

菌根真菌感染墨兰与建兰根状茎对呼吸速率和 几种氧化酶活性的影响

潘超美¹ 陈汝民² 李玲²

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510407; 2. 华南师范大学生物系, 广东 广州 510631)

摘要: 用从野生建兰根部分离的菌根真菌 P15 菌株感染墨兰 *Cymbidium sinense* 和建兰 *Cymbidium ensifolium* 的根状茎后, 使寄主的呼吸速率、细胞色素 C 氧化酶、过氧化物酶活性明显增高, 而感染前后 IAA 氧化酶活性变化不明显。两个品种相比较, 建兰根状茎的呼吸速率、细胞色素 C 氧化酶和过氧化物酶活性均比墨兰的高, 但墨兰的根状茎 IAA 氧化酶活性则高于建兰。

关键词: 菌根真菌; 墨兰; 建兰; 根状茎; 氧化酶类; 呼吸速率

中图分类号: Q945.19 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-3395(2002)01-0046-05

Effect of Mycorrhizal Infection on Respiration and Activities of Some Oxidase in Rhizome of *Cymbidium sinense* and *C. ensifolium*

PAN Chao-mei¹ CHEN Ru-min² LI Ling²

(1. College of Pharmacy, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510407, China;

2. Department of Biology, South China Normal University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: Endophytic mycorrhizal fungus P15 isolated from the roots of wild *Cymbidium ensifolium* was used to infect the non-mycorrhizal rhizomes of *C. sinense* and *C. ensifolium*. A marked increase in respiratory rate, cytochrome C oxidase activity, and peroxidase activity was shown in the rhizomes of two infected species, while the change in IAA oxidase activity was slight. The levels of respiratory rate, activities of cytochrome C oxidase and peroxidase in the rhizomes of *C. ensifolium* were all higher than those of *C. sinense* before or after infection, but the IAA oxidase activity showed the contrary.

Key words: Mycorrhizal fungi; *Cymbidium sinense*; *Cymbidium ensifolium*; Rhizome; Oxidases; Respiratory rate

兰科植物是菌根植物, 在自然条件下其胚细胞不能形成酶系统来满足萌发过程的营养所需^[1]。近年来的一些研究结果表明, 菌根真菌能够吸收多种无机和有机化合物满足兰科植物体生长的需要; 菌丝入侵到植物细胞内被同化, 同时真菌菌丝也能激发寄主植物体内的一系列生理变化, 从而促进了寄主植物体内的生理代谢活动^[2]。细胞色素氧化酶是植物体呼吸链中的末端氧化酶, 它调控着植物细胞的呼吸速率, 并直接关系到 ATP 的生成; 而 IAA 氧化酶和过氧化物酶与植物细胞的生长和抗逆性有密切的联系, 一直为研究者所关注^[3-5]。目前有关菌根真菌与兰科植物共生感染后的生理研究报道不多见。本试验以墨兰 (*Cymbidium sinense*) 和建兰 (*C. ensifolium*) 的根状茎为材料, 探讨菌根真菌感染对兰科植物根状茎的呼吸速率和对细胞色素 C 氧化酶、IAA 氧化酶和过氧化物

收稿日期: 2001-03-23 接受日期: 2001-08-20

基金项目: 广东省“九五”重点科技攻关项目(049711961101)

酶活性的影响,为国兰的快速繁殖生产提供部分科学依据。

1 材料和方法

实验材料 由华南师范大学国兰研究中心提供墨兰(*Cymbidium sinense*)无菌根状茎。建兰根状茎从广东新丰县采集野生建兰(*C. ensifolium*)的种子,经无菌培养后获得。根状茎在 $1/2\text{MS}+2\text{ mg L}^{-1}\text{NAA}+2\text{ mg L}^{-1}\text{6-BA}+10\%\text{CM}$ (椰乳)+1%蔗糖的生长培养基中継代培养保存。

菌丝滤液的制备 菌根真菌 P15 号菌株从野生建兰根段上分离、纯化后获得^[6]。把 P15 号菌株接种到含有麦麸 50 g L^{-1} 、葡萄糖 20 g L^{-1} 、 KH_2PO_4 1.5 g L^{-1} 、维生素 B₁ 10 mg L^{-1} 的液体培养基中, 28°C 下,摇床 $100\text{--}120\text{ r min}^{-1}$ 振荡培养两周,待菌丝体充分生长后,将菌丝体取出、捣碎、过滤,滤液备用。

根状茎感染真菌的培养 选取継代培养 30 d、生长旺盛、体积大小较一致的根状茎 2 g,转到含有 3 ml 菌丝滤液和 100 ml 感染培养基 ($1/2\text{MS}+2\text{ mg L}^{-1}\text{NAA}+2\text{ mg L}^{-1}\text{6-BA}+10\%\text{CM}+1\%$ 羧甲基纤维素+0.1%葡萄糖)中, 28°C 自然光照下,摇床 100 r min^{-1} 振荡培养 35 d。每周一次将根状茎转移到不含菌丝滤液的感染培养基,以防止菌丝生长过盛。以未感染的根状茎作为对照。在感染培养开始后,每隔 3 d(后期隔 5 d)取样一次作相关的生理指标分析。

呼吸速率的检测 呼吸速率用 Warburg 微量呼吸测压仪测定^[7]。每个 Warburg 小瓶内放入 1.0 g 鲜重的根状茎,加入 2 ml 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0),小烧瓶内室放置一张吸附了 0.2 ml 20% KOH 的小滤纸,2 h 内每隔 20 min 记录一次读数。测定温度为 25°C 。呼吸速率以每克鲜重的根状茎每小时吸氧的微升数表示。五个重复测定,取平均值。

酶液的提取 准确称取 2.0 g 根状茎置于玻璃研钵上,迅速冷冻($1^\circ\text{C}\text{--}10^\circ\text{C}$)10 min。加入 10 ml 0.1 mol/L, pH7.0 磷酸盐缓冲液,置冰浴中研磨成匀浆,于 4°C 下 $7\ 162\times\text{g}$ 离心 20 min,上清液为粗酶液。

细胞色素 C 氧化酶活性测定 参照陈良碧^[8]的方法,取 10 μl 粗酶液置于 $\phi 1\text{ cm}$ 的比色杯中,加入 0.2 mol/L, pH7.0 的磷酸缓冲液 2.6 ml, 0.04% 细胞色素 C 0.2 ml, 0.4% 二甲基对-苯二胺盐酸溶液 0.1 ml,置 37°C 水浴保温 30 min,立即冰浴冷却。迅速在 510 nm 波长下测定 OD 值的变化。酶活性以 $\text{OD}_{510\text{nm}}\text{ mg}^{-1}\text{FW min}^{-1}$ 表示。每样三个重复,取平均值。

过氧化物酶活性测定 参照张志良^[9]的方法。取粗酶液 10 μl ,置于 $\phi 1\text{ cm}$ 比色杯中,加入反应混合液(0.2 mol/L 磷酸缓冲液 pH6.0 50 ml, 30% H_2O_2 0.028 ml, 愈创木酚 0.019 ml)3 ml,立即开启秒表记录时间,于 470 nm 波长下,读取 1 min 时的 OD 值。以煮沸 5 min 的酶液作对照。每样三个重复。酶活性以 $\text{OD}_{470\text{nm}}\text{ mg}^{-1}\text{FW min}^{-1}$ 表示。

IAA 氧化酶活性的测定 参照张志良^[9]和徐如涓等^[10]的方法。取粗酶液 2 ml,加入 4 ml 冷丙酮,置冰箱中,沉淀过夜后去掉丙酮,用 4 ml 0.02 mol/L 的磷酸缓冲液溶解沉淀。再经 $16\ 114\times\text{g}$ 离心 15 min 后加 3ml 反应试剂(198 $\mu\text{g MnCl}_2$, 163 μg 2,4-dichlorophenol, 200 μg IAA, 用磷酸缓冲液配制), 25°C 下黑暗保温 1.5 h 后,取保温液 0.5 ml,加 2 ml Salkowski 试剂(将 0.135 g FeCl_3 溶解于 50 ml 35%的 HClO_4 中)、同样条件下再放置 30 min,530 nm 比色测定溶液中 IAA 的含量,以煮沸 5 min 的酶液作对照。用每克鲜重材料每小时内分解破坏 IAA 的微克数表示酶活力大小。每样三个重复,取平均值。

2 结果和分析

2.1 菌根真菌对墨兰和建兰根状茎呼吸速率和细胞色素氧化酶活力的影响

无论是否被菌根真菌感染,建兰的呼吸速率要比墨兰高得多(图 1)。与菌根真菌感染的墨兰和建兰根状茎相比(图 1),在感染 30 d 的过程中,对照根状茎呼吸速率变化不大,只在开始缓慢地持续上升,到了第 10 天后趋于较平稳状态。被菌根真菌感染后的根状茎呼吸速率始终高于未感染的对照,分别在第 9 天和第 20 天出现了两个氧吸收的高峰。一般来说,真菌侵染寄主后 10 d 左右,细胞内的菌丝团就开始消解^[1]。在前一实验中,我们观察到 P15 号菌株的菌丝团的初次解体发生在侵染寄主的第 9-11 天之间^[6]。所以,推测第一个高峰出现可能是寄主细胞内菌丝团开始消解的时候,由于菌丝团在寄主细胞内解体,释放出能被寄主细胞利用的营养物质,从而刺激了寄主细胞的物质代谢,使呼吸速率产生跃升。菌丝团消解后的细胞可以再次被相邻的菌丝重新感染,在细胞内又形成新的菌丝团,一段时间后菌丝团再次解体;或者也可能是其它感染区域的细胞群的菌丝团解体使呼吸速率再次跃升,即出现在 20 d 时的高峰。

细胞色素 C 氧化酶是植物呼吸链中的末端氧化酶,位于线粒体膜中,催化将电子从细胞色素 C(cyt C)传到 O_2 的反应,在控制电子传递中起着很重要的作用。从图 2 看出,真菌感染过程中,墨兰和建兰根状茎的细胞色素 C 氧化酶活性皆提高,表明感染后的共生体系比未感染前的根状茎本身具有更强的代谢能力。两个品种比较,未感染建兰的细胞色素 C 氧化酶活性高于墨兰的活性,但从感染后的变化幅度看,墨兰酶活性的增值幅度为 33%-150%,平均增加比率为 91%;而建兰的增值幅度为 26.8%-82%,平均增加比率为 39.6%。从整个培养过程来看,酶活性呈持续升高趋势,在第 9 天出现高峰,以后缓慢下降,到 20 d 时再次出现高峰,这与呼吸速率的变化基本一致。

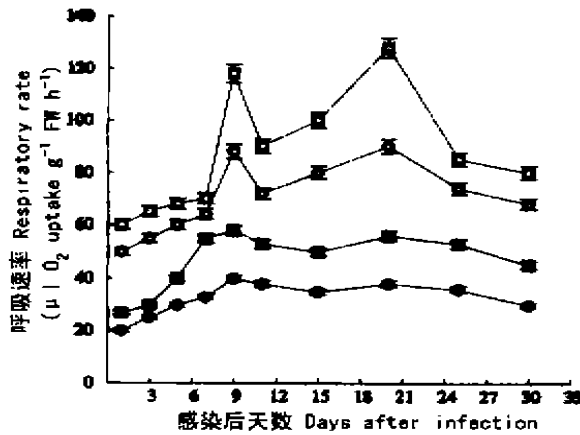


图 1 菌根真菌感染后两种兰花根状茎呼吸速率的变化

Fig. 1 Changes in respiratory rate of *C. sinense* and *C. ensifolium* rhizomes after mycorrhizal infection

■ 未感染建兰 Uninfected *C. ensifolium*; □ 感染后建兰 Infected *C. ensifolium*;
● 未感染墨兰 Uninfected *C. sinense*; ○ 感染后墨兰 Infected *C. sinense*

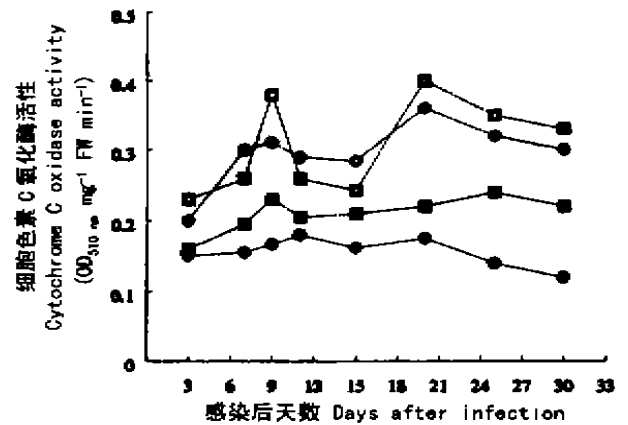


图 2 菌根真菌感染后两种兰花根状茎细胞色素 C 氧化酶活性的变化

Fig. 2 Changes in cytochrome C oxidase activity of *C. sinense* and *C. ensifolium* rhizomes after mycorrhizal infection

2.2 菌根真菌感染过程中, IAA 氧化酶和过氧化物酶活性的变化

在菌根真菌感染过程中, IAA 氧化酶活性变化幅度不大(图 3), 基本维持在相对稳定的水平。墨兰的 IAA 氧化酶活性比建兰高。一般认为, IAA 含量与其酶活性之间存在着反比关系^[1], IAA 氧化酶活性高, 使 IAA 含量减少, 生长速度慢。在本实验条件下, 墨兰根状茎的生长也稍比建兰慢些。但 IAA 氧化酶活性容易受环境因子的影响, 如低温和水分胁迫都会增加 IAA 氧化酶的活性, IAA 含量随之降低。从本实验结果来看, 真菌的介入, 对 IAA 氧化酶活性的影响不大, 同一品种感染前后的酶活性水平差异不大, 感染后 IAA 酶活性在第 10 天和第 25 天时稍有波动, 这可能是由于胞内菌丝体解体导致其它代谢活动加强, 相互影响所致。

而过氧化物酶活性的变化(图 4)则有所不同。在感染后的第一天, 被菌根真菌感染后的两种根状茎的过氧化物酶活性高于对照。感染的初期, 酶活性不断上升, 第 7 天达到了高峰, 随后逐渐下降, 到培养后期(30 d), 酶活性水平已接近未感染根状茎的水平。兰科菌根真菌是能与兰科植物形成共生关系的内寄生菌, 但对于非兰科植物却是致病性很强的腐生菌, 尤其是 *Rhizoctonia solani*, 能引起许多植物根腐病^[10]。有关学者认为, 致病性感染对寄主呼吸和各种氧化酶活性增高的影响可能与毒素的释放有关^[11]。Maxwell 和 Bateman 在用 *R. solani* 感染菜豆幼苗时, 发现植株在生长中期和结实的成熟阶段, 组织中的多酚氧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶和细胞色素 C 氧化酶才显著升高, 而不是发生在感染初期的幼苗阶段。在这些氧化酶升高的同时, 寄主组织细胞会出现严重损伤或坏死; 而用菌根真菌感染兰科植物的过程却是一个形成共生联合体的过程, 在这个过程中酶活性的增加, 尤其是过氧化物酶, 在感染的初期就可检测出来^[1]。本实验中观察到被感染后的根状茎的寄主组织细胞生长正常, 没有发生褐变和坏死, 可以证实是共生感染, 区别于致病感染。

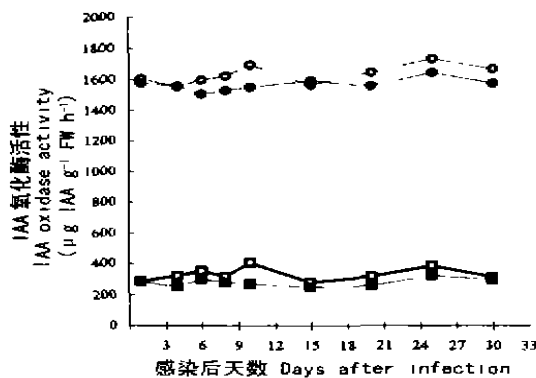


图 3 菌根真菌感染后两种兰花根状茎 IAA 氧化酶活性变化

Fig. 3 Changes in IAA oxidase activity of *C. sinense* and *C. ensifolium* rhizomes after mycorrhizal infection

■ 未感染建兰 Uninfected *C. ensifolium*; □ 感染后建兰 Infected *C. ensifolium*;
● 未感染墨兰 Uninfected *C. sinense*; ○ 感染后墨兰 Infected *C. sinense*

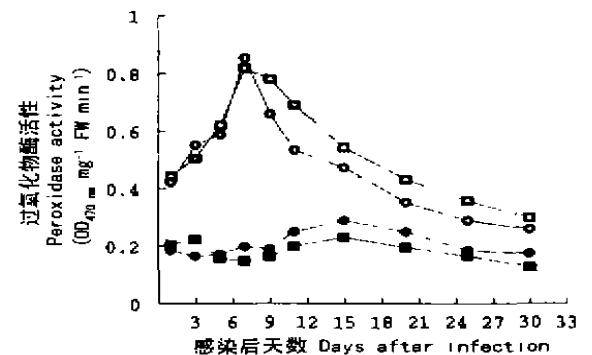


图 4 菌根真菌感染后两种兰花根状茎过氧化物酶活性的变化

Fig. 4 Changes in peroxidase activity of *C. sinense* and *C. ensifolium* rhizomes after mycorrhizal infection

3 讨论

本实验中, 两个兰花品种的根状茎被菌根真菌感染后, 细胞色素 C 氧化酶、过氧化物酶活性显

著增加(图 2,4)。过氧化物酶的第一次活性高峰发生在第 7 天,比呼吸速率、细胞色素 C 氧化酶、IAA 氧化酶活性的高峰出现时间(第 9 天)要早些,这与 Blakeman 等的结果基本一致^[3],他认为在兰科植物与真菌的共生体系中,过氧化物酶(POD)活性增加是生长发育的特征。植物体内 POD 的作用底物很多,如 H₂O₂ 以及酚酸化合物等一系列其他物质,因此,POD 是一种多功能的酶,它不仅可以将体内某些有害的代谢副产物转变为无害物质,而且可以促进体内某些中间物质的转化,从而对植物生长、发育和提高抗性起积极作用。有学者认为^[4],POD 活性的提高可能是植物对逆境反应的自我调节,有助于植物的生长。

菌根真菌与墨兰和建兰根状茎形成共生体系后,刺激了植物体内一系列的生物代谢活动,其结果是呼吸速率、细胞色素 C 氧化酶和过氧化物酶活性都显著提高,这些指标说明了真菌与其兰科寄主的共生发育过程是互为有利的,兰花与真菌的共生联合体比未感染的植株具有更强的代谢能力。但接种与否则对 IAA 氧化酶影响不大(图 3),其原因不明,还有待进一步了解。

参考文献:

- [1] Harley J L, Smith S E. Mycorrhizal Symbiosis [M]. London: Academic Press, 1983, 268-295.
- [2] Hadley G. Orchid mycorrhiza [A]. In: Arditti J. Orchid Biology [M]. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1982, 86-118.
- [3] Boldue R, Cherry J, Blair B. Increase in IAA oxidase activity of winter wheat by cold treatment and gibberellic acid [J]. *Plant Physiol*, 1970, 45: 461-464.
- [4] Blakeman J P, Mokahel M A, Hadley G. Effect of mycorrhizal infection on respiration and activity of some oxidase enzymes of orchid protocorms [J]. *New Phytol*, 1976, 77:697-704.
- [5] Al Barazi Z, Schwabe W W. The possible involvement of polyphenol oxidase and the auxin oxidase system in root formation and development in cuttings of *Pistacia vera* [J]. *J Hort Sci*, 1984, 59 (3):453-461.
- [6] 潘超美,陈汝民,叶庆生. 菌根真菌在兰属(*Cymbidium*)墨兰和建兰根部中的感染特征及其生理特征 [J]. *土壤与环境*, 1999, 8(4): 287-289.
- [7] 张志良. 植物生理学实验指导 [M]. 北京:高等教育出版社, 1990, 131.
- [8] 陈良碧. 杂交水稻种子生理特点与耐储藏性研究 [J]. *种子*, 1994, (4):19-21, 24.
- [9] 徐如涓,赵毓橘. 表油菜素内酯对黄瓜幼苗下胚轴过氧化物酶和 IAA 氧化酶活性的影响 [J]. *植物生理学报*, 1989, 15(3): 263-267.
- [10] 郭秀珍 毕国昌. 林木菌根及应用技术 [M]. 北京:中国林业出版社, 1989, 131-140.