煤炭科学技术
COAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

DSE及其代谢物对紫花苜蓿促生作用及其矿区生态修复潜力

毕银丽 宋雅宁 白雪蕊 王淑惠

引用本文:
毕银丽， 宋雅宁， 白雪蕊， 等. DSE及其代谢物对紫花苜蓿促生作用及其矿区生态修复潜力[J]. 煤炭科学技术, 2023, 51(12): 90–99.
BI Yinli, SONG Yaning, BAI Xuerui. DSE and its metabolites on *Medicago sativa L.* growth promotion and its potential for ecological restoration in mining areas[J]. Coal Science and Technology, 2023, 51(12): 90–99.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.13199/j.cnki.cst.2023–1105

您可能感兴趣的其他文章
Articles you may be interested in

接菌对根土复合体抗剪拉作用机理及其矿山生态修复潜力
Mechanisms of shear tension resistance of root–soil complexes by inoculated bacteria and potential for ecological restoration in mines
煤炭科学技术. 2023, 51(1): 493–501 https://doi.org/10.13199/j.cnki.cst.2022–2167

紫花苜蓿黄土复合体抗剪强度时间效应研究
Study on the time effect of shear strength of alfalfa–loess composite
煤炭科学技术. 2023, 51(11): 234–247 https://doi.org/10.13199/j.cnki.cst.2022–2230

接种菌根对采煤沉陷区苜蓿生长及土壤改良影响研究
Research on effect of arbuscular mycorrhizal fungi on alfalfa growth and soil improvement in mining subsidence area
煤炭科学技术. 2020, 48(4) http://www.mtkxjs.com.cn/article/id/3f9bea58–ed47–402a–821e–6a2b3ad717b0

黄土高原矿区生态修复固碳机制与增汇潜力及调控
Mechanism, potential and regulation of carbon sequestration and sink enhancement in ecological restoration of mining areas in the Loess Plateau
煤炭科学技术. 2023, 51(1): 502–513 https://doi.org/10.13199/j.cnki.cst.2023–2250

神东矿区接种AMF对植物土壤生态化学计量及养分回收的影响
Effects of AMF inoculation on plant–soil ecological stoichiometry and nutrient recovery in Shendong mine
煤炭科学技术. 2024, 52(5): 354–363 https://doi.org/10.12438/cst.2023–0273

煤矸石山植物物种多样性与土壤化学因子的关系—以灵武矿区生态修复初期为例
Relationship between plant species diversity and soil chemical properties in coal gangue dump：early stage of ecological restoration in Lingwu Mining Area
煤炭科学技术. 2020, 48(4) http://www.mtkxjs.com.cn/article/id/5a808e39–f649–4d4f–8a7a–ae2eb2463316

关注微信公众号，获得更多资讯信息

移动扫码阅读

毕银丽, 宋雅宁, 白雪蕊, 等. DSE 及其代谢物对紫花苜蓿促生作用及其矿区生态修复潜力[J]. 煤炭科学技术, 2023, 51(12): 90−99.

BI Yinli, SONG Yaning, BAI Xuerui, *et al*. DSE and its metabolites on *Medicago sativa L.* growth promotion and its potential for ecological restoration in mining areas[J]. Coal Science and Technology, 2023, 51(12): 90−99.

DSE 及其代谢物对紫花苜蓿促生作用及其矿区生态修复潜力

毕银丽[1,2,3], 宋雅宁[1,2], 白雪蕊[1,2], 王淑惠[1,3]

(1. 西安科技大学 西部矿山生态环境修复研究院, 陕西 西安　710054; 2. 西安科技大学 地质与环境学院, 陕西 西安　710054; 3. 中国矿业大学 (北京) 煤炭资源与安全开采国家重点实验室, 北京　100083)

摘　要: 煤炭开采造成矿区土地生产力降低，生态脆弱问题加剧，微生物联合植物复垦技术是矿区生态修复常用手段，合适的菌剂接种方式对加快矿区生态修复具有重要意义。深色有隔内生真菌 (*Dark Septate Endophytes*，DSE) 是一类普遍存在于植物根系的内生真菌，其代谢物具有植物生长刺激素的功能。以紫花苜蓿为研究对象，在浸根方式和模拟土培方式 2 种接种方式下，设置 DSE 菌丝(HD)、代谢物(MD)、菌丝及其代谢物(HD+MD)及空白对照(CK)4 个处理，探究 DSE 及其代谢物对紫花苜蓿的促生作用机制。结果表明：浸根方式下菌丝及其代谢物联合处理的紫花苜蓿长势最佳，总生物量、总叶绿素、根体积、全氮含量分别比对照组增加了 83.78%、35.54%、132.12%、82.16%，DSE 在紫花苜蓿根系定殖率可达 68.89%，且以菌丝结构定殖为主。模拟土培方式下 DSE 代谢物对紫花苜蓿的促生作用显著，定殖以微菌核结构为主。相关性分析表明，与接种方式相比较，DSE 接种处理与菌丝定殖率、微菌核定殖率、总定殖率、根长、根表面积、根投影面积呈显著正相关 (P<0.05)，与地上部鲜重、根鲜重、总鲜重、根体积、全氮、全钾呈极显著正相关 (P<0.01)。DSE 及代谢物通过定殖率和光合作用调控紫花苜蓿的生长，为矿区生态修复绿色菌肥的的开发利用提供了理论依据。

关键词: 矿区生态修复; 深色有隔内生真菌; 紫花苜蓿; 生长特性; 植物生物刺激素

中图分类号: TD88; X171　　**文献标志码:** A　　**文章编号:** 0253−2336(2023)12−0090−10

DSE and its metabolites on *Medicago sativa L.* growth promotion and its potential for ecological restoration in mining areas

BI Yinli[1,2,3], SONG Yaning[1,2], BAI Xuerui[1,2], WANG Shuhui[1,3]

(1. *Institute of Ecological Environment Restoration in Mine Areas of West China*, *Xi'an University of Science and Technology*, *Xi'an* 710054, *China*; 2. *College of Geology and Environment*, *Xi'an University of Science and Technology*, *Xi'an* 710054, *China*; 3. *State Key Laboratory for Coal resources and Safe Mining*, *China University of Mining and Technology-Beijing*, *Beijing* 100083, *China*)

Abstract: Coal mining has caused the reduction of land productivity in mining areas and exacerbated the problem of ecological fragility, while microbial combined plant reclamation technology is a commonly used means of ecological restoration in mining areas, and the appropriate inoculation method of microbial agents is of great significance for accelerating the ecological restoration in mining areas. *Dark Septate Sndophytes* (DSE) are a group of endophytic fungi ubiquitously existing in plant root systems, whose metabolites could function as plant growth stimulants. Taking *Medicago sativa L.* as the research object, four treatments were set up, including DSE hypha (HD), metabolite (MD), hypha and its metabolite (HD+MD) and blank control (CK), to explore the mechanism of DSE and its metabolite promoting effect on *Medicago sativa L.*, under two inoculation methods of root dipping and simulated soil cultivation. The results showed that *Medicago sativa L.* co-treated with hypha and its metabolites under root dipping method had the best growth potential. Compared to the control group, the total biomass, total chlorophyll, root volume and total nitrogen content increased by 83.78%, 35.54%, 132.12% and

收稿日期: 2023−07−28　　**责任编辑:** 黄小雨　　**DOI:** 10.13199/j.cnki.cst.2023-1105

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (2022YFF1303300); 黄河流域煤矿区荒漠碳汇构建与固废利用协同增效技术资助项目 (2022-YRUC-01-0304)

作者简介: 毕银丽 (1971—), 女, 陕西米脂人, 教授, 博士生导师。E-mail: ylbi88@126.com

82.16%, respectively. The colonization rate of DSE in the root system of *Medicago sativa L.* could achieve 68.89%, dominated by the colonization in the hypha mode. Under simulated soil cultivation, DSE metabolites performed a significant growth-promoting effect on *Medicago sativa L.*, and the colonization was dominated by the microsclerotia mode. The correlation analysis showed that compared with the inoculation method, the DSE inoculation treatment was significantly positively correlated with hypha colonization rate, microsclerotia colonization rate, total colonization rate, root length, root surface area, root projected area ($P<0.05$), and highly significantly positively correlated with aboveground fresh weight, root fresh weight, total fresh weight, root volume, total nitrogen and total potassium ($P<0.01$). DSE and its metabolites could regulate the growth of *Medicago sativa L.* through colonization rate and photosynthesis, providing a theoretical basis for the development and utilization of green microbial fertilizer for ecological restoration in mining areas.

Key words: ecological restoration in mining area; *Dark Septate Endophytes*; *medicago sativa L.*; growth characteristics; plant biostimulants

0 引　　言

煤炭开采过程造成表土的剥离与挖掘、煤炭资源的运输和倾倒会破坏原有土层结构[1]，致使土壤养分损失，酶活性降低，土壤微生物多样性锐减，土壤功能稳定性减弱[2]，土地生产力和地表植被受损[3-4]。在绿色开采煤矿的同时，采取灵活有效的途径增加土壤养分，实现快速高效的植被恢复，是保障采矿区生态环境高质量发展的首要任务[5]。

紫花苜蓿 (*Medicago sativa L.*) 为多年生豆科草本植物，具有耐寒、抗旱、较强的再生能力和广适性，其根系发达，可改善土壤养分，优化土壤结构[6]，是矿区生态修复的首选植物。此外，紫花苜蓿还具有良好的培肥作用，其根系分泌物释放增加土壤有机质[7]，其根、茎、叶翻压、腐解可作为绿肥[8]。秦嘉海等[9]发现在黑河流域的草甸盐土种植紫花苜蓿 3 年后地表覆盖度达 95% ~ 98%，土壤速效氮、磷、钾含量增加。

为提高矿区植被的抗逆性能，利用具有促生作用的微生物进行联合修复，是目前矿区生态修复常用的技术手段。深色有隔内生真菌 (*Dark Septate Endophytes*, DSE) 是一类以深色菌丝和微菌核结构定殖于植物根系组织细胞内和细胞间隙的内生真菌[10]。DSE 在多种植被中广泛存在，无宿主特异性，且不会对宿主植物产生病害作用，同时具有促进植物生长、提高宿主抗逆性的特性[11]。DSE 还能增强植物应对干旱[12]、盐胁迫[13] 以及抵御病虫害的能力[14]。微生物会分泌具有活性的生长刺激素，可以增加植物养分含量、提高植物非生物胁迫耐受性和改善植物品质性状[15]。徐润冰[16] 发现 DSE 分泌的酸性磷酸酶，能将难溶态磷转化为容易被植物吸收的可溶态磷，进而促进植物生长[17]。DSE 也可以分泌蛋白水解酶，矿化土壤中的蛋白质和肽，使氮以无机形式供植物吸收利用[18]。此外，DSE 分泌的生长素、氨基酸、糖类等代谢物[19] 具有促进植物获取养分、增强植物抗性[20] 的功能。DSE 代谢物具有作为植物生物刺激素的潜在用途[21]，代谢物中的化合物会影响植物在分子水平上的反应，促进色素、激素、抗氧化剂和生物碱的生物合成[22]。

菌剂的接种方式会影响其对植物的促生效果。黄望启等[23] 用农杆菌在植物移栽时对植物幼根进行浸泡，TINNA 等[24] 将洋葱幼苗移栽前用微生物菌剂浸根可以提高洋葱对营养物质的吸收，进而提高洋葱产量,大面积农田作物的接种也可将一定浓度的液体菌剂溶于灌溉水中对根系进行接种[25]。此外，笔者等[26] 通过叶面涂抹施加 DSE 提高了蛋白桑生长速率及品质。

目前，DSE 的研究主要集中在其与植物的互作机理以及 DSE 多样性上，不同接种方式下 DSE 及其代谢物对植物的促生效果研究较少。以紫花苜蓿为研究对象，探究浸根和模拟土培 2 种接种方式下 DSE 及其代谢物对紫花苜蓿生长特性的影响，筛选促进植物生长的最适接种方式，是植被恢复前期帮助幼苗在矿区恶劣条件下快速生长的有效方式。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试植物紫花苜蓿为矿区生态修复常用物种。水培溶液为 1/2 霍格兰营养液 (各物质质量浓度分别为：硫酸钾 303.5 mg/L，磷酸铵 57.5 mg/L，硫酸镁 246.5 mg/L，EDTA 铁钠盐 10 mg/L，硫酸亚铁 1.43 mg/L，硼砂 2.25 mg/L，硫酸锰 1.065 mg/L，硫酸铜 0.025 mg/L，硫酸锌 0.11 mg/L，硫酸铵 0.01 mg/L，钙盐 472.5 mg/L)。

供试菌种从内蒙古自治区锡林浩特市胜利露天矿外围草原区克氏针茅 (*Stipa krylovii*) 根部分离纯化获得，测序鉴定为链格孢属 (*Alternaria* sp.)，是植物根内 DSE 常见的种属之一[27]，保存于中国矿业大

学 (北京) 微生物复垦实验室。

将 *Alternaria* sp.接种至 PDA 固体培养基 (各物质质量浓度分别为：马铃薯淀粉 6.0 g/L，葡萄糖 20.0 g/L，琼脂 20.0 g/L，购自北京酷来搏科技有限公司)，28 ℃ 黑暗倒置培养 14 d，得到 *Alternaria* sp.菌落。在无菌条件下取直径 7 mm 的菌饼，然后置于 MMN 液体培养基 (氯化钙 0.05 g/L，氯化钠 0.025 g/L，氯化铁 0.01 g/L，硫酸镁 0.15 g/L，磷 0.000 1 g/L，葡萄糖 10.0 g/L，柠檬酸 0.2 g/L，麦芽提取物 10.0 g/L，购自北京酷来搏科技有限公司)，28℃、180 r/m 振荡培养 8 d 得到 DSE 菌液。将 DSE 菌液分装于 10 m/L 离心管，于 4 ℃、10 000 r/m 离心 15 min，取离心管内上清液过 0.22 μm 的滤膜，滤液即为 DSE 代谢物，离心管内固体物质即为 DSE，将 DSE 与 DSE 代谢物保存备用。

供试基质为玻璃珠和无菌水，玻璃珠直径为 1 mm，用高温灭菌锅将去离子水灭菌 30 min 后得到无菌水。

1.2　试验设计

试验在西安科技大学西部矿山生态环境修复研究院水培室进行。选取颗粒饱满、大小一致的紫花苜蓿种子，用体积分数为 75% 的乙醇处理种子 3 min，再用体积分数为 10% 的 H_2O_2 溶液浸泡 15 min 后用无菌水冲洗干净，备用。

将 250 g 高温灭菌的玻璃珠放入直径 7.9 cm，高 7.5 cm 的花盆中，每盆播种 25 粒上述紫花苜蓿种子，并浇 1/2 霍格兰营养液 50 mL，共种植 24 盆。植物出芽后生长在自然光 14 h(（25±3）℃)和黑暗 10 h(（20±3）℃)的环境中。生长 10 d 后进行间苗，每盆保留长势一致的幼苗 10 株。12 盆用于模拟土培方式接种试验，12 盆用于浸根方式接种试验。

模拟土培接种试验植物生长基质为玻璃珠，设置接种 DSE(DH)、DSE 代谢物 (DM)、DSE +DSE 代谢物 (DH+DM) 及空白对照 (CK) 四个处理，用镊子在盆中扎小孔，将 DSE 及其代谢物倒入小孔并拨动玻璃珠覆盖。按照质量比 1∶100 添加 DSE 和 DSE 代谢物，分别接种 2.5 g DH，2.5 mL DM，2.5 gDH+2.5 mL DM，CK 添加 2.5 mL 无菌水，每个处理 3 个重复。生长期间称重浇灌营养液，保持含水率为 50%~60%。一周后移入水培盒（12.7 cm×8.7 cm×11.4 cm）中进行培养试验。

水培盒中加入 1/2 霍格兰营养液 800 mL，将 10 株紫花苜蓿幼苗移入水培盒并进行固定，在试验期间，在水培盒中连续充气。每天添加营养液以保持液体体积。

浸根方式接种试验先将植物移入水培盒，水培试验设计同上。试验处理同模拟土培试验。按照质量比 1∶100 接种 DSE 和 DSE 代谢物，分别在水培盒中接种 8 g DH，8 mL DM，8 g DH+8 mL DM，CK 添加 8 mL 无菌水，直接将 DSE 及其代谢物倒入水培盒内，每个处理 3 个重复。一周后水培盒更换 1/2 霍格兰营养液。植物生长 47 d 后收获，进行各项指标的测定。

1.3　测定指标与方法

1.3.1　紫花苜蓿根系 DSE 的定殖

随机取少量细根样冲洗干净，放在适宜大小的试管中。加入 10%KOH 溶液 (10 g KOH 溶于 100 mL 蒸馏水) 放于恒温水浴锅 (90 ℃) 加热至透明为止。加热后将试管取出倒出 KOH，用清水漂洗干净后加入染色液 (酸性品红) 浸泡，于 90 ℃ 恒温水浴锅加热 30 min 进行染色。将上述已染色的根段用清水漂洗加入脱色液 (乳酸与甘油与水质量比为 1∶1∶1) 静置过夜脱色，脱色后将根系切成长 1.0 ~ 1.5 cm 根段，随机选取 30 根制片，放于显微镜下观察，分别记录总定殖率、菌丝定殖率和微菌核定殖率[28]。计算公式如下：

$$C_x = A/B \times 100\% \tag{1}$$

式中：C_x 为定殖率；A 为定殖根段数；B 为总根段数。

1.3.2　紫花苜蓿生长状况

每个处理 10 株紫花苜蓿，收获后用无菌水冲洗根部粘连菌丝后，用分析天平称重测定植株地上部鲜重和根鲜重，根冠比计算式为

$$R_{sr} = R_b/S_b \tag{2}$$

式中：R_{sr} 为根冠比；R_b 为根鲜重；S_b 为地上部鲜重。

1.3.3　紫花苜蓿叶绿素含量的测定

采用乙醇法[29] 测定叶绿素含量：取新鲜植物叶片于研钵中，加入碳酸钙和石英砂与 95% 乙醇进行破碎浸提，研磨成浆后静置 3 ~ 5 min。静置后过滤至 25 mL 容量瓶定容。后用分光光度计分别在波长 665、649、470 nm 处测定滤液的吸光度，计算叶绿素 $a(C_a)$、叶绿素 $b(C_b)$、类胡萝卜素 (C_{xc}) 含量及总叶绿素含量 (C_T)，mg/L。

$$C_T = C_a + C_b \tag{3}$$

$$C_a = 13.95A_{665} - 6.88A_{649} \tag{4}$$

$$C_b = 24.96A_{649} - 7.32A_{665} \tag{5}$$

$$C_{xc} = (1\,000A_{470} - 2.05C_a - 114.8C_b)/245 \tag{6}$$

式中：A_{665}、A_{649}、A_{470} 分别表示波长在 665、649、470 nm 的吸光度。

1.3.4　紫花苜蓿根系构型的测定

植物根部黏连菌丝用清水漂洗干净后用 Microtek ScanMaker i800 plus 进行根系扫描，并用根系表型分析系统 V2.3.2 软件分析根系表型结构，获得植物根长、根表面积、根体积、平均直径、根尖数。

1.3.5　紫花苜蓿营养元素的测定

植物样品烘干磨碎后用 H_2SO_4–H_2O_2 消煮，消煮至溶液澄清透明后静置冷却，用凯氏定氮仪测定植株全氮含量[30]，用电感耦合等离子发射光谱仪 (ICP-OES) 测定植株全磷和全钾含量[31]。

1.4　数据处理

采用 Excel 2013 软件处理数据，使用 Origin2019 进行绘图。试验数据通过 spss20.0 进行单因素方差分析 (ANOVA)，显著性水平选择 α=0.05。采用 R 语言 corrplot 包进行相关性分析。使用 R 语言 Vegan 包进行分解分析。

2　结果与分析

2.1　DSE 及其代谢物对紫花苜蓿根系 DSE 定殖率的影响

DSE 及其代谢物在紫花苜蓿根系定殖效果如图 1 所示。在显微镜下观察，CK 和 DM 处理的紫花苜蓿根系均没有发现 DSE 定殖。由图 1a 和 1c 可知，与模拟土培相比，浸根方式紫花苜蓿根系 DSE 以菌丝方式为主要定殖方式，DH、DH+DM 处理菌丝侵染率与模拟土培相比分别提高了 7.67、9.33 倍，DH、DH+DM 处理总定殖率与模拟土培相比分别提高了 2.71、5.2 倍。由图 1b 可知，DH 处理有助于微菌核定殖于紫花苜蓿根系。定殖率最高可达 15.56%。

2.2　DSE 及其代谢物对紫花苜蓿生长特性的影响

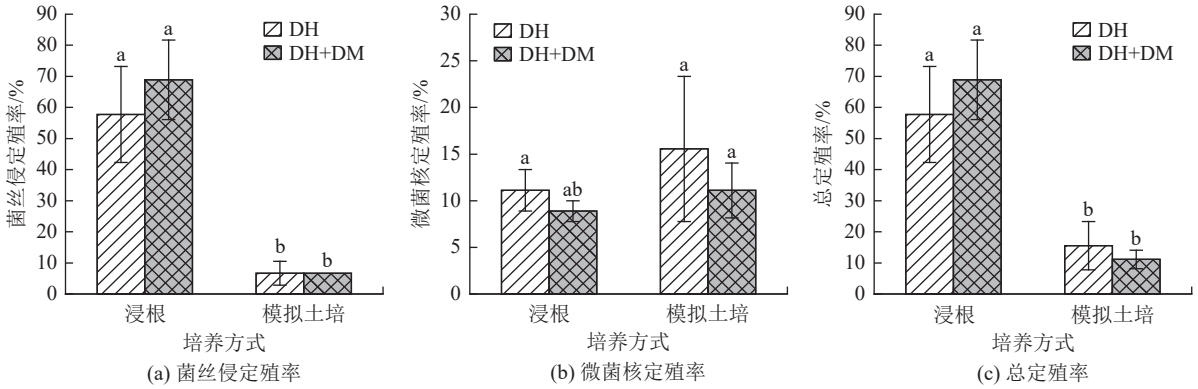
DSE 及其代谢物对紫花苜蓿鲜重的影响如图 2 所示。浸根方式和模拟土培方式接种 DSE 及其代谢物均能增加紫花苜蓿地上部鲜重、根鲜重、总鲜重，浸根方式作用效果表现为 DH+DM>DH>DM>CK，模拟土培作用效果表现为 DM>DH+DM>DH>CK。浸根方式 DM、DH+DM 处理较 CK 相比根冠比增加。模拟土培较 CK 相比，DH+DM 处理根冠比增加。整体来看，浸根方式 DH+DM 对紫花苜蓿的促生效果最好 (P<0.05)，地上部鲜重、根鲜重、总鲜重较 CK 分别增加了 83.54%、84.15%、83.78%。模拟土培 DM 对紫花苜蓿的促进作用最明显 (P<0.05)，地上部鲜重、根鲜重、总鲜重较 CK 分别增加了 97.37%、88.77%、94.25%。

2.3　DSE 及其代谢物对紫花苜蓿光合作用的影响

DSE 及其代谢物对紫花苜蓿叶绿素含量的影响如图 3 所示。浸根方式接种 DSE 及其代谢物叶片叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素含量高于 CK，DH、DM、DH+DM 处理叶绿素 a 较 CK 分别增加 7.58%、21.91%、32.14%，叶绿素 b 含量较 CK 分别增加 1.02%、43.65%、43.19%，总叶绿素含量较 CK 分别增加 5.57%、28.59%、35.54%。DH、DH+DM 处理可增加类胡萝卜素含量 (图 3b)，较 CK 相比分别增加 2.54%、12.77%。模拟土培叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素含量表现为 DM>DH>CK>DH+DM。类胡萝卜素含量表现为 CK>DH>DM>DH+DM。

2.4　DSE 及其代谢物对紫花苜蓿根系构型的影响

DSE 及其代谢物对紫花苜蓿根系结构的影响如图 4 所示，对植物根系扫描和数据化处理获得根系表型结构 (根系长度、平均直径、根体积、表面积、投影面积、根尖数) 见表 1。由表 1 可知，浸根方式各处理根系长度增加，DH、DM、DH+DM 较 CK 分别提高 59.31%、16.42%、38.13%。根体积表现为 DH+DM>DM>DH>CK，其中，DH+DM 较对照显著 (P<0.05) 增加 132.12%。根尖数增加，表现为 DH+DM>



注：相同字母表示采用“Duncan test”检验，组间没有显著差异(P>0.05)，不同字母表示有显著差异(P<0.05)。

图 1　DSE 及其代谢物对紫花苜蓿根系定殖率的影响

Fig.1　Effect of DSE and metabolites on root colozination rate in *Medicago sativa L.*

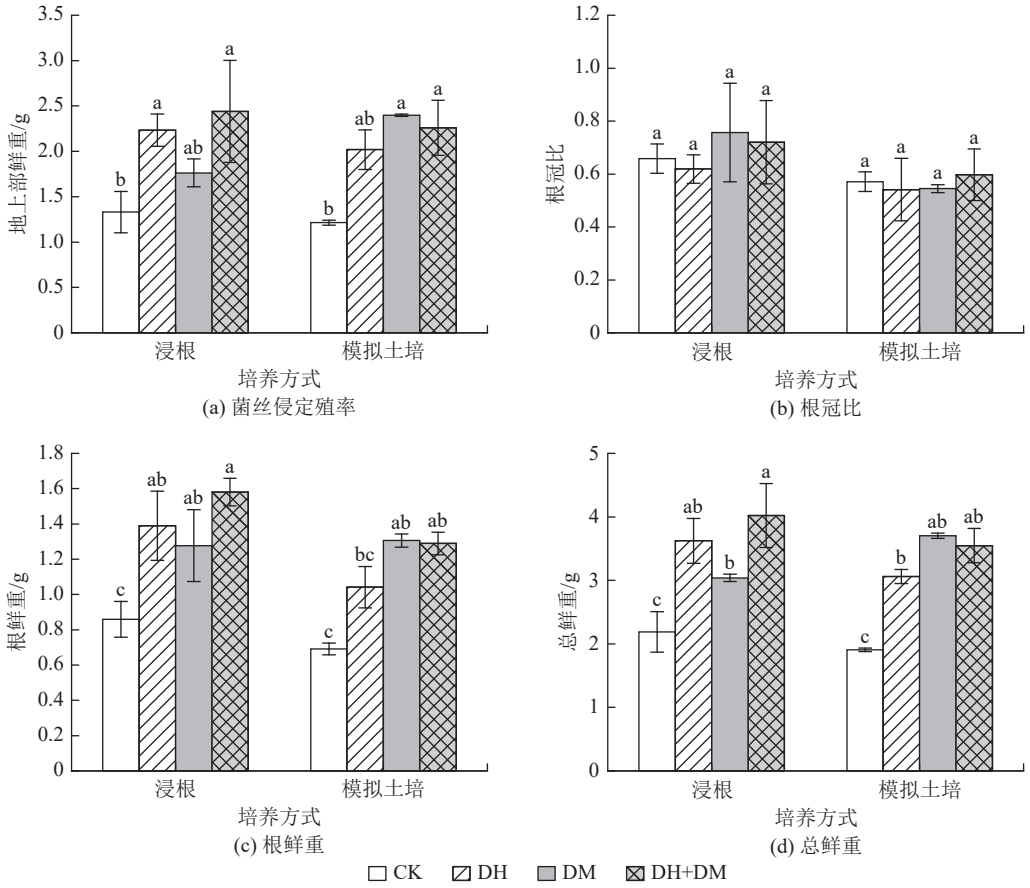


图 2　DSE 及其代谢物对紫花苜蓿生长特性的影响

Fig.2　Effect of DSE and metabolites on the growth characteristics of *Medicago sativa L.*

DH>DM>CK。模拟土培 DH、DM、DH+DM 处理较 CK 根系长度分别增加 23.30%、54.09%、67.90%。DH、DM、DH+DM 处理根体积较 CK 相比有所增加，较 CK 相比分别增加 29.6%、40.28%、33.98%。根尖数表现为 DM>DH>DH+DM>CK，DM 较 CK 相比，根尖数显著 (P<0.05) 增加 128.61%。总体来看，浸根方式 DH+DM 处理根体积最大，模拟土培 DM 处理根尖数最多。

2.5　DSE 及其代谢物对紫花苜蓿养分含量的影响

DSE 及其代谢物对紫花苜蓿组织中全氮、全磷、全钾含量的影响如图 5 所示。接种 DH、DM、DH+DM 紫花苜蓿的营养元素含量均有所增加。浸根方式 DH+DM 处理紫花苜蓿全氮含量最高，较 CK 相比显著 (P<0.05) 增加 82.16%，模拟土培 DM 处理紫花苜蓿全氮含量最高，较 CK 相比显著 (P<0.05) 增加 103.70%。模拟土培各处理紫花苜蓿全磷含量均高于浸根方式，其中，DH 处理全磷含量显著 (P<0.05) 高于其他处理，全磷含量较对照增加 131.50%(图 5b)。浸根方式与模拟土培 DH 处理紫花苜蓿全钾含量最高，浸根方式 DH 处理全钾含量较 CK 显著 (P<0.05) 增加 116.75%，模拟土培 DH 处理全钾含量较 CK 显著 (P<0.05) 增加 55.01%(图 5c)。

2.6　接种方式、接种处理与紫花苜蓿生长指标相关性分析

由图 6 所示的相关性分析表明，接种处理与菌丝定殖率、微菌核定殖率、总定殖率、根长、根表面积、根投影面积呈显著正相关 (P<0.05)，与地上部鲜重、根鲜重、总鲜重、根体积、全氮、全钾呈极显著正相关 (P<0.01)。浸根方式接种对菌丝定殖率、总定殖率更有效，对根直径影响显著 (P<0.05)，对全磷影响极显著 (P<0.01)。说明浸根方式接种 DSE 及其代谢物对促进紫花苜蓿生长更有效。同时，不同的接种处理对紫花苜蓿生长发育具有不同的作用效果。菌丝定殖率与总定殖率与根体积、全氮、全钾呈显著正相关 (P<0.05)，与根鲜重、总鲜重呈极显著正相关 (P<0.01)。表明 DSE 菌丝、DSE 代谢物均能促进植物根系发育，促进植物养分积累进而促进植物生长。

2.7　接种方式和接种处理对紫花苜蓿生长特性的分解分析

对植物生理生长指标进行分解分析，结果表明，接种方式对紫花苜蓿生长的贡献度为 3.1%，接种处理对紫花苜蓿生长贡献度为 14.0%，两者对紫花苜蓿

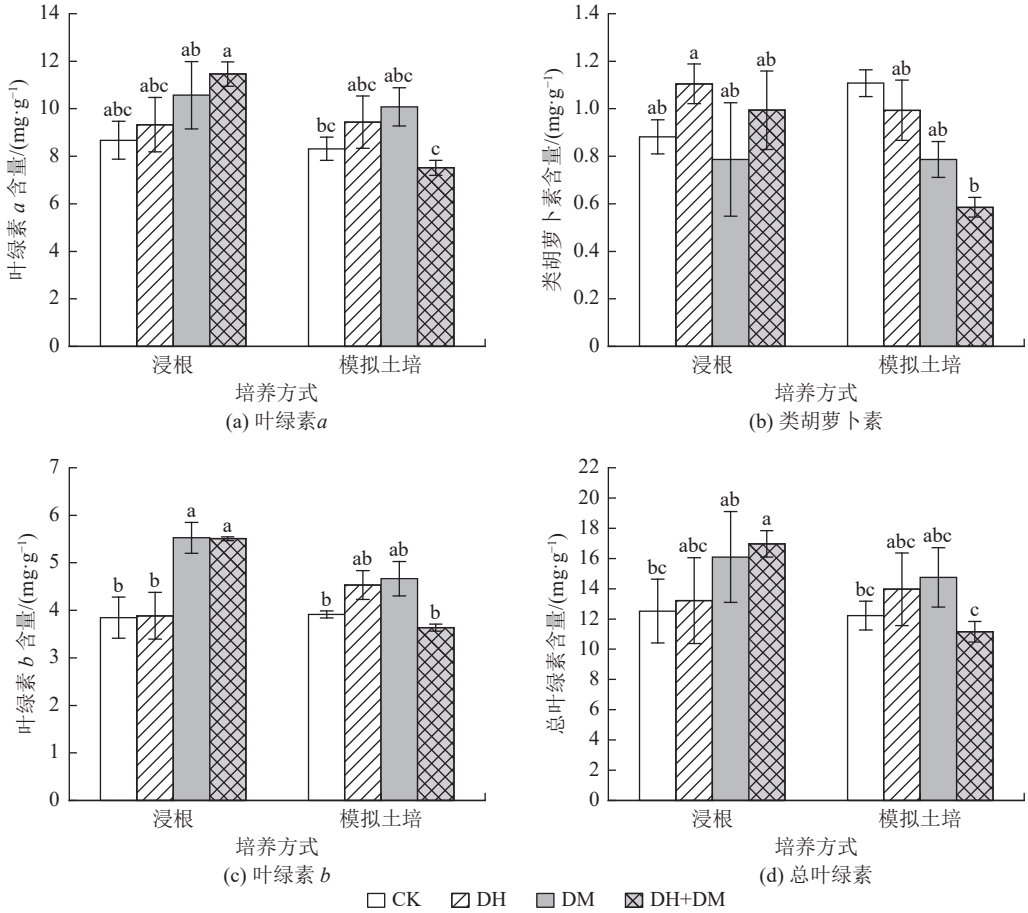


图 3　DSE 及其代谢物对紫花苜蓿的叶绿素含量的影响

Fig.3　Effect of DSE and metabolites on chlorophyll content in *Medicago sativa L.*

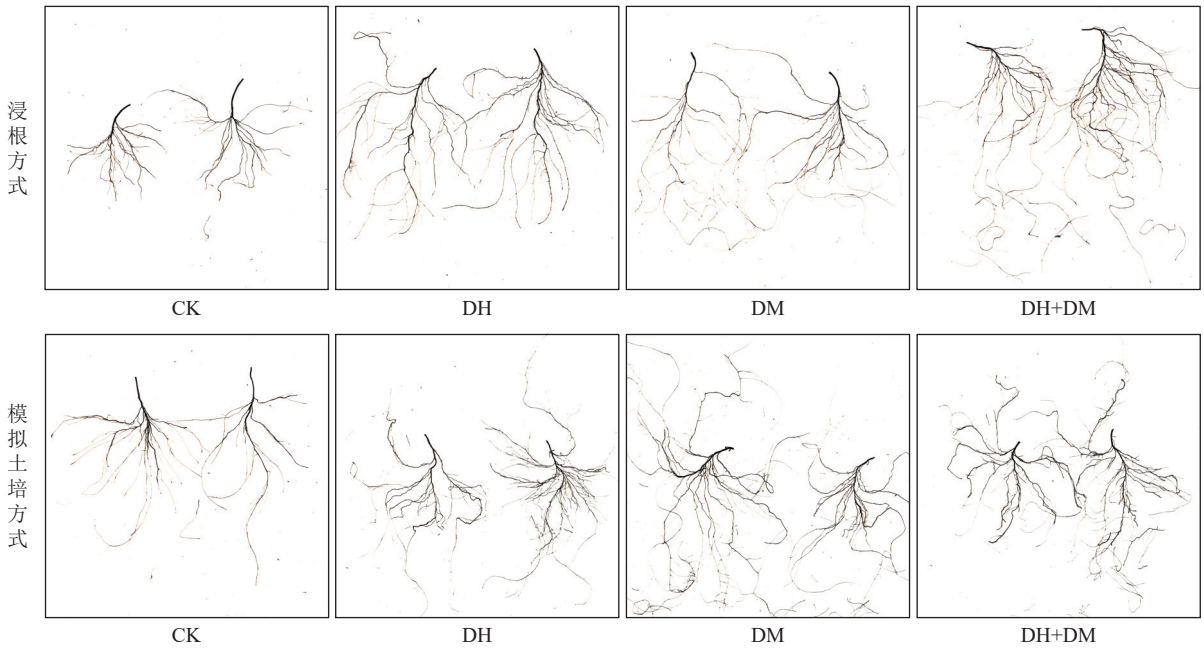


图 4　不同处理下紫花苜蓿根系结构

Fig.4　Root structure of *Medicago sativa L.* under different treatments

生长的共同贡献度为−2.4%，未被这 2 种环境因子解释到的残差为 85.3%(图 7)。说明 2 种环境因子完全独立，两 2 环境因子相比，接种处理是影响紫花苜蓿生长的主要因素。

表 1　DSE 及其代谢物对紫花苜蓿根系构型的影响

Table 1　Effects of DSE and metabolites on root architecture characteristic of *Medicago sativa*

培养方式	处理方式	根系长度/cm	平均直径/mm	根体积/mm^3	表面积/cm^2	投影面积/mm^2	根尖数
浸根	CK	55.49±17.43b	2.36±0.27abc	99.87±19.46b	7.65±2.19a	2.43±0.70a	39.27±8.05b
	DH	88.40±9.48ab	2.32±0.15bc	180.78±31.17ab	12.61±2.20a	4.11±0.70a	66.93±11.15ab
	DM	64.60±1.57ab	2.82±0.25ab	181.52±25.98ab	11.42±1.03a	3.63±0.33a	40.90±1.27b
	DH+DM	76.65±20.19ab	2.88±0.12a	231.82±52.43a	13.98±3.49a	4.45±1.11a	72.27±7.6ab
模拟土培	CK	57.22±4.08ab	2.45±0.02abc	111.91±7.85b	9.47±1.00a	3.01±0.32a	38.83±0.53b
	DH	70.55±2.56ab	2.41±0.11abc	144.43±8.56ab	10.58±0.20a	3.37±0.06a	53.20±7.61ab
	DM	88.17±15.15ab	2.18±0.15c	156.99±44.22ab	12.11±2.70a	3.85±0.86a	88.77±30.19a
	DH+DM	96.07±3.62a	2.07±0.11c	149.94±4.51ab	12.48±0.37a	3.97±0.12a	50.83±3.14ab

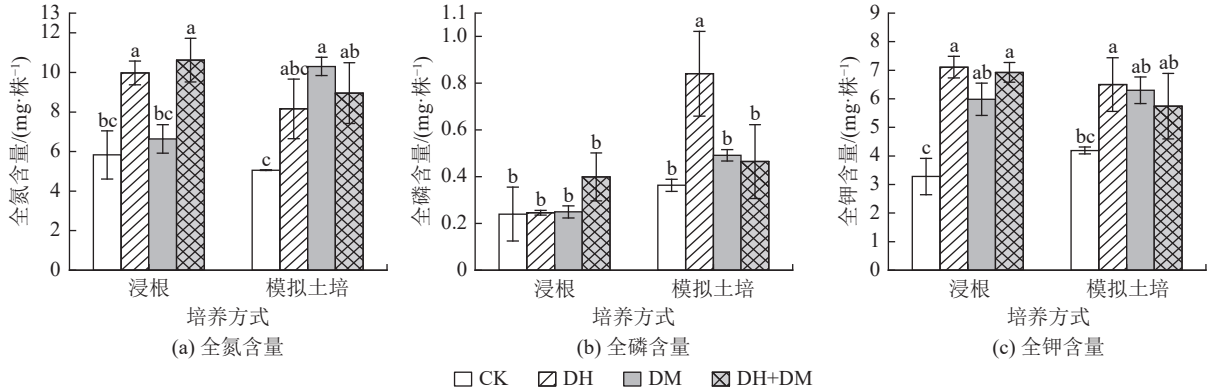


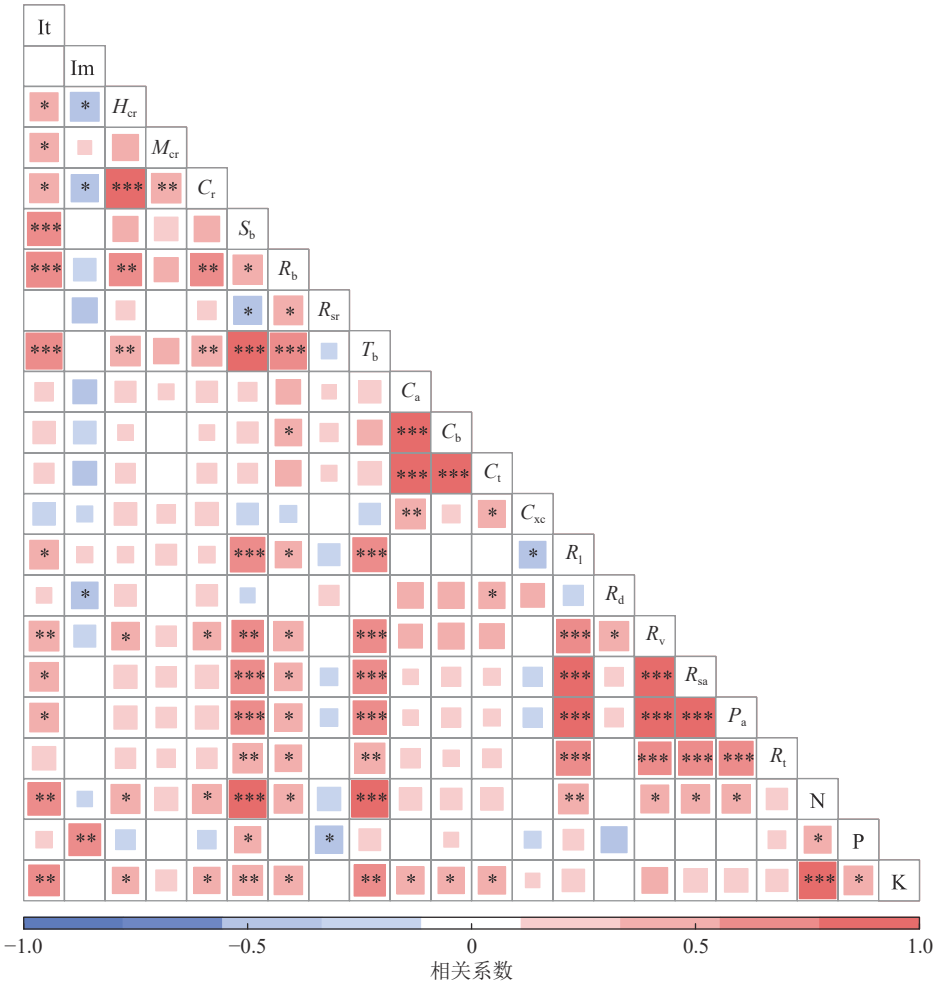
图 5　DSE 及其代谢物对紫花苜蓿养分含量的影响

Fig.5　Effect of DSE and metabolites on the nutrient content of *Medicago sativa L.*

3　讨　　论

煤炭开采过程破坏生态，对土壤、植被生长环境造成扰动，矿区生态环境微生物修复技术的应用，是从生态系统功能和结构修复的角度出发进行生态环境修复的一种可持续发展的方法。紫花苜蓿是矿区植被恢复的先锋植物，其长势参数，地上生物量、株高和植被水分可用于评价矿区复垦效果[32]。研究中添加 DSE 紫花苜蓿根长、根体积、根表面积、根投影面积以及根尖数增加；增加了植物全氮、全磷、全钾含量，增加了植物总生物量。有研究发现 DSE 菌丝可以延伸到根皮层细胞、细胞内以及根维管组织内扩大根的吸收面积，有效促进植物对水分和养分的吸收[33]，DSE 微菌核作为重要的贮藏器官可以积累大量糖原、蛋白质、聚磷酸盐和脂质等营养物质[34]。因此，DSE 在紫花苜蓿根内的定殖促进了表明 DSE 可以促进根系发育，继而扩大根系吸收养分的空间。增加植物对营养元素的吸收，进而促进植物的生长。此外，有研究发现 DSE 代谢物中氨基酸和肽类占总化合物的 36.45%[21]，氨基酸可能是植物氮营养的重要贡献者[35]，植物可以直接吸收氨基酸、酰胺、二肽、三肽和寡肽作为氮源，研究中在不同基质添加 DSE 代谢物紫花苜蓿体内含氮量增加，可能是由于植物吸收了 DSE 代谢物中的氨基酸和肽类物质，促进了紫花苜蓿的生长。

研究中浸根方式接种 DSE 紫花苜蓿根内 DSE 菌丝的定殖率更高，可能是浸根方式可以使菌体富集，能够在根表面看到菌体的缠绕[36]，说明 DSE 菌液浸根幼苗可以快速有效的地促进 DSE 定殖。浸根方式 DH+DM 处理叶绿素含量更高；DH、DH+DM 处理促进根系结构发育以及养分吸收。王淑惠等[37]发现接种鲜样和风干样 DSE 均能在紫花苜蓿根内定殖并促进植物生长，这与研究具有相似的结果。因此 DSE 菌液浸根方式是在西部矿区复垦过程中前期帮助促进幼苗快速生长的有效方式。此外，模拟土培方式接种 DSE 及其代谢物较对照相比根平均直径更细，这与应益山等[38] 的研究结果相似，根系直径越小，其生理功能可能越活跃，DSE 及其代谢物在模拟土培中的添加可能促进了根系吸收水分和养分的活跃程度。相关性分析表明，与接种方式相比，接种处理是影响紫花苜蓿生长的主要因素，无论是浸根方



注：It—接种处理；Im—接种方式；H_{cr}—菌丝定殖率；M_{cr}—微菌核定殖率；C_r—总定殖率；S_b—地上部鲜重；R_b—根鲜重；R_{sr}—根冠比；T_b—总鲜重；C_a—叶绿素 *a*；C_b—叶绿素 *b*；C_t—总叶绿素；C_{xc}—类胡萝卜素；R_l—根长；R_d—根直径；R_v—根体积；R_{sa}—根表面积；P_a—根投影面积；R_t—根尖数；N—全氮；P—全磷；K—全钾；接种方式：固体基质设为 1，液体基质设为 0；*在 0.05 水平 (双侧) 上显著相关；**在 0.01 水平 (双侧) 上显著相关；***在 0.001 水平(双侧)上显著相关。

图 6　接种方式、接种处理和紫花苜蓿侵染率、生理生长指标相关性热图

Fig.6　Heatmap showing correlation between different planting method, inoculation treatment, physiological, biochemical indexes and infection rate of *Medicago sativa L.*

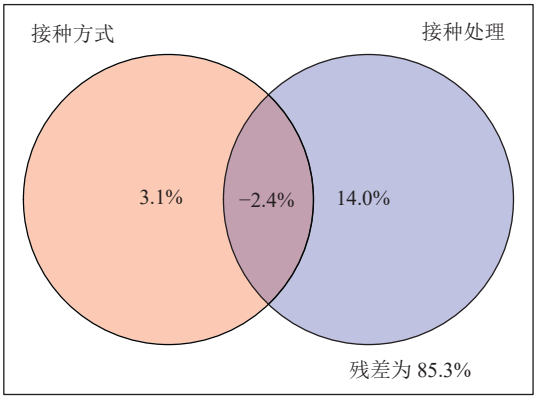


图 7　接种方式和接种处理对紫花苜蓿生长特性的分解分析

Fig.7　Variation partition analysis of different inoculation variation method and inoculation treatment

式还是模拟土培方式接种均能够促进紫花苜蓿的生长，这与郑爱珍等[39]人施用相同微生物菌剂，采用不同接种处理培养番茄均能够促进番茄生长的研究结果一致。

近年来，微生物菌剂因其经济高效、低能耗、不产生二次污染等特点，被广泛应用于矿区生态环境修复领域[40-42]。研究通过室内模拟试验，分析对比了不同方式接种 DSE 及其代谢物的有效性，发现浸根方式接种对紫花苜蓿的生长更有益，DSE 及其代谢物能够有效促进紫花苜蓿幼苗的生理生长，有潜在的生态修复利用价值。研究主要针对于紫花苜蓿幼苗生长情况，对于紫花苜蓿后期生长和矿区实际环境条件下的 (土壤质地、养分、水分、土壤 pH 等) 生长效应有待于进一步观察。

4　结　　论

1) 浸根方式是最有效的接种方式。浸根方式

DSE 以菌丝为主要定殖结构。浸根方式接种 DH+DM 处理对紫花苜蓿的促生效果最好，与对照组相比，地上部鲜重、根鲜重、总鲜重、叶绿素 *b*、总叶绿素、根体积、全氮和全钾含量分别显著增加 83.53%、84.15%、83.78%、43.19%、35.54%、132.12%、82.16%、111.20%。

2) 模拟土培方式 DSE 以微菌核为主要定殖结构。模拟土培方式 DM 处理对紫花苜蓿生长的促进作用最明显，较对照相比，地上部鲜重、根鲜重、总鲜重根尖数、全氮含量分别显著提升 97.37%、88.77%、94.25%、128.61%、103.70%。

3) 相关性分析表明，与接种方式相比，DSE 不同接种处理是影响紫花苜蓿营养成分、生长特性的关键因素。DSE 与其代谢物均能促进紫花苜蓿生长，对于矿区逆境的抗性具有潜在作用，有菌肥开发的潜力。

参考文献(References):

[1] AHIRWAL J, MAITI S K. Development of technosol properties and recovery of carbon stock after 16 years of revegetationon coal mine degraded lands[J]. Catena, 2018, 166: 114−123.

[2] QUADROS P D de, ZHALNINA K, DAVIS-RICHARDSON A G, *et al*. Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil[J]. Applied Soil Ecology, 2016, 98: 195−203.

[3] FENG Y, WANG J, BAI Z, *et al*. Effects of surface coal mining and land reclamation on soil properties: a review[J]. Earth-ScienceReviews, 2019, 191: 12−25.

[4] 张延旭，毕银丽，郭　楠，等. 接种不同丛枝菌根真菌对黄花苜蓿生长影响[J]. 煤炭学报，2019，44(12)：3815−3822.
ZHANG Yanxu, BI Yinli, GUO Nan, *et al*. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of *medicago falcata*[J]. Journal of China Coal Society, 2019, 44(12): 3815−3822.

[5] 李全生. 东部草原区煤电基地开发生态修复技术研究[J]. 生态学报，2016，36(22)：7049−7053.
LI Quansheng. Research on ecological restoration technology of coal-power base in eastern steppe of China[J]. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(22): 7049−7053.

[6] 瞿宋林，吴一凡，刘忠宽，等. 丛枝菌根真菌对紫花苜蓿生长发育特性的影响[J]. 草地学报，2022，30(10)：2529−2534.
QU Songlin, WU Yifan, LIU Zhongkuan, *et al*. Research progress for effects of arbuscular mycorrhizal fungion growth and development of alfalfa[J]. Acta Agrestia Sinica, 2022, 30(10): 2529−2534.

[7] 刘雪强，南丽丽，郭全恩，等. 黄土高原半干旱区种植不同绿肥作物对土壤理化性质的影响[J]. 甘肃农业大学学报，2020，55(1)：145−152.
LIU Xueqiang, NAN Lili, GUO Quanen, *et al*. Effects of planting different green manures on soil physical and chemical properties in semi-arid region of loess plateau[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2020, 55(1): 145−152.

[8] 谢　伟，钱晓彤，王东丽，等. 鄂尔多斯矿区排土场苜蓿恢复地土壤种子库的演变特征[J]. 中国水土保持学，2020，18(4)：29−37.
XIE Wei, QIAN Xiaotong, WANG Dongli, *et al*. Evolution characteristics of soil seed bank during *medicago sativa* restoration in the dump of a mining area in Ordos[J]. Science of Soil and Water Conservation, 2020, 18(4): 29−37.

[9] 秦嘉海，金自学. 黑河流域盐渍土资源及紫花苜蓿改土培肥和生态恢复效应的研究[J]. 土壤通报，2006，37(6)：1106−1109.
QIN Jiahai, JIN Zixue. Salinized soil resources in Heihe watershed and the effects of alfalfa on soil fertility and ecological reestablishment[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2006, 37(6): 1106−1109.

[10] JUMPPONEN A, TRAPPE J M. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi[J]. New Phytologist, 1998, 140(2): 295−310.

[11] XU R B, LI T, SHEN M, *et al*. Evidence for a dark septate endophyte (exophiala pisciphila, H93) enhancing phosphorus absorption by maize seedlings[J]. Plant and Soil, 2020, 452(1/2): 249−266.

[12] LIU Y, WEI X L. Dark septate endophyte improves drought tolerance of ormosia hosiei hemsley & E. H. wilson by modulating root morphology, ultrastructure, and the ratio of root hormones[J]. Forests, 2019, 10(10): 830−842.

[13] MARTINA M G, BALDWIN A H, MAUL J E, *et al*. Dark septate endophyte improves salt tolerance of native and invasive lineages of phragmites australis[J]. The ISME Journal, 2020, 14(8): 1943−1954.

[14] WAEL Y, GABOR M K, PHILIPP F. Differential interaction of the dark septate endophyte cadophora sp. and fungal pathogens in vitro and in planta[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2019, 95(12): fiz164.

[15] YAKHIN O I, LUBYANOV A A, YAKHIN I A, *et al*. Biostimulants in plant science: a global perspective[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 2049−2080.

[16] 徐润冰. 深色有隔内生真菌嗜鱼外瓶霉(*exophiala pisciphila*)促进玉米磷吸收的机制研究 [D]. 昆明：云南大学，2017.
XU Runbing. Effects of the dark septum endophytic fungus *Exophiala pisciphila* on phosphorus uptake in maize [D]. Kunming: Yunnan University, 2017.

[17] HASELWANDTER K, RRAD D J. The significance of a root-fungus association in two *Carex* species of high-alpine plant communities[J]. Oecologia, 1982, 53(3): 352−354.

[18] UPSON R, READ D J, NEWSHAM K K. Nitrogen form influences the response of *Deschampsia antarctica* to dark septate root endophytes[J]. Mycorrhiza, 2009, 20(1): 1−11.

[19] BERTHELOT C, LEYVAL C, FOULONJ, *et al*. Plant growth promotion, metabolite production and metal tolerance of dark septate endophytes isolated from metal-pollutedpoplar phytomanagement sites[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2016, 92(10): 144−175.

[20] TIENAHO J, KARONEN M, MUILU-MAKELA R, *et al*. Metabolic profiling of water-soluble compounds from the extracts of dark septate endophytic fungi (DSE) isolated from scots pine (*pinus sylvestris* L.) seedlings using UPLC-Orbitr-ap-MS[J]. Molecules, 2019, 24(12): 2330.

[21] WANG S H, BI Y L, QUAN W Z, *et al*. Growth and metabolism of dark septate endophytes and their stimulatory effects on plant growth[J]. Fungal Biology, 2022, 126(10): 674−686.

[22] PELLEGRINI M, PAGNANI G, BERNARDI M, *et al*. Cell-free supernatants of plant growth-promoting bacteria: A review of

their use as biostimulant and microbial biocotrol agents in sustainable agricullture[J]. Sustainability, 2020, 12(23): 1−22.

[23] 黄望启, 杨赛奇, 徐开杰, 等. 农杆菌浸根对小麦苗期生理生化特性的影响[J]. 西北农业学报, 2012, 21(9): 45−51.
HUANG Wangqi, YANG Saiqi, XU Kaijie, *et al*. The effect of physiologyical and biochemical characteristics of wheat seedling with *Agrobacterium tumefaciens* soaking rots[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2012, 21(9): 45−51.

[24] TINNA D, GARG N, SHARMA S, *et al*. Utilization of plant growth promoting rhizobacteria as root dipping of seedlings for improving bulb yield and curtailing mineral fertilizer use in onion under field conditions[J]. Scientia Horticulturae, 2020, 270: 109432.

[25] 陈保冬, 于　萌, 郝志鹏, 等. 丛枝菌根真菌应用技术研究进展[J]. 应用生态学报, 2019, 30(3): 1035−1046.
CHEN Baodong, YU Meng, HAO Zhipeng, *et al*. Research progress in arbuscular mycorrhizal technology[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2019, 30(3): 1035−1046.

[26] 毕银丽, 王茁优, 柯增鸣. 叶面涂抹 DSE 菌液对蛋白桑生长发育影响及其生态修复前景 [J]. 煤田地质与勘探, 2023, 51(2): 187−194.
BI Yinli, WANG Zhuoyou, KE Zengming. Effect of foliar application of DSE fungal solution on growth of morus alba and its prospects of ecological restoration application [J]. Coal Geology & Exploration. 2023, 51(2): 187−194.

[27] SHADMANI L, JAMALI S, FATEMI A. Isolation, identification, and characterization of cadmium-tolerant endophytic fungi isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.) roots and their role in enhancing phytoremediation [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2021, 52(3): 1097−1106.

[28] PHILLIPS J M, HAYMAN D S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection[J]. Transactions British Mycological Society, 1970, 55(1): 158−161.

[29] 罗姗姗, 曹　昀, 纪欣圣. 水深对黑藻叶绿素含量和抗氧化酶活性的影响[J]. 生态学杂志, 2019, 38(1): 221−228.
LUO Shanshan, CAO Yun, JI Xinsheng. Effects of water depth on chlorophyll content and antioxidant enzyme activity of *Hydrilla verticillata*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2019, 38(1): 221−228.

[30] 温云杰, 李桂花, 黄金莉, 等. 连续流动分析仪与自动凯氏定氮仪测定小麦秸秆全氮含量之比较 [J]. 中国土壤与肥料, 2015(6): 146−151.
WEN Yunjie, LI Guihua, HUANG Jinli, *et al*. Determination nitrogen in the Kjeldahl digests of plant samples by continuous flow analyzer in comparison with auto mated distillation-titration instrument [J]. Soils and Fertilizers Sciences in China, 2015(6): 146−151.

[31] 何中声, 陈佳嘉, 朱　静, 等. 戴云山南坡不同海拔森林土壤微生物功能多样性特征及影响因素[J]. 生态学报, 2019, 42(9): 3504−3515.
HE Zhongsheng, CHEN Jiajia, ZHU Jing, *et al*. Characteristics of microbial functional diversity and its influencing factors of forest soils at different elevations on the southern slope of Daiyun Mountain[J]. Acta Ecologica Sinica, 2019, 42(9): 3504−3515.

[32] 肖　武, 任　河, 赵艳玲, 等. 无人机遥感支持下的煤矸石山自燃监测与预警[J]. 煤炭科学技术, 2023, 51(2): 412−421.
XIAO Wu, REN He, ZHAO Yanling, *et al*. Monitoring and early warning the spontaneous combustion of coal waste dumps supported by unmanned aerial vehicle remote sensing[J]. Coal Science and Technology, 2023, 51(2): 412−421.

[33] WU F L, QU D H, TIAN W, *et al*. Transcriptome analysis for understanding the mechanism of dark septate endophyte S16 in promoting the growth and nitrate uptake of sweet cherry[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2021, 20(7): 1819−1831.

[34] YU T , NASSUTH A, PETERSON R L. Characterization of the interaction between the dark septate fungus phialocephala fortinii and asparagus officinalis roots [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001, 47(8): 741−753.

[35] CZABAN W, JAMTGARD S, NASHOLM T, *et al*. Direct acquisition of organic N by white clover even in the presence of inorganic N[J]. Plant and Soil, 2016, 407(1/2): 91−107.

[36] 彭　炜, 谭悠久, 黄永春. GFP 标记的多粘芽孢杆菌 1114 在番茄根际的定殖[J]. 中国生物防治, 2010, 26(3): 307−311.
PENG Wei, TAN Youjiu, HUANG Yongchun. Colonization of *gfp* tagged *Paenibacillus polymyxa* strain around tomato roots[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(3): 307−311.

[37] 王淑惠, 毕银丽, 李梦琪. 不同培养期深色有隔内生真菌链格孢菌对紫花苜蓿生长的影响[J]. 菌物学报, 2021, 40(10): 2863−2873.
WANG Shuhui, BI Yinli, LI Mengqi. Effects of dark septate endophyte Alternaria sp. with different culture periods on growth of *Medicago sativa*[J]. Myc osystema, 2021, 40(10): 2863−2873.

[38] 应益山, 杨丽婷, 程建新, 等. 不同生境对苦竹鞭根形态结构及其异速生长的影响[J]. 西北植物学报, 2022, 42(9): 1583−1590.
YING Yishan, YANG Liting, CHENG Jianxin, *et al*. Effect of habitats on the morphological and structural characteristic of rhizome roots of *Pleioblastus amarus* and its allometric growth[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2022, 42(9): 1583−1590.

[39] 郑爱珍, 孟　鑫, 韩　霜, 等. 丛枝菌根真菌对水培番茄生长的影响[J]. 中国瓜菜, 2020, 33(11): 48−51.
ZHENG Aizhen, MENG Xin, HAN Shuang, *et al*. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of hydroponic tomato[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2020, 33(11): 48−51.

[40] 毕银丽, 罗　睿, 柯增鸣, 等. 接菌对根土复合体抗剪拉作用机理及其矿山生态修复潜力[J]. 煤炭科学技术, 2023, 51(1): 493−501.
BI Yinli, LUO Rui, KE Zengming, *et al*. Mechanisms of shear tension resistance of root-soil complexes by inoculated bacteria and potential for ecological restoration in mines[J]. Coal Science and Technology, 2023, 51(1): 493−501.

[41] 毕银丽, 郭　晨, 王　坤. 煤矿区复垦土壤的生物改良研究进展[J]. 煤炭科学技术, 2020, 48(4): 52−59.
BI Yinli, GUO Chen, WANG Kun. Research progress of biological improvement of reclaimed soil in coal mining area[J]. Coal Science and Technology, 2020, 48(4): 52−59.

[42] 张延旭, 毕银丽, 王　瑾. 接种菌根对采煤沉陷区苜蓿生长及土壤改良影响研究[J]. 煤炭科学技术, 2020, 48(4): 142−147.
ZHANG Yanxu, BI Yinli, WANG Jin. Research on effect of arbuscular mycorrhizal fungi on alfalfa growth and soil improvement in mining subsidence area[J]. Coal Science and Technology, 2020, 48(4): 142−147.