

网纹 勃对中辽 1 号杨生长及抗旱性影响研究

张妍¹ 彭龙² 王诗琦¹ 姚佳佳² 杨成超¹ 冯连荣¹ 王乃锐¹ 林阳³ 矫丽曼¹ 杨志岩¹ 彭儒胜^{1*}

(1 辽宁省杨树研究所 2 中国林业科学研究院亚热带林业研究所 3 辽宁省旱地农林研究所)

摘要:【目的】为了丰富促进杨树的外生菌根真菌资源,促进杨树生长并提高抗旱性,本文对采集到的马勃属大型真菌进行了 ITS 序列分子鉴定,并以其与中辽 1 号杨 (*Populus×canadensis* cv. 'Zhongliao 1') 组培苗共培养法,观察菌根形成情况及对杨树生长及根系发育的影响;对其与中辽 1 号杨盆栽扦插苗共生后,用控水法,依据干旱胁迫后的生理指标变化,分析该菌对杨树抗旱性的影响。【结果】(1) 该真菌为网纹马勃 (*Lycoperdon perlatum* Pers.); (2) 中辽 1 号杨可以与网纹马勃形成外生菌根,共培养后整株苗生物量比对照提高 96.43%、根系生物量比对照提高 162.07%、根系总长度比对照提高 75.71%、根表面积比对照提高 108.33%、根体积比对照提高 178.34%、根尖数比对照提高 88.81%; (3) 干旱胁迫后,接种网纹马勃的苗木渗透调节物质脯氨酸、可溶性糖含量均高于对照,过氧化产物丙二醛、过氧化氢含量均低于对照,超氧化物歧化酶活性、过氧化物酶活性、过氧化氢酶活性均高于对照。【结论】网纹马勃可以与杨树形成外生菌根,丰富了杨树外生菌根真菌资源;接种网纹马勃可以显著促进杨树生长、提高杨树抗旱能力,对解决干旱地区杨树生长出现的问题具有重要意义。

关键词: 抗旱性; 外生菌根真菌; 渗透调节; 抗氧化酶; 活性氧

Study on the Effect of *Lycoperdon perlatum* Pers. on the Growth and Drought Resistance of *Populus×canadensis* cv. 'Zhongliao 1'

Yan Zhang¹, Long Peng², Shiqi Wang¹, Jiajia Yao², Lianrong Feng¹, Chengchao Yang¹, Nairui Wang¹, Yang Lin³, Liman Jiao¹, Zhiyan Yang¹, Rusheng Peng^{1*}

Abstract: 【Objective】 In order to enrich the ectomycorrhizal fungi resources of poplar, promote the growth of poplar and improve its drought resistance, in this paper, ITS sequence molecules of the *Lycoperdon* macrofungi collected were identified, and based on the co-culture of the fungus with tissue culture seedlings of *Populus×canadensis* cv. 'Zhongliao 1', mycorrhiza formation was observed and its effects on the poplar growth and root development were discovered. With the water control method, the physiological index changes of the potted cutting seedlings under different degrees of drought stress were analyzed to reveal the fungus effects on the poplar drought resistance. 【Result】 1) the macrofungi collected was *Lycoperdon perlatum* Pers., 2) it could form ectomycorrhiza with *Populus×canadensis* cv. 'Zhongliao 1', and through the co-culture, compared with the control, the whole seedling biomass, root biomass, total root length, root surface area, root volume and the number of root tips were increased by 96.43%, 162.07%, 75.71%, 108.33%, 178.34%, 88.81% respectively, 3) under drought stress, compared with the control, the content of osmoregulatory substances such as proline and soluble sugar in seedlings inoculated with *Lycoperdon perlatum* Pers. was higher, the contents of peroxide product malonaldehyde (MDA) and hydrogen peroxide were lower, the activities of superoxide dismutase, peroxidase and catalase were higher.

Lycoperdon perlatum Pers. could form ectomycorrhiza with poplar, which enriched the resources of poplar ectomycorrhiza fungi.

【Conclusion】The inoculation of *Lycoperdon perlatum Pers.* could significantly promote the growth of poplar and improve its drought resistance, which was of great significance to solve the problems of poplar growth in arid areas.

Keywords: drought resistance; ectomycorrhizal fungi; osmotic regulation; antioxidant enzyme; reactive oxygen species

杨树是中国北方地区造林面积最大的树种,在用材林和防护林建设中占有重要地位(王胜东等,2006)。杨树是一种对水分非常敏感的树种,其生长对水分的需求量非常大(Cao et al. 2012),在风沙干旱区杨树成活率低、生长缓慢、病虫害严重甚至大面积枯死,造成用材林产量低、防护林生态功能严重下降等问题。针对杨树适应干旱胁迫的研究大多聚焦树种本身,揭示了某些特定基因或多肽通过调节气孔密度、降低失水速率、提高光合速率和抗氧化酶活性等方式,调控杨树生长和抗旱性。(Wang et al., 2022; Jiao et al., 2022; Jiao et al., 2021) 然而,除了植物自身抗旱机制外,根际微生物也在植物抗逆性方面起到重要作用,目前已有研究表明土壤中的丛枝菌根真菌(AMF)通过与植物根系建立菌根共生关系,可以增强植物对干旱胁迫的适应性和耐受性(Wang et al., 2023; Ma et al., 2022; Leventis et al., 2021)。

除了丛枝菌根真菌外,生态系统中的外生菌根真菌也对维持树木生长、提高抗旱能力也具有重要意义。外生菌根真菌是一类能侵染宿主植物尚未木栓化的营养根,并在根表面定殖形成菌套和侵入皮层细胞组织间隙形成哈蒂氏网,以及向外延展形成外延菌丝等结构的真菌,其与根系形成的互惠共生结构被称为外生菌根(Ectomycorrhizae, ECM)(刘润进等, 2007)。在干旱胁迫环境下,ECM的形成使宿主植物的根形态特征和生理生化指标发生改变,大量的外延菌丝能够扩大根系的有效吸收面积,从土壤中吸收的水量和养分,进而通过促进宿主植物对水分和矿物质的吸收,改善光合作用,调节渗透物质和信号分子等方式直接或间接地提高植物的抗旱能力,使植物达到干旱避免和脱水避免(Smith et al., 2009; Alvarez et al., 2009; Sato et al. 2019; Kipfer et al., 2012; 刘栋, 2021; Lehto et al., 2011; Xu et al., 2015; Sebastiana et al., 2018; Liu, 2022)。

杨树和真菌关系密接,既有内生菌根、外生菌根,又有内外生混合形式的菌根(袁志林等, 2019)。杨树可以与外生菌根真菌构建互惠共生体系,解析共生体抗旱机制。陆续有学者发现褐环乳牛肝菌(*Suillus luteus*)、卷边桩菇(*Paxillus involutus*)、红绒盖牛肝菌(*Xerocomellus chrysenteron*)、劣味乳菇(*Lactarius insulsus*)、彩色豆马勃(*Pisolithus arhizus*)等外生菌根真菌可以提高杨树抗旱性(赵茜, 2009; 张天泽等, 2022; 宋薇, 吴小芹, 2011)。但杨树外生菌根真菌资源较松树等山地树种少,被用于生产实践的菌种更是少之又少(王淑清等, 2002),因此目前马勃属真菌对杨树生长和抗旱能力的调控机制还不清楚。那么马勃属真菌是否能促进杨树生长,提高杨树抗旱能力呢?在此背景下,本研究基于山地针叶林下采集到的马勃属真菌,从形态到生理和生化水平,评估马勃属真菌对中辽1号杨生长情况的影响,揭示该菌根共生体系抗旱机制,为外生菌根真菌资源的利用提供依据。为了丰富杨树外生菌根真菌资源,促进杨树生长并提高抗旱性,本文对山地针叶林下采集到的马勃属真菌进行ITS序列分子鉴定,并开展其与中

辽1号杨组培苗、扦插苗的共培养，并对盆栽扦插苗进行干旱胁迫，通过观察菌根形成情况、测试苗木生物量、干旱胁迫后生理指标等，分析接种该菌对杨树生长及抗旱性的影响，同时为干旱地区造林和生态治理提供可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

子实体由笔者采集于黑龙江省哈尔滨市东北林业大学帽儿山实验基地，该基地属于长白山系张广才岭西坡，地理坐标北纬 45°20' ~ 45°25'，东经 127°29' ~ 127°44'，经组织分离获得纯种菌丝。

固体菌种制备：采用 PDA 综合培养基，马铃薯 200g/L+葡萄糖/蔗糖 20g/L+琼脂 20g/L+磷酸二氢钾 3g/L+七水硫酸镁 1.5g/L，pH 值 5.8，于 25℃暗培养 30d。

液体菌剂制备：将事先接种在 PDA 综合培养基上的菌种用打孔器打取 8mm 菌饼 2 块接入装有 100ml 液体培养基的 250ml 三角瓶中，液体培养基配方为，马铃薯 200g/L+葡萄糖/蔗糖 20 g/L+磷酸二氢钾 3g/L+七水硫酸镁 1.5g/L，pH 值 5.8。置于 25℃、150r/min 的振荡器上暗培养 30d。

1.1.2 受体材料

中辽1号杨 (*Populus×canadensis* cv. 'Zhongliao 1') 组培苗、盆栽扦插苗 (蔺胜军等, 2014)。

盆栽苗扦插基质：砂子、草炭土、蛭石等体积比混匀，装入布袋中放入灭菌锅在 121℃下灭菌 2h。

1.2 试 方法

1.2.1 菌种 ITS 序列分子鉴定

刮取组织分离获得的新鲜菌丝，使用 DNasecure 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒进行基因组 DNA 提取，以提取 DNA 为模板，应用真菌通用引物对 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增，ITS1:5' -TCCGTAGGTGAACCT-GCGG-3'，ITS4:5' -TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3'；ITS-PCR 扩增体系为：10×PCRBuffer 2.5 μL，dNTP (2.5mmol/L) 2 μL，引物 (10 μmol/L) 0.5 μL，rTaq DNA 聚合酶 (5U/μL) 0.25 μL，模板 DNA 2 μL，用 ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 扩增程序为：94℃预变性 5min，94 摄氏度变性 30s，55 摄氏度退火 45s，72℃延伸 2min，共 30 个循环，最后 72℃延伸 10min，终止温度在 4℃。反应结束后取 6 μL 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。检测后，送至宝生物工程（大连）有限公司进行测序。

将测得的序列输入 GenBank，进行 BLAST 比对，找出与之最大相似性的序列，下载相似性序列的 ITS 区域，用 Clustalw (BioEdit7.0 软件) 进行多序列比对，并辅以人工修正。将比对结果输入 MEGA 5.2 软件，采用 N-J 法构建测得序列的系统发育树，进行系统发育分析 (张妍等, 2016)。

1.2.2 网纹马勃与杨树组培苗共培养方法

采用杨树-真菌共培养基培养基 (硝酸钾 0.38g/L+硝酸铵 0.33g/L+磷酸二氢钾 0.136g/L+七水硫酸镁

0.074g/L+二氯化钙 0.088g/L+1/5 微量元素 2ml/L+VB10.0001g/L+1/5 铁盐 2ml/L+蔗糖 1g/L+葡萄糖 1g/L+卡拉胶 9g/L, pH5.8), 在直径 150mm 培养皿中制作培养基斜面, 斜面顶端至培养皿 1/2 处。

将挑选的根系和株高较为均一的中辽 1 号杨无菌幼苗转接至培养基表面, 每皿 2 株。选用网纹马勃固体平板菌种, 打取直径 8mm 菌饼 4 个, 转接至根系周围, 对照组接种无菌 PDA 琼脂块, 封口后于温度 25℃、光周期 12h(光照强度为 20000Lx)的光照培养箱中培养(何兴华等, 2021)。

1.2.3 网纹马勃对杨树生物量及根系生长情况测定

共培养 30d 后, 称量苗木整株鲜重及根重, 并利用根系扫描仪测定根尖数、根系总长度、根体积、根表面积。继续培养至 180d, 利用超景深显微镜观察成熟菌根形态。

1.2.4 杨树盆栽扦插苗接种网纹马勃方法

将中辽 1 号杨插穗插入装有灭菌基质的花盆(280mm×300mm)中, 每周浇水 1 次, 扦插 50d 后, 在根部周围采用打孔法接种网纹马勃液体菌剂(马磊等, 2007)。

1.2.5 干旱胁迫方式

盆栽扦插苗接种 30d 后, 搬入温室中, 灌足水, 然后进行持续控水处理, 监测土壤水分, 设置四个梯度, 土壤田间持水量的 80%±5%为正常水分, 田间持水量的 65%±5%为轻度干旱, 田间持水量的 50%±5%为中度干旱, 田间持水量的 35%±5%为重度干旱(张中峰等, 2016; 彭思利等, 2021)。于不同土壤水分梯度, 取顶部第 6-8 片叶片进行干旱生理指标测试。

1.2.6 抗旱生理指标测试

选用渗透调节物质选用脯氨酸、可溶性糖, 膜脂过氧化产物选用丙二醛、过氧化氢, 抗氧化酶系统活性选用氧化物酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶。

匀浆制作: 准确称取 0.2g 叶片于 2ml 离心管中, 加入 2 颗小钢珠, 盖好盖后浇液氮速冻, 并迅速置于高通量组织研磨仪进行研磨, 研磨速率为 2000r/m, 研磨时间 1min。如遇未充分研磨的叶片, 则再次浇液氮速冻, 重复研磨 1min。充分研磨后, 加入 2ml 磷酸盐缓冲液(PBS 0.05mol/L Tris-HCl, pH7.4), 使用选择振荡器充分振荡混匀备用。

测试全部采样南京建成生理指标测试试剂盒, 按照试剂盒操作步骤进行测试。其中脯氨酸采用茚三酮法、可溶性糖采用浓硫酸蒽酮反应法、丙二醛采用硫代巴比妥酸法、过氧化氢采用钼酸法、过氧化氢酶采用钼酸铵法、过氧化物酶采用催化过氧化氢反应法、超氧化物歧化酶采用黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应法。

1.3 数据分析

用 SPSS 26.0 统计软件对所得数据进行统计分析, 图表制作运用 Excel 软件。

2 结果与分析

2.1 内转录间隔区(ITS)序列分析

MB 序列测定结果显示，其 PCR 扩增产物长度为碱基 697bp，测序结果登录 NCBI 经 BLAST 比对，比对结果多为马勃属 (*Lycoperdon*) 真菌，下载 18 个相似高的 ITS 序列，用 ClustalW 进行多序列比对，并辅以人工修正后，用 MEGA7.0 软件采用 N-J (Neighbor-Joining) 法构建系统发育树，构建发育树时进行自举检验，重复抽样 1000 次，进化树结果显示 MB 与 DQ112630.1 *Lycoperdon perlatum* voucher MJ4684 序列聚为一支，亲缘关系最近，故将 MB 鉴定网纹马勃。

结合形态特征将该菌种鉴定为网纹马勃 (*Lycoperdon perlatum* Pers.)。

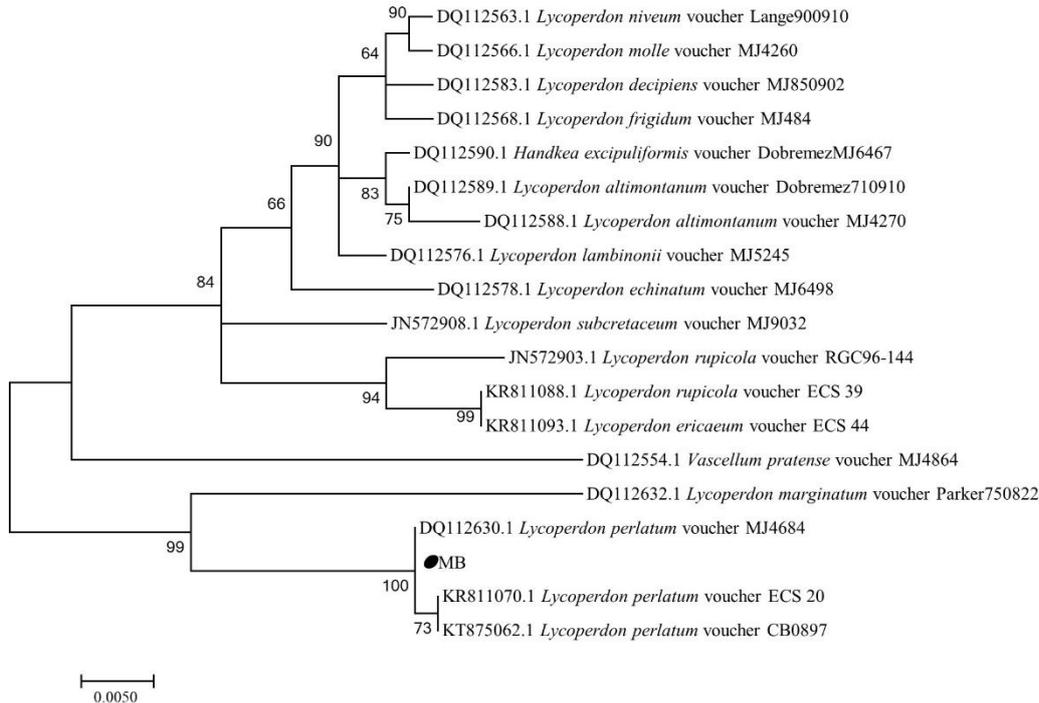


图 1 系统发育树

Figure 1 Genetic evolutionary tree of strain

2.2 网纹 勃对杨树生物量的影响

建立大培养皿共生体系后，杨树组培苗生长显著受到了促进作用，即使尚未形成典型外生菌根时，苗木生长尤其是根系生长发育已经受到了促进（图 2A）。接种网纹马勃对杨树组培苗整株鲜重和根系鲜重均匀显著影响 ($P < 0.05$)，结果显示，接种了网纹马勃的培养皿中的中辽 1 号幼苗整株鲜重极显著高于接种无菌 PDA 琼脂块培养皿中的幼苗鲜重，高出 96.43%（图 2D）；另外，共生体系中幼苗根系重量也显著高于 CK 组，高出 162.07%（图 2E）。

2.3 网纹 勃对杨树根系生长的影响

接种 30d 后，可观察到有幼嫩菌根形成，苗木生长发育已与对照发生鲜明对比。经根系扫描可以发现，接种网纹马勃诱发了大量不定根，根系发育显著强于对照（图 2C）。结果显示接种网纹马勃的杨树根系总长度、根表面积、根体积和根尖数均高于对照组，其中根系总长度比对照组提高 75.71%（图 2F）、根表面积比对照组提高 108.33%（图 2G）、根体积比对照组提高 178.34%（图 2H）、根尖数比对照组提高 88.81%

(图 2I)。

继续培养至 180d 后，由超景深显微镜可以观察到典型的成熟菌根（图 2B），可见网纹马勃可以与杨树共生，形成外生菌根。

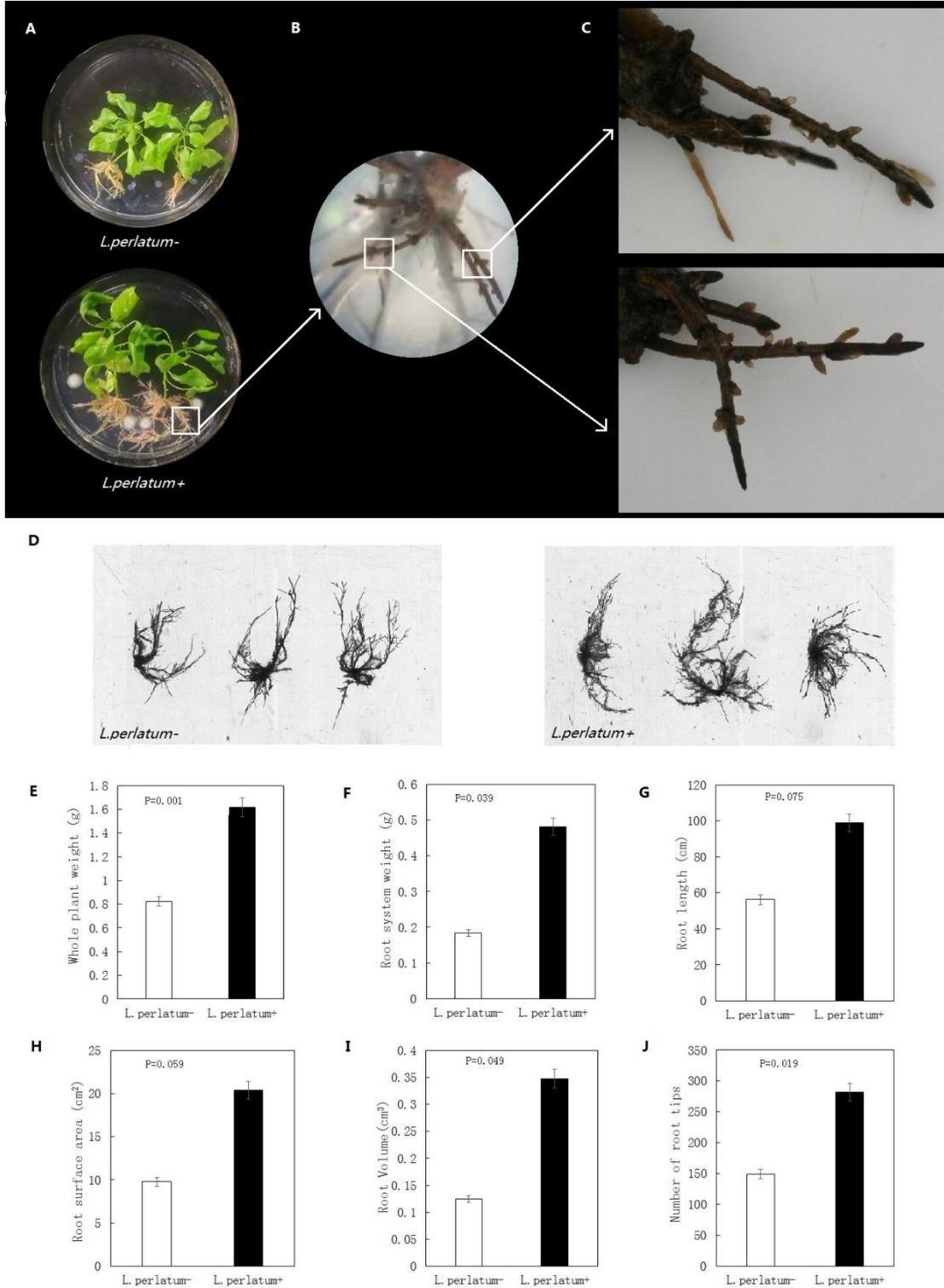


图 2 网纹马勃在中辽 1 号杨中引发外生菌根的发育

Figure 2 The development of ectomycorrhiza in *Populus x canadensis* cv. 'Zhongliao 1'

- (A) 共培养 30 天，不同接种方式下中辽 1 号杨组培苗发育情况
- (B) 共培养 180 天，通过显微镜拍摄的外生菌根的发育情况
- (C) 共培养 180 天，通过超景深显微镜拍摄的外生菌根的发育情况
- (D) 通过根系扫描仪扫描的不同接种方式下根系发育情况
- (E) 不同接种方式下中辽 1 号杨的整株重量。接种组和对照组之间的统计显著性使用独立样本 t 检验计算，以下同。
- (F) 不同接种方式下中辽 1 号杨的根系重量
- (G) 不同接种方式下中辽 1 号杨的根系总长度
- (H) 不同接种方式下中辽 1 号杨的根系总表面积
- (I) 不同接种方式下中辽 1 号杨的根系总体积
- (J) 不同接种方式下中辽 1 号杨的根系总根尖数

2.4 干旱胁迫下网纹 勃对中辽 1 号杨渗透调节物质的影响

经双因素方差分析，脯氨酸含量在接种处理和干旱处理之间有显著的交互作用（表 1），接种处理和干旱处理对 Pro 含量均有显著影响（ $P < 0.001$ ）。随着干旱程度的加重，对照和接种处理均表现出先升高后下降的趋势，其中对照处理在中度干旱时就开始下降，接种处理则在中度干旱时达到最大值，重度干旱时开始下降。在相同干旱条件下，接种网纹马勃后 PRO 含量显著高于对照（图 3A）。

经双因素方差分析，可溶性糖含量在接种处理和干旱处理之间的交互作用不显著（表 1），接种处理和干旱处理对可溶性糖含量均有显著影响（ $P < 0.001$ ）。随着干旱程度的加重，对照和接种处理均表现出先升高后下降的趋势，对照和接种处理均在中度干旱时达到最大值，重度干旱时开始下降。在相同干旱条件下，接种处理可溶性糖含量显著高于对照（图 3B）。

表 1 干旱和接种对中辽 1 号杨渗透调节物质含量的双因素方差分析结果

Table 1 Results of two-factor variance analysis of the effects of drought and inoculation on the content of osmoregulatory substances in *Populus×canadensis* cv. 'Zhongliao 1'

处理 Treatment	脯氨酸		可溶性糖	
	Mean square	F-value	Mean square	F-value
干旱 Drought	5454.87***	1359.96	73.18***	456.03
接种 Inoculation	10686.73***	2664.32	13.16***	81.99
干旱×接种	1941.61***	484.07	0.03 ^{NS}	0.21

注：*、**、***和 NS 分别表示在 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 水平显著和不显著

Note:*,**,and *** and NS indicate significant difference at $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$ levels and non-significant difference respectively.

2.5 干旱胁迫下网纹马勃对中辽1号杨抗氧化体系的影响

2.5.1 干旱胁迫下网纹马勃对中辽1号杨过氧化产物的影响

经双因素方差分析，MDA 含量在接种处理和干旱处理之间有显著的交互作用（表 2），接种处理和干旱处理对 MDA 含量均有显著影响（ $P<0.001$ ）。随着干旱程度的加重，对照和接种处理均表现出持续升高的趋势。在相同干旱条件下，除正常水分条件下差异不显著，其他干旱程度，接种处理 MDA 含量显著低于对照（图 3C）。

经双因素方差分析， H_2O_2 含量在接种处理和干旱处理之间有显著的交互作用（表 2），接种处理和干旱处理对 H_2O_2 含量均有显著影响（ $P<0.001$ ）。随着干旱程度的加重，对照和接种处理均表现出持续升高的趋势。在相同干旱条件下，除正常水分条件下差异不显著，其他干旱程度，接种处理 H_2O_2 含量显著低于对照（图 3D）。

表 2 干旱和接种对中辽1号杨幼苗过氧化产物含量的双因素方差分析结果

Table 2 Results of two-factor variance analysis of the effects of drought and inoculation on the content of peroxide products in *Populus×canadensis* cv. 'Zhongliao 1'

处理 Treatment	MDA		H2O2	
	Mean square	F-value	Mean square	F-value
干旱 Drought	163.97***	1248.80	81120.43***	3070.23
接种 Inoculation	57.75***	439.84	2602.29***	98.49
干旱×接种 Drought ×Inoculation	8.77***	66.75	937.29***	35.47

注：*、**、***和 NS 分别表示在 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.001$ 水平显著和不显著

Note:*,**,and *** and NS indicate significant difference at $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$ levels and non-significant difference respectively.

不同的小写字母表示相同干旱胁迫条件下，不同接种处理的显著性差异 ($P<0.05$)；不同大写字母表示相同接种处理下，不同干旱胁迫的显著性差异 ($P<0.05$). CK: 对照组；MB: 网纹马勃。NW: 正常水分；LS: 轻度干旱胁迫；MS: 中度干旱胁迫；SS: 重度干旱胁迫

2.5.2 干旱胁迫下网纹马勃对中辽1号杨抗氧化酶系统的影响

经双因素方差分析，CAT 活性在接种处理和干旱处理之间有显著的交互作用（表 3），接种处理和干旱

处理对 CAT 活性均有显著影响 ($P < 0.001$)。随着干旱程度的加重, 对照和接种处理均表现出先升高后下降的趋势, 对照和接种处理均在中度干旱时达到最大值, 重度干旱时开始下降。在相同干旱条件下, 接种处理 CAT 活性显著高于对照 (图 3E)。

经双因素方差分析, POD 活性在接种处理和干旱处理之间有显著的交互作用 (表 3), 接种处理和干旱处理对 POD 活性均有显著影响 ($P < 0.001$)。随着干旱程度的加重, 对照和接种处理均表现出先升高后下降的趋势, 对照和接种处理均在中度干旱时达到最大值, 重度干旱时开始下降。在相同干旱条件下, 接种处理 POD 活性显著高于对照 (图 3F)。

经双因素方差分析, SOD 活性在接种处理和干旱处理之间有显著的交互作用 (表 3), 接种处理和干旱处理对 SOD 活性均有显著影响 ($P < 0.001$)。随着干旱程度的加重, 对照和接种处理均表现出先升高后下降的趋势, 对照和接种处理均在中度干旱时达到最大值, 重度干旱时开始下降。在相同干旱条件下, 接种处理 SOD 活性显著高于对照 (图 3G)。

表 3 干旱和接种对中辽 1 号杨抗氧化酶活性的双因素方差分析结果

Table 3 Results of two-factor variance analysis of the effects of drought and inoculation on the autoxidant enzyme activities in *Populus×canadensis* cv. 'Zhongliao 1'

处理 Treatment	CAT		POD		SOD	
	Mean square	F-value	Mean square	F-value	Mean square	F-value
干旱 Drought	3156.36***	1950.56	408.51***	796.74	7699.51***	3701.09
接种 Inoculation	813.64***	502.81	257.87***	502.94	1598.54***	768.41
干旱×接种 Drought ×Inoculation	94.18***	58.20	15.39***	30.02	159.63***	76.73

注: *, **, ***和 NS 分别表示在 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 水平显著和不显著

Note: *, **, and *** and NS indicate significant difference at $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$ levels and non-significant difference respectively.

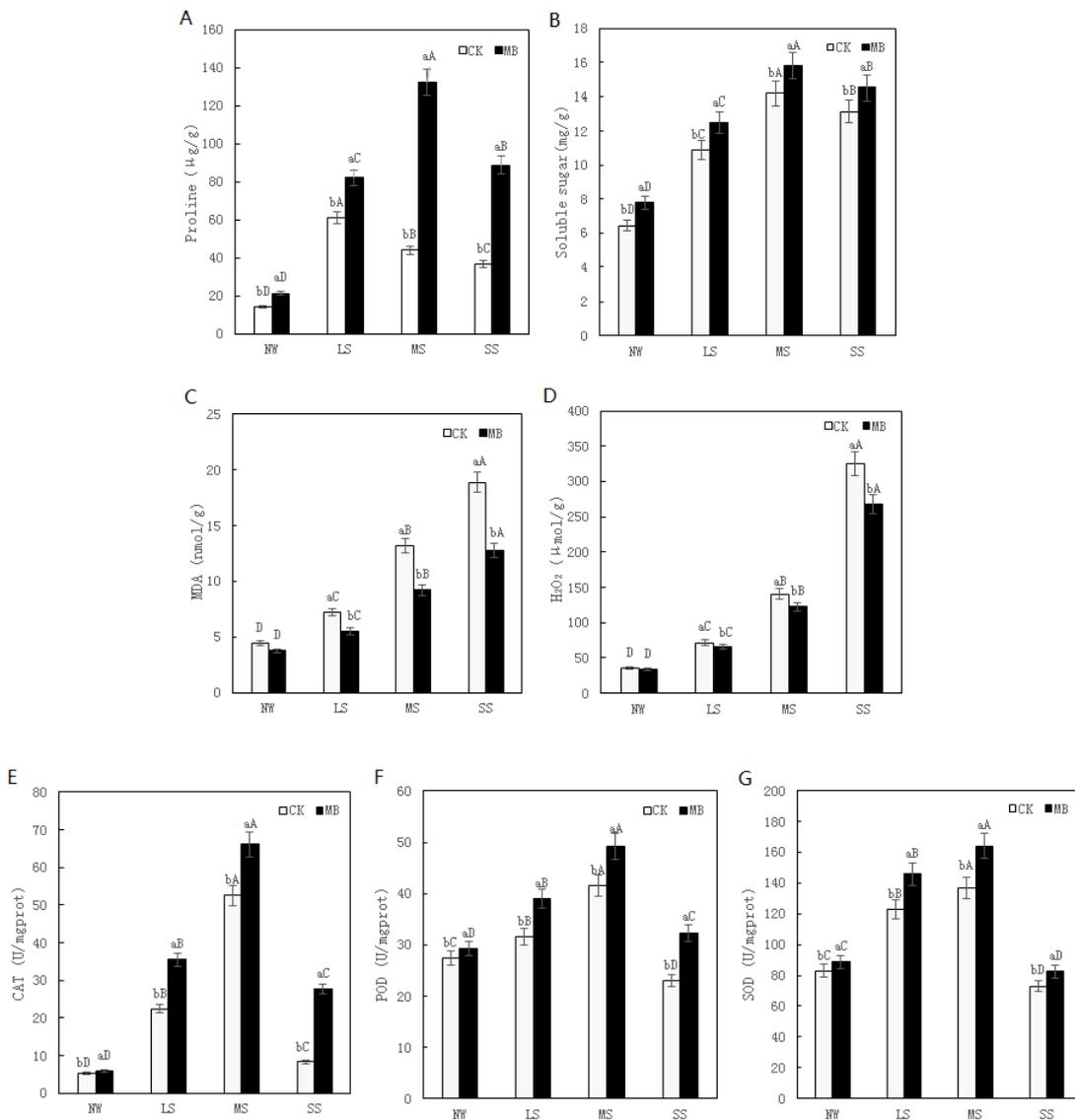


图3 不同干旱胁迫及接种方式下对中辽1号杨发育影响

Figure 3. Effects of different drought stress and inoculation methods on the development of *Populus x canadensis* cv. 'Zhongliao 1'

(A) 不同干旱胁迫下中辽1号杨的脯氨酸含量。不同的小写字母表示相同干旱胁迫条件下，不同接种处理的显著性差异(P<0.05)，使用独立样本 t 检验统计显著性；不同大写字母表示相同接种处理下，不同干旱胁迫的显著性差异(P<0.05)，使用方差分析计算统计显著性。CK:对照组；MB:网纹马勃。NW:正常水分；LS:轻度干旱胁迫；MS:中度干旱胁迫；SS:重度干旱胁迫，以下同。

(B) 不同干旱胁迫下中辽1号杨的可溶性糖含量

(C) 不同干旱胁迫下中辽1号杨的MDA含量

(D) 不同干旱胁迫下中辽1号杨的H₂O₂含量

(E) 不同干旱胁迫下中辽1号杨的CAT活性

(F) 不同干旱胁迫下中辽1号杨的POD活性

(G) 不同干旱胁迫下中辽 1 号杨的 SOD 活性

3 讨论与结论

3.1 讨论

3.1.1 网纹马勃对中辽 1 号杨生长及根系发育的影响

植物生物量是评估 ECM 真菌效应的重要指标 (Kumar et al., 2018), 多项研究表明, 植物和 ECMF 的共生, 能显著提高宿主植物的生物量 (张文泉, 闫伟, 2013), 本研究也表明, 接种网纹马勃可以促进杨树生长和根系发育, 其中根系总长度比对照组提高 75.71%、根表面积比对照组提高 108.33%、根体积比对照组提高 178.34%、根尖数比对照组提高 88.81%。且发现在菌丝和根系尚未有物理接触时, 网纹马勃在与杨树共生的情况下, 就可以促进杨树不定根的生成, 根系发育显著优于对照。根系和菌丝物理接触之前的根际信号分子交流通常称为预侵染阶段或早期共生阶段, 寄主根系释放的关键代谢产物能够诱导菌丝分支或孢子萌芽 (Fries et al., 1987), 吸引真菌朝向寄主根系延伸 (Horan & Chilvers, 1990)。寄主植物在 ECM 早期共生阶段响应真菌信号因子的诱导, 启动免疫反应机制以保证真菌在植物组织内部的适当定殖与互惠共生。真菌与植物在物理接触之前, 通过水溶性信号因子的相互交流与识别, 快速诱导寄主防御反应相关基因和钙信使结合蛋白基因的表达 (倪杨, 2014)。同时, ECM 真菌也会释放出相应的信号分子被寄主识别、接受, 启动其体内一系列基因的表达, 并对根系生长进行调节以刺激生根 (袁志林和陈连庆, 2007)。可见菌根形成前, 外生菌根真菌就可以影响植物的发育。

3.1.2 干旱胁迫下网纹马勃对中辽 1 号杨渗透调节物质的影响

在干旱胁迫环境中, 植物为了减缓由胁迫造成的生理代谢不平衡, 细胞大量积累一些小分子有机化合物, 如脯氨酸、可溶性糖、甜菜碱等以通过渗透调节来降低水势, 维持较高的渗透压, 保证细胞的正常生理功能 (赵江涛等, 2006)。脯氨酸 (Pro) 是植物蛋白质的组分之一, 并可以游离状态广泛存在于植物体中, 除了作为植物细胞质内渗透调节物质外, 还在稳定生物大分子结构、降低细胞酸性、解除氨毒以及作为能量库调节细胞氧化还原等方面起重要作用。可溶性糖主要包括葡萄糖、海藻糖、蔗糖等, 同样在参与渗透调节和维持蛋白质稳定方面起到了重要作用 (邵艳军等, 2006)。干旱胁迫下脯氨酸含量升高, 一方面是由于植物叶片萎蔫而刺激了脯氨酸的合成, 另一方面是因为脯氨酸氧化成谷氨酸的过程受到抑制, 在干旱胁迫下可溶性糖含量的增加, 对原生质体和细胞膜能起到一定的保护作用。大多数菌根植物比非菌根植物具有更好的渗透调节能力 (Ouledali et al., 2018), 可以通过合成参与渗透调节的脯氨酸和可溶性糖来降低渗透势, 以应对干旱胁迫 (Khalil et al., 2020)。本研究中, 接种网纹马勃的处理组在正常水分和干旱胁迫下脯氨酸和可溶性糖的含量都显著高于对照组, 这与 Badia 等人研究一致 (Badia et al., 2022), 可能是因为接种网纹马勃促进了中辽 1 号杨的光合作用, 使植物积累的干物质增多, 渗透调节物质含量也随之增加。尽管渗透调节物质在植物的抗旱机理中发挥了重要的作用, 但随着干旱的持续加重, 其含量也会逐

渐减少，本研究中随着干旱的持续加重，脯氨酸和可溶性糖含量均出现了先升高后下降的趋势，可能是由于干旱胁迫比较严重时，细胞严重失水，破坏了正常的生理活性，导致渗透调节物质的合成的原料和及场所被破坏，渗透调节机制无法正常发挥作用。

3.1.3 干旱胁迫下网纹马勃对中辽1号杨抗氧化体系的影响

植物体内在干旱胁迫下会产生大量活性氧 (ROS)，主要以过氧化氢 (H_2O_2)、超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 和羟基自由基 (OH) 等形式存在，ROS 的过量累积会对植物体造成损伤 (DelRío, 2015)。为了维持体内 ROS 的平衡，植物通过一套由抗氧化酶和非酶抗氧化剂组成的抗氧化系统来对过量的 ROS 进行抵御和清除。植物中的抗氧化酶主要包括 CAT、POD、SOD 等。过氧化氢酶 (CAT) 可促使 H_2O_2 分解为分子氧和水，清除体内的过氧化氢，从而使细胞免于遭受 H_2O_2 的毒害，是生物防御体系的关键酶之一。过氧化物酶 (Peroxidase, POD) 具有消除过氧化氢和酚类胺类毒性的双重作用，也是植物在逆境条件下酶促防御系统的关键酶之一。超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD)，是生物体内清除自由基的首要物质。过氧化物酶 (Peroxidase, POD) 与超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 协同作用，清除体内过剩的自由基，从而提高植物的抗逆性 (He JL, et al. 2011)。在干旱胁迫条件下植物体内为了清除过多的 ROS，抗氧化酶的活性通常均有所提高，而接种菌根真菌能够促进提高植物抗氧化酶活性，从而提高植物的抗旱能力 (Zhang H S, et al. 2011; Wu QS, Zou YN, 2009.)，本研究中，在相同干旱条件下，接种处理三种酶活性显著高于对照。可见，在干旱胁迫下，中辽1号杨本身启动了对干旱的应答反应，提高了抗氧化酶活性，网纹马勃也发挥了一定作用，提高了苗木的抗旱性。但抗氧化酶的活性并不是一直升高的，随着干旱达到一定程度，其活性也会降低 (Liu et al., 2013)。本研究中，随着干旱的加重，抗氧化酶的活性呈现出先上升后下降的趋势，在中度干旱胁迫情况下，酶活性达到最大值，这也与张天泽等人研究一致 (Zhang et al., 2023)，可能是由于随着干旱的持续加重，ROS 不断的积累，超过了细胞有限的抗氧化能力，细胞内环境逐渐紊乱，抗氧化酶系统受到影响，抗氧化酶的活性随胁迫时间的延长逐渐下降 (井大炜等 2013)。

过氧化氢是活性氧 ROS 的重要代表之一，在植物面临环境胁迫时，参与诸多生理反应，大量累积会对植物体造成氧化损伤，而在浓度达到 $10 \mu\text{mol/L}$ 时可以抑制植物光合作用中接近 50% 的碳固定 (Ivanov, 2014)，在干旱胁迫下植物体内通常会形成 H_2O_2 的大量累积。丙二醛 (MDA) 是膜脂过氧化最重要的产物之一，作为氧化终产物，丙二醛会引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合，影响线粒体呼吸链复合物及线粒体内关键酶活性，且具有细胞毒性。可通过 MDA 了解膜脂过氧化的程度，以间接测定膜系统受损程度以及植物的抗逆性 (Azarabadi et al. 2016)。植物体内过量的 ROS 与细胞膜上的磷脂、酶等发生膜脂过氧化反应，而膜脂过氧化反应的过程与其最终产物丙二醛均会对细胞膜造成严重损害 (Sharma et al., 2012)。本研究显示随着干旱程度加重，MDA 与 H_2O_2 含量持续上升，且后期上升速度加快，这可能与胁

胁迫后期抗氧化酶系统活性降低有密切关系,同时不同干旱程度下处理组 MDA 与 H_2O_2 含量均显著低于对照组,这与 Huang 等人的研究一致 (Huang et al., 2020), 说明接种网纹马勃的苗木受到的胁迫程度更轻, 受到了外生菌根的保护。

3.2 结论

菌种鉴定为网纹马勃, 网纹马勃, *Lycoperdon perlatum* Pers., 马勃菌目、马勃菌科、马勃属, 分布范围广泛 (周日宝等, 1994; 蒲训等, 1994; 陈锡林等, 1995; 郭建荣, 2005)^[36-39], 夏秋季林中地上群生, 有时生于腐木上, 幼时可食、成熟后有消肿、止血、解毒作用, 可与云杉、松、栎形成外生菌根, 具有非常高的研究与利用价值。通过本研究发现网纹马勃也可以与杨树形成外生菌根, 并能够促进杨树生长, 且能够通过调节渗透调节物质、提高抗氧化酶活性和清除活性氧积累等手段, 提高杨树在干旱逆境下的抗旱能力。网纹马勃丰富了杨树外生菌根真菌资源, 网纹马勃与杨树的共生效应也为干旱地区杨树栽培提供了理论依据。