

罗璇, 黄国辉, 姚平, 等. 外源丛枝菌根真菌对低温胁迫下蓝莓幼苗抗氧化系统的影响[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 909-913.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.04.028

# 外源丛枝菌根真菌对低温胁迫下蓝莓幼苗抗氧化系统的影响

罗璇, 黄国辉, 姚平, 王东来, 鞠方成, 赵凤军

(辽东学院农学院/辽东学院小浆果研究所, 辽宁 丹东 118003)

**摘要:** 本研究通过筛选得到4种菌根真菌(硬皮马勃属 *Scleroderma* sp.、牛肝菌属 *Boletus* sp.、鬼伞菌属 *Coprinus* sp.、口蘑属 *Tricholoma* sp.), 分别采用菌液浇施的方法接种蓝莓幼苗, 接种90 d后进行菌根侵染率调查并进行低温胁迫处理。结果表明, 4种菌根真菌均可以侵染蓝莓幼苗, 其中以接种 *Coprinus* sp. 处理的侵染率最高, 接种 *Tricholoma* sp. 处理的侵染率最低。2个蓝莓品种的幼苗接种不同菌根真菌后, 在低温胁迫下其超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)的活性总体高于对照, 其中以接种 *Boletus* sp. 处理的蓝莓幼苗表现最好, 接种 *Scleroderma* sp. 处理和接种 *Coprinus* sp. 处理也在一定程度上提高了蓝莓幼苗的酶活性, 接种 *Tricholoma* sp. 处理对蓝莓幼苗酶活性的影响最小。

**关键词:** 蓝莓幼苗; 丛枝菌根真菌; 低温胁迫; 抗氧化系统

中图分类号: S663.903.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2017)04-0909-05

## Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on antioxidant systems in the *in vitro* branch of blueberry under low temperature stress

LUO Xuan, HUANG Guo-hui, YAO Ping, WANG Dong-lai, JU Fang-cheng, ZHAO Feng-jun

(College of Agriculture/Small Fruit Institute, Eastern Liaoning University, Dandong 118003, China)

**Abstract:** Four kinds of mycorrhizal fungi were inoculated in the seedlings of blueberry to investigate the colonization and the influence on low temperature-stressed *in vitro* branches 90 days later. All four mycorrhizal fungi colonized in blueberry *in vitro* branches; *Coprinus* sp. showed the highest colonization rate, and *Tricholoma* sp., the lowest. Under low temperature stress, the activities of SOD, POD and CAT were increased in mycorrhizal fungi-inoculated blueberry; the highest enzymes activities were presented in *Boletus* sp. treated blueberry, and the lowest, in *Tricholoma* sp..

**Key words:** blueberry seedling; arbuscular mycorrhizal fungus; low temperature stress; antioxidant system

蓝莓, 学名越橘, 杜鹃花科越橘属(*Vaccinium*) 多年生灌木, 是一个既古老又新兴的果树树种。蓝莓为浅根系植物, 根系不发达, 无明显主根, 无根毛,

根系主要分布在浅土层, 吸收能力较差<sup>[1-2]</sup>。在自然条件下以蓝莓为代表的杜鹃花类植物与菌根真菌形成一种共生的特殊菌根结构, 即杜鹃花类菌根, 也称为欧石楠类菌根(ERM), 可以解决蓝莓根系由于没有根毛造成的水分和养分吸收困难等问题。有报道指出, 欧石楠类菌根具有促进杜鹃花类植物对营养的吸收, 增强宿主植物对环境胁迫的抗性, 促进植株生长等作用<sup>[3-6]</sup>。菌根真菌对蓝莓植株的生长发育和营养吸收有很好的促进作用。肇莹等<sup>[7]</sup>的研究结果表明, 内生真菌能够显著促进蓝莓植株的生长。高丽霞等<sup>[8]</sup>认为, 菌根真菌均可不同程度地侵染免

收稿日期: 2017-03-31

基金项目: 辽宁省农业领域青年科技创新人才培养计划项目(2014010); 中央财政农业科技推广示范项目(GCNTLN13); 辽东学院重点培育项目(2016ZD005); 辽宁省教育厅一般项目(L2014535)

作者简介: 罗璇(1980-), 女, 辽宁丹东人, 博士, 讲师, 主要从事小浆果植物与微生物的互作研究。(Tel) 18241565209; (E-mail) luoxuannema@163.com

眼蓝莓根系,并且能显著促进免眼蓝莓的生长。许庆龙<sup>[9]</sup>指出,丛枝菌根(AM)真菌尤其是摩西球囊霉接种处理可以提高蓝莓品种薄雾在干旱条件下的保水能力。增强植物对生态环境胁迫的抵抗能力有助于植物的生长发育,而温度是制约植物生长发育的重要因子,低温胁迫影响经济作物产量的事例常有报道,因此提高植物对低温胁迫的抗性一直是科研工作者研究的焦点<sup>[10]</sup>。进入新世纪以来,中国蓝莓种植业发展迅猛,其中尤以东北地区更为明显,但由于东北地区冬季气温偏低,露地栽培的蓝莓需要采取土埋等方法越冬,耗费人力财力,近年来针对菌根真菌提高植物抗寒性的研究常有报道<sup>[11-14]</sup>,而针对菌根真菌提高蓝莓幼苗抗寒性的研究却鲜有报道。

通过分离辽宁地区蓝莓菌根真菌,得到28株菌根真菌,并通过初步筛选,获得4株较优良的菌株:硬皮马勃属 *Scleroderma* sp.、牛肝属 *Boletus* sp.、鬼伞属 *Coprinus* sp.、口蘑属 *Tricholoma* sp.。本研究拟将初步筛选出的4株真菌接种于蓝莓幼苗中,研究其在低温胁迫条件下的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性的变化,旨在通过研究接种不同菌根真菌的蓝莓幼苗在低温条件下的酶活性变化,评估真菌对蓝莓耐寒性的积极效应,以期在寒冷地区越冬方式的改变及育苗的应用提供参考方法和理论依据。

## 1 材料与方法

试验于2015年在辽东学院园艺实训基地和辽东学院园艺实验室进行。

### 1.1 供试宿主植物

蓝莓一年生组培苗由丹东瀚林蓝莓有限公司提供,品种为丹东地区主栽品种蓝丰和瑞卡。

### 1.2 供试菌根真菌

供试菌根真菌为硬皮马勃属 *Scleroderma* sp. (LD012)、牛肝属 *Boletus* sp. (LD020)、鬼伞属 *Coprinus* sp. (LD023)、口蘑属 *Tricholoma* sp. (LD037),菌种取自辽东地区蓝莓根部,通过形态学鉴定来初步鉴定其属。对4种菌根真菌进行平板培养,将生长活力良好的菌落取出,分别配置成1 ml 500个孢子的菌悬液。菌根真菌培养繁殖采用平板培养法<sup>[15]</sup>。

### 1.3 供试基质

试验基质为沙壤土:草炭土:珍珠岩=6:3:1(体积比),均匀混合后在高压蒸汽灭菌锅(0.11

MPa、121℃)中灭菌2h,放置备用。

## 1.4 试验设计

1.4.1 接种 2015年5月在辽东学院园艺实训基地进行盆栽试验,选择生长一致的蓝丰和瑞卡一年生组培苗,单株种植于装有试验基质的10 cm×10 cm的培养钵内,在种植后24 h内将LD012、LD020、LD023、LD037的菌悬液接种到盆栽蓝莓组培幼苗根际周围,每株接种菌悬液20 ml。每个品种设5个处理,分别为对照(CK)、接种LD012处理(T1)、接种LD020处理(T2)、接种LD023处理(T3)、接种LD037处理(T4),随机区组排列,每个小区30株,每个处理重复3次,水肥管理按照常规方法统一进行。待接种90 d时,测定接种蓝莓种苗根部的菌根侵染率<sup>[16]</sup>。

1.4.2 菌根侵染率的测定 蓝莓菌根真菌侵染情况的测定采用改良的醋酸墨水染色法<sup>[17-18]</sup>,此方法无毒、成本低且方便显微观察<sup>[19]</sup>。采用菌根分级标准进行统计<sup>[20]</sup>,按照公式(1)计算每个处理试验样品的菌根侵染率:

$$\text{侵染率}(\%) = \frac{\text{菌根真菌侵染根段数}}{\text{观察总根段数}} \quad (1)$$

1.4.3 低温胁迫处理 从每个处理中随机抽取一定数量的蓝丰和瑞卡苗木,取其地上部进行低温胁迫处理。将每个处理幼嫩的带叶枝条剪成3 cm长的小段,用无菌水冲洗干净,并将每个处理均匀分成5份,分别放入5℃、0℃、-5℃、-10℃、-15℃的冰箱中进行低温胁迫处理<sup>[12]</sup>。处理24 h后,测定各项指标。

蓝莓幼苗中超氧化物歧化酶的提取及活性测定采用氮蓝四唑(NBT)法<sup>[21]</sup>,过氧化物酶的提取及活性测定按照李合生<sup>[22]</sup>的方法进行,过氧化氢酶的提取及活性测定依照邹奇<sup>[23]</sup>的方法进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 蓝莓幼苗菌根侵染率

表1显示,4种真菌均可侵染蓝莓幼苗,其中以T3处理下的侵染率最高,对蓝丰和瑞卡幼苗的侵染率分别达49.62%和64.81%,明显高于对照的菌根真菌侵染率,T1处理和T2处理下的侵染率也均达到43.67%以上,T4处理下的侵染率较低,对蓝丰和瑞卡幼苗的侵染率分别为36.98%和27.39%,但也远远高于对照,说明接种外源菌根真菌提高了蓝莓幼苗菌根真菌的侵染率。

表 1 蓝莓幼苗的菌根侵染率

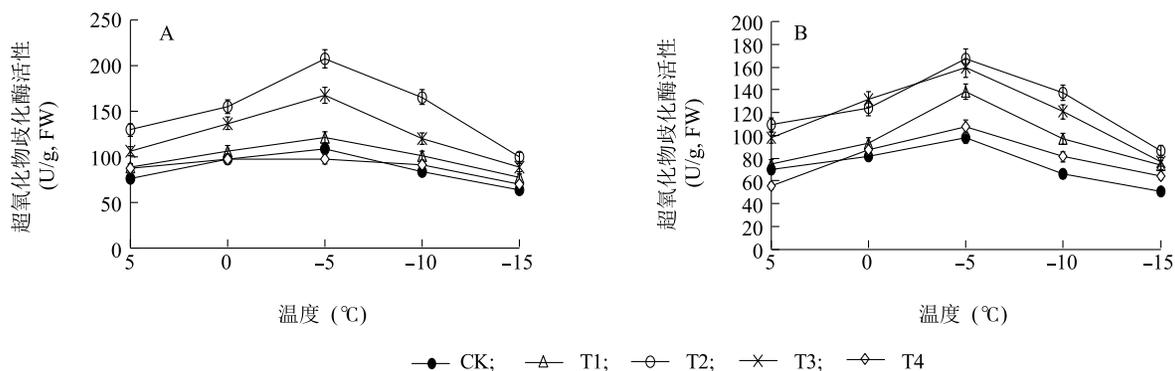
Table 1 The mycorrhizal fungi colonization rate in the seedlings of blueberry

处理	侵染率 (%)	
	蓝丰	瑞卡
CK	5.77	8.04
T1	57.26	43.67
T2	50.16	53.54
T3	49.62	64.81
T4	36.98	27.39

CK:对照;T1:接种 *Scleroderma* sp.(LD012)处理;T2:接种 *Boletus* sp.(LD020)处理;T3:接种 *Coprinus* sp.(LD023)处理;T4:接种 *Tricholoma* sp.(LD037)处理。

## 2.2 低温胁迫对蓝莓幼苗超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

与对照相比,接种不同的菌根真菌后,低温胁迫下2个蓝莓品种幼苗的SOD活性均有增加的趋势。



A: 蓝丰; B: 瑞卡。CK、T1、T2、T3、T4 见表 1 注。

图 1 蓝莓幼苗超氧化物歧化酶活性变化

Fig.1 Changes of SOD activity in the seedlings of blueberry

## 2.3 低温胁迫对蓝莓幼苗过氧化物酶(POD)活性的影响

图 2 显示,随着温度的降低,供试蓝莓幼苗 POD 活性均呈先上升后下降的趋势。POD 活性的最大值出现在-5 °C 低温胁迫下。当温度下降到-5 °C 时,T2、T3 和 T4 处理蓝丰幼苗的 POD 活性上升到 145.9 U/g、117.8 U/g 和 125.4 U/g,与对照相比分别增加了 49.9%、21.1% 和 28.9%,而 T1 处理的 POD 活性与对照相比增加了 5.7%。同样的低温胁迫下,在 T2 和 T3 处理瑞卡幼苗表现较好,POD 活性上升到 139.3 U/g 和 111.8 U/g,与对照相比分别增加了 64.9% 和 32.3%,而 T1 和 T4 处理瑞卡幼苗

T1 处理和 T4 处理的 SOD 活性增加的幅度均不大,与对照相比,T1 处理瑞卡幼苗在-5 °C 低温胁迫下的 SOD 活性增加了 40.9%,低于 T2 和 T3 处理的增加幅度(70.6%、62.3%)。在-5 °C 的低温胁迫下,T2 处理蓝丰幼苗的 SOD 活性与对照相比增加了 89.7%,说明在-5 °C 的低温胁迫下,菌根真菌处理后的植株对低温胁迫产生了一定抗性。在-10 °C 的低温胁迫下,对照和各处理蓝莓幼苗的 SOD 活性均呈下降趋势,但各处理的 SOD 活性仍高于对照,说明在此温度下,植物细胞均受到不同程度的冻害,但接种菌根真菌的植株根系仍然对-10 °C 的低温有一定抗性。在-15 °C 的低温胁迫下,对照和各处理的 SOD 活性都急剧下降,各处理的 SOD 活性并没有高于对照太多,说明在-15 °C 的低温胁迫下,接种菌根真菌对蓝莓幼苗耐寒性的影响不大(图 1)。

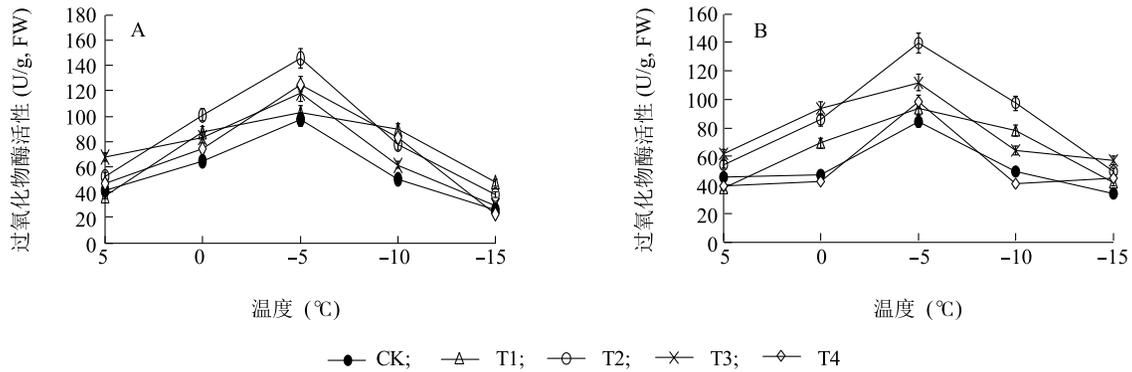
的 POD 活性与对照相比仅增加了 16.2% 和 10.9%。当温度降低至-10 °C 时,对照和各处理下蓝莓幼苗的 POD 活性均呈下降趋势,当温度降至-15 °C 时,POD 活性急剧下降,表明植株已经受到低温冻害,导致植株细胞内自由基的清除和产生失衡<sup>[24]</sup>。

## 2.4 低温胁迫对蓝莓幼苗过氧化氢酶(CAT)活性的影响

图 3 显示,随着温度的下降,各处理 CAT 活性均呈缓慢下降的趋势。T3 和 T4 处理的蓝丰和瑞卡幼苗的 CAT 活性与对照差别不大,甚至略低于对照。T1 和 T2 处理的蓝丰和瑞卡幼苗在低温胁迫下 CAT 活性明显比对照高,尤其是在-5 °C 的低温条件

下,与对照相比,蓝丰幼苗的 *CAT* 活性分别增加了 44.4%和 68.2%,瑞卡幼苗的 *CAT* 活性分别增加了 19.2%和 52.1%。在-15 °C低温胁迫下,*CAT* 活性

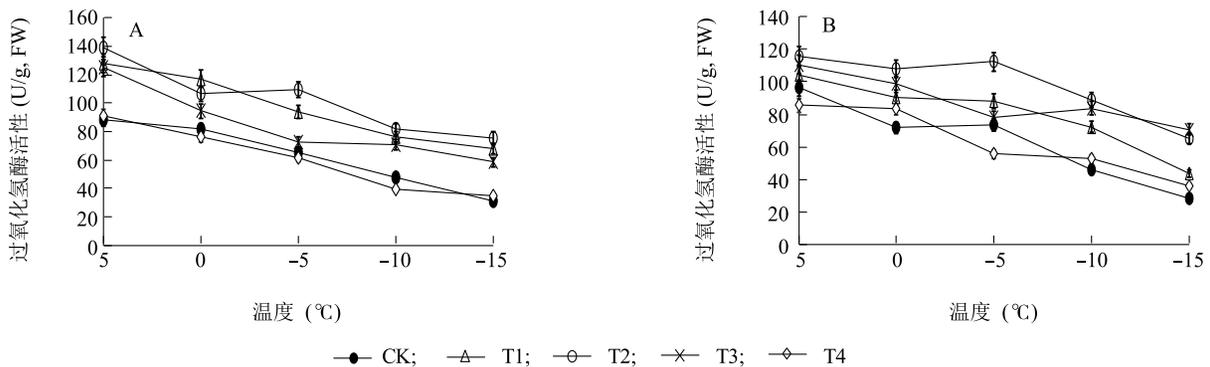
下降明显,说明植株细胞受到冻害,自由基产生和清除的平衡已经受到破坏。



A: 蓝丰; B: 瑞卡。CK、T1、T2、T3、T4 见表 1 注。

图 2 蓝莓幼苗过氧化物酶活性变化

Fig.2 Changes of *POD* activity in the seedlings of blueberry



A: 蓝丰; B: 瑞卡。CK、T1、T2、T3、T4 见表 1 注。

图 3 蓝莓幼苗过氧化氢酶活性变化

Fig.3 Changes of *CAT* activity in the seedlings of blueberry

### 3 讨论

植物受到冻害的根本原因是植株的细胞膜系统受到低温伤害。在低温条件下,植物的细胞膜透性、氧化酶、同工酶、可溶性蛋白等指标与植株的抗寒能力显著相关<sup>[25]</sup>。马德华等<sup>[26]</sup>研究发现,在低温胁迫条件下,耐寒性弱的黄瓜品系 *SOD* 活性明显降低,而耐寒性强的黄瓜品系 *SOD* 活性呈上升状态。韩冰等<sup>[27]</sup>指出,黄瓜幼苗接种 AM 真菌后,在低温条件下黄瓜的叶片可通过提高抗氧化酶的活性来增强适应性。郭绍霞等<sup>[28]</sup>指出,接种菌根真菌能显著提高彩

叶草叶片中 *SOD* 酶的活性,提高植株对低温的抗性。

本研究结果表明,与对照相比,接种菌根真菌后,在 5~-10 °C 的低温胁迫下短期内提高了其离体茎段 *SOD*、*POD* 和 *CAT* 的活性,增强对活性氧的清除能力,蓝莓幼苗耐寒性有不同程度的提高,且不同蓝莓品种间差别较小。T2 处理的蓝丰和瑞卡幼苗的 *SOD*、*POD* 和 *CAT* 的酶活性提高最为显著,T1 和 T3 处理的蓝莓幼苗的酶活性也有提高,而 T4 处理对蓝莓幼苗的影响最小,可能是较低的菌根侵染率影响了蓝莓幼苗抗寒性的提高。本研究选取的均为北高丛蓝莓品种,适合在中国北方栽培,具有一定的

抗寒性,而在-15℃低温条件下,接种不同菌根真菌对蓝莓幼苗酶活性的影响并无明显差别,说明在该温度下,植株细胞已经受到冻害,菌根真菌对蓝莓幼苗耐寒性的影响不足以抵抗-15℃的低温。

本研究只是根据离体茎段低温处理后的 *SOD*、*POD* 和 *CAT* 这 3 个抗氧化系统酶活性指标来确定植株的抗寒性,获得结果与以往的研究结果基本一致,但由于木本植物株型较大,处理可能还会受根系影响,加上其他相关指标未能测得,所以菌根真菌可以提高蓝莓幼苗抗寒性的结论还需进一步验证。

### 参考文献:

- [1] 谢兆森, 吴晓春. 蓝莓栽培中土壤改良的研究进展[J]. 北方果树, 2006(1): 1-4.
- [2] 和 阳, 杨 巍, 刘 双, 等. 蓝莓栽培中土壤改良的方法及作用[J]. 北方园艺, 2010(14): 46-48.
- [3] BOUGOURE D S, CAIRNEY J W G. Chitinolytic activities of ericoid mycorrhizal and other root-associated fungi from *Epacris pulchella* (*Ericaceae*) [J]. *Mycological Research*, 2006, 110(3): 328-334.
- [4] HOBBIIE J E, HOBBIIE E A, DROSSMAN H, et al. Mycorrhizal fungi supply nitrogen to host plants in Arctic tundra and boreal forests: <sup>15</sup>N is the key signal [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2009, 55(1): 84-94.
- [5] CAIRNEY J W G, MEHARG A A. Ericoid mycorrhiza: a partnership that exploits harsh edaphic conditions [J]. *European Journal of Soil Science*, 2003, 54(4): 735-740.
- [6] SMAGULA J M, LITTEN W. Effect of ericoid mycorrhizae isolation on growth and development of lowbush blueberry tissue culture plantlets [J]. *Acta Horticulturae*, 1989, 241: 110-114.
- [7] 肇 莹, 杨 涛, 孙进杰, 等. 一株蓝莓菌根真菌的鉴定及对蓝莓生长的影响[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(3): 400-405.
- [8] 高丽霞, 李 森, 莫爱琼, 等. 丛枝菌根真菌接种对兔眼蓝莓在华南地区生长的影响[J]. 生态环境学报, 2012(8): 1413-1417.
- [9] 许庆龙, 刘晓敏, 徐小兵, 等. 4 种丛枝菌根真菌对南高丛蓝莓抗旱性的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2016, 42(4): 427-434.
- [10] 沈 漫, 王明麻, 黄敏仁. 植物抗寒机理研究进展[J]. 植物学报, 1997, 14(2): 1-8.
- [11] 包亚英, 朱伟玲, 陈 洁, 等. 丛枝菌根真菌对植物抗寒性影响的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(3): 77-79.
- [12] 张林平, 齐国辉, 郭 强. 丛枝菌根真菌对君迁子幼苗生长及抗寒性的影响[J]. 河北果树, 2003(1): 6-8.
- [13] 齐国辉, 杨文利, 张林平, 等. 丛枝菌根真菌对君迁子贮藏营养及抗冻性的影响[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(1): 62-64.
- [14] 刘爱荣, 陈双臣, 刘燕英, 等. 丛枝菌根真菌对低温下幼苗光合生理和抗氧化酶活性的影响[J]. 生态学报, 2011, 31(12): 3497-3503.
- [15] 刘小燕, 屈 艾, 闫晶晶. 不同菌根真菌对蓝莓组培苗移栽成活率和生长的影响[J]. 山东农业科学, 2012, 44(5): 40-44.
- [16] 刘润进, 陈应龙. 菌根学[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [17] 杨亚宁, 巴 雷, 白晓楠, 等. 一种改进的丛枝菌根染色方法[J]. 生态学报, 2010, 30(3): 774-779.
- [18] VIERHEILIG H, COUGHLAN A P, WYSS U, et al. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(12): 5004-5007.
- [19] 盛萍萍, 刘润进, 李 敏. 丛枝菌根观察与侵染率测定方法的比较[J]. 菌物学报, 2011, 30(4): 519-525.
- [20] BIERMANN B, LINDERMAN R G. Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizas: a proposed method towards standardization [J]. *New Phytologist*, 1981, 87: 63-67.
- [21] BEAUCHAMP C, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [J]. *Analytical Biochemistry*, 1971, 44(1): 276-287.
- [22] 李合生. 植物生理生化实验原理与技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [23] 邹 奇. 植物生理生化实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [24] 谢安强, 洪 伟, 吴承祯, 等. 桉树内生菌对尾巨桉幼苗抗寒性的影响[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2011, 40(2): 138-144.
- [25] 简令成. 植物抗寒机理研究的新进展[J]. 植物学报, 1992, 9(3): 17-22.
- [26] 马德华, 孙其信. 温度逆境对不同品种黄瓜幼苗膜保护系统的影响[J]. 西北植物学报, 2001, 21(4): 656-661.
- [27] 韩 冰, 贺超兴, 闫 妍, 等. AMF 对低温胁迫下黄瓜幼苗生长和叶片抗氧化系统的影响[J]. 中国农业科学, 2011, 44(8): 1646-1653.
- [28] 郭绍霞, 马 颖, 李 敏. 丛枝菌根真菌对彩叶草耐寒性的影响[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2009, 26(3): 174-176.

(责任编辑:王 妮)