

DOI:10.11686/cyxb2025255

http://cyxb.magtech.com.cn

余子欣, 沈为正, 潘高, 等. 锰耐受性种子内生菌筛选及其促进锰胁迫下种子萌发与幼苗生长的研究. 草业学报, 2026, 35(6): 145—154.

YU Zi-xin, SHEN Wei-zheng, PAN Gao, *et al.* Screening of manganese-tolerant endophytic fungi from seeds and their ability to promote seed germination and seedling growth under manganese stress. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(6): 145—154.

锰耐受性种子内生菌筛选及其促进锰胁迫下 种子萌发与幼苗生长的研究

余子欣^{**}, 沈为正^{**}, 潘高, 王雯颖, 刘文胜^{*}

(中南林业科技大学生命科学与技术学院, 湖南长沙 410004)

摘要:本研究以前期从湘潭锰矿植物种子获得的 4 种优势可培养种子内生真菌及大叶胡枝子、五节芒、青葙和藜这 4 种不同生活型的植物种子为材料, 开展真菌锰耐受性试验以及接种内生菌对锰胁迫下种子发芽与幼苗生长影响的试验。研究结果显示, 4 种内生真菌相比较, 链格孢霉在高锰胁迫下的菌落直径、生物量变化最小。该菌的最小抑菌浓度为 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mn^{2+} 吸附率达 75.6%, 高于其他 3 株真菌, 这说明链格孢霉锰耐受性最强。接种链格孢霉提高了锰胁迫下大叶胡枝子、五节芒、青葙和藜的种子发芽率与发芽势, 促进了幼苗生长。高 Mn^{2+} 浓度 ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 时, 大叶胡枝子、五节芒、青葙、藜的接种组发芽率分别较非接种组提高 4.9%、12.9%、88.9%、93.3%, 总生物量则分别较非接种组提高 4.0%、117.1%、31.5%、35.7%。这说明链格孢霉对胁迫下种子发芽与幼苗生长的促进作用具有广谱性。

关键词: 锰胁迫; 种子内生菌; 种子萌发; 幼苗生长; 耐受性

Screening of manganese-tolerant endophytic fungi from seeds and their ability to promote seed germination and seedling growth under manganese stress

YU Zi-xin^{**}, SHEN Wei-zheng^{**}, PAN Gao, WANG Wen-yin, LIU Wen-sheng^{*}

School of Life Sciences and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

Abstract: In this study, we first evaluated the tolerance of endophytic fungi isolated from seeds of several plant species to manganese (Mn) stress, and then determined whether they were able to promote the growth of the same plants under Mn stress. Four culturable dominant endophytic fungi (*Corynespora cassiicola*, *Curvularia lunata*, *Pestalotiopsis microspora*, and *Alternaria* sp.) that had previously been isolated and screened from seeds of plants growing at a Mn mine in Xiangtan were used in this study. These fungi had been isolated from seeds of plants belonging to different life forms (*Lespedeza davidii*, a shrub; *Miscanthus floridulus*, a giant grass; *Celosia argentea*, a tropical herbaceous plant; and *Chenopodium album*, an annual flowering plant). The Mn tolerance of the seed endophytic fungi was evaluated, and then their ability to promote seed germination and growth of the four plant species under Mn stress was evaluated. When the fungi were grown under control conditions and under Mn stress, the colony diameter and the biomass of *Alternaria* sp. changed the least among the four endophytic fungi (*C. cassiicola*, *C. lunata*, *P. microspora*, and *Alternaria* sp.). For *Alternaria* sp., the minimum inhibitory

收稿日期: 2025-06-26; 改回日期: 2025-09-01

基金项目: 国家自然科学基金(42177018)和湖南省大学生创新项目(S202410538069)资助。

作者简介: 余子欣(2004—), 女, 浙江衢州人, 在读本科。E-mail: 2941788420@qq.com; 沈为正(2000—), 男, 湖南临湘人, 在读硕士。E-mail: 2354350858@qq.com。 ** 共同第一作者 These authors contributed equally to this work.

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: liuwsairr@163.com

concentration of Mn was $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and the Mn^{2+} adsorption rate was 75.6%; these values were higher than those determined for the other three endophytic fungi. These findings indicated that *Alternaria* sp. had the strongest Mn tolerance. In addition, under Mn stress, inoculation with *Alternaria* sp. increased the seed germination rates and germination potential of *L. davidii*, *M. floridulus*, *C. argentea*, and *C. album*, and promoted their seedling growth. The seed germination rates of the inoculated group of *L. davidii*, *M. floridulus*, *C. argentea*, and *C. album* were 4.9%, 12.9%, 88.9%, and 93.3% higher, respectively, than those of the non-inoculated group, and the total biomasses of the inoculated group were 4.0%, 117.1%, 31.5%, 35.7% higher, respectively, than those of the non-inoculated group. The results show that *Alternaria* sp. can promote seed germination and seedling growth of many plant species under stress. Consequently, this fungal strain is a promising candidate strain for environmental remediation.

Key words: Mn stress; seed endophytic fungi; seed germination; seedling growth; tolerance

锰污染生态治理是当前锰矿区的一个重要课题^[1]。利用锰耐受性强的植物修复污染矿区植被是一种绿色高效的矿区治理方式。种子发芽与幼苗生长是植物对环境最敏感的阶段,是成功进行植物修复的关键^[2-3]。然而,高浓度重金属胁迫下种子发芽与幼苗生长往往会受到严重抑制^[4-5]。种子内生菌定殖于种子内部,与种子之间形成共生关系。胁迫条件下,它能够提高种子活力、发芽率,促进幼苗生长,从而增强植物对胁迫的耐受性^[6]。因此,探索种子内生真菌的重金属耐受性及其对种子发芽和幼苗生长阶段植物重金属耐受性的效应,对利用重金属耐受性植物治理矿区污染具有重要意义^[7]。

矿区许多植物种子内生菌具有较强的重金属耐受性,能够在多种植物种子内部生活,并与植物共生,促进重金属胁迫下的种子发芽与幼苗生长。优选出这些种子内生真菌并揭示其对植物的促生作用是矿区植物修复的关键环节。在重金属污染条件下,菌株对重金属的耐受性,是筛选可修复重金属土壤且具有联合超富集作用的植物内生菌的首要指标^[8-9]。例如,研究发现,接种耐受性内生真菌的醉马草(*Achnatherum inebrians*)种子在锰(Mn^{2+})胁迫下,其发芽率与发芽指数均显著大于未接种内生真菌的种子^[8]。李柯等^[10]研究表明,在高浓度铅(Pb)胁迫下,侵染耐受性较强的内生真菌(*Epichloë guerinii*)的德兰臭草(*Melica transsilvanica*)种子比未侵染该真菌的种子发芽率更高,幼苗生物量更高。然而,有关内生真菌影响重金属胁迫下植物种子发芽的研究较少,且仅聚焦于内生真菌对重金属条件下单一物种种子发芽的影响,而有关真菌对重金属条件下多种植物种子发芽影响的研究鲜有报道^[7,11]。

矿区自然生长的优势植物具有重金属耐受性强的优点,是矿区植物修复的主要候选植物。这些植物包括灌木、多年生草本和一年生草本植物等不同生活型。例如,大叶胡枝子(*Lespedeza davidii*)为豆科灌木,该植物在我国分布广泛,具有抗逆性强,能生物固氮等优点,是重金属植物修复的重要候选植物^[3]。五节芒(*Miscanthus floridulus*)为禾本科多年生草本植物,具有生物量大、抗逆性强、生长迅速等特点,在矿区分布广泛。并且该植物对镉(Cd)、锌(Zn)和锰(Mn)等重金属均有较强的耐受性^[12]。再如,藜(*Chenopodium album*)和青葙(*Celosia argentea*)等一年生草本植物均为矿区广泛分布且对锰耐受性强的植物,其中,青葙为锰超富集植物。这4种不同生活型的植物均为湘潭锰矿废弃地自然生长的优势植物,研究锰胁迫下内生真菌对这些植物种子发芽与幼苗生长的影响对利用它们开展植物修复具有非常重要的理论与实践价值。

本研究采用可培养法从湘潭锰矿区常见植物中筛选种子内生菌,并接种到大叶胡枝子、五节芒、藜、青葙这4种不同生活型且在矿区分布广泛的植物种子内,在锰胁迫下开展种子发芽与幼苗生长试验,揭示内生菌对种子发芽与幼苗生长的影响,为利用植物协同微生物进行土壤重金属锰污染的植物修复实践提供理论证据。

1 材料与方法

1.1 锰耐受性内生真菌的筛选

真菌材料:参试的4株可培养内生真菌分别为多主棒孢霉(*Corynespora cassicola*)、新月弯孢霉(*Curvularia*

lunata)、小孢拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis microspore*)和链格孢霉(*Alternaria* sp.),分别简称为YM-1、YM-2、YM-3、YM-4。这4株菌株均为课题组前期从湘潭锰矿自然生长的植物种子中分离获得,为植物种子内的优势真菌。

真菌锰耐受性检测:参照Choo等^[13]的方法于2023年12月份在中南林业科技大学植物学实验室进行。利用 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 配制含锰母液,灭菌后加入马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA;每L培养基含200~300 g马铃薯的浸出液、葡萄糖20 g、琼脂粉20 g),配制不同 Mn^{2+} 浓度(0、5、10、15、20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)溶液。培养5 d后用打孔器($D=8$ mm)从4种参试内生菌菌落边缘打取菌饼,接种至上述不同 Mn^{2+} 浓度的PDA平板上。培养3 d,用十字交叉法测定内生真菌在不同 Mn^{2+} 浓度下的菌落直径^[14]。

制作不同 Mn^{2+} 浓度的PDA培养基来测定 Mn^{2+} 的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。在28℃下培养7 d,直至菌落停止长出,终止转接,此时的 Mn^{2+} 浓度即为锰对菌株的MIC值。

菌丝生物量测定:参照贾彤等^[15]的方法。利用打孔器($D=8$ mm)在PDA培养基上打取菌饼,将菌饼置于马铃薯葡萄糖水培养基(potato dextrose broth, PDB;每L培养基含200~300 g马铃薯的浸出液、葡萄糖20 g)中培养3 d。然后吸取1 mL菌液放入0、5、10、15、20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 等5个 Mn^{2+} 浓度的PDB培养基中。每个浓度设置3个重复,培养3 d。培养结束后,用灭菌滤纸过滤收集菌丝,于65℃下烘干称重,利用分析天平(BSA124S,上海市赛多利斯有限公司)测定菌丝生物量。

Mn^{2+} 吸附率检测:参照Colpaert等^[16]的方法。将菌株在PDB培养基上培养2 d。取1 mL菌液置于1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mn^{2+} 浓度的PDB培养基中。将起始菌液的吸光度调节至 $\text{OD}_{600}=1$ 后,置于恒温振荡培养箱(ZQZY-80AS,上海知楚仪器有限公司)中,25℃、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养2 d,设置3个重复。2 d后取出每个PDB培养基中的菌液,利用AA-7000火焰原子分光光度计(北京东西分析仪器公司)测定其吸光度,计算 Mn^{2+} 吸附率。计算公式如下:

$$\text{吸附率}(\%) = (C - C_0) \div C \times 100$$

式中: C 为重金属初始浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); C_0 为取样时测得的重金属残余浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

1.2 种子发芽试验

1.2.1 试验材料 参试种子为2023年11月采集于湖南省湘潭市锰矿废弃地的大叶胡枝子、五节芒、青葙和藜的成熟期植株。种子采集地地理位置为北纬27°58′,东经112°51′,海拔26 m。该区土壤锰含量达52319.25 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。为使研究结果更具有代表性,于每一参试植物的分布区随机选择植株各50株,株间距离至少2 m,于不同植株上采集种子,并形成混合种子样品。种子带回实验室后室温中自然风干,然后在混合种子样品中随机挑选1000粒饱满、无霉变和虫咬的种子作为该物种参试种子的试验样品。装入纸质种子袋中室温保存。

1.2.2 接种试验 参照Geisen等^[17]的方法对种子进行彻底灭菌。即先将大叶胡枝子、五节芒、青葙、藜的种子用3%的HCl浸泡1 min,然后用10%的NaClO浸泡5 min,再用无菌水冲洗干净。

将内生真菌菌株在PDB培养基中培养,吸取发酵液置于无菌锥形瓶中,将灭菌后的种子置于其中浸泡过夜,制备接菌种子。与之对照,吸取无菌PDB培养基置于无菌锥形瓶中,将另一部分灭菌种子在其中浸泡过夜,制备非接菌种子。

1.2.3 萌发试验 将浸泡后的种子取出,放入装有无菌滤纸的培养皿中,每个培养皿中放置20粒种子。参照王悟敏等^[5]的方法,共设置5个 Mn^{2+} 浓度(0、5、10、15、20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。同时设置接菌和不接菌两个处理组。每个处理各设置5个重复,每种植物共计放置1000粒种子(5个浓度 \times 2个接菌组合 \times 20粒种子 \times 5个重复)。预试验结果显示,五节芒种子对锰胁迫的耐受性较高,在较高的 Mn^{2+} 浓度下仍有较高的发芽率,为更好地揭示其发芽特征,本研究增加设置了2个 Mn^{2+} 浓度(25、30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),每个处理5个重复。共计增加400粒种子(2个浓度 \times 2个接菌组合 \times 20粒种子 \times 5个重复)。

种子之间保持适当的间距,以避免相互之间的影响。预试验结果显示,各植物种子在28℃时发芽率最高,因此本试验将种子发芽温度设置为28℃。将已处理好的种子放置到(28 \pm 1)℃的光照培养箱中培养(光照12 h,黑暗12 h),培养期间及时添加锰溶液以保持滤纸湿润,隔天观察种子发芽情况。以胚根达到种子长度的1/2时为

种子发芽的标志,连续5 d内没有新种子发芽时发芽结束。由于25 d后各植物种子均无新的发芽,因此本发芽试验持续时间为30 d。培养30 d后,计算发芽率、发芽势,测量幼苗芽长和根长及干重。

$$\text{发芽率} = 30 \text{ d 正常发芽种子数} / \text{总种子数} \times 100\%$$

$$\text{发芽势} = 13 \text{ d 正常发芽种子数} / \text{总种子数} \times 100\%$$

1.3 数据分析

通过Excel 2022录入试验数据。利用SPSS 19.0软件对菌落直径、菌丝生物量、种子发芽率、发芽势、幼苗生物量等进行数据分析,得出平均值与标准差;对菌落直径、菌丝生物量、种子发芽率、发芽势、幼苗生物量等指标,先进行方差齐性检验($P > 0.05$ 满足方差齐性),再对数据进行双因素方差分析(two-way ANOVA),采用LSD法检验差异显著性。利用Sigmaplot 14.0制图。

2 结果与分析

2.1 种子内生真菌的锰耐受性

2.1.1 菌落直径 试验结果显示,随着 Mn^{2+} 浓度的升高,4种真菌的菌落直径均随之减少($P < 0.05$);与对照相比,浓度为 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时菌落直径分别下降了19.03%、49.80%、28.69%、18.89%(表1)。高 Mn^{2+} 浓度下($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),YM-4(链格孢霉)菌落直径大于其他3个菌株,这说明菌株链格孢霉对锰胁迫具有较高的耐受能力(表1)。

表1 4个种子内生菌菌株在不同 Mn^{2+} 浓度下的菌落直径

Table 1 Colony diameter of four seed endophytic fungi under different Mn^{2+} concentrations (cm)

菌株 Strain	Mn^{2+} 浓度 Mn^{2+} concentration ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)				
	0	5	10	15	20
YM-1	7.20±0.10a	7.03±0.06ab	6.90±0.26ab	6.77±0.32b	5.83±0.15c
YM-2	7.63±0.06b	8.17±0.15a	6.80±0.26c	4.20±0.10d	3.83±0.06e
YM-3	7.53±0.06a	7.03±0.25b	7.20±0.20ab	6.60±0.20c	5.37±0.21d
YM-4	9.00±0.00a	9.00±0.00a	8.57±0.12b	7.63±0.15c	7.30±0.10d

注:同行不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。下同。

Note: Different small letters in the same row indicate significant difference among different treatments ($P < 0.05$). The same below.

2.1.2 最小抑菌浓度及锰离子吸附率 在所检测的4个菌株中,YM-1、YM-2、YM-3、YM-4的最小抑菌浓度分别为40、30、40和50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。YM-4(链格孢霉)的最小抑菌浓度高于其他3个菌株,说明其耐受性最强(表2)。

不同菌株在 Mn^{2+} 浓度相同时吸附率不一样,YM-1、YM-2、YM-3、YM-4的 Mn^{2+} 吸附率分别为57.0%、62.8%、72.6%与75.6%。YM-4对锰离子的吸附率高于其他3个菌株(表2)。

2.1.3 菌株生物量 由表3可知,4个菌株均表现为随着 Mn^{2+} 浓度的升高,内生真菌生物量不断减少($P < 0.05$);与对照相比,浓度为 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时4个菌株的菌丝生物量分别下降了50.89%、72.97%、65.57%、29.49%,高锰胁迫下链格孢霉生物量下降幅度最小。高锰浓度下($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),YM-4(链格孢霉)生物量高于其他3种真菌,这说明菌株链格孢霉对锰胁迫具有较高的耐受能力(表3)。

表2 4个种子内生菌菌株的最小抑菌浓度及锰离子吸附率

Table 2 Minimum inhibitory concentration (MIC) and manganese ion adsorption rate of four endophytic fungi in seeds

菌株 Strain	锰离子吸附率 Mn^{2+} adsorption rate (%)	最小抑菌浓度 Minimum inhibitory concentration (MIC, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
YM-1	57.0	40
YM-2	62.8	30
YM-3	72.6	40
YM-4	75.6	50

表 3 不同锰浓度下 4 个种子内生真菌菌丝的生物量

Table 3 Biomass of four seed endophytic fungi under different manganese concentrations (mg)

菌株 Strain	Mn ²⁺ 浓度 Mn ²⁺ concentration (mmol·L ⁻¹)				
	0	5	10	15	20
YM-1	131.00±4.58a	117.33±4.93b	108.00±2.00b	93.00±3.61c	64.33±11.59d
YM-2	148.00±5.00b	157.67±4.04a	100.67±3.06c	63.00±4.58d	40.00±2.65e
YM-3	122.00±8.72a	95.67±2.08b	64.00±1.00c	54.00±1.00d	42.00±3.00e
YM-4	187.67±2.31a	186.67±5.03a	167.67±4.51b	146.33±5.13c	132.33±3.79d

2.2 种子内生真菌对种子发芽阶段植物锰耐受性的影响

本研究结果显示,发芽试验开始第 2 天后五节芒、青葙种子开始发芽,第 3 天大叶胡枝子、藜种子开始发芽;第 22 天后五节芒、青葙无种子发芽,第 25 天后大叶胡枝子、藜无种子发芽。

研究结果显示,大叶胡枝子的发芽率为 82.3%~93.2%,五节芒发芽率为 52.5%~92.5%,青葙发芽率为 30.0%~76.7%,藜发芽率为 15.4%~66.3%。双因素分析结果显示,除内生菌感染对大叶胡枝子的发芽率(图 1A)及藜的发芽势(图 1H)、锰胁迫对青葙的发芽率无显著影响外,锰胁迫和内生菌感染对其余各组发芽率或发芽势均有显著或极显著影响(图 1)。随着 Mn²⁺浓度的增加,接菌组与非接菌组的大叶胡枝子(图 1A 和图 1E)、五节芒(图 1B 和图 1F)、藜(图 1D 和图 1H)的发芽率和发芽势均下降显著(P<0.05)。相同 Mn²⁺浓度下,大叶胡枝子(图 1E)、五节芒(图 1B 和图 1F)、青葙(图 1G)、藜(图 1D)大部分接菌组的发芽率和发芽势高于非接菌组(P<0.05)。其中,高浓度(20 mmol·L⁻¹)时,大叶胡枝子、五节芒、青葙、藜接菌组发芽率分别较非接菌组高 4.9%、12.9%、88.9%、93.3%。

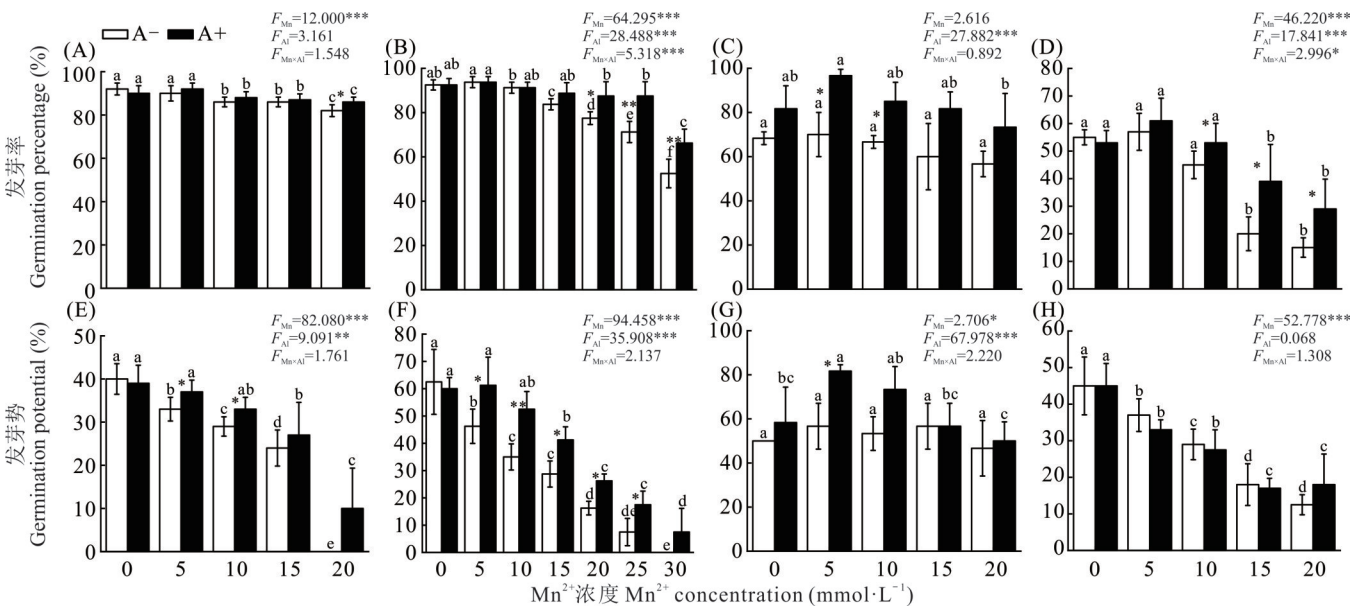


图 1 锰胁迫和内生真菌感染对 4 种植物种子发芽率与发芽势的影响

Fig. 1 Effects of Mn stress and endophyte infection on seed germination rate and germination potential of four plants

A、E 表示大叶胡枝子, B、F 表示五节芒, C、G 表示青葙, D、H 表示藜; A+ 或 A- 表示内生菌感染或不感染; 不同小写字母表示不同锰胁迫下带菌或不带菌种子间差异显著(P<0.05); * 表示同一 Mn²⁺浓度下接菌组与非接菌组差异显著(P<0.05), ** 表示同一 Mn²⁺浓度下接菌组与非接菌组差异极显著(P<0.01)。下同。A, E indicate *L. davidii*, B, F indicate *M. floridulus*, C, G indicate *C. argentea* and D, H indicate *C. album*. A⁺ or A⁻ indicate *Alternaria* sp. infected seeds or *Alternaria* sp. free seeds. Different small letters indicate significant difference among different Mn concentrations of the inoculation seeds or the non-inoculation seeds (P<0.05). * indicates significant difference between the inoculation group and the non-inoculation group of the same Mn²⁺ concentration (P<0.05); ** indicates significant difference between the inoculation group and the non-inoculation group of the same Mn²⁺ concentration (P<0.05). The same below.

2.3 种子内生真菌对幼苗生长阶段植物锰耐受性的影响

2.3.1 幼苗芽长与根长 双因素分析结果显示,除内生菌侵染对五节芒的芽长(图2B)、青箱的根长(图2G)无显著影响外,锰胁迫和内生菌侵染对其余各组芽长或根长均有显著影响(图2)。研究结果显示,随着 Mn^{2+} 浓度升高,接菌组与未接菌组的大叶胡枝子(图2A和图2E)、五节芒(图2B和图2F)、青箱(图2C和图2G)和藜(图2D和图2H)的芽长、根长均呈现下降的趋势($P < 0.05$);当 Mn^{2+} 浓度高于 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,大叶胡枝子(图2A和图2E)、青箱(图2C和图2G)、藜(图2D和图2H)接菌组在相同 Mn^{2+} 浓度时,其根长、芽长均大于非接菌组。其中,高浓度($20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)时,大叶胡枝子、五节芒、青箱、藜接菌组根长分别较非接菌组高 21.3% 、 65.8% 、 27.4% 、 11.1% ,芽长分别较非接菌组高 0.3% 、 7.8% 、 35.3% 、 35.7% 。

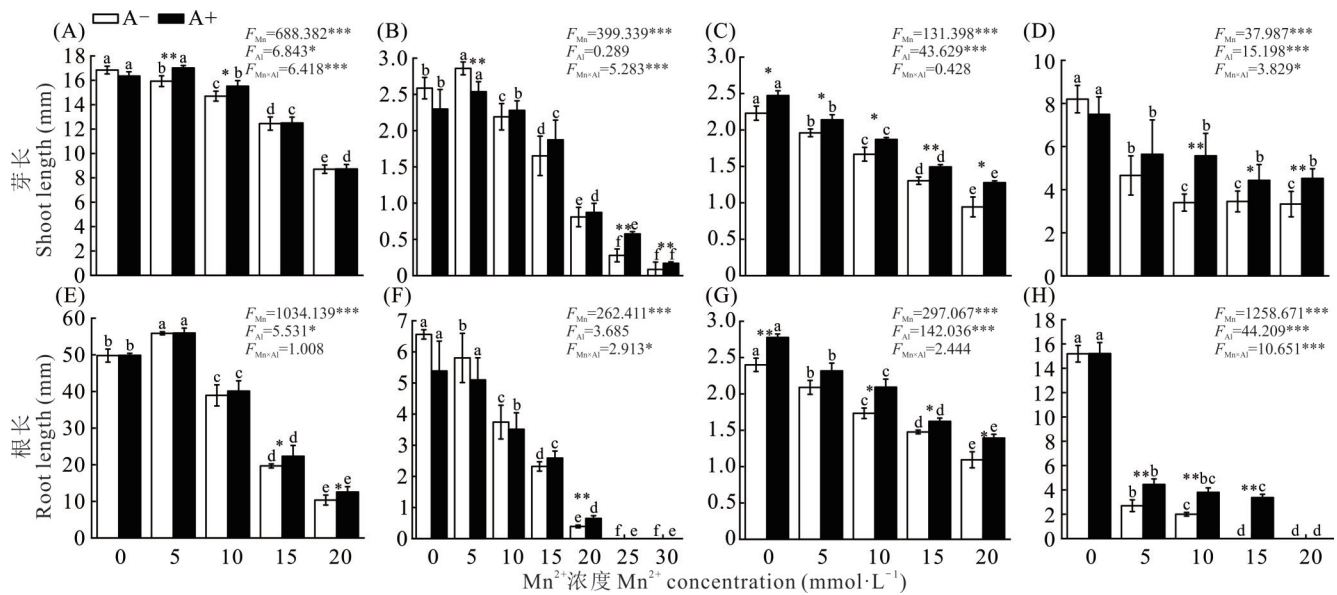


图2 锰胁迫和内生真菌侵染对4种植物幼苗芽长与根长的影响

Fig. 2 Effects of Mn stress and endophyte infection on shoot length and root length of four plants

2.3.2 幼苗生物量 双因素分析结果显示,除内生菌侵染对大叶胡枝子的芽生物量(图3A)和根生物量(图3E)、五节芒的芽生物量(图3B)无显著影响外,锰胁迫和内生菌侵染对其余各组生物量均有显著或极显著影响(图3)。随着 Mn^{2+} 浓度升高,接菌组与未接菌组的大叶胡枝子(图3A,图3E和图3I)、五节芒(图3B,图3F和图3J)、青箱(图3C,图3G和图3K)和藜(图3D,图3H和图3L)的芽生物量、根生物量、总生物量均下降($P < 0.05$);当 Mn^{2+} 浓度高于 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,五节芒、青箱、藜接菌组在相同 Mn^{2+} 浓度下,其根生物量、芽生物量均高于非接菌组($P < 0.05$)。其中,高浓度($20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)时,大叶胡枝子、五节芒、青箱、藜接菌组的芽生物量分别较非接菌组高 0.5% 、 96.4% 、 33.9% 、 225.0% ,根生物量分别较非接菌组高 36.4% 、 161.5% 、 29.6% 、 15.4% ,总生物量分别较非接菌组高 4.0% 、 117.1% 、 31.5% 、 35.7% 。

3 讨论

3.1 参试内生真菌的锰耐受性

矿区许多植物的种子内生菌具有较强的耐受重金属的能力。菌株对重金属的耐受性越强,其对植物修复能力的促进作用越强^[18]。与细菌相比,真菌呈丝状生长且生长速度快,生物量大,其重金属耐受能力优于内生细菌^[15]。因而,优选重金属耐受性强的内生真菌具有重要意义。本研究结果表明锰胁迫下内生真菌链格孢霉的菌落直径、生物量均高于其他3种内生真菌,且该菌株在高锰胁迫下各项指标变化较小;该菌最小抑菌浓度达 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 Mn^{2+} 吸附率达 75.6% ,在这4种菌中均最高,这充分说明该菌具有较强的锰耐受能力。这与镉(Cd)胁迫对内生真菌 *Fusarium* sp. 的影响结果类似^[19]。一般来说,耐受性越强的真菌与植物共生越能促进植物在胁迫

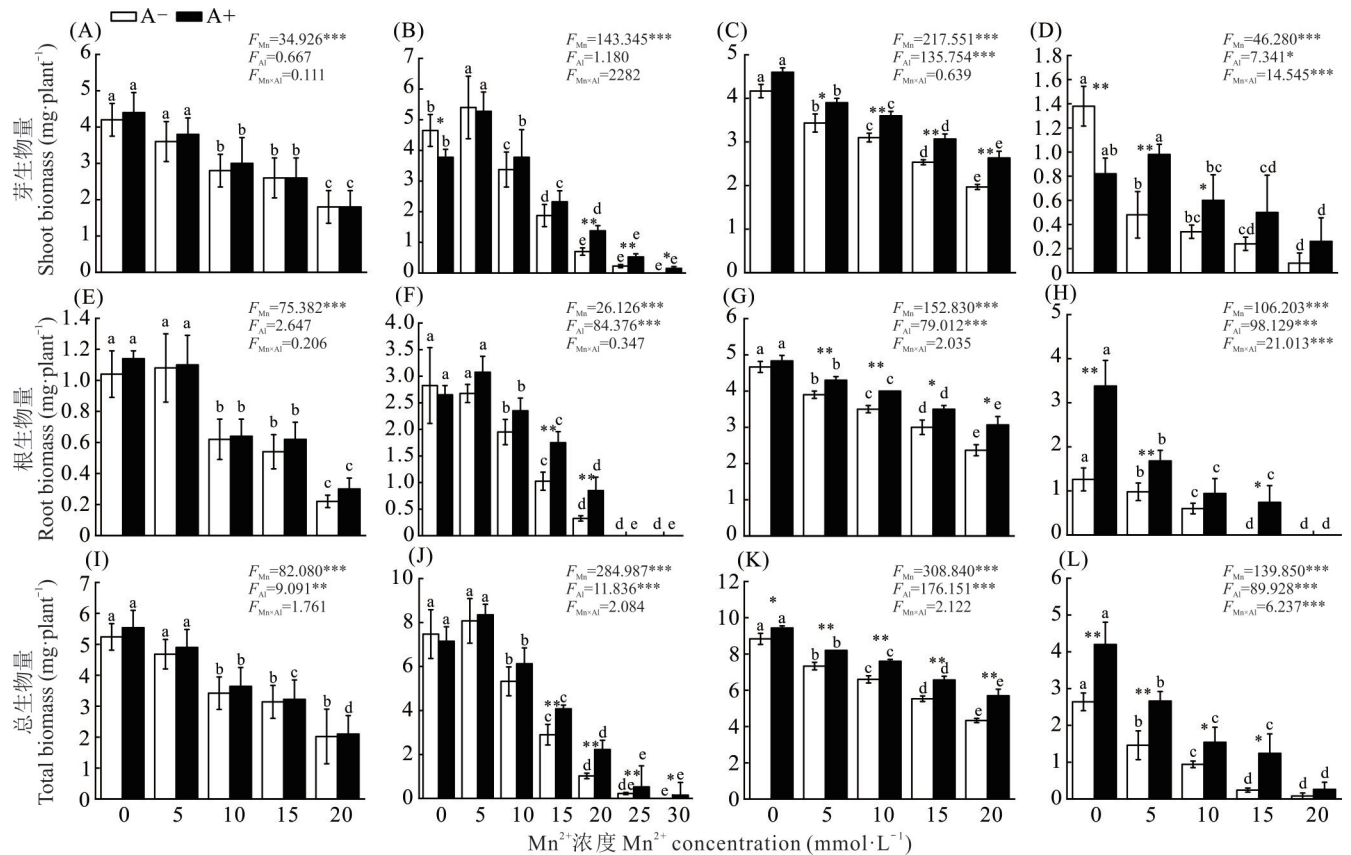


图3 锰胁迫和内生真菌侵染对4种植物芽生物量、根生物量与总生物量的影响

Fig. 3 Effects of Mn stress and endophyte infection on shoot biomass, root biomass and total individual biomass of four plants

A、E、I表示大叶胡枝子，B、F、J表示五节芒，C、G、K表示青箱，D、H、L表示藜。A、E、I indicate *L. davidii*, B、F、J indicate *M. floridulus*, C、G、K indicate *C. argentea*, and D、H、L indicate *C. album*.

条件下的生存，具有广泛的应用前景^[20]；另外，其他研究也显示链格孢霉分布广泛，许多菌株具有较强的重金属耐受性。例如，台喜生等^[18]研究显示金属矿区植物内生真菌中链格孢属(*Alternaria*)分布较广。这进一步说明链格孢霉是一种锰耐受性强、吸附率高具有广阔应用范围的内生真菌。

3.2 锰胁迫和内生真菌侵染对种子发芽的效应

种子发芽是植物种群形成和持续更新的关键时期，也是植物对外界逆境响应最敏感的时期^[7]。内生真菌能够促进种子发芽，较高的发芽率能使带菌植物快速建植，从而赢得生长的空间和竞争优势，为植被快速恢复及污染治理提供了可能^[21]。本研究结果显示，内生真菌链格孢霉能够提高锰胁迫下大叶胡枝子、五节芒、青箱、藜这4种不同生活型植物种子的发芽率与发芽势。张鹏等^[11]研究表明，随着盐浓度的增加，紫花荆茅(*Stipa purpurea*)的种子发芽率、发芽势不断降低；而接种内生真菌则抑制了其下降趋势。旷宇等^[22]也发现内生真菌感染会提高NaCl胁迫下中华羊茅(*Festuca sinensis*)的种子发芽率。陈振江等^[23]研究发现，内生真菌侵染显著提高了低pH值(4.47~6.12)下黑麦草(*Lolium perenne*)的发芽率。李春杰等^[24]对醉马草耐盐性的研究表明，在中高盐浓度下，内生真菌的侵染可以显著提高醉马草的种子发芽率。本研究结果与这些研究结果^[11,22-24]一致，这说明内生真菌感染种子并与其共生后，可缓解胁迫对种子发芽的抑制作用，提高种子发芽率与发芽势，显著提高种子发芽阶段植物对胁迫的耐受性^[25]。其原因可能是内生真菌促进植物种子的细胞渗透能力，增加抗氧化酶活性，从而保护锰胁迫环境下植物种子的细胞膜免于受损，维持细胞内外离子含量平衡，促使种子处于水分充盈环境，从而保证植物能完成种子发芽^[26]。

值得一提的是，参试本研究的内生真菌链格孢霉对锰胁迫下湘潭锰矿广泛分布的大叶胡枝子、五节芒、青箱、藜这4种不同生活型(灌木、多年生草本与一年生草本)植物的种子发芽均有促进作用。这种内生真菌对胁迫下

种子发芽的促进功能也在 Qiang 等^[27]的研究中证实。研究发现链格孢霉对非胁迫条件下的托马斯黄芪 (*Astragalus utahensis*)^[28]、沙地云杉 (*Picea mongolica*)^[29] 种子发芽也有促进作用。这说明该内生真菌对多种植物胁迫与非胁迫条件下的植物种子发芽均有促进作用。研究显示,种子发芽特性受植物生活型影响,木本植物、多年生草本植物、一年生草本植物之间发芽率均存在显著差异^[30-33]。尽管不同生活型的植物种子发芽率存在差异,但本研究显示链格孢霉对不同生活型植物种子的发芽均有促进作用,说明该菌的作用具有广谱性。另一方面,一些研究显示,内生真菌对植物的共生作用具有物种特异性。例如,镰刀菌属 (*Fusarium* sp.) 对燕麦 (*Avena sativa*) 种子发芽有促进作用^[6],而对小叶兜兰 (*Paphiopedilum barbigerrum*) 种子发芽则有抑制作用^[34]。本研究结果与该结果不一致。这可能与内生真菌和植物互作产生的代谢产物有关。内生真菌存在于植物体内,经过长期进化后一部分真菌可能与植物形成共生关系,而另一部分真菌则在特定条件下会对寄主植物产生不利影响^[6]。总而言之,一方面,链格孢霉对胁迫下植物的促进作用具有广谱性;另一方面,链格孢霉真菌在许多植物体内广泛存在,这说明该菌在矿区植物修复中可应用于多种植物。

3.3 锰胁迫和内生真菌侵染对幼苗生长的效应

本研究结果显示,内生真菌链格孢霉能够提高锰胁迫下大叶胡枝子、青苜蓿、五节芒、藜这4种不同生活型植物的芽长、根长及幼苗生物量。王桔红等^[35]研究发现贫铜菌 HXC-8 对铜 (Cu) 具有一定的耐受性,能够降低环境中游离态 Cu^{2+} 的浓度,可减缓铜对含羞草 (*Mimosa pudica*) 生长的胁迫。陈振江等^[23]研究发现,内生真菌侵染显著提高了低 pH 值 (4.47~6.12) 下黑麦草的胚芽长和干重。张鹏等^[11]研究表明,随盐浓度的增加,紫花针茅幼苗和胚根生长的抑制强度增加。本研究结果与这些结果一致^[11,23,35],表明内生真菌的存在使多种植物具有更宽泛的重金属适应度,从而有利于其在胁迫条件下生长^[23]。其原因可能是真菌会产生激素,可通过分泌包括吲哚乙酸 (indole acetic acid, IAA) 等植物激素促进植物生长,并促进营养吸收^[36-37]。

另一方面, *Alternaria* sp. 对非锰胁迫下辣椒^[38] (*Capsicum annuum*)、菜豆^[39] (*Phaseolus vulgaris*) 幼苗的生长均有促进作用。这表明该内生真菌不仅能够促进非锰胁迫下植物的生长,还能够促进锰胁迫下植物的生长^[39]。充分说明该菌对植物生长的促进作用也具有广谱性。因此,可利用该内生真菌促进植物在锰污染地区的生长,为利用微生物与植物协同治理锰污染提供重要的理论依据。

4 结论

1) 分离于湘潭锰矿区常见植物的4株种子内生菌多主棒孢霉、新月弯孢霉、小孢拟盘多毛孢和链格孢霉菌株均对锰具有较高的耐受性,链格孢霉在高锰胁迫下菌落直径、生物量变化最小,具有最高的锰耐受性及 Mn^{2+} 吸附能力。

2) 内生真菌链格孢霉感染显著提高了锰胁迫下五节芒、大叶胡枝子、藜、青苜蓿这4种不同生活型植物种子的发芽率、发芽势以及幼苗的生物量,链格孢霉对种子发芽与幼苗生长有促进作用,该菌对胁迫下植物生长的促进作用具有广谱性。

参考文献 References:

- [1] Hayes R C, Conyers M, Li G D, *et al.* Spatial and temporal variation in soil Mn^{2+} concentrations and the impact of manganese toxicity on lucerne and subterranean clover seedlings. *Crop and Pasture Science*, 2012, 63(9): 875-885.
- [2] Li C J, Lang M X, Chen Z J, *et al.* Effects of *Epichloë* endophytic fungi on the germination of grass seeds. *Acta Prataculturae Sinica*, 2022, 31(3): 192-206.
李春杰, 郎鸣晓, 陈振江, 等. *Epichloë* 内生真菌对禾草种子萌发影响研究进展. *草业学报*, 2022, 31(3): 192-206.
- [3] Krishna K R, Neha P, Ram P M, *et al.* Biotechnological strategies for enhancing heavy metal tolerance in neglected and underutilized legume crops: A comprehensive review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 208(2): e111705.
- [4] Chen J R, Liu D, Wu J S, *et al.* Seed germination and metal accumulation of Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) under heavy metal exposure. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(22): 6501-6509.
陈俊任, 柳丹, 吴家森, 等. 重金属胁迫对毛竹种子萌发及其富集效应的影响. *生态学报*, 2014, 34(22): 6501-6509.
- [5] Wang W M, Kuang X S, Hu J Y, *et al.* Effects of manganese stress on seed germination, seedling growth and physiological and

- biochemical characteristic of *Rhus chinensis*. *Acta Ecologica Sinica*, 2022, 42(9): 3706–3715.
- 王悟敏, 匡雪韶, 胡佳瑶, 等. 锰胁迫对盐肤木种子萌发、幼苗生长及理化特性的影响. *生态学报*, 2022, 42(9): 3706–3715.
- [6] Li X T, Li L J, Zhang Y P, *et al.* Using exogenous endophytic fungi to improve seed germination and seedling development of oat under water stress. *Journal of Irrigation and Drainage*, 2023, 42(7): 10–17, 59.
- 李晓婷, 李立军, 张永平, 等. 干旱胁迫下外源内生真菌对燕麦种子萌发及幼苗生长的影响. *灌溉排水学报*, 2023, 42(7): 10–17, 59.
- [7] Shahzad R, Waqas M, Khan A L, *et al.* Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 106(9): 236–243.
- [8] Wan Z W, Wang P, Zhang X X, *et al.* Effect of manganese and SA on germination of *Achnatherum inebrians* seed containing or free of endophyte. *Acta Agrestia Sinica*, 2016, 24(1): 107–113.
- 万志文, 王萍, 张兴旭, 等. 锰、水杨酸与内生真菌互作对醉马草种子萌发的影响. *草地学报*, 2016, 24(1): 107–113.
- [9] Li F Y, Zhang C L, Huang H, *et al.* Screening of plant growth-promoting endophytic bacteria from *Amaranthus retroflexus* L. and their effects on chromium accumulation in plant. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 29(7): 1694–1700.
- 李方圆, 张超兰, 黄河, 等. 反枝苋内生菌筛选及其铬富集效果研究. *西南农业学报*, 2016, 29(7): 1694–1700.
- [10] Li K, Shi C, Wang W Q, *et al.* Seed germination and growth effects of endophyte infection on *Melica transsilvanica* under Pb stress. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2020, 37(2): 280–286.
- 李柯, 施宠, 王文全, 等. 重金属Pb胁迫下内生真菌侵染对德兰臭草种子萌发及生长的影响. *农业资源与环境学报*, 2020, 37(2): 280–286.
- [11] Zhang P, Ren Q, Meng S Y, *et al.* Effects of *Epichloë* endophyte on seed germination and seedling growth of *Stipa purpurea* under salt stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2022, 31(10): 110–121.
- 张鹏, 任茜, 孟思宇, 等. 内生真菌对盐胁迫下紫花针茅种子萌发和幼苗生长的研究. *草业学报*, 2022, 31(10): 110–121.
- [12] Zhang C B, Wang J, Ke S X, *et al.* Effects of natural inhabitation by *Miscanthus floridulus* on heavy metal speciations and function and diversity of microbial community in mine tailing sand. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2009, 33(4): 629–637.
- 张崇邦, 王江, 柯世省, 等. 五节芒定居对尾矿砂重金属形态、微生物群落功能及多样性的影响. *植物生态学报*, 2009, 33(4): 629–637.
- [13] Choo J, Wong C, Müller M. Protocol for screening endophytic fungi against heavy metals//Udayanga D, Bhatt P, Manamgoda D, *et al.* *Mycoremediation protocols*. Berlin: Springer, 2022.
- [14] Chu W H, Xie Q Z, Yang C, *et al.* The identification and study on Cd tolerance of C12, a fungus which shows high tolerance to Cd. *Journal of Northwest Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2017, 45(9): 71–80.
- 楚文卉, 谢清哲, 杨超, 等. 1株镉耐受真菌C12的鉴定及其镉耐受性研究. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2017, 45(9): 71–80.
- [15] Jia T, Wang R H, Cao M W. Isolation and identification of the *Epichloë* endophyte from *Bothriochloa ischaemum* and its heavy metal tolerance. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(18): 6623–6631.
- 贾彤, 王瑞宏, 曹苗文. 白羊草 *Epichloë* 属内生真菌的分离鉴定及其重金属耐受性. *生态学报*, 2018, 38(18): 6623–6631.
- [16] Colpaert J V, Vandenkoornhuysen P, Adriaenssens K, *et al.* Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*. *New Phytologist*, 2000, 147(2): 367–379.
- [17] Geisen S, ten Hooven F C, Kostenko O, *et al.* Fungal root endophytes influence plants in a species-specific manner that depends on plant's growth stage. *Journal of Ecology*, 2021, 109(4): 1618–1632.
- [18] Tai X S, Yang R Q, Chang G H, *et al.* Research progress of endophyte resources in metal mining area. *Chinese Wild Plant Resources*, 2021, 40(4): 57–64.
- 台喜生, 杨蕊琪, 常国华, 等. 金属矿区植物内生菌资源研究进展. *中国野生植物资源*, 2021, 40(4): 57–64.
- [19] Liu J S, Luo Y L, Xie X C, *et al.* Research on screening and growth-promotion ability of cadmium resistant endophytic fungi. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2019, 48(3): 61–69.
- 刘军生, 罗阳兰, 解修超, 等. 抗镉植物内生真菌的筛选及其促生能力研究. *河南农业科学*, 2019, 48(3): 61–69.
- [20] Giauque H, Connor E W, Hawkes C V. Endophyte traits relevant to stress tolerance, resource use and habitat of origin predict effects on host plants. *New Phytologist*, 2019, 221(4): 2239–2249.
- [21] Zhang P P, Hu L X, Fu J M. Effects of endophyte infection on seed germination, seedling growth and osmotic stress resistance of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Pratacultural Science*, 2012, 29(7): 1094–1099.
- 张萍萍, 胡龙兴, 傅金民. 内生真菌侵染对盐胁迫下黑麦草种子萌发的影响. *草业科学*, 2012, 29(7): 1094–1099.
- [22] Kuang Y, Nan Z B, Tian P. Effects of *Epichloë* endophyte and seed hydro-priming on the germination of *Festuca sinensis* under

- NaCl stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2016, 25(2): 160–168.
- 旷宇, 南志标, 田沛. 内生真菌和水引发对NaCl胁迫条件下中华羊茅种子萌发的影响. *草业学报*, 2016, 25(2): 160–168.
- [23] Chen Z J, Liu J, Wei X K, *et al.* Effects of latosols extracts with different pH and endophytic fungi on growth and physiology of *Lolium perenne* seedling. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2017, 37(7): 1348–1356.
- 陈振江, 刘静, 魏学凯, 等. 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. *西北植物学报*, 2017, 37(7): 1348–1356.
- [24] Li C J, Yao X, Nan Z B. Advances in research of *Achnatherum inebrians*–*Epichloë* endophyte symbionts. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2018, 42(8): 793–805.
- 李春杰, 姚祥, 南志标. 醉马草内生真菌共生体研究进展. *植物生态学报*, 2018, 42(8): 793–805.
- [25] Chen Z H, Liu X F, Bao G S, *et al.* Effects of endophytic fungi on drought tolerance ability of tall fescue seed. *Journal of Tarim University*, 2016, 28(2): 12–17.
- 陈志豪, 刘学锋, 鲍根生, 等. 内生真菌对高羊茅种子耐干旱能力的影响. *塔里木大学学报*, 2016, 28(2): 12–17.
- [26] Zhang W, Mace W J, Matthew C, *et al.* The impact of endophyte infection, seed aging, and imbibition on selected sugar metabolite concentrations in seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(25): 6921–6929.
- [27] Qiang X J, Ding J J, Lin W, *et al.* Alleviation of the detrimental effect of water deficit on wheat (*Triticum aestivum* L.) growth by an indole acetic acid-producing endophytic fungus. *Plant and Soil*, 2019, 439(2): 373–391.
- [28] Eldredge S D, Geary B, Jensen S L. Seed isolates of *Alternaria* and *Aspergillus* fungi increase germination of *Astragalus utahensis*. *Native Plants Journal*, 2016, 17(2): 89–94.
- [29] Di J L, Jiang H Y, Cong L, *et al.* Effects of four antagonistic endophytic fungi on the growth on *Picea mongolia*. *Journal of Northeast Forestry University*, 2022, 50(6): 39–45.
- 狄佳麟, 姜海燕, 丛林, 等. 4株内生拮抗菌对沙地云杉的促生作用. *东北林业大学学报*, 2022, 50(6): 39–45.
- [30] Grime J P, Mason G, Curtis A V, *et al.* A comparative study of germination characteristics in a local flora. *Journal of Ecology*, 1981, 69(3): 1017–1059.
- [31] Liu H L, Song M F, Duan S M, *et al.* A comparative study of seed germination traits of 52 species from Gurbantunggut Desert and its peripheral zone. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(15): 4308–4317.
- 刘会良, 宋明方, 段士民, 等. 古尔班通古特沙漠及周缘52种植物种子的萌发特性与生态意义. *生态学报*, 2011, 31(15): 4308–4317.
- [32] Bu H Y, Du G Z, Chen X L, *et al.* Community-wide germination strategies in an alpine meadow on the eastern Qinghai–Tibet Plateau: phylogenetic and life-history correlates. *Plant Ecology*, 2007, 195(1): 87–98.
- [33] Zhang Y Y, Zhang C H, Zhang L, *et al.* Germination response to light of 30 Poaceae species from the eastern Qinghai–Tibet plateau and correlates with their life history. *Journal of Lanzhou University (Natural Sciences)*, 2011, 47(4): 49–54.
- 张莹莹, 张春辉, 张蕾, 等. 青藏高原东缘30种禾本科植物种子萌发对光的响应及其与生活史的关联. *兰州大学学报(自然科学版)*, 2011, 47(4): 49–54.
- [34] Tian F, Liao X F, Wang L H, *et al.* Isolation and identification of beneficial orchid mycorrhizal fungi in *Paphiopedilum barbigerrum* (Orchidaceae). *Plant Signaling and Behavior*, 2022, 17(1): 2005882.
- [35] Wang J H, Chen W, Ruan Y T, *et al.* Isolation and identification of *Cupriavidus* sp. HXC-8 and its effects on growth of *Mimosa pudica* contaminated with copper. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2023, 51(8): 131–139.
- 王桔红, 陈文, 阮玥婷, 等. 内生贫铜菌的分离鉴定及其对铜污染含羞草生长的影响. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2023, 51(8): 131–139.
- [36] Chu W, Wang Y Y, Guo Y, *et al.* Screening of *Casuarina equisetifolia* rhizosphere promoting bacteria and their effects on seed germination and seedling growth. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2024, 35(8): 2159–2166.
- 储薇, 王炎炎, 郭玥, 等. 木麻黄根际促生菌的筛选及对种子萌发和幼苗生长的影响. *应用生态学报*, 2024, 35(8): 2159–2166.
- [37] Chen K X, Tang W T, Li L N, *et al.* Functional mechanism of seed endophytes enhancing heavy metal resistance of host plants: a review. *Microbiology China*, 2021, 48(6): 2187–2194.
- 陈柯璇, 汤雯婷, 李丽娜, 等. 种子内生菌增强宿主植物重金属抗性的功能机制研究进展. *微生物学通报*, 2021, 48(6): 2187–2194.
- [38] Mauricio-Castillo J A, Salas-Muñoz S, Reveles-Torres L R, *et al.* Could *Alternaria solani* IA300 be a plant growth-promoting fungus? *European Journal of Plant Pathology*, 2020, 157(2): 413–419.
- [39] Herrera M D, Salas-Muñoz S, Reveles-Torres L R, *et al.* *Alternaria solani* IA300 induces growth and development in two common bean cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, 2024, 170(2): 451–462.