

张玲秀, 白建华, 郝瑞林, 等. 印度梨形孢发酵条件优化及玉米田间应用试验[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(24): 334–337.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.24.086

印度梨形孢发酵条件优化及玉米田间应用试验

张玲秀, 白建华, 郝瑞林, 董社琴
(忻州师范学院生物系, 山西忻州 034000)

摘要:为使印度梨形孢尽早应用于农业生产, 首先采用响应面法对液体发酵条件进行优化; 其次在玉米大田试验中, 用拌种法和灌根 g 法施生物菌肥; 最后在玉米生长各时期对根长、株高进行测量, 对根部菌的共生情况进行检测。结果表明, 最佳培养条件是初始 pH 值为 6.02、培养温度为 27.55 ℃、转速为 178.2 r/min, 通过发酵优化大大提高了菌体产量, 经检测印度梨形孢定殖于玉米根中, 施肥组的生物总量、玉米产量和主根长显著高于对照组, 其中拌种加灌根产量最高。

关键词:印度梨形孢; 生物菌肥; 发酵条件优化; 玉米

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)24-0334-04

随着地球人口的不断增加和人们对生活水平的不断追求, 人们对粮食产量的增加也提出了更高的要求, 现在各国都在大力开发和实施绿色环保农业。玉米作为全球主要粮食和饲料作物之一, 其产量的提高具有重要意义。

在 4 亿年前, 共生土壤真菌协助陆地植物在地球繁殖, 两者形成互利的关系。根部定殖真菌的共生对植物的适应、获取营养和对生物和非生物的胁迫具有重要作用。印度梨形孢 (*Piriformospora indica*) 被发现于印度西北部沙漠地区的灌木丛根部, 主要由菌丝与孢子组成, 其孢子形状类似于梨形, 根据其发现地与形态特征, 将其命名为印度梨形孢。该菌属于担子菌门层菌纲梨形孢属^[1]。印度梨形孢可在植物根部定殖, 并随着根部的成熟, 定殖量不断增加。印度梨形孢在植物中的定殖过程包括 3 个阶段: 与植物之间相互识别开启共生模式、定殖于植物进行活体营养阶段、干扰植物细胞死亡程序形成共生关系。印度梨形孢与植物互作具有以下生物学功能: 促进植物生长、提高植物抗逆境胁迫能力、提高植物抗生物逆境能力等^[1]。

印度梨形孢是一种具有广泛宿主的植物内生真菌^[2]。它能促进植物的生长和提高产量, 可提高植物对营养的吸收和对生物和非生物的胁迫, 如抵抗干旱和水涝^[3-4]。能够诱发植物产生系统抗病性, 显著提高植物对多种病害的抗病性, 减轻发病水平^[5], 因而印度梨形孢定殖后能提高植株的系统抗病性和抗逆性。

印度梨形孢可在人工培养基上生长并能顺利完成其生活史, 这一性状使其商品化开发应用成为可能, 更具商业开发和产业化应用前景^[6]。将印度梨形孢作为生物菌肥可以更好地为农业发展作贡献, 然而印度梨形孢发酵生产菌肥的工艺

和菌肥田间应用试验鲜有报道。

本研究首先对印度梨形孢进行发酵优化扩大培养菌肥, 进而施用于大田玉米种子、3 叶期、5 叶期等时期, 并对印度梨形孢定殖于玉米根部进行检测, 最后测定玉米生物总鲜质量、玉米产量, 确定其对玉米生长量的影响。本研究能为印度梨形孢菌肥应用于大田玉米生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

印度梨形孢 (*Piriformospora indica*) 保存于笔者所在实验室。供试玉米品种为先玉 335, 种子购买于市场。

1.2 方法

1.2.1 响应面法优化设计 本试验通过前期单因素优化结果, 选取影响显著的 3 个因素: A (初始 pH 值)、B (培养温度)、C (转速), 以印度梨形孢生物量 (以 $D_{600\text{nm}}$ 表示) 为指标, 根据 Box-Behnken 设计原理, 设计响应面分析试验, 其因素水平编码见表 1。

表 1 因素水平编码

水平	因素		
	初始 pH 值	温度 (℃)	转速 (r/min)
-1	5.8	26	100
0	6.0	28	200
1	6.2	30	300

1.2.2 印度梨形孢共生玉米根形态学观察及真菌 18S rDNA 扩增鉴定 在玉米生长的 7 叶期, 随机选取玉米根系, 用自来水冲洗干净后再用蒸馏水冲洗 3 遍, 剪成 1 cm 长的小段, 经 10% NaOH 浸泡 4 h 后洗净, 再经 1% HCl 浸泡 5 min 后洗净, 最后用 0.05% 乳酸石炭酸棉蓝染色液染色制片, 于体视显微镜下观察印度梨形孢真菌定殖情况并拍照^[7]。

另外, 取玉米 7 叶期根系, 用蒸馏水冲洗、乙醇消毒 3 遍后, 采用十六烷基三甲基溴化铵法 (hexadecyl trimethyl ammonium bromide, 简称 CTAB 法) 提取总 DNA, PCR 扩增引物为 ITS1: 5'-TCCGTAAGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性

收稿日期: 2017-07-30
基金项目: 山西省回国留学人员重点科研资助项目 (编号: 2015-098)。
作者简介: 张玲秀 (1975—), 男, 山西忻州人, 硕士, 讲师, 研究方向为资源微生物与应用微生物。E-mail: twozeroxiu@126.com。
通信作者: 董社琴, 女, 博士, 教授, 研究方向为植物科学。E-mail: sheqindong@163.com。

4 min;94 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 90 s,共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,利用 Image Lab 3.0 软件进行分析。

1.2.3 印度梨形孢大田施肥及玉米生物量和产量的测定
农田选取地点为山西省忻州市定襄县宏道镇东街村,种植时间为 2016 年 4 月 22 日,种植数量为 120 株,分成 3 组:阳性对照、根部灌菌、种子拌菌 + 根部灌菌,每组 40 株,阴性对照不作处理,种子拌菌组在种植前将种子浸泡菌液;玉米在 3 叶期和 5 叶期进行 2 次根部浇灌稀释菌液,收获玉米后称各区玉米总鲜质量、玉米棒质量,测量株高和叶长,并进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 响应面试验结果与分析

2.1.1 Box - Behnken 设计试验结果 以 pH 值、温度、转速为自变量,以印度梨形孢菌液 600 nm 处的吸光度为响应指标,采用 Box - Behnken 方法设计响应面分析试验,试验设计及实施结果见表 2。

2.1.2 响应面设计结果及方差分析 根据表 2 的试验结果,利用 Design Expert v8.0.5. b 软件对试验数据进行分析,所得主要分析结果见表 3。

二次模型中回归系数的显著性检验结果(表 3)表明,因素 B(温度)对印度梨形孢生物量影响效果的线性效应显著,因素 A(pH 值)和 C(转速)效应不显著;因素 A²、B²、C² 对结果的曲面效应显著,因素 AB、AC 交互影响效应显著。对试验数据进行多次拟合回归,以梨形孢生物量(Y)为因变量,初始 pH 值(A)、温度(B)、转速(C)为自变量建立回归方程模型为

表 2 印度梨形孢响应面试验设计及结果

试验号	A:pH 值	B:温度 (℃)	C:转速 (r/min)	实测 <i>D</i> _{600 nm}	预测 <i>D</i> _{600 nm}
1	6.00	28.00	200.00	0.594	0.569 4
2	6.00	28.00	200.00	0.591	0.569 4
3	6.20	28.00	100.00	0.460	0.473 6
4	6.20	28.00	300.00	0.306	0.336 6
5	6.00	26.00	100.00	0.477	0.467 9
6	5.80	30.00	200.00	0.377	0.381 5
7	6.00	30.00	100.00	0.275	0.301 1
8	5.80	28.00	100.00	0.423	0.392 4
9	5.80	26.00	200.00	0.313	0.352 8
10	6.00	28.00	200.00	0.534	0.569 4
11	6.00	30.00	300.00	0.332	0.341 1
12	5.80	28.00	300.00	0.473	0.459 4
13	6.20	26.00	200.00	0.457	0.452 5
14	6.00	28.00	200.00	0.594	0.569 4
15	6.20	30.00	200.00	0.280	0.240 2
16	6.00	28.00	200.00	0.534	0.569 4
17	6.00	26.00	300.00	0.384	0.357 9

$$Y = 0.570 - 0.010A - 0.046B - 0.018C - 0.060AB - 0.051AC + 0.038BC - 0.082A^2 - 0.130B^2 - 0.072C^2。$$

另外,由表 3 可知,试验因素对印度梨形孢生物量影响显著程度由大到小依次为温度 > 转速 > 初始 pH 值。模型的回归 *F* 值为 12.93,*P* =0.001 4,表明该模型在 0.01 水平上显著。多元相关系数 *R*² =0.983 2,调整 *R*² =0.960 3,表明模型对试验实际情况拟合较好,失拟项差异不显著(*P* =0.227 7 > 0.05),表示该方程试验拟合效果好。

表 3 回归与方差分析结果

来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	显著性
回归模型	0.190	9	0.021	12.93	0.001 4	**
A	8.611 × 10 ⁻⁴	1	8.611 × 10 ⁻⁴	0.54	0.486 3	
B	0.017	1	0.017	10.56	0.014 1	*
C	2.450 × 10 ⁻³	1	2.450 × 10 ⁻³	1.54	0.255 1	
AB	0.015	1	0.015	9.11	0.019 5	*
AC	0.010	1	0.010	6.52	0.037 9	*
BC	5.625 × 10 ⁻³	1	5.625 × 10 ⁻³	3.53	0.102 4	
A ²	0.028	1	0.028	17.79	0.003 9	*
B ²	0.072	1	0.072	45.02	0.000 3	***
C ²	0.022	1	0.022	13.62	0.007 7	**
残差	0.011	7	1.595 × 10 ⁻³			
失拟项	6.979 × 10 ⁻³	3	2.326 × 10 ⁻³	2.22	0.227 7	
纯误差	4.183 × 10 ⁻³	4	1.046 × 10 ⁻³			
总和	0.200	16				
<i>R</i> ²	0.983 2					
调整 <i>R</i> ²	0.960 3					

注: * 表示 *P* <0.05; ** 表示 *P* <0.01; *** 表示 *P* <0.001。

2.1.3 响应面图及等高线图分析 根据回归方程得出不同因子的响应面和等高线,结果见图 1、图 2、图 3。响应面和等高线均可阐明该模型。在响应面中,单因素影响效果与曲面陡峭相关,曲面越陡峭,影响越显著。等高线与响应面对应,响应值越大曲线越接近中心。各因素交互作用与等高线形状相关,圆形则为不显著,椭圆为显著。

通过 Design Expert v8.0.5. b 软件进行分析,印度梨形孢生物量的最佳培养条件是初始 pH 值为 6.02、培养温度为 27.55 ℃、转速为 178.2 r/min,此条件下菌体 *D*_{600 nm} 的理论值为 0.625 9。在该条件下进行 3 次试验验证,菌体 *D*_{600 nm} 平均值为 0.612 9,与预测值的误差仅为 2.07%,表明该模型可靠性高,应用响应面法优化印度梨形孢的培养条件是可行的。

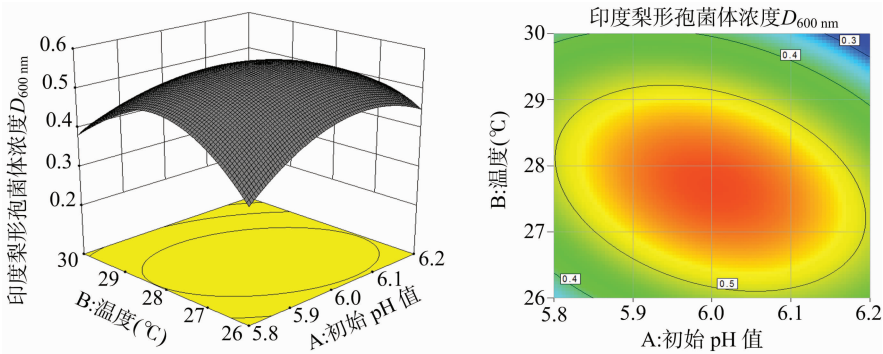


图1 培养温度与初始 pH 值及其交互作用对印度梨形孢生物量影响的响应面和等高线

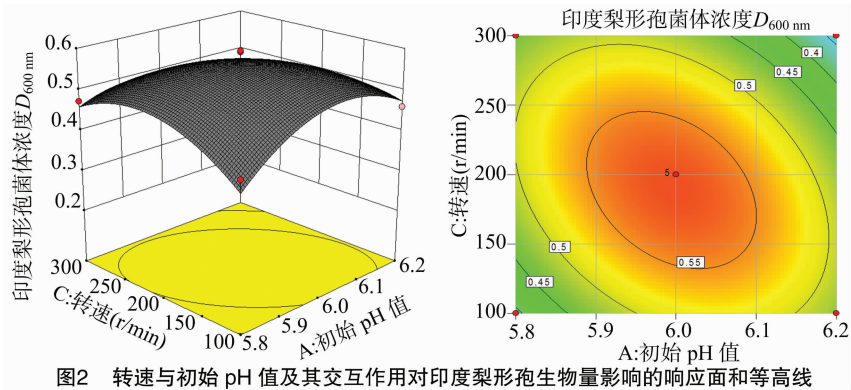


图2 转速与初始 pH 值及其交互作用对印度梨形孢生物量影响的响应面和等高线

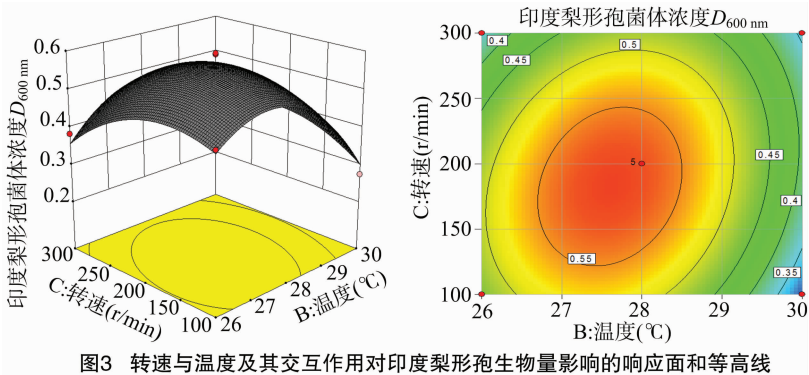


图3 转速与温度及其交互作用对印度梨形孢生物量影响的响应面和等高线

2.2 印度梨形孢共生玉米根形态学观察及真菌 18S rDNA 扩增鉴定

2.2.1 印度梨形孢共生玉米根形态学观察结果 在玉米生长的 7 叶期,选取印度梨形孢真菌与玉米共生根系,经苔盼蓝染色,在 6.3×25 体视显微镜下可清晰地观察到该真菌在紫根部的细胞间和细胞内非常密集地定殖有椭圆形的厚垣孢子,主要在根系成熟区的表皮层,分生区、伸长区少有定殖。如图 4 箭头所示。

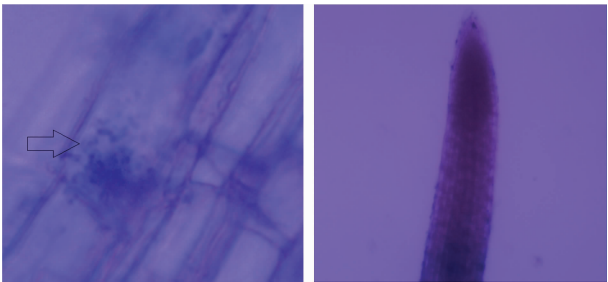


图4 印度梨形孢在玉米根部定殖

由图 4 可知,印度梨形孢主要定殖在植物根系的表皮细胞,在细胞内或细胞间形成致密的菌丝组织。在定殖过程中,首先由附着在植物根部表皮的厚垣孢子萌发产生菌丝,紧接着萌发自不同孢子的菌丝迅速联接起来,在根表形成菌丝网络,孢子萌发后菌丝穿透根部表皮细胞壁或通过细胞间隙进入根组织内部。

2.2.2 通用引物 ITS1 和 ITS4 扩增结果 以提取的所有供试真菌 DNA 为模板,用通用引物 ITS1 和 ITS4 扩增的 rDNA ITS,电泳图谱显示扩增出的片段大约 380 bp,可确定的确有真菌存在于植物根系,另从分子大小初步判断其为印度梨形孢浸染玉米根部。结果见图 5。

2.3 印度梨形孢大田施用及玉米生物量和产量的测定 印度梨形孢对供试玉米(先玉 335)植株的生长有显著性影响。玉米在生长各时期株高均显著高于对照,接种印度梨形孢的玉米具有较长的主根,更绿、更宽的叶片,更粗壮的茎秆,更多量的生物总量和玉米产量。

由表 4 可知,从种子拌菌到 3 叶期和 5 叶期菌液浇灌,与

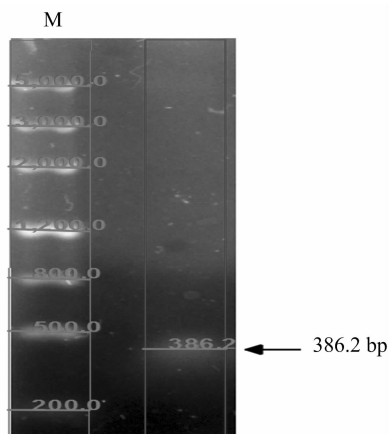


图5 印度梨形孢玉米根部定殖扩增结果

表 4 印度梨形孢对大田玉米生物量、产量和主根长的影响

处理	平均生物量鲜质量 (kg/株)	平均玉米鲜质量 (kg/株)	3 叶期平均主根长 (cm)	株高 (cm)	叶长 (cm)
种子拌菌 + 灌菌	0.900 ± 0.100b	0.690 ± 0.040b	10.250 ± 0.120b	201.120 ± 13.030a	83.000 ± 4.030a
灌菌	0.765 ± 0.075a	0.590 ± 0.110a	9.350 ± 0.170b	197.540 ± 11.460a	74.000 ± 3.030b
阴性对照	0.720 ± 0.050a	0.500 ± 0.050a	8.100 ± 0.260b	183.410 ± 15.840a	71.000 ± 3.450b

注:多重均值比较采用 *LSD* 方法;同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

3 结论与讨论

植物内生真菌印度梨形孢可进行离体培养,易于规模化制剂的制备,寄主范围更加广泛,具有广谱生物学效应特性。在生物功能上,印度梨形孢与丛枝菌根真菌 (*Arbuscular mycorrhizal fungi*, 简称 AMF) 极为相似,能促进植物生长,加快植物对氮、磷等矿物质的吸收,提高作物对逆境胁迫的忍耐性,诱导植物产生系统抗性。但 AMF 不能进行纯培养,而印度梨形孢可以在人工培养基上进行纯培养。自印度梨形孢被发现以来,关于该菌的寄主,该菌促进植物生长、提高植物抗逆抗病性、增加植物产量、提高果实品质等的研究报道层出不穷。近年来,广大科研人员侧重于印度梨形孢与植物互作分子机制的研究。这些研究主要来源于德国、印度等首次报道该菌的国家以及伊朗、墨西哥、美国等后来才逐渐开始研究该菌的国家。目前,国内浙江大学、福建农林大学的相关科研人员也在进行研究,但所做发酵优化并不全面,且未见将印度梨形孢开发制备成生物肥料和应用于玉米大田的研究报道^[1,3,6]。

本研究在前期研究工作的基础上,进一步采用响应面法优化印度梨形孢发酵技术参数为 pH 值 6.02、培养温度 27.55 ℃、转速 178.2 r/min。在此条件下,提高了菌体生物量,为印度梨形孢应用于大田实践奠定了基础。进一步可将印度梨形孢制备成绿色、安全、无污染的抗逆、促生型生物肥料,解决长期以来不合理施用化肥造成的土壤板结、环境污染等问题,弥补现有的各种生物肥料施用范围局限、肥效不稳定等缺陷,为发展生态农业提供一条新途径。

对照相比,拌种加灌菌处理下,玉米生物量增加 25%;玉米鲜质量增加 38%;3 叶期平均主根长增加 26%;株高增加 9%;叶长增加 17%。灌菌处理下,玉米生物量增加 6%;玉米鲜质量增加 18%;3 叶期平均主根长增加 15%;株高增加 7%;叶长增加 4%。可见印度梨形孢可显著促进玉米的生长和提高产量,其中拌种加灌菌效果更明显。印度梨形孢可伴随玉米种子的萌发而定殖于根部,后期的根部浇灌也具有同样的效果。施印度梨形孢菌肥宜在早期,促进效果更佳。

关于印度梨形孢促进玉米生长发育的机制可能涉及到激素和营养吸收等方面,另外对玉米干旱等逆境下所起的有益作用,也可能间接促进生物量和产量的增加,这方面有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 朱志炎,毛琳琳,何 勇,等. 印度梨形孢 (*Piriformospora indica*) 的生物学特性及对植物生长的互作效应研究进展[J]. 长江大学学报(自然科学版),2016,13(15):53-58.
- [2] Varma A, Bakshi M, Lou B, et al. *Piriformospora indica*: a novel plant growth - promoting mycorrhizal fungus[J]. Agricultural Research, 2012,1(2):117-131.
- [3] 陈佑源,楼兵干,高其康,等. 印度梨形孢诱导油菜抗旱性机理的初步研究[J]. 农业生物技术学报,2013,21(3):272-281.
- [4] Yang Y Z, Zhang J M, Zhang Y, et al. Effects of *Piriformospora indica* on chinese cabbage production and resistance to waterlogged stress [J]. Journal of Chemical & Pharmaceutical Research, 2013,5(12):520-524.
- [5] Waller F, Achatz B, Baltruschat H, et al. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt - stress tolerance, disease resistance, and higher yield[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(38):13386-13391.
- [6] 宋凤鸣,毛克克,吴铤铤,等. 印度梨形孢的生物学效应及其作用机制[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2011,37(1):1-6.
- [7] Chao S, Johnson J M, Cai D, et al. *Piriformospora indica*, confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought - related genes and the plastid - localized CAS protein [J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167(12):1009.