

丛枝菌根真菌摩西球囊霉对铜胁迫下白术幼苗光合特性及抗氧化酶活性的影响

杨国¹, 卢可¹, 朱高樑¹, 潘敏昕¹, 董丽佳¹, 罗洁^{2,*}, 莫亿伟^{1,*}

¹绍兴文理学院生命科学院, 浙江绍兴312000

²绍兴文理学院元培学院, 浙江绍兴312000

摘要: 采用盆栽试验, 添加不同浓度(0、200、400 mg·kg⁻¹)铜(Cu), 研究接种丛枝菌根真菌(AMF)摩西球囊霉(*Glomus mosseae*)对白术(*Atractylodes macrocephala*)幼苗生长、光合特性、膜脂过氧化程度及抗氧化酶活性的影响。结果表明: 与对照相比, Cu胁迫使白术幼苗生长和叶片光合系统受到明显抑制, 膜脂过氧化水平升高, 抗氧化酶活性降低; 接种摩西球囊霉后发现其能够较好地侵染白术根系, 接种摩西球囊霉的白术幼苗在不同浓度Cu胁迫下, 均表现为叶片叶绿素 a 、叶绿素 b 和总叶绿素含量增加, 叶片净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、蒸腾速率(T)显著升高, 胞间CO₂浓度(C_i)显著下降, 质膜相对透性(MRP)及膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)含量显著降低; 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性较对照显著增加, 植株生长量和体内Cu积累量较对照均有所下降。以上结果说明接种摩西球囊霉可提高Cu胁迫下白术幼苗叶片光合能力和抗氧化能力, 降低膜脂过氧化水平, 减少白术根系对Cu的吸收, 缓解Cu胁迫对白术植株的伤害, 提高白术产量和品质。

关键词: 丛枝菌根真菌; 摩西球囊霉; 白术; 铜胁迫; 光合特性; 抗氧化酶

白术(*Atractylodes macrocephala*)是菊科苍术属多年生草本植物, 喜凉爽气候, 以根茎入药, 是著名的道地药材, 浙江磐安和新昌、安徽亳州为白术主要产区(段启等2008)。白术药用成分为内酯类和白术多糖, 具有降血糖、抗氧化、抗衰老、利尿、抗炎、抗肿瘤等多方面的药效(Li等2007; Lee等2007)。铜(Cu)是植物正常生长发育所必需的微量元素之一, 但Cu具有积累性, 过量的Cu对植物有毒害作用。近年来中药材的经济效益提升, 农民为了提高产量, 大量使用含各种重金属的农药、化肥和有机肥, 以及生活污水的排放, 导致农田土壤Cu污染日趋严重。土壤Cu污染对中药材生长发育及次生代谢产物的积累产生影响, 进而影响药材质量, 而且对动物、微生物等都产生影响, 直接或间接地威胁到整个生态系统稳定和人类健康(Roy等2009)。目前中药材中重金属超标问题已经引起了广泛的关注, 国际上通常监控5种重金属, 其中之一是Cu。因此, 开展白术生产中防治重金属污染的研究对白术产业健康发展具有重要意义。

丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungus, AMF)分布广泛, 能够侵染90%以上的陆生植物根系形成菌根(Bedini等2007), AMF能够提高作物抗旱性、抗病性, 增强作物对盐碱和污染物毒害的

耐性, 修复退化土壤, 增加产量和改善品质等(赵青华等2014; 孙吉庆等2012), 同时对于缓解重金属胁迫伤害及改善重金属土壤环境具有重要作用(Postma等2007)。目前, 已有较多重金属胁迫下接种AMF对植物膜脂过氧化程度、活性氧的产生以及抗氧化酶活性影响的报道, 王穗子等(2014)发现接种AMF可提高Cu胁迫下海州香薷(*Elsholtzia splendens*)叶片光合色素含量、抗氧化能力, 降低膜脂过氧化水平, 从而缓解Cu胁迫对植株造成的伤害, 增强海州香薷对Cu胁迫的适应性, 提高植株生物量。张美德等(2014)研究发现低浓度的硒处理有利于增强镉(Cd)胁迫下白术幼苗抗氧化能力, 而添加外源AMF对Cu胁迫下白术的影响尚未有人研究。本文探讨了AMF摩西球囊霉(*Glomus mosseae*)对不同浓度Cu胁迫的白术幼苗生长、光合特性、膜脂过氧化程度及抗氧化酶活性的影响, 为白术的科学安全种植和菌根基质开发提供新的实验依据。

收稿 2017-10-09 修定 2018-01-30

资助 国家自然科学基金(31700476)、绍兴市科技计划项目(2015B70023)、绍兴文理学院校级项目(2016LG1006)和浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)项目(2017R428015)。

* 共同通讯作者: 罗洁(lj26wlxy@163.com)、莫亿伟(ywmo@163.com)。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试AMF菌种为摩西球囊霉[*Glomus mosseae* (T. H. Nicolson & Gerd.) Gerd. & Trappe], 用保存在高粱栽培基质中的孢子、菌根根段和菌丝作为接种物, 菌种购于北京农林科学研究院, 菌种编号BGC GZ01A。供试白术(*Atractylodes macrocephala* Koidz.)种子购于浙江新昌县种子有限公司, 进行生理指标测定的药品均为分析纯, 光合特性测定仪器为Li-6400便携式光合测定系统分析仪(Li-COR, USA)。

1.2 试验设计

接种处理: 选择饱满的白术种子浸泡12 h后, 用10% (V/V)双氧水浸泡15 min, 无菌水冲洗干净, 蛭石高温灭菌后冷却填满每个穴盘, 一半的穴盘混入摩西球囊霉菌剂(每个穴孔1 g摩西球囊霉菌剂), 一半的穴盘不加入, 每孔播3粒种子, 出苗后定期浇Hoagland营养液, 待种苗生长40 d后, 选取长势一致的移栽至高温灭菌过的沙壤土基质中, 每盆(内径23 cm、高度17 cm)中装2.0 kg土, pH为5.9, 土壤基质Cu含量为23.38 mg·kg⁻¹, 每盆种植3株白术种苗, 每个处理4盆。

Cu胁迫处理: 使用CuSO₄设计3个Cu胁迫梯度, 浓度分别为0、200、400 mg·kg⁻¹ (DW), 对照处理为不添加Cu和摩西球囊霉(*Gm*), 并设*Gm* (不添加Cu)、Cu1 (200 mg·kg⁻¹ Cu胁迫)、*Gm*+Cu1、Cu2 (400 mg·kg⁻¹ Cu胁迫)、*Gm*+Cu2等几组处理。花盆底部配有托盘, 将流入托盘内的水回浇到盆内, 避免Cu流失, 每5 d浇一次水, 处理60 d后测定相关指标。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 菌根侵染率测定

用FAA固定液(38%甲醛5 mL、冰醋酸5 mL、70%酒精90 mL)固定白术根系24 h以上, 再将根系用蒸馏水洗净后放入小烧杯中, 于10% KOH溶液中90°C下透明处理40~60 min, 在2%盐酸溶液中漂洗5 min, 去掉盐酸后加入酸性品红乳酸甘油染色液(乳酸875 mL、甘油63 mL、蒸馏水63 mL、酸性品红0.1 g)进行染色, 放置90°C水浴锅内30~60 min, 加入乳酸甘油水(1:1:1, V/V/V)混和液中进行脱色处理30 min, 最后将根系剪成1 cm左右的小段,

每个玻片10条根, 竖直平行排列。每个样品30个根段, 计算侵染率(Mcgonigle等1990), 菌根侵染率(%)=侵染根段长度/观察根段长度×100%。

1.3.2 气体交换参数

用Li-6400便携式光合仪于10:00~12:00在充足阳光下随机测定白术叶片的净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、胞间CO₂浓度(C_i)和蒸腾速率(T_r)。

1.3.3 生理指标

选取健康已展开的成熟叶片, 用丙酮比色法测定叶绿素, 包括叶绿素a和叶绿素b; 硫代巴比妥酸法测定丙二醛(malonaldehyde, MDA)含量; 相对电导率法测定质膜透性(permeability of plasma membrane, MRP); 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性用氧化硝基四氮唑蓝法测定; 过氧化氢酶(catalase, CAT)活性用紫外吸收法测定; 过氧化物酶(peroxidase, POD)活性用愈创木酚氧化法测定(陈建勋和王晓峰2015)。

1.3.4 生物量及植株Cu含量测定

植株洗净后, 将其分为地上部分和地下部分, 分别装入纸袋, 105°C杀青20 min, 80°C烘干至恒重。测定地上部分和地下部分重量, 计算总生物量和根冠比(地下部干重/地上部干重)。然后研磨成粉末, 过60目筛, 精确称取白术地上部分和地下部分样品各0.2 g, 加入5 mL酸液(浓硝酸4 mL、高氯酸1 mL)消解, 再用电感耦合等离子体发射光谱仪(Prodigy XP ICP, 美国Leeman公司)测定分样品中Cu含量。

1.3.5 统计分析

试验数据处理和绘图采用Excel和SPSS 20.0完成, 不同处理均值的多重比较为在5%的置信水平上进行最小显著差检验(minimum significant difference test, LSD), 百分数的差异显著性分析经过反正弦转换, 添加Cu和接种摩西球囊霉的交互作用对白术各参数的差异显著性采用SPSS 20.0软件进行一般线性模型(general linear model, GLM)中的双因素方差分析(two-way ANOVA)。

2 实验结果

2.1 Cu胁迫对摩西球囊霉侵染白术根系的影响

如图1所示, 在3个Cu浓度(0、200、400 mg·kg⁻¹)梯度下, 未接种摩西球囊霉的处理(图

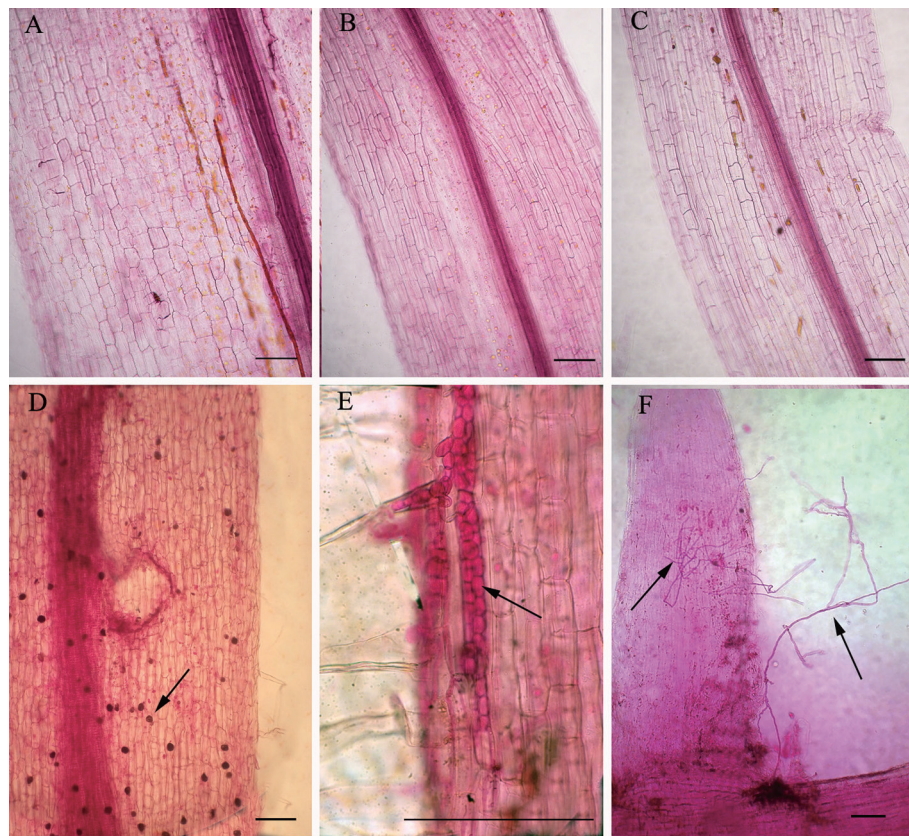


图1 不同处理下摩西球囊霉侵染白术根系的情况

Fig.1 Mycorrhizal colonization of *A. macrocephala* roots under different *G. mosseae* treatments

A: 对照; B: Cu1; C: Cu2; D: *Gm*, 黑色箭头代表摩西球囊霉孢子; E: *Gm*+Cu1, 黑色箭头代表摩西球囊霉泡囊; F: *Gm*+Cu2, 黑色箭头代表根内菌丝和根外菌丝。各比例尺长度均为80 μm 。

1-A~C)均未观察到明显的菌丝和囊泡结构, 侵染率均为0。接种了摩西球囊霉的处理可以观察到孢子、泡囊、胞间菌丝和胞内菌丝(图1-D~F, 黑色箭头所示)。Cu浓度为0时, 接种了摩西球囊霉的白术菌根侵染率为63.1%; Cu浓度为200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 接种了摩西球囊霉的白术菌根侵染率为43.6%; Cu浓度为400 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 接种了摩西球囊霉的白术菌根侵染率为35.3%。可见, 随着Cu胁迫浓度增加, 摩西球囊霉对白术根系的侵染率逐渐下降, 说明Cu胁迫不利于摩西球囊霉的侵染和菌根的发育。

2.2 摩西球囊霉对Cu胁迫下白术叶片叶绿素含量的影响

由表1可知, 在无Cu胁迫时, 接种摩西球囊霉的白术幼苗和未接种的幼苗叶片叶绿素a和叶绿素b含量均无显著差异, 而在200和400 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cu胁迫下, 随着Cu胁迫浓度增加, 白术幼苗叶片叶绿素a和叶绿素b含量显著下降; 同时, 接种摩西球囊

霉的白术幼苗叶片叶绿素a和叶绿素b含量均高于未接种的处理, 在200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cu胁迫下, 接种了摩西球囊霉的与对照相比叶绿素a和叶绿素b分别增加了10.4%和25.2%; 在400 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cu胁迫下, 接种了摩西球囊霉的与对照相比叶绿素a和叶绿素b分别增加了25%和10.5%, 表明Cu胁迫下接种摩西球囊霉可提高叶片叶绿素含量。

经双因素方差分析(表1), Cu处理对植株叶片叶绿素a、叶绿素b、总叶绿素含量变化作用均极显著; 接种摩西球囊霉对叶绿素a、叶绿素b、总叶绿素含量变化影响显著; 而两者的交互作用对叶绿素b含量变化无显著影响, 对叶绿素a和总叶绿素含量变化有显著影响。

2.3 摩西球囊霉对Cu胁迫下白术叶片气体交换参数的影响

由图2可知, 随着Cu胁迫浓度升高, 白术幼苗的 P_n 、 G_s 和 T_r 均随之降低, 而 C_i 增高。在200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

表1 摩西球囊霉对铜胁迫下白术叶绿素含量的影响

Table 1 Effect of *G. mosseae* on chlorophyll content of *A. macrocephala* under copper stress

Cu浓度/mg·kg ⁻¹	处理	叶绿素a含量/mg·g ⁻¹	叶绿素b含量/mg·g ⁻¹	叶绿素总含量/mg·g ⁻¹
0	对照	3.70±0.25 ^a	2.23±0.25 ^a	5.50±0.44 ^a
	<i>Gm</i>	3.37±0.21 ^{ab}	2.17±0.12 ^a	5.53±0.21 ^a
200	Cu1	2.60±0.20 ^c	1.70±0.10 ^b	4.30±0.17 ^b
	<i>Gm</i> +Cu1	2.87±0.32 ^{bc}	2.13±0.15 ^a	5.00±0.40 ^a
400	Cu2	2.00±0.17 ^d	1.33±0.15 ^c	3.33±0.32 ^c
	<i>Gm</i> +Cu2	2.50±0.26 ^c	1.47±0.15 ^{bc}	3.97±0.35 ^b
<i>F</i> 值	Cu	29.34 ^{**}	37.81 ^{**}	48.33 ^{**}
	<i>Gm</i>	6.44 [*]	4.79 [*]	8.62 [*]
	<i>Gm</i> ×Cu	1.04 [*]	3.64	1.87 [*]

同一指标数据用不同小写字母标识表示差异显著($P<0.05$); *表示差异显著($P<0.05$); **表示差异极显著($P<0.05$); *F*值是两均方的比值; ×代表交互作用。下同。

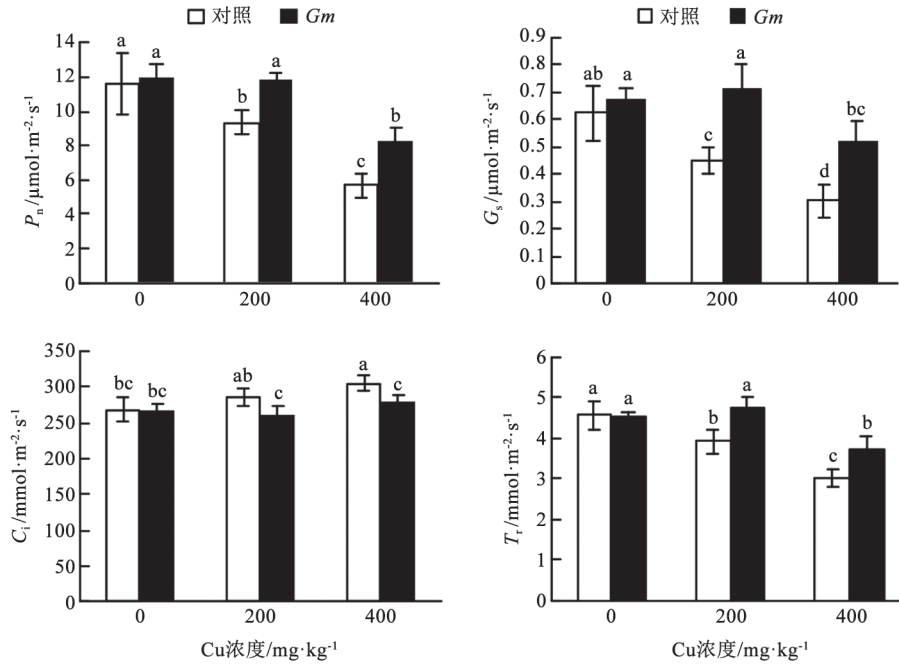


图2 摩西球囊霉对铜胁迫下白术叶片光合气体交换参数的影响

Fig.2 Effect of *G. mosseae* on photosynthetic gas exchange parameters in leaves of *A. macrocephala* under copper stress

Cu胁迫下, 接种了摩西球囊霉的白术幼苗的 P_n 、 G_s 和 T_r 较对照组有显著增加, 分别增加了26.5%、57%、21.8%; C_i 较对照显著降低, 减少了8.7%。在400 mg·kg⁻¹ Cu胁迫下, 接种了摩西球囊霉的白术幼苗的 P_n 、 G_s 和 T_r 较对照组有显著增加, 分别增加了46.4%、70.3%、23.4%; C_i 较对照显著降低, 减少了8.4%。表明接种摩西球囊霉可有效缓解Cu胁迫对于白术叶片光合作用的抑制。

经双因素方差分析(表2), Cu处理对植株叶片

P_n 、 G_s 和 T_r 的作用均极显著, 对植株叶片 C_i 作用显著; 接种摩西球囊霉对 P_n 、 G_s 和 T_r 影响极显著, 对 C_i 作用显著; 而两者的交互作用对 P_n 、 G_s 和 C_i 无显著影响, 仅对 T_r 影响显著。

2.4 摩西球囊霉对Cu胁迫下白术叶片抗氧化能力和质膜相对透性的影响

随着Cu胁迫浓度的增加, SOD、POD和CAT活性显著降低。在200 mg·kg⁻¹ Cu胁迫下, 接种了摩西球囊霉的处理组与对照相比SOD、POD和

表2 摩西球囊霉对铜胁迫下白术光合气体交换参数、抗氧化系统和MRP影响的双因素方差分析

Table 2 Two-way ANOVA of the effect of *G. mosseae* on gas exchange parameters, antioxidant system and MRP of *A. macrocephala* under copper stress

F值	Cu	Gm	Gm×Cu
P_n	42.32**	17.13**	2.76
G_s	17.36**	25.95**	3.93
C_i	6.35*	8.52*	1.97
T_r	31.00**	14.51**	4.28*
SOD活性	100.44**	37.93**	4.34*
POD活性	151.22**	50.38**	2.51
CAT活性	295.38**	38.09**	0.65
MRP	32.05**	9.14*	1.24
MDA含量	82.25**	25.67*	5.58*

CAT活性分别增加了35.2%、22.3%和10.2%；在400 mg·kg⁻¹ Cu胁迫下，接种了摩西球囊霉的处理组与对照相比SOD、POD和CAT活性分别增加了53.2%、38.3%和13.8%，表明Cu胁迫下接种摩西球

囊霉可显著提高叶片抗氧化能力(图3)。经双因素方差分析(表2)，Cu处理对植株叶片SOD、POD和CAT的作用均极显著；接种摩西球囊霉对SOD、POD和CAT影响极显著；而两者的交互作用对POD和CAT无显著影响，但对SOD影响显著。

Cu胁迫处理的白术幼苗叶片的MRP和MDA含量随Cu含量增加而增加，说明Cu易造成细胞膜透性增大，叶片外渗透的电导率增加，接种摩西球囊霉后的白术幼苗叶片质膜透性和丙二醛含量相比与对照下降。在400 mg·kg⁻¹ Cu胁迫下，接种了摩西球囊霉的白术幼苗的MRP和MDA含量降幅分别为12.6%和14.6% (图4)，说明接种摩西球囊霉提高了叶片细胞内的抗氧化能力，从而减轻了Cu胁迫对细胞的伤害。经双因素方差分析(表2)，Cu处理对植株叶片MRP和MDA含量的作用均极显著；接种摩西球囊霉对MRP和MDA含量影响显著；而两者的交互作用对MRP和MDA含量无显著影响。

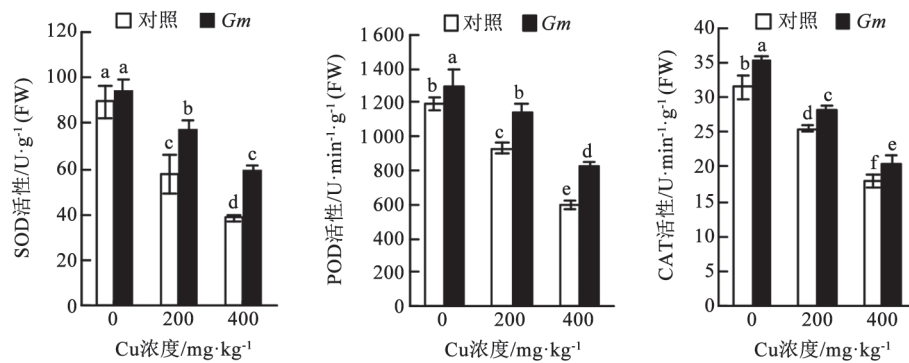


图3 摩西球囊霉对铜胁迫下白术抗氧化系统的影响

Fig.3 Effect of *G. mosseae* on antioxidant system of *A. Macrocephala* under copper stress

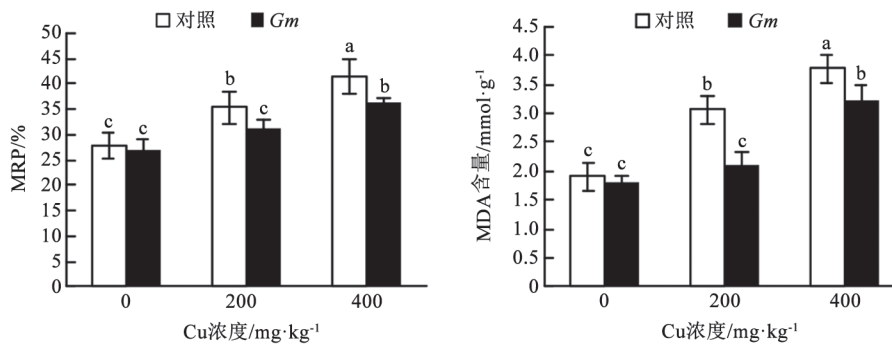


图4 摩西球囊霉对铜胁迫下白术叶片MRP和MDA含量的影响

Fig.4 Effect of *G. mosseae* on MRP and MDA content in leaves of *A. macrocephala* under copper stress

2.5 Cu胁迫条件下接种摩西球囊霉对白术幼苗生物量和Cu含量的影响

由表3可看出, 在没有Cu胁迫时, 接种了摩西球囊霉的白术幼苗与对照相比, 地上部分干重、地下部分干重、总干重均显著增加, 分别增加了17.7%、12.2%和14.6%; 在200 mg·kg⁻¹ Cu胁迫下, 接种了摩西球囊霉的与对照相比, 地上部分干重、地下部分干重、总干重均显著增加, 分别增加了16.2%、20.5%和17.5%; 在400 mg·kg⁻¹ Cu胁迫下, 接种了摩西球囊霉的与对照相比, 地上部分干重、地下部分干重、总干重均显著增加, 分别增加了20.8%、28.6%和22.9%, 表明Cu胁迫下接种摩西球囊霉可显著提高白术的生物量。

随着土壤Cu胁迫浓度增加, 白术地上部分和地下部分的Cu含量都随之增加; 在200 mg·kg⁻¹ Cu胁迫下, 接种了摩西球囊霉的与对照相比, 白术地上部分和地下部分的Cu含量均显著下降, 分别降低了36.5%和38.0%; 在400 mg·kg⁻¹ Cu胁迫下, 接种了摩西球囊霉的与对照相比, 白术地上部分和地下部分的Cu含量均显著下降, 分别降低了31.9%和26.9%, 表明外源Cu胁迫下接种摩西球囊霉可显著降低白术体内的Cu含量。

双因素方差分析表明(表3), Cu处理对白术植株地上部分干重、地下部分干重、植株总干重以及地上部分和地下部分积累的Cu含量的影响均极显著; 接种摩西球囊霉对植株地上部分干重、地下部分干重以及植株总干重的影响也极显著, 同样接种摩西球囊霉对白术地上部分和地下部分积累的Cu含量的影响也极显著; 接种摩西球囊霉和Cu胁迫

交互作用对地上部分干重、地下部分干重、植株总干重及根冠比均不显著, 然而, 接种摩西球囊霉和Cu胁迫交互作用对白术地上部分和地下部分积累的Cu含量的影响极显著。

3 讨论

3.1 摩西球囊霉提高Cu胁迫下白术幼苗叶片光合作用并能促进植株生长

叶绿素是高等植物进行光合作用最重要的色素, 而光合色素含量的降低不利于叶片捕获更多的光能供光合作用所利用。Cu是叶绿素合成有关酶的必不可少的活化剂, 适量的Cu可以提高酶活性, 提高植物光合能力, 而过量的Cu会抑制叶绿素的合成(Burzyński和Kłobus 2004)。本研究发现随着Cu胁迫浓度增加, 白术幼苗叶绿素含量随之降低, 原因可能是过量Cu容易与叶绿体中蛋白质的巯基(-SH)结合, 致使叶绿体蛋白失活, 破坏叶绿体结构, 使叶绿素分解(储玲等2004)。但本研究同时发现, 在Cu胁迫下接种摩西球囊霉后可以显著增加白术叶片的叶绿素含量, 这与王穗子(2015)研究发现一致, 即接种摩西球囊霉可提高Cu胁迫下海州香薷叶片光合色素含量。

Cu胁迫会抑制光合作用从而间接影响植物生长, 光合作用的限制因素主要可分为气孔限制因素和非气孔限制因素, C_i的大小可用于判断光合作用的限制因素是气孔限制还是非气孔因素(Farquhar和Sharkey 1982), 当P_n下降时, C_i和G_s同时下降, 说明影响光合作用能力的主要限制因子是气孔限制, 相反, 当P_n下降同时C_i上升, 说明光合速率下降

表3 摩西球囊霉对铜胁迫下白术幼苗生物量及铜含量的影响

Table 3 Effect of *G. mosseae* on biomass of *A. macrocephala* and copper content under copper stress

Cu浓度/mg·kg ⁻¹	处理	地上部干重/g	地下部干重/g	植株总干重/g	根冠比	地上部Cu含量/ mg·kg ⁻¹ (DW)	地下部Cu含量/ mg·kg ⁻¹ (DW)
0	对照	2.43±0.13 ^b	0.98±0.05 ^b	3.42±0.09 ^b	0.41±0.04	5.20±0.10 ^d	6.15±0.11 ^e
	<i>Gm</i>	2.86±0.30 ^a	1.10±0.03 ^a	3.92±0.29 ^a	0.38±0.05	5.09±0.02 ^d	5.05±0.06 ^e
200	Cu1	1.95±0.05 ^c	0.78±0.03 ^c	2.73±0.08 ^c	0.40±0.01	40.54±0.40 ^b	50.33±0.74 ^c
	<i>Gm</i> +Cu1	2.27±0.06 ^b	0.94±0.04 ^b	3.21±0.03 ^b	0.42±0.03	25.76±0.19 ^c	34.26±0.53 ^d
400	Cu2	1.49±0.07 ^d	0.56±0.05 ^d	2.05±0.11 ^d	0.38±0.02	66.10±0.11 ^a	78.23±0.62 ^a
	<i>Gm</i> +Cu2	1.80±0.10 ^c	0.72±0.03 ^c	2.52±0.10 ^c	0.40±0.03	41.03±0.69 ^b	57.18±0.84 ^b
F值	Cu	69.50 ^{**}	172.77 ^{**}	144.31 ^{**}	0.66	30 717.71 ^{**}	18 118.26 ^{**}
	<i>Gm</i>	25.90 ^{**}	62.28 ^{**}	53.42 ^{**}	0.07	6 918.75 ^{**}	2 263.40 ^{**}
	<i>Gm</i> ×Cu	0.33	2.03	0.05	1.35	2 044.73 ^{**}	500.95 ^{**}

的限制因子是非气孔限制即叶肉细胞光合活性的下降(Hubbard等2001)。本研究发现Cu胁迫下,白术叶片的 P_n 下降、 C_i 反而升高,说明白术叶片光合能力下降主要是由于非气孔限制因素引起的,这与闫明和钟章成(2008)的研究结果一致,即光合活性的降低是导致光合速率下降的主要原因,但是却和Akaya和Takenaka (2001)的研究结果不一致,他们认为铝(Al)胁迫对植株光合作用的影响主要是气孔因素和 CO_2 的固定过程,产生这种矛盾的原因可能和他们的实验材料和实验条件不同有关。此外,我们发现接种摩西球囊霉可有效缓解Cu胁迫对于白术叶片光合作用的抑制,摩西球囊霉对胁迫条件下宿主植物光合能力下降的缓解效应也被其他学者观察到(陈良华等2017),这与菌根促进宿主植物养分平衡和抗氧化能力,以及增加宿主植物光能捕获和光化学效率有关(Chen等2015)。

本研究发现接种摩西球囊霉可以提升白术的生物量,同时可以降低白术植物体内Cu积累量,摩西球囊霉能缓解Cu胁迫带来的伤害,增加宿主植物的抗逆性,促进植物生长,这在很多前人的研究中都得到证实(Xiao等2016; Chen和Zhao 2009),其原因可能是摩西球囊霉与白术形成共生体后,产生了庞大的根外菌丝系统(图1-F)。一方面摩西球囊霉菌丝通过增加分泌球囊霉素,在土壤中形成球囊霉素相关蛋白(GRSP) (Purin和Rillig 2007),与土壤中的Cu结合,并阻止其向根部运输,减少了植物根系对Cu的吸收,减轻了Cu对植株的伤害(Ferrol等2009);另一方面摩西球囊霉增加了白术根部在土壤中的吸收范围,提高了对水分及矿质元素的吸收,从而提高了叶片含水量,有利于气孔进行气体交换,有利于光合作用能力的增强,促进体内有机物的积累,从而提高了植株的生物量。

3.2 Cu胁迫下摩西球囊霉能提高白术幼苗抗氧化酶活性和降低膜脂过氧化程度

在重金属胁迫反应中,植物诱导产生的抗氧化酶(SOD、POD、CAT等)能清除活性氧(ROS),对保护植物起到重要作用(Groppa和Benavides 2008)。正常生长条件下,SOD、POD和CAT等能维持自由基在植物体内产生和清除的动态平衡,从而排除了自由基对植物细胞膜结构潜在伤害的可能性(Lombardi等2005),本试验发现,随着Cu胁迫浓度增加,白术幼苗叶片中的SOD、POD和CAT

活性随之降低,说明Cu胁迫降低了白术叶片抗氧化酶活性。然而,当接种了摩西球囊霉后,我们发现白术幼苗叶片中的SOD、POD和CAT的活性得到明显提高,说明了摩西球囊霉可提高植物体内抗氧化酶的活性,增强植物耐受重金属胁迫的能力。Latef等(2011)研究发现Cu胁迫下接种摩西球囊霉可显著提高辣椒体内抗氧化酶活性,有效缓解膜脂的过氧化伤害。但摩西球囊霉是如何提高白术耐Cu能力的机理方面的研究还需进一步开展。

细胞膜是植物调节细胞内外物质交换和运输的重要结构,Cu胁迫会使植物体内产生大量ROS造成膜脂过氧化,MDA是膜脂过氧化产物,其含量高低反映细胞膜脂过氧化作用强弱和质膜破坏程度(谢明吉等2005)。此外,过量的Cu会与细胞膜蛋白的-SH或磷脂分子层的磷脂类物质反应,造成膜蛋白的磷脂结构改变,致使细胞膜结构改变,膜系统遭受破坏,透性增大,使细胞内一些可溶性物质外渗,从而质膜相对透性增大(Hashem等2016)。本试验中发现Cu胁迫下,白术叶片MDA含量和MRP随着Cu浓度升高而增加,表明了Cu胁迫引起了白术叶片内ROS的增加,打破ROS产生与清除系统的平衡,从而引起膜脂过氧化伤害,而接种后摩西球囊霉的白术MDA含量和MRP较之对照显著下降,说明接种摩西球囊霉可以适当缓解Cu胁迫造成的膜脂过氧化程度。前人从Cu胁迫的根内球囊霉中分离到编码金属硫蛋白相关基因(*GmarMT1*)和缓解根外菌丝过氧化伤害有关的*Gint ABC1*基因(Lanfranco等2002; González- Guerrero等2010),说明摩西球囊霉可能参与调节了某些抗重金属胁迫基因的表达。摩西球囊霉缓解了Cu胁迫下白术叶片膜脂氧化的伤害,这也可能与摩西球囊霉参与调节了某些重金属胁迫基因的表达有关系。

综上所述,Cu胁迫使白术幼苗叶片光合系统受到明显的抑制,膜脂过氧化水平升高,抗氧化酶活性降低,从而导致植株生长量下降。接种摩西球囊霉可提高Cu胁迫下白术叶片的叶绿素含量、光合能力及抗氧化酶活性,降低氧化伤害,减少白术根系对Cu的吸收,缓解Cu胁迫对白术造成的伤害,促进植物生长,提高白术的产量和品质。

参考文献(References)

Akaya M, Takenaka C (2001). Effects of aluminum stress on

- photosynthesis of *Quercus glauca* Thumb. *Plant Soil*, 237 (1): 137–146
- Bedini S, Avio L, Argese E, et al (2007). Effects of long-term land use on arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin-related soil protein. *Agr Ecosyst Environ*, 120 (2–4): 463–466
- Burzyński M, Kłobus G (2004). Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd, and Pb stress. *Photosynthetica*, 42 (2): 505–510
- Chen J, Wang X (2015). *Experimental Guidance on Plant Physiology*. Guangzhou: South China University of Technology Press (in Chinese) [陈建勋, 王晓峰(2015). 植物生理学实验指导. 广州: 华南理工大学出版社]
- Chen L, Hu X, Yang W, et al (2015). The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on sex-specific responses to Pb pollution in *Populus cathayana*. *Ecotox Environ Safe*, 113: 460–468
- Chen LH, Lai J, Hu XW, et al (2017). Effects of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthetic physiology in females and males of *Populus deltoides* exposed to cadmium pollution. *Chin J Plant Ecol*, 41 (4): 480–488 (in Chinese with English abstract) [陈良华, 赖娟, 胡相伟等(2017). 接种丛枝菌根真菌对受镉胁迫美洲黑杨雌、雄株光合生理的影响. *植物生态学报*, 41 (4): 480–488]
- Chen XH, Zhao B (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi mediated uptake of nutrient elements by Chinese milk vetch (*Astragalus sinicus* L.) grown in lanthanum spiked soil. *Biol Fert Soils*, 45 (6): 675–678
- Duan Q, Xu D, Liu C, et al (2008). Research progress of *Arctyloides macrocephala*. *Chin Tradit Herb Drugs*, 39 (5): 800–802 (in Chinese) [段启, 许冬谨, 刘传祥等(2008). 白术的研究进展. *中草药*, 39 (5): 800–802]
- Farquhar GD, Sharkey TD (1982). Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol*, 33: 317–345
- Ferrol N, González-Guerrero M, Valderas A, et al (2009). Survival strategies of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Phytochem Rev*, 8 (3): 551–559
- González-Guerrero M, Benabdellah K, Valderas A, et al (2010). *GintABC1*, encodes a putative abc transporter of the MRP subfamily induced by Cu, Cd, and oxidative stress in *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza*, 20 (2): 137–146
- Groppa MD, Benavides MP (2008). Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids*, 34 (1): 35–45
- Hashem A, Allah EFA, Alqarawi AA, et al (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate salt stress in lupine (*Lupinus termis* Forsik) through modulation of antioxidant defense systems and physiological traits. *Legume Res*, 39 (2): 198–207
- Hubbard RM, Ryan MG, Stiller V, et al (2001). Stomatal conductance and photosynthesis vary linearly with plant hydraulic conductance in ponderosa pine. *Plant Cell Environ*, 24 (1): 113–121
- Lanfranco L, Bolchi A, Ros EC, et al (2002). Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Physiol*, 130 (1): 58–67
- Latef AAHA (2011). Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and copper on growth, accumulation of osmolyte, mineral nutrition and antioxidant enzyme activity of pepper (*Capsicum annum* L.). *Mycorrhiza*, 21 (6): 495–503
- Lee JC, Lee KY, Son YO, et al (2007). Stimulating effects on mouse splenocytes of glycoproteins from the herbal medicine *Atractylodes macrocephala* Koidz. *Phytomedicine*, 14 (6): 390–395
- Li CQ, He LC, Dong HY, et al (2007). Screening for the anti-inflammatory activity of fractions and compounds from *Atractylodes macrocephala* Koidz. *J Ethnopharmacol*, 114 (2): 212–217
- Lombardi L, Sebastiani L (2005). Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Sci*, 168 (3): 797–802
- McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, et al (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*, 115 (3): 495–501
- Postma JWM, Olsson PA, Falkengren-Grerup U (2007). Root colonisation by arbuscular mycorrhizal, fine endophytic and dark septate fungi across a pH gradient in acid beech forests. *Soil Biol Biochem*, 39: 400–408
- Purin S, Rillig MC (2008). The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: limitations, progress, and a new hypothesis for its function. *Pedobiologia*, 51 (2): 123–130
- Roy DN, Mandal S, Sen G, et al (2009). Superoxide anion mediated mitochondrial dysfunction leads to hepatocyte apoptosis preferentially in the periportal region during copper toxicity in rats. *Chem-Biol Interact*, 182 (2–3): 136–147
- Sun JQ, Liu RJ, Li M (2012). Advances in the study of increasing plant stress resistance and mechanisms by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol J*, 48 (9): 845–852 (in Chinese with English abstract) [孙吉庆, 刘润进, 李敏(2012). 丛枝菌根真菌提高植物抗逆性的效应及其机制研究进展. *植物生理学报*, 48 (9): 845–852]
- Wang S, Jin Z, Li Y, et al (2015). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on the photosynthetic pigment Contents, anti-oxidation capacity and membrane lipid peroxidation of *Elsholtzia splendens* leaves under copper stress. *Acta Ecol Sin*, 35 (23): 7699–7708 (in Chinese with English abstract) [王穗子, 金则新, 李月灵等(2015). 铜胁迫条件下AMF对海州香薷光合色素含量、抗氧化能力和膜脂过氧化的影响. *生态学报*, 35

- (23): 7699–7708]
- Xiao JX, An J, Chen YY, et al (2016). Improved growth and Cu tolerance of Cu excess-stressed white clover after inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. *J Plant Nutr*, 39 (2): 227–234
- Xie M, Ke W, Wang W, et al (2005). MDA accumulation and antioxidation capacity of two *Elsholtzia splendens* populations under copper stress. *Chin J Ecol*, 24 (8): 935–938 (in Chinese with English abstract) [谢明吉, 柯文山, 王万贤等(2005). 铜胁迫下两种海州香薷的膜脂过氧化水平及抗氧化能力比较. *生态学杂志*, 24 (8): 935–938]
- Yan M, Zhong ZC (2008). Effects of aluminum stress on photosynthesis of *Cinnamomum camphora* seedlings inoculated with AMF. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 28 (9): 1816–1822 (in Chinese with English abstract) [闫明, 钟章成(2008). 铝胁迫对接丛枝菌根真菌樟树幼苗光合作用的影响. *西北植物学报*, 28 (9): 1816–1822]
- Zhang MD, Ai LQ, He YS, et al (2014). Effects of selenium on antioxidant ability of *Atractylodes macrocephala* Koidz. under cadmium stress. *J Southern Agr*, 45 (7): 1211–1214 (in Chinese with English abstract) [张美德, 艾伦强, 何银生等(2014). 硒对镉胁迫下白术抗氧化能力的影响. *南方农业学报*, 45 (7): 1211–1214]
- Zhao QH, Sun LT, Wang Y, et al (2014). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen regimes on plant growth, nutrient uptake and tea quality in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Plant Physiol J*, 50 (2): 164–170 (in Chinese with English abstract) [赵青华, 孙立涛, 王玉等(2014). 丛枝菌根真菌和施氮量对茶树生长、矿物质元素吸收与茶叶品质的影响. *植物生理学报*, 50 (2): 164–170]
- Zhu L, Liu D, Wang Y, et al (2004). Effect of copper pollution on seedling growth and activate oxygen metabolism of *Trifolium pratense*. *Chin J Appl Ecol*, 15 (1): 119–122 (in Chinese with English abstract) [储玲, 刘登义, 王友保等(2004). 铜污染对三叶草幼苗生长及活性氧代谢影响的研究. *应用生态学报*, 15 (1): 119–122]

Effect of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on photosynthesis and antioxidation enzyme activities in *Atractylodes macrocephala* seedlings under copper stress

YANG Guo¹, LU Ke¹, ZHU Gao-Liang¹, PAN Ming-Xin¹, DONG Li-Jia¹, LUO Jie^{2*}, MO Yi-Wei^{1*}

¹Academy of Life Science, Shaoxing University, Shaoxing, Zhejiang 312000, China

²Yuanpei College, Shaoxing University, Shaoxing, Zhejiang 312000, China

Abstract: Pot experiments were conducted to investigate effect of arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Glomus mosseae* inoculations and copper ion (Cu) additions (0, 200 and 400 mg·kg⁻¹) on seedling growth, photosynthetic characteristics, lipid peroxidation and antioxidation enzyme activities in *Atractylodes macrocephala*. Results show that, compared to the control, Cu stress significantly inhibited growth and photosynthetic system of *A. macrocephala*, inhibited membrane lipid peroxidation and decreased activities of antioxidant enzymes. AMF colonized roots of *A. macrocephala* very well. For AMF inoculated seedlings, copper stress increased contents of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and total chlorophyll, net photosynthetic rate (P_n), stomatal conductance (G_s), transpiration rate (T_r), and activities of superoxide dismutase (SOD), superoxide dismutase (POD) and catalase (CAT); decreased intercellular CO₂ concentration (C_i), relative permeability of plasma membrane (MRP) and malondialdehyde (MDA) content. In addition, plant biomass and Cu accumulation in plant were significantly decreased compared to the control. It was suggested that inoculation of AMF effectively alleviates damage of Cu stress on *A. macrocephala* by increasing photosynthetic ability and antioxidant capacity of *A. macrocephala* seedlings, and reducing membrane lipid peroxidation and Cu absorption by root system, thus adaptability to Cu stress and improved productivity and quality of *A. macrocephala* is being achieved.

Key words: arbuscular mycorrhizal fungus; *Glomus mosseae*; *Atractylodes macrocephala*; copper stress; photosynthetic characteristics; antioxidation enzyme

Received 2017-10-09 Accepted 2018-01-30

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31700476), Shaoxing Science and Technology Project (2015B70023), Shaoxing University Project (2016LG1006), and Xinmiao Talents Program of Zhejiang Province (2017R428015).

*Co-corresponding authors: Luo J (lj26wlyx@163.com), Mo YW (ywmo@163.com).