

菌剂施用对高温胁迫下芒萁光合与抗逆生理特性的影响

冯柳俊¹, 陈志强^{1*}, 罗立津², 王健¹

(1. 福建师范大学 地理科学学院、碳中和未来技术学院, 福州 350117; 2. 福建省微生物研究所环境微生物研究室, 福州 350007)

摘要: 为研究纳豆芽孢杆菌菌剂对芒萁耐热能力的影响, 本研究测定了不同温度和不同肥料处理下当年生芒萁的光合和抗高温生理指标。结果表明: (1) 温度和肥料都能显著影响芒萁的光合和抗高温生理 ($P < 0.05$)。 (2) 温度升至 45°C 时, 芒萁叶片的净光合速率、蒸腾速率、气孔导度和叶绿素含量显著降低 ($P < 0.05$), 高温胁迫对芒萁光合生理的抑制属于非气孔限制; 为抵御高温胁迫, 芒萁的超氧化物歧化酶、过氧化物酶活性、脯氨酸、丙二醛含量和相对电导率显著升高 ($P < 0.05$)。 (3) 与对照组和有机肥组相比, 菌剂显著提高了芒萁叶片的净光合速率、蒸腾速率、气孔导度、叶绿素含量以及过氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性, 降低了胞间 CO₂ 浓度、丙二醛含量和相对电导率 ($P < 0.05$)。 (4) 使用主成分分析与隶属函数法相结合的评价方法综合评价了芒萁抗高温能力, 发现菌剂添加的有机肥施用下芒萁的抗高温能力得分更高。综上所述, 芒萁具有一定的抗高温性, 能根据不同胁迫环境选择性地诱导抗逆生理活动来适应高温环境; 纳豆芽孢杆菌菌剂缓解了高温胁迫对芒萁光合作用的抑制, 诱导抗氧化酶活性的提高以缓解细胞的损伤, 减轻渗透调节的压力, 有效提高芒萁对高温胁迫的抵抗能力。该研究结果对南方红壤侵蚀区及类似区域的生态修复和水土保持具有一定意义。

关键词: 芒萁, 高温胁迫, 纳豆芽孢杆菌, 光合特性, 抗逆生理

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号:

基金项目: 福建省自然科学基金 (2020J01143); 福建省水利科技项目 (MSK202201); 福建省水利科技项目: 南方典型河湖山水林田草生命共同体的风险评估与优化调控 (A20LKYC00291B06)。

第一作者: 冯柳俊, 1995, 男, 汉族, 博士研究生, 研究方向为水土保持与生态修复, (E-mail) swliuzi0120@163.com。

* **通信作者:** 陈志强, 博士, 教授, 研究方向为资源环境、水土保持与生态修复、GIS 应用, (E-mail) soiltuqiang061@163.com。

Effects of bacterial agent application on physiological characteristics of photosynthesis and stress resistance in *Dicranopteris pedata* under high temperature stress

FENG Liujun¹, CHEN Zhiqiang^{1*}, LUO Lijin², WANG Jian¹

(1. School of Geographical Science School of Carbon neutrality Future Technolugu, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China; 2. Laboratory of Environmental Microbiology, Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou 350007, China)

Abstract: In order to investigate study the influence of microbial agent *Bacillus natto* on the ability of *Dicranopteris pedata* to tolerate high temperature stress, this study determined the physiological indexes of photosynthesis and resistance to high temperature of annual *D. pedata* under different temperatures and fertilizers treatments. The results showed that: (1) both temperature and fertilizer could significantly affect the photosynthesis and high temperature resistance physiology of *D. pedata* ($P < 0.05$). (2) The net photosynthetic rate, transpiration rate, stomatal conductance, and chlorophyll content of *D. pedata* leaves were significantly reduced ($P < 0.05$) when the temperature was increased to 45°C. The inhibition of photosynthetic physiology of *D. pedata* by high-temperature stress was an non-stomatal limiting. To defend the high temperature stress, the superoxide dismutase, peroxidase activity, proline, malondialdehyde content, and relative conductivity of *D. pedata* were increased significantly ($P < 0.05$). (3) Compared with the control group and the organic fertilizer group, the fertilizer with microbial agent audition significantly increased the net photosynthetic rate, transpiration rate, stomatal conductance, chlorophyll content, and the activities of peroxide dismutase and catalase in leaves of *D. pedata*, and decreased the intercellular CO₂ concentration, malondialdehyde content and the relative electrical conductivity of *D. pedata* leaves ($P < 0.05$). (4) The evaluation method combining principal component analysis and membership function method was used to evaluate the high temperature resistance of *D. pedata*. It was found that the *D. pedata* scored higher in resistance to high temperature under fertilizer-added origin manure application. Overall, *D. pedata*

has a certain degree of resistance to high temperature, and can selectively induce stress resistance physiology to adapt the high temperatures environment according to different stress environments. The *Bacillus natto* can alleviate the photosynthesis inhibition of *D. pedata* by high temperature stress, induce the increase of antioxidant enzyme activities to alleviate cell damage, reduce the pressure of osmoregulation, and effectively improved the resistance of *D. pedata* induced by high temperature stress. This study provide a reference for the ecological restoration and soil and water conservation in the southern red soil erosion area and similar areas.

Key words: *Dicranopteris pedata*; high temperature stress; *Bacillus natto*; photosynthetic characteristics; stress resistance physiology

植物的生长发育和扩散对于温度变化十分敏感 (Wahid et al., 2007)。全球变暖背景下高温作为非生物胁迫因子, 会损害植物的光合系统, 降低光合效率 (Hayat et al., 2009), 同时打破活性氧 (ROS) 的平衡从而破坏植物细胞质膜, 攻击生物大分子, 阻碍植物细胞功能的正常发挥 (Janicka-Russak et al., 2012), 最终影响植物的生长发育甚至导致其死亡。受到高温胁迫后, 植物也会做出应激反应, 如诱导抗氧化酶活性以消除过量的 ROS, 积累渗透调节物质以平衡细胞内外水势等, 减轻高温胁迫造成的损伤以保护植物细胞 (张婷等, 2023)。除植物自身能够通过相应机制抵御高温胁迫外, 微生物能够提高植物应答高温胁迫的耐热性 (张春楠等, 2020)。特别是一些有益的细菌和真菌能够改善胁迫下植物的生理性能, 增强植物抗逆性, 帮助植物克服非生物胁迫的危害 (Levy, et al., 1983)。因此, 菌剂应用于诱导植物相关抗逆生理的表达成为提高植物应答高温胁迫能力的有效措施 (沈杰等, 2016)。有研究发现, 纳豆芽孢杆菌 (*Bacillus natto*) 是一种耐热性强且稳定性高的益生菌, 可通过产生许多抗菌物质、维生素类物质和抗氧化物质等来增强机体免疫力和调节机体肠道菌群环境 (尹聪和许啸, 2011)。同时, 纳豆芽孢杆菌菌剂具有制备低投入、高收益和绿色环保等优点, 可辅助有机肥和化肥发挥更佳的施用效果 (Liu, et al., 2022), 符合现代生态环境的可持续发展诉求。

芒萁 (*Dicranopteris pedata*) 是一种广泛生长于我国长江以南地区的多年生蕨类植物, 是南方红壤侵蚀区抑制水土流失和修复生态环境的重要先锋植物 (梁美霞等, 2021)。由于南方红壤侵蚀区林下植被稀疏, 甚至无上层植被覆盖地表 (袁再健等, 2020), 导致夏季高温时

地表温度大幅增长, 芒萁因此容易遭受高温胁迫, 从而限制了其生长和蔓延。然而, 高温胁迫下芒萁的光合和抗高温生理如何应答, 纳豆芽孢杆菌是否能够增强高温胁迫下芒萁的抗高温能力等科学问题皆不得而知, 相关研究鲜见报道, 成为南方红壤侵蚀区水土保持研究领域的一个空白。因此, 在全球变暖大环境下, 深入了解芒萁对高温胁迫的应答以及促进芒萁对高温胁迫的抵御或将成为南方红壤侵蚀区水土保持和生态修复的关键之一。

为研究芒萁如何响应高温胁迫, 本研究假设纳豆芽孢杆菌菌剂能够诱导芒萁的生理生化以抵御高温胁迫, 从光合生理和抗高温生理两个角度探讨芒萁的抗高温能力并加以验证, 以为高温环境下芒萁适应性生长发育和南方红壤侵蚀区及类似水土流失地区的生态治理提供理论依据和科学支撑。

1. 材料与amp;方法

1.1 试验材料

试验材料选用从福建省福州市鼓山 (119°22'—119°25' E、25°20'—26°05' N) 移栽的1年生芒萁, 供试土壤为鼓山风景区花岗岩发育的山地红壤。供试菌剂为福建省微生物研究所自备所得的纳豆芽孢杆菌菌剂, 方法如下: 将纳豆芽孢杆菌菌株接种到相应的肉汤培养基 (Luria-Bertani, LB: 0.5%酵母提取物, 1%蛋白胨, 0.5%氯化钠, pH 7.2~7.4) 和马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (Potato Dextrose Agar, PDA: 20%土豆, 2%葡萄糖, 2%琼脂) 中, 置于 37 °C、150 r·min⁻¹ 的恒温摇床培养。24 h 后取培养好的种子液以 1% 的移种量混匀混入固态发酵培养基 (麸皮 1 kg, 豆粕 8 kg, 水 6.5 L), 37 °C 条件培养 48 h。最后将培养好的固态发酵物于 50 °C 下烘干。

1.2 试验设计

在福州鼓山选择长势一致的当年生芒萁, 移栽至福建省微生物研究所的人工气候培养箱。培养 2 月后, 设置 3 组处理, 第一组不施用任何肥料 (F1), 第二组施用有机肥 (F2, 有机肥/土壤=1/4, V/V), 第三组施用纳豆芽孢杆菌菌剂+有机肥 (F3, 菌剂/有机肥/土壤=1/1/4, V/V/V)。预培养期间, 培养箱的昼夜模拟设置为白昼 16 h, 25 °C; 黑夜 8 h, 20 °C; 光照强度 1 000 μmol·m⁻²·s⁻¹。

施肥处理 1 个月后, 进行短期高温胁迫试验。胁迫时, 昼夜模式不变, 温度模式设置为 25 °C/20 °C、35 °C/30 °C、45 °C/40 °C, 共处理 48 h。其中, 25 °C/20 °C 为对照组, 35 °C/30 °C、

45 °C/40 °C为高温胁迫组。为防止干旱，培育和胁迫期间各处理材料于每日上午 7:00 进行浇灌，使土壤持水量保持于 60%~70%。短期高温胁迫后，次日 9:00-11:00 检测光合参数。每个处理下重复测 3 株芒萁，每株取 2 片成熟叶子，共 6 次。然后，剪下测量过光合作用的芒萁叶片低温保存。室内测定芒萁叶片生理指标，每个处理设 3 个重复。

1.3 检测方法

利用便携式光合作用系统 (Li-6800, USA) 在恒定的室内光源下测定各处理下芒萁叶片的光合参数：净光合速率 (P_n)，蒸腾速率 (T_r)，气孔导度 (G_s) 和胞间 CO_2 浓度 (C_i)。测定时，叶室内的流量设置值为 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，压力阀为 0.1 kPa，光照强度为 $1600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ， CO_2 浓度为 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，叶片温度为 25 °C，叶室内的湿度为 55%~60%。采用丙酮法检测叶绿素 (Chl) 含量；逆境生理指标的试验方法如下：采用氮蓝四唑法检测超氧化物歧化酶 (SOD) 活性，愈创木酚法检测过氧化物酶 (POD) 活性，紫外光度计法检测过氧化氢酶 (CAT) 活性，茚三酮法检测脯氨酸 (Pro) 含量，硫代巴比妥酸法检测丙二醛 (MDA) 含量，电导仪检测相对电导率 (REC)。

1.4 数据处理

将测定的各个生理指标数据录入 Microsoft Excel 2019 并进行整理与计算。采用 SPSS 22 软件进行数据的双因素方差分析 (two-way ANOVA) 和单因素方差分析 (one-way ANOVA)，检测施肥处理和温度变化对芒萁光合生理和抗高温生理的影响。One-way ANOVA 分析时，若通过方差齐性检验则采用 S-N-K 方法做事后多重比较检验，若未通过方差齐性检验则用 Dunnett's C 做事后多重比较检验。

通过主成分分析和模糊数学隶属函数法相结合的方法 (朱亚迪等, 2022) 评价不同高温胁迫处理下芒萁的耐高温能力。采用 SPSS 22 软件做数据的 Pearson 相关性分析、Kaiser-Meyer-Olkin 检验和 Bartlett 球形检验，检验数据进行主成分分析的可行性。然后，使用 SPSS 22 软件对数据做主成分分析，获取特征值、贡献率、主成分载荷等，计算主成分得分 (PCS)。并用隶属函数法计算主成分得分的隶属函数值，最终结合主成分贡献率的比率得出三种高温胁迫下芒萁的抗逆性综合得分，以评价其耐高温能力。计算公式如下：

$$U_{PCSj} = \frac{x_j - x_{min}}{x_{max} - x_{min}} \quad (1)$$

$$W_j = P_j \sum_{j=1}^n P_j \quad (j=1, 2, 3, \dots, n) \quad (2)$$

$$D = \sum_{j=1}^n [U_{PCSj} \times R_j] \quad (j=1, 2, 3, \dots, n) \quad (3)$$

式中： U_{PCsj} 为第 j 个 PCS 的隶属函数值； x_j 为第 j 个 PCS， x_{min} 为第 j 个主成分内的最小值； x_{max} 为第 j 个主成分内的最大值； W_j 为第 j 个 PCS 的贡献率比率； P_j 为第 j 个主成分贡献率； D 为芒萁耐高温能力综合得分， D 值越高，耐高温能力越强。

使用软件 Origin Pro 2022 制图。

2. 结果与分析

2.1 芒萁叶片光合特性

双因素方差分析结果显示（表 1），不同温度和不同肥料分别对芒萁各光合特性指标产生显著影响（ $P<0.05$ ）。同时，温度和肥料双因素交互作用也对芒萁各光合指标有显著影响（ $P<0.05$ ）。

随着温度的上升（图 1），F2 组芒萁的 P_n 先上升再大幅下降（ $P<0.05$ ），而温度从 25 °C 升到 35 °C 时，F2 组芒萁 T_r 、 G_s 和 C_i 基本保持不变，但上升到 45 °C 时， T_r 和 G_s 显著下降，而 C_i 显著上升（ $P<0.05$ ）；F3 组芒萁的 P_n 和 G_s 随温度的变化趋势与 F2 组相似，但 T_r 呈现先上升后下降、 C_i 呈现先下降后上升的趋势，变化差异显著（ $P<0.05$ ）。三种施肥处理间比较发现，当温度升到 45 °C 时，除 C_i 外，F3 组芒萁的其余 3 项气体交换参数都显著高于 F2 组和 F1 组（ $P<0.05$ ）。三种施肥处理的芒萁 Chl 含量随温度的上升都显著下降（ $P<0.05$ ）。与对照 F1 组相比，在 35 °C 和 45 °C 时 F2 组和 F3 组芒萁 Chl 都显著高于 F1 组，其中 45 °C 时 F3 组芒萁 Chl 还显著高于 F2 组（ $P<0.05$ ）。

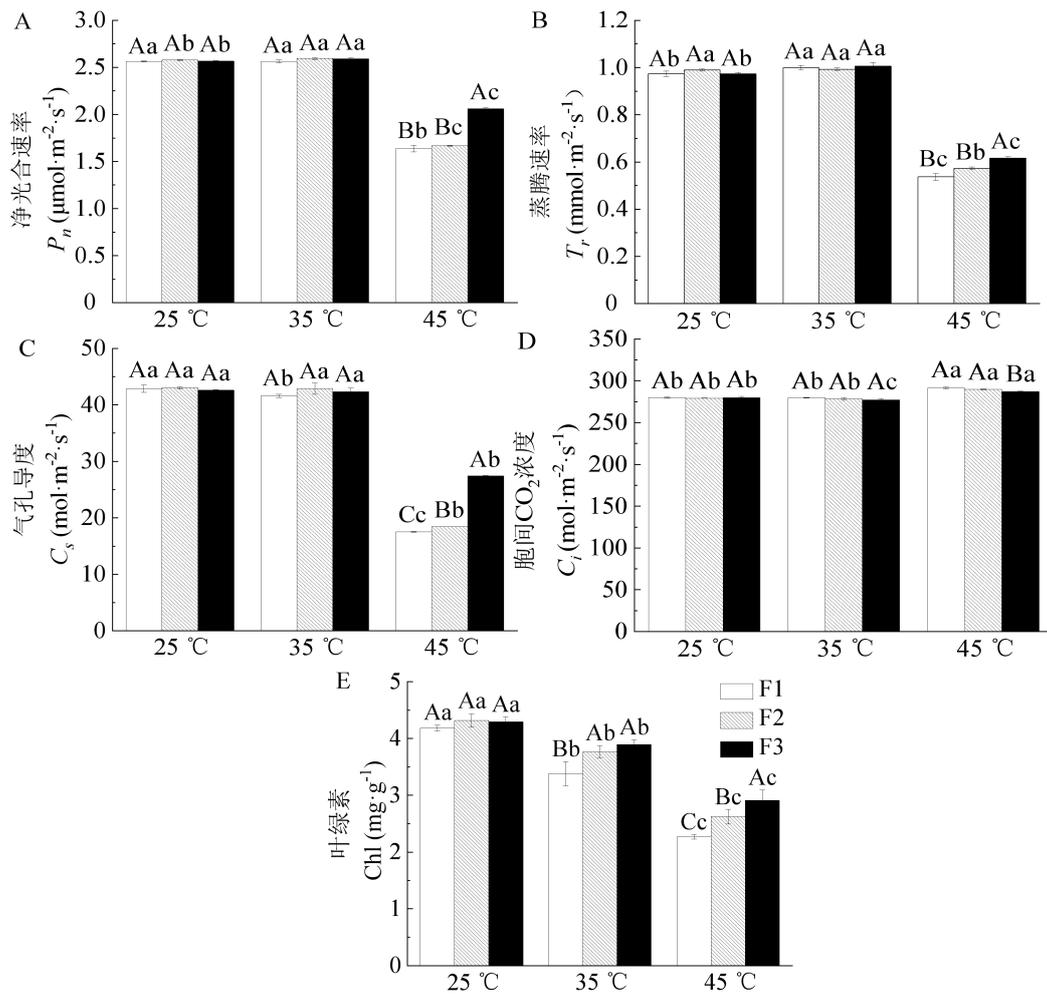
表1 温度和肥料影响芒萁光合特性的双因素方差分析

Table 1 Two-way ANOVA of the effects of temperature and fertilizer on photosynthetic characteristics of *Dicranopteris pedata*

因素 Factor	P_n	T_r	G_s	C_i	Chl
温度 Temperature	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
肥料 Fertilizer	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
温度+肥料 Temperature and fertilizer	0.000	0.000	0.000	0.016	0.019

注：表中数据为显著性 P 值，显著性差异水平表示为 $P<0.05$ 。下同。

Note: The data in the table are significant P values, and the level of significant difference is expressed as $P < 0.05$. The same below.



F1. 不施用任何肥料; **F2.** 施用有机肥; **F3.** 施用纳豆芽孢杆菌菌剂+有机肥; 同大写字母表示同一处理温度下施用不同肥料间的显著性差异水平 ($P < 0.05$); 不同小写字母表示施用同一肥料下不同温度间的显著性差异水平 ($P < 0.05$)。下同。

F1. Without fertilization; **F2.** Applying organic fertilizer; **F3.** Applying *Bacillus natto* bacteria agent and organic fertilizer; different uppercase letters indicate the level of significant difference ($P < 0.05$) between different fertilizers applied at the same treatment temperature; different lowercase letters indicate the level of significant difference ($P < 0.05$) between different temperatures applied with the same fertilizer. The same below.

图1 不同施肥处理对高温胁迫下芒萁叶片光合特性的影响

Fig. 1 Effects of different fertilization treatments on photosynthetic parameters of *Dicranopteris pedata* leaves under high temperature stress

2.2 芒萁细胞质膜的损害

双因素方差分析结果显示 (表 2), 不同温度和不同肥料对芒萁 REC 和 MDA 均产生显著影响 ($P < 0.05$)。但是, 温度和肥料两因素交互作用对芒萁细胞膜无显著影响。

随着温度的上升（图 2），三种施肥处理下芒萁的 REC 和 MDA 都显著提高（ $P<0.05$ ）。与 F1 组相比发现，F2 组芒萁的 REC 和 MDA 与 F1 组都无显著性差异；F3 组芒萁的 REC 和 MDA 在 45 °C 高温胁迫时显著低于 F1 组（ $P<0.05$ ）。

表2 温度和肥料对芒萁细胞膜的影响的双因素方差分析

Table 2 Two-way ANOVA of the effects of temperature and fertilizer on the cell membrane of *Dicranopteris pedata*

因素 Factor	REC	MDA
温度 Temperature	0.000	0.000
肥料 Fertilizer	0.048	0.042
温度+肥料 Temperature and fertilizer	0.462	0.688

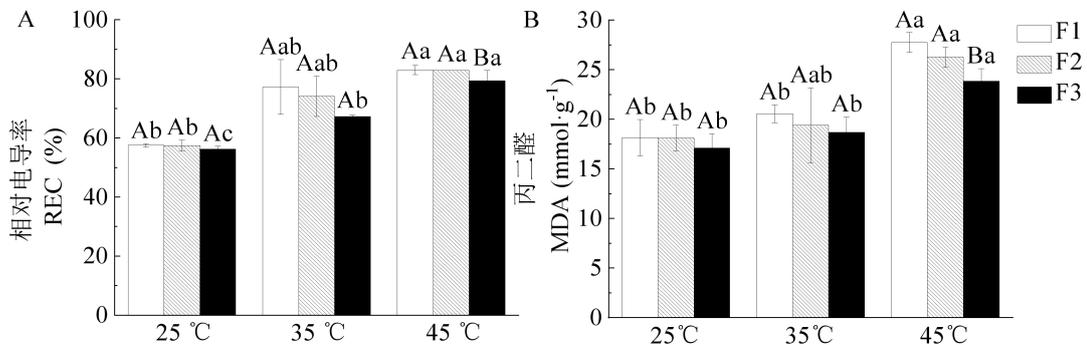


图2 不同施肥处理对高温胁迫下芒萁叶片细胞膜的破坏

Fig. 2 Damage of cell membranes in leaves of *Dicranopteris padata* under high temperature stress by different fertilization treatments

2.3 芒萁的抗氧化及渗透调节

双因素方差分析结果显示（表 3），不同温度和不同肥料分别对芒萁抗氧化酶活性和渗透调节物质都能产生显著影响（ $P<0.05$ ）。除 POD 外，温度和肥料两因素交互作用对芒萁 SOD、CAT 和 Pro 都产生显著影响（ $P<0.05$ ）。

随着温度的上升（图 3），各施肥处理的芒萁 SOD 和 POD 活性均有显著升高的现象，F3 组的 CAT 依然随温度的上升显著升高，而 F2 组则呈现先显著升高再显著降低的变化趋势（ $P<0.05$ ）。不同施肥处理间比较发现，35 °C 时的 F3 组芒萁 CAT 活性和 45 °C 时的 F3 组芒萁 SOD 和 CAT 活性都显著高于 F1 和 F2 组（ $P<0.05$ ）。三种施肥处理下的芒萁的 Pro 含量随温度的上升而显著提高（ $P<0.05$ ）。处理间比较发现，25 °C 时 F2 和 F3 组芒萁的 Pro

含量显著高于 F1 组, 35 °C 时 F3 组芒萁的 Pro 含量显著小于 F1 和 F2 组 ($P < 0.05$), 而 45 °C 时三组间芒萁的 Pro 含量没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

表3 温度和肥料影响芒萁抗氧化酶活性及渗透调节物质的双因素方差分析

Table 3 Two-way ANOVA of the effects of temperature and fertilizer on antioxidative enzyme activity and osmotic regulators of *Dicranopteris pedata*

因素 Factor	超氧化物歧化酶 SOD	过氧化物酶 POD	过氧化氢酶 CAT	脯氨酸 Pro
温度 Temperature	0.00	0.000	0.000	0.00
肥料 Fertilizer	0.016	0.006	0.000	0.00
温度+肥料 Temperature and Fertilizer	0.001	0.492	0.000	0.016

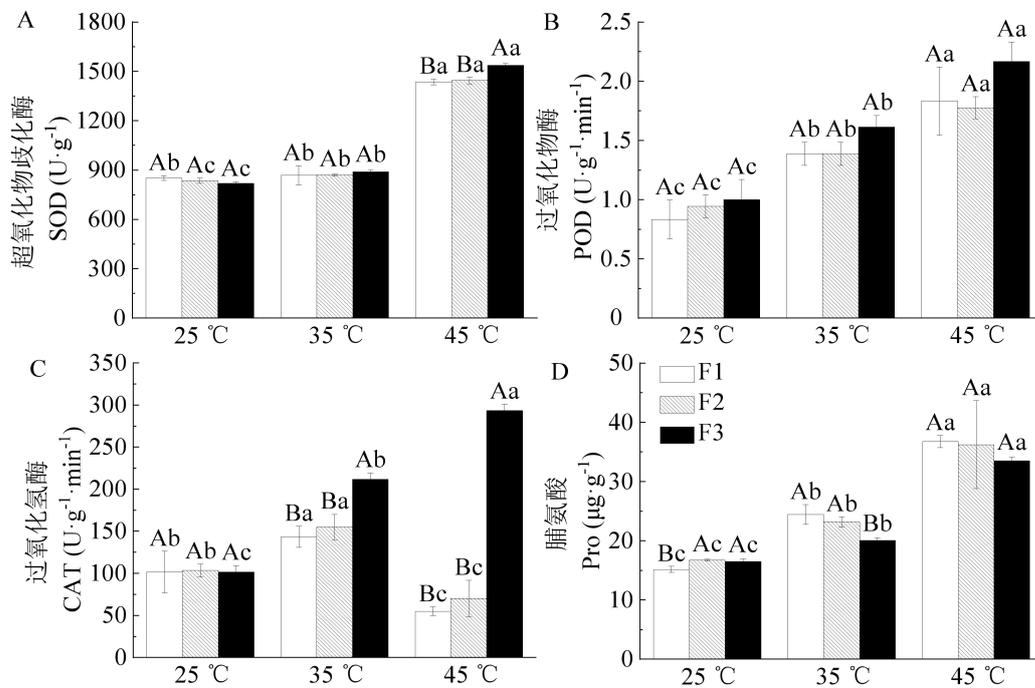


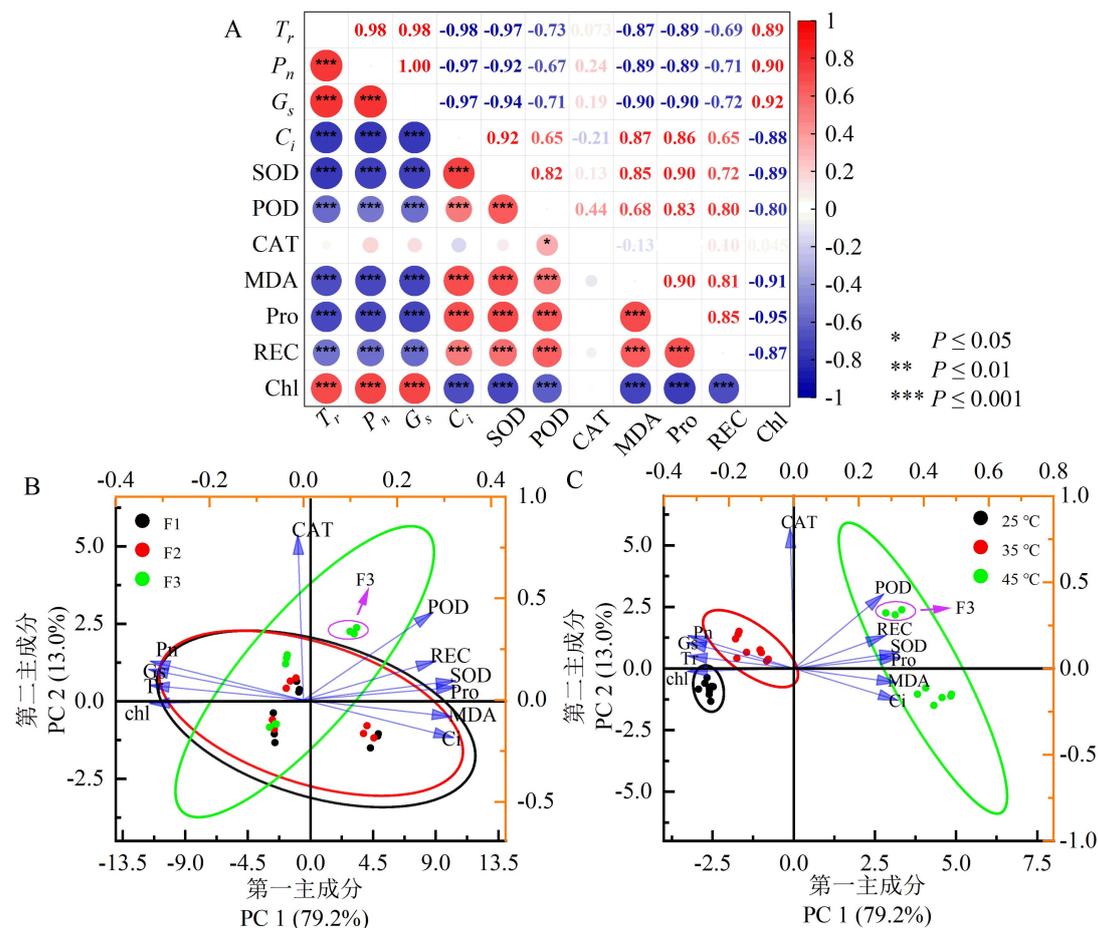
图3 不同施肥处理对高温胁迫下芒萁抗氧化酶和脯氨酸的影响

Fig. 3 Effects of different fertilization treatments on antioxidant enzymes and proline of *Dicranopteris pedata* under high temperature stress

2.4 耐高温能力评价

Pearson 相关性分析结果 (图 4: A) 显示, 除 CAT 仅与 POD 有显著正相关外, 所有指标数值上均呈显著相关性 ($P > 0.05$); KMO 检验结果为 0.86, Bartlett 球形检验结果为 $P < 0.005$ 。因此, 本次试验数据适合做主成分分析。

主成分分析结果（表 4 和图 4: B 以及图 4: C）表明，特征值大于 1 的主成分有 2 个，即总共提取出 2 个主成分。第一主成分特征值为 8.71，贡献率为 79.18%，第二主成分特征值为 1.43，贡献率为 13.00%，累计贡献率达到 92.18%，能够反映绝大部分信息，涵盖了不同高温胁迫下芒萁的耐高温能力。根据图 4: B 和载荷矩阵发现，第一主成分包括了 T_r 、 P_n 、 G_s 、 C_i 、SOD、POD、Pro、MDA、REC 和 Chl 共 10 个指标的主要信息，第二主成分仅包括 CAT 的主要信息。分别以 x_1 - x_{11} 代表 T_r 、 P_n 、 G_s 、 C_i 、SOD、POD、CAT、Pro、MDA、REC 和 Chl，以 y_1 和 y_2 表示第一主成分得分和第二主成分得分，根据载荷矩阵和主成分特征值获得公式（4）和（5）。然后，基于 y_1 和 y_2 值计算隶属函数值 U_j ，以主成分贡献比率 W_j 为权重，得到三种高温胁迫下芒萁耐高温能力综合得分（表 5）。评价结果显示，高温胁迫下 F3 处理的芒萁耐高温能力都优于 F2 处理。



T_r . 蒸腾速率; P_n . 净光合速率; G_s . 气孔导度; C_i . 胞间 CO_2 浓度; SOD. 超氧化物歧化酶; POD. 过氧化物酶; CAT. 过氧化氢酶; Pro. 脯氨酸; MDA. 丙二醛; REC. 相对电导率; Chl. 叶绿素。

T_r. transpiration rate; *P_n*. net photosynthetic rate; *G_s*. stomatal conductance; *C_i*. intercellular CO₂ concentration; **SOD**. superoxide dismutase; **POD**. Peroxidase; **CAT**. Catalase; **Pro**. Proline; **MDA**. Malondialdehyde; **REC**. relative electrical conductivity; **Chl**. Chlorophyll.

图 4 高温胁迫下芒萁光合与抗逆生理各指标的相关性分析 (A) 和主成分分析 (B 和 C)

Fig. 4 Correlation analysis (A) and principle component analysis (B and C) of photosynthesis and stress resistance physiology of *Dicranopteris pedata* under high temperature stress

表 4 高温胁迫下芒萁光合与抗逆生理各指标主成分分析

Table 4 Principal component analysis of each index of photosynthesis and stress resistance physiology of *Dicranopteris pedata* under high temperature stress

成分 Component	特征值 Eigenvalue	贡献率 Contribution	累计贡献率 Cumulative contribution	指标 Index	载荷矩阵 Component matrix	
					第一主成分 First principal component	第二主成分 Second principal component
					1	8.71
2	1.43	13.00	92.18	<i>T_r</i>	-0.97	0.09
3	0.50	4.50	96.68	Chl	-0.97	-0.02
4	0.14	1.25	97.93	<i>P_n</i>	-0.96	0.23
5	0.08	0.76	98.69	Pro	0.96	0.08
6	0.06	0.58	99.27	SOD	0.96	0.11
7	0.04	0.38	99.65	<i>C_i</i>	0.94	-0.22
8	0.03	0.27	99.92	MDA	0.93	-0.1
9	0.01	0.05	99.96	REC	0.83	0.23
10	0.003	0.03	99.99	POD	0.82	0.52
11	0.001	0.01	100.00	CAT	-0.04	0.97

$$y_1 = -0.33x_1 - 0.33x_2 - 0.33x_3 + 0.32x_4 + 0.32x_5 + 0.28x_6 - 0.01x_7 + 0.32x_8 + 0.33x_9 + 0.28x_{10} - 0.33x_{11} \quad (4)$$

$$y_2 = 0.07x_1 + 0.19x_2 + 0.15x_3 - 0.18x_4 + 0.09x_5 + 0.43x_6 + 0.81x_7 - 0.08x_8 + 0.06x_9 + 0.19x_{10} - 0.02x_{11} \quad (5)$$

表 5 三种高温胁迫下芒萁耐高温能力评价

Table 5 Evaluation of the high temperature tolerance of *Dicranopteris pedata* under three high temperature stresses

温度 Temperature	肥料 Fertilizer	主成分得分 Principal component score		隶属函数值 Subordinative function value		综合得分 Composite scores	排序 Rank
		第一主成分 First principal component	第二主成分 Second principal component	第一主成分 First principal component	第二主成分 Second principal component		
		25°C	F1	-2.17	0.08		
	F2	-2.06	-0.01	0.64	0.43	0.61	2
	F3	-2.15	0.13	0.63	0.64	0.63	1
35°C	F1	-0.58	0.59	0.60	0.41	0.57	2
	F2	-0.70	0.53	0.47	0.57	0.48	3
	F3	-0.54	0.11	0.58	0.54	0.58	1
45°C	F1	2.66	-0.28	0.65	0.61	0.65	1
	F2	2.53	-0.27	0.45	0.45	0.45	3
	F3	3.01	-0.45	0.53	0.48	0.53	2

3. 讨论

3.1 高温胁迫抑制芒果光合作用

植物的光合作用是十分复杂的生物化学过程，对外界温度的变化极其敏感(张顺堂等, 2011)，因此光合特性的变化能反映高温胁迫对植物的损害。其中， P_n 、 T_r 、 G_s 和 C_i 是4种基本的光合参数，Chl含量也能够反映植物的光合特性。本研究中，随着温度的上升，F1组芒果的 P_n 、 T_r 和 G_s 在45℃时显著下降，这反映出芒果能够抵御一定程度的高温胁迫，但胁迫程度过高也会导致其光合速率的降低。这与前人研究结果相似(杜尧东等, 2012; Feng et al., 2014)。 P_n 、 T_r 、 G_s 和 C_i 关系密切，高温胁迫会导致植物 G_s 降低，进而导致 P_n 和 T_r 降低(安佳佳等, 2010)。由此可见，芒果为应答高温胁迫，做出了适当闭合叶片气孔的反应。然而，在45℃胁迫时，芒果 C_i 出现显著上升的现象，这可能是高温胁迫降低了光合速率，光合作用同化的 CO_2 低于来自外界的或者呼吸作用增加的 CO_2 。这也表明高温胁迫对芒果光合作用的抑制是非气孔限制(Drake et al., 2017)。相关性分析结果显示 C_i 与 P_n 、 T_r 、 G_s 等光合指标都呈现极显著负相关关系，进一步证明了芒果在高温胁迫下非气孔限制的光合作用抑制现象。高温胁迫下，芒果叶片的光合反应位点、电子传递链和PS II的放氧复合体受到伤害，叶肉细胞光合活性的下降，致使芒果叶片的光合反应能力受到抑制，进入叶肉细胞的 CO_2 减少而滞留胞间，并导致 C_i 上升。

3.2 芒果的耐高温能力

REC和MDA常被用作植物细胞质膜受损程度评价的指示性指标(赵雁等, 2015, 张鹤等, 2022)。本研究中，F1组芒果叶片REC和MDA仅在胁迫温度达到45℃时显著高于对照。这表明，在一定程度上芒果细胞质膜能够保护自己的完整性，维持正常的生理功能。然而，胁迫程度过高时，芒果细胞质膜依然受到ROS氧化的威胁而受损。已有大量研究表明，高温胁迫下植物能够快速调节SOD、POD和CAT等抗氧化酶和Pro等渗透调节物质以抵御胁迫的威胁(Ul Hassan et al., 2021)。在35℃的胁迫程度时，芒果POD、CAT和Pro发挥着抵御高温胁迫的关键作用，使芒果保持相对较低的REC和MDA，所受的伤害较小。在45℃时，SOD和POD活性以及Pro浓度协同抵御高温胁迫，但是，CAT活性显著下降，而此时芒果的REC和MDA都显著上升。这表明在胁迫程度较强的高温胁迫下，即使抗氧化酶和渗透调节物质进一步发挥作用，但芒果依然受到了较大的伤害，同时还发现芒果在应对不同

程度高温胁迫时采取的应答措施略有不同。可见，芒萁能够根据不同的胁迫环境选择性提高抗氧化酶活性来适应高温环境，这属于植物自身独有的应激反应(刘敏和房玉林, 2020)。

3.3 菌剂施用对高温胁迫下芒萁光合能力的促进

光合作用是植物积累生物质和转运分配光合产物的重要生理性能(薛义霞等, 2010)也是植物体内重要的代谢过程，增强光合生理能够增强植物的抗逆性(陈笑莹等, 2013)。微生物菌剂含有大量有益活菌，能够在改善土壤的同时增强植物的生理性能(王志超, 2019)。与 F1 和 F2 处理组相比，45 °C 胁迫下 F3 处理组的芒萁具有更高的 P_n 、 T_r 、 G_s 、和 Chl，结合 two-way ANOVA 的结果，表明有机肥和纳豆芽孢杆菌菌剂共同增强了高温胁迫下芒萁的光合能力，从而增强了芒萁的抗高温能力。高温胁迫对植物光合生理的危害取决于核酮糖二磷酸羧化酶(Rubisco)等酶活性以及类囊体膜中 PS II 等光合器官的功能性受高温胁迫的影响程度(叶晓青等, 2023)。基于高温胁迫对芒萁光合生理的抑制为非气孔限制，本研究结果表明施用添加了纳豆芽孢杆菌菌剂的有机肥有效缓解了高温胁迫下芒萁光合相关酶活性以及叶片光合器官的损伤，保护了芒萁叶片的光合活性。相关性分析结果发现， P_n 、 T_r 、 G_s 、和 Chl 之间呈极显著正相关关系，这说明 Chl 的合成与芒萁光合能力关系密切，进一步表明菌剂施用能通过促进 Chl 的合成增强芒萁的光合作用能力。

添加纳豆芽孢杆菌的有机肥对芒萁光合生理的促进效果要明显优于单独施用有机肥。比较 45 °C 高温胁迫下 F1 和 F2 处理组发现，有机肥能增强芒萁的光合能力，但仍然显著低于 F3 处理组。可能的原因是纳豆芽孢杆菌分泌的活性物质与有机肥中的营养成分共同促进了叶绿素合成前体物质的积累，Chl 因此显著增加，从而增强了芒萁转化光能的能力以及光能的利用率。陈笑莹等(2013)同样发现接种 AM 真菌的玉米具有更强的光合能力；王归鹏等(2021)同样发现在有机基质里添加微生物菌剂后调节了叶片气孔，提高了 P_n 和 Chl，均与本研究结果相似。同时，微生物会产生相关激素和信号分子，协助芒萁诱导气孔开闭、光合电子传递及其他代谢途径，进而提高了 P_n (张忠学等, 2019; 王归鹏等, 2021)，这也是添加了纳豆芽孢杆菌菌剂的 F3 处理组的芒萁光合能力强于仅施用有机肥的 F2 处理组的另一重要原因。

3.4 菌剂施用对高温胁迫下芒萁抗逆生理的诱导

大量试验表明微生物肥料能够改善土壤结构和微生物环境，具有解钾、释磷、固氮的功能，对促进作物生长和增强植物抗逆性有着显著作用(范娜等, 2021)。相关性分析结果发现

45 °C 高温胁迫下芒萁 SOD 与 POD 呈现极显著正相关关系, CAT 与 POD 为极显著正相关关系, 这有力地证明了 SOD 与 POD 的协同作用以及 POD 与 CAT 的协同作用在抵御 ROS 氧化细胞膜时起到了关键作用。其中, 45 °C 胁迫下 F3 组芒萁的 SOD 和 CAT 在整体上都要高于 F1, 尤其当 F1 和 F2 组的 CAT 活性下降时, F3 组的 CAT 活性显著上升, 说明在高温胁迫下, 纳豆芽孢杆菌菌剂会促使芒萁植株体内产生更高的酶活性, 来消除植物体在胁迫下产生的有害物质, 强化了 SOD 与 POD 的协同作用以及 POD 与 CAT 的协同作用。虽然芒萁 Pro、REC 和 MDA 都随着高温胁迫程度的提升而上升, 但是 F3 处理下的 Pro 在 35°C 显著低于 F1 和 F2 组, MDA 和 REC 在 45 °C 显著低于 F1 组等试验结果进一步证明纳豆芽孢杆菌菌剂在一定程度上能够有效提高芒萁的耐热性, 缓解了高温胁迫对芒萁的损伤 (杨倩等, 2013)。高温胁迫易增加植物蒸腾作用, 使植物细胞容易失去水分, 导致植物受到一定程度的水分胁迫。Pro 作为渗透调节剂本应发挥关键作用, 但是试验结果发现, 菌剂施用并未显著诱导芒萁 Pro 的合成以抵御水分胁迫。然而, 已有报道表明纳豆发酵过程中会产生具有良好的保水性和生物溶性的 γ -聚谷氨酸 (张文, 2014), γ -聚谷氨酸会诱导具有亲水性的渗透调节物质的积累(朱安婷等, 2010), 从而降低细胞渗透势, 增强芒萁的抗性。

3.5 菌剂诱导芒萁耐高温胁迫能力的综合评价

主成分分析结果发现, 第一主成分包含了芒萁光合生理和抗逆生理 79.2% 的信息, 其中 POD、REC、SOD、Pro、MDA 和 C_i 与第一主成分呈正相关, POD、SOD 和 Pro 是植物的重要抗逆生理生化物质, 这进一步说明了 POD、SOD 酶活性的诱导和 Pro 的合成积累是芒萁应答高温胁迫的重要抵御机制, 与上文的结论一致。细胞质膜受损的指示性指标 REC 和 MDA 也为芒萁细胞在高温胁迫下遭受损害提供了有力证据。而 P_n 、 G_s 、 T_r 和 Chl 与第一主成分呈负相关, 说明高温胁迫下芒萁的光合能力受损。从不同施肥处理角度看, 不施肥的 F1 处理组和仅施用有机肥的 F2 处理组高度重合, 因此仅施用有机肥不能增强芒萁抵御高温胁迫的能力。而添加了纳豆芽孢杆菌菌剂的有机肥的处理组 F3 与 F1 和 F2 处理组出现了一定的差异。再根据图 4: C 可发现, 不同温度处理使芒萁的光合生理和耐高温生理发现了明显的变化, 其中 45 °C 时, F3 处理组在第一象限, 而 F1 和 F2 处理组都在第四象限, 这些都有力地证明了添加纳豆芽孢杆菌菌剂的有机肥有效地增强了芒萁的光合能力和耐高温能力。

然而, 仅以单个植物生理指标评价其耐高温能力具有局限性, 因为高温胁迫对植物的影响是多方面的, 植物调节各种生理活动抵御高温胁迫同样是一个极其复杂的过程。目前, 主

成分分析与隶属函数法相结合综合评价植物的抗逆性是热门的评价方式 (朱亚迪等, 2022)。因此, 为评价纳豆芽孢杆菌菌剂对芒果抵御高温胁迫的作用, 本研究采用该方法对 F2 和 F3 处理下芒果的耐高温能力做综合评价。最终评价结果显示, 三种温度处理下 F3 处理组芒果的耐高温能力都要强于 F2 处理组, 这说明纳豆芽孢杆菌菌剂有效提高了芒果的耐高温能力。此外, two-way ANOVA 结果发现温度变化和不同肥料施用的交互作用对芒果的光合生理和抗逆生理都有显著影响。但是这种交互作用对芒果 REC 和 MDA 却没有显著的影响。这是因为高温抑制芒果的光合特性, 迫使芒果调节抗逆生理抵御胁迫; 而纳豆芽孢杆菌菌剂则增强芒果的光合作用, 并协助芒果调节抗逆生理活动以增强对高温胁迫的耐受性, 进一步证明芒果在纳豆芽孢杆菌菌剂作用下有效缓解了高温胁迫的危害。

4. 结论

本研究探讨了芒果对高温胁迫的响应以及纳豆芽孢杆菌菌剂+有机肥施用诱导芒果抵抗高温胁迫的能力。研究发现, 芒果具有一定的耐高温性, 但是温度胁迫程度过高时受损依然严重, 导致非气孔限制的光合速率下降, 细胞质膜遭到氧化。此时, 芒果能够根据不同胁迫情况调节自身抗氧化酶活性及渗透调节物质以抵御高温胁迫。此外, 相较于单纯施用有机肥, 纳豆芽孢杆菌菌剂+有机肥施用能够在一定程度上缓解高温胁迫对芒果光合作用的抑制, 诱导抗氧化酶活性的提高以缓解细胞的损伤, 减轻渗透调节的压力, 有效提高芒果对高温胁迫的抵抗能力。

参考文献

- 安佳佳, 李新国, 李绍鹏, 等, 2010 短期高温对香蕉幼苗光合作用及相关生理指标的影响 [J]. 中国农学通报, 26(20): 362-365. [AN JJ, LI XG, LI SP, et al., 2010. Effects of short-term high temperature on photosynthesis and related physiological indices of Brazil banana plantlets [J]. Chin Agric Sci Bul, 26(20): 362-365.]
- 陈笑莹, 宋凤斌, 朱先灿等, 2013. 高温胁迫下丛枝菌根真菌对玉米光合特性的影响 [J]. 华北农学报, 28(2): 108-113. [CHEN XX, SONG FB, ZHU XC, et al., 2013. Effect of arbuscular Mycorrhizal fungi on photosynthetic characteristics in maize plants under high temperature stress [J]. Acta Agric Boreal-Sin, 2013, 28(2): 108-113.]
- DRAKE JE, POWER SA, DUURSMA RA, et al., 2017. Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis for four tree species under drought: A comparison of model formulations [J]. Agric For Meteorol, 247: 454-466.

-
- 杜尧东, 李键陵, 王华, 等, 2012. 高温胁迫对水稻剑叶光合和叶绿素荧光特征的影响 [J]. 生态学杂志, 31(10): 2541-2548. [DU YD, LI JL, WANG H, et al., 2012. Effects of high temperature stress on the flag leaf photosynthesis and Chlorophyll fluorescence parameters of rice [J]. Chin J Ecol, 31(10): 2541-2548.]
- 范娜, 彭之东, 白文斌, 等, 2021. 微生物菌剂对土壤酶活性及高粱生长的影响 [J]. 中国农业科技导报, 23(2): 185-192. [FAN N, PENG ZD, BAI WB, et al., 2021. Influences of microbial agents on soil enzyme activity and sorghum growth [J]. J Agric Sci Technol, 23(2): 185-192.]
- FENG B, LIU P, LI G, et al., 2014. Effect of heat stress on the photosynthetic characteristics in flag leaves at the grain-filling stage of different heat-resistant winter wheat varieties [J]. J Agron Crop Sci, 200(2): 143-155.
- HAYAT S, MASOOD A, YUSUF M, et al., 2009. Growth of Indian mustard (*Brassica juncea* L.) in response to salicylic acid under high-temperature stress [J]. Brazilian J Plant Physiol, 21(3): 187-195.
- JANICKA-RUSSAK M, KABALA K, WADOWIKOWSKA A, et al., 2012. Response of plasma membrane H⁺-ATPase to low temperature in cucumber roots [J]. J Plant Res, 125(2): 291-300.
- LEVY Y, DODD J, KRIKUN J, 1983. Effect of irrigation, water salinity and rootstock on the vertical distribution of vesicular-arbuscular mycorrhiza in citrus roots [J]. New Phytol, 95(3): 397-403.
- 梁美霞, 陈志彪, 陈志强, 等, 2021. 不同活动状况崩岗崩壁土壤及芒萁的生态恢复效应 [J]. 水土保持研究, 28(6): 138-143. [LIANG MX, CHEN ZB, CHEN ZQ, et al., 2021. Ecological restoration effects of soil and *Dicranopteris pedata* under different activities in Benggang [J]. Res Soil Water Conserv, 28(6): 138-143.]
- 刘敏, 房玉林, 2020. 高温胁迫对葡萄幼树生理指标和超显微结构的影响 [J]. 中国农业科学, 53(7): 1444-1458. [LIU M, FANG YL, 2020. Effects of heat stress on physiological indexes and ultrastructure of grapevines [J]. Sci Agric Sin, 53(7): 1444-1458.]
- LIU Y, LI C, ZHAO B, et al., 2022. Inoculation of prickly pear litter with microbial agents promotes the efficiency in aerobic composting [J]. Sustainability, 14(8): 4084824.
- UI HASSAN M, RASOOL T, IQBAL C, et al., 2022. Linking plants functioning to adaptive responses under heat stress conditions: a mechanistic review [J]. J Plant Growth Regul, 41(7): 2596-2613.
- 沈杰, 蔡艳, 张宇羽, 等, 2016. 苗床添加 EM 菌肥对烟草幼苗生长及抗逆酶活性的影响 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 44(4): 48-56. [SEEN J, CAI Y, ZHANG YY, et al., 2016. Effect of effective microorganisms fertilizer on growth and enzyme activities of tobacco seedlings [J]. J NW A&F Univ. (Nat Sci Ed), 44(4): 48-56.]
- WAHID A, GELANI S, ASHRAF M, et al., 2007. Heat tolerance in plants: an overview [J]. Environ. Exp. Bot., 61(3): 199-223.
- 王归鹏, 马乐乐, 范兵华等, 2021. 微生物菌剂对番茄全有机营养栽培转化及产量品质的影响 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 49(9): 118-128. [WANG GP, MA LL, FAN BH, et al., 2021. Effects of microbial agents of nutrient transformation, yield

-
- and quality of tomato with organic nutrition cultivation [J]. J NW A & F Univ (Nat Sci Ed), 49(9): 118-128.]
- 王志超. 2019. 增施微生物菌肥和镁肥对水稻新品种彦粳软玉 1 号产量和品质性状的影响 [D]. 沈阳农业大学, 35-37. [WANG ZC, 2019. Effect of adding microbial fertilizer and magnesium fertilizer on yield and quality of new rice Variety Yangengruanyu 1 [D]. Shenyang Agric Univ, 35-37.]
- 薛义霞, 李亚灵, 温祥珍, 2010. 空气湿度对高温下番茄光合作用及坐果率的影响 [J]. 园艺学报, 37(3): 397-404. [XUE YX, LI YL, WEN XZ, 2010. Effects of air humidity in on the photosynthesis and fruit-set fo tomato under high temperature [J]. Acta Horti Sin 2010, 37(3): 397-404.]
- 杨倩, 柴文娟, 张春林, 等, 2013. 一种微生物菌肥对甜高粱种子萌发、幼苗生长和抗逆能力的影响 [J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 34(6): 102-109. [YANG Q, CHAI WJ, ZHANG CL, et al., 2013. Effects of a microbial fertilizer on *Sorghum Bicolor* L. Seeds Germination. seedling growth and stress tolerance [J]. J Inn Mon Agric Uni (Nat Sci Ed), 34(6): 102-109.]
- 尹聪, 许啸, 2011. 纳豆菌微生态制剂的研究进展 [J]. 饲料与畜牧, (10): 38-42. [YIN C, XU X, 2011. Research progress of natto microecologies [J]. Anim Agric, (10): 38-42.]
- 袁再健, 马东方, 聂小东, 等, 2020. 南方红壤丘陵区林下水土流失防治研究进展 [J]. 土壤学报, 57(1): 12-21. [YUAN ZJ, MA DF, NIE XD, et al., 2020. Progress in research on prevention and control of soil erosion under forest in Red Soil Hilly Region of South China [J]. Acta Pedol Sin., 57(1): 12-21.]
- 叶晓青, 曾嘉楠, 邹勇等, 2023. 温度胁迫对烤烟生理机制的影响及相关调控研究进展 [J]. 广东农业科学, 50(8): 105-117. [YE XQ, ZENG JN, ZOU Y, et al., 2023. Resarch progress on the physiological mechanism and related regulation of temperature stress on *Flue-cured Tobacco* [J]. Guangdong Agr Sci 50(8): 105-117.]
- 张春楠, 张瑞芳, 王红, 等, 2020. 丛枝菌根真菌影响作物非生物胁迫耐受性的研究进展 [J]. 微生物学通报, 47(11): 3880-3891. [ZHANG CN, ZHANG RF, WANG H, et al., 2020. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on abiotic stress tolerance in crops: a review [J]. Microbiol Chin, 47(11): 3880-3891.]
- 张鹤, 敖平星, 赵雁, 2022. ALA 对高温胁迫下苜蓿属 3 个品种叶片生理的影响 [J]. 草地学报, 30(5): 1178-1184. [ZhANG H, AO PX, ZHAO Y, 2022. Effect of 5-aminolevulinic acid on leaf physiology of three cultivars of medicago under high temperature stress [J]. Acta Agr Sin, 30(5): 1178-1184.]
- 张顺堂, 张桂莲, 陈立云, 等, 2011 高温胁迫对水稻剑叶净光合速率和叶绿素荧光参数的影响 [J]. 中国水稻科学, 25(3): 335-338. [ZHANG ST, ZHANG GL, CHEN LY, et al., 2011. Effects of high temperature stress on net photosynthetic rate and Chlorophyll fluorescence parameters of flag leaf in rice [J]. Chin J Rice Sci, 25(3): 335-338.]
- 张婷, 李平, 韦嘉励, 2023. 4 种常春藤对高温胁迫的生理响应 [J/OL]. 分子植物育种, 1-12[2023-12-25].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231027.0926.002.html>. [ZHANG T, LI P, WEI JL, 2023. Physiological responses of four Hedera plants to high temperature toletrance [J/OL]. Mol Plant Breed, 1-12[2023-12-25].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231027.0926.002.html>.]

-
- 张文, 2014. γ -聚谷氨酸制备及其农用效果 [D]. 中国农业科学院: 63-64. [ZHANG W, 2014. The preparation and agricultural application experiment of γ -Poly-Glutamic Acid [D]. Chin Acad Agr Sci: 63-64.]
- 张忠学, 冯子珈, 齐智娟等, 2019. 节水灌溉下复合微生物有机肥对水稻光合与产量的影响 [J]. 农业机械学报, 50(7): 313-321. [ZHANG ZX, FENG ZJ, QI ZJ, et al., 2019. Effects of compound microbial organic fertilizer with water-saving irrigation on photosynthetic and yield of rice [J]. Trans Chin Soc Agric Mach, 50(7): 313-321.]
- 赵雁, 车伟光, 毕玉芬, 等, 2015. “德钦”紫花苜蓿苗期耐热性综合评价 [J]. 北方园艺, (20): 69-73. [ZHAO Y, CHE WG, BI YF, et al., 2015. Thermotolerance comprehensive evaluation of *Medicago sativa* L. ‘Deqin’ on seeding stage [J]. N Hortic, (20): 69-73.]
- 朱安婷, 蒋友武, 谢国生, 等. 2010. 外源聚 γ -谷氨酸对水稻幼苗耐旱性和渗透调节的影响 [J]. 核农学报, 24(6): 1269-1273. [ZHU AT, JIANG YW, XIE GS, et al., 2010. Effects of exogenous poly γ -glutamic acid on drought tolerance and osmotic adjustment of rice seedlings [J]. J Nucl Agr Sci, 24(6): 1269-1273.]
- 朱亚迪, 王慧琴, 王洪章, 等, 2022 不同夏玉米品种大喇叭口期耐热性评价和鉴定指标筛选 [J]. 作物学报: 48(12), 3130-3143. [ZHU YD, WANG HQ, WANG HZ, et al., 2022. Evaluation and identification index of heat tolerance in different summer maize varieties at V12 stage [J]. Acta Agron Sin, 48(12), 3130-3143.]