



内生真菌印度梨形孢增强烟草耐寒性的作用机制研究

王致尧, 李寒, 何小亚, 高维常, 朱经伟, 张恒, 刘艳霞, 李想

引用本文:

王致尧, 李寒, 何小亚, 等. 内生真菌印度梨形孢增强烟草耐寒性的作用机制研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2026, 34(1): 72–82.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4978>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

印度梨形孢对铁皮石斛种子萌发和原球茎生长的影响

Effects of *Piriformospora indica* on Seed Germination and Protocorm Growth of *Dendrobium officinale*

热带亚热带植物学报. 2021, 29(1): 59–66 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4231>

优质牧草旋扭山绿豆对低温胁迫的生理响应及其耐寒性快速鉴定

Physiological Response of High Quality Forage *Desmodium intortum* to Low Temperature Stress and Rapid Identification of Its Cold Tolerance

热带亚热带植物学报. 2019, 27(6): 649–658 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4046>

硅对低温胁迫后檀香紫檀苗木生长和光合生理的影响

Effects of Silicon on Growth and Photosynthetic Physiology of Red Sandalwood Seedlings after Cold Stress

热带亚热带植物学报. 2019, 27(2): 139–148 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3987>

7种木莲属植物抗寒性评价及其生理机制

Evaluation of Cold Resistance and Physiological Mechanism of Seven *Manglietia* Species

热带亚热带植物学报. 2021, 29(5): 519–529 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4349>

自然越冬期姜花属植物生理指标变化及抗寒性评价

Changes in Physiological Characteristics of Cold Resistance of *Hedychium* and Evaluation during Natural Overwintering Period

热带亚热带植物学报. 2021, 29(5): 509–518 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4333>

向下翻页，浏览PDF全文

内生真菌印度梨形孢增强烟草耐寒性的作用机制研究

王致尧¹, 李寒^{2*}, 何小亚³, 高维常², 朱经伟², 张恒², 刘艳霞², 李想^{4*}

(1. 贵州大学烟草学院, 贵阳 550025; 2. 贵州省烟草科学研究院, 贵阳 550081; 3. 贵州省烟草公司遵义市公司, 贵州 遵义 563000; 4. 中国烟草总公司贵州省公司, 贵阳 550001)

摘要: 烟草是喜温且对低温敏感的作物, 在漂浮育苗阶段易受“倒春寒”等低温寡日照天气的不利影响。为克服“倒春寒”天气导致的烟苗生长迟缓、存活率降低等问题, 该研究在不改变现行漂浮育苗方式的基础上, 探究了内生真菌印度梨形孢(*Piriformospora indica*)在烟草根系中的定殖效应及其提高烟草抗寒性的作用机制。结果表明, 印度梨形孢在烟苗根部的定殖显著增强了烟草体内抗氧化酶系统(包括 SOD、CAT、POD 和 APX)的活性, 有效遏制了活性氧(ROS)的过量累积。同时, 印度梨形孢还促进了烟草体内一系列渗透调节物质的积累, 包括可溶性糖、脯氨酸及可溶性蛋白。此外, 印度梨形孢还可进一步刺激冷响应基因的表达, 并通过增强叶绿素合成和光系统 II (PSII)效率, 提升了烟草的光合作用能力。该研究阐明了印度梨形孢通过多途径增强烟草抗寒性的作用机制, 并为促进烟苗在低温条件下的生长提供了有效策略。

关键词: 印度梨形孢; 烟草; 抗寒性; 活性氧; 渗透调节物质; 光合作用

doi: 10.11926/jtsb.4978

CSTR: 32235.14.jtsb.4978

Study on Mechanism of Endophytic Fungus *Piriformospora indica* Enhancing Cold Tolerance in Tobacco

WANG Zhiyao¹, LI Han^{2*}, HE Xiaoya³, GAO Weichang², ZHU Jingwei², ZHANG Heng², LIU Yanxia², LI Xiang^{4*}

(1. College of Tobacco Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550081, China; 3. Zunyi Branch of Guizhou Tobacco Company, Zunyi 563000, Guizhou, China; 4. Guizhou Branch Company of China Tobacco Corporation, Guiyang 550001, China)

Abstract: Tobacco is a warm-loving crop that is sensitive to low temperatures. During the floating seedling stage, it is vulnerable to adverse effects from cold spells such as “late spring cold” and low light. To address the issues of slow growth and reduced survival rate of tobacco seedlings caused by such cold spells, this study explored the colonization effect of the endophytic fungus *Piriformospora indica* in tobacco roots and its mechanism for enhancing tobacco cold resistance without altering the current floating seedling cultivation method. The results showed that the colonization of *P. indica* in the roots of tobacco seedlings significantly increased the activity of the antioxidant enzyme system, including SOD, CAT, POD, and APX, in tobacco, effectively curbing the excessive accumulation of reactive oxygen species (ROS). Additionally, *P. indica* promoted the accumulation of osmotic adjustment substances in tobacco, including soluble sugars, proline, and soluble proteins. Moreover, *Piriformospora indica* could further stimulate the expression of cold response genes and enhance the photosynthetic capacity of tobacco by promoting chlorophyll synthesis and the efficiency of photosystem II (PSII).

收稿日期: 2024-10-21

接受日期: 2024-12-29

基金项目: 中国烟草总公司贵州省公司重大专项项目(2022XM03); 贵州省科技计划项目(ZK[2024]-646)资助

This work was supported by the Major Project of China Tobacco Guizhou Industrial Co., Ltd. (Grant No. 2022XM03), and the Project for Science and Technology Plan in Guizhou (Grant No. ZK[2024]-646).

作者简介: 王致尧(2000年生), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物微生物互作。E-mail: 451057552@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: rhanli@163.com; newcool1361214@163.com

This study clarified the multi-pathway mechanism by which *P. indica* enhances tobacco cold resistance and provided an effective strategy for promoting the growth of tobacco seedlings under low temperature.

Key words: *Piriformospora indica*; Tobacco; Cold resistance; Reactive oxygen; Osmolytes; Photosynthesis

温度是影响植物生长发育和地理分布的重要生态因子^[1], 当环境温度持续低于植物生长所需温度时, 植物将面临低温胁迫, 导致植物体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的过量积累, 由此对膜脂、蛋白质、核酸和其他大细胞分子造成氧化损伤^[2]。低温胁迫还会显著降低植物体内叶绿素的含量, 削弱植物对 CO₂ 的利用能力, 降低光合效率^[3]。此外, 低温胁迫还会导致植物脱水、膜流动性降低和细胞内钙稳态紊乱^[4-7]。因此, 深入探究植物在低温胁迫下的生理响应机制, 寻找提高植物抗寒性的技术手段与方法, 对于保障农业生产的稳定性与可持续性发展具有重要的科学价值与意义。

近年来, 共生真菌在增强植物抵御非生物胁迫能力方面所展现出的巨大潜力, 引起了学术界的广泛关注。丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizae)通过增强植物的光合作用与抗氧化能力, 显著提高了玉米(*Zea mays*)、水稻(*Oryza sativa*)等作物的抗寒性^[8-9]。Han 等^[10]研究表明, 丛枝菌根真菌能够通过调控青杨(*Populus cathayana*)体内 14-3-3 家族蛋白基因的表达来增强其抗旱能力。此外, 丛枝菌根真菌还能增强宿主植物对盐胁迫的抗性^[11]。相比之下, 印度梨形孢(*Piriformospora indica*)作为一种有益的内生真菌, 凭借其可离体培养、促进宿主生长及提高宿主抗逆性的生物学特性, 已成为当下研究内生菌与植物有益互作的热点^[12]。彭兵等^[13]的研究指出, 接种印度梨形孢能够增加烟草株高与叶面积, 促进烟草生长。Ghorbani 等^[14]的研究指出, 番茄(*Lycopersicon esculentum*)接种印度梨形孢可诱导产生对盐胁迫的抗性。Rai 等^[15]的研究表明印度梨形孢能够显著提升多种蔬菜种子在低温下的萌发率。Murphy 等^[16]的研究证实, 接种印度梨形孢能够增强大麦(*Hordeum vulgare*)的抗寒能力。在抗旱方面, 印度梨形孢可以提高干旱胁迫下白榆(*Ulmus pumila*)的气体交换参数和光能利用率, 增强其抗旱能力^[17]。李震等^[18]的研究还表明, 接种印度梨形孢能够刺激宿主抗旱相关基因表达上调, 进而提高烟草的抗旱能力。这说明利用共生真菌促进作物生长、增强作物对非生物胁迫的抗性是一种行之有效的策略。

烟草(*Nicotiana tabacum*)是一种起源于美洲的叶用经济作物, 喜温不耐低温。在中国南方烟区, 漂浮育苗技术是烤烟育苗的主流方法。然而, 在漂浮育苗期间常常遭遇“倒春寒”等低温寡日照不利天气的影响^[19]。前期的低温环境会影响烟草种子的萌发, 致使种子发芽时间延长, 整齐度降低^[20]; 其次, 低温会抑制烟苗的生长, 烟苗易出现老苗、僵化苗、根系发黄、幼苗叶片畸形等症状^[21]。烟苗的优劣与成熟烟叶质量的好坏息息相关, 因此, 如何在不改变当前烟草育苗方式的前提下, 提高烟苗的耐寒能力并促进其在低温环境下的生长, 对确保烟叶的高质量生产具有至关重要的意义。

本研究在不改变当前烟草育苗方式的前提下, 将内生菌印度梨形孢与育苗基质相结合, 系统性地探讨了印度梨形孢在烟苗根部的定殖对烟草抗寒性的影响, 重点分析了印度梨形孢对烟草光合作用、抗氧化酶活性、渗透调节物质积累以及低温响应基因表达的调控作用, 阐明印度梨形孢通过多途径增强烟草抗寒性的作用机制, 并为促进烟苗在低温条件下的生长提供有效策略。

1 材料和方法

1.1 试验处理和样品采集

试验于 2023 年的秋冬季在贵州省烟草科学研究所的室外(海拔约 1 100 m, 106°36'42.0624" E, 26°39'1.39284" N)进行。参考 Li 等^[22]的方法对烟草进行印度梨形孢的接种。通过高速离心(7 770×g)收集在马铃薯葡萄糖肉汤培养基中培养 4 d 的印度梨形孢菌丝体, 收集后用 ddH₂O 对菌丝体进行重悬, 并调节真菌颗粒悬浮液的 OD₆₀₀ 值为 0.1。随后将真菌颗粒悬浮液拌入育苗基质中, 使用该育苗基质装盘并播入云烟 87 种子。每个育苗盘装入 1 kg 育苗基质并拌入 300 mL 印度梨形孢悬浮液, 以拌入等体积 ddH₂O 的基质为对照。均设置 3 个生物学重复。依据 Li 等^[22]的方法对印度梨形孢与烟草的共生关系进行界定, 使用 0.05% 台盼蓝染液对播种后第 49 天的烟草根部进行染色处理, 并在光学显微镜的 10 倍物镜下, 通过观察烟草根部染色的厚垣孢子来确

定共生关系。播种 65 d 后随机选取处于低温环境下(实时温度 4 °C)的烟苗进行生理生化指标、光合作用参数、光合荧光参数的测定、RNA 的提取及基因表达的检测分析,并取其地上部分在 75 °C 烘箱中烘干后称量干重。每个漂浮育苗盘随机取 3 个样品进行各指标的测试分析,即每个测试指标共计进行 9 次生物学重复。在播种 70 d 后,统计烟苗的存活率,存活率(%)=(成苗数-死苗数)/成苗数×100%。

1.2 生理生化指标的检测

使用商业试剂盒(科铭生物技术有限公司,中国)测定样品的 O_2^- (cat#: SA-1-G)、 H_2O_2 (cat#: H2O2-1-Y)、丙二醛含量(cat#: MDA-1-Y)、叶绿素含量(cat#: CPL-1-G)、可溶性蛋白含量(cat#: KMSP-1-W)、可溶性糖含量(cat#: KT-1-Y)、脯氨酸含量(cat#: PRO-1-Y)、超氧化物歧化酶活性(cat#: SOD-1-Y)、过氧化氢酶活性(cat#: CAT-1-W)、抗坏血酸过氧化物酶活性(cat#: APX-1-W)和过氧化物酶活性(cat#: POD-1-Y),具体步骤参照使用说明书。使用台式电导率仪 DDS-307 (上海仪电科学仪器股份有限公司,中国)测定相对电导率。参照 Lichtenthaler^[23]的方法,使用分光光度法测定叶绿素含量。

1.3 光合作用和光合荧光参数的测定

使用 LI-6400 便携式光合作用系统(LI-COR 公

司,美国)测量样本的光合参数。测定的光合作用指标涵盖净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、细胞间二氧化碳浓度(C_i)和蒸腾速率(T_r)。为确保测量准确性,在正式测定前,采用系统内置的光源,设定光强为 $1\,000\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的光合光子通量密度,对烟草叶片进行 30 min 的预照射处理。测定的叶绿素荧光参数包括光系统 II 的最大光化学效率(F_v/F_m)、光系统 II 的实际光化学量子效率(Φ_{PSII})、光合电子传递速率(E_{TR})、光化学猝灭系数(q_P)和非光化学猝灭系数(NPQ)。为获取准确的光合荧光参数,所测烟苗在测量前均需在黑暗环境中静置 40 min,以确保叶片充分适应暗环境,从而保障测量结果的可靠性。

1.4 RNA 的提取和 qRT-PCR 分析

使用 RNAPrep Pure Plant Plus Kit (TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD)提取样本 RNA。随后,使用 $1\ \mu\text{g}$ RNA 进行 cDNA 的合成(PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser, TaKaRa)。定量实时聚合酶链式反应(qRT-PCR)参照 Li 等^[22]的方法,使用荧光定量 PCR 试剂盒(TB Green® Premix Ex Taq™ II, Bulk)在 Applied Biosystems ViiA™ 7 实时聚合酶链式反应仪上进行,以管家基因 *NtActin* 为内参基因。qRT-PCR 的引物见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物

Table 1 Primers used for qRT-PCR

引物 Primer	正向序列 Forward sequence (5'~3')	反向序列 Reverse sequence (5'~3')
<i>NtActin</i>	TCACAGAAGCTCCTCCTAATCCA	GAGGGAAAGAACAGCCTGAATG
<i>NtCBF1</i>	GGATGAGGAGACGCTATTCTG	TGTGAACACTGAGGTGGAGG
<i>NtCBF3</i>	TATTCAGAAGGCGACCGT	CCTCCTCGTCCATAAACAA
<i>NtDREB2B</i>	CGGCCGCCCATCTGAGTC	AGGTGGAGGCAGCATTAGTC
<i>NtERD10B</i>	GGCCTTGACAGCGGACGAATAC	TGTTCCGGTGGTTCATAGTCTCC
<i>NtERD10C</i>	CGGGTGAGGACACGGCTGTA	AGGCGCCACTTCTCTGTCTTC
<i>NtICE1</i>	TGATAGGCTTTACATGCTGAGATC	AGCTGTTGAGTTGGCGTTA

1.5 数据统计分析

使用 GraphPad Prism version 4 中的 Tukey 检验对数据进行统计学分析。数据以 9 个重复的平均值±标准差表示。

2 结果和分析

2.1 低温下印度梨形孢对烟苗的生长影响

将印度梨形孢的菌液拌入育苗基质中,并在秋冬季的室外进行漂浮育苗。播种后,室外温度

逐日降低,烟苗生长发育迟缓,甚至出现死亡(图 1: A, B)。对播种后第 49 天的烟苗根部进行台盼蓝染色镜检,在育苗阶段,向育苗基质中拌入印度梨形孢菌液可有效实现印度梨形孢在烟草根部的定殖(图 1: C)。在播种后第 70 天,相较于对照而言,实验组的烟苗生长更好,其地上部分干重(图 1: D)和遭受冷害时的存活率(图 1: E)较对照组分别高出 70.0%和 20.5%。这表明印度梨形孢在烟草根部的定殖可提高烟苗的抗寒性,并促进烟苗在低温环境下的生长。

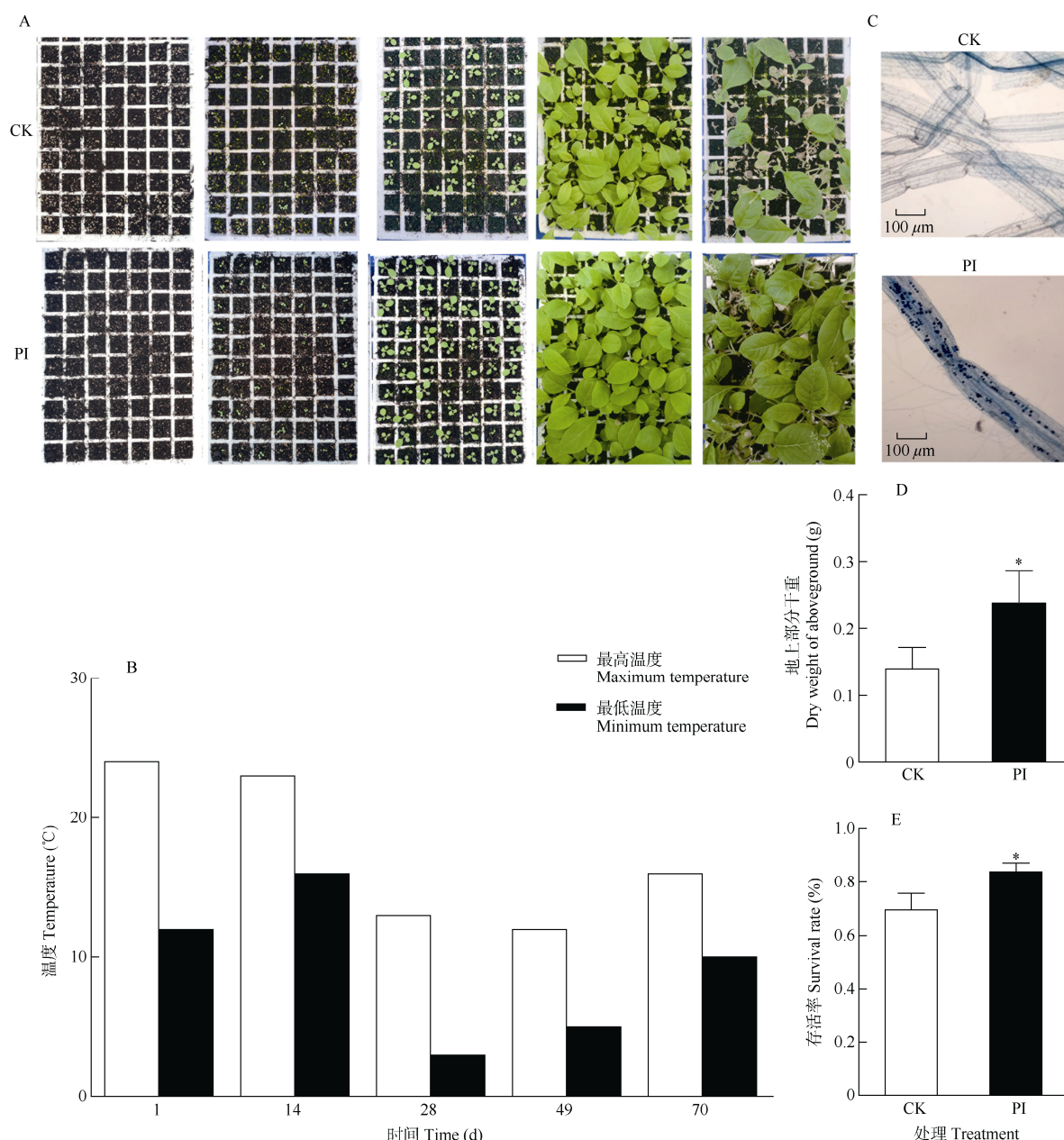


图 1 印度梨形孢对烟苗低温下生长的影响。A: 低温胁迫下烟苗的生长表型比较; B: 烟草育苗期间的温度变化; C: 播种第 49 天印度梨形孢在烟草根部的定殖; D: 播种第 70 天烟苗的地上部分干重; E: 播种第 70 天后烟苗的存活率; CK: 对照; PI: 接种印度梨形孢; *: $P < 0.05$ 。下同

Fig. 1 Effect of *Piriformospora indica* on tobacco growth under cold stress. A: Growth phenotypes of tobacco under cold stress; B: Changes in temperature during tobacco seedling cultivation; C: Colonization of *P. indica* in tobacco roots after sowing 49 days; D: Dry weight of aboveground of tobacco seedlings after sowing 70 days from; E: Survival rate of tobacco seedlings after sowing 70 days; CK: Control; PI: Inoculated with *P. indica*. *: $P < 0.05$. The same below

2.2 低温下印度梨形孢对损伤相关指标的影响

对播种后第 65 天处于低温(实时温度 4 °C)下的烟苗进行生理生化指标的测定。在低温胁迫下, 对照的 H_2O_2 和超氧阴离子(O_2^-)水平分别比接种印度梨形孢的烟草高出 58.1%和 51.1%, MDA 含量也高出 120.5%(图 2), 这表明对照在低温胁迫下遭受了严重的氧化损伤。与对照相比, 试验组叶片的电解

质渗漏率减少了 73.5%, 表明印度梨形孢的定殖增强了低温胁迫下烟草的细胞膜稳定性。

2.3 低温下印度梨形孢对抗氧化酶活性和渗透调节物质积累的影响

播种后第 65 天, 实时温度为 4 °C, 印度梨形孢定殖烟草叶片的 SOD、CAT、POD 和 APX 活性分别比对照高 22.8%、22.5%、18.7%和 41.2%(图 3),

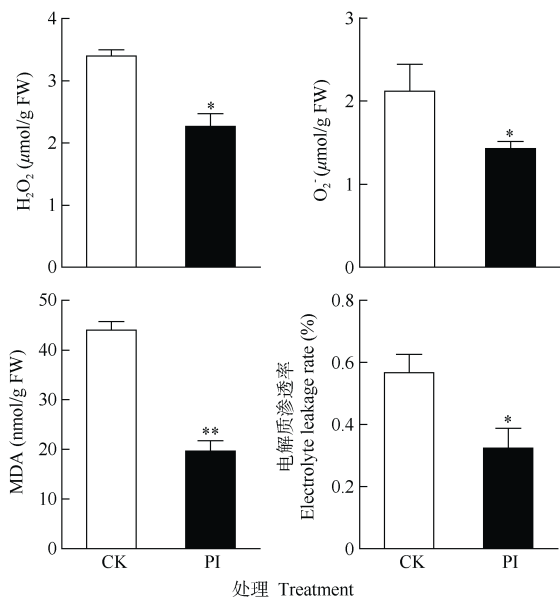


图 2 印度梨形孢对低温下烟草氧化损伤相关指标的影响。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。下同

Fig. 2 Effect of *Piriformospora indica* on indicators related to oxidative damage in tobacco leaves under cold stress. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$. The same below

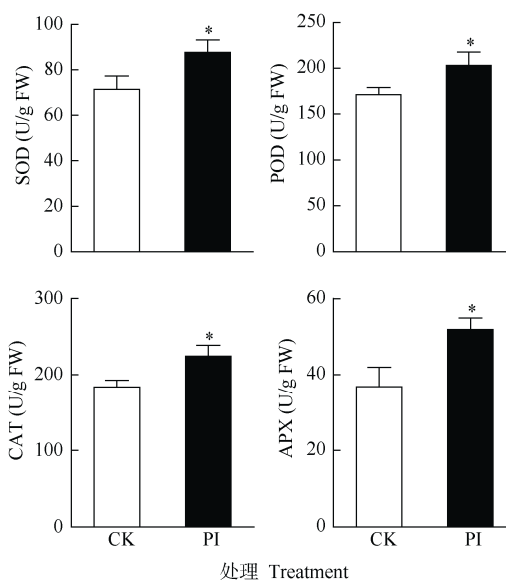


图 3 印度梨形孢对低温下烟草抗氧化酶活性的影响。SOD: 超氧化物歧化酶; POD: 过氧化物酶; CAT: 过氧化氢酶; APX: 抗坏血酸过氧化物酶。

Fig. 3 Effects of *Piriformospora indica* on activities of antioxidant enzymes in tobacco leaves under cold stress. SOD: Superoxide dismutase; POD: Peroxidase; CAT: Catalase; APX: Ascorbate peroxidase.

且可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸含量分别比对照高 16.2%、20.0%、36.8% (图 4), 这表明在低温胁迫下, 印度梨形孢可增强烟草抗氧化酶的活性, 并促进烟草渗透调节物质的积累, 从而提高烟草抵御低温胁迫的能力。

2.4 低温胁迫下印度梨形孢对烟草光合作用的影响

对播种后第 65 天处于低温(实时温度 4 °C)下的烟草叶片进行光合色素含量、净光合速率(Pn)、气孔导度(Gs)、胞间二氧化碳浓度(Ci)和蒸腾速率(Tr)测定。结果表明, 印度梨形孢定殖的烟草叶片中, 叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量均显著高于对照(图 5)。与对照相比, 印度梨形孢定殖的烟草在低温胁迫下表

现出较高的 Pn、Gs 和 Tr, 而 Ci 则有所降低。

进一步测定了烟草叶片的光合荧光参数, 包括 Fv/Fm、ΦPSII、ETR、qP 和 NPQ。由图 6 可见, 接种印度梨形孢的烟草的 Fv/Fm、ΦPSII、ETR、qP 和 NPQ 值较对照分别增加了 23.5%、52.1%、38.7%、45.0%和 24.5%。因此, 印度梨形孢能有效提高冷胁迫下烟草叶片中光系统 II (PSII)的效率, 进而增强烟草的光合作用能力。

2.5 印度梨形孢对烟草低温响应相关基因表达的影响

ICE (inducer of CBF expression)-CBF (C-repeat binding transcription factor/dehydrate responsive ele-

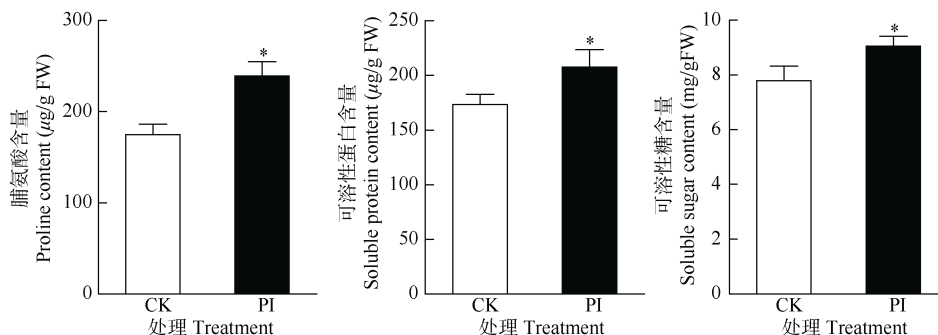


图 4 印度梨形孢对低温环境下烟草渗透调节物质含量的影响

Fig. 4 Effects of *Piriformospora indica* on osmolyte contents in tobacco leaves under cold stress

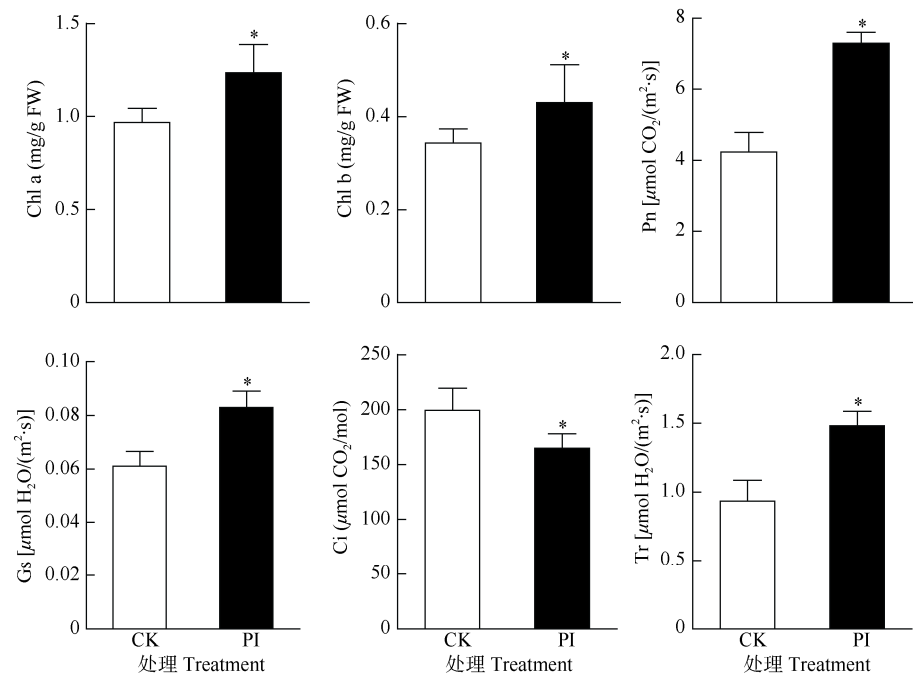


图 5 印度梨形孢对低温环境下烟草光合作用关键指标的影响。Chl a: 叶绿素 a; Chl b: 叶绿素 b; Pn: 净光合速率; Gs: 气孔导度; Ci: 胞间二氧化碳浓度; Tr: 蒸腾速率。

Fig. 5 Effects of *Piriformospora indica* on photosynthesis in tobacco leaves under cold stress. Chl a: Chlorophyll a content; Chl b: Chlorophyll b content; Pn: Net photosynthetic rate; Gs: Stomatal conductance; Ci: Intercellular CO_2 concentration; Tr: Transpiration rate.

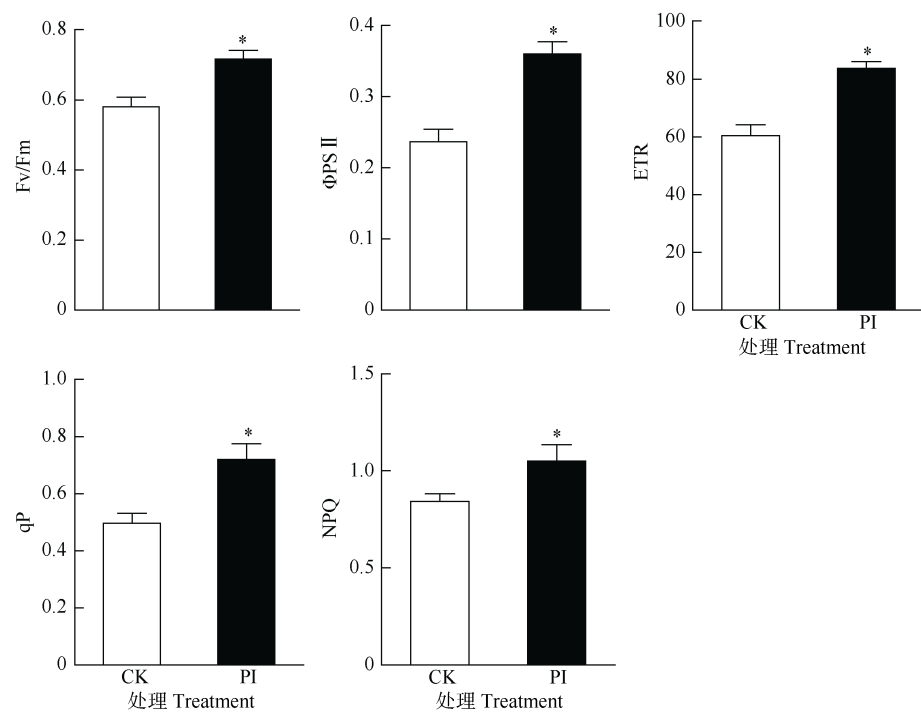


图 6 印度梨形孢对低温环境下烟草光合荧光参数的影响。Fv/Fm: 光系统 II 的最大光化学效率; ΦPSII : 光系统 II 的实际光化学量子效率; ETR: 光合电子传递速率; qP: 光化学猝灭系数; NPQ: 非光化学猝灭系数。

Fig. 6 Effects of *Piriformospora indica* on fluorescence parameters in tobacco leaves under cold stress. Fv/Fm: Maximum photochemical efficiency of photosystem II; ΦPSII : Actual photochemical quantum efficiency of photosystem II; ETR: Photosynthetic electron transport rate; qP: Photochemical quenching coefficient; NPQ: Non-photochemical quenching coefficient.

ment binding factor)-COR (cold-regulated genes)信号通路是调节植物抗寒性的关键途径。为进一步探究低温胁迫下印度梨形孢调节烟草耐冷胁迫的分子机制,在播种后第 65 天(实时温度 4 °C)对烟草 ICE-CBF-COR 信号通路相关基因的表达进行了荧光定量 PCR 分析。结果表明,在低温胁迫下,ICE1 的表达没有显示出显著差异,基因 *NtCBF1*、*NtCBF3*、

NtDREB2B、*NtERD10B* 和 *NtERD10C* 在印度梨形孢定殖的烟草中的表达相较于对照组分别提高了 45.1%、45.5%、61.1%、50.2%和 57.6% (图 7)。*NtDREB2B* 是 *NtCBF1* 的同源基因,而 *NtERD10B* 和 *NtERD10C* 则是 *NtCBF1* 的下游基因。因此,印度梨形孢诱导的抗寒性可能与 CBF 和 COR 的表达上调有关。

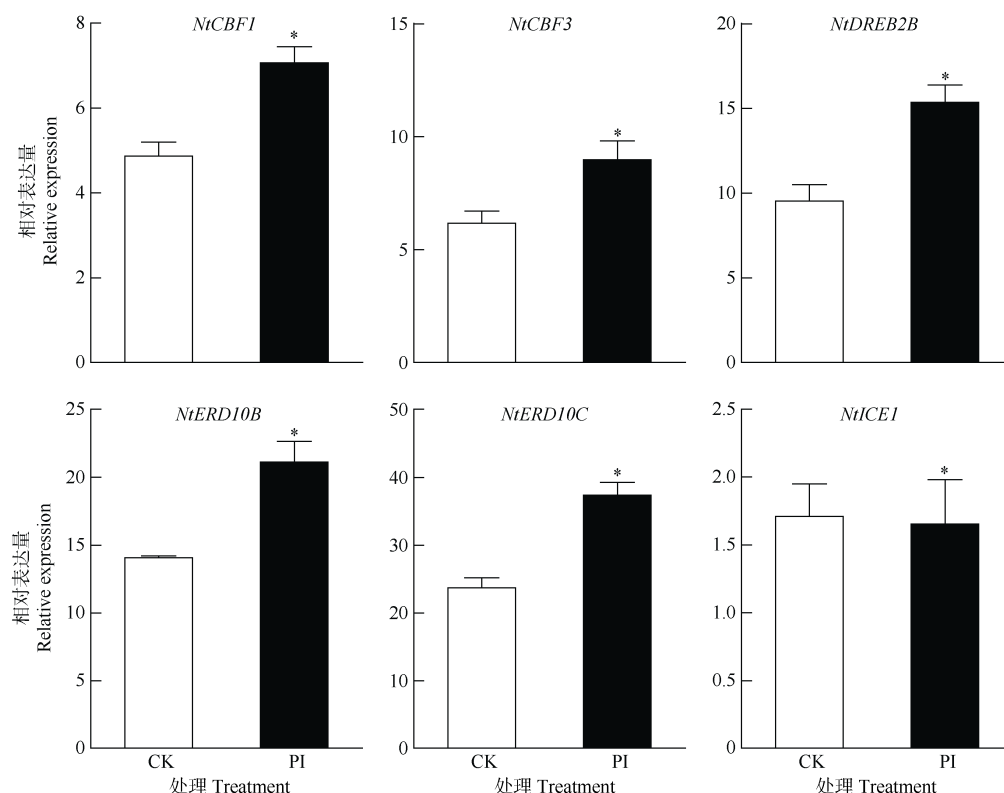


图 7 印度梨形孢对烟草低温响应相关基因表达的影响

Fig. 7 Effects of *Piriformospora indica* on expression of genes related to low-temperature response of tobacco

3 讨论和结论

冷胁迫作为限制作物生长和产量的重要因素,对全球约 15%的农业用地产生了深远的负面影响^[24-25]。有研究表明,冷胁迫可通过破坏作物细胞稳态和扰乱 ROS 产生与清除之间的平衡,导致细胞内 ROS 过度积累,由此对植物组织造成氧化损伤^[26-27]。抗氧化酶系统作为植物的关键防御机制,在清除 ROS 中发挥着核心作用^[28-29]。SOD 特异性地将超氧自由基转化为过氧化氢和氧气,随后过氧化氢在 APX、CAT 和 POD 的作用下被有效清除^[30]。共生真菌的定殖能够增强宿主植物的抗氧化酶系统,有效维持 ROS 稳态,从而减轻过量 ROS

的累积对植物细胞膜的氧化损伤。丛枝菌根真菌 (AMF)上调了包括 SOD、POD、CAT 和 APX 在内的多种抗氧化酶的活性,降低了 MDA 的含量,从而增强了质膜的稳定性^[31-34]。本研究中,冷胁迫引发了烟草叶片 ROS 的爆发,导致 MDA 生成和电解质渗漏率的增加。电解质渗漏率的增加是细胞膜受损的直接反映,标志着细胞内部电解质向外界环境的非正常流失。然而,印度梨形孢在烟草根部的定殖显著增强了烟草 SOD、POD、CAT 和 APX 的活性,从而减少了 MDA 的积累,降低了电解质渗漏率。李震等^[18]的研究同样表明,接种印度梨形孢能够提高烟草叶片中 SOD、POD 的活性。类似地,香蕉(*Musa spp.*)中印度梨形孢的定殖也显著刺激了 SOD、CAT、

APX 和谷胱甘肽还原酶(GR)的活性,并有效减少了冷胁迫下 ROS 的过度积累^[35]。这些表明印度梨形孢的定殖能够增强宿主植物的抗氧化酶活性,从而在冷胁迫下维持细胞膜的稳定性。

冷胁迫能引发植物细胞失水,但植物可通过积累渗透调节物质(如可溶性糖、脯氨酸和可溶性蛋白)来有效抵消这种损害,从而恢复细胞内的渗透平衡^[36-40]。此外,这些渗透调节物质还可通过直接参与 ROS 清除以及降低植物的冰点来保持细胞膜的完整性,使植物能够更好地适应冷胁迫。脯氨酸通过维持渗透平衡、细胞膨压以及间接调节 ROS 代谢来提高植物的胁迫耐受性^[37];可溶性糖作为能量来源,为细胞代谢提供基础,从而增强植物的抗寒性^[40];可溶性蛋白能与水结合,维持细胞水分含量,从而减少冷胁迫下的生理失水^[36]。在本研究中,内生真菌印度梨形孢显著增加了低温胁迫下烟草中脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白的含量。类似地,在拟南芥中,印度梨形孢的定殖显著促进了可溶性蛋白与脯氨酸的积累^[41];而香蕉接种印度梨形孢则增加了可溶性糖和脯氨酸的含量^[40]。这表明印度梨形孢可刺激渗透调节物质的积累,从而提高宿主植物对冷胁迫的抵抗力。

叶绿素是光合作用中捕获光能的关键因子。然而,冷胁迫阻碍了叶绿素的合成,甚至导致其降解,由此对光合作用产生不利影响^[42-43]。在本研究中,接种印度梨形孢可有效促进烟草叶绿素在冷胁迫下的合成,从而减轻冷胁迫对植物的负面影响。此外,本研究结果还表明,冷胁迫对烟草的光合作用产生了严重的抑制作用,这主要体现在 P_n 、 G_s 以及 Tr 的显著下降。 P_n 的降低可能与 G_s 下降以及 CO_2 进入叶片受阻有关。然而,接种印度梨形孢提高了烟草叶片的 P_n 、 Tr 和 G_s ,同时降低了胞间 CO_2 浓度。接种印度梨形孢的烟草 C_i 的降低,可能是由于 CO_2 作为光合作用的基本底物,在光合过程中被大量消耗,从而导致了胞间 CO_2 的减少。这实际上反映了光合作用的增强,进而促进了 P_n 的提高。

冷胁迫还可损害 PSII 反应中心,降低光合活性、减缓叶片电子传递速率并增强光抑制^[44]。此外,由冷胁迫诱导的 ROS 过量积累还可进一步抑制 PSII 光损伤修复蛋白质的合成,从而加剧 PSII 反应中心的损害^[45]。光合荧光参数是衡量 PSII 功能和光捕获效率的重要指标。当中, F_v/F_m 对环境胁迫敏感,代表 PSII 的最大光化学效率; $\Phi PSII$ 与植物光能利用

效率密切相关,当光合有效辐射(PAR)受限时, $\Phi PSII$ 的下降意味着光合效率的降低;ETR 可衡量植物利用环境中光能进行光合作用的速率与效率,在光照不足的情况下,其数值的下降直接反映了光合作用速率的减缓; qP 代表了开放的 PSII 反应中心的比例,它与植物的光合活性呈正相关关系^[46];NPQ 则代表了植物通过热耗散方式消散过剩光能的光保护能力。在盐胁迫下,接种印度梨形孢显著提高了番茄 PSII 的光化学效率,表现为 NPQ、 qP 、 F_v/F_m 和 $\Phi PSII$ 等光合荧光参数的显著增加^[47]。当植物面临镉污染、干旱或低温胁迫时,接种印度梨形孢亦可有效提高宿主植物的 PSII 光化学效率,帮助其更好地应对各种环境压力^[48-49]。本研究中,接种了印度梨形孢的烟草在遭受冷胁迫时,其 F_v/F_m 、 $\Phi PSII$ 、ETR、 qP 和 NPQ 值均显著高于对照组。印度梨形孢能够增强烟草中抗氧化酶的活性,可能是通过激活抗氧化酶防御系统来减轻过量 ROS 生成对 PSII 反应中心所造成的损害。综合叶绿素含量、光合作用参数和光合荧光参数的分析结果,认为接种印度梨形孢的烟草具有更好的光合作用能力,该共生关系为烟草在低温环境下的生长提供了必要的物质与能量支持。

由 ICE-CBF-COR 构成的冷信号级联反应在植物抗寒中发挥着关键作用^[50-52]。作为 *ICE1* 的下游调控基因, *CBF* 转录因子在冷胁迫条件下能够被迅速地诱导上调表达。诱导产生的 CBFs 能与 *COR* 基因启动子中的顺式作用元件特异性结合,进而激活 *CORs* 的表达,从而增强植物对冷胁迫的抵御能力。本研究表明,在冷胁迫条件下,除 *NtICE1* 外,被印度梨形孢定殖的烟草中 *NtCBF1*、*NtCBF3* 和 *NtDRE-B2B* (*CBF1* 的同源基因)的表达水平均显著高于对照组。*NtERD10B* 和 *NtERD10C* 作为烟草中 *CBF1* 的下游调控因子,负责编码 LEA 蛋白^[53]。在冷胁迫下,印度梨形孢定殖的烟草中 *NtERD10B* 和 *NtERD10C* 的表达量同样显著高于对照。有研究表明印度梨形孢能够通过激活 CBF 依赖途径中相关基因的表达,进而增强宿主植物对冷胁迫的耐受性^[22,40]。因此,推测印度梨形孢的定殖能够上调与冷胁迫相关基因的表达,从而提升烟草对冷胁迫的适应能力。

综上,在低温胁迫下,印度梨形孢能够通过提升烟草体内渗透调节物质的含量、增强抗氧化酶活性、提高光合效率以及刺激低温响应相关基因表达等途径来增强烟草的抗寒能力。本研究提供了一种

能够在不改变当前漂浮育苗方式的前提下, 促进烟苗在低温环境下生长发育的策略, 并揭示了印度梨形孢增强烟草抗寒性的作用机制, 为未来利用微生物资源改良作物的耐寒性提供了有力的理论依据与实践指导。

参考文献

- [1] YANG H Y, LIU C Z. Effects of low temperature stress on physiological indexes of cold resistance of four species in the genus *Euonymus* [J]. Grassl Turf, 2020, 40(2): 92–98. [杨航宇, 刘长仲. 低温胁迫对 4 种卫矛属植物抗寒生理指标的影响 [J]. 草原与草坪, 2020, 40(2): 92–98. doi: 10.13817/j.cnki.cyyep.2020.02.014.]
- [2] ZHANG J F, SONG K J, JIN F Y, et al. A novel strategy of artificially regulating plant rhizosphere microbial community to promote plant tolerance to cold stress [J]. Sci Total Environ, 2024, 949: 175184. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2024.175184.
- [3] ZHANG H Y, YUE D F, PAN X J, et al. Effects of 5-HT on the cold resistance of mangrove *Kandelia obovata* seedlings [J]. Chin J Appl Ecol, 2023, 34(5): 1263–1271. [张慧玉, 岳丹斐, 潘晓娇, 等. 5-羟色胺在红树植物秋茄幼苗抗寒中的作用 [J]. 应用生态学报, 2023, 34(5): 1263–1271. doi: 10.13287/j.1001-9332.202305.013.]
- [4] CONDE A, MANUELA CHAVES M, GERÓ H. Membrane transport, sensing and signaling in plant adaptation to environmental stress [J]. Plant Cell Physiol, 2011, 52(9): 1583–1602. doi: 10.1093/pcp/pcr107.
- [5] SHI H T, YE T T, ZHONG B, et al. Comparative proteomic and metabolomic analyses reveal mechanisms of improved cold stress tolerance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] by exogenous calcium [J]. J Integr Plant Biol, 2014, 56(11): 1064–1079. doi: 10.1111/jipb.12167.
- [6] AGURLA S, GAHIR S, MUNEMASA S, et al. Mechanism of stomatal closure in plants exposed to drought and cold stress [J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1081: 215–232. doi: 10.1007/978-981-13-1244-1_12.
- [7] YUAN P G, YANG T B, POOVAIAH B W. Calcium signaling-mediated plant response to cold stress [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(12): 3896. doi: 10.3390/ijms19123896.
- [8] ZHU X C, SONG F B, LIU T D, et al. Arbuscular mycorrhizae reducing water loss in maize plants under low temperature stress [J]. Plant Sign Behav, 2010, 5(5): 591–593. doi: 10.4161/psb.11498.
- [9] ZHANG H J, QI H X, LU G X, et al. Non-targeted metabolomics analysis reveals the mechanism of arbuscular mycorrhizal symbiosis regulating the cold-resistance of *Elymus nutans* [J]. Fron Microbiol, 2023, 14: 1134585. doi: 10.3389/fmicb.2023.1134585.
- [10] HAN Y Y, LOU X, ZHANG W R, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi enhanced drought resistance of *Populus cathayana* by regulating the 14-3-3 family protein genes [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(3): e0245621. doi: 10.1128/spectrum.02456-21.
- [11] CHEN G S, YANG A N, WANG J Z, et al. Effects of the synergistic treatments of arbuscular mycorrhizal fungi and trehalose on adaptability to salt stress in tomato seedlings [J]. Microbiol Spectr, 2024, 12(3): e0340423. doi: 10.1128/spectrum.03404-23.
- [12] SABRA M, ABOULNASR A, FRANKEN P, et al. Beneficial root endophytic fungi increase growth and quality parameters of sweet basil in heavy metal contaminated soil [J]. Front Plant Sci, 2018, 9: 1726. doi: 10.3389/fpls.2018.01726.
- [13] PENG B. Effects of three endophytic fungi on tobacco growth, induced disease resistance and tolerance to heavy metals and their preliminary mechanism [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015. [彭兵. 三种内生真菌对烟草生长、诱导抗病性和抗重金属能力的影响及其机理的初步研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.]
- [14] GHORBANI A, OMRAN V O G, RAZAVI S M, et al. *Piriformospora indica* confers salinity tolerance on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) through amelioration of nutrient accumulation, K^+/Na^+ homeostasis and water status [J]. Plant Cell Rep, 2019, 38(9): 1151–1163. doi: 10.1007/s00299-019-02434-w.
- [15] RAI M, VARMA A. Arbuscular mycorrhiza-like biotechnological potential of *Piriformospora indica*, which promotes the growth of *Adhatoda vasica* Nees [J]. Electron J Biotechn, 2005, 8(1): 107–112. doi: 10.2225/vol8-issue1-fulltext-5.
- [16] MURPHY B R, DOOHAN F M, HODKINSON T R. Yield increase induced by the fungal root endophyte *Piriformospora indica* in barley grown at low temperature is nutrient limited [J]. Symbiosis, 2014, 62(1): 29–39. doi: 10.1007/s13199-014-0268-0.
- [17] XU W R. Effects of *Piriformis indica* inoculation on physiological characteristics of *Ulmus pumila* under different water stress [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2021. [徐万茹. 不同水分胁迫下接种印度梨形孢对白榆生理特性的影响 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2021. doi: 10.27277/d.cnki.gsdnu.2021.000702.]
- [18] LI Z, SHAO C Y, TIAN R J, et al. Preliminary probe to the mechanism of *Piriformospora indica* improving drought resistance of flue-cured tobacco [J]. J Arid Land Res Envir, 2023, 37(3): 143–149. [李震, 邵晨阳, 田仁进, 等. 印度梨形孢提高烤烟抗旱能力的机理初探 [J]. 干旱区资源与环境, 2023, 37(3): 143–149. doi: 10.13448/j.cnki.jalre.2023.073.]
- [19] REN X M, HU Z R, JIANG X Z, et al. Analysis of physiological characteristics and related gene expression in response to low-temperature stress in different tobacco varieties [J/OL]. Mol Plant Breeding, [2024-01-29].

- [任晓敏, 户正荣, 姜习振, 等. 低温胁迫对不同烟草品种的生理特性及相关基因表达分析 [J/OL]. 分子植物育种, [2024-01-29]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20240128.1721.002>.]
- [20] ZHAO Y Y, LI Y L. Tobacco seeds germination at different temperature [J]. Anhui Agri Sci Bull, 2011, 17(23): 53–54. [赵雨云, 李阳林. 不同温度对烟草种子萌发特征的影响 [J]. 安徽农学通报, 2011, 17(23): 53–54. doi: 10.16377/j.cnki.issn1007-7731.2011.23.057.]
- [21] ZHANG J Y, JI W J, LIU L J. The late spring cold of Yunnan and its influence on tobacco in March, 2011 [J]. Yunnan Geogr Envir Res, 2012, 24(1): 25–29. [张加云, 吉文娟, 刘荫今. 2011 年 3 月云南倒春寒过程及其对烤烟影响评估 [J]. 云南地理环境研究, 2012, 24(1): 25–29.]
- [22] LI H, FU S H, ZHU J W, et al. Nitric oxide generated by *Piriformospora indica*-induced nitrate reductase promotes tobacco growth by regulating root architecture and ammonium and nitrate transporter gene expression [J]. J Plant Interact, 2022, 17(1): 861–872. doi: 10.1080/17429145.2022.2108926.
- [23] LICHTENTHALER H K. Chlorophyll fluorescence signatures of leaves during the autumnal chlorophyll breakdown [J]. J Plant Physiol, 1987, 131(1/2): 101–110. doi: 10.1016/S0176-1617(87)80271-7.
- [24] THAKUR P, KUMAR S, MALIK J A, et al. Cold stress effects on reproductive development in grain crops: An overview [J]. Environ Exp Bot, 2010, 67(3): 429–443. doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.09.004.
- [25] CHAUDHRY S, SIDHU G P S. Climate change regulated abiotic stress mechanisms in plants: A comprehensive review [J]. Plant Cell Rep, 2022, 41(1): 1–31. doi: 10.1007/S00299-021-02759-5.
- [26] YOU J, CHAN Z. ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants [J]. Front Plant Sci, 2015, 6: 1092. doi: 10.3389/fpls.2015.01092.
- [27] KARAMI-MOALEM S, MAALI-AMIRI R, KAZEMI-SHAHAN-DASHTI S S. Effect of cold stress on oxidative damage and mitochondrial respiratory properties in chickpea [J]. Plant Physiol Biochem, 2018, 122: 31–39. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.11.011.
- [28] NAVROT N, ROUHIER N, GELHAYE E, et al. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria [J]. Physiol Plant, 2007, 129(1): 185–195. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00777.x.
- [29] RAJPUT V D, HARISH, SINGH R K, et al. Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress [J]. Biology, 2021, 10(4): 267. doi: 10.3390/biology10040267.
- [30] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [J]. Plant Physiol Biochem, 2010, 48(12): 909–930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
- [31] LATEF A A H A, HE C X. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress [J]. Sci Hort, 2011, 127(3): 228–233. doi: 10.1016/j.scienta.2010.09.020.
- [32] HUANG Y M, SRIVASTAVA A K, ZOU Y N, et al. Mycorrhizal-induced calmodulin mediated changes in antioxidant enzymes and growth response of drought-stressed trifoliate orange [J]. Front Microbiol, 2014, 5: 682. doi: 10.3389/fmicb.2014.00682.
- [33] LI J Q, MENG B, CHAI H, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate drought stress in *C₃* (*Leymus chinensis*) and *C₄* (*Hemarthria altissima*) grasses via altering antioxidant enzyme activities and photosynthesis [J]. Front Plant Sci, 2019, 10: 499. doi: 10.3389/fpls.2019.00499.
- [34] HE J D, ZOU Y N, WU Q S, et al. Mycorrhizas enhance drought tolerance of trifoliate orange by enhancing activities and gene expression of antioxidant enzymes [J]. Sci Hort, 2020, 262: 108745. doi: 10.1016/j.scienta.2019.108745.
- [35] LI D, BODJRENOU D M, ZHANG S T, et al. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms banana to cold resistance [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4973. doi: 10.3390/ijms22094973.
- [36] KONTUNEN-SOPPELA S, LANKILA J, LÄHDESMÄKI P, et al. Response of protein and carbohydrate metabolism of Scots pine seedlings to low temperature [J]. J Plant Phys, 2002, 159(2): 175–180. doi: 10.1078/0176-1617-00538.
- [37] HAYAT S, HAYAT Q, ALYEMENI M N, et al. Role of proline under changing environments [J]. Plant Sign Behav, 2012, 7(11): 1456–1466. doi: 10.4161/psb.21949.
- [38] JOGAWAT A. Osmolytes and their role in abiotic stress tolerance in plants [M]// ROYCHOUDHURY A, TRIPATHI D. Molecular Plant Abiotic Stress: Biology and Biotechnology. John Wiley & Sons Ltd, 2019: 91–104. doi: 10.1002/9781119463665.ch5.
- [39] GHOSH U K, NAHIDUL I M, NUREALAM S M, et al. Understanding the roles of osmolytes for acclimatizing plants to changing environment: A review of potential mechanism [J]. Plant Sign Behav, 2021, 16(8): 1913306. doi: 10.1080/15592324.2021.1913306.
- [40] XU Q S, WEI Q Q, KONG Y L, et al. Unearthing the alleviatory mechanisms of brassinolide in cold stress in rice [J]. Life, 2022, 12(6): 833. doi: 10.3390/life12060833.
- [41] JIANG W, PAN R, WU C, et al. *Piriformospora indica* enhances freezing tolerance and post-thaw recovery in *Arabidopsis* by stimulating the expression of *CBF* genes [J]. Plant Sign Behav, 2020, 15(4): 1745472. doi: 10.1080/15592324.2020.1745472.

- [42] HAJIHASHEMI S, NOEDOOST F, GEUNS J M C, et al. Effect of cold stress on photosynthetic traits, carbohydrates, morphology, and anatomy in nine cultivars of *Stevia rebaudiana* [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1430. doi: 10.3389/fpls.2018.01430.
- [43] LI Y Z, ZHU J C, XU J W, et al. Effect of cold stress on photosynthetic physiological characteristics and molecular mechanism analysis in cold-resistant cotton (ZM36) seedlings [J]. *Front Plant Sci*, 2024, 15: 1396666. doi: 10.3389/fpls.2024.1396666.
- [44] WEI Y L, CHEN H Z, WANG L, et al. Cold acclimation alleviates cold stress-induced PSII inhibition and oxidative damage in tobacco leaves [J]. *Plant Sign Behav*, 2022, 17(1): 2013638–2013638. doi: 10.1080/15592324.2021.2013638.
- [45] HE J, CHOW W S. The rate coefficient of repair of photosystem II after photoinactivation [J]. *Physiol Plant*, 2003, 118(2): 297–304. doi: 10.1034/j.1399-3054.2003.00107.x.
- [46] BANERJEE A, ROYCHOUDHURY A. Cold stress and photosynthesis [M]// AHMAD P, AHANGER M A, ALYEMENI M N, et al. *Photosynthesis, Productivity and Environmental Stress*. John Wiley & Sons Ltd, 2019: 27–37. doi:10.1002/9781119501800.ch2.
- [47] GHORBANI A, RAZAVI S M, GHASEMI OMRAN V O, et al. *Piriformospora indica* inoculation alleviates the adverse effect of NaCl stress on growth, gas exchange and chlorophyll fluorescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. *Plant Biol*, 2018, 20(4): 729–736. doi: 10.1111/plb.12717.
- [48] SHAHABIVAND S, PARVANEH A, ALILOO A A. Root endophytic fungus *Piriformospora indica* affected growth, cadmium partitioning and chlorophyll fluorescence of sunflower under cadmium toxicity [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2017, 145: 496–502. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.07.064.
- [49] BOORBOORI M R, ZHANG H Y. The role of *Serendipita indica* (*Piriformospora indica*) in improving plant resistance to drought and salinity stresses [J]. *Biology*, 2022, 11(7): 952. doi: 10.3390/biology11070952.
- [50] ZHAO C Z, ZHANG Z J, XIE S J, et al. Mutational evidence for the critical role of CBF transcription factors in cold acclimation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2016, 171(4): 2744–2759. doi: 10.1104/pp.16.00533.
- [51] SHI Y T, DING Y L, YANG S H. Molecular regulation of CBF signaling in cold acclimation [J]. *Trends Plant Sci*, 2018, 23(7): 623–637. doi: 10.1016/j.tplants.2018.04.002.
- [52] LIU Y K, DANG P Y, LIU L X, et al. Cold acclimation by the CBF-COR pathway in a changing climate: Lessons from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Rep*, 2019, 38(5): 511–519. doi: 10.1007/s00299-019-02376-3.
- [53] SHUKLA R K, RAHA S, TRIPATHI V, et al. Expression of CAP2, an APETALA2-family transcription factor from chickpea, enhances growth and tolerance to dehydration and salt stress in transgenic tobacco [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142(1): 113–123. doi: 10.1104/pp.106.081752.