部分的富镉能力要强于富硒能力。

表3 不同处理下碎米茅富集和转运硒、镉的能力

Table 3 Se/Cd enrichment and transport capacity of *Cardamine violifolia* under different treatments

处理 Treatments	富集系数 Enrichment coefficient		转运系数 Transport coefficient	
	Se	Cd	Se	Cd
D9	0.21	18.13	0.95	3.82
D10	0.23	17.84	0.85	3.52
D11	0.25	14.05	0.81	2.98
D12	0.29	11.25	0.87	2.91

3 讨论

本研究从恩施州硒矿区附近的蒲儿草根际土壤中筛选出1株能够耐受一定硒镉浓度的真菌,经过菌落形态和分子生物学鉴定该真菌为芬芳镰刀菌(*Fusarium redolens*)。Booth^[18]及张素轩^[19]认为芬芳镰刀菌(*F. redolens*)是镰刀菌属美丽组(section elegans)中1个具有重要经济意义的种。Zhang等^[20]从结香中分离到多株具有抗菌活性的内生真菌,如*F. oxysporum* var. *redolens*,属于芬芳镰刀菌属真菌。研究表明,芬芳镰刀菌的多种次生代谢产物都表现出较好的抗菌活性^[21-22],徐利剑等^[23]从盾叶薯蓣中分离获得了内生芬芳镰刀菌并研究了Dzf2中的2个

抗菌活性成分,其中镰刀菌酸是芬芳镰刀菌的活性物质之一。Son等^[24]发现镰刀菌酸具有温和的毒性,在体外和体内均显示出对假单胞菌的抗卵菌活性,可以抑制植物病原卵菌和真菌的菌丝体生长,同时还可以有效抑制植物致病菌细胞的生长。刘奇^[25]发现芳香镰孢属真菌HNU066可以提高生物滴滤塔反应器活性填料对含硫化氢废气的清除效率,与对照组相比可提高34.5%。

本研究通过室内土壤模拟试验发现,芬芳镰刀菌具有活硒抑镉能力。添加10⁸cfu/mL真菌并种植碎米茅,土壤中有效硒含量可提高24.84%,只添加10⁸cfu/mL真菌,土壤中有效硒含量可提高15.64%。只种植碎米茅,土壤中有效硒可提高4.82%,活硒率均低于二者共同处理的活硒率24.84%;添加10⁸cfu/mL的真菌并种植碎米茅,土壤中有效镉含量可降低24.74%,只添加10⁸cfu/mL的真菌,土壤中有效镉含量可降低10.65%。只种植碎米茅,土壤中有效镉可降低16.92%,抑镉率均低于二者共同处理的抑镉率24.74%,说明土壤中有效硒/镉的含量既受真菌的影响又受碎米茅的影响,且添加10⁸cfu/mL的真菌后土壤中有效硒含量最高,有效镉含量最低,即活硒率和抑镉率均达到最高。综上,碎米茅和真菌都对土壤有效硒/镉有影响,同时碎米茅对土壤有效硒与有效镉影响低于真菌的影响,说明在硒镉伴生土壤中,真菌对土壤活硒抑镉的能力强于碎米茅。

真菌是否具有活硒抑镉能力以及对硒镉伴生土壤修复的效果最终体现在指示植物中硒/镉含量的变化情况,植物中的硒/镉含量是评估硒/镉生物利

用度/毒性的直接指标之一。本研究中,不同浓度Pec-z3处理后碎米茅地上部分总硒含量增加3.19%~25.64%,地下部分总硒含量增加14.58%~36.82%。碎米茅地上部分总镉含量降低9.82%~32.72%,地下部分总镉含量降低2.36%~11.63%。表明不同浓度的真菌有增加碎米茅地上和地下部分总硒含量、降低总镉含量的作用。添加 10^8 cfu/mL菌液对碎米茅地上和地下部分总硒、总镉含量影响最大,其中地上部分总硒含量增加25.64%,总镉含量降低32.72%,地下部分总硒含量增加36.82%,总镉含量降低11.63%。

富集系数与转运系数的大小和植物种类、土壤类型、土壤环境、重金属种类、重金属生物可利用性、强化剂种类等多种因素有关。富集系数和转运系数的大小可以间接反映土壤重金属污染植物修复的效果。研究发现,碎米茅是一种极具潜力的重金属污染的指示和修复植物^[26],相较硒而言,碎米茅对镉具有更好的富集能力,硒元素主要富集在碎米茅根部,镉元素主要富集在碎米茅叶部。本研究中碎米茅地上部分对于镉的积累量最高为122.573 mg/kg(>100 mg/kg),碎米茅地下部分对于镉的积累量最高为32.117 mg/kg,说明碎米茅具有潜在的土壤镉修复价值。

目前,已有细菌或植物对土壤中Cd、Cr、Pb、Zn、Cu、Ni、Mn、As、Hg等重金属进行单独或联合修复的研究^[27-28],但暂时还没有真菌或植物单独或联合作用后能够提高植物可食用部位有益元素Se降低有害元素Cd含量相关的研究。本研究主要进行了小规模的盆栽试验,还处于初步模拟研究阶段,实际应用还有待进一步的田间试验验证。本研究没有涉及芬芳镰刀菌活硒抑镉的机制,只研究了芬芳镰刀菌单一使用于1种指示植物的效果,今后将继续筛选出具有活硒抑镉能力的细菌、放线菌等,组合使用或联合其他植物来解决不同土壤和植物硒镉伴生的问题。

参考文献 References

- [1] 张泽洲.典型农作物中硒形态分析及其硒-镉相互作用研究[D].武汉:中国地质大学,2019.ZHANG Z Z.Selenium speciation and selenium-cadmium interaction in staple crops [D]. Wuhan: China University of Geosciences, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [2] 韦雪姬,王磊,卓小雄.桂中典型碳酸盐岩区水稻及根系土硒含量特征[J].地球与环境,2020,48(3):369-376.WEI X J, WANG L,ZHUO X X.Characteristics of selenium contents in rice and rhizosphere soil in a typical carbonate region of central Guangxi [J].Earth and environment,2020,48(3):369-376 (in Chinese with English abstract).
- [3] 沈燕春.贵池富硒区伴生重金属及其生物效应研究[D].合肥:安徽农业大学,2011.SHEN Y C.Research of the selenium-rich area in Guichi associated with heavy metals and its biological effects [D].Hefei: Anhui Agricultural University, 2011 (in Chinese with English abstract).
- [4] 孙协平,周广文,罗友进,等.硒镉伴生对富硒土壤柑橘生长及生理代谢的影响[J].核农学报,2020,34(3):661-668. SUN X P, ZHOU G W, LUO Y J, et al.Effect of selenium cadmium associated on growth and physiological metabolism of *Citrus* in Se-enriched soil [J].Journal of nuclear agricultural sciences, 2020, 34(3): 661-668 (in Chinese with English abstract).
- [5] 李荣林,王胜兵,李优琴.锌硒对油菜吸收和累积镉的影响[J].江苏农业学报,2008,24(3):274-278.LI R L,WANG S B,LI Y Q.Effects of zinc and selenium on absorption of cadmium in rapeseed [J]. Jiangsu journal of agricultural sciences, 2008,24(3):274-278 (in Chinese with English abstract).
- [6] YANG B B, YANG C, SHAO Z Y, et al.Selenium (Se) does not reduce cadmium (Cd) uptake and translocation in rice (*Oryza sativa* L.) in naturally occurred Se-rich paddy fields with a high geological background of Cd [J].Bulletin of environmental contamination and toxicology, 2019, 103 (1) : 127-132.
- [7] 耿建梅,王斌,温翠萍,等.海南稻田土壤硒与重金属的含量、分布及其安全性[J].生态学报,2012,32(11):3477-3486. GENG J M, WANG W B, WEN C P, et al.Concentrations and distributions of selenium and heavy metals in Hainan paddy soil and assessment of ecological security [J].Acta ecologica sinica, 2012, 32(11): 3477-3486 (in Chinese with English abstract).
- [8] DU Y J, LUO K L, NI R X, et al.Selenium and hazardous elements distribution in plant-soil-water system and human health risk assessment of Lower Cambrian, Southern Shaanxi, China [J]. Environmental geochemistry and health, 2018, 40 (5):2049-2069.
- [9] 宋明义,岑静,胡艳华,等.高镉地质环境富硒土壤特征及其生态效应[J].地球与环境,2012,40(3):354-360.SONG M Y,CEN J,HU Y H,et al.Study on the characteristics of selenium-rich soil under geological environment with high contents of cadmium and its ecological effects [J]. Earth and environment,2012,40(3):354-360 (in Chinese with English abstract).
- [10] 王锐,侯宛苓,李雨潼,等.高硒高镉区土地安全区划方法[J].环境科学,2019,40(12):5524-5530.WANG R, HOU W L,

- LI Y T, et al. Land safety zoning method in high-selenium and high-cadmium areas [J]. Environmental science, 2019, 40(12): 5524-5530 (in Chinese with English abstract).
- [11] 安凤秋. 外源重金属铅和镉对土壤生物活性及微生物群落多样性的影响研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018. AN F Q. Influence on soil biological activity and bacteria community diversity by exogenous lead and cadmium [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [12] 杨礼茂. 鄂西南地区硒资源及其综合开发[J]. 地域研究与开发, 1998, 17(4): 72-76. YANG L M. Selenium resources in southwest Hubei and its comprehensive development [J]. Areal research and development, 1998, 17(4): 72-76 (in Chinese).
- [13] 林樾. 莼叶碎米荠形态分析及其富硒多肽对肝癌细胞作用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021. LIN Y. Speciation analysis of selenium in *Cardamine violifolia* and its selenium enriched peptides activity in hepatoma cells [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [14] RIAZ M, KAMRAN M, RIZWAN M, et al. Cadmium uptake and translocation: selenium and silicon roles in Cd detoxification for the production of low Cd crops: a critical review [J/OL]. Chemosphere, 2021, 273: 129690 [2023-02-06]. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129690>.
- [15] ZWOLAK I. The role of selenium in arsenic and cadmium toxicity: an updated review of scientific literature [J]. Biological trace element research, 2020, 193(1): 44-63.
- [16] 尹明, 李家熙. 岩石矿物分析[M]. 4版. 北京: 地质出版社, 2011: 845-846. YIN M, LI J X. Rock mineral analysis [M]. 4th ed. Beijing: Geological Publishing House, 2011: 845-846.
- [17] 徐聪, 赵婷, 池海涛, 等. 微波消解-ICP-MS法测定土壤及农作物小麦中的8种重金属元素[J]. 中国测试, 2019, 45(5): 85-92. XU C, ZHAO T, CHI H T, et al. Determination of eight kinds of heavy metal elements in cultivated soil and the wheat by microwave digestion-ICP-MS method [J]. China measurement & test, 2019, 45(5): 85-92 (in Chinese with English abstract).
- [18] BOOTH C. The genus *Fusarium* [M]. Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux for the Commonwealth Mycological Institute, 1971.
- [19] 张素轩. 镰刀菌属分类进展[J]. 真菌学报, 1991, 10(2): 85-94. ZHANG S X. Advances in the taxonomy of the genus *Fusarium* [J]. Acta mycologica sinica, 1991, 10(2): 85-94 (in Chinese).
- [20] ZHANG H W, RUAN C F, BAI X L. Isolation and antimicrobial effects of endophytic fungi from *Edgeworthia chrysanthemifolia* [J/OL]. Bangladesh journal of pharmacology, 2015, 10(3): 529 [2023-02-06]. <https://doi.org/10.3329/bjp.v10i3.23575>.
- [21] XU L J, LIU Y S, ZHOU L G, et al. Enhanced beauvericin production with *in situ* adsorption in mycelial liquid culture of *Fusarium redolens* Dzf2 [J]. Process biochemistry, 2009, 44(10): 1063-1067.
- [22] 李静. 滇重楼内生真菌及其抗菌活性检测和甾体化合物分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2007. LI J. Antimicrobial activity and steroid analysis of the endophytic fungi from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2007 (in Chinese with English abstract).
- [23] 徐利剑, 李培琴, 赵江林, 等. 内生芬芳镰刀菌Dzf2中两个抗菌活性成分[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22: 564-567. XU L J, LI P Q, ZHOU L G, et al. Two antimicrobial active components in endophytic *Fusarium fumigatus* Dzf2 [J]. Natural products research and development, 2010, 22: 564-567.
- [24] SON S W, KIM H Y, CHOI G J, et al. Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans* [J]. Journal of applied microbiology, 2008, 104(3): 692-698.
- [25] 刘奇. 芳香镰孢属真菌HNU066及其在含硫化氢废气降解中的应用: 201910876615.3[P]. 2020-02-21. LIU Q. Fusarium aromaticum fungus HNU066 and its application in the degradation of hydrogen sulphide-containing exhaust gases: 201910876615.3[P]. 2020-02-21.
- [26] 黄东华, 麦淑华, 仇曙, 等. 镉对堇叶碎米荠生长生理特性的影响[J]. 湖北农业科学, 2022, 61(5): 87-90. HUANG D H, MAI S H, QIU S, et al. Effect of cadmium on the growth and physiological characteristics of the *corydalis capensis* [J]. Hubei agricultural science, 2022, 61(5): 87-90.
- [27] 刘新亮, 刘梦茹, 杨亚东, 等. 重金属污染土壤修复技术研究现状及发展方向[J]. 化工矿物与加工, 2021, 50(10): 52-57. LIU X L, LIU M R, YANG Y D, et al. Research status and development direction of heavy metal contaminated soil remediation technology [J]. Chemical minerals and processing, 2021, 50(10): 52-57.
- [28] MAHAR A, WANG P, ALI A, et al. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: a review [J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2016, 126: 111-121.

Screening and identification of a fungus *Fusarium redolens* and its effect of selenium uptake and cadmium reduction on *Cardamine violifolia*

CHEN E¹, DU Xingyuan¹, ZHANG Chaoyang¹, MA Shilong¹,
HUANG Ziyi², CHEN Yongbo¹, YANG Baohong³

1. Enshi Autonomous Prefecture Academy of Agricultural Sciences, Enshi 445000, China;

2. College of Life Sciences and Engineering, South China University of Technology,
Guangzhou 511400, China;

3. The Second Geological Brigade of Hubei Provincial Geological Bureau, Enshi 445000, China

Abstract One functional fungus strain was isolated and screened from plant rhizosphere soil with high background value of 50.187 mg/kg selenium (Se) and 50.311 mg/kg cadmium (Cd) using selective culture medium to solve the problem of co-accumulation of selenium and cadmium in crops. The fungus strain obtained was identified as *Fusarium redolens*. The changes in available selenium and cadmium in soil, as well as the content of Se and Cd in edible parts of plants were determined with soil simulation experiments and pot experiments. Evaluate The effects of fungus on selenium uptake and cadmium reduction based on the enrichment of selenium/cadmium and the transport coefficients. The results of soil simulation experiments showed that the rate of active selenium was positively correlated with culture time after the fungus was inoculated, while the rate of cadmium immobilization was opposite. The rate of active selenium reached its peak on the 5th day, at 60.9%. The rate of cadmium immobilization was highest at 41.2% on the third day and lowest at 27.3% on the fifth day. The results of the pot experiments showed that adding 10⁸ cfu/mL of fungi significantly reduced the soil pH by 0.35 units compared to the control. There was no adverse effect on the growth of the seedlings of *Cardamine violifolia*, with an average plant height, root length, and biomass of 7.4 cm, 9.6 cm, and 2.9 g, respectively, all higher than that of the control. The content of available selenium in the soil significantly increased, with the highest rate of active selenium reaching 24.8%, while the content of available cadmium significantly decreased, with the rate of cadmium immobilization of 24.7%. The content of total selenium in the above ground and underground parts of *Cardamine violifolia* increased by 25.6% and 36.8%, respectively, while the content of total cadmium in the above ground and underground parts of *Cardamine violifolia* decreased by 32.7% and 11.6%, respectively. It is indicated that fungi have the ability to activate selenium and immobilize cadmium in natural soil with high background value of selenium and cadmium, and the best effect is achieved when adding a concentration of 10⁸ cfu/mL, which helps to enrich selenium and reduce cadmium in *Cardamine violifolia*.

Keywords selenium (Se); selenium-cadmium concomitant; *Cardamine violifolia*; fungus; bioavailability of selenium and cadmium in soil

(责任编辑:张志钰)