

DOI: 10.5846/stxb201708211500

刘倩,高娅妮,柳旭,周文楠,王佳珍.混合盐碱胁迫下接种丛枝菌根真菌和根瘤菌对紫花苜蓿生长的影响.生态学报,2018,38(17): - .  
Liu Q, Gao Y N, Liu X, Zhou W N, Wang Q Z.Effects of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on growth of *Medicago sativa* under saline-alkaline stress.Acta Ecologica Sinica,2018,38(17): - .

## 混合盐碱胁迫下接种丛枝菌根真菌和根瘤菌对紫花苜蓿生长的影响

刘倩,高娅妮,柳旭,周文楠,王佳珍\*

西北农林科技大学 动物科技学院草业科学系,杨凌 712100

**摘要:**随着气候变化,全球土壤盐碱化严重威胁着农牧业生产和生态环境的建设。土壤盐化与碱化常常伴随发生,目前多数研究侧重于盐胁迫,忽略了碱胁迫的存在。实际上,碱性盐除了盐度外还伴随着高 pH。由此,试图探讨混合盐碱胁迫下接种丛枝菌根真菌(AMF)和根瘤菌对紫花苜蓿生长的影响及其作用机理。根据中国盐碱地的特点,将 4 种盐(NaCl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、NaHCO<sub>3</sub>)按一定比例混合模拟出 16 种混合盐碱(盐浓度 25—150 mmol/L, pH 7.67—10.52)胁迫浓度,按照 L<sub>16</sub>(16<sup>1</sup>×2<sup>2</sup>)混合正交设计,采用盆栽法研究了混合盐碱胁迫下接种 AMF 摩西管柄囊霉(*Funneliformis mosseae*)和根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)对紫花苜蓿生长及生理的影响。结果表明,对紫花苜蓿株高的影响程度依次是 AMF+根瘤菌>pH>AMF>盐碱类型>根瘤菌;对地上生物量、地下生物量、茎高净增长量、丙二醛(MDA)及脯氨酸影响程度依次是 pH>AMF+根瘤菌>盐碱类型>AMF>根瘤菌;对超氧化物歧化酶(SOD)的影响程度依次是 pH>AMF+根瘤菌>盐碱类型>AMF >根瘤菌;对过氧化物酶(POD)影响程度依次是 pH>AMF+根瘤菌>根瘤菌>AMF>盐碱类型;对蛋白质的影响程度依次是 pH>盐碱类型>根瘤菌>AMF+根瘤菌=AMF。株高、地下生物量、POD 均在双接种的处理下出现最大值。本研究证明:盐碱混合胁迫会严重抑制植物的生长发育;而接种 AMF 和/或根瘤菌均可有效缓解盐碱胁迫对植物造成的伤害,提高植物对盐碱的耐受能力;且同时接种 AMF 及根瘤菌效果最好,其次是单独接种 AMF,单独接种根瘤菌作用相对最小。

**关键词:**混合盐碱胁迫;AMF;根瘤菌;双接种;紫花苜蓿

## Effects of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on growth of *Medicago sativa* under saline-alkaline stress

LIU Qian, GAO Yani, LIU Xu, ZHOU Wennan, WANG Quanzhen\*

Department of Grassland Science, College of Animals Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

**Abstract:** Due to climate change, agriculture, animal husbandry production, and ecological environments have been seriously influenced by global soil salinization. Salt stress generally has been the focus of numerous studies, resulting in alkaline stress being ignored, when, in fact, salinization frequently occurs with soil alkalization. Actually, high pH levels co-exist with salinity in alkaline soil. The present study attempts to investigate the effects of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and rhizobia on the growth of alfalfa (*Medicago sativa* L.) under saline-alkaline stress (SAS). Based on the characteristics of Chinese saline-alkaline soil and a mixed orthogonal design L<sub>16</sub>(16<sup>1</sup>×2<sup>2</sup>), of an indoor pot experiment, alfalfa seedlings were inoculated with AMF (*Funneliformis mosseae*), rhizobia, both, or neither under 16 different saline-alkaline conditions (salinity 25—150 mmol/L and pH 7.67—10.52). The conditions were created by mixing four types of salts (i.e., NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>) in various proportions. The effects of inoculation with

基金项目:国家自然科学基金项目(31472138)

收稿日期:2017-08-21; 网络出版日期:2018-00-00

\* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: wangquanzhen191@163.com

AMF and/or rhizobia on the growth of alfalfa under mixed SAS were studied. The results showed that shoot length was influenced by factors in the order of AMF+rhizobia>pH>AMF>SAS>rhizobia. The factors that affected shoot biomass, root biomass, high net growth of stem, malondialdehyde (MDA) and proline were ordered most to least as pH>SAS>AMF+rhizobia>AMF>rhizobia, and they affected SOD, POD, and protein ordered most to least as pH>AMF+rhizobia>SAS>AMF>rhizobia, pH>AMF+rhizobia>rhizobia>AMF>SAS, and pH>SAS>rhizobia>AMF+rhizobia=AMF, respectively. The shoot length, root biomass, and POD of seedlings inoculated with rhizobia and AMF showed the maximum responses. The root nodule numbers and weight of alfalfa inoculated with AMF and rhizobia were slightly more than that of alfalfa inoculated with rhizobia alone, but the differences were not significant. The results suggested that SAS would strongly inhibit the growth and development of alfalfa and the damage was greater than that caused by salt stress or alkaline stress. However, inoculating rhizobia or AMF could significantly improve the salt tolerance of alfalfa (salinity  $\leq 75$  mmol/L, pH 7.0—9.79) and alleviate the inhibition of alfalfa's growth under saline-alkaline stress. In terms of the different methods of inoculation, the dual inoculation of rhizobia and AMF worked best, the effect of inoculating with only rhizobia was second, and inoculating with rhizobia showed the lowest effect in the alleviating process. However, the positive effects of AMF and/or rhizobia cannot completely offset the negative impact of SAS (salinity: 100—150 mmol/L, pH 9.87—10.52). This result could provide some reference for reducing damage of SAS on alfalfa, improving resistance of seedlings to SAS, and utilizing saline-alkaline soil. It can also be applied to agricultural production practices.

**Key Words:** saline-alkaline stress; AMF; rhizobia; double inoculation; alfalfa

世界上约有 10 亿  $\text{hm}^2$  的土壤受到盐渍的影响,严重抑制着作物的生长,尤其在干旱和半干旱地区仍呈不断恶化的趋势<sup>[1-2]</sup>。土壤盐化与碱化常常同时发生,而很多研究将盐碱胁迫笼统地称为盐胁迫,忽略了碱胁迫的存在<sup>[3]</sup>。实际上,碱性盐除了盐度外还伴随着高 pH,由  $\text{NaHCO}_3$  和  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  引发的碱性盐要比由  $\text{NaCl}$  和  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  引发的中性盐对植物的伤害更大,是两种不同的非生物胁迫<sup>[4-5]</sup>。近年来,随着气候变化和人类生产活动的影响,土壤盐碱化日趋扩大,严重威胁着农牧业生产和生态环境的建设。紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 是多年生豆科牧草,具有一定的固氮和抗胁迫能力,是国际公认的最优质蛋白质牧草,在世界上广泛种植<sup>[6]</sup>。而在盐碱地上其生长受阻,产量下降,限制了苜蓿的推广与应用。丛枝根菌真菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) 与植物根系可以形成互惠共生体,改善植物的矿质营养及土壤的物理结构<sup>[7]</sup>。根瘤菌可以与豆科植物共生固氮,提高苜蓿的产量和品质。而盐胁迫会降低结瘤率和固氮酶活性,对植物固氮产生影响<sup>[8]</sup>。双接种 AMF 和根瘤菌不仅可以促进其营养物质的吸收,增强植物的抗逆性,还可以使苜蓿结瘤固氮,促进其生长<sup>[9]</sup>。同时,这种双接种方法在生化和生理上提高抗氧化酶活性及渗透调节能力来提高植物的抗盐性<sup>[8]</sup>。与单独接种根瘤菌相比,盐胁迫下同时接种两种根际促生菌更能提高甘草产量及其茎和根中的氮含量<sup>[10]</sup>。

正交试验设计是利用正交表安排部分多因素实验来代替全面实验。不仅可以确定影响因素的主次效应顺序,还可以研究因素间的交互效应,找出优化条件或实验最优组合<sup>[11]</sup>。目前有很多关于盐胁迫下植物接种 AMF 或/和根瘤菌的研究及混合盐碱胁迫下植物单独接种 AMF 或根瘤菌的研究,而混合盐碱胁迫下紫花苜蓿同时接种 AMF 和根瘤菌的研究却鲜有报道。因此,本研究采用正交设计的方法,避免了常规实验设计规模大、限制因素多、操作繁琐、效率低等缺点<sup>[11]</sup>。探讨了苜蓿可以耐受的盐碱浓度以及 AMF 和根瘤菌混合接种对盐碱胁迫下紫花苜蓿生长及生理的影响。该结果以期将为缓解盐碱地对苜蓿生长的伤害,为提高苜蓿抗盐碱性及农业生产实践提供决策参考和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 寄主植物

紫花苜蓿 (金皇后, *Medicago sativa* L. 'Jinhuanghou') 种子由酒泉大业种业有限公司提供。苜蓿种子经

10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浸泡 10 min 灭菌,再用 70% 的乙醇灭菌 3 分钟,用无菌蒸馏水冲洗干净后置于铺有滤纸的培养皿(680 mm×315 mm×170 mm)中。在人工气候培养箱(光 25℃/暗 25℃ 各 12 h,70% 湿度)中萌发,每天用无菌蒸馏水补充水分,待幼苗长出两片子叶时,将其移到花盆中。

### 1.1.2 供试菌种

丛枝菌根真菌摩西管柄囊霉(*Funneliformis mosseae*)购自北京市农林科学院植物营养与资源研究所,接种物为内含摩西球囊霉孢子、侵染根段及根外菌丝的沙土混合物;根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)由西北农林科技大学草业科学实验室提供,接种物为由液体菌种摇菌后得到的液体菌剂。

## 1.2 实验设计

根据中国东北地区盐碱土的特点,实验将两种中性盐(NaCl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)和两种碱性盐(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、NaHCO<sub>3</sub>)按照一定的比例和浓度模拟出 4 种盐浓度(25,75,100,150 mmol/L,盐胁迫)、16 种 pH(7.67—10.52,碱胁迫)梯度<sup>[4]</sup>(表 1)。

表 1 各处理液的盐分组成、盐浓度、摩尔比及 pH 值

Table 1 Salt composition, salt concentration, molar ration and pH of solutions in mixed salt treatments

处理组 Treatment	盐组分比例 SAS composition molar ration				不同盐浓度下的 pH 值 pH of solutions in SAS			
	NaCl	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaHCO <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	25 mmol/L	75 mmol/L	100 mmol/L	150 mmol/L
A	1	2	1	0	7.67	7.92	7.97	8.06
B	1	9	9	1	8.11	8.21	8.56	8.85
C	1	1	1	1	9.02	9.79	9.87	10.13
D	9	1	1	9	10.26	10.38	10.46	10.52

SAS: 盐碱胁迫 Saline-alkaline stress

实验采用混合正交设计表 L<sub>16</sub>(16<sup>1</sup>×2<sup>2</sup>)。盐碱胁迫(因素 X<sub>2</sub>)包括 4 个水平(25、75、100、150 mmol/L);pH(因素 X<sub>1</sub>)包括 16 个水平;根瘤菌(因素 X<sub>3</sub>)包括两个水平(接种和不接种);摩西管柄囊霉(因素 X<sub>4</sub>)包括两个水平(接种和不接种)。共有 32 个处理,每个处理重复 3 次。以没有盐碱和菌剂处理为对照组,设 4 个对照也是 3 次重复,共计 108 个花盆。

### 1.3 盆栽实验

每个花盆装 3 kg 用 15% 工业 NaClO 消毒过的石英砂(粗砂 20—40 目;细沙 40—70 目 = 1:3, m:m)。挑选长出三片子叶且生长整齐一致的紫花苜蓿幼苗移栽于混有摩西管柄囊霉接种物的石英砂中(层播,5 g/盆)。根瘤菌菌剂采用根灌法接种,用注射器把配制好的菌悬液注射在幼苗根部(10 mL/株)。在西北农林科技大学草业科学系全自动日光温室进行花盆实验,隔一天浇一次营养液,65 d 后进行盐碱胁迫处理,隔 1 d 浇 1 次盐碱混合液,胁迫处理 14 d 后分别收获苜蓿地上地下部分。收获当天,每个花盆中选取 3 株苜蓿用镊子取下其根瘤,统计根瘤数及根瘤重,检测 AM 真菌侵染状况。然后将样品放入 -80℃ 超低温冰箱中保存以进行后续指标测定。

### 1.4 测定项目及方法

株高用刻度尺准确度量,精确至 mm;地上干重用电子天平称量(0.01 g);POD 活性测定参考张兴旭<sup>[12]</sup>的方法,用愈创木酚法显色法测定;SOD 活性的测定参考 Beyer 和 Fridovich<sup>[13]</sup>的方法;丙二醛(MDA)和脯氨酸(proline)参照 Madhava 和 Sresty<sup>[14]</sup>的方法,分别采用硫代巴比妥酸法测定和茚三酮法测定;可溶性蛋白含量测定参照 Bradford<sup>[15]</sup>的方法;采用计数法统计根瘤菌数;用电子天平称量根瘤菌干重,采用根段法镜检<sup>[16]</sup> AM 菌根侵染状况。

### 1.5 数据处理

采用 Excel 2010 软件进行数据统计及正交分析,采用 SPSS 21.0 软件进行各处理组间差异显著性分析,测定结果用平均值±标准误表示。将根瘤菌、AMF 及 pH 作为自变量 X<sub>i</sub>,各项指标作为因变量 Y<sub>i</sub>,固定离散变量

根瘤菌,采用 SAS(V20.0)建立因变量  $Y_i$  与自变量  $X_i$  的二元三次回归模型<sup>[17-18]</sup>,其关系方程如下:

$$Y = \sum_{i=1}^3 (\beta_{i \times j+1} X_i^j) + u (i = 1, 2; j = 1, 2, 3)$$

$\beta$  是常量。

## 2 结果分析

### 2.1 AMF 和根瘤菌对盐碱胁迫下紫花苜蓿株高及茎高净增长量的影响

除盐碱类型外,pH、根瘤菌、AMF 以及 4 个因素间两两交互作用都对紫花苜蓿株高有显著影响(表 2)。与对照相比,正交处理组第 3、6、23、28、29 组中紫花苜蓿株高都有一定程度的降低,而这几组都未接种根瘤菌或摩西管柄囊霉,其他处理组中紫花苜蓿株高都大于对照。第 7 组(B 盐 100 mmol/L,pH 8.56,同时接种根瘤菌和摩西管柄囊霉)处理组株高最高,第 23 组(B 盐 100 mmol/L,pH 8.56,不接种根瘤菌或摩西管柄囊霉)处理组株高最低(表 3)。第 7 组和第 19 组差异不显著,与其他处理组差异显著,第 23 组和第 1、7、13、19 组差异显著,与其他处理组差异都不显著。处理中四类盐对应的株高顺序依次是 D>C>B>A(表 3)。在整个植物生长过程中,没有植株死亡,但随着胁迫时间的延长,D 盐胁迫下的处理组出现叶片萎焉失绿,甚至凋落现象,其他处理组长势较好。而茎高净增长量分别在第 1 组(A 盐 25 mmol/L,pH 7.67,接种摩西管柄囊霉)和第 6 组(B 盐 75 mmol/L,pH 8.21,不接种根瘤菌或摩西管柄囊霉)出现最大值和最小值,但这两组差异不显著。由极差 R 值及正交实验结果得出(表 3),不同因素对紫花苜蓿株高的影响程度依次是 AMF+根瘤菌>pH>AMF>盐碱类型>根瘤菌,对茎高的净增长量影响程度依次是 pH>盐碱类型>AMF+根瘤菌>AMF>根瘤菌(表 4、表 5)。该结果表明,pH 对紫花苜蓿的抑制生长作用大于盐胁迫,同时接种摩西管柄囊霉和根瘤菌对紫花苜蓿的促进生长作用大于单独接种摩西管柄囊霉或根瘤菌,而单独接种摩西管柄囊霉的作用又大于单独接种根瘤菌的作用。

表 2 盐碱类型、pH、根瘤菌及 AMF 对紫花苜蓿株高、地下生物量及地上生物量影响的方差分析

因素 Factor	自由度 df	株高 Stem length		地下生物量 Dry root weight		地上生物量 Dry shoots weight	
		F 值 F-value	P 值 Pr>F	F 值 F-value	P 值 Pr>F	F 值 F-value	P 值 Pr>F
$X_1$	3	4.167	0.008	3.861	0.012	2.796	<0.001
$X_2$	15	1.354	ns	1.081	ns	1.852	<0.001
$X_3$	1	11.002	0.01	0.692	ns	4.83	0.037
$X_4$	1	22.846	<0.001	1.143	ns	11.13	<0.001
$X_1 \cdot X_3$	3	2.998	0.007	3.64	0.016	2.831	0.01
$X_1 \cdot X_4$	3	4.531	<0.001	1.143	ns	2.113	<0.001
$X_2 \cdot X_3$	31	2.411	0.001	2.642	0.001	5.987	<0.001
$X_2 \cdot X_4$	31	2.411	0.001	2.642	0.001	5.987	<0.001
$X_3 \cdot X_4$	3	10.633	<0.001	0.682	ns	4.63	<0.001
Model	17	3.178	<0.001	3.178	<0.001	4.823	<0.001
$R^2$		0.409		0.409		0.512	

$X_1$ : pH;  $X_2$ : 盐碱类型, Saline-alkaline stress;  $X_3$ : 根瘤菌, rhizobia;  $X_4$ : AMF; ns: 无显著影响 No significant difference

表 3 株高的正交试验结果

处理 Treatment	pH( $X_1$ )	盐碱( $X_2$ ) SAS/(mmol/L)	根瘤菌( $X_3$ ) rhizobia	AMF( $X_4$ )	AMF+根瘤菌 ( $X_5$ )	株高 shoot length/cm
1	7.67	1(A 盐 25)	2(不接种)	1(接种)		13.05±2.49bcd
2	7.92	2(A 盐 75)	1(接种)	1	1(双接种)	12.05±1.47bcde
3	7.97	3(A 盐 100)	2	2(不接种)	2(不接种)	9.63±0.46de
4	8.06	4(A 盐 150)	1	2		11.63±2.82cde

续表

处理 Treatment	pH(X <sub>1</sub> )	盐碱(X <sub>2</sub> ) SAS/(mmol/L)	根瘤菌(X <sub>3</sub> ) rhizobia	AMF(X <sub>4</sub> )	AMF+根瘤菌 (X <sub>5</sub> )	株高 shoot length/cm
5	8.11	5(B盐 25)	1	2		12.26±3.60bcde
6	8.21	6(B盐 75)	2	2	2	9.51±0.72de
7	8.56	7(B盐 100)	1	1	1	16.31±3.26a
8	8.85	8(B盐 150)	2	1		11.68±0.87cde
9	9.02	9(C盐 25)	2	2	2	10.35±1.68de
10	9.79	10(C盐 75)	1	2		10.97±2.34cde
11	9.87	11(C盐 100)	2	1		11.97±2.37bcde
12	10.13	12(C盐 150)	1	1	1	12.38±2.32bcde
13	10.26	13(D盐 25)	1	1	1	14.33±1.67abc
14	10.38	14(D盐 75)	2	1		10.00±2.27de
15	10.46	15(D盐 100)	1	2		9.79±2.16de
16	10.52	16(D盐 150)	2	2	2	10.04±0.76de
17	7.67	1	1	2		12.14±1.84bcde
18	7.92	2	2	2	2	11.87±1.56cde
19	7.97	3	1	1	1	15.47±2.2ab
20	8.06	4	2	1		12.43±0.47bcde
21	8.11	5	2	1		12.27±0.989bcde
22	8.21	6	1	1	1	11.73±0.64cde
23	8.56	7	2	2	2	8.81±0.65e
24	8.85	8	1	2		11.78±2.66cde
25	9.02	9	1	1	1	11.96±1.68bcde
26	9.79	10	2	1		11.96±1.73bcde
27	9.87	11	1	2		10.36±1.47de
28	10.13	12	2	2	2	8.93±0.65e
29	10.26	13	2	2	2	9.36±0.49e
30	10.38	14	1	2		9.53±1.53de
31	10.46	15	2	1		10.69±0.71de
32	10.52	16	1	1	1	12.17±0.89bcde
CK	7.00		2	2	2	9.99±0.46de
K <sub>1</sub>	12.59	12.28	12.18	12.53	13.30	
K <sub>2</sub>	11.96	11.79	10.78	10.44	9.81	
K <sub>3</sub>	12.55	11.11				
K <sub>4</sub>	12.03	10.74				
K <sub>5</sub>	12.27					
K <sub>6</sub>	10.62					
K <sub>7</sub>	12.56					
K <sub>8</sub>	11.73					
K <sub>9</sub>	11.15					
K <sub>10</sub>	11.47					
K <sub>11</sub>	11.17					
K <sub>12</sub>	10.66					
K <sub>13</sub>	11.85					
K <sub>14</sub>	9.77					
K <sub>15</sub>	10.24					
K <sub>16</sub>	11.10					
R	2.82	1.54	1.4	2.09	3.49	
顺序 order	2	4	5	3	1	

CK: 对照处理 Control; R: 正交极差值; K: 4 种因素各水平的均值; 不同小写字母表示不同处理间在 95% 置信水平下差异显著

表 4 盐碱胁迫及根瘤菌、摩西球囊霉处理下紫花苜蓿生物量和茎高净增长量的正交实验结果

Table 4 Above biomass and shoot increment of alfalfa under SAS, rhizobia and AMF treatments in orthogonal matrix experiment

处理 Treatment	生物量 Biomass		茎高净增长量 High net growth of stem	处理 Treatment	生物量 Biomass		茎高净增长量 High net growth of stem
	地上 Overground	地下 Underground			地上 Overground	地下 Underground	
1	2.60±0.46fghijk	2.05±0.55bcde	1.45±1.22ab	18	3.42±0.32cdef	2.58±0.56abc	0.80±0.12b
2	4.79±0.32ab	2.17±0.60bcde	0.99±0.25ab	19	4.68±0.3ab	2.84±0.76ab	2.07±1.63 a
3	3.09±0.38efgh	2.09±0.54bcde	0.54±0.16b	20	5.23±1a	2.42±0.74abcd	1.13±0.68ab
4	2.84±0.33efghi	2.50±0.46abcd	0.89±0.65b	21	5.30±0.77a	1.68±0.26bcdef	1.31±0.20ab
5	2.95±1.2efghi	2.51±0.67abcd	0.99±0.61ab	22	2.15±0.07ghijkl	2.16±0.82bcde	1.07±0.25ab
6	2.51±0.42fghijkl	1.91±0.93bcdef	0.31±0.08b	23	1.59±0.34jkl	1.08±0.08ef	0.49±0.13b
7	4.27±1.07abcd	2.02±0.63bcdef	1.12±0.29ab	24	2.12±0.95ghijkl	1.56±0.90cdef	0.85±0.29b
8	3.80±0.08bcde	2.33±0.43bcd	0.69±0.06b	25	1.33±0.06l	0.85±0.07f	1.03±0.20 ab
9	3.52±0.35cdef	2.49±1.08abcd	1.37±0.64ab	26	1.94±0.27hijkl	1.92±0.27bcdef	0.77±0.75 b
10	2.04±0.83ghijkl	1.68±0.76bcdef	1.41±1.55ab	27	1.85±0.11ijkl	1.35±0.23def	0.80±0.34b
11	4.94±1.32ab	2.44±0.09abcd	0.97±0.68ab	28	1.76±0.28ijkl	1.56±0.36cdef	0.74±0.16b
12	4.97±0.4ab	1.96±0.70bcdef	0.52±0.28b	29	1.57±0.44jkl	1.05±0.21ef	0.93±0.59ab
13	4.47±0.6abc	3.49±0.49a	0.99±0.13ab	30	2.32±0.47ghijkl	1.64±0.48cdef	0.54±0.18b
14	2.25±0.81ghijkl	1.57±0.92cdef	0.66±0.43b	31	2.77±0.88efghij	1.57±0.20cdef	1.32±0.11ab
15	1.55±0.01jkl	1.89±0.80bcdef	0.59±0.18b	32	2.14±0.56ghijkl	1.50±0.26cdef	0.80±0.25b
16	1.46±0.79jk	1.95±0.40bcdef	1.08±0.19ab	CK	3.12±0.27ghijkl	2.26±0.33bcd	1.34±0.18ab
17	3.42±0.52defg	2.55±0.75abc	1.41±0.75 ab				

CK: 对照处理 Control; 不同小写字母表示不同处理间在 95% 置信水平下差异显著, 图中值为平均值±标准差

表 5 各因素每个水平的平均值和极差

Table 5 Average and range for each factor

水平 Level	生物量 Biomass										株高增长量 Shoot increment				
	地上 Overground					地下 Underground									
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>
K <sub>1</sub>	2.92	3.71	2.97	3.59	3.60	2.30	2.40	2.04	2.06	2.12	1.43	1.16	1.00	1.05	1.07
K <sub>2</sub>	4.02	3.09	2.97	2.35	2.36	2.37	1.91	1.92	1.90	1.84	0.90	0.85	0.91	0.86	0.78
K <sub>3</sub>	3.89	2.77				2.47	1.78				1.30	0.95			
K <sub>4</sub>	4.03	2.32				2.46	1.83				1.01	0.86			
K <sub>5</sub>	4.12					2.10					1.15				
K <sub>6</sub>	2.33					2.04					0.69				
K <sub>7</sub>	2.93					1.55					0.81				
K <sub>8</sub>	2.96					1.94					0.77				
K <sub>9</sub>	2.43					1.67					1.20				
K <sub>10</sub>	1.99					1.80					1.09				
K <sub>11</sub>	3.4					1.89					0.88				
K <sub>12</sub>	3.28					1.76					0.63				
K <sub>13</sub>	3.02					2.27					0.96				
K <sub>14</sub>	2.29					1.60					0.60				
K <sub>15</sub>	2.16					1.73					0.95				
K <sub>16</sub>	1.8					1.73					0.94				
R	2.32	1.39	0	1.24	1.24	0.92	0.62	0.12	0.16	0.28	0.8	0.31	0.09	0.19	0.28
顺序 Order	1	2	4	3	3	1	2	5	4	3	1	2	5	4	3

## 2.2 AMF 和根瘤菌对盐碱胁迫下紫花苜蓿生物量的影响

4 种因素及其两两间的交互作用都对紫花苜蓿的地上生物量有显著影响。pH、pH 与根瘤菌的交互作用、

盐碱类型与根瘤菌的交互作用及盐碱类型与 AMF 的交互作用对植株地下生物量影响显著(表 2)。正交处理组中紫花苜蓿地上及地下生物量的最小值都出现在第 25 组(C 盐 25 mmol/L, pH 9.02, 同时接种根瘤菌和摩西管柄囊霉)即地上部与地下部生物量在相同条件下达到最小值。而地上、地下生物量分别在在第 21 组(B 盐 25 mmol/L, pH 8.1, 单接摩西管柄囊霉)、第 13 组(D 盐 25 mmol/L, pH 10.26, 同时接种根瘤菌和摩西管柄囊霉)出现最大值。地上生物量中第 21 组与第 2、7、11、12、13、19、20 组差异不显著, 与其他处理组都差异显著。地上生物量中第 13 组与第 4、5、9、11、17—10 组差异不显著, 与其他处理组都差异显著(表 4)。从正交处理结果和极差 R 来看(表 4、表 5), 不同因素对紫花苜蓿地上、地下生物量的影响程度相似, 顺序依次是 pH > 盐碱类型 > AMF + 根瘤菌  $\geq$  AMF > 根瘤菌, 盐碱类型对其的影响程度依次是 D > C > B > A。该结果表明盐碱引发的 pH 对紫花苜蓿生物量的影响要大于盐碱类型, 且大于 AMF 和根瘤菌的作用。

表 6 盐碱类型、pH、根瘤菌及 AMF 对紫花苜蓿 SOD、MDA、蛋白质、脯氨酸及 POD 影响的方差分析

Table 6 Variance analyses for the models of SOD, MDA, protein, proline and POD for each of the experimental factors

因素 Factors	自由度 DF	超氧化物 歧化酶 SOD		丙二醛 MDA		蛋白质 Protein		脯氨酸 Proline		过氧化物酶 POD	
		F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值
		F-value	Pr>F	F-value	Pr>F	F-value	Pr>F	F-value	Pr>F	F-value	Pr>F
X <sub>1</sub>	3	1.062	ns	1.448	ns	1.029	ns	2.252	ns	0.719	ns
X <sub>2</sub>	12	1.21	0.028	1.043	ns	1.051	ns	2.319	0.008	1.583	ns
X <sub>3</sub>	2	1.687	ns	0.184	ns	1.218	ns	0.715	ns	3.36	0.039
X <sub>4</sub>	2	3.628	0.03	1.731	ns	0.521	ns	0.118	ns	2.503	ns
X <sub>1</sub> · X <sub>3</sub>	10	0.974	ns	1.397	ns	0.723	ns	0.984	ns	1.392	ns
X <sub>1</sub> · X <sub>4</sub>	10	1.13	ns	1.519	ns	1.613	ns	0.929	ns	1.018	ns
X <sub>2</sub> · X <sub>3</sub>	34	1.949	0.009	1.192	ns	1.719	0.027	1.348	ns	1.736	0.025
X <sub>4</sub> · X <sub>2</sub>	34	1.929	0.01	1.202	ns	1.746	0.024	1.281	ns	1.757	0.023
X <sub>4</sub> · X <sub>3</sub>	7	1.457	ns	1.369	ns	0.964	ns	0.459	ns	2.738	0.012
Model	7	1.949	0.009	1.519	ns	1.719	0.027	1.828	0.028	1.736	0.025
R <sup>2</sup>	34	0.476		0.359		0.448		0.386		0.447	

### 2.3 AMF 和根瘤菌对盐碱胁迫下紫花苜蓿丙二醛(MDA)和脯氨酸含量的影响

盐碱类型对紫花苜蓿脯氨酸含量有显著影响, 而其他因素及其交互作用对 MDA 和脯氨酸的影响都不显著(表 6)。不同的处理对紫花苜蓿中 MDA 和脯氨酸积累量影响不同。MDA 在第 15 组(D 盐 75 mmol/L, pH 10.46, 单接摩西管柄囊霉)和第 23 组(B 盐 100 mmol/L, pH 8.56, 不接菌)分别出现最小值和最大值。脯氨酸在第 24 组(B 盐 100 mmol/L, pH 8.85, 单接根瘤菌)和 29 组(D 盐 25 mmol/L, pH 10.26, 不接菌)分别出现最大值和最小值。MDA 在第 15 组除和第 4 组、第 23 组差异显著外, 与其他组差异都不显著(表 7)。由正交处理结果和极差 R 值得出(表 7、表 8), 不同因素对紫花苜蓿 MDA 和脯氨酸含量影响程度相同, 依次是 pH > 盐碱类型 > AMF + 根瘤菌 > AMF > 根瘤菌。该结果表明, 盐碱胁迫是引发植物 MDA 和脯氨酸积累的主要因素, 其影响要大于 AMF 和根瘤菌的作用。

### 2.4 AMF 和根瘤菌对盐碱胁迫下紫花苜蓿 SOD 和 POD 的影响

盐碱类型、AMF、盐碱类型与根瘤菌的交互作用及盐碱类型与 AMF 的交互作用都对 SOD 有显著影响。根瘤菌、盐碱类型与根瘤菌的交互作用、盐碱类型与 AMF 的交互作用及根瘤菌与 AMF 的交互作用对 POD 影响显著(表 6)。pH 与不同处理对紫花苜蓿中 SOD、POD 活性的影响不同。SOD 在第 19 组(A 盐 100 mmol/L, pH 7.97, 同时接种根瘤菌和摩西管柄囊霉)和 29 组(D 盐 25 mmol/L, pH 10.26, 不接菌)分别出现最小值和最大值。POD 在第 7 组(B 盐 100 mmol/L, pH 8.56, 同时接种根瘤菌和摩西管柄囊霉)和第 11 组(C 盐 100 mmol/L, pH 9.87, 单接摩西管柄囊霉)分别出现最大值和最小值。SOD 在第 29 组和第 11 组、第 15 组、第 19 组、第 23 组差异显著(表 7)。由正交处理结果和极差 R 值得出(表 7、表 8), 不同因素对紫花苜蓿 SOD 的影

响程度依次是 pH>AMF+根瘤菌>盐碱类型>AMF>根瘤菌,对 POD 的影响程度依次是 pH>AMF+根瘤菌>根瘤菌>AMF>盐碱类型。该结果表明盐碱胁迫引发的 pH 是影响植物酶活性的主要因素,AMF+根瘤菌处理明显提高 SOD 和 POD 活性。

### 2.5 AMF 和根瘤菌对盐碱胁迫下紫花苜蓿可溶性蛋白的影响

总体来看,可溶性蛋白含量在所有处理组中变化不大。盐碱类型与两种菌间的交互作用对可溶性蛋白影响显著(表 6)。在第 11 组(C 盐 100 mmol/L, pH 9.87, 单接摩西管柄囊霉)和 30 组(D 盐 75 mmol/L, pH 10.38, 单接根瘤菌)分别出现最大值和最小值。第 11 组与第 26 组(C 盐 75 mmol/L, pH 9.87, 单接根瘤菌)、30 组差异显著,与其他处理组差异都不显著,而 30 组除与 26 组差异不显著外,与其他处理组都差异显著(表 7)。由极差 R(表 7、8)得出,不同因素对紫花苜蓿可溶性蛋白含量的影响程度依次是 pH>盐碱类型>根瘤菌>AMF+根瘤菌=AMF。该结果表明盐碱胁迫及其引发的高 pH 值对紫花苜蓿可溶性蛋白含量的影响强于根瘤菌和摩西管柄囊霉。

表 7 盐碱胁迫及根瘤菌、摩西球囊霉处理下紫花苜蓿丙二醛、脯氨酸、SOD、POD 及可溶性蛋白含量的正交实验结果

Table 7 MDA, proline, SOD, POD and protein of alfalfa under SAS, rhizobia and AMF treatments in orthogonal matrix experiment

处理 Treatment	丙二醛 MDA	脯氨酸 Proline	SOD	POD	可溶性蛋白 protein
1	6.82±2.78 bc	16.20± 10.26c	12.50± 2.51abcde	8.57±2.48cd	15.31±2.38ab
2	6.77±1.61 bc	17.35± 7.14c	12.06±3.08abcde	11.90±2.05abc	12.95±1.61ab
3	7.55±0.76abc	27.54 ±22.35abc	15.28±3.07ab	10.84±2.10bcd	18.10±0.79 a
4	11.68±4.09a	24.87 ±29.91bc	13.16±4.28abcde	10.95±2.12bcd	15.28±1.05 ab
5	6.79±0.62 bc	18.39 ±7.40abc	11.65±2.96abcde	10.34±2.11bcd	13.09±0.84ab
6	10.34±0.36 abc	49.79 ±55.06abc	12.98±1.49abcde	9.95±1.60bcd	15.74±0.41 ab
7	9.15±2.52 abc	57.20 ±40.75c	13.64±3.15abcd	13.01±3.05ab	16.57±4.11 ab
8	7.83±1.82 abc	82.47 ±55.57a	12.66±4.52abcde	10.57±2.39bcd	16.84±1.58ab
9	9.77±2.23 abc	7.85 ±7.26c	12.05±1.98abcde	10.32±1.62bcd	19.05±2.10 a
10	8.46±4.00abc	34.24 ±28.09abc	16.57±5.69a	11.45±3.00abc	15.99±2.66 ab
11	8.18±0.32 abc	27.74 ±27.32abc	9.60±3.99bcde	7.12±1.86d	19.11±0.90 a
12	8.50±1.13 abc	45.33 ±14.80abc	9.81±1.95bcde	14.86±1.77a	17.50±2.71 a
13	7.53±2.77abc	22.27 ±30.60c	10.44±2.84abcde	11.65±2.05abc	16.90±0.95 ab
14	6.11±1.83 c	23.31 ±17.33c	11.51±4.17abcde	9.74±0.87bcd	17.57±2.16 a
15	6.03±0.99 c	12.54 ±4.48c	8.60±1.49cde	9.86±1.94bcd	14.61±2.11ab
16	8.01±2.62 abc	48.77 ±41.53abc	11.41±1.06abcde	10.13±1.56bcd	15.06±1.49ab
17	9.50±2.62 abc	16.69 ±8.80c	10.10±3.72bcde	9.02±0.25cd	16.75±1.48ab
18	9.63±2.83abc	17.09 ±19.14c	12.59±3.28abcde	9.37±2.45bcd	18.80±2.09 a
19	7.99±1.09 abc	8.59 ±7.54c	7.34±0.78e	9.56±2.04bcd	17.28±2.18 a
20	7.40±0.92 abc	21.14 ±16.68c	7.64±0.81de	8.45±2.08cd	15.82±9.10 ab
21	8.72±0.76 abc	12.93 ±17.63c	8.23±4.83de	11.96±3.64abc	15.74±1.90 ab
22	7.46±2.55 abc	6.93 ±1.85c	7.55±3.92de	9.98±1.29bcd	16.15±2.43ab
23	10.73±2.48 ab	13.93 ±12.28c	8.40 ±1.31cde	10.22±0.86bcd	12.54±4.66ab
24	6.40±2.43 bc	81.52 ±87.88 ab	11.49±1.95abcde	8.70±1.38cd	15.41±3.28 ab
25	7.07±0.98 bc	12.04 ±15.34c	13.47±2.15abcde	11.50±1.77abc	13.99±2.94 ab
26	7.37±1.43 abc	32.20 ±45.07abc	14.46±3.80abc	10.96±0.83bcd	10.32±8.18 cd
27	7.07±1.68 bc	15.51 ±11.84c	11.11±5.05abcde	9.16±1.98bcd	15.16±2.00ab
28	6.55±2.99bc	30.30 ±2.25abc	12.83±1.30abcde	8.95±1.42cd	17.33±1.30a
29	8.57±1.86 abc	6.71 ±6.75c	16.52±0.68a	9.42±1.32bcd	15.29±0.87 ab
30	7.43±0.71 abc	10.11 ±7.20abc	12.95 ±2.67abcde	9.54±1.50bcd	6.10±9.25 d
31	6.40±5.30 bc	28.86 ±35.81c	12.44±1.90abcde	10.06±1.37bcd	15.59±3.54 ab
32	8.09±0.45abc	40.43 ±32.44abc	9.20±2.32bcde	11.15±1.48bc	16.02±1.25 ab
CK	6.23±0.63 bc	16.33 ±18.95c	12.86±2.11abcde	10.36±1.84bcd	14.16±1.09 ab



表 8 各因素每个水平的平均值和极差  
Table 8 Average and range for each factor

水平 Level	MDA					脯氨酸 Proline					SOD					POD					可溶性蛋白 Protein				
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>
K <sub>1</sub>	8.16	8.42	7.87	7.59	7.82	16.44	18.68	26.50	28.44	29.03	11.30	11.33	11.20	10.78	10.44	8.80	9.83	10.79	10.70	11.70	16.03	16.29	14.98	15.85	15.92
K <sub>2</sub>	8.20	8.43	8.12	8.41	8.89	17.22	40.40	27.93	25.99	25.25	12.33	10.82	11.94	12.36	12.76	10.63	10.59	9.80	9.89	9.9	15.88	15.26	16.14	15.27	16.50
K <sub>3</sub>	7.77	7.87				18.06	25.65				11.31	12.49				10.20	10.54				17.69	16.06			
K <sub>4</sub>	9.54	7.27				23.00	24.13				10.40	11.64				9.70	10.20				15.55	14.64			
K <sub>5</sub>	7.75					15.66					9.94					11.15					14.41				
K <sub>6</sub>	8.90					28.36					10.26					9.96					15.94				
K <sub>7</sub>	9.94					35.57					11.02					11.62					14.56				
K <sub>8</sub>	7.12					82.00					12.07					9.64					16.13				
K <sub>9</sub>	8.42					9.95					12.76					10.91					16.52				
K <sub>10</sub>	7.92					33.22					15.52					11.21					13.16				
K <sub>11</sub>	7.63					21.62					10.36					8.14					17.13				
K <sub>12</sub>	7.53					37.81					11.32					11.91					17.42				
K <sub>13</sub>	8.05					14.49					13.48					10.54					16.10				
K <sub>14</sub>	6.77					16.71					12.23					9.64					11.83				
K <sub>15</sub>	6.21					20.70					10.52					9.96					15.10				
K <sub>16</sub>	8.05					44.60					10.30					10.64					15.54				
R	3.73	1.16	0.25	0.82	1.07	67.51	21.72	1.43	2.45	3.78	3.54	1.67	0.74	1.58	2.32	3.11	0.76	0.99	0.81	1.80	5.59	1.65	1.16	0.58	0.58
顺序 order	1	2	5	4	3	1	2	5	4	3	1	3	5	4	2	1	5	3	4	2	1	2	3	4	4

## 2.6 AMF 及根瘤菌对紫花苜蓿根部的侵染状况

在 AMF 接种处理的石英砂中菌根均有侵染紫花苜蓿根部,而未做 AMF 接种处理的石英砂中没有检测到 AMF 侵染苜蓿根部。接种了根瘤菌的紫花苜蓿,根部均结有灰褐色根瘤。在有单独接种根瘤菌的处理中根瘤数是 960 个,重 0.433g, 双接种处理中根瘤数是 1162 个,重 0.452g。双接种处理中的根瘤数和根瘤重都略高于单独接种根瘤菌的处理,但差异不显著。

## 2.7 模型分析

通过正交结果分析发现,5 种不同因素对紫花苜蓿地上生物量、地下生物量、茎高净增长量、脯氨酸含量及 MDA 含量的影响程度相同,都为  $\text{pH} > \text{盐碱类型} > \text{AMF} + \text{根瘤菌} > \text{AMF} > \text{根瘤菌}$ 。根瘤菌的影响最小,因此,将根瘤菌固定,拟合出这 3 个指标关于 pH 和 AMF 的二元三次回归曲线。方差分析表明,模拟项的  $P < 0.05$ , 方差显著,说明在实验范围内模型与实际情况吻合。随盐碱胁迫程度加剧或 pH 的增大,地上生物量和 MDA 含量基本呈现出一个 U 型轨迹,而茎净增长量却呈现出一个倒 U 型的轨迹。与对照相比,单独接种根瘤菌和同时接种 AMF 和根瘤菌的处理对紫花苜蓿地上部生物量都有显著的促进作用。而对于茎净增长量这种促进生长作用却不明显,盐碱胁迫对其的抑制生长作用表现更明显。这与正交分析结果一致。pH < 9 或在 9 附近时,保护酶系统在短期内仍能维持活性氧产生及清除的动态平衡,茎生长速率虽然减缓但茎仍能保持生长,而 pH 超过这一临界范围,动态平衡被破坏,紫花苜蓿生长受到严重抑制(图 1)。表明接种根瘤菌和 AMF 可以提高紫花苜蓿耐盐碱性,使其在 pH 约为 9 (C 盐, 25—75 mmol/L) 的土壤中仍能正常生长。

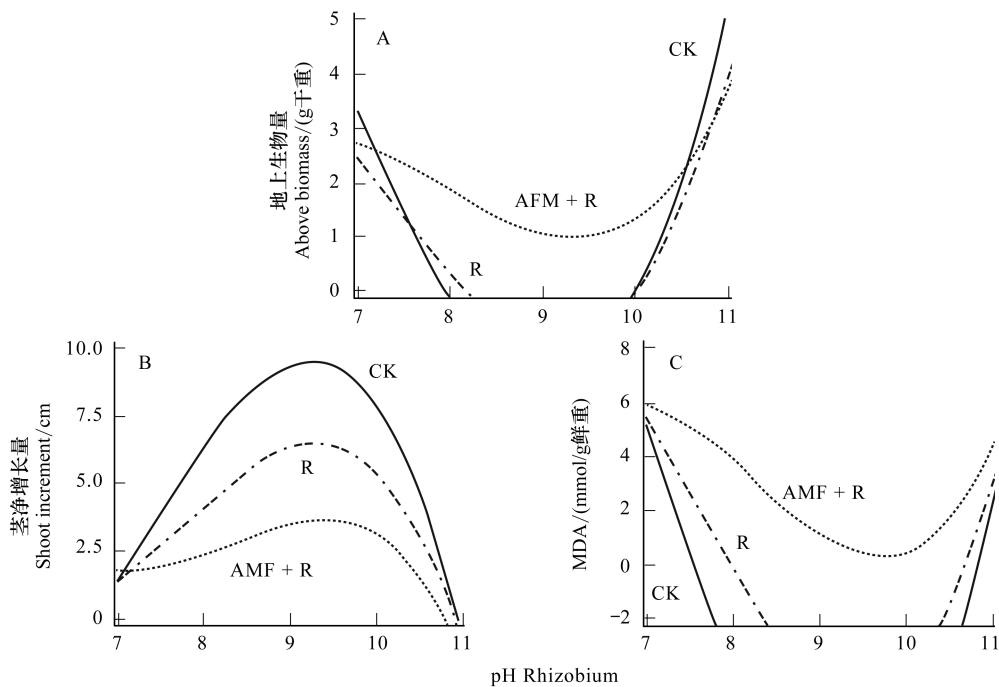


图 1 紫花苜蓿地上生物量、茎净增长量、MDA 含量随 pH 的变化

Fig.1 The variance of above biomass, shoot increment and MDA content with pH

CK: 对照组 Control; R: 接种根瘤菌处理组 Rhizobium; AMF+R: 双接种 AMF 和根瘤菌处理组; MDA: 丙二醛 Malonaldehyde

## 3 讨论

多数情况下,盐胁迫与碱胁迫并不是单独发生的,而是在复杂的盐碱地体系中共同存在,相伴发生。而且碱胁迫在盐胁迫的基础上还伴随着 pH 的升高,比盐胁迫对植物的伤害更大。盐碱胁迫引发的 pH 对紫花苜蓿的形态和生理指标的影响程度最大,这与 Shao 等<sup>[3]</sup>的结果一致。株高及生物量可以直接反应盐碱胁迫对植物生长的抑制。植物在高浓度盐碱胁迫下(100 mmol/L),细胞器破坏、大分子物质分解,大多数基因表达

下调,叶片衰老相关基因表达上调。叶片早衰,光合作用降低,植物生长受到抑制<sup>[19]</sup>。紫花苜蓿的株高及茎高净增长量均出现在中等浓度盐碱(100 mmol/L, pH 8.56)胁迫下同时接种根瘤菌和摩西管柄囊霉处理中,这与紫花苜蓿、盐碱离子、根瘤菌及摩西管柄囊霉单独或交互作用后其最适生长的 pH 改变有关<sup>[20]</sup>。植物同时接种根瘤菌与摩西管柄囊霉后,适宜浓度的盐离子或盐碱溶液反而有利于其茎的生长。低浓度的盐离子可以促进植物的光合作用,比如  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{HCO}_3^-$  等都参与植物的光合、呼吸、离子运输等生理过程<sup>[21]</sup>。本实验表明根瘤菌比摩西管柄囊霉对 pH 或盐碱溶液更敏感,摩西管柄囊霉比根瘤菌更能促进对植物细胞的增殖。Valenzuela 等认为<sup>[22]</sup>盐胁迫通过激发拟南芥根中茉莉酸信号通路来抑制细胞的伸长,紫花苜蓿中也可能存在类似的效应。Larimer 等<sup>[23]</sup>研究发现并不是所有的双接种都对植物生长有协同作用,这种作用是正面的、负面的或是无影响的主要取决与生物和非生物环境。

混合盐碱胁迫下接种根瘤菌与摩西管柄囊霉对紫花苜蓿的影响也可以通过其地上、地下的生物量来反映。地上与地下生物量的分配是紫花苜蓿适应盐碱的一种方式,当苜蓿受到胁迫时,根瘤菌和摩西管柄囊霉就近保护的是植株根部,所以对地下生物量影响较小,而地上部光合作用减弱,生物量积累下降。在高浓度盐碱胁迫下(pH 10.5—11),接种 AMF 和根瘤菌的苜蓿干重比对照要低,可能菌根化植物具有更高的水势能,在盐碱胁迫中增加了植物含水量。这与 Feng 等<sup>[24]</sup>研究结果一致。根瘤菌、摩西管柄囊霉与紫花苜蓿是互惠共生的,Kbdei-Lateif 等<sup>[25]</sup>发现根瘤菌能促进豆科植物根部类黄酮的排出,有利于 AMF 孢子萌发、菌丝分枝和次生孢子的形成。必要条件下,植物还可以把这些植物生长促生菌当做营养物质的来源<sup>[26]</sup>。本实验研究结果表明,在高浓度盐碱胁迫下,两种菌不能完全抵消盐碱对植物的抑制作用。植物细胞内离子失衡,代谢紊乱,苜蓿营养不良停止生长,AMF 和根瘤菌不能从苜蓿中获得足够的碳源,互惠作用受限<sup>[27]</sup>。

盐碱抑制植物的生长主要有两个阶段,第一个阶段主要是由高浓度的盐引起的水分亏缺造成的<sup>[28]</sup>。随着胁迫时间的延长,进入第二个阶段,离子毒害成为抑制植物生理代谢的主要因素<sup>[1]</sup>。盐碱胁迫下紫花苜蓿最先受到伤害的是细胞膜,MDA 是膜质过氧化的产物,可以反映细胞的受损程度。许多研究表明,随着胁迫强度的增大,植物中 MDA 含量呈先升高后下降的趋势<sup>[29-30]</sup>。而本研究结果正好与此相反,随着盐碱胁迫程度的加大,pH 值升高,MDA 含量一开始呈下降趋势。其原因是 AMF 和根瘤菌提高了植物的抗逆性,使保护酶系统在短期内仍能维持活性氧的动态平衡,后随着盐碱胁迫程度的加大,体内活性氧的产生及清除的动态平衡受到破坏,MDA 含量明显回升。这与 Li 等<sup>[31]</sup>的结果一致。双接种处理的紫花苜蓿中,大量渗透调节物质如脯氨酸、甜菜碱、可溶性蛋白质等积累,维持细胞内低渗透势来减轻盐碱胁迫对植物的伤害<sup>[32]</sup>。

盐碱引发的 pH 影响着叶片中酶的活性,同时接种根瘤菌和摩西管柄囊霉促使抗氧化酶基因 *AtAPX3* 和 *OsAPX4* 表达量上升,降低土壤 pH 对抗氧化酶(包括 SOD、POD 及 CAT)活性的影响,缓解氧化应激对植物细胞造成的伤害<sup>[33]</sup>。这在本研究结果中也得到了生理水平的证实。根瘤菌可以通过调节植物的有机酸含量来减小盐碱对植物的伤害,AMF 还通过吸收  $\text{K}^+$  排出  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ ,增加叶片相对含水量,降低细胞膜渗透性等多种方式来参与调控植物缓解盐胁迫的机制<sup>[34-36]</sup>。不同因素对 POD 和可溶性蛋白的影响程度不同,这种差异可能是由于两种菌和盐碱离子的交互作用产生的。Zhang 等<sup>[37]</sup>发现碱胁迫会导致杂交榛中 Zn、B 和 Ca 含量的降低,使细胞伸长和分裂受到抑制、细胞膜稳定性降低,这也是盐碱胁迫抑制植物生长的另一个因素。高浓度盐碱胁迫下,植物菌根侵染率下降,  $\text{Na}^+$  积累<sup>[38]</sup>。幼叶通过光合作用可以维持低  $\text{Na}^+$  和高  $\text{K}^+$  含量,老叶通过加强氨基酸(如缬氨酸、丝氨酸、氨基丁酸等)的合成来进行渗透调节及维持细胞稳定<sup>[39]</sup>,但比较缓慢滞后。大多数植物在 NaCl 溶液浓度达到 150 mM 时就不能存活<sup>[40-41]</sup>,而本实验中 150 mM 混合盐碱胁迫未有植株死亡,这可能与植株的品种基因有关,但也说明了接菌处理增强了紫花苜蓿对盐碱溶液的抗性,三种接种方式都有利于紫花苜蓿抵抗盐碱胁迫,但从总体来看,双接种>单接摩西管柄囊霉>单接根瘤菌。这与相关研究结果一致<sup>[42]</sup>。“AMF+根瘤菌-紫花苜蓿-盐碱地”体系对提高紫花苜蓿抗盐碱性,有效利用盐碱地及农业的可持续发展有一定的重要意义。

#### 4 结论

(1) 紫花苜蓿接种根瘤菌或/和摩西管柄囊霉后对盐碱胁迫(盐浓度<75 mmol/L, pH 7.0—9.79)耐受性提高,但根瘤菌或/和摩西管柄囊霉的促进作用不能完全抵消盐碱胁迫(盐浓度 100—50 mmol/L, pH 9.87—10.52)对植物的抑制作用。盐碱胁迫对地上生物量、地下生物量、茎高净增长量、MDA、脯氨酸及可溶性蛋白的影响要大于摩西管柄囊霉和根瘤菌。

(2) 紫花苜蓿同时接种根瘤菌和摩西管柄囊霉对其株高、生物量及渗透调节能力都有所提高,且这种作用优于单接一种菌。不同接种方式对植物的影响程度为摩西管柄囊霉+根瘤菌>摩西管柄囊霉>根瘤菌。

(3) 盐碱混合胁迫对紫花苜蓿的生长发育造成严重伤害,且其伤害程度要大于盐胁迫。盐碱胁迫引发的 pH 对植物的伤害要大于盐碱类型,接种根瘤菌和 AMF 后的紫花苜蓿不仅有利于自身产量的提高,还能有效利用盐碱地。

#### 参考文献 (References):

- [ 1 ] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 651-681.
- [ 2 ] 翁亚伟, 张磊, 张姗, 田中伟, 靳雪莹, 李梦雅, 余钟毓, 姜东, 戴廷波. 盐旱复合胁迫对小麦幼苗生长和水分吸收的影响. *生态学报*, 2017, 37(7): 2244-2252.
- [ 3 ] Shao S, Qi MM, Tao S, Lin J X, Wang Y N, Yan X F. Physiological and biochemical responses of Jerusalem artichoke seedlings to mixed salt-alkali stress conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2015, 43(2): 473-478.
- [ 4 ] Shi DC, Wang D L. Effects of various salt-alkaline mixed stresses on *Aneurolepidium chinense* (Trin.) Kitag. *Plant and Soil*, 2005, 271(1/2): 15-26.
- [ 5 ] Guo R, Shi L X, Yan C R, Zhong X L, Gu F X, Liu Q, Xia X, Li H R. Ionic and metabolic responses to neutral salt or alkaline salt stresses in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *BMC Plant Biology*, 2017, 17: 41.
- [ 6 ] Anower M R, Mott I W, Peel M D, Wu Y J. Characterization of physiological responses of two alfalfa half-sib families with improved salt tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 71: 103-111.
- [ 7 ] 王强, 王茜, 王晓娟, 张亮, 张云飞, 黄利春, 金樑. AM 真菌在有机农业发展中的机遇. *生态学报*, 2016, 36(1): 11-21.
- [ 8 ] Wang Y F, Zhang Z Q, Zhang P, Cao Y M, Hu T M, Yang P Z. Rhizobium symbiosis contribution to short-term salt stress tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant and Soil*, 2016, 402(1/2): 247-261.
- [ 9 ] Tilak KVBR, Ranganayaki N, Manoharhari C. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanuscajan*). *European Journal of Soil Science*, 2006, 57(1): 67-71.
- [ 10 ] Egamberdieva D, Li L, Lindström K, Räsänen L A. A synergistic interaction between salt-tolerant *Pseudomonas* and *Mesorhizobium* strains improves growth and symbiotic performance of liquorice (*Glycyrrhizauralensis* Fish.) under salt stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(6): 2829-2841.
- [ 11 ] Hedayat A S, Sloane N J A, Stufken J. *Orthogonal Arrays: Theory and Applications*. New York, USA: Springer, 1999.
- [ 12 ] 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*. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 175(1/3): 703-709.
- [ 13 ] Beyer WF Jr, Fridovich I. Effect of hydrogen peroxide on the iron-containing superoxide dismutase of *Escherichiacoli*. *Biochemistry*, 1987, 26(5): 1251-1257.
- [ 14 ] Madhava Rao K V, Sresty T V S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanuscajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science*, 2000, 157(1): 113-128.
- [ 15 ] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [ 16 ] Giovannetti M, Mosse B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 1980, 84(3): 489-500.
- [ 17 ] Chatterjee S, Price B. CHAI-TERJEE, S., B. PRICE: *Regression Analysis by Example*. 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York, 1991, xvii, 278 pp., US \$ 32.60, ISBN 0-471-88479-0. *Biometrical Journal*, 1992, 34(6): 734.
- [ 18 ] Lattin J, Carroll D, Green P E. *Analyzing Multivariate Data*. California, USA: Thomson Learning, 2003.

- [19] Kong X Q, Wang T, Li W J, Tang W, Zhang D M, Dong H Z. Exogenous nitric oxide delays salt-induced leaf senescence in cotton (*Gossypiumhirsutum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, 38: 61.
- [20] 邵璐, 姜华. 辽宁碱蓬根际土壤真菌多样性的季节变化及其耐盐性. *生态学报*, 2016, 36(4): 1050-1057.
- [21] He Y, Chen Y, Yu C L, Lu K X, Jiang Q S, Fu J L, Wang G M, Jiang D A. Photosynthesis and yield traits in different soybean lines in response to salt stress. *Photosynthetica*, 2016, 54(4): 630-635.
- [22] Valenzuela C E, Acevedo-Acevedo O, Miranda G S, Vergara-Barros P, Holuigue L, Figueroa C R, Figueroa P M. Salt stress response triggers activation of the jasmonate signaling pathway leading to inhibition of cell elongation in *Arabidopsis* primary root. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(14): 4209-4220.
- [23] Larimer A L, Clay K, Bever J D. Synergism and context dependency of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia with a prairie legume. *Ecology*, 2014, 95(4): 1045-1054.
- [24] Feng G, Zhang F S, Li X L, Tian C, Tang C, Rengel Z. Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza*, 2002, 12(4): 185-190.
- [25] Abdel-Lateif K, Bogusz D, Hoche V. The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and Frankia bacteria. *Plant Signaling&Behavior*, 2012, 7(6): 636-641.
- [26] Omirou M, Fasoula D A, Ioannides I M. *Bradyrhizobium* inoculation alters indigenous AMF community assemblages and interacts positively with AMF inoculum to improve cowpea performance. *Applied Soil Ecology*, 2016, 108: 381-389.
- [27] 李媛媛, 王晓娟, 豆存艳, 林双双, 罗巧玉, 崔慧君, 孙莉, 金樑. 四种宿主植物及其不同栽培密度对 AM 真菌扩繁的影响. *草业学报*, 2013, 22(5): 128-135.
- [28] 王隼珍, 刘倩, 高妮妮, 柳旭. 植物对盐碱胁迫的响应机制研究进展. *生态学报*, 2017, 37(16): 5565-5577.
- [29] Xu D H, Wang W Y, Gao T P, Fang X W, Gao X G, Li J H, Bu H Y, Mu J. Calcium alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing antioxidant metabolism and adjusting solute accumulation in *Calligonummongolicum*. *Conservation Physiology*, 2017, 5(1): cox060.
- [30] Hossain M D, Inafuku M, Iwasaki H, Taira N, Mostofa M G, Oku H. Differential enzymatic defense mechanisms in leaves and roots of two true mangrove species under long-term salt stress. *Aquatic Botany*, 2017, 142: 32-40.
- [31] Li L, Li L, Wang X Y, Zhu P Y, Wu H Q, Qi S T. Plant growth-promoting endophyte *Piriformospora indica* alleviates salinity stress in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2017, 119: 211-223.
- [32] Deinlein U, Stephan A B, Horie T, Luo W, Xu G H, Schroeder J L. Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science*, 2014, 19(6): 371-379.
- [33] Guan Q J, Wang Z J, Wang X H, Takano T, Liu S K. A peroxisomal APX from *Puccinelliatenuiflora* improves the abiotic stress tolerance of transgenic *Arabidopsis thaliana* through decreasing of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 175: 183-191.
- [34] 宋婷婷, 田璞, 勇月圆, 杨巍巍, 王泽伟, 吴限, 许慧慧, 才华. 根瘤共生对紫花苜蓿耐盐碱性及有机酸含量变化的影响. *分子植物育种*, 2016, 14(4): 1009-1015.
- [35] Li X, Sun M L, Zhang H H, Xu N, Sun G Y. Use of mulberry-soybean intercropping in salt-alkali soil impacts the diversity of the soil bacterial community. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9(3): 293-304.
- [36] Hegazi A M, El-Shraiy A M, Ghoname A A. Erratum to: mitigation of salt stress negative effects on sweet pepper using Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF), *Bacillus megaterium* and Brassinosteroids (BRs). *Gesunde Pflanzen*, 2017, 69(2): 91-102.
- [37] 张丽, 贾志国, 马庆华, 张刚, 王贵禧. 盐碱胁迫对平欧杂种榛枝条电阻抗图谱参数及离子含量的影响. *应用生态学报*, 2014, 25(11): 3131-3138.
- [38] Lin J X, Wang Y N, Sun S N, Mu C S, Yan X F. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth, photosynthesis and photosynthetic pigments of *Leymus chinensis* seedlings under salt-alkali stress and nitrogen deposition. *Science of the Total Environment*, 2017, 576: 234-241.
- [39] Guo R, Shi L X, Yang C W, Yan C R, Zhong X L, Liu Q, Xia X, Li H R. Comparison of ionic and metabolites response under alkali stress in old and young leaves of Cotton (*Gossypiumhirsutum* L.) Seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1785.
- [40] Khorasaninejad S, Mousavi A, Soltanloo H, Hemmati K, Khalighi A. The effect of salinity stress on growth parameters, essential oil yield and constituent of peppermint (*Menthapiperita* L.). *World Applied Sciences Journal*, 2010, 11(11): 1403-1407.
- [41] Çoban Ö, Baydar N G. Brassinosteroid effects on some physical and biochemical properties and secondary metabolite accumulation in peppermint (*Menthapiperita* L.) under salt stress. *Industrial Crops and Products*, 2016, 86: 251-258.
- [42] 蒙程, 陆妮, 柴琦. 不同 pH 下接种 AM 真菌和根瘤菌对紫花苜蓿生长的影响. *草业科学*, 2017, 34(2): 352-360.