

内生真菌对青贮玉米幼苗抗旱性的影响

王英娜¹,王佳玮¹,夏依婷¹,刘涛¹,李联欢¹,刘建利¹,康鹏¹,李素芬²

(1.北方民族大学生物科学与工程学院,国家民委黄河流域农牧交错区生态保护重点实验室,宁夏特殊生境微生物资源开发与利用重点实验室,宁夏银川750021;2.西鄂尔多斯国家级自然保护区管理局,内蒙古鄂尔多斯014300)

摘要:为了研究干旱胁迫下内生真菌对青贮玉米幼苗生长的影响并筛选可以提高青贮玉米幼苗抗旱性的菌株,开展盆栽试验,将分离自西鄂尔多斯荒漠强旱生孑遗植物四合木、沙冬青、锦刺等植物根系的8株内生真菌和1株内生真菌模式种印度梨形孢,以灌根的方式分别接种到青贮玉米幼苗根系,镜检侵染率后,采用PEG6000模拟重度干旱胁迫培养2周,测定青贮玉米幼苗生理生化指标并计算抗旱系数,利用主成分分析法综合评价内生真菌对青贮玉米幼苗抗旱性的影响。结果表明:所有菌株均能侵入青贮玉米根系形成共生,但侵染率存在差异;在未接菌(E-)组的非胁迫和胁迫植株之间,地上部分鲜重、叶相对含水量、叶绿素含量、根体积、根表面积、根鲜重、根干重、根干物质含量、Pro含量、MDA含量、CAT活性、SOD活性、POD活性等13个指标存在显著差异,基于13个生理指标的主成分分析表明,只有Am04、Tm36、Tm02、印度梨形孢等4株内生真菌可提高青贮玉米幼苗抗旱性,并以菌株Am04最优;而Pm53、Tm30、Pm38、Pm06、Pm57等5株内生真菌并未提高青贮玉米幼苗抗旱性;且侵染率和大多数抗旱性生理指标之间无相关性。因此,不同内生真菌对青贮玉米幼苗抗旱性具有不同程度影响,其中菌株Am04较其他菌株更有利于提高青贮玉米幼苗抗旱能力。

关键词:内生真菌;强旱生植物;青贮玉米;幼苗;抗旱性

中图分类号:Q939.96 **文献标志码:**A

Effects of endophytic fungi on drought stress tolerance of silage maize seedlings

WANG Yingna¹, WANG Jiawei¹, XIA Yiting¹, LIU Tao¹,
LI Lianhuan¹, LIU Jianli¹, KANG Peng¹, LI Sufen²

(1. College of Biological Science and Engineering, North Minzu University; Key Laboratory of Ecological Protection of Agro-pastoral Ecotones in the Yellow River Basin, National Ethnic Affairs Commission of the People's Republic of China; Ningxia Key Laboratory of Microbial Resources Development and Applications in Special Environment, Yinchuan, Ningxia 750021, China;
2. West Ordos National Nature Reserve Administration, Ordos, Inner Mongolia 014300, China)

Abstract: To study the effects of endophytic fungi on growth of silage maize seedlings and obtain excellent strain enhancing the drought tolerance of silage maize seedlings, 8 strains of endophytic fungi isolated from the roots of three strong xerophytes (*Tetraena mongolica*, *Ammopiptanthus mongolicus*, *Potaninia mongolica*) planting in West Ordos and *Piriformospora indica* of model species of endophytic fungi were selected as test materials to inoculate into the roots of silage maize seedlings. After two weeks under severe drought stress simulated with PEG6000, the physiological and biochemical indexes of the seedlings were measured and the drought resistance coefficient was calculated. Then the effect of inoculating endophytic fungi on drought resistance of silage maize seedlings was evaluated using principal component analysis method. The results showed that all strains invaded the roots of silage maize seedlings to form symbiosis, but the infection rates were very different between different endophytic fungi strains. There were significant differences in 13 physiological indexes between non-drought stressed and drought stressed group in

the uninoculated plants (E-), such as aboveground fresh weight, leaf relative water content, chlorophyll content, root volume, root surface area, root fresh weight, root dry weight, root dry matter content, Pro content, MDA content, CAT activity, SOD activity and POD activity. The principal component analysis based on 13 physiological indexes demonstrated that only 4 endophytic fungi (Am04, Tm36, Tm02 and *Piriformospora indica*) improved the drought resistance of silage maize seedlings. The strains Am04 was the best. However, the other 5 endophytic fungi (Pm53, Tm30, Pm38, Pm06 and Pm57) did not improve the drought resistance of silage maize seedlings. There was no correlation between infection rate and most physiological indexes of drought resistance. Therefore, different endophytic fungi strains had different effects on the drought resistance of silage maize seedlings. The strain Am04 improved the drought resistance of silage maize seedlings better than others.

Keywords: endophytic fungi; strong xerophytes; silage maize; seedling; drought resistance

干旱作为最主要的非生物胁迫因素限制了干旱和半干旱地区农作物生长,导致生产力大幅降低,进而造成巨大的农业经济损失^[1]。干旱区约占全球陆地表面面积的 41%,全球约 38%以上的人口生存依赖干旱区。我国旱区约占国土面积的 53%~68%,其中西北内陆荒漠草原、黄土高原、黄河流域的绝大部分区域都属于干旱区^[2-3]。

植物微生物作为植物的“第二基因组”存在于根际或根内,有研究表明植物微生物有助于提高宿主植物对不良环境的抗性^[4-6]。内生真菌作为这些有益微生物的重要组成部分广泛存在于植物组织中,相较于根际微生物,内生真菌可与宿主形成较强的共生关系^[7-9]。研究表明内生真菌有利于提高宿主植物应对干旱胁迫的能力,尤其以专性共生的禾草内生真菌(*Epichloë spp.*)、印度梨形孢(*Piriformospora indica*)和深色有隔内生真菌(DSE)研究居多。李飞^[10]和夏超^[11]研究发现内生真菌(*Epichloë gansuensis*)与醉马草(*Achnatherum inebrians*)共生提高了宿主抗旱性。张雪^[12]、任颖^[13]、He等^[14]和Liu等^[15]报道了DSE提高植物抗旱性。蒿若超等^[16]、韦巧等^[17]、徐乐等^[18]和Xu等^[19]报道了印度梨形孢提高植物抗旱性。

西鄂尔多斯是我国干旱半干旱地区生物多样性保育的关键地区以及全球温带草原灌木物种起源地和分布中心。该地区的植被类型主要包括沙生植被、草原化荒漠植被、荒漠植被和干旱草原植被,且超旱生灌木、半灌木在植物群落中占据生态位优势。由于该区地处草原向荒漠的过渡带,加之边缘效应及古地理等原因,故该地区生长着丰富的古地中海孑遗植物、亚洲中部珍稀濒危荒漠植物及我国特有植物,如沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)、四合木(*Tetraena mongolica*)、绵刺(*Potania mongolica*)、半日花等(*Helianthemum songari-*

cum)^[20],这些超旱生植物共生微生物资源急需开发利用。

青贮玉米作为食草家畜的优质饲料在宁夏和内蒙河套地区农牧交错带干旱半干旱地区种植面积较大,但由于其种植需水量大,对水分胁迫敏感,产量受干旱影响较大^[21]。因此,加强青贮玉米抗旱性的微生物菌剂研究对于干旱半干旱地区青贮玉米种植具有重要意义^[22]。本研究用从西鄂尔多斯荒漠强旱生植物四合木、绵刺和沙冬青根内分离出的 8 株内生真菌和 1 株内生真菌模式种印度梨形孢接种青贮玉米幼苗,评价植株在聚乙二醇 6000 (PEG6000)模拟干旱胁迫下植株的抗旱能力,检测荒漠强旱生植物内生真菌能否帮助异源宿主植物提高抗旱性,研究成果可为开发利用荒漠超旱生植物共生微生物资源奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试内生真菌菌株共 9 株:菌株 Tm02、Tm30、Tm36 分离自四合木根内,菌株 Pm06、Pm37、Pm38 和 Pm53 分离自绵刺根内,菌株 Am04 分离自沙冬青根内,印度梨形孢购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。青贮玉米品种为‘宁丹 33’,购自宁夏润丰种业有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 供试内生真菌制备 将供试菌株接种到 PDA 固体培养基上 27℃ 培养 7 d,待菌丝长满平板后用灭菌后的 1 mL 枪头打成菌饼,将 5 个菌饼接入 200 mL PDA 液体培养基中,在温度 28℃ 和转速 180 r·min⁻¹条件下培养 5 d,将培养液用榨汁机打碎,用 PDA 液体培养基调整 OD₆₀₀ 值为 0.932 用于接种。

1.2.2 盆栽青贮玉米幼苗 挑选大小一致且颗粒

饱满的玉米种子自来水冲洗后采用无菌水浸泡 12 h,用 2.5%次氯酸钠溶液表面消毒 3 min,无菌水冲洗 3~4 次,再用 70%酒精消毒 5 min,无菌水冲洗 3~4 次,最后用 0.1%氯化汞溶液消毒 1 min,无菌水冲洗 3~4 次。将消毒后的种子置于水琼脂培养基上,在 28℃培养箱中催芽,2 d 后胚根长度达 2 cm 左右。

蛭石 80℃干热灭菌 6 h 后,装入酒精消毒后的花盆(盆高 14.0 cm,上口径 20.1 cm,下口径 12.9 cm)。将催芽后的种子种入花盆中,每盆 3 粒种子,试验设置 9 株内生真菌和 1 个阴性对照组共 10 个处理,接种阳性对照印度梨形孢处理为 E+,未接种阴性对照处理为 E-,其余每组处理按菌株编号标记,每个处理分为干旱胁迫组(D⁺)与非干旱胁迫组(D⁻),每组各 6 盆,共 120 盆。

1.2.3 回接内生真菌试验 种子移入盆中 10 d 后,轻轻拨开三叶期青贮玉米幼苗根部土壤,使其根系裸露出来,将 10 mL 内生真菌培养液围绕青贮玉米幼苗根系四周进行浇灌,对照组以等体积的无菌 PDA 液体培养基灌根处理,每株内生真菌接种 12 盆,接种后 3 d 不浇水或营养液,平时用烧杯浇 800 mL 无菌水,每 3 d 浇一次 30 mL 无菌的 Hoagland's 营养液,将每个处理盆栽随机摆放,为规避位置效应,每 7 d 挪动位置,培养 25 d 左右至拔节期。

1.2.4 PEG6000 模拟干旱胁迫试验 将 E-、E+ 和每个接种内生真菌拔节期青贮玉米幼苗各取 6 盆置于托盘中,向托盘内倒入深度为 10 cm 的 30% PEG6000(-1.2 MPa)溶液,确保盆中蛭石能将 PEG6000 溶液上吸,另 6 盆托盘中放置等体积的无菌水作为非干旱胁迫对照,约 2 周后,当 E-干旱胁迫处理植株叶片全部萎蔫卷曲时停止胁迫。

1.2.5 植株生理指标测定 地上部分生理指标参考黄倩等^[23]和郝建军等^[24]方法进行测定,采用丙酮提取法^[24]测定叶绿素含量,采用茚三酮法测定脯氨酸含量,采用硫代巴比妥酸法测定丙二醛含量,采用愈创木酚法测定过氧化物酶活性,采用分光光度法测定过氧化氢酶活性,采用氮蓝四唑光化还原法测定超氧化物歧化酶活性。根系生理指标参考陈鹏狮等^[25]方法测定。

1.2.6 染色镜检青贮玉米幼苗根系侵染 参考陈思杰等^[26]和 Mcgonigle 等^[27]方法稍作修改:将青贮玉米幼苗根系用自来水冲洗干净,随机挑选直径小于 2 mm 的细根剪成 1 cm 长的根段,各处理开放置,共 10 个试管,向各试管中加入 10% KOH 溶液

淹没根样,90℃水浴加热 1 h 后倒掉 KOH 溶液,用无菌水冲洗干净控干水分,加入 10%碱性 H₂O₂溶液室温放置 30 min,倒掉 H₂O₂溶液无菌水冲洗干净控干水分后加入 1% HCl 溶液浸泡 5 min,倒掉 HCl 溶液后加入 0.05%台盼蓝染液室温染色 25 min,倒去染液,将染色后的根样置于乳酸甘油混合液中脱色 12 h,每 10 个根段置于一个载玻片上,盖上并轻敲盖玻片,将根段组织均匀分散在载玻片上,观察并统计侵染率。

$$\text{侵染率}(\%) = \frac{\text{受侵染根段数}}{\text{总镜检根段数}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3 数据统计分析

$$\text{相对含水量(RWC)} = \left[\frac{\text{样品鲜重} - \text{样品干重}}{\text{样品饱和鲜重} - \text{样品干重}} \right] \times 100\% \quad (2)$$

抗旱系数计算公式:只选 E-干旱胁迫处理组和非干旱胁迫处理组测定值有显著差异的指标计算抗旱系数。

$$\text{MDA 含量抗旱系数(DTC)} = -(\text{干旱胁迫测定值} / \text{未干旱胁迫测定值}) \quad (3)$$

$$\text{其余指标耐旱系数(DTC)} = \frac{\text{干旱胁迫测定值}}{\text{未干旱胁迫测定值}}^{[28-29]} \quad (4)$$

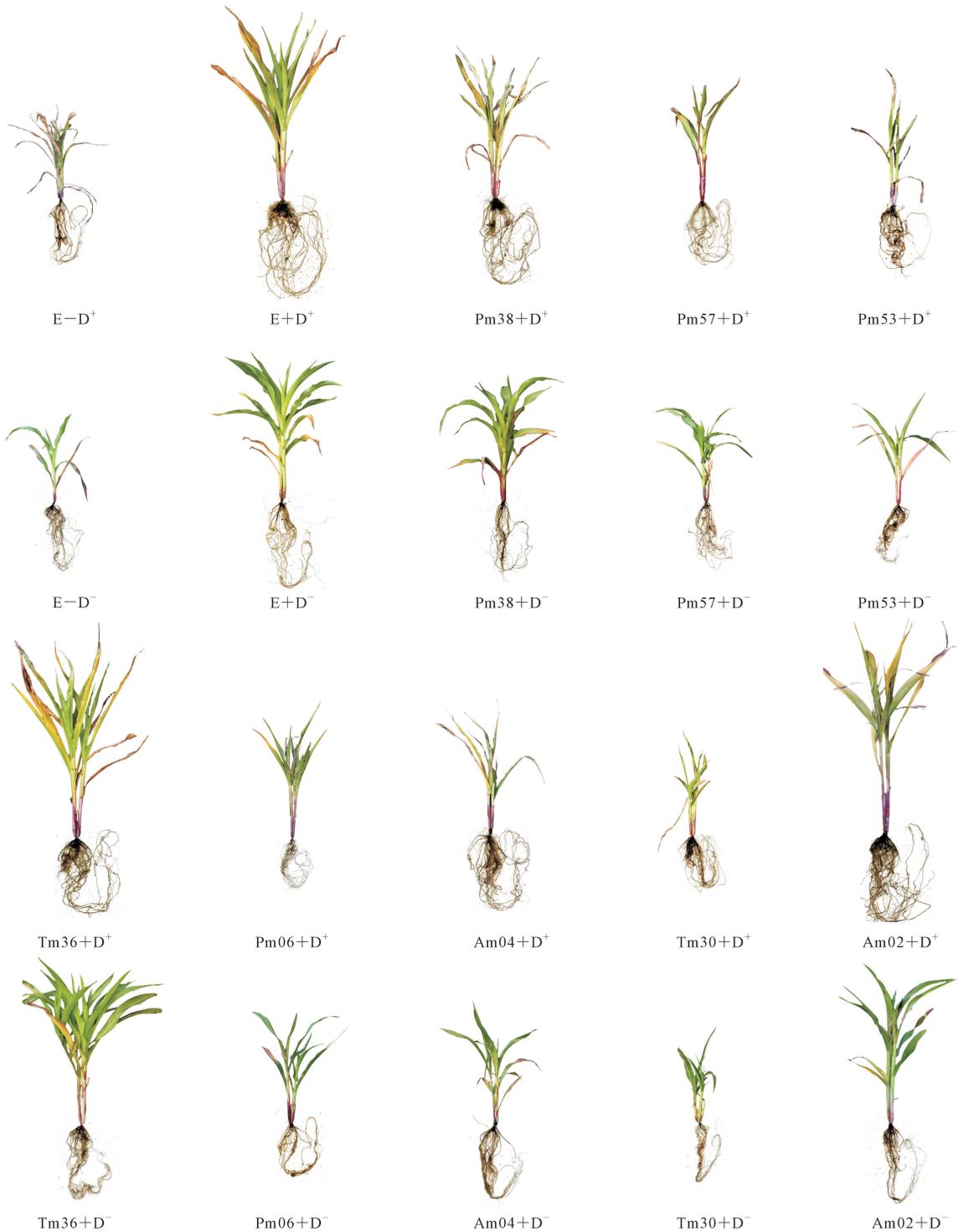
采用 Excel 软件进行数据处理,采用 SPSS 13.0 软件进行主成分分析^[28,30]和方差分析,采用 Origin 2019 软件进行回归分析。

2 结果与分析

2.1 接种内生真菌对青贮玉米幼苗地上部分抗旱性的影响

如图 1 所示青贮玉米幼苗地上部分,E-所有干旱胁迫植株叶片均表现出卷曲萎蔫甚至出现枯死现象,而非干旱胁迫处理的植株生长正常。各接菌组胁迫植株均出现不同程度叶卷曲症状,其中接种菌株 Pm53、Pm06、Am04、Tm30 较严重,E+及接种其它菌株的植株能在一定程度上缓解干旱胁迫对植株的影响。

为进一步量化干旱胁迫对青贮玉米幼苗的影响,测定了非胁迫和干旱胁迫后的植株株高、基径粗、总叶片数、地上部分鲜重、地上部分干重等 5 个地上部分形态学性状,以及叶绿素含量和叶相对含水量等 2 个生理指标。研究发现,只有地上部分鲜重、叶相对含水量、叶绿素含量等指标在 E-的非干旱胁迫和干旱胁迫之间存在显著差异,胁迫造成这 3 个指标都比对应的非胁迫值低。因此,只基于这 3 个指标计算所得的抗旱系数均小于 1.0。如图 2 所



注: E⁻: 未接种内生真菌; E⁺: 接种印度梨形孢; Pm38: 接种内生真菌 Pm38; Pm57: 接种内生真菌 Pm57; Pm53: 接种内生真菌 Pm53; Tm36: 接种内生真菌 Tm36; Pm06: 接种内生真菌 Pm06; Am04: 接种内生真菌 Am04; Tm30: 接种内生真菌 Tm30; Tm02: 接种内生真菌 Tm02; D⁺: 干旱胁迫处理; D⁻: 非干旱胁迫处理, 后同。

Note: E⁻: not inoculated with endophytic fungi; E⁺: inoculated with *Piriformis indica*; Pm38: inoculated with endophytic fungi Pm38; Pm57: inoculated with endophytic fungi Pm57; Pm53: inoculated with endophytic fungi Pm53; Tm36: inoculated with endophytic fungi Tm36; Pm06: inoculated with endophytic fungi Pm06; Am04: inoculated with endophytic fungi Am04; Tm30: was inoculated with endophytic fungi Tm30; Tm02: was inoculated with endophytic fungi Tm02; D⁺: was a drought stress treatment, D⁻: was a non-drought stress treatment, the same later.

图 1 干旱胁迫下接种内生真菌对青贮玉米幼苗地上及地下部分影响

Fig.1 The morphology of aboveground part and underground part of silage maize seedling inoculated with endophytic fungi under drought stress

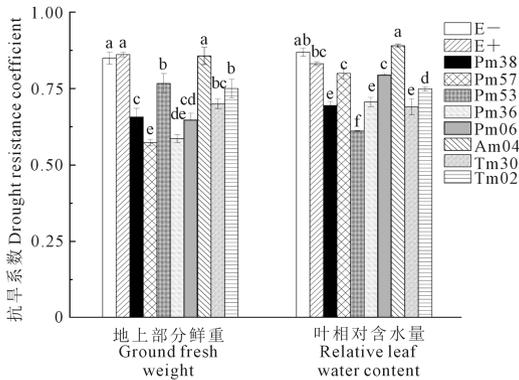
示,各处理地上部分鲜重抗旱系数在 0.6~0.8 之间,其中 E-、E+和菌株 Am04 处理最高,显著高于接种其它组,菌株 Pm57 处理最小,较 E-组降低了 30.59%;叶相对含水量抗旱系数也在 0.6~0.8 之间,其中 E-和菌株 Am04 最高,显著高于其他接种其它菌株,E+次之、菌株 Pm53 最小;叶绿素含量抗旱系数在 0.3~0.9 之间(图 3),其中菌株 Am04 和 Pm53 最高,显著高于其他组,菌株 Pm38 和 Tm30 最小。

2.2 接种内生真菌对青贮玉米幼苗根系抗旱性的影响

如图 1 所示青贮玉米幼苗地下部分根系,与非干旱胁迫相比,干旱胁迫后的青贮玉米幼苗植株根

系均出现不同程度的体积增大和根数增多现象。

根表面积、根体积、根鲜重、根干重和根干物质含量等 5 个指标在 E-的非干旱胁迫和干旱胁迫植株之间存在显著差异,且在大多数接种组中,干旱胁迫造成除根鲜重外的 4 个指标都比对应的非干旱胁迫植株高。因此,基于这 5 个指标所得的抗旱系数均大于 1.0(除根鲜重)。如图 4 所示,根体积抗旱系数在 1.5~5.5 之间,除菌株 Pm57 和 Pm53 外,其他菌株均显著高于 E-组,其中菌株 Tm36 最大,为 E-的 3.55 倍;根表面积抗旱系数在 1.2~2.5 之间,除菌株 Pm57 和 Pm53 小于 E-,菌株 Pm06 和 E-无差异外,其余菌株均显著大于 E-,其中菌株 Tm36



注:不同小写字母表示差异显著。下同。
Note: Different lowercase letters indicate significant difference. The same below.

图 2 接种内生真菌对青贮玉米幼苗地上部分鲜重抗旱系数及叶相对含水量抗旱系数的影响

Fig.2 Effects of endophytic fungi on the drought resistance coefficient of fresh weight and relative leaf water content of the aboveground part of silage maize seedlings inoculated with endophytic fungi

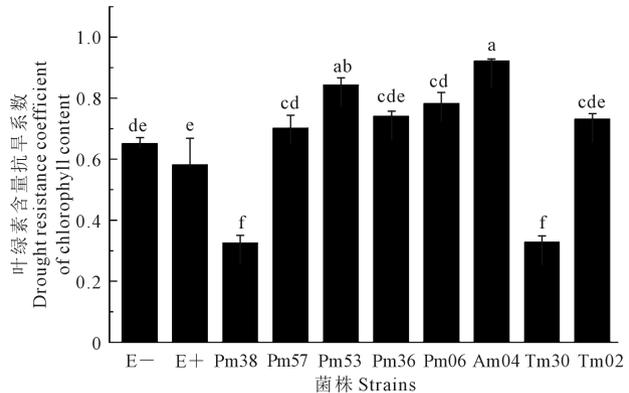


图 3 内生真菌对青贮玉米幼苗叶绿素含量抗旱系数的影响

Fig.3 Effect of endophytic fungi on the drought resistance coefficient of chlorophyll content of silage maize seedlings inoculated with endophytic fungi

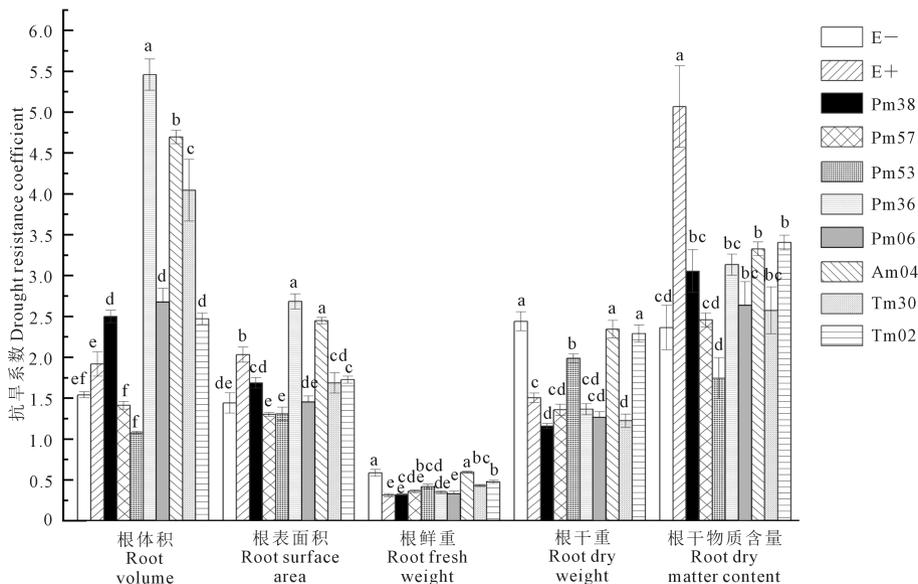


图 4 内生真菌对青贮玉米幼苗根系各指标抗旱系数的影响

Fig.4 Effect of endophytic fungi on every drought resistance coefficient of silage maize seedlings inoculated with endophytic fungi

和 Am04 较高;根鲜重抗旱系数在 0.3~0.6 之间,只有接种 Am04 与 E-组差异不显著,其余均显著低于 E-;根干重抗旱系数在 1.2~2.5 之间,其中 E-、菌株 Tm02 和 Am04 较高,菌株 Pm38 和 Tm30 较低;根干物质含量抗旱系数在 1.5~5.0 之间,除菌株 Pm53 外,其余组菌株均大于 E-组,其中 E+最大,菌株 Pm38、Tm36、Am04 和 Tm02 次之。

2.3 接种内生真菌对干旱胁迫下青贮玉米幼苗渗透调节物质和保护酶的影响

植物体内的脯氨酸(Pro)含量、膜脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量、保护酶超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性等指标,干旱胁迫处理和非干旱胁迫处理之间均存在差异显著,故以这 5 个指标为基础计算抗旱系数。

如图 5 所示,干旱胁迫造成植株体内渗透压调节物质 Pro 含量增加,因此其抗旱系数介于 1.0~4.0 之间,其中菌株 Tm02 最大,菌株 Pm38、Pm53 和 Tm30 低于 E-;干旱胁迫导致 MDA 含量增加或降低,其含量与植株抗旱性呈负相关关系,因此其抗旱系数介于-0.3~-5.0 之间,其中菌株 Pm53 最大,菌株 Pm57 最小;干旱胁迫导致 SOD、POD 和 CAT 等 3 种保护酶活性增高,因此导致其抗旱系数整体表现为大于 1.0。如图 6 所示,SOD 抗旱系数介于 1.0~6.0 之间,其中菌株 Tm02 最高,是 E-的 1.63 倍,其余菌株均低于 E-。POD 抗旱系数介于 0.5~2.0 之间,其中菌株 Pm57 和 Pm06 小于 1.0,其余菌株则大于 1.0,菌株 Pm57、Tm36、Am04 和 E-无显著差异,其余菌株均低于 E-;CAT 抗旱系数介于 0.5~

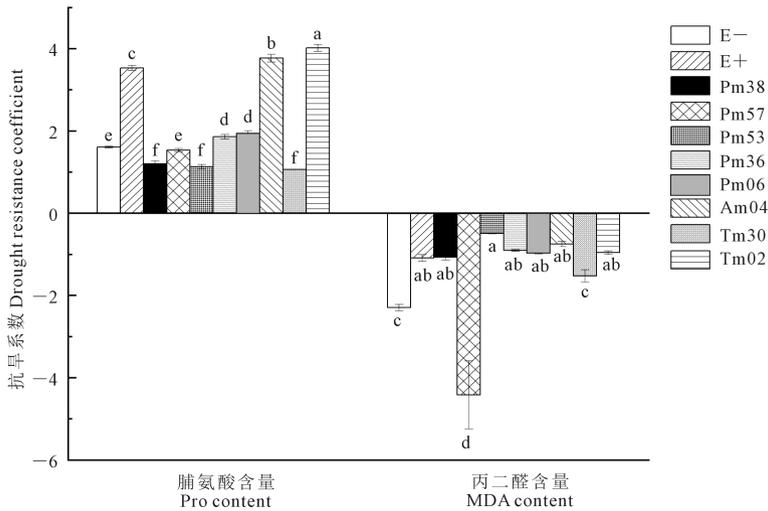


图 5 内生真菌对青贮玉米幼苗渗透调节物质抗旱系数的影响

Fig.5 Effect of endophytic fungi on the drought resistance coefficient of osmotic adjustment of silage maize seedlings inoculated with endophytic fungi

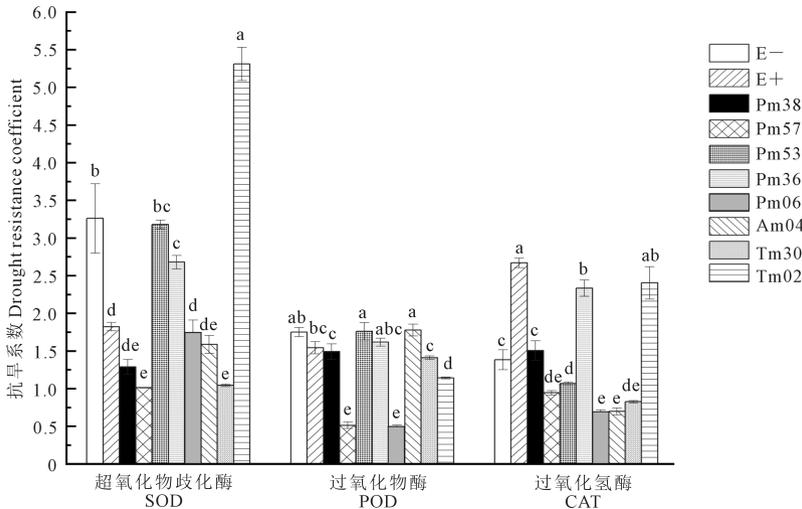


图 6 内生真菌对青贮玉米幼苗体内保护酶抗旱系数的影响

Fig.6 Effects of endophytic fungi on the drought resistance coefficient of protective enzymes of silage maize seedlings inoculated with endophytic fungi

2.5 之间,菌株 Pm57、Pm53、Pm06、Am04、Tm30 小于 1.0,其余菌株大于 1.0,菌株 E+、Tm36、Tm02 最高,分别为 E-的 1.93 倍、1.70 倍和 1.74 倍。

2.4 各指标抗旱性系数相关性分析

如表 1 所示,根干重抗旱系数和地上部分鲜重抗旱系数呈显著正相关;根鲜重抗旱系数与根干重抗旱系数呈显著正相关关系;根体积抗旱系数与根表面积抗旱系数呈极显著正相关关系;根干重抗旱系数与 SOD 活性呈显著正相关关系;CAT 活性抗旱系数和 Pro 含量抗旱系数均与根干物质含量抗旱系数呈显著正相关关系。

2.5 指标抗旱系数主成分分析

将 13 个指标抗旱系数进行主成分分析,前 5 个主成分的特征值均大于 1,因此提取出 5 个主成分(F1~F5),其贡献率分别为 32.812%、21.096%、14.049%、12.784%、9.589%,累计贡献率为 90.329%(表 2)。主成分载荷矩阵中青贮玉米幼苗植株各项

指标主成分负荷的相对大小可以表示该指标对主成分影响的程度。由表 2 可知,F1 的所有指标均起正向作用,其中根干重抗旱系数、地上部分鲜重抗旱系数和 Pro 含量抗旱系数对其正向作用较大;F2 的根表面积抗旱系数和根干物质含量抗旱系数正贡献较大,根鲜重抗旱系数和根干重抗旱系数负贡献较大;F3 的 MDA 含量抗旱系数和 POD 含量抗旱系数正贡献较大,相对含水量对其负向作用较大;F4 中根体积抗旱系数正贡献较大,CAT 活性抗旱系数和 SOD 活性抗旱系数负贡献较大;F5 中叶绿素含量抗旱系数和 SOD 活性抗旱系数正贡献较大,地上鲜重抗旱系数和 POD 活性抗旱系数负贡献较大。

根据各指标因子得分系数矩阵,构建 5 个主成分的函数表达式,随后根据每个主成分的贡献率计算综合得分,结果见表 3(见 53 页),与未接种菌株的 E-组相比,接种菌株 Am04、Tm36、Tm02 和 E+的青贮玉米幼苗植株综合得分均高于 E-,说明接种菌

表 1 各指标抗旱系数相关性

Table 1 Correlation analysis of various drought resistance coefficient

指标 Index	地上部分 鲜重 Ground fresh weight	叶相对 含水量 Relative leaf water content	叶绿素 含量 Chlorophyll content	根体积 Root volume	根表 面积 Root surface area	根鲜重 Root fresh weight	根干重 Root dry weight	根干物 质含量 Root dry matter content	Pro 含量 Pro content	MDA 含量 MDA content	CAT 活性 CAT activity	SOD 活性 SOD activity	POD 活性 POD activity
地上部分鲜重 Ground fresh weight	1.00												
叶相对含水量 Relative leaf water content	0.45	1.00											
叶绿素含量 Chlorophyll content	0.18	0.29	1.00										
根体积 Root volume	-0.18	0.03	0.03	1.00									
根表面积 Root surface area	0.09	0.19	0.17	0.84**	1.00								
根鲜重 Root fresh weight	0.61	0.44	0.35	0.10	0.07	1.00							
根干重 Root dry weight	0.71*	0.40	0.56	-0.15	0.03	0.87**	1.00						
根干物质含量 Root dry matter content	0.35	0.41	-0.13	0.19	0.54	-0.24	-0.08	1.00					
Pro 含量 Pro content	0.51	0.55	0.42	0.18	0.47	0.29	0.49	0.71*	1.00				
MDA 含量 MDA content	0.36	-0.30	0.12	0.36	0.43	0.03	0.14	0.22	0.28	1.00			
CAT 活性 CAT activity	0.13	-0.04	-0.11	0.03	0.41	-0.27	0.04	0.68*	0.45	0.22	1.00		
SOD 活性 SOD activity	0.27	-0.11	0.37	-0.17	-0.03	0.35	0.66*	-0.03	0.40	0.31	0.50	1.00	
POD 活性 POD activity	0.61	-0.10	-0.04	0.23	0.44	0.44	0.44	0.12	0.07	0.51	0.25	0.20	1.00

注: * 为 $P < 0.05$, ** 为 $P < 0.01$ 。

Note: * means $P < 0.05$, ** means $P < 0.01$.

表 2 各指标抗旱系数的主成分特征值、方差贡献率、累计贡献率和成分载荷矩阵

Table 2 Principal component eigenvalues, variance contribution rate, cumulative contribution rate and component loading matrix of drought resistance coefficient

各指标抗旱系数 Drought resistance coefficient of each index	主成分载荷值 Principal component variable				
	F1	F2	F3	F4	F5
地上部分鲜重 Fresh weight on the ground	0.779	-0.251	-0.001	-0.074	-0.503
叶相对含水量 Relative leaf water content	0.476	-0.164	-0.725	0.363	-0.154
叶绿素含量 Chlorophyll content	0.463	-0.353	-0.096	0.156	0.650
根体积 Root volume	0.223	0.581	0.255	0.646	0.247
根表面积 Root surface area	0.528	0.692	0.102	0.406	0.157
根鲜重 Root fresh weight	0.633	-0.597	0.140	0.354	-0.107
根干重 Root dry weight	0.793	-0.588	0.072	-0.046	0.048
根干物质含量 Root dry matter content	0.466	0.678	-0.478	-0.178	-0.227
Pro 含量 Pro content	0.799	0.195	-0.437	-0.080	0.187
MDA 含量 MDA content	0.462	0.361	0.585	-0.094	0.065
CAT 活性 CAT activity	0.400	0.561	-0.094	-0.628	0.041
SOD 活性 SOD activity	0.546	0.241	0.223	-0.588	0.402
POD 活性 POD activity	0.577	0.095	0.609	0.053	-0.440
主成分特征值 Principal component eigenvalues	4.266	2.742	1.826	1.662	1.247
成分贡献率/% Ingredient contribution rate	32.812	21.096	14.049	12.784	9.589
累计贡献率/% Cumulative contribution rate	32.812	53.908	67.956	80.740	90.329

株 Am04、Tm36、Tm02、印度梨形孢等 4 株内生真菌可提高青贮玉米幼苗抗旱性,并以菌株 Am04 最优;而接种菌株 Pm53、Tm30、Pm38、Pm06、Pm57 等 5 株内生真菌反而降低了青贮玉米幼苗抗旱性。

2.6 接种内生真菌系感染率与抗旱系数相关性

菌液灌根 20~25 d 后,将青贮玉米幼苗根系进行染色,显微观察内生真菌侵入植物根系共生情况,E-内未见根内菌丝,E+和其余菌株接种菌发现根内存在菌丝,菌丝呈蜿蜒状或直线型,可见分叉,具横隔,具有丝状真菌典型形态,接种菌株 Pm06 植株根内可见微菌核,其余菌株未见微菌核。

对各处理感染率进行方差分析,如图 7 所示,E-感染率为 0,接种 E+的在单个植株的平均根系侵

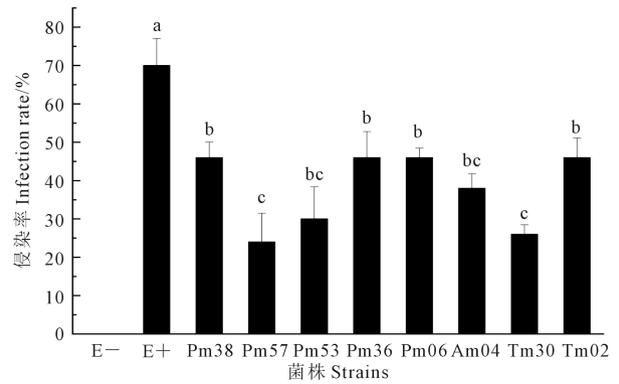


图 7 青贮玉米幼苗根系内生真菌感染率

Fig.7 Infection rate of endophytic fungi in the root system of silage maize seedlings

染率最高(70%),其余 8 株内生真菌在单个植株的平均感染率仅在 20%~50%之间,远低于 E+。

将感染率与各指标抗旱系数、抗旱系数主成分综合得分进行线性回归,只有根鲜重抗旱系数与感染率之间存在显著线性相关 ($R^2 = 0.346$, $P = 0.043$),其余各指标抗旱系数、抗旱系数主成分综合得分都与感染率之间均不存在显著线性相关关系(表 4,见 54 页)。

3 讨论

本研究采用主成分分析法综合分析接种 9 株内生真菌的青贮玉米幼苗在 PEG6000 模拟重度干旱胁迫下与非干旱胁迫植株有显著差异的 13 个指标,接种 Am04、Tm36、Tm02、印度梨形孢等 4 株内生真菌可提高青贮玉米幼苗抗旱性,而接种 Pm53、Tm30、Pm38、Pm06、Pm57 等 5 株内生真菌反而降低了青贮玉米幼苗抗旱性。接种印度梨形孢试验结果和徐乐等^[18]、Xu 等^[19]、张文英等^[31]报道的印度梨形孢提高玉米抗旱性一致,接种其它内生真菌的结果与胡美玲等^[32]报道的部分内生真菌能提高玉米抗旱性一致。

在大多数接种菌剂提高植物抗逆性试验中,除与禾草共生的 Epichloë 属内生真菌可以依靠检测种子带菌情况建立 E+和 E-植株外^[10-11],其它非专性共生内生真菌与宿主植物共生体的建立均需在建立在种子消毒建立 E-植株的基础上,人工回接建立 E+植株,然后再施以各种胁迫处理检测内生真菌对植物抗逆性影响,因此,试验中大多设置接菌+干旱处理组、未接菌+干旱处理组、未接菌+非干旱处理组。数据分析过程中,首先对未接菌+干旱处理组和未接菌+非干旱处理组各生理指标绝对值进行比较,确定干旱胁迫对植物产生了影响,然后各个接菌

表 3 不同处理青贮玉米幼苗的主成分得分、综合得分(F)及优良度排序

Table 3 Principal component score, comprehensive score (F) and goodness ranking of silage corn seedlings with different treatments

处理 Treatment	主成分得分 Principal component score					主成分综合得分 Principal component composite score	排名 Rank
	F1	F2	F3	F4	F5		
接种菌株 Am04 Inoculated with strain Am04	3.27	-0.30	-0.15	1.61	0.02	1.31	1
接种菌株 Tm36 Inoculated with strain Tm36	0.20	2.07	0.74	0.37	0.80	0.80	2
接种菌株 Tm02 Inoculated with strain Tm02	2.23	-0.23	-0.20	-1.17	0.67	0.63	3
E+ Inoculated with strain <i>Piriformospora indica</i>	1.59	1.69	-1.08	-0.83	-0.72	0.60	4
E- Not inoculated	1.36	-2.03	-0.02	-0.03	-0.61	-0.05	5
接种菌株 Pm53 Inoculated with strain Pm53	-0.39	-1.45	1.47	-0.71	0.14	-0.32	6
接种菌株 Tm30 Inoculated with strain Tm30	-1.77	0.42	0.71	0.59	-0.60	-0.41	7
接种菌株 Pm38 Inoculated with strain Pm38	-1.88	1.00	0.48	-0.28	-0.61	-0.47	8
接种菌株 Pm06 Inoculated with strain Pm06	-1.69	-0.20	-0.54	0.24	0.61	-0.64	9
接种菌株 Pm57 Inoculated with strain Pm57	-2.95	-0.98	-1.41	0.20	0.30	-1.45	10

+干旱处理组和未接菌+干旱处理组各生理指标绝对值比较,以及各个接菌+干旱处理组各生理指标绝对值之间比较,确定接菌对植物抗旱性有无影响以及各个菌株影响力大小^[12-19]。本研究中,在胁迫试验开始时,发现各接菌植株长势差异较大,其原因是为确保胁迫试验中的植株均与接种内生真菌共生,镜检发现内生真菌侵染植物根部存在差异,部分侵染较慢,此时有些内生真菌的促生作用已显现,因此导致各接菌植株长势差异很大。在胁迫试验结束后,直接比较各个接菌+干旱处理组和未接菌+干旱处理组,以及各个接菌+干旱处理(菌株组)之间各生理指标绝对值,以评价接种各种内生真菌菌株对植物抗旱性影响大小,显然不合理。因此,本试验参考朱志明等^[28]和朴明鑫等^[29]方法,避免接种各内生真菌的植株胁迫试验前的长势本底差异对胁迫后各生理指标的影响,采用抗旱系数,即同一接菌处理组的干旱胁迫值/非干旱胁迫值来度量植株抗旱性,比较各生理指标绝对值更能准确反映植物抗旱能力的大小,抗旱系数越大代表植株抗旱性越强,这样抗旱系数不同真正代表接种内生真菌不同。

当接菌植株受到干旱胁迫后,根表面积抗旱系

数、根体积抗旱系数、根干重抗旱系数、根干物质含量抗旱系数、Pro 含量抗旱系数、CAT 活性抗旱系数、SOD 活性抗旱系数和 POD 活性抗旱系数等指标抗旱系数大于 1,说明胁迫造成这些指标绝对值增高;而地上部分鲜重抗旱系数、叶相对含水量抗旱系数、叶绿素含量抗旱系数、根鲜重抗旱系数和 MDA 含量抗旱系数等指标抗旱系数小于 1,说明胁迫导致这些指标绝对值降低,并且同一指标抗旱系数在不同接菌处理间的变化幅度存在差异,鉴于采用各抗旱系数之间比较,很难获得统一结论,其原因是植物的抗旱性是一个复杂综合能力,是多因素共同作用的结果,在不同的生理指标上体现出的变化幅度并不相同,采用某单一指标未必能够直观、准确地评价其抗旱性。为了弥补单一指标评价的不足,本试验参考朱志明等^[28]和朱娟娟等^[30]方法,以 13 个指标抗旱系数为基础,采用主成分分析法综合评价抗旱性更客观、科学。

内生真菌侵染植物并与植物建立共生体,影响植物生长、发育和次生代谢产物积累,以往的研究中很少有检测内生真菌与植物是否形成共生体的报道,并未证明接种的内生真菌是否真正在植物体

表 4 侵染率与各指标抗旱系数及主成分综合得分线性回归分析

Table 4 Linear regression analysis diagram of infection rate, drought resistance coefficient of each index and principal component comprehensive score

指标 Index	线性拟合 Linear fitting	
	R^2	P
地上部分鲜重抗旱系数 Drought resistance coefficient of fresh weight on the ground	0.027	0.647
叶相对含水量抗旱系数 Drought resistance coefficient of relative leaf water content	0.035	0.604
叶绿素含量抗旱系数 Drought resistance coefficient of chlorophyll content	-0.125	0.647
根体积抗旱系数 Drought resistance coefficient of root volume	0.065	0.477
根表面积抗旱系数 Drought resistance coefficient of root surface area	0.157	0.257
根鲜重抗旱系数 Drought resistance coefficient of root fresh weight	0.346	0.043
根干重抗旱系数 Drought resistance coefficient of root dry weight	0.211	0.182
根干物质含量抗旱系数 Drought resistance coefficient of root dry matter content	0.392	0.053
Pro 含量抗旱系数 Drought resistance coefficient of Pro content	0.175	0.229
MDA 含量抗旱系数 Drought resistance coefficient of MDA content	0.210	0.183
CAT 活性抗旱系数 Drought resistance coefficient of CAT activity	0.146	0.276
POD 活性抗旱系数 Drought resistance coefficient of POD activity	0.038	0.589
SOD 活性抗旱系数 Drought resistance coefficient of SOD activity	0.015	0.737
主成分综合得分 Principal component composite score	0.156	0.259

内“内生”，尤其在接种异源植物的研究中更是如此。本试验通过染色镜检，发现印度梨形孢在单个青贮玉米幼苗植株的平均侵染率高达 70%，另外 8 株内生真菌对单个青贮玉米幼苗植株的平均侵染率仅在 20%~50% 之间。用侵染率与各指标抗旱系数、抗旱系数主成分分析综合得分进行线性回归分析，表明只有根鲜重抗旱系数与侵染率之间存在显著线性关系 ($P < 0.05$)，说明共生成功只是内生真

菌影响植物的前提条件，内生真菌在植物体内的生物量、菌株刺激植物的机制、植物应答内生真菌的机制等都可能影响内生真菌对植物的效应。

植物面对胁迫时，会从各个方面对胁迫做出响应，本试验选取在未接菌 (E-) 组的非干旱胁迫和干旱胁迫植株之间差异显著的地上部分鲜重、叶相对含水量、叶绿素含量、根体积、根表面积、根鲜重、根干重、根干物质含量、Pro 含量、MDA 含量、CAT 活性、SOD 活性、POD 活性等 13 个生理指标进行考察，发现虽然接种 Am04、Tm36、Tm02、印度梨形孢等 4 株内生真菌可提高青贮玉米幼苗抗旱性，但各菌株对这些指标的影响存在较大差异。菌株 Am04 可显著降低地上部鲜重的损失，增加叶片的保水性、玉米植株根体积与根表面积、根系保水性和干物质累积；同时提高植株体内过氧化物酶活性，增加脯氨酸和叶绿素含量，并且能显著降低丙二醛含量，最大化减少植株受干旱胁迫的损伤。菌株 Tm36 可显著增加根系体积与表面积，显著降低青贮玉米幼苗体内丙二醛的累积；菌株 Tm02 可增加根系干物质的累积，显著提高过氧化氢酶活性，增加脯氨酸含量降低丙二醛的积累；印度梨形孢可以影响地上部鲜重和根干物质含量，还可以显著增加脯氨酸含量并显著降低丙二醛含量。以上分析可以看出菌株 Am04 帮助植株对干旱胁迫的响应是从形态到生理生化多方面的，而其余 3 种菌株则更侧重于抗氧化系统的酶活性和细胞渗透物质的调节。

4 结 论

用内生真菌模式种印度梨形孢和分离自荒漠强旱生植物根系的 8 株内生真菌接种青贮玉米幼苗，所有菌株均能侵入青贮玉米幼苗根系形成共生，但侵染率存在差异，且侵染率和大多数抗旱性生理指标之间无相关性；基于 13 个生理指标进行主成分分析，表明只有 Am04、Tm36、Tm02、印度梨形孢等 4 株内生真菌可提高青贮玉米幼苗抗旱性，并以菌株 Am04 最优；而 Pm53、Tm30、Pm38、Pm06、Pm57 等 5 株内生真菌并未提高青贮玉米幼苗抗旱性。

参 考 文 献:

- [1] SOVANNAKA S. 基于不同标准化指标的农业干旱时空分析及影响评估 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
SOVANNAKA S. Spatiotemporal analysis and impacts assessment of agricultural drought based on different standardized indices [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2019.
- [2] HU W G, RAN J Z, DONG L W, et al. Aridity-driven shift in biodiversity-soil multifunctionality relationships [J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 5350.

- [3] LI C J, FU B J, WANG S, et al. Drivers and impacts of changes in China's drylands[J]. *Nature Reviews Earth & Environment*, 2021, 2(12): 858-873.
- [4] DE VRIES F T, GRIFFITHS R I, KNIGHT C G, et al. Harnessing rhizosphere microbiomes for drought-resilient crop production[J]. *Science*, 2020, 368(6488): 270-274.
- [5] FINKEL O M, SALAS-GONZÁLEZ I, CASTRILLO G, et al. A single bacterial genus maintains root growth in a complex microbiome[J]. *Nature*, 2020, 587(7832): 103-108.
- [6] XU L, COLEMAN-DERR D. Causes and Consequences of a conserved bacterial root microbiome response to drought stress[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2019, 49: 1-6.
- [7] 陈世苹,高玉葆.内生真菌与禾本科植物之间的关系及其生态学意义[J]. *生态学杂志*, 2000, 19(5): 52-57.
CHEN S P, GAO Y B. Grass-endophyte interactions and their ecological significance[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2000, 19(5): 52-57.
- [8] 李春杰,姚祥,南志标.醉马草内生真菌共生体研究进展[J]. *植物生态学报*, 2018, 42(8): 793-805.
LI C J, YAO X, NAN Z B. Advances in research of *Achnatherum inebrians-Epichloë* endophyte symbionts[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2018, 42(8): 793-805.
- [9] 王志伟,陈永敢,王庆臻,等.中国植物内生微生物研究的发展和展望[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(3): 482-496.
WANG Z W, CHEN Y G, WANG Q C, et al. Progresses and perspectives of studies on plant endophytic microbes in China[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(3): 482-496.
- [10] 李飞.内生真菌对醉马草抗旱性影响的研究[D].兰州:兰州大学, 2007.
LI F. Effects of endophyte infection on drought resistance to drunken horse grass (*Achnatherum inebrians*) [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2007.
- [11] 夏超.醉马草—内生真菌共生体对干旱胁迫的响应[D].兰州:兰州大学, 2018.
XIA C. Responses of *Epichloë gansuensis-Achnatherum inebrians* symbiont to drought stress[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2018.
- [12] 张雪.油蒿深色有隔内生真菌物种多样性和促生抗旱研究[D].保定:河北大学, 2020.
ZHANG X. Species diversity, promotion of growth and drought resistance of dark septate endophytes in *Artemisia ordosica* [D]. Baoding: Hebei University, 2020.
- [13] 任颖.深色有隔内生真菌和绿色木霉对黄芪促生抗旱研究[D].保定:河北大学, 2019.
REN Y. Effect of dark septate endophyte and *Trichoderma viride* on the growth and drought resistance of *Astragalus membranaceus* [D]. Baoding: Hebei University, 2019.
- [14] HE C, WANG W Q, HOU J L. Plant growth and soil microbial impacts of enhancing licorice with inoculating dark septate endophytes under drought stress[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2277.
- [15] LIU Y, WEI X L. Dark septate endophyte improves the drought-stress resistance of *Ormosia hosiei* seedlings by altering leaf morphology and photosynthetic characteristics[J]. *Plant Ecology*, 2021, 222(7): 761-771.
- [16] 蒿若超,张文英, OELMÜLLER R. 印度梨形孢真菌诱导提高花生抗旱性研究初报[J]. *干旱地区农业研究*, 2013, 31(2): 182-185, 195.
HAO R C, ZHANG W Y, OELMÜLLER R. Preliminary study on conferring drought tolerance of peanut by *Piriformospora indica* fungi[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2013, 31(2): 182-185, 195.
- [17] 韦巧,武美燕,张文英,等.内生真菌印度梨形孢对旱稻苗期生长及抗旱性的影响[J]. *生态学杂志*, 2018, 37(9): 2642-2648.
WEI Q, WU M Y, ZHANG W Y, et al. Effect of the endophytic fungus *Piriformospora indica* on the growth and drought tolerance of rice seedling under drought stress[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2018, 37(9): 2642-2648.
- [18] 徐乐,汪媛媛,叶开温,等.ABA和NO在印度梨形孢提高玉米苗期抗旱性的作用[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(9): 2939-2947.
XU L, WANG A A, YE K W, et al. Effect of ABA and NO on improving drought tolerance of *Zea mays* L. at seedling stage by *Piriformospora indica* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(9): 2939-2947.
- [19] XU L, WANG A A, WANG J, et al. *Piriformospora indica* confers drought tolerance on *Zea mays* L. through enhancement of antioxidant activity and expression of drought-related genes [J]. *The Crop Journal*, 2017, 5(3): 251-258.
- [20] 王迎春.内蒙古西鄂尔多斯古老残遗物种生活史适应机制的比较研究[D].呼和浩特:内蒙古大学, 2000.
WANG Y C. A comparative study on life history strategies of ancient relic species in West Erdos Region [D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2000.
- [21] 侯湃,陈彩锦,张静妮,等.宁夏固原地区不同青贮玉米品种生产性能及营养品质研究[J]. *草地学报*, 2021, 29(10): 2346-2354.
HOU P, CHEN C J, ZHANG J N, et al. Study on production performance and nutritional quality of different silage maize in Guyuan area of Ningxia[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2021, 29(10): 2346-2354.
- [22] 王超,李刚,谢越盛,等.植物根围促生细菌菌剂增强玉米干旱耐受性研究[J]. *干旱地区农业研究*, 2018, 36(1): 126-132, 185.
WANG C, LI G, XIE Y S, et al. Enhanced drought tolerance in maize conferred by a consortium of plant growth-promoting rhizobacterium strains[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2018, 36(1): 126-132, 185.
- [23] 黄倩,赵永国,徐劲松,等.油菜苗期抗旱性鉴定及抗旱指标评价[J]. *干旱地区农业研究*, 2021, 39(3): 9-17.
HUANG Q, ZHAO Y G, XU J S, et al. Assessment of drought tolerance of rapeseed seedling and the evaluation of drought indexes[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2021, 39(3): 9-17.
- [24] 郝建军,康宗利,于洋.植物生理学实验技术[M].北京:化学工业出版社, 2007: 68-72.
HAO J J, KANG Z L, YU Y. *Plant physiology experimental technology* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 68-72.
- [25] 陈鹏狮,纪瑞鹏,谢艳兵,等.东北春玉米不同发育期干旱胁迫对根系生长的影响[J]. *干旱地区农业研究*, 2018, 36(1): 156-163.
CHEN P S, JI R P, XIE Y B, et al. Effects of drought stresses during key growth periods on root growth of spring maize in Northeast China[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2018, 36(1): 156-163.