

不同 pH 砖红壤浸提液和内生真菌 对黑麦草幼苗生长生理的影响

陈振江, 刘 静, 魏学凯, 田 沛, 曹 莹, 周景乐, 李春杰*

(草地农业生态系统国家重点实验室, 兰州大学 草地农业科技学院 兰州 730020)

摘 要:以带内生真菌 (E^+) 和不带内生真菌 (E^-) 的多年生黑麦草 (*Lolium perenne*) 种子为材料, 采用室内种子萌发实验, 分析多年生黑麦草在不同 pH (4.47~6.12) 砖红壤浸提液中种子萌发、幼苗形态指标及生理指标的变化, 探讨内生真菌对酸性环境中多年生黑麦草幼苗生长和生理特性的影响。结果表明: (1) 在相同带菌情况下 (内生真菌侵染 E^+ 或未侵染 E^-), 随着砖红壤浸提液 pH 值的降低 (浸提液酸性的增强), E^+ 和 E^- 种子发芽率、发芽势、发芽指数、活力指数、胚芽长、胚根长、胚芽鲜重和胚芽干重均表现为逐渐下降的趋势, 且 5 个砖红壤浸提液处理均显著低于相应对照 (CK, pH 6.12); 幼苗脯氨酸含量、超氧化物歧化酶活性、过氧化物酶活性和丙二醛含量呈上升趋势, 且 5 个砖红壤浸提液处理均显著高于相应 CK。 (2) 除 CK 外, 在相同 pH 砖红壤浸提液处理下, 内生真菌侵染显著提高了多年生黑麦草的发芽率、胚芽长、鲜重和干重等形态指标及脯氨酸含量和超氧化物歧化酶活性, 却显著降低了过氧化物酶活性和丙二醛含量; 在砖红壤浸提液 pH 为 4.47~6.12 时, E^+ 萌发种子胚根长与 E^- 之间无显著差异。研究发现, 不同 pH 砖红壤浸提液对 E^+ 和 E^- 种子萌发、生长和生理有一定的影响, 内生真菌的侵染可促进宿主植物的生长, 同时对砖红壤浸提液 pH 值具有较宽的适应范围, 可将多年生黑麦草内生真菌共生体应用于酸性土壤改良。

关键词: 多年生黑麦草; 内生真菌; 砖红壤浸提液; pH; 生长生理特性

中图分类号: Q945.79

文献标志码: A

Effects of Latosols Extracts with Different pH and Endophytic Fungi on Growth and Physiology of *Lolium perenne* Seedling

CHEN Zhenjiang, LIU Jing, WEI Xuekai, TIAN Pei, CAO Ying, ZHOU Jingle, LI Chunjie*

(State Key Laboratory of Grassland Agro-ecosystems, College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou 730020, China)

Abstract: This study was conducted to investigate changes of seed germination, seedling morphological and physiological indexes of endophyte-infected (E^+) and endophyte-free (E^-) perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in latosols extracts solution with different pH (4.47–6.12) by using the laboratory germination experiment, to analyze the effect of the endophytic fungi on seedling growth and physiological characteristics of ryegrass in an acidic environment. The result showed that: (1) in the same endophyte infection [endophyte-infected (E^+) or endophyte-free (E^-)] of case, the germination rate, germination energy, germination index, vigor index of seeds, shoot length, root length, fresh weight and dry weight of seedling

收稿日期: 2017-02-21; 修改稿收到日期: 2017-06-15

基金项目: 国家“973”项目 (2014CB138702); 国家自然科学基金项目 (31372366); 教育部创新团队发展计划项目 (IRT13019)

作者简介: 陈振江, 硕士, 主要从事禾草内生真菌共生体研究。E-mail: chenzz15@163.com

* 通信作者: 李春杰 (1968–), 男, 教授, 博士, 主要从事禾草内生真菌共生体研究。E-mail: chunjie@lzu.edu.cn.

showed a decreasing trend with the decrease of latosols extracts solution pH value (the acidity of the extracts is enhanced), and the treatments of five latosols extracts solution were significantly lower than that of CK (pH, 6.12) ($P < 0.05$); proline content, superoxide dismutase activity (SOD), peroxidase activity (POD), and malondialdehyde content (MDA) of ryegrass had minimum value under pH 6.12, and were significantly lower ($P < 0.05$) than that of other five treatments of latosols extracts solution. (2) In addition to the control (CK), endophyte-infection significantly ($P < 0.05$) improved germination rate, germination energy, germination index, vigor index, shoot length, fresh weight, dry weight, proline content and SOD activity, and decreased the POD activity and MDA content under pH 4.47–5.01. In the acid latosols extracts solution, the root length of perennial ryegrass that endophyte-infected (E^+) had no significant difference ($P > 0.05$) with endophyte-free (E^-) when the acid latosols extracts solution pH 4.47–6.12. The results showed that the effects of latosols extracts solution with different pH on seed germination, growth and physiology of endophyte-infected (E^+) and endophyte-free (E^-), and endophytic fungi improved the growth and adaptive capacity of host in wider pH of latosol extraction. The symbiont of perennial ryegrass-endophytic fungi can be used for improving acid soil.

Key words: perennial ryegrass; endophyte; latosols extracts; pH; growth and physiological characteristics

酸碱度是土壤重要的化学性质之一。土壤 pH 值的高低不仅直接影响着土壤中大量和微量元素的离子形态和有效性,而且还影响着土壤微生物的活性,以及矿物质和有机质的分解,进而影响土壤营养元素的释放、固定和迁移等,也会使重金属元素释放有毒物质毒害植物根系,影响植物生长。当 pH 低于一定程度时,土壤缓冲体系将会失去缓冲作用,导致土壤酸化加速^[1-2]。目前施用石灰等其他碱性物质是一项改良土壤酸化的传统措施,可以提高土壤 pH 值,但长期施用石灰等会导致土壤养分失衡,同时存在复酸化过程,即土壤会因石灰等物质的碱性消耗后再次发生酸化,而且酸化程度会比施用前有所加剧^[3]。施用过多会导致土壤碱化;施用量不足,因 Ca^{2+} 的移动性较差对底层土壤的酸度影响不大^[2]。

多年生黑麦草 (*Lolium perenne*) 为禾本科 (Poaceae) 黑麦草属植物,其具有生长速度快、须根发达、适应性强、耐盐碱、增加土壤有机质和改善土壤结构等优点,同时常与 *Epichloë festuca* var. *Lolii* 内生真菌构成共生关系^[4-5]。禾草内生真菌 (grass endophyte) 是指在禾草体内度过大部分或者全部生命周期,但却不会引起禾草外部显示任何病害症状的一大类真菌^[6]。内生真菌与禾草之间形成互利共生的关系^[7],其形成的共生体提高了宿主的抗旱^[8-9]、抗寒^[10]、抗病^[11-12]、抗虫^[13]、耐盐^[14]、耐涝^[15]、耐重金属^[16]等能力,同时禾草为内生真菌的生长提供充足的养分和良好的生存环境及其繁殖载体^[17]。

目前关于内生真菌与 pH 的研究主要集中在醉

马草、中华羊茅和野大麦上,同时这些研究都是在人工控制条件下通过 NaOH 溶液和 HCl 溶液或 H_2SO_4 溶液配成不同 pH 值研究酸碱度和内生真菌对宿主禾草的影响^[18-19],与实际土壤的理化性质相差很大。而对于酸碱度和内生真菌在人工模拟或自然条件下对禾草生长及生理的影响目前尚无报道,因此本试验选择多年生黑麦草‘顶峰’ (Pinnacle) 为试验材料,探讨多年生黑麦草种子在不同 pH 砖红壤土壤浸提液处理条件下形态指标和生理指标的变化,同时探讨被内生真菌侵染 (E^+) 和未被内生真菌侵染 (E^-) 的黑麦草种子形态指标和生理指标之间的差异。为进一步开展禾草内生真菌共生体抗逆性研究和生物措施改良酸性土壤提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

黑麦草品种‘顶峰’ (Pinnacle) 种子从百绿公司购进,该品种香柱菌属 (*Epichloë*) 内生真菌带菌率高达 95%^[20],2013 年穴播于兰州大学草地农业科技学院榆中试验地,成熟时单株收获种子并检测是否带菌;2014 年将被内生真菌侵染 (E^+) 种子和未被侵染 (E^-) 种子分开种植,成熟时从 E^+ 和 E^- 种植带采收种子并检测是否带菌,并参照李春杰等^[21]的方法检测种子带菌率,结果 E^+ 植株种子带菌率达 98%, E^- 植株种子带菌率为 2%。采收种子 5℃ 下保存于农业部牧草与草坪草种子质量监督检验测试中心 (兰州) 贮藏室,备用。试验土壤取自海南省儋州市中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所

十队基地典型的砖红壤,在阴凉处风干后,储存备用。

1.2 土壤浸提液的提取

酸性土壤 pH 值的测定常用土液比为 1 : 2.5,该研究所试验基地的砖红壤 pH 值为 4.59,常用的土液比有 1 : 1、1 : 2.5 和 1 : 5 几种^[22-24]。根据实际砖红壤 pH 值和常用的土液比,本试验在此基础上做了一定程度的调整共设置了 1 : 1、1 : 3、1 : 5、1 : 7、1 : 10 等 5 个土液比。将风干的砖红壤土样过 1 mm 筛,按 1 : 1、1 : 3、1 : 5、1 : 7、1 : 10 的土液质量比混合均匀,经 5 000 ×1 离心 20 min,取其上清液,分别得到各土液比的浸提液。用 pH 211 HANNA 数字酸度计(北京哈纳科技有限公司)测定各浸提液的 pH 值,分别为 4.47、4.58、4.73、4.85 和 5.01,以蒸馏水处理作对照,pH=6.12。共计 6 个 pH 值处理。

1.3 种子发芽试验

按照国际种子检验协会 (ISTA) 种子检验规程^[25],采用纸上发芽(TP)法,取直径 12 cm 的灭菌培养皿,平铺 2 层灭菌定性滤纸作为芽床。并各取 5 mL 浸提液浸湿芽床。挑选饱满、均匀的黑麦草 E⁺、E⁻ 种子各 100 粒,用 75% 乙醇表面消毒 6 min,蒸馏水冲洗 3 次后放入芽床,每个处理 5 次重复,用封口膜(4"×125 FT/Roll)密封,保持芽床 pH 稳定。然后将培养皿置于人工变温光照培养箱(温度为 25 ℃/15 ℃日/夜;光周期为 16 h/8 h 光/暗;光照度为 5 000 lx)中培养。试验期间和结束后检测相关萌发和生理指标。

1.4 萌发指标测定

试验期间每天记录发芽种子数(以胚根突破种皮作为萌发标准),14 d 后多年生黑麦草种子发芽结束,统计其发芽数、计算发芽率、发芽势、发芽指数和活力指数及测定胚芽长、胚根长、胚芽、胚根鲜重和干重。多年生黑麦草幼苗的胚芽长、胚根长采用测量法:发芽结束后随机挑选 10 株用直尺测量其长度,求平均值;幼苗胚芽和胚根鲜重、干重的测定采用称量法:用电子天平称量采集的鲜活植物的重量即为鲜重;在 80 ℃的烘箱中烘 24 h 后的重量即为干重。

发芽率(%) = $n/N \times 100\%$

发芽势(%) = G_{pt}/N

发芽指数 = $\sum(G_t/D_t)$

活力指数(VI) = 发芽指数 × 根鲜重

式中, n 为正常发芽粒数, N 为供试种子总数, G_{pt} 为达到日高峰时的发芽数, G_t 为不同时间 t 的

发芽种子数量, D_t 为发芽试验天数。

1.5 生理指标测定

多年生黑麦草种子在发芽室发芽结束后,将挑选的不同处理下幼嫩的叶包在锡箔纸内置于液氮中,带回实验室储存在 -80 ℃ 冰箱中待用。

1.5.1 游离脯氨酸含量 采用磺基水杨酸-酸性印三酮法提取和测定游离脯氨酸 (Pro) 的含量^[26]。称取样品(新鲜叶片) 0.1 g,用蒸馏水洗净后剪碎放入试管中,加入 3% 的磺基水杨酸 5 mL,在沸水浴中提取 20 min,冷却后离心 15 min,上清液即为脯氨酸提取液。取 2 mL 提取液加入 2 mL 冰醋酸和 2 mL 酸性茚三酮试剂,在沸水浴中加热显色 30 min,待冷却后,加入 5 mL 甲苯进行萃取,静置片刻后取上层液用分光光度计测定在 520 nm 下的吸光值,每样品重复 4 次。并按如下公式计算脯氨酸 (Pro) 含量:

$$\text{Pro}(\mu\text{g/g}) = c \times V / A \times W$$

式中, c 为提取液中脯氨酸浓度 (μg),有标准曲线求得, V 为提取液总体积 (mL), A 为测定时吸取的体积 (mL), W 为样品重 (g)。

1.5.2 丙二醛含量 采用硫代巴比妥酸比色法测定丙二醛 (MAD) 的含量^[27]。称取新鲜植物叶片 0.1 g,加入 5% 的 TCA 5 mL,将研磨后所得的匀浆离心 10 min。取上清液 2 mL,加 0.67% 硫代巴比妥酸 2 mL,混合后在沸水浴中煮沸 30 min,冷却后离心。取上清液分别在 450、532 和 600 nm 波长处测定吸光度值 OD_{450} 、 OD_{532} 和 OD_{600} 。并按如下公式计算 MAD 的含量 (C , nmol/L):

$$C = 6.45 \times (OD_{532} - OD_{600}) - 0.56 \times OD_{450}$$

1.5.3 超氧化物歧化酶活性 采用核黄素-NBT 法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性^[28]。取新鲜叶片 0.1 g 洗净剪碎后置于预冷的研钵中,加入预冷的磷酸缓冲液 (pH 7.8) 在冰浴上研磨成浆(石英砂应少量且同量),在 4 ℃、10 000 r/min 下离心 20 min,上清液即为粗酶液。试验组加入 0.05 mL 粗酶液和 3.2 mL 混合液,对照为 3.2 mL 的混合液,重复 3 次。将 1 支对照管置于暗处,其他各管光照 15 min (将试管置于 4 000 lx 光照培养箱中)至反应结束后,以不照光的对照作空白,迅速在 560 nm 下比色测定吸光度值 (A_{CK} 、 A_E)。用下列公式计算酶活性:

$$\text{SOD 总活性}(U \cdot g^{-1}) = (A_{CK} - A_E) \times V / (0.5 \times A_{CK} \times W \times V_t)$$

式中, V 为总粗酶液量 (mL), V_t 为测定时吸

取的酶液量 (mL), W 为样品重 (g)。

1.5.4 过氧化物酶活性 过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚法测定^[29]。分别称取叶片 0.1 g,加 5 mL KH_2PO_3 缓冲液($\text{pH} = 6.0$),在冰浴中研磨后离心 10 min,上清液即为酶提取液。取酶液 1 mL 加入愈创木酚反应液 3 mL,立刻于波长 470 nm 下分别读取叶的 OD 值(A_{470}),隔 30 s 读 1 次,共读 4 次。酶活性以反应速度表示,即每克材料(鲜重)单位时间内吸光度变化值($\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)。

1.6 数据统计分析

试验数据用 Excel 2003 录入制图,采用 SPSS 17.0 软件进行差异显著性分析和相关性分析。

2 结果与分析

2.1 不同 pH 砖红壤浸提液中内生真菌对多年生黑麦草种子萌发的影响

表 1 显示,在相同带菌情况下(内生真菌侵染 E^+ 或未侵染 E^-),随着砖红壤浸提液 pH 值的降低(浸提液酸性的增强),多年生黑麦草种子发芽率、发芽势、发芽指数和活力指数均表现为逐渐下降的趋势,并且 5 个砖红壤浸提液处理均显著低于相应对照(CK,pH 6.12)($P < 0.05$)。在相同 pH 砖红壤浸提液处理下, E^+ 多年生黑麦草种子的发芽率、发芽势、发芽指数和活力指数均高于相应 E^- 种子,且除对照(CK)外 E^+ 和 E^- 之间差异均达到显著水平

($P < 0.05$)。其中,在 $\text{pH} \leq 4.73$ 时, E^- 种子发芽率均低于 50%,而 E^+ 种子发芽率均大于 60%, E^+ 种子发芽率比相应 E^- 分别高出 19.5%、18.75% 和 18.0%。以上结果说明内生真菌在酸胁迫环境下可以显著促进多年生黑麦草的萌发,同时提高了酸逆境下种子活力,增强其对酸胁迫的抵抗力。

2.2 不同 pH 砖红壤浸提液中内生真菌对多年生黑麦草幼苗生长的影响

表 2 显示,在相同带菌情况下(内生真菌侵染 E^+ 或未侵染 E^-),随着砖红壤浸提液 pH 值的降低(浸提液酸性增强), E^+ 和 E^- 萌发种子胚芽长、胚根长、胚芽鲜重和胚芽干重均表现为逐渐下降的趋势,并且 5 个砖红壤浸提液处理均显著低于相应对照(CK,pH 6.12)($P < 0.05$);除 CK 外,其余 4 个处理的 E^+ 和 E^- 胚根长均显著低于 pH 5.01 处理($P < 0.05$)。在相同 pH 砖红壤浸提液处理下, E^+ 多年生黑麦草种子的胚芽长、胚芽鲜重和胚芽干重均高于相应 E^- 种子,且除 CK 外 E^+ 和 E^- 之间差异均达到显著水平($P < 0.05$)。而在 $\text{pH} \leq 6.12$ 时, E^+ 和 E^- 胚根长之间无显著差异($P > 0.05$)。上述结果说明内生真菌的侵染能够明显缓解酸胁迫对多年生黑麦草幼苗生长带来的不利影响。

2.3 不同 pH 砖红壤浸提液中内生真菌对多年生黑麦草脯氨酸含量的影响

由图 1 可知,在相同带菌情况下,随着砖红壤

表 1 不同 pH 砖红壤浸提液中 E^+ 和 E^- 多年生黑麦草种子的萌发情况

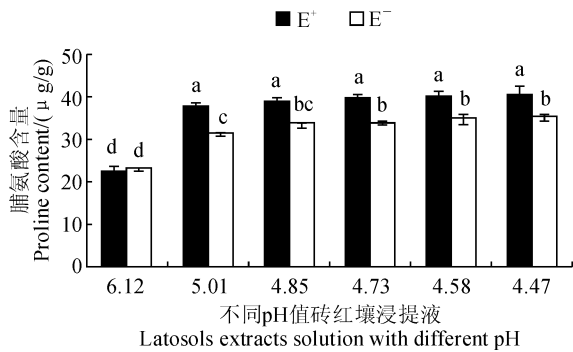
Table 1 Seed germination of perennial ryegrass of endophyte-infected (E^+) and endophyte-free (E^-) in latosols extracts solution with different pH						
处理 Treatment	pH	带菌情况 Endophytic status	发芽率 Germination rate/%	发芽势 Germination energy/%	发芽指数 Germination index	活力指数 Vigor index
CK	6.12	E^+	86.00±4.68a	46.75±2.59a	25.09±0.63a	225.70±0.38a
		E^-	81.50±3.70ab	45.50±1.08a	23.30±0.35ab	219.47±0.07a
1:10	5.01	E^+	72.15±2.89bc	38.00±1.87b	21.32±0.76c	187.11±0.45b
		E^-	60.75±2.37defg	28.25±0.96cde	16.46±0.33g	147.25±0.26f
1:7	4.85	E^+	71.00±2.31bcd	37.25±1.87b	17.00±0.31d	149.69±0.07c
		E^-	52.25±6.40egh	26.00±2.53cde	12.37±0.24h	106.04±0.17g
1:5	4.73	E^+	68.75±2.86bcd	35.50±0.89bc	16.47±0.41de	143.13±0.19cd
		E^-	49.75±2.29fg	24.50±1.63de	11.50±0.30h	97.80±0.10g
1:3	4.58	E^+	64.25±2.40cde	24.00±1.02bc	15.94±0.34ef	132.33±0.20de
		E^-	45.50±3.92gh	22.75±2.18de	10.12±0.27j	84.22±0.10gh
1:1	4.47	E^+	62.50±2.39def	29.75±1.93bcd	15.24±0.48fg	110.81±0.23e
		E^-	43.00±1.08h	21.25±2.27f	9.81±0.19j	79.57±0.09h

注:同列不同字母表示表示处理间在 0.05 水平存在显著性差异;表 2 同
Note:The different normal letters within the same column indicate significant difference among treatments at 0.05 level;The same as Table 2

表 2 不同 pH 砖红壤浸提液中 E⁺ 和 E⁻ 多年生黑麦草幼苗的生长情况

Table 2 Seedlings growth of perennial ryegrass of endophyte-infected (E⁺) and endophyte-free (E⁻) in latosols extracts solution with different pH

处理 Treatment	pH	带菌情况 Endophytic status	胚芽长 Shoot length/cm	胚根长 Root length/cm	胚芽鲜重 Fresh weight of seedlings/mg	胚芽干重 Dry weight of seedlings/mg
CK	6.12	E ⁺	6.98±0.14a	4.91±0.12a	42.00±3.09a	18.88±0.94a
		E ⁻	6.80±0.11ab	4.35±0.10a	39.70±4.01a	17.76±1.28a
1 : 10	5.01	E ⁺	6.00±0.16b	3.01±0.12b	36.55±2.25b	11.59±0.92b
		E ⁻	5.12±0.09cd	2.99±0.06b	25.58±5.42d	8.13±1.29ef
1 : 7	4.85	E ⁺	5.97±0.15bc	2.41±0.13cd	35.30±5.59bc	11.32±1.40b
		E ⁻	4.94±0.11de	2.23±0.08c	23.60±5.11de	7.83±0.89gh
1 : 5	4.73	E ⁺	5.90±0.13c	2.37±0.10cd	34.75±5.76bc	10.89±1.01bc
		E ⁻	4.77±0.12ef	1.96±0.11cd	23.39±4.33de	6.94±0.06gh
1 : 3	4.58	E ⁺	5.83±0.10c	2.14±0.09cd	32.70±3.96bc	9.87±1.17cd
		E ⁻	4.65±0.11f	1.83±0.04cd	22.96±5.05e	6.42±0.86h
1 : 1	4.47	E ⁺	5.77±0.13c	1.93±0.12cd	31.21±3.78c	9.12±0.04de
		E ⁻	4.05±0.16fg	1.76±0.11d	22.19±1.89e	6.38±1.349h



不同字母表示不同处理间在 0.05 水平存在显著性差异;下同。
图 1 不同 pH 砖红壤浸提液中 E⁺ 和 E⁻ 多年生黑麦草脯氨酸含量的比较

The different normal letters indicate significant difference among treatments at 0.05 level;The same as below

Fig.1 Comparison of proline content of endophyte-infected (E⁺) and endophyte-free (E⁻) of perennial ryegrass in latosols extracts solution with different pH

浸提液 pH 值的降低,多年生黑麦草幼苗脯氨酸含量表现为逐渐上升的趋势,并且 5 个砖红壤浸提液处理均显著高于相应 CK ($P<0.05$)。在相同 pH 砖红壤浸提液处理下,E⁺ 多年生黑麦草幼苗脯氨酸的含量均高于相应 E⁻ 种子,且除对照(CK)外 E⁺ 和 E⁻ 之间差异均达到显著水平($P<0.05$)。其中,在 pH ≤5.01 时,E⁺ 幼苗脯氨酸的含量比相应 E⁻ 分别高出 38.1%、38.7%、40.5%、40.0% 和 44.1%。以上结果说明内生真菌的侵染可诱导宿主在细胞内积累较多的渗透调节物质,在一定程度上缓解了酸胁迫的伤害,从而使宿主表现出较强的耐酸性。

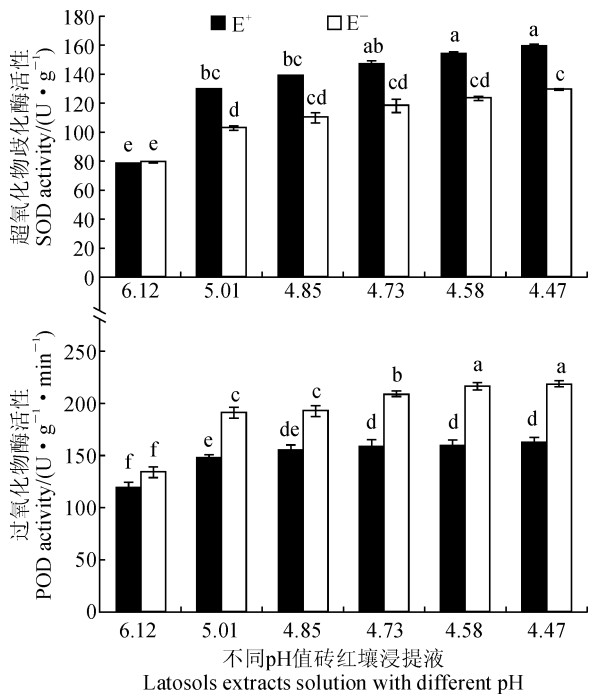


图 2 不同 pH 砖红壤浸提液中 E⁺ 和 E⁻ 多年生黑麦草 SOD 和 POD 活性的比较

Fig.2 Comparison of SOD and POD activities of endophyte-infected (E⁺) and endophyte-free (E⁻) of perennial ryegrass in latosols extracts solution with different pH

2.4 不同 pH 砖红壤浸提液中内生真菌对多年生黑麦草 SOD 和 POD 活性的影响

2.4.1 SOD 活性 图 2 显示,在相同带菌情况下,随着砖红壤浸提液 pH 值的降低,多年生黑麦草幼

苗 SOD 活性均表现为逐渐上升的趋势,并且 5 个砖红壤浸提液处理均显著高于相应 CK ($P<0.05$)。其中, E^+ 幼苗 SOD 活性在 pH 4.47 时仅显著高于 pH 5.01 处理 23.1% ($P<0.05$),跟其他 3 个处理 (pH 4.85、4.73、4.58) 差异不显著 ($P>0.05$); E^- 幼苗 SOD 活性在 pH 4.47~4.73 时分别显著高于 pH 5.01 处理 27.0%、23.5% 和 15.4%。在相同 pH 砖红壤浸提液处理下, E^+ 多年生黑麦草幼苗 SOD 活性均高于相应 E^- 种子,且除对照 (CK) 外 E^+ 和 E^- 之间差异均达到显著水平 ($P<0.05$),各浸提液处理相应增幅分别为 23.1%、25.7%、25.5%、25.9% 和 25.9%。上述结果说明内生真菌的侵染可诱导提高宿主幼苗的保护酶活性,在一定程度上使宿主表现出较强的耐酸性。

2.4.2 POD 活性 由图 2 还可知,在相同带菌情况下,随着砖红壤浸提液 pH 值的降低,多年生黑麦草幼苗 POD 活性也表现为逐渐上升的趋势,并且 5 个砖红壤浸提液处理也均显著高于相应 CK ($P<0.05$)。其中, E^+ 幼苗 POD 活性在 pH 4.47 时显著高于 pH 5.01 处理 9.8%,而与 pH 4.73 和 4.58 浸提液处理差异不显著 ($P>0.05$); E^- 幼苗 POD 活性在 pH 4.47 和 4.58 时分别显著高于 pH 5.01 处理 12.6% 和 11.8%。在相同 pH 砖红壤浸提液处理下, E^+ 多年生黑麦草幼苗 POD 活性均低于相应 E^- 种子,且除对照 (CK) 外 E^+ 和 E^- 之间差异均达到显著水平 ($P<0.05$)。其中,在 pH ≤ 5.01 时, E^+ 幼苗 POD 活性比相应 E^- 分别显著降低 19.3%、20.5%、19.4%、16.3% 和 18.0%。上述结果说明内生真菌的侵染可使宿主幼苗具有更稳定和

高效的活性氧消除系统,从而在一定程度上表现出较强的耐酸性。

2.5 不同 pH 砖红壤浸提液中内生真菌对多年生黑麦草 MDA 含量的影响

由图 3 可知,在相同带菌情况下,随着砖红壤浸提液 pH 值的降低,多年生黑麦草幼苗丙二醛含量表现为逐渐上升的趋势,并且 5 个砖红壤浸提液处理均显著高于相应 CK ($P<0.05$); E^+ 幼苗的 pH 4.47 处理和 E^- 幼苗的 pH 4.47~4.73 处理丙二醛含量均显著高于相应 pH 5.01 处理 ($P<0.05$)。在相同 pH 砖红壤浸提液处理下, E^+ 多年生黑麦草幼苗 MDA 含量均不同程度地高于相应 E^- 幼苗,且除对照 (CK) 外 E^+ 和 E^- 之间差异均达到显著水平 ($P<0.05$)。其中, E^+ 幼苗 MDA 含量在 pH 4.47~5.01 浸提液处理下分别比 E^- 幼苗显著降低了 14.2%、12.3%、12.3%、12.0% 和 13.9%。以上结果说明内生真菌提高了黑麦草幼苗的抗氧化能力,从而在一定程度上增强了其对酸毒害的耐性。

3 讨 论

种子萌发和幼苗生长是植物建植的基础,种子的萌发除了与种子自身的遗传有关外,还受到环境因子如温度、光照、pH、土壤水分等的影响^[30-32]。其中 pH 是影响植物正常生长和细胞内多种物质代谢的重要环境因子^[33]。据报道,pH 值会影响植物水分和养分的吸收,从而导致其营养元素缺乏,引起植株发育不良、根系不发达等症状^[34-35]。对醉马草、中华羊茅和野大麦内生真菌研究发现,随着环境酸度的升高,三者种子的发芽率、发芽势、胚芽长、胚根长及鲜、干重等各项萌发指标均逐渐增加,且均显著高于不带内生真菌的植株^[18]。有学者研究发现,醉马草内生真菌共生体幼苗株高、根长、分蘖和生物量随着 pH 的升高均呈增加的趋势^[19]。本研究发现,多年生黑麦草的胚根长、胚芽长及鲜、干重等各项萌发指标均随砖红壤浸提液 pH 降低(酸度增强)而逐渐降低,并在 pH 4.47 ~ 4.73 时显著高于对照 (pH 6.12)。从本试验结果看,酸胁迫对 E^+ 和 E^- 种子萌发和幼苗生长都有影响。在强酸 (pH 4.47 ~ 5.01) 环境下, E^+ 种子发芽率、发芽势、发芽指数、活力指数、胚芽长及鲜、干重显著高于 E^- 种子,表明内生真菌的存在使多年生黑麦草具有更宽泛的酸适应度,从而增加其竞争优势。而其中的胚根长在二者之间差异不显著,可能是因为内生真菌主要分布在宿主的地上部分(茎髓、叶鞘、叶片、花序和

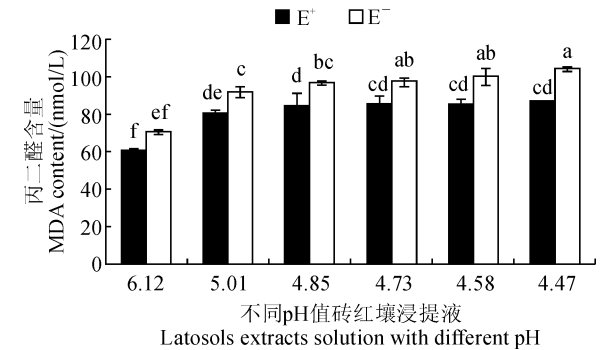


图 3 不同 pH 砖红壤浸提液中 E^+ 和 E^- 多年生黑麦草丙二醛含量的比较

Fig. 3 Comparison of malondialdehyde content of endophyte-infected (E^+) and endophyte-free (E^-) of perennial ryegrass in latosols extracts solution with different pH

种子),根尖处只有少量内生真菌的存在,而大多数植物根内并没有发现内生真菌的分布^[36]造成的,也可能是不同植物对胁迫防御机制不同,但具体原因需要进一步验证。

为了缓解酸胁迫对植物造成的损伤(如细胞失水和生理干旱),植物会合成许多渗透调节物质,如多元醇(如可溶性糖、甘露醇、山梨醇)、含氮化合物(如脯氨酸、甜菜碱)以及有机酸(如水杨酸、草酸)等,通过这些物质含量的变化来调节渗透势从而减轻伤害^[37]。胡雁春研究表明,在不同 pH 酸雨影响下,三叶草种子的脯氨酸含量随 pH 的降低呈上升趋势^[38]。还有研究表明内生真菌的侵染能使宿主植物更快适应周围的盐环境,并通过增加游离脯氨酸的含量来消除活性氧的累积^[39]。本试验中,在低 pH 胁迫下内生真菌的侵染诱导宿主植物产生了较多的脯氨酸,说明内生真菌在一定程度上能促使宿主产生更多的脯氨酸来降低酸胁迫给细胞带来的伤害,使宿主植物细胞维持稳定,保证细胞的正常生理代谢。

植物体内丙二醛含量一定程度上反映了植物受到逆境条件胁迫(如高温、盐碱、以及强光等)下的抗逆能力。丙二醛含量越高,说明植物细胞膜脂质过氧化程度越高,细胞膜受到的伤害严重^[40-41]。在非胁迫条件下,细胞内活性氧和自由基的产生与清除处于一个动态平衡的状态^[39]。当植物受到非生物胁迫(如高温、盐碱等)和生物胁迫(如病、虫等)时,这

种平衡关系被破坏,使植物体内过氧化氢(H_2O_2)及单线态氧(O_2)等活性氧浓度升高,导致植物蛋白、酶结构及膜质受到自由基的攻击产生非特异性氧化,从而产生大量如羟自由基(OH^\cdot)及超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)等高活性的基团使植物受到伤害^[40-41]。李晓科研究发现,小麦幼苗的 SOD 和 POD 活性随着 pH 的升高而持续降低^[42]。本研究中,随着砖红壤浸提液 pH 值的降低, E^+ 和 E^- 幼苗丙二醛含量均表现为升高的趋势,而且 E^+ 幼苗丙二醛含量显著低于 E^- 幼苗,说明内生真菌的侵染有效地保护了黑麦草细胞膜系统,减轻其氧化程度;本试验表明,内生真菌的寄生可有效提高多年生黑麦草植物体内 SOD 和 POD 活性,增强其自由基和活性氧的清除能力,进而在一定程度上增加了多年生黑麦草的抗酸性。马敏芝的研究表明,黑麦草感染不同程度的锈病后,内生真菌的寄生使宿主体内游离脯氨酸含量升高、丙二醛含量降低,SOD 和 POD 活性增加,从而提高了宿主黑麦草在田间条件下对锈病的抗性^[43],与本试验研究结果相似。

土壤浸提液虽然非常接近田间土壤的特性,但跟大田还是有很大的差异,本研究只通过室内试验证明了内生真菌的侵染可提高宿主植物抗酸能力,但仍需要在温室和田间进一步验证,从而为黑麦草——内生真菌共生体的合理利用及抗酸育种方面的研究提供理论基础,其抗酸机制尚需进一步深入探讨。

参考文献:

[1] 王京元, 阎俊崎, 陈霞, 等. 土壤 pH 值对盆栽大豆幼苗的影响[J]. 江西农业学报, 2012, **24**(2): 96-97.
WANG J Y, YAN J Q, CHEN X, *et al.* Effect of soil pH-value on seedling of potted soybean[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2012, **24**(2): 96-97.

[2] 周娟, 袁珍贵, 郭莉莉, 等. 土壤酸化对作物生长发育的影响及改良措施[J]. 作物研究, 2013, **27**(1): 96-102.
ZHOU J, YUAN Z G, GUO L L, *et al.* The effect of soil acidification on crop growth and development and improvement measures[J]. *Crop Research*, 2013, **27**(1): 96-102.

[3] 李潇潇, 夏强, 任立, 等. 我国土壤的酸化及改良[J]. 现代园艺, 2011, (9): 156-156.
LI X X, XIA Q, REN L, *et al.* Soil acidification and improvement in our country[J]. *Modern Horticulture*, 2011, (9): 156-156.

[4] 翟飞飞. 多年生黑麦草诱变株系的抗寒性评价[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2013.

[5] MA M Z, CHRISTENSEN M J, NAN Z B. Effects of the endophyte *Epichloë festucae* var. *lolii*, of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on indicators of oxidative stress from pathogenic fungi during seed germination and seedling growth[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2015, **141**(3): 571-583.

[6] SCHARDL C L, LEUCHTMANN A, SPIERING M J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, **55**(55): 315-340.

[7] SAIKKONEN K, WÄLI P, HELANDER M, *et al.* Evolution of endophyte-plant symbioses[J]. *Trends in Plant Science*, 2004, **9**(6): 275-280.

[8] 黄玺, 李春杰, 南志标, 等. 醉马草内生真菌对其伴生种硬质早熟禾和针茅生长的影响[J]. 草业学报, 2010, **19**(5):

- 87-93.
- HUANG X, LI C J, NAN Z B, *et al.* Effects of *Achnatherum inebrians* infected with *Neotyphodium* endophyte on accompanying species of *Stipa capillata* and *Poa sphondylodes* [J]. *Acta Pratacultuae Sinica*, 2010, **19**(5): 87-93
- [9] 李 飞, 李春杰. 内生真菌对禾草类植物抗旱性的影响[J]. 草业科学, 2006, **23**(3): 57-62.
- LI F, LI C J. Effect of endophyte infection on drought-resistance of graminaceous grasses [J]. *Pratacultural Science*, 2006, **23**(3): 57-62.
- [10] ZHOU L Y, LI C J, ZHANG X X, *et al.* Effects of cold shocked *Epichloë* infected *Festuca sinensis* on ergot alkaloid accumulation[J]. *Fungal Ecology*, 2015, 14: 99-104.
- [11] MOY M, BELANGER F, DUNCAN R, *et al.* Identification of epiphyllous mycelial nets on leaves of grasses infected by clavicipitaceous endophytes [J]. *Symbiosis*, 2000, **28** (4): 291-302.
- [12] LI C J, GAO J H, NAN Z B. Interactions of *Neotyphodium gansuense*, *Achnatherum inebrians*, and plant-pathogenic fungi[J]. *Mycological Research*, 2007, **111** (10): 1 220-1 227.
- [13] SONG M L, CHAI Q, LI X Z, *et al.* An asexual *Epichloë* endophyte modifies the nutrient stoichiometry of wild barley (*Hordeum brevisubulatum*) under salt stress[J]. *Plant and Soil*, 2015a, **387**(1-2): 153-165.
- [14] SONG M L, CHAI Q, LI X Z, *et al.* An asexual *Epichloë* endophyte modifies the nutrient stoichiometry of wild barley (*Hordeum brevisubulatum*) under salt stress[J]. *Plant and Soil*, 2015b, **387**(1): 153-165.
- [15] SONG M L, LI X Z, SAIKKONEN K, *et al.* An asexual *Epichloë*, endophyte enhances waterlogging tolerance of *Hordeum brevisubulatum* [J]. *Fungal Ecology*, 2015, 13: 44-52.
- [16] ZHANG X X, LI C J, NAN Z B. Effects of cadmium stress on growth and anti-oxidative systems in *Achnatherum inebrians* symbiotic with *Neotyphodium gansuense*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, **175**(1-3): 703-709.
- [17] SCHARDL C L. *Epichloë festucae* and related mutualistic symbionts of grasses[Review][J]. *Fungal Genetics & Biology*, 2001, **33**(2): 69-82.
- [18] 彭清青, 李春杰, 宋梅玲, 等. 不同酸碱条件下内生真菌对三种禾草种子萌发的影响[J]. 草业学报, 2011, **20** (5): 72-78.
- PENG Q Q, LI C J, SONG M L, *et al.* Effects of *Neotyphodium* endophytes on seed germination of three grass species under different pH conditions[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2011, **20**(5): 72-78.
- [19] 万志文, 冯疆蓉, 陈振江, 等. 不同 pH 对醉马草内生真菌共生体幼苗生长和产碱的影响[J]. 西北植物学报, 2016, **36** (4): 715-720.
- WAN Z W, FENG J R, CHEN Z J, *et al.* Effects of different pH on growth and ergot alkaloids concentrations of symbiont of *Epichloë gansuensis*-*Achnatherum inebrians* seedling [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, **36** (4): 715-720.
- [20] 柳小妮. 多年生黑麦草顶峰的引种适应性研究[J]. 草原与草坪, 2002, (3): 51-52.
- LIU X N. Studies on adapt ability of pinnacle in China[J]. *Grassland & Turf*, 2002, (3): 51-52.
- [21] 李春杰. 醉马草内生真菌共生体生物学与生态学特性的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2005
- [22] 索 龙, 罗晨诚, 潘凤娥, 等. 生物质炭和秸秆对海南砖红壤酸性及交换性能的影响[J]. 热带生物学报, 2015, **6**(2): 173-179.
- SUO L, LUO C C, PAN F E, *et al.* Effect of biochar and corn straw on acidify and exchangeable capacity in the basalt-derived latosol in Hainan[J]. *Journal of Tropical Biology*, 2015, **6**(2): 173-179.
- [23] 李 艳, 张如莲, 刘国道, 等. 施用豆科绿肥后砖红壤酸度随时间的动态变化[J]. 热带作物学报, 2011, **32** (3): 427-431.
- LI Y, ZHANG R L, LIU G D, *et al.* Studies on dynamic changes of latosol acidity after leguminous green manure application[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2011, **32** (3): 427-431.
- [24] 许 彦, 罗 丰, 许如意, 等. 三亚地区农业土壤 pH 值测定方法初探[J]. 长江蔬菜, 2011, (24): 50-51.
- XU Y, LUO F, XU R Y, *et al.* Research on determination methods for pH value of agricultural soil in sanya district[J]. *Journal of Changjiang Vegetables*, 2011, (24): 50-51.
- [25] SECRETARIAT Z I. Proceedings of the international seed testing association-opening ceremony, introductory repor, ordinary meeting[J]. *Seed Science and Technology*, 1999, 76: 481-484
- [26] ABRAHÁM E, HOURTON-CABASSA C, ERDEI L, *et al.* Methods for determination of proline in plants[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2010, 639: 317-331.
- [27] 赵世杰, 许长成, 邹 琦, 等. 植物组织中丙二醛测定方法的改进[J]. 植物生理学报, 1994, **30**(3): 207-210.
- ZHAO S J, XU C C, ZOU Q, *et al.* Improvement of method for measurement of malondialdehyd in plant tissues [J]. *Plant Physiology Journal*, 1994, **30** (3): 207-210.
- [28] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.

[29] 袁朝兴, 丁 静. 水分胁迫对棉花叶片中 IAA 含量, IAA 氧化酶和过氧化物酶活性的影响[J]. 分子植物, 1990, (2): 179-184.

YUAN C X, DING J. Effects of water stress on the content of IAA and the activities of IAA oxidase and peroxidase in cotton leaves[J]. *Molecular Plant*, 1990, (2): 179-184.

[30] GIANNOPOLITIS C N, RIES S K. Superoxide dismutases, 1: Occurrence in higher plants[J]. *Plant Physiology*, 1977, **59**(2): 309-14.

[31] PENFIELD S, GRAHAM S, GRAHAM I A. Storage reserve mobilization in germinating oilseeds: Arabidopsis as a model system[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2005, **33**(2): 380-383.

[32] LOPEZMOLINA L, MONGRAND S, CHUA N H. A post-germination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, **98**(8): 4 782-4 787.

[33] 唐 琨, 朱伟文, 周文新, 等. 土壤 pH 对植物生长发育影响的研究进展[J]. 作物研究, 2013, **27**(2): 207-212.

TANG K, ZHU W W, ZHOU W X, *et al.* Research progress on effects of soil pH on plant growth and development [J]. *Crop Research*, 2013, **27**(2): 207-212.

[34] RAYLE D L, CLELAND R E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well [J]. *Plant Physiology*, 1992, **99**(4): 1 271-1 274.

[35] 赵彦坤, 张文胜, 王幼宁, 等. 高 pH 对植物生长发育的影响及其分子生物学研究进展[J]. 中国生态农业学报, 2008, **16** (3): 783-787.

ZHAO Y K, ZHANG W S, WANG Y N, *et al.* Research progress in physiology and molecular biology of plant responses to high pH[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2008, **16**(3): 783-787.

[36] CHRISTENSEN M J, BALL J P, BENNETT R J, *et al.* Fungal and host genotype effects on compatibility and vascular colonization by *Epichloë festucae* [J]. *Mycological Research*, 1997, **101**(4): 493-501.

[37] 韩 冰, 贺超兴, 郭世荣, 等. 丛枝菌根真菌对盐胁迫下黄瓜幼苗渗透调节物质含量和抗氧化酶活性的影响[J]. 西北植物学报, 2011, **31**(12): 2 492-2 497.

HAN B, HE C X, GUO S R, *et al.* Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on osmo regulation substance contents and antioxidant enzyme activities of cucumber seedlings under salt stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2011, **31**(12): 2 492-2 497.

[38] 胡雁春. 模拟酸雨对三叶草种子萌发及幼苗生理指标的影响[J]. 安徽农业科学, 2014, **42**(1): 85-86.

HU Y C. Study on the influence of simulated acid rain on clover[J]. *Journal of Anhui Agri. Sci*, 2014, **42**(1): 85-86.

[39] RODRIGUEZ R, REDMAN R. Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, **102**(9): 3 175-3 176.

[40] PARIDA A K, DAS A B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review [J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2005, **63**(3): 324-349.

[41] JUNG W J, JIN Y L, PARK R D, *et al.* Treatment of *Paenibacillus illinoisensis* suppresses the activities of antioxidative enzymes in pepper roots caused by *Phytophthora capsici* infection[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, **22**(9): 901-907.

[42] 李晓科. 模拟酸雨对大麦幼苗部分生理特性的影响[J]. 山西农业科学, 2012, **40**(4): 329-331.

LI X K. Effects of simulated acid rain on leaf physiological indices in the *Hordeum vulgare* seedling [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2012, **40**(4): 329-331.

[43] 马敏芝, 南志标. 内生真菌对感染锈病黑麦草生长和生理的影响[J]. 草业学报, 2011, **20**(6): 150-156.

MA M Z, NAN Z B. Effect of fungal endophytes against rust disease of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on growth and physiological indices [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2011, **20**(6): 150-156.

(编辑:裴阿卫)