

DOI: 10.11766/trxb202108030397

陈曼, 张杨, 白亚男, 戴传超. 磷水平对内生真菌枫香拟茎点霉与水稻互作平衡的调控作用[J]. 土壤学报, 2023, 60 (2): 577–586.
CHEN Man, ZHANG Yang, BAI Yanan, DAI Chuanchao. Regulation of Phosphorus Levels on the Interaction Balance between Endophytic Fungus *Phomopsis liquidambaris* and Rice[J]. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60 (2): 577–586.

磷水平对内生真菌枫香拟茎点霉与水稻互作平衡的调控作用*

陈曼, 张杨, 白亚男, 戴传超[†]

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心, 江苏省微生物与功能基因组学重点实验室, 南京 210023)

摘要: 内生真菌枫香拟茎点霉 (*Phomopsis liquidambaris*, B3) 能够与水稻建立互惠互利关系, 但是两者之间的互作关系是否会受到土壤中有效磷含量的影响尚不清楚。本研究以水稻-B3 共生体系为研究对象, 在低磷 (LP)、中磷 (MP)、高磷 (HP) 三个磷水平中分别设置未接菌组 (E-)、接菌组 (E+), 共六个处理, 探讨在室外盆栽试验与温室试验下, 不同磷水平对植物-内生真菌互作关系的影响。室外盆栽试验表明, 在低磷水平下, 接种 B3 显著促进水稻生长, 水稻产量提高 7.05%; 在中高磷水平下 B3 对水稻生长的作用减弱。为排除土壤中复杂环境的影响, 设计温室试验, 结果表明, 在低磷水平下, 与未接种处理相比, 接种 B3 的水稻根冠比提高 22.48%, 磷含量增加 39.98%, 同时, B3 显著增强叶绿素的含量以及水稻根部蔗糖、葡萄糖、果糖积累量, 然而, 低磷环境会限制 B3 在水稻根部的定殖量; 在中磷和高磷水平下, B3 定殖量高但对水稻的促生作用减弱。以上结果表明, 在低磷水平下, B3 与水稻之间是低丰度互作平衡关系, 在该条件下, B3 在水稻根部的定殖量低但能显著促进水稻生长; 而在中高磷水平下, B3 与水稻是高丰度互作平衡关系, B3 在水稻根部定殖量高, 虽然没有促生作用但可能具有其他优势。本研究有利于解释磷是否以及如何影响内生真菌与水稻的互作关系。

关键词: 磷; 内生真菌; 枫香拟茎点霉; 水稻; 互作

中图分类号: Q939.96 文献标志码: A

Regulation of Phosphorus Levels on the Interaction Balance between Endophytic Fungus *Phomopsis liquidambaris* and Rice

CHEN Man, ZHANG Yang, BAI Yanan, DAI Chuanchao[†]

(Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomics, Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Industrialization of Microbial Resources, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: [Objective] The interaction between endophytic fungi and plants is affected by many factors, among which the content of phosphorus in soil plays a key role in regulating the interaction between them. However, it is not clear whether and how phosphorus fertilizer in the environment affects the interaction between endophytic fungi and plants. [Method] In this

* 国家自然科学基金项目 (32071638) 和江苏省优势学科 III 期项目资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 32071638) and the Superiority Discipline III Project of Jiangsu Province

[†] 通讯作者 Corresponding author, E-mail: daichuanchao@njnu.edu.cn

作者简介: 陈曼 (1996—), 女, 江苏徐州人, 硕士研究生, 主要从事微生物资源与生态方面的研究。E-mail: chenman3740@163.com

收稿日期: 2021-08-03; 收到修改稿日期: 2021-08-31; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2022-01-28

study, the symbiont of *Phomopsis liquidambaris* (B3) and rice (*Oryza sativa* L.) was used as the experimental model. Three different phosphorus levels, i.e., low phosphorus (LP), medium phosphorus (MP), high phosphorus (HP), uninoculated endophytes treatment (E-), and inoculation endophytes treatment (E+) were designed in this experiment. Physiological indexes of rice and B3 colonization were detected under different phosphorus levels to explore how phosphorus regulates the interaction between B3 and rice in the outdoor experiment and greenhouse experiment. 【 Result 】 In the outdoor experiment, B3 significantly (i) increased the phosphorus uptake ability of rice, (ii) promoted rice growth in the whole growth period and the formation of rice grain in the mature stage, and (iii) increased the rice yield by 7.05% under LP treatment. In MP and HP treatments, the effect of B3 was weakened. In the greenhouse experiment, under LP treatment, compared with the uninoculated treatment, the root/shoot ratio of rice inoculated with B3 increased by 22.48%, and resulted in an enhanced phosphorus uptake ability of rice by 39.98%. There was a significant enhancement of photosynthesis in rice and the accumulation of carbon sources such as sucrose, glucose and fructose in rice roots. However, the colonization of B3 was significantly limited under this condition. Also, consistent with this result, the biomass of B3 cultured in the LP medium was significantly lower than that in MP and HP mediums, which meant that B3 would be significantly affected by the phosphorus concentration. In the MP and HP treatments, B3 had high colonization in rice roots, but had little effect on rice growth. 【 Conclusion 】 Phosphorus concentration affects the symbiotic relationship between B3 and rice. In LP treatment, B3 colonization was low in rice roots, but it significantly promoted plant growth. In MP and HP treatments, B3 had high colonization rates in rice roots but with no significant effect on rice growth. Understanding the influence of phosphorus fertilizer on the interaction between endophytic fungi and plants will be helpful to improve the utilization efficiency of phosphorus fertilizer and microbial resources, which will provide a new path for the sustainable development of agriculture.

Key words: Phosphorus; Endophytic fungi; *Phomopsis liquidambaris*; Rice; Interactions

在生态系统中,几乎所有的植物均与微生物建立互作关系,包括互惠共生、拮抗共生等。植物内生菌是指生活在健康植物体内的并且不引起明显病状的一类微生物^[1]。内生真菌为植物提供许多益处^[2-3],例如,促进植株对土壤中营养元素的吸收、增强植物抵抗生物与非生物胁迫的能力等。因此,内生真菌在农业可持续发展方面具有巨大潜力。

然而,越来越多的研究表明内生真菌与植物互作关系会受到诸多因素的影响,例如植物基因型、植物免疫、环境条件(温度、pH、水分、土壤养分等)、微生物间相互作用^[4-5]等,其中土壤中有效养分含量对内生真菌影响植物生长起主导作用^[5-7]。磷是影响植物生长的关键营养元素之一,由于固定作用,其利用效率很低^[8],因此,农户通过施加大量磷肥以维持作物产量,但这会造成地表和地下水磷含量超标,污染环境^[9]。利用内生真菌供给作物磷营养是提高植物利用磷肥效率的途径之一,然而,研究指出,在不同磷水平下内生菌与植物互作关系表现不一,例如, Hiruma 等^[10]发现内生真菌 *Colletotrichum tofieldiae* 仅在低磷水平下具有较高丰度,提高土壤肥力,促进植物生长,而在高磷水

平下不表现出促生作用;类似的,内生真菌 EPF^[11] 仅在低磷水平下才能与宿主植物建立共生互利关系,显著促进植物生长,而在高磷水平下则无效果;然而 Morcillo 等^[12]发现有益菌 *Bacillus amyloliquefaciens* (GB03) 仅在高磷水平下才能发挥有益作用,在缺磷条件下会引起植物产生明显的胁迫症状。这些结果表明外界环境中磷浓度的改变会影响内生菌与宿主植物的互作关系,这种关系可能会随着菌种差异以及宿主特性而发生改变。因此,合理施加磷肥将充分发挥微生物功能,达到生态经济效益最大化。然而,磷影响内生菌与植物互作关系的机制研究还较少。

为探讨不同磷浓度对内生真菌-植物共生关系的影响,本研究以内生真菌枫香拟茎点霉(*Phomopsis liquidambaris*, 以下简称 B3) 与水稻共生体为实验模型,设置不同磷水平,检测共生水平下水稻生理生化指标与 B3 定殖量等,试图从共生双方生长的角度探讨磷如何调控 B3 与水稻互作关系。深入了解外界环境中磷肥影响内生真菌与植物互作关系,有助于提高磷肥的利用效率,充分发挥内生真菌的作用,为农业的可持续发展提供新思路。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株为内生真菌枫香拟茎点霉 (*Phomopsis liquidambaris*)^[2]。供试水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种为南粳 5055。供试土壤为江苏省南京师范大学植物园水稻试验田的黄棕壤, 土壤理化性质: pH 7.25, 全磷 142 mg·kg⁻¹, 有效磷 7.17 mg·kg⁻¹, 全氮 489 mg·kg⁻¹, 碱解氮 98.0 mg·kg⁻¹, 全钾 320 mg·kg⁻¹, 速效钾 64.0 mg·kg⁻¹。

1.2 菌液制备与接种

挑选颗粒饱满的水稻种子, 70%乙醇表面消毒 5 min, 3%次氯酸钠表面消毒 10 min, 用无菌水冲洗数次, 在 28 °C 黑暗中萌发。露白后, 将其移至盛有灭菌蛭石的育苗盘中。取 5 mL B3 菌液转移至 250 mL PDB 培养基中, 置于摇床中 28 °C、180 r·min⁻¹ 振荡培养 2 d, 收获 3.40 g (相当于 0.37 g 干重) 的菌丝体, 用无菌蒸馏水洗涤两次, 并稀释至 500 mL, 作为接种剂。水稻幼苗长至 10 d 时, 根部接种 2 mL 真菌悬浮液, 未接种组则使用 2 mL 无菌蒸馏水。

1.3 盆栽设计

水稻种植按照 3 × 2 因子进行设计, 低磷 (LP)、中磷 (MP)、高磷 (HP) 三个磷肥水平和未接种组 (E-)、接种组 (E+), 共 6 个处理, 每个处理 6 个重复。

室外盆栽试验: 2020 年 6 月—10 月在南京师范大学水稻试验田进行 (气候为亚热带季风气候, 年降水量 1 107 mm, 年平均温度 15.8 °C)。土壤风干混匀, 过 2 mm 筛, 装入塑料桶中 (底径 25 cm, 高 35 cm), 每桶装土 14 kg, 接菌三周后选取长势一致的水稻幼苗移栽至塑料桶中, 每桶 5 颗苗。以过磷酸钙作为基肥调节土壤中磷水平 (以 P₂O₅ 计): 1) 低磷, 10.00 mg·kg⁻¹; 2) 中磷, 106.67 mg·kg⁻¹; 3) 高磷, 500.00 mg·kg⁻¹。氮肥与钾肥实施参照杨波等^[2]方法, 整个水稻生长季节内常规灌溉管理。

温室盆栽试验: 2020 年 9 月—10 月在植物培养箱进行可控的盆栽试验 (培养条件: 28 °C 16 h 光照/25 °C 8 h 黑暗), 用灭菌蛭石代替土壤培养水稻幼苗。在装有蛭石的塑料杯 (口径 9 cm, 高 17.80 cm) 中移栽接菌后的水稻幼苗, 每杯 5 颗苗。水稻的营

养液配方为国际水稻营养液 (Yoshida) 配方^[13]。调节营养液中 NaH₂PO₄ 的含量调节不同磷水平^[14], 1) 低磷: P 1 mg·L⁻¹; 2) 中磷: P 10 mg·L⁻¹; 3) 高磷: P 100 mg·L⁻¹。每周浇营养液 2 次。

1.4 样品采集与分析

室外盆栽试验分别在水稻苗期、分蘖期、孕穗期、成熟期取样, 测量水稻株高、鲜重、干重及水稻植株地上部与根部磷含量; 测量成熟期水稻籽粒的长度与宽度, 计算千粒重。温室实验在接种 B3 的 3、7、14、21 d 后采集新鲜植株样本, 检测水稻叶片叶绿素的含量、根部碳源积累量以及水稻根部 B3 的定殖量; 测量 21 d 的水稻苗的根长与茎长, 计算根冠比, 并检测水稻磷含量。

水稻磷含量检测采用钼锑抗比色法^[15]。叶片叶绿素含量的测定采用浸提法^[16]。

碳源积累量测定: 水稻根部葡萄糖、蔗糖、果糖含量通过南京建成生物工程研究所试剂盒检测, 参照试剂盒说明书进行。

内生真菌枫香拟茎点霉定殖量测定: 采用相对定量 PCR 方法^[17]。以水稻的 β -actin 为内参基因, B3 特异的 ITS 序列为引物 (Bf1/Br1) 检测 B3 在水稻根内的定殖量。具体序列为: Bf1: 5'-CTG GCC CCC TCG GGG TCC CTG G-3' 和 Br1: 5'-TTT CAG GGC CTG CCC TTT TAC AGG C-3'。

1.5 内生真菌枫香拟茎点霉在不同含磷培养基中生物量的测定

采用察氏培养基培养^[18]。对配方中磷含量进行了调整, 1) 低磷, 1 mg·L⁻¹ P (7.37 mg·L⁻¹ K₂HPO₄); 2) 中磷, 10 mg·L⁻¹ P (73.70 mg·L⁻¹ K₂HPO₄); 3) 高磷, 100 mg·L⁻¹ P (737.00 mg·L⁻¹ K₂HPO₄), 用氯化钾 (KCl) 补齐钾元素的含量。两种培养基设置的磷浓度一致。平板培养试验: 取 B3 菌饼置于带有玻璃纸的不同磷浓度固体平板中, 28 °C 培养箱中培养 7 d, 刮取菌丝, 测定不同处理 B3 菌丝的鲜重与干重。液体培养试验: 吸取 5 mL B3 菌液于不同磷浓度液体培养基中 (不添加琼脂), 28 °C、180 r·min⁻¹ 振荡培养 7 d, 离心收集菌丝, 测定鲜重与干重。

1.6 数据处理

使用 Excel 2016 程序和 SPSS (16.0) 统计软件进行数据统计分析, 使用 Duncan 多重比较法进行方

差分析 (ANOVA) 或使用独立样本 T 检验, 以确定处理间的显著性差异。图表中数据表示为平均值 \pm 标准误。

2 结 果

2.1 不同磷水平下 B3 对水稻全生育期生长的影响

表 1 为不同磷水平下 B3 对水稻农艺指标的影响, 可以看出, 在苗期和分蘖期时, B3 接种与磷水

平没有显著的交互作用, 在孕穗期时开始出现显著作用 ($P < 0.05$), 在成熟期时对水稻生长与产量的影响达极显著水平 ($P < 0.01$)。与未接种处理相比, 只有在 LP 水平下, B3 接种会显著增加分蘖期、孕穗期、成熟期水稻株高与鲜重, 提高水稻千粒重 7.05%; 而在 MP 水平下接种 B3, 水稻生长指标和产量与未接种处理相比差异不显著; 在 HP 水平下, 接种 B3 显著降低了水稻鲜重、干重与千粒重, 与未接种处理相比, 水稻千粒重降低了 5.15%。

表 1 不同磷水平下 B3 对水稻生长指标的影响

Table 1 Effects of endophytic fungus B3 on growth index of rice under different phosphorus levels

时期	磷水平	处理	株高	鲜重	干重	千粒重
Stage	P level	Treatment	Height/cm	Fresh weight/g	Dry weight/g	1000-grain weight/g
苗期 Seedling stage	LP	E-	34.52 \pm 0.84	2.49 \pm 0.37	0.56 \pm 0.07	—
		E+	32.28 \pm 1.03	1.79 \pm 0.35	0.39 \pm 0.07	—
	MP	E-	35.36 \pm 0.60	2.76 \pm 0.28	0.72 \pm 0.07	—
		E+	35.12 \pm 0.96	2.64 \pm 0.31	0.58 \pm 0.06	—
	HP	E-	37.40 \pm 0.43	2.35 \pm 0.24*	0.78 \pm 0.04**	—
		E+	36.32 \pm 1.07	1.64 \pm 0.11	0.48 \pm 0.02	—
分蘖期 Tillering stage	LP	E-	51.52 \pm 1.75	13.70 \pm 1.65	3.24 \pm 0.39	—
		E+	59.63 \pm 1.77*	16.23 \pm 1.48*	4.23 \pm 0.75	—
	MP	E-	52.47 \pm 2.79	18.38 \pm 2.64	4.09 \pm 0.54	—
		E+	51.74 \pm 1.71	16.23 \pm 3.65	4.42 \pm 1.47	—
	HP	E-	54.33 \pm 0.92	21.94 \pm 2.36**	4.49 \pm 0.46*	—
		E+	56.85 \pm 0.96	10.18 \pm 1.90	2.78 \pm 0.43	—
孕穗期 Booting stage	LP	E-	76.47 \pm 2.36	82.32 \pm 1.56	19.24 \pm 0.65	—
		E+	82.10 \pm 0.75*	87.50 \pm 0.76*	18.91 \pm 0.78	—
	MP	E-	86.67 \pm 0.82	97.98 \pm 4.61	23.78 \pm 0.99*	—
		E+	85.14 \pm 0.91	89.24 \pm 2.14	20.46 \pm 0.91	—
	HP	E-	84.27 \pm 3.25	106.53 \pm 3.41*	24.40 \pm 2.19*	—
		E+	86.55 \pm 0.95	86.03 \pm 5.69	19.41 \pm 0.79	—
成熟期 Mature stage	LP	E-	94.07 \pm 2.21	137.71 \pm 2.26	25.58 \pm 0.82	29.73 \pm 0.66
		E+	98.58 \pm 0.65*	143.86 \pm 1.26*	28.98 \pm 0.54*	31.82 \pm 0.40*
	MP	E-	99.90 \pm 3.89	174.40 \pm 8.13	34.35 \pm 1.21	33.27 \pm 0.16
		E+	100.05 \pm 0.35	160.20 \pm 4.15	32.07 \pm 1.09	33.87 \pm 0.17
	HP	E-	106.10 \pm 1.97*	165.26 \pm 4.95*	34.46 \pm 0.40*	31.70 \pm 0.40*
		E+	98.73 \pm 1.30	147.00 \pm 5.11	31.33 \pm 1.17	30.06 \pm 0.21

注: LP、MP、HP 分别表示低磷、中磷、高磷水平; E-、E+ 分别表示未接种 B3、接种 B3; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 下同。Note: LP, MP and HP were low, medium and high phosphorus levels respectively. E- and E+ were uninoculated B3 and inoculation B3. * means $P < 0.05$, ** means $P < 0.01$. The same below.

由表 2 可知, 磷水平显著影响水稻籽粒的长度 ($P < 0.05$), 不接种 B3 时, MP 与 HP 水平水稻籽粒长度与宽度显著高于 LP 水平 ($P < 0.01$); B3 接种与磷水平存在显著的交互作用 ($P < 0.05$), 在 LP 水平下, 接种 B3 能极显著增加水稻籽粒的宽度与长度 ($P < 0.01$), 且与 MP、HP 水平接种处理相比差异不显著, 这表明在 LP 水平下接种 B3 能够有效缓解低磷对水稻籽粒形成的限制。

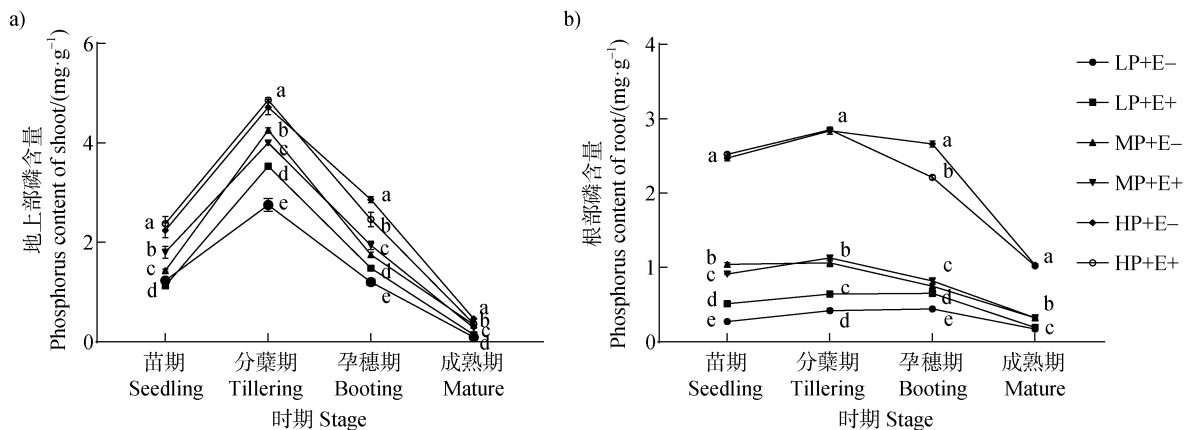
由图 1 可知, 水稻地上部和地下部的磷含量随着水稻生长呈现先增加再降低的趋势; 磷肥施加对水稻体内磷含量的影响差异极显著 ($P < 0.01$), 水

稻地上部或地下部磷含量随着外界施磷量的增加而增加, 不依赖于 B3 接种。值得注意的是, B3 接种与磷水平存在显著的交互作用, 只有在 LP 水平下, 接种 B3 后水稻地上部分磷含量高于未接种处理, 在分蘖期和孕穗期达到极显著水平 ($P < 0.01$) 并且较未接种处理分别高 28.36%、23.33%; 地下部磷含量在苗期、分蘖期、孕穗期均显著高于未接种处理 ($P < 0.05$)。而在 MP 和 HP 水平下, B3 接种处理对水稻的促生作用减弱甚至出现抑制现象, 例如 MP 水平下, 与未接种处理相比, 水稻苗期接种 B3 后显著降低地上部磷含量和地下部磷含量达 25.87%、12.50%。

表 2 不同磷水平下 B3 对水稻籽粒的影响

Table 2 Effects of endophytic fungus B3 on rice grain under different phosphorus levels

处理 Treatment	籽粒宽度 Seed width/mm		籽粒长度 Seed length/mm	
	Seed width/mm		Seed length/mm	
	E-	E+	E-	E+
LP	3.79 ± 0.06	4.05 ± 0.06**	6.75 ± 0.08	7.10 ± 0.08**
MP	4.12 ± 0.03	4.03 ± 0.07	7.17 ± 0.10	6.95 ± 0.06
HP	4.02 ± 0.09	3.97 ± 0.08	7.12 ± 0.04	7.17 ± 0.09



注: 同一生育期不同字母表示在 0.05 水平差异显著。Note: Different letters affixed to the data in the graph indicate a significant difference between treatments at $P < 0.05$.

图 1 不同磷水平下 B3 对水稻磷吸收的影响

Fig. 1 Effects of endophytic fungus B3 on phosphorus uptake in rice under different phosphorus levels

2.2 不同磷水平下 B3 对水稻根长、根冠比与磷吸收的影响

如图 2a 所示, 外界环境中磷水平显著影响水稻根长 ($P < 0.01$), 未接种 B3 时, LP、MP 水平下水稻根长显著高于 HP 处理 ($P < 0.01$); B3 接种与磷水平存在显著的交互作用 ($P < 0.01$), B3 接种后在

LP 水平下水稻根长较未接种处理高 9.01%, 分别为 MP 和 HP 水平下水稻根长的 1.23 倍和 1.20 倍。水稻根冠比 (图 2b) 较未接种处理高 22.48%, 分别是 MP 和 HP 水平下水稻根冠比的 1.23 倍和 1.04 倍。如图 2c 所示, 磷水平显著影响水稻体内磷含量 ($P < 0.01$), 随着外界施磷量的增加, 水稻体磷含量增加。

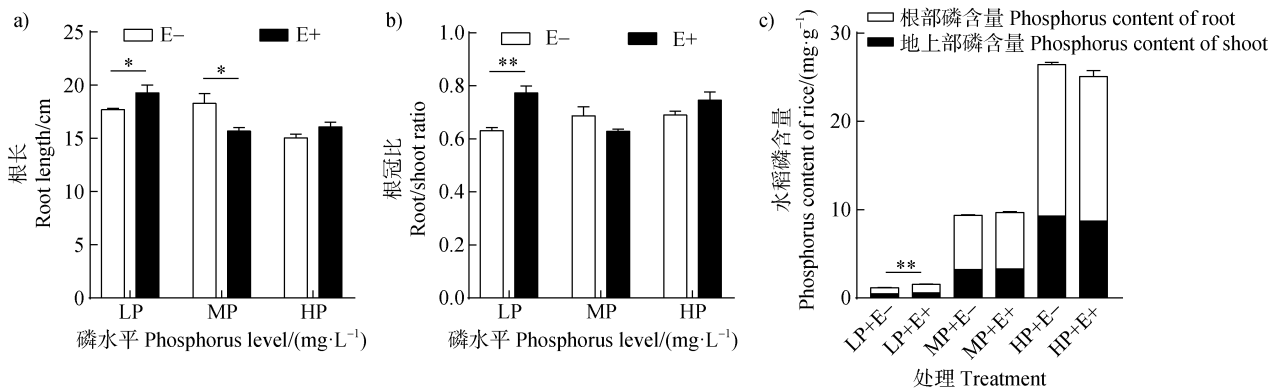


图2 不同磷水平下 B3 对水稻根长 (a)、根冠比 (b) 与磷吸收 (c) 的影响

Fig. 2 Effects of endophytic fungus B3 on root length (a), the ratio of root and shoot (b) and phosphorus uptake (c) under different phosphorus levels

在 LP 水平下, 接种 B3 显著促进水稻对磷的吸收, 接种处理水稻的磷含量较未接种处理高 39.98%, 但在 MP 和 HP 水平下接种处理与未接种处理相比差异不显著。表明在 LP 水平下接种内生真菌 B3 显著促进了水稻根长与根冠比, 增强了水稻在贫瘠环境下吸收磷的能力。

2.3 不同磷水平下 B3 对水稻光合作用的影响

如图 3 所示, 随着水稻幼苗的生长叶绿素的含量逐渐增加。水稻幼苗叶绿素含量显著受 B3 接种与磷水平相互作用的影响 ($P < 0.05$), 尤其在 7 d 和 14 d, 在 LP 水平下, B3 接种比未接种处理高了 18.61%、17.84%, 然而在 MP 和 HP 水平下, B3 对促进水稻叶绿素积累作用无显著效果甚至表现出抑制现象, 例如, HP 水平下, 真菌接种 7 d 和 14 d 时, 接种 B3 的水稻比未接种处理叶绿素含量分别

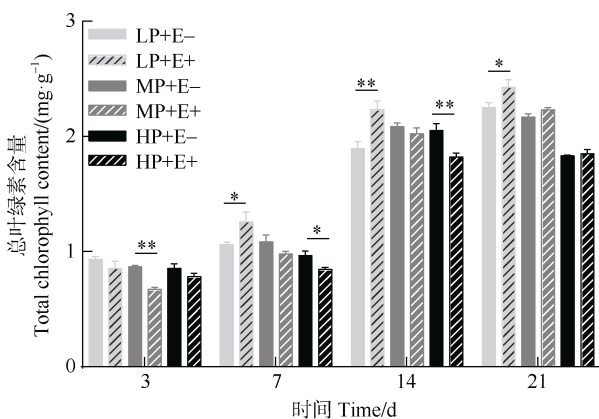


图3 不同磷水平下 B3 对水稻总叶绿素积累的影响

Fig. 3 Effects of endophytic fungus B3 on total chlorophyll accumulation in rice under different phosphorus levels

降低了 12.30%和 11.25%, 因此 B3 接种后, LP 水平下水稻幼苗叶绿素含量显著高于 MP、HP 水平 ($P < 0.05$)。

2.4 不同磷水平下 B3 对水稻根部碳源积累的影响

如图 4 所示, 磷水平显著影响水稻根部碳源积累 ($P < 0.05$), 未接种 B3 时, MP 水平下水稻根部蔗糖和葡萄糖积累高于 LP 和 HP 水平, 尤其在 7 d; 在 LP 水平下, 与未接种处理相比, 接种 B3 显著促进水稻根部蔗糖积累, 3~21 d 水稻根部蔗糖含量分别是未接种处理的 1.29 倍、1.51 倍、1.31 倍和 1.17 倍, 水稻根部葡萄糖在 7 d 和 14 d 时较未接种处理高 20.00%和 19.72%, 水稻根部果糖的含量在 7 d 和 21 d 时, 接种处理分别是未接种处理的 1.34 倍和 1.22 倍; 但是在 MP 和 HP 水平下 B3 接种对水稻根部糖的积累量无显著影响。

2.5 不同磷水平下 B3 的体内定殖与体外生长

图 5 所示为不同磷水平下水稻根部 B3 的定殖量情况。B3 在水稻根部定殖量呈现先增加再降低的趋势, 在 7 d 时定殖量达到最高值。在 3 d 时, 不同磷水平下水稻根部 B3 的定殖量差异不显著, 7 d、14 d、21 d 时 MP 水平下 B3 定殖量高于 LP 和 HP 水平, 并且在 14 d 时达极显著水平 ($P < 0.01$), 7 d、14 d、21 d 时 LP 水平下 B3 的定殖量较 MP 水平下的定殖量分别低 70.43%、68.81%、52.85%。

平板培养与液体培养两种方法检测 B3 在不同含磷培养基中的生物量, 结果见表 3。可以看出, 磷显著影响 B3 菌丝生长 ($P < 0.05$), 在 LP 水平下培养的 B3 菌丝干重或鲜重均显著低于 MP 或 HP 培养。

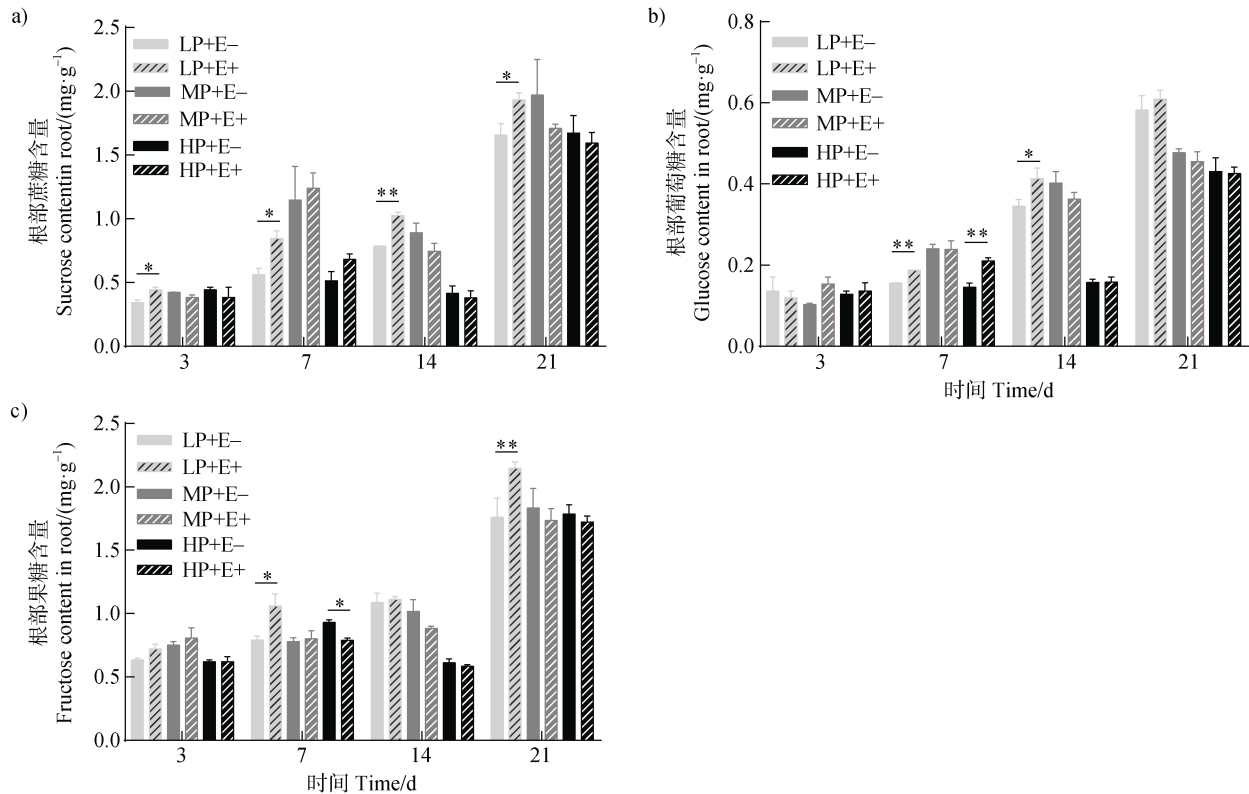


图 4 不同磷水平下 B3 对水稻根部蔗糖 (a)、葡萄糖 (b) 和果糖 (c) 积累的影响

Fig. 4 Effects of endophytic fungus B3 on sucrose (a), glucose (b), and fructose (c) accumulation in rice roots under different phosphorus levels

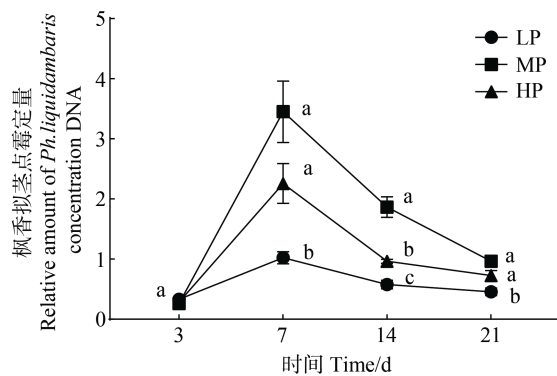


图 5 不同磷处理下 B3 在水稻根部的定殖

Fig. 5 Colonization of the endophytic fungus B3 in the roots of rice under different phosphorus levels

3 讨 论

3.1 不同磷浓度下 B3 对水稻生长的影响

有研究指出, 内生真菌更趋向于在环境贫瘠的条件下促进植株的生长而在环境营养成分过多的情况下则更趋向于缄默或者负调控的状态^[19]。在低磷条件下接种真菌后, 提高了根际微生物多样性, 增强植物磷吸收并促进植物生长, 然而, 在高磷条件

下, 宿主植物的碳成本超过了真菌定殖带来的好处, 而且会降低田间微生物群落多样性^[20-21]。本研究结果也发现, 在低磷水平下, 水稻接种 B3 能够显著促进水稻对磷吸收并提高水稻产量, 而在中磷或高磷水平下, B3 对水稻的促生作用减弱。温室试验结果证实, 仅在低磷水平下, B3 能够显著促进水稻根部发育, 提高水稻根冠比, 增强缺磷条件下水稻获取磷的能力; 此外, 低磷水平下 B3 可能通过增强水稻的光合作用, 增加各类碳源的积累; 但是在中磷和高磷水平下, B3 对水稻的促生作用减弱甚至表现出抑制现象, 这表明内生真菌 B3 的促生作用取决于特定的有效磷酸盐的水平。这与根内生真菌印度梨形孢形成鲜明对比, 后者在低磷和高磷条件下均能促进植物生长^[22]。本研究结果暗示了, 在营养贫瘠土壤中通过接种内生真菌 B3 能够缓解植株受环境营养的限制, 显著促进植物生长, 减少化学肥料投入, 达到经济生态效益最大化。

3.2 不同磷浓度对 B3 定殖量的影响

研究表明, 低营养条件可能有利于微生物的定殖^[20]。Ray 等^[23]研究发现, 在低氮或低磷处理下,

表 3 不同含磷培养基对 B3 生物量的影响

Table 3 Effects of different phosphorus mediums on the biomass of the endophytic fungus B3

处理 Treatment	平板培养 Plate culture		液体培养 Liquid culture	
	菌丝鲜重	菌丝干重	菌丝鲜重	菌丝干重
	Fresh weight/g	Dry weight/g	Fresh weight/g	Dry weight/g
LP	0.050± 0.007b	0.016± 0.001b	1.831± 0.105b	0.076± 0.005b
MP	0.101± 0.013a	0.032± 0.003a	3.007± 0.186a	0.098± 0.008ab
HP	0.089± 0.007a	0.029± 0.002a	2.481± 0.422ab	0.103± 0.012a

注：同一列中无相同字母表示在 0.05 水平差异显著。Note: Different letters affixed to the data in the same column indicate a significant difference between treatments at $P < 0.05$.

Serendipita bescii 更容易与小麦建立共生关系, 具有较高定殖量。据报道, 从营养受限条件下生长的健康植物中更容易分离出有益内生菌^[24], 这是因为低磷水平下, 植物根系防御相关反应受到抑制, 故内生菌定殖量高^[6, 10]。然而本试验探究结果与之不同, 低磷水平下 B3 在水稻根部的定殖量低, 而中高磷水平下定殖量高。这可能是因为在低磷水平下, 磷是唯一限制性元素, 因此对 B3 定殖量影响较大。通过用不同含磷培养基培养 B3, 检测 B3 生物量的结果也证实这一点, 即在低磷处理下 B3 生物量显著低于中磷和高磷处理。在中磷和高磷水平下, 磷素对于 B3 而言不是限制性元素, 因此其在植物体内具有较高的丰度, 若在此条件下降低其他元素的含量, 中高磷处理 B3 的定殖量也许会发生变化。研究发现, 在内生真菌与植物共生过程中, 植物需向真菌提供营养来建立和维持真菌在植物体的定殖^[25], 而在低磷水平下, 水稻能够分配给真菌的营养物质减少, 因此会限制 B3 在植物体内的定殖量。此外, Smith S E 和 Smith F A^[26]研究指出: 由于植株根长的增加, 对真菌的定殖量存在稀释作用, 但实际上每株植株的真菌生物量保持不变。在本研究中, 低磷水平下, 接种 B3 显著促进水稻根长, 分别是中磷和高磷水平下水稻根长的 1.23 倍和 1.20 倍, 因此, 低磷水平下水稻根系真菌定殖量低可能是因为水稻根系长度导致的稀释作用。

3.3 B3 定殖量与水稻生长之间的关系

Maulana 等^[11]研究结果表明, 在低磷水平下, 内生真菌 EPF 在油菜根部定殖率较高, 且在该水平下内生真菌能够显著促进油菜生长, 提高生物量; 孙翔等^[27]指出, 内生真菌的定殖量与八角产量呈正相关性, 八角产量随内生真菌定殖量升高而逐渐增

加。这些结果暗示了内生真菌在植物体内的定殖数量多可能有利于促进植物生长。然而, 本研究结果与之不同, 在低磷水平下, 虽然 B3 定殖量低, 但其能够显著促进水稻的生长, 而在中磷和高磷水平下, B3 定殖量高, 促生作用却减弱。这可能因为低磷水平下磷为限制性元素, 会激活 B3 感知外界磷浓度, 调节植物磷吸收途径, 增强宿主对磷的吸收^[28]; 然而在中磷和高磷水平下, 磷素对 B3 影响较小, 因此 B3 发挥作用减弱。磷素对 B3 的影响在其定殖量结果上也能表现出来。有研究指出^[26], 不能仅仅根据定殖量的变化就断定一种植物与真菌之间是否建立了良好的共生关系, 例如, van't Padje 等^[29]研究发现, 在低磷环境下, 真菌定殖量低, 但真菌维持着与宿主之间的碳-磷交换比, 而在高磷水平下, 真菌定殖量高, 但是真菌从环境中获取的磷不会立刻与宿主植物进行营养交换, 而是储存多余的养分, 待宿主需要时再向宿主提供。类似的, 在低磷水平下, B3 定殖量低但能够显著促进植物生长, 在中高磷水平下, B3 定殖量高, 不促生, 但可能具有其他优势, 例如, 研究结果发现^[30], B3 定殖能够显著引起水稻产生应激反应, 增强水稻防御酶活及相关基因的表达, 提高宿主防御反应, 有效降低穗腐病的发生。此外, Zhou 等^[31-32]发现, B3 存在腐生和共生两个阶段, 当 B3 接触活体植物后, 共生基因被大量诱导, 与植物建立共生关系, 然而, 当植物枯萎死亡后, B3 进入腐生阶段, 由此表明, B3 是诱导共生型内生真菌, 其与宿主植物能否建立共生关系会受到外界环境的影响^[33]。

3.4 展望

外界环境条件会影响 B3 与宿主之间的共生关系。在低氮条件下^[17], B3 参与调节植物碳代谢, 调

控碳水化合物的分配, 促进植物生长, 同时, 在该条件下, 水稻根系转化酶活性被激活, 增加真菌利用的碳源—己糖的合成, 从而促进真菌的定殖。本研究结果中发现在低磷水平下, 接种 B3 对水稻光合作用与根部碳源积累有影响, 磷是否是通过影响碳水化合物的代谢来调控植物与真菌的相互作用, 还需进一步研究。此外, 当磷不是限制性元素时, 即在中磷和高磷水平下, B3 有较高定殖量, B3 是否会通过调节宿主抗性指标来增强宿主的抗病能力, 维持两者的共生关系? 这些问题还需进一步探索。

4 结 论

环境中磷浓度会影响内生真菌 B3 与水稻的相互作用。在低磷水平下, B3 与水稻是低丰度互作平衡关系, B3 在水稻根部定殖量低, 但显著促进水稻生长, 有效缓解水稻在低营养环境下的生长限制; 在中高磷水平下, B3 与水稻是高丰度互作平衡关系, B3 在水稻根部定殖量高, 虽然无显著促生效果, 但可能具有其他优势, 例如增强抗病能力等。因此, 内生真菌 B3 与水稻之间是一种诱导型互作关系, 在不同环境条件下发挥不同的作用, 但具体影响机制还需进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Rai M, Agarkar G. Plant-fungal interactions: What triggers the fungi to switch among lifestyles?[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2016, 42 (3): 428—438.
- [2] Yang B, Ma H Y, Wang X M, et al. Improvement of nitrogen accumulation and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.) by the endophyte *Phomopsis liquidambari*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 82: 172—182.
- [3] Han F, Li J K. Research advances in endophytic fungus *Piriformospora indica* to improve plant stress resistance[J]. *Journal of Tropical Biology*, 2019, 10(3): 298—302. [韩飞, 李俊凯. 内生真菌印度梨形孢提高植物抗逆性的研究进展[J]. *热带生物学报*, 2019, 10(3): 298—302.]
- [4] Hardoim P R, van Overbeek L S, Berg G, et al. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2015, 79 (3): 293—320.
- [5] Castrillo G, Teixeira P J P L, Paredes S H, et al. Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity[J]. *Nature*, 2017, 543 (7646): 513—518.
- [6] Bhalla K, Qu X Y, Kretschmer M, et al. The phosphate language of fungi[J]. *Trends in Microbiology*, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.08.002>.
- [7] Jain P, Pundir R K. Potential role of endophytes in sustainable agriculture—recent developments and future prospects//Maheshwari D K. *Endophytes: Biology and biotechnology*[M]. Cham, Switzerland: Springer, 2017: 145—169.
- [8] Yan Y P, Wang X M, Xiong J, et al. Progresses in studies on sorption mechanisms of phosphate on minerals using multiple analytic approaches[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2020, 57 (1): 22—35. [严玉鹏, 王小明, 熊娟, 等. 基于不同分析方法研究磷酸根在矿物表面吸附机制的进展[J]. *土壤学报*, 2020, 57 (1): 22—35.]
- [9] Du J X, Liu K L, Huang J, et al. Spatio-temporal evolution characteristics of soil available phosphorus and its response to phosphorus balance in paddy soil in China[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2021, 58 (2): 476—486. [都江雪, 柳开楼, 黄晶, 等. 中国稻田土壤有效磷时空演变特征及其对磷平衡的响应[J]. *土壤学报*, 2021, 58 (2): 476—486.]
- [10] Hiruma K, Gerlach N, Sacristán S, et al. Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent[J]. *Cell*, 2016, 165 (2): 464—474.
- [11] Maulana A F, Turjaman M, Hashimoto Y, et al. Nitrogen and phosphorus concentrations in growth media affect the relationship between root endophytic fungi and host plant[J]. *Archives of Microbiology*, 2021, 203 (5): 2411—2418.
- [12] Morcillo R J, Singh S K, He D X, et al. Rhizobacterium-derived diacetyl modulates plant immunity in a phosphate-dependent manner[J]. *The EMBO Journal*, 2020, 39 (2): 2.
- [13] Yoshida S, Forno D A, Cock J H, et al. *Laboratory manual for physiological studies of rice*[M]. Philippines: International Rice Research Institute, 1971: 61.
- [14] Chithrameenal K, Alagarasan G, Raveendran M, et al. Genetic enhancement of phosphorus starvation tolerance through marker assisted introgression of *OsPSTOL1* gene in rice genotypes harbouring bacterial blight and blast resistance[J]. *PLoS One*, 2018, 13 (9): e0204144.
- [15] Lu C. Comparative study on two methods for determination of total phosphorus in wetland plants[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2009, 21 (8): 142—144. [卢超. 两种测定湿地植物总磷方法的比较研究[J]. *江西农业学报*, 2009, 21 (8): 142—144.]
- [16] He Q, Yang W J, Zhang X J, et al. Optimization of conditions for rapid extraction of chlorophyll from plants[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2013, 41 (11): 97—98, 138. [贺倩, 杨文杰, 张旭娟, 等. 植物叶绿

- 素快速浸提法的条件优化[J]. 江苏农业科学, 2013, 41 (11): 97—98, 138.]
- [17] Sun K, Zhang W, Yuan J, et al. Nitrogen fertilizer-regulated plant-fungi interaction is related to root invertase-induced hexose generation[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2020, 96 (8): fiae139.
- [18] Lian J P, Duan Q J, Zhang Y, et al. Isolation and identification of endophytic fungi from *Scindapsus aureum* with degrading formaldehyde[J]. Shandong Chemical Industry, 2019, 48 (7): 232—234. [廉佳佩, 段乔健, 张云, 等. 绿萝内生真菌中甲醛降解菌的筛选和鉴定[J]. 山东化工, 2019, 48 (7): 232—234.]
- [19] Hacquard S, Kracher B, Hiruma K, et al. Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi[J]. Nature Communications, 2016, 7: 11362.
- [20] Jisha S, Anith K N, Sabu K K. The protective role of *Piriformospora indica* colonization in *Centella asiatica* (L.) *in vitro* under phosphate stress[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019, 19: 101088.
- [21] Finkel O M, Salas-González I, Castrillo G, et al. The effects of soil phosphorus content on plant microbiota are driven by the plant phosphate starvation response[J]. PLoS Biology, 2019, 17 (11): e3000534.
- [22] Yadav V, Kumar M, Deep D K, et al. A phosphate transporter from the root endophytic fungus *Piriformospora indica* plays a role in phosphate transport to the host plant[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285 (34): 26532—26544.
- [23] Ray P, Guo Y Q, Chi M H, et al. *Serendipita bescii* promotes winter wheat growth and modulates the host root transcriptome under phosphorus and nitrogen starvation[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(4): 1876—1888.
- [24] Hiruma K, Kobae Y, Toju H. Beneficial associations between Brassicaceae plants and fungal endophytes under nutrient-limiting conditions: Evolutionary origins and host-symbiont molecular mechanisms[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2018, 44: 145—154.
- [25] Rasmussen S, Parsons A J, Fraser K, et al. Metabolic profiles of *Lolium perenne* are differentially affected by nitrogen supply, carbohydrate content, and fungal endophyte infection[J]. Plant Physiology, 2008, 146(3): 1440—1453.
- [26] Smith S E, Smith F A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: New paradigms from cellular to ecosystem scales[J]. Annual Review of Plant Biology, 2011, 62: 227—250.
- [27] Sun X, Zheng Y, Guo L D. Relationship between endophytic fungi and yield of anise[C]//Proceedings of the annual Conference of Chinese Society of Fungi, 2012. 2012: 239—239. [孙翔, 郑勇, 郭良栋. 内生真菌与八角产量的关系[C]//2012年中国菌物学会学术年会论文集. 2012: 239—239.]
- [28] Tang M J, Lu F, Yang Y, et al. Benefits of endophytic fungus *Phomopsis liquidambaris* inoculation for improving mineral nutrition, quality, and yield of rice grains under low nitrogen and phosphorus condition[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10462-8>.
- [29] van't Padje A, Werner G D A, Kiers E T. Mycorrhizal fungi control phosphorus value in trade symbiosis with host roots when exposed to abrupt 'crashes' and 'booms' of resource availability[J]. New Phytologist, 2021, 229 (5): 2933—2944.
- [30] Zhu Q, Tang M J, Yang Y, et al. Endophytic fungus *Phomopsis liquidambaris* B3 induces rice resistance to RSRD caused by *Fusarium proliferatum* and promotes plant growth[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101 (10): 4059—4075.
- [31] Zhou J, Li X, Chen Y, et al. *De novo* transcriptome assembly of *Phomopsis liquidambari* provides insights into genes associated with different lifestyles in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 121.
- [32] Zhou J, Li X, Huang P W, et al. Endophytism or saprophytism: Decoding the lifestyle transition of the generalist fungus *Phomopsis liquidambari*[J]. Microbiological Research, 2018, 206: 99—112.
- [33] Yuan Z L, Zhang C L, Lin F C. Recent advances on physiological and molecular basis of fungal endophyte-plant interactions[J]. Acta Ecologica Sinica, 2008, 28 (9): 4430—4439. [袁志林, 章初龙, 林福呈. 植物与内生真菌互作的生理与分子机制研究进展[J]. 生态学报, 2008, 28 (9): 4430—4439.]

(责任编辑: 卢萍)