



# 兰科菌根真菌对铁皮石斛光合性能及 *pepc* 基因表达的影响

魏 明, 余茂元, 柴瑞娟

(安徽工程大学 生物与化学工程学院, 安徽芜湖 241000)

**摘要:**为了阐明兰科菌根真菌对铁皮石斛光合作用的影响及机制,采用盆栽方式研究了兰科菌根真菌对铁皮石斛幼苗生长的影响,并分析了叶片中叶绿素含量、光合参数、叶绿素荧光参数以及 *pepc* 基因表达的变化。结果表明:(1)兰科菌根真菌促进了铁皮石斛幼苗生长,接种兰科菌根真菌的铁皮石斛的株高、根重、茎叶重和总生物量分别是未接种对照组的 1.21、1.54、1.71 和 1.68 倍;而且可显著提高叶片中叶绿素含量、叶片净光合速率( $P_n$ )、蒸腾速率( $G_s$ )和气孔导度( $T_r$ )。(2)接种兰科菌根真菌的铁皮石斛叶片潜在光化学效率( $F_v/F_0$ )、最大光化学效率( $F_v/F_m$ )、光化学猝灭系数( $q_P$ )、非光化学猝灭系数( $q_N$ )、实际光化学反应量子效率(Yield)和表观光合电子传递速率(ETR)均高于未接种对照组。(3)菌根真菌能促进 *pepc* 基因的表达,增强 PEPC 活性,提高铁皮石斛叶片的光合碳同化能力。研究表明,菌根的形成可以提高铁皮石斛叶片光合性能和 *pepc* 基因的表达水平,促进铁皮石斛幼苗的生长。

**关键词:**铁皮石斛;兰科菌根真菌;光合作用; *pepc* 基因表达

中图分类号: Q945.79; Q789 文献标志码: A

## Effect of Orchid Mycorrhizal Fungi on Photosynthetic Characteristics and *pepc* Gene Expression of *Dendrobium officinale*

WEI Ming, YU Maoyuan, CHAI Ruijuan

(College of Biology and Chemistry Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu, Anhui 241000, China)

**Abstract:** In order to find out the impact and mechanism of orchid mycorrhizal (OM) fungi on photosynthesis of *Dendrobium officinale*, we investigated the effect of OM fungi on the growth of *D. officinale* seedlings using a pot experiment. The chlorophyll content, photosynthetic characteristics, chlorophyll fluorescence parameters, and the expression of *pepc* gene were analyzed. The results were as follows: (1) OM fungi could improve the growth of *D. officinale* seedlings. The height of plants, mass of roots, mass of shoots and total biomass of *D. officinale* seedlings were of 1.21, 1.54, 1.71 and 1.68-fold, respectively, compared to control. Chlorophyll content, net photosynthetic rate ( $P_n$ ), stomatal conductance ( $G_s$ ) and transpiration rate ( $T_r$ ) of *D. officinale* seedlings increased too. (2) The potential photochemical efficiency ( $F_v/F_0$ ), photochemical maximum efficiency ( $F_v/F_m$ ), the photochemical quenching coefficient ( $q_P$ ), non-photochemical quenching coefficient ( $q_N$ ), quantum yield of electron transport (Yield) and apparent photosynthetic electron transport rate (ETR) in leaves of *D. officinale* seedlings inoculated with OM fungi were higher than that of control. (3) OM fungi could enhance the expression level of *pepc* gene,

收稿日期: 2018-09-21; 修改稿收到日期: 2018-10-26

基金项目: 安徽省自然科学基金(1408085MC65); 安徽省高校自然基金(2017A101)

作者简介: 魏 明(1969—), 男, 博士, 教授, 主要从事药用植物栽培研究。E-mail: wmrainbow69@126.com

PEPC activity, and promote photosynthetic carbon assimilation of *D. officinale*. Therefore, the development of *D. officinale* mycorrhiza could improve photosynthesis, the expression level of *pepc* gene and the growth of *D. officinale* seedlings.

**Key words:** *Dendrobium officinale*; orchid mycorrhizal fungi; photosynthesis; *pepc* gene expression

光合作用是植物生长发育的重要生理过程,通过研究植物叶片光合参数和叶绿素荧光参数的变化,可以了解植物光合作用与环境因子之间的关系<sup>[1]</sup>。石斛属植物具有景天酸代谢(CAM)途径的特征,其CAM途径的表达与环境变化有关<sup>[2-4]</sup>。磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(Phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)是CAM植物光合碳代谢的源头关键酶,其基因表达量的高低对PEPC活性具有重要影响<sup>[5]</sup>。*pepc*基因是决定CAM植物光合碳同化速率的关键基因,通过研究*pepc*基因的表达,可以进一步明确环境因素对CAM植物光合碳同化的影响。

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)为兰科石斛属植物,是珍稀药用植物<sup>[6]</sup>。铁皮石斛生长缓慢,其原因与该物种的生态环境特征有关,也与根际微生物的形成有关。菌根技术是一种先进的真菌肥料技术,通过菌根技术能提高植物根系吸收水分和营养成分的能力,增强植株的抗逆性,有效提高植株的光合作用,促进植物生长<sup>[7-10]</sup>。在自然界中,绝大多数石斛在生长过程中都能与相应的真菌形成共生关系,彼此互惠互利。研究表明,石斛幼苗接种菌根真菌后,有助于提高石斛幼苗的生理活性<sup>[11]</sup>,提高其成活率,促进石斛幼苗的生长<sup>[12]</sup>,对铁皮石斛的引种驯化具有重要作用。有关菌根真菌对铁皮石斛光合性能以及*pepc*基因表达的影响还鲜有报道。本试验通过接种兰科菌根真菌,探讨菌根真菌对铁皮石斛光合性能以及*pepc*基因表达的影响,以期从光合作用角度阐明菌根真菌促进石斛生长的机制,为石斛的菌根化栽培提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

铁皮石斛无菌苗由安徽工程大学组培基地提供,菌根真菌为本实验室从野生金钗石斛中分离的丝核菌,编号为(OM12),初步鉴定为角菌根菌属(*Ceratobriza*),由本实验室保存;栽培培养基为粉碎的树皮,营养成分为发酵过的豆饼。

### 1.2 接种菌剂的制备和试验设计

将菌根真菌接种在马铃薯和葡萄糖液体培养基

中,28 ℃振荡培养4~6 d,得到液体菌剂备用。试验设计分为接种兰科菌根真菌(OM真菌,+M)和不接种OM真菌作为对照(-M)2种处理,每个处理重复3次。选生长一致的铁皮石斛无菌苗(苗高4 cm左右)为原始试验材料,以盆栽的方式进行培养。栽种之前,盆利用0.1% HgCl<sub>2</sub>消毒10 min,培养基在121 ℃下湿热灭菌30 min,其中培养基含有发酵过的豆饼,树皮和豆饼的比例为7:3。幼苗移栽后开始接种菌根真菌,每隔6 d接种1次,每次接种菌剂10 mL,连续接种3次,培养温度为(25±0.5) ℃,相对湿度为80%,光照强度为300  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。试验在安徽工程大学温室中进行,培养时间2017年4~9月。

### 1.3 生长指标和叶绿素含量测定

参考Biermann和Linderman<sup>[13]</sup>描述的方法鉴定菌根的形成情况。取1 cm左右的根段,漂洗,酸化,染色,脱色等过程,根段有颜色即表示菌根形成。随机选择处理幼苗5株,洗净后去除表面水分,测量每株的株高,分别称取根部和地上部分的质量(以鲜重表示),3次重复取平均值。叶绿素含量采用丙酮酸/乙醇混合液法提取测定<sup>[14]</sup>。

### 1.4 光合作用参数和响应曲线的测定

使用Li-6400便携式光合测定系统(Licok公司美国)测定光合作用指标。测定时的叶室配备LED红蓝光源,叶室光量子通量为300  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,CO<sub>2</sub>浓度为400  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。选择长势一致的叶片(上午9:00~11:00取叶片),每个处理测定3株,每株取5片叶片,每片叶取5个瞬时净光合速率(*P<sub>n</sub>*),仪器同时记录气孔导度(*G<sub>s</sub>*)、胞间CO<sub>2</sub>浓度(*C<sub>i</sub>*)和蒸腾速率(*T<sub>r</sub>*)等参数值。利用Li-6400的曲线测定功能,将红蓝光源设定一系列光合有效辐射强度(PAR)0、50、100、200、400、600、800、1 000  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,在CO<sub>2</sub>浓度为400  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时,测定叶片*P<sub>n</sub>*,绘制*P<sub>n</sub>*-PAR的响应曲线,测定时叶片温度设为25 ℃。再利用Li-6400的曲线测定功能,将CO<sub>2</sub>浓度设为0、50、100、200、400、600、800  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,在光量子通量为300  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时,测定叶片*P<sub>n</sub>*,绘制*P<sub>n</sub>*-CO<sub>2</sub>的响应曲线。

## 1.5 叶绿素荧光参数的测定

采用 Mini-PAM 型便携式叶绿素荧光仪 (WALZ 公司 德国) 测定叶片叶绿素荧光参数。测定时选择长势一致的叶片, 每个处理测定 3 株, 每株取 5 片叶片。每次测定前叶片均经过暗适应 30 min, 测定初始荧光 ( $F_0$ )、最大荧光 ( $F_m$ ), 计算可变荧光  $F_v$  ( $F_v = F_m - F_0$ ), 最大光化学效率 ( $F_v/F_m$ ), 潜在光化学效率 ( $F_v/F_0$ )。打开内源光化光 ( $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), 至稳态后照射远红外光, 测定 PSⅡ实际光化学量子效率 (Yield)、表观光合电子传递速率 (ETR)、光化学淬灭系数 ( $q_p$ ) 和非光化学淬灭系数 ( $q_N$ )。

## 1.6 引物设计、RNA 提取和 cDNA 合成

利用已知的铁皮石斛 *pepc* 基因序列设计定量 PCR 引物 (NCBI 检索登录号为 JF423930)<sup>[15]</sup>, 引物由上海生物工程公司合成, 内参基因为铁皮石斛  $\beta$ -*actin*<sup>[16]</sup>, 引物序列见表 1。利用 RNA 提取试剂盒 (上海生物工程公司) 分别提取铁皮石斛不同生长期的叶片总 RNA。利用反转录试剂盒 (TaKaRa 公司) 进行反转录得到 cDNA 用于基因的特异性表达分析, 方法参照试剂盒说明书。

## 1.7 mRNA 的 RT-PCR 扩增

利用 SYBR Green 试剂盒 (Takara 公司 中国) 进行实时荧光定量 PCR 分析, 在 480 Ⅱ 荧光定量 PCR 仪 (Roche 公司 瑞士) 上进行试验。反应体系 (共 20  $\mu\text{L}$ ): 10  $\mu\text{L}$  SYBR Primix Ex Taq<sup>TM</sup>, 上下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , cDNA 1.0  $\mu\text{L}$ , 用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 20  $\mu\text{L}$ ; RT-PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 65 °C 延伸 30 s, 40 循环, 在 65 °C 延伸步骤收集荧光信号后, 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  进行相对定量分析。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, BOX Chemi XR 凝胶成像仪 (Syngene 英国) 拍照分析。

## 1.8 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 活性测定

根据 PEPC 催化原理, 在 Mg<sup>2+</sup> 存在下, PEPC 把磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 和 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 催化形成草酰乙酸。草酰乙酸和 NADH 在苹果酸脱氢酶的作

表 1 RT-PCR 引物信息

Table 1 RT-PCR primer information

基因 Gene	引物序列 Primer sequences (5'→3')
<i>pepc</i>	TTCTGCCACTACTGAATCGG TGACTGTGTTGGATGTGCTG
$\beta$ - <i>actin</i>	TTAGCTGGTCGTGACCTGACTGAT AAGGGAACCTCTCAGCTCCAATT

用下形成苹果酸和 NAD<sup>+</sup>。通过测定 340 nm 下 NADH 的氧化速率可计算出 PEPC 活力大小。分别取不同生长期的铁皮石斛叶片 0.1 g, 用 Tris-HCl 缓冲液和叶片混合于冰浴中研磨, 在 4 °C 下 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。反应体系: 1 mL 100 mmol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 内含 100 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, pH 9.2, 0.1 mL 40 mmol · L<sup>-1</sup> PEP, 0.1 mL 5 mmol · L<sup>-1</sup> NADH, 过量的苹果酸脱氢酶, 0.1 mL 酶液, 0.1 mL 100 mmol · L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> 启动液, 1.5 mL 蒸馏水, 反应液总体积为 3 mL, 在 25 °C 下保温 10 min, 在 340 nm 处测定吸光值, 每隔 10 s 测定吸光值, 记录吸光值的变化。酶活力定义为: 在测定条件下, 每分钟内每毫升酶液氧化 1  $\mu\text{mol}$  NADH 为一个酶活单位 ( $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )。

## 1.9 试验数据处理与统计分析

应用统计分析软件 SPSS 17.0 进行数据统计分析, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和最小显著差异法 (LSD) 比较不同处理组间的差异, 显著性水平设定在  $\alpha = 0.05$ , 采用 Origin 8.6 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 OM 真菌对铁皮石斛生长的影响

OM 真菌对铁皮石斛生长具有显著的促进作用, 铁皮石斛组培苗接种 OM 真菌后生长比对照组旺盛, 苗色浓绿, 产生新根多。由表 2 可知, 接种 OM 真菌后, 株高、根重、茎叶重和总生物量均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 其中株高、根重、茎叶重和总生物量分别是未接种对照组的 1.21、1.54、1.71 和 1.68 倍。

### 2.2 OM 真菌对铁皮石斛叶片叶绿素含量的影响

光合色素是植物进行光合作用所必需的物质, 其含量高低在一定程度上反映了植物叶片光合作用的强弱。从表 3 可以看出, OM 真菌对铁皮石斛叶片中叶绿素 a、叶绿素 b 以及总叶绿素含量影响显著 ( $P < 0.05$ ), 对类胡萝卜素含量和叶绿素 a/b 值影响不显著。可见, 接种 OM 真菌能显著提高铁皮石斛幼苗叶绿素含量, 提高叶片光合作用, 促进铁皮石斛幼苗的生长。

### 2.3 OM 真菌对铁皮石斛植株光合特性的影响

由表 4 可知, 接种 OM 真菌显著提高了铁皮石斛叶片的  $P_n$ 、 $G_s$  和  $T_r$ , 但对  $C_i$  影响不显著。由光响应曲线 (图 1, A) 可知, 随着光照强度的增大, 铁皮

表 2 OM 真菌处理下铁皮石斛幼苗生长情况

Table 2 The growth of *D. officinale* seedlings with OM fungus treatments

处理 Treatment	株高 Plant height/cm	根鲜重 Fresh weight of roots/g	茎叶鲜重 Fresh weight of shoots/g	总生物量 Total biomass/g
-M	8.6±0.16b	0.28±0.02b	1.65±0.12b	1.93±0.15b
+M	10.4±0.23a	0.43±0.03a	2.82±0.21a	3.25±0.23a

注:表中各列的不同字母表示 0.05 水平差异显著; -M. 未接种 OM 真菌(对照); +M. 接种 OM 真菌; 下同

Note: The same column normal letters in table are significantly different among treatments at 0.05 level; -M. Non-inoculated OM fungi (control); +M. Inoculated OM fungi; The same as below

表 3 OM 真菌处理下铁皮石斛叶绿素和类胡萝卜素含量变化

Table 3 The changes of chlorophyll and carotenoids contents in leaves of *D. officinale* seedlings with OM fungus treatments

处理 Treatment	叶绿素 a Chlorophyll a (mg·g <sup>-1</sup> )	叶绿素 b Chlorophyll b (mg·g <sup>-1</sup> )	叶绿素总量 Total chlorophyll (mg·g <sup>-1</sup> )	类胡萝卜素 Carotenoids (mg·g <sup>-1</sup> )	叶绿素 a/b Chlorophyll a/b
-M	0.694±0.08b	0.314±0.06b	1.008±0.14b	0.335±0.07a	2.21±0.15a
+M	1.476±0.12a	0.682±0.11a	2.158±0.21a	0.346±0.12a	2.16±0.12a

表 4 OM 真菌处理下铁皮石斛叶片光合参数变化

Table 4 The changes of photosynthetic parameters in leaves of *D. officinale* seedlings with OM fungus treatments

处理 Treatment	净光合速率 $P_n$ /(μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> )	气孔导度 $G_s$ /(mmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> )	蒸腾速率 $T_r$ /(mmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> )	胞间 CO <sub>2</sub> 浓度 $C_i$ /(μmol·mol <sup>-1</sup> )
-M	4.162±0.21b	0.153±0.03b	0.765±0.08b	50.64±8.62a
+M	6.724±0.15a	0.275±0.05a	1.124±0.12a	49.16±4.54a

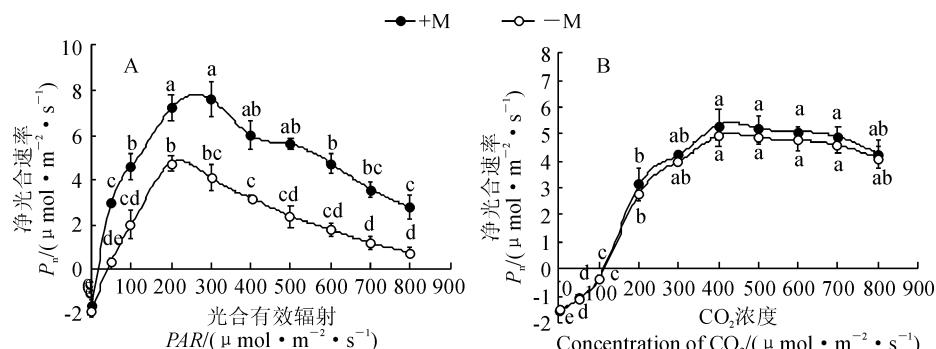
图 1 OM 真菌处理下铁皮石斛叶片的  $P_n$ -PAR 响应曲线(A)和  $P_n$ -CO<sub>2</sub> 响应曲线(B)

Fig. 1 Response curve of the net photosynthetic rate to different photosynthetic photon flux densities (A) and different concentrations of CO<sub>2</sub> (B) in leaves of *D. officinale* seedlings with OM fungus treatments

石斛的  $P_n$  由负值开始不断上升, 随后,  $P_n$  开始下降。在光照强度处于 50~800  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  之间时, 接种 OM 真菌的铁皮石斛叶片始终具有较大的净光合速率, 在光强为 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  时, 净光合速率达到最大, 而未接种组在光强为 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  时, 净光合速率最大。说明接种 OM 真菌增强了铁皮石斛对光强的适应性。由二氧化碳响应曲线(图 1,B)可知, 随着 CO<sub>2</sub> 浓度的升高, 其所对应的  $P_n$  快速上升, 在 CO<sub>2</sub> 浓度达到 400  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  左右时,  $P_n$  达到最大, 并随着 CO<sub>2</sub>

浓度的继续升高缓慢下降。OM 真菌对二氧化碳响应曲线影响不显著, 说明 OM 真菌不影响铁皮石斛对环境 CO<sub>2</sub> 的需求。

## 2.4 OM 真菌对铁皮石斛植株叶绿素荧光参数的影响

从表 5 可以看出, OM 真菌能提高铁皮石斛  $F_m$ 、 $F_v/F_m$  和  $F_v/F_0$  的值, 提高了铁皮石斛 PS II 原初光能转化效率和 PS II 反应中心潜在活性, 能把所捕获的光能高效转化为植物所需的化学能。

图 2 表示  $q_P$ 、 $q_N$ 、Yield 和 ETR 等荧光参数对光

表 5 OM 真菌处理下铁皮石斛叶片部分叶绿素荧光参数比较

Table 5 Comparison of some chlorophyll fluorescence parameters in leaves of *D. officinale* seedlings with OM fungus treatments

处理 Treatment	初始荧光 $F_0$	最大荧光 $F_m$	最大光化学效率 $F_v/F_m$	潜在光化学效率 $F_v/F_0$
-M	308.32±12.65a	1 556.84±24.36b	0.802±0.014b	4.049±0.26b
+M	302.21±16.32a	1 682.64±56.23a	0.820±0.012a	4.568±0.32a

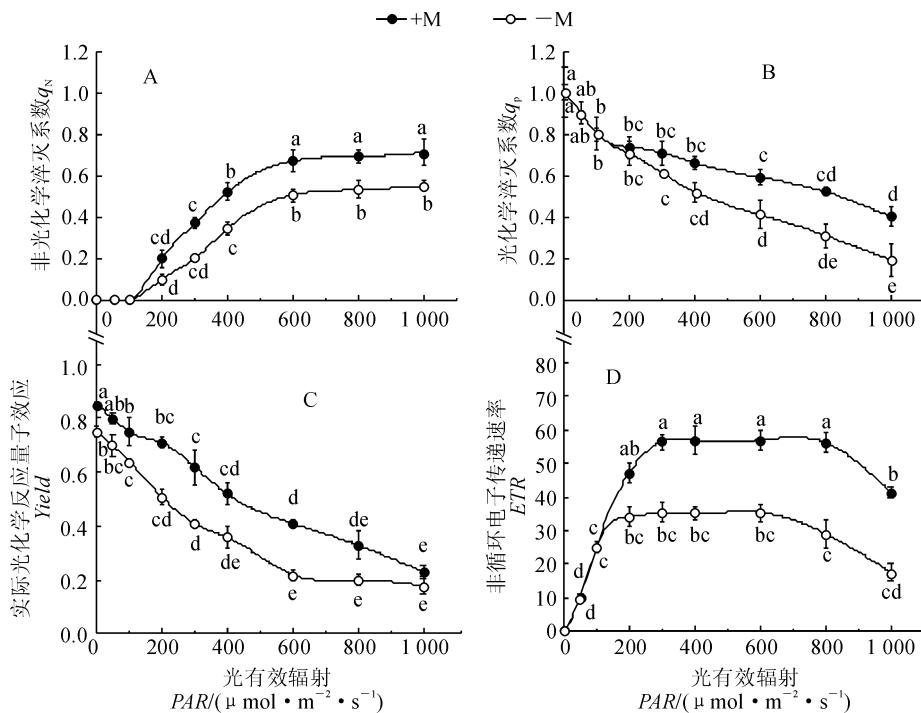


图 2 OM 真菌处理下铁皮石斛叶片叶绿素荧光参数比较

Fig. 2 Comparison of chlorophyll fluorescence parameters in leaves of *D. officinale* seedlings with OM fungus treatments

照强度的响应。由图 2, A 可知,  $q_N$  随着光强的增大而增大, 而  $q_P$  随着光强的增大而降低(图 2, B), 接种 OM 真菌均能提高  $q_P$  和  $q_N$  的值, 进而提高铁皮石斛 PSII 将所捕获的光能转化为化学能的效率, 增强了铁皮石斛耗散过剩的光能为热的能力, 提高光合机构的自身保护能力。图 2, C 显示, Yield 随光强的增大而降低, 在同一光量子通量下, 接种 OM 真菌的铁皮石斛的 Yield 较高, 而对照组较低, 这与上述光化学猝灭系数的结果相对应, 说明 OM 真菌提高了 PSII 光能捕获效率。ETR 随光强变化曲线如图 2, D 所示, 在低光强下, 接种 OM 真菌与对照组铁皮石斛的 ETR 无明显差异, 当光强超过 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  时, 随着光强的增加, 接种 OM 真菌的铁皮石斛的 ETR 增加更快, 在光强为 600  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  时, 对照组受到抑制开始下降, 而接种 OM 真菌组在 800  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  时, 才受到

抑制。可见, 接种 OM 真菌能提高铁皮石斛的 ETR 值, 激发铁皮石斛潜在的光合能力。

## 2.5 OM 真菌对 *pepc* 基因表达的影响

铁皮石斛是 CAM 植物, 由 PEPC 催化固定  $\text{CO}_2$  形成苹果酸。因此 *pepc* 基因表达量的高低对铁皮石斛光合速率具有重要影响, 对铁皮石斛的生长起着决定作用。图 3 表示了铁皮石斛叶片不同生长时期 *pepc* 基因的表达情况, 由图 3 可知, 在铁皮石斛幼苗生长 1 个月时, 接种菌根真菌和对照组 *pepc* 基因表达量差异不大, 随着培养时间的延长, 接种 OM 真菌的叶片 *pepc* 基因表达量显著高于对照组, 说明 OM 真菌能促进 *pepc* 基因的表达。由图 4 可知, 接种 OM 真菌显著提高了 PEPC 活性, 接种 OM 真菌植株的 PEPC 活性变化与接种 OM 真菌植株的 *pepc* 基因表达变化一致, 研究表明, OM 真菌通过诱导 *pepc* 基因的表达提高 PEPC 的活

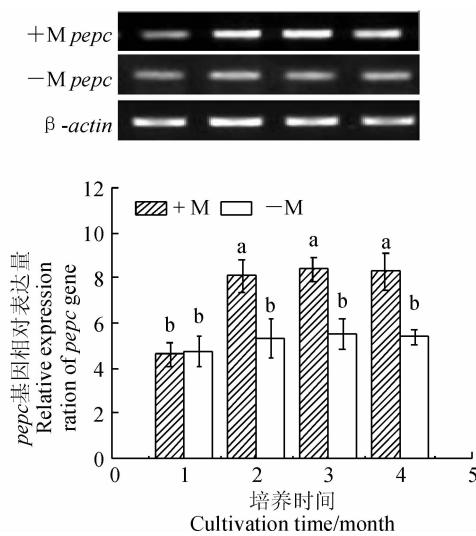
图3 OM真菌处理下铁皮石斛 *pepc* 基因的表达

Fig. 3 Expression of *pepc* gene in leaves of *D. officinale* seedlings with OM fungus treatments

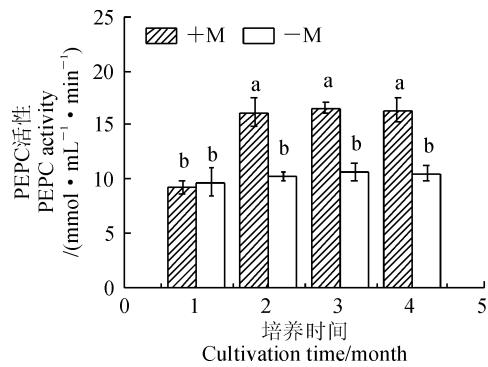


图4 OM真菌处理下铁皮石斛叶片PEPC活性变化

Fig. 4 The changes of PEPC activity in leaves of *D. officinale* seedlings with OM fungus treatments

性,进而提高铁皮石斛叶片光合碳同化能力。

### 3 讨论

光合作用是植物生长的基础,是植物体内重要的生理代谢过程,光合作用的强弱对植物的生长具有重要影响。植物的光合作用受到各种环境因素的影响,如植物受到菌根真菌侵染时,叶片中叶绿素含量、 $P_n$ 、 $G_s$  和  $T_r$  均会发生变化,从而影响植物的光合作用<sup>[17]</sup>。在植物与真菌共生过程中,真菌通过提高植物的光合效率,促进碳水化合物的积累来满足真菌对碳源的需求<sup>[18]</sup>。叶绿素是植物进行光合作用的重要色素,其含量高低反映了植物光合能力的大小<sup>[19]</sup>。本研究结果表明,接种OM真菌能提高铁皮石斛叶片中叶绿素含量,叶片的净光合速率、气孔导度和蒸腾速率,但  $C_i$  变化不明显。OM真菌能够促进叶绿素的合成,提高铁皮石斛的光合能力。叶

片气孔导度升高有利于气体和水分交换,是植物光合作用控制因素之一。铁皮石斛属于CAM植物,其光合碳同化途径在CAM和C<sub>3</sub>途径间转换,强光照射会导致叶片气孔关闭,影响气体交换。在接种OM真菌情况下,铁皮石斛叶片  $G_s$  升高,但  $C_i$  并未降低,导致  $G_s$  升高的原因可能与菌根的形成促进了水分的运转有关,从而有利于菌根苗气体交换<sup>[20]</sup>,促进CO<sub>2</sub>的吸收,使  $C_i$  保持在一定水平,提高植物的光合作用。

叶绿素荧光来自光反应系统(PS II)的天线色素,叶绿素荧光的变化反映了植物的光合生理状况以及多种因素对植物光合作用的影响。如干旱<sup>[21]</sup>和铝<sup>[22]</sup>胁迫降低了植物叶片的叶绿素荧光参数,影响了植物光合性能。菌根真菌能提高植株叶片的叶绿素荧光参数,改善植物光合性能。如杜鹃花菌根真菌能显著提高叶片叶绿素荧光参数,改善杜鹃花幼苗的光合性能,促进杜鹃花幼苗的生长<sup>[23]</sup>。本研究也表明,铁皮石斛幼苗接种菌根真菌后,叶绿素荧光参数有所提高,这与上述前人研究相似。 $F_v/F_m$  和  $F_v/F_0$  值提高,说明PS II的实际光能捕获效率较高,能把所捕获的光能更多地用于光化学反应,增强了植株对有效光的利用,提高植物叶片的净光合速率。 $q_P$ 、Yield 和 ETR 升高有利于提高植物的光能转化效率以及对强光的适应性,为暗反应的光合碳同化积累更多的能量,促进碳同化的高效运转和有机物的积累<sup>[24-25]</sup>。 $q_N$  提高,表明叶片PS II天线色素吸收的光能以热的形式耗散掉的部分较多,对提高自身光合机构的保护具有积极作用,增强了铁皮石斛对环境的适应能力。

铁皮石斛属于CAM植物,随着环境条件的变化,其光合作用在CAM和C<sub>3</sub>途径间变化<sup>[26]</sup>。PEPC是催化CAM代谢途径中固定CO<sub>2</sub>反应的关键酶,因此, *pepc* 基因高表达能提高植株的光合效率。本研究显示,接种OM真菌能促进 *pepc* 基因的表达,提高PEPC的活性,促进光合碳同化。叶片中高PEPC活性可以引起气孔保卫细胞中苹果酸浓度的升高,促进气孔张开,提高叶片光合速率<sup>[27]</sup>,这也可能是  $G_s$  升高的一个原因。铁皮石斛属于喜阴植物,一般不耐强光照射,光响应曲线分析表明,OM真菌增强了铁皮石斛对光强的耐受性,这可能与 *pepc* 基因表达提高了植株对光强耐受性有关<sup>[28]</sup>,具体机制还需进一步研究。

总之,接种OM真菌改善了铁皮石斛的光合性能,促进了 *pepc* 基因的表达,增强了PEPC活性,提

高了铁皮石斛叶片固定CO<sub>2</sub>的能力,促进铁皮石斛生长,提高了铁皮石斛对环境的适应能力。本研究初步确定了OM真菌对铁皮石斛光合作用的影响,

阐明了铁皮石斛 *pepc* 基因的表达特性以及PEPC活性变化规律,为铁皮石斛的菌根化栽培提供了依据。

## 参考文献:

- [1] 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]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, **145**(11): 496-502.
- [2] RITCHIE R J, BUNTHAWIN S. The use of pulse amplitude modulation (PAM) fluorometry to measure photosynthesis in a CAM orchid, *Dendrobium* spp. (D. cv. Viravuth Pink) [J]. *International Journal of Plant Sciences*, 2010, **171**(6): 575-585.
- [3] DODD A N, BORLAND A M, Haslam R P, et al. Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, **53**(369): 569-580.
- [4] WINTER K, HOLTUM J A M. The effects of salinity, crassulacean acid metabolism and plant age on the carbon isotope composition of *Mesembryanthemum crystallinum* L., a halophytic C<sub>3</sub>-CAM species [J]. *Planta*, 2005, **222**(1): 201-209.
- [5] DENG H, ZHANG L S, ZHANH G Q, et al. Evolutionary history of PEPC genes in green plants: Implications for the evolution of CAM in orchids [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2016, **94**(1): 559-564.
- [6] 李玲, 邓晓兰, 赵兴兵, 等. 铁皮石斛化学成分及药理作用研究进展 [J]. 肿瘤药学, 2011, **1**(2): 90-94.  
LI L, DENG X L, ZHAO X B, et al. Advance in studies on chemical constituents in *Dendrobium candidum* and their pharmacological effects [J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2011, **1**(2): 90-94.
- [7] SMITH S E, SMITH F A. Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth [J]. *Mycologia*, 2012, **104**(1): 1-13.
- [8] CHEN J, ZHANG L C, XING Y M, et al. Diversity and taxonomy of endophytic xylariaceous fungi from medicinal plants of *Dendrobium* (Orchidaceae) [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(3): 1-11.
- [9] CHEN X M, DONG H L, HU K X. Diversity and antimicrobial and plant-growth-promoting activities of endophytic fungi in *Dendrobium loddigesii* Rolfe [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2010, **29**(3): 328-337.
- [10] AZAREEL A C, RONALD F C, ALEJANDRO A, et al. Growth and photochemical efficiency of photosystem II in seedlings of two varieties of *Capsicum annuum* L. inoculated with rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi [J]. *Revista Argentina de Microbiología*, 2018, **50**(2): 178-188.
- [11] 魏明, 杨超英, 孔芳, 等. 硝酸镧和兰科菌根真菌对铁皮石斛生理特性的影响 [J]. 西北植物学报, 2015, **35**(2): 309-314.  
WEI M, YANG C Y, KONG F, et al. Effects of lanthanum nitrate and orchid mycorrhizal fungi on physiological characteristic of *Dendrobium officinale* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalis Sinica*, 2015, **35**(2): 309-314.
- [12] 魏明, 杨超英, 李爱军, 等. 硝酸镧和菌根真菌互作对石斛生长和有效成分积累的影响 [J]. 植物生理学报, 2014, **50**(7): 1 059-1 064.  
WEI M, YANG C Y, LI A J, et al. Effects of lanthanum nitrate and orchid mycorrhizal fungi on the growth and active component accumulation in *Dendrobium* [J]. *Plant Physiology Journal*, 2014, **50**(7): 1 059-1 064.
- [13] BIERMAN B, LINDERMANN R G. Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae: a proposed method towards standardization [J]. *New Phytologist*, 1981, **87**(1): 63-67.
- [14] 郝建军, 康宗利, 于洋. 植物生理学实验技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 65-72.
- [15] 曾淑华, 文国松, 徐绍忠, 等. 铁皮石斛磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2012, **43**(4): 766-771.  
ZENG S H, WEN G S, XU S Z, et al. Cloning and expression analysis on phosphoenolpyruvate carboxylase gene in *Dendrobium officinale* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2012, **43**(4): 766-771.
- [16] 张岗, 赵明, 张大为, 等. 铁皮石斛实时定量PCR内参基因的筛选 [J]. 中国中药杂志, 2013, **48**(9): 1 664-1 668.  
ZHANG G, ZHAO M M, ZHANG D W, et al. Reference gene selection for Real-time quantitative PCR analysis of *Dendrobium officinale* [J]. *Chin Pharm J*, 2013, **48**(9): 1 664-1 668.
- [17] 陈笑莹, 宋凤斌, 朱先灿, 等. 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, 2013, **28**(2): 108-113.  
CHEN X Y, SONG F B, ZHU X C, et al. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthetic characteristics in

- maize plants under high temperature stress [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2013, **28**(2): 108-113.
- [18] ANTONIA R M, NESTOR F D S, MIQUEL R C, et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis with arundo donax decreases root respiration and increases both photosynthesis and plant biomass accumulation [J]. *Plant Cell and Environment*, 2017, **40**(7): 1115-1126.
- [19] DAI Y J, SHEN Z G, LIU Y, et al. Effects of shade treatments on the photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence, and chlorophyll content of *Tetragastigma hemsleyanum* Diels et Gilg [J]. *Environmental Experimental Botany*, 2009, **65**(2): 177-182.
- [20] MATHUR S P, SHARMA M, JAJOO A. Improved photosynthetic efficacy of maize (*Zea mays*) plants with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) under high temperature stress [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2018, **180**(3): 149-154.
- [21] MATHOBO R, MARAIS D, STEYN J M. The effect of drought stress on yield, leaf gaseous exchange and chlorophyll fluorescence of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. *Agricultural Water Management*, 2017, **180**: 118-125.
- [22] 郑阳霞,贾松涛,赵英鹏,等. 铅胁迫对西瓜幼苗光合及叶绿素荧光特性的影响[J]. 华北农学报,2015, **30**(4): 150-156.  
ZHENG Y X, JIA S T, ZHAO Y P, et al. Effect of aluminum stress on photosynthetic characteristics and chlorophyll fluorescence parameters of watermelon seedlings [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2015, **30**(4): 150-156.
- [23] 欧 静,何跃军,刘仁阳,等. 杜鹃花类菌根真菌对桃叶杜鹃幼苗光合性能及叶绿素荧光参数的影响[J]. 微生物学通报, 2013, **40**(8): 1423-1436.
- OU J, HE Y J, LIU R Y, et al. Effects of inoculation with different ERM isolates on photosynthesis and chlorophyll fluorescence parameter of *Rhododendron annae* Franch. seedlings [J]. *Microbiology China*, 2013, **40**(8): 1423-1436.
- [24] OUKARROUM A, STRASSER R J, SCHANSKER G. Heat stress and the photosynthetic electron transport chain of the lichen *Parmelina tiliacea* (Hoffm.) Ach. in the dry and the wet state: differences and similarities with the heat stress response of higher plants [J]. *Photosynthesis Research*, 2012, **111**(3): 303-314.
- [25] KLUGHAMMER C, SCHREIBER U. Complementary PSII quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation pulse method [J]. *PAM Application Notes*, 2008, **1**: 27-35.
- [26] 苏文华,张光飞. 铁皮石斛叶片光合作用的碳代谢途径[J]. 植物生态学报, 2003, **27**(5): 631-637.  
SU W H, ZHANG G F. The photosynthesis pathway in leaves of *Dendrobium officinale* [J]. *Acta Phytocenotica Sinica*, 2003, **27**(5): 631-637.
- [27] JIAO D M, HUANG X Q, LI X, et al. Photosynthetic characteristic and tolerance to photo-oxidation of transgenic rice expressing C<sub>4</sub> photosynthesis enzyme [J]. *Photosynthesis Research*, 2002, **72**(1): 85-93.
- [28] 丁在松,周宝元,孙雪芳,等. 干旱胁迫下PEPC过表达增强水稻的耐强光能力[J]. 作物学报,2012, **38**(2): 285-292.  
DING Z S, ZHOU B Y, SUN X F, et al. High light tolerance is enhanced by overexpressed PEPC in rice under drought stress [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2012, **38**(2): 285-292.

(编辑:潘新社)