

镉胁迫下接种 AM 真菌对葡萄次生代谢酶活性的影响

屈雁朋¹, 房玉林^{1,2*}, 刘延琳¹, 宋士仁¹, 张 昂¹, 周光荣¹

(1. 西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 陕西省葡萄与葡萄酒工程技术研究中心, 陕西 杨陵 712100)

摘 要: 试验以 1 a 生酿酒葡萄赤霞珠 (*Cabernet sauvignon*) 扦插苗为研究对象, 研究不同浓度镉 (0, 50, 200, 600 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$) 胁迫下 AM 真菌对葡萄次生代谢酶: 过氧化物酶 (POD)、多酚氧化酶 (PPO) 及苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 的活性影响。结果表明, 随镉处理浓度的升高, 过氧化物酶 (POD)、多酚氧化酶 (PPO) 及苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 的含量均呈上升趋势, 相对于未接种苗木, 接种 AM 真菌显著提高了葡萄根系菌根的侵染率和次生代谢相关酶的活性。接种 AM 真菌能缓解葡萄幼苗在镉胁迫下的毒害作用。

关键词: 镉胁迫; AM 真菌; 次生代谢

中图分类号: S763.150.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-7461(2009)05-0101-05

Effects of AM Fungal on the Secondary Metabolites of Grape under Cadmium Stress

QU Yan-peng¹, FANG Yu-lin^{1,2*}, LIU Yan-lin¹, SONG Shi-ren¹, ZHANG Ang¹, ZHOU Guang-rong¹

(1. College of Enology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Shaanxi Engineering Research Center for Viti-viniculture, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Experiment was conducted with the cuttings of one-year-old wine grape *Cabernet sauvignon* to study the effects of AM fungal on the secondary metabolites of grape under different cadmium stresses (0, 50, 200, 600 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$). The results showed that the peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) contents showed an upward trend with the increase of chromium stress, compared with the non-inoculated seedlings, AM fungal significantly increased the grape roots mycorrhizal infection rate and secondary metabolites related activity. AM fungi can alleviate the grape seedlings to the stress of heavy metals.

Key words: Cd stress; AM fungi; secondary metabolites

丛枝菌根 (arbuscular mycorrhiza, AM) 是自然界中分布最广的一类菌根, AM 真菌能与陆地上 90% 的高等植物共生, 其对植物的生长发育、营养状况、水分的吸收与利用、抗病性、耐盐性以及产量和品质等均具有重要作用^[1-5]。自从 2002 年 Jamal 等^[6]发现接种 AM 真菌提高了污染土壤中大豆和小扁豆对 Zn 和 N_i 的吸收以后, 人们对 AM 与重金属的研究也产生了浓厚的兴趣, 之后的研究涉及重金属污染下的菌根生理、生态、应用等多个方面。在重金属污染条件下, AM 真菌可以改善植物生长状况, 减轻重金属对植物的毒害, 影响植物对重金属的

吸收和转运, 加快土壤中重金属元素向植物根部聚集, 因而在重金属污染土壤的植物修复中受到越来越多的关注^[7]。

随着现代工业农业和新兴城市的迅速发展, 含有重金属的废弃物不断输入环境, 引起的环境污染问题也随之出现。重金属在土壤中不易随水淋滤, 也不易被微生物降解, 常在土壤中积累, 当土壤中的有害重金属含量积累到一定程度时就会影响土壤生态系统的稳定性, 并可通过食物链途径而危及人类的健康^[8]。因此利用 AM 真菌修复重金属污染土壤已显得非常重要。目前已有很多这方面的报道^[9-11], 但有

收稿日期: 2009-01-19 修回日期: 2009-02-27

基金项目: 陕西省“13115 计划”项目; 西北农林科技大学青年学术骨干支持计划。

作者简介: 屈雁朋, 男, 在读硕士, 主要从事葡萄学方面的研究。

* 通讯作者: 房玉林, 男, 博士, 副教授, 主要从事葡萄与葡萄酒学方面的研究。E-mail: fangyulin1973@yahoo.com.cn

关重金属胁迫下接种 AM 真菌对酿酒葡萄影响的却很少,本文主要研究镉胁迫下接种 AM 真菌对赤霞珠葡萄扦插苗次生代谢的影响,了解 AM 真菌对重金属镉的缓解机理,为以后在西北干旱半干旱地区开展葡萄园土壤修复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验在西北农林科技大学葡萄酒学院实验温室进行。选用 1 a 生赤霞珠(*Cabernet sauvignon*)扦插苗作为供试材料,于 2008 年 3 月定植于直径 25 cm 深 30 cm 的花盆中,底部垫有托盘,每盆种植 1 株,5 次重复,每次 30 株。供试土壤:以黏土:河砂:珍珠岩(2:1:1)混合配制的营养土为栽培基质。土壤有机质含量 $11.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,pH 值为 8.08,有效氮 $67 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,有效磷 $14 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,有效钾 $111 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。土壤过 16 目筛,每盆装土 6 kg,在压力(0.15MPa)、温度(121℃)条件下蒸汽灭菌 2 h。

供试 AM 菌:摩西球囊霉(*Glomus mosseae*),北京市农林科学院提供。所用菌剂为培养基质(沸石和河砂)、侵染根段、菌丝和孢子的混合物,孢子密度约为 $30 \text{ 个孢子} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。接种处理为:选取生长一致的健康葡萄苗木,在土壤中接种 AM 真菌,菌剂用量按 5%(w/w)将菌剂与育苗基质混匀后;盆内先加入 5 kg 灭菌基质,放入 400 g 菌种接种物,栽入成活的扦插苗,然后在根系周围覆盖 50 g 接种物,再用 4 kg 灭菌基质覆盖。对照植株加入等量的灭活菌种,再覆盖等量的灭菌土壤。

1.2 试验处理

采用完全随机区组试验设计。设定 2 个因素:接种 AM 真菌和镉胁迫。接种真菌有 2 个水平:接种和不接种;镉胁迫有 4 个水平:浓度分别为:0、50、200、600 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$,对应的编号分别为 I、II、III、IV。配置 Cd^{2+} 溶液 1 L:称取 31.40 g 的 $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (分子量 769.5),定容到 1 L 的容量瓶中,则 Cd^{2+} 浓度为 $122.24 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,盆土质量为 9 kg,接种时向 I、II、III、IV 处理植株的根系周围(以根颈为圆心的 5 cm 范围)及正下方浇灌 0.0、3.7、14.7、44.1 mL 的 Cd^{2+} 浓度为 $122.24 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。 Cd^{2+} 溶液处理在接种后 60 d 进行。

1.3 调查项目及测定方法

分别于镉处理后第 0、5、10 d 和 15 d 取样(根和叶片),对应的编号分别为 0、5、10、15,用蒸馏水冲洗干净,取样的质量均为 1.0 g,保存于 -20°C 的冰箱中,备用。菌根侵染率的测定:采用苯胺蓝(Ani-

line blue)染色,方格画线法测定^[12]。POD、PPO 和 PAL 的测定:采用分光光度法进行测定^[13-14]。

1.4 数据分析

数据采用 Excel 2003 和 DPS 7.55 软件进行统计分析,利用邓肯(Duncan)新复极差法进行显著性检验。不同处理进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 菌根真菌和 Cd 对葡萄菌根侵染率的影响

侵染率是反映菌根形成和共生真菌对植物亲和力的指标。镉胁迫条件下,接种菌根对葡萄植株根系的侵染状况见表 1。接种处理随镉浓度的增加,菌根侵染率先上升而后降低。表明 AM 真菌对低浓度的镉胁迫有一定的缓解作用,而对高浓度的镉胁迫几乎不起作用。

表 1 不同浓度镉胁迫下赤霞珠的侵染率

Table 1 The infection rate in *C. sauvignon*

镉浓度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)	对照植株菌 根侵染率/%	接种植株菌 根侵染率/%
0	0	65.38
50	0	71.65
200	0	42.16
600	0	23.58

2.2 镉胁迫下接种 AM 真菌对 PPO 活性的影响

植物受到镉胁迫时,会产生保护性的酶。经过对葡萄叶片和根部 PPO 含量分析,可以看出低浓度镉胁迫下接种与非接种葡萄 PPO 含量有显著的差异性($P < 0.05$)。由图 1、图 2 可以看出,随着镉胁迫程度的加强,葡萄苗木中 PPO 含量增加,在 50、200 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度镉胁迫下接种 AM 真菌的葡萄叶片 PPO 含量分别增加 2.18 和 2.71 倍;而未接种苗木在此胁迫下分别增加 1.65 和 1.95 倍,明显低于接种苗木,这说明葡萄幼苗在接种 AM 真菌条件下能促进次级代谢产物酶 PPO 的产生;而在胁迫程度达到 600 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时接种和非接种根部 PPO 增加 3.2 和 3.1 倍,差异不显著。这说明在较低浓度镉胁迫时接种 AM 真菌能促进 PPO 酶含量的增加,而在高浓度胁迫下效果不显著。

2.3 镉胁迫下接种 AM 真菌对 POD 活性的影响

通过对葡萄叶片和根部 POD 含量分析,可以看出不同浓度镉处理下接种和不接种 AM 真菌的葡萄叶片中 POD 含量有显著的差异性($P < 0.05$),但根部 POD 含量差异不显著。逆境条件下,植物体内活性氧代谢失衡,生物体经过长期进化形成了完善的酶类抗氧化保护系统来清除活性氧,其中 POD 起着至关重要的作用。由图 3、图 4 可以看出,POD 酶活性随着镉胁迫浓度的增加呈递增的趋势,并随着

胁迫时间的延长酶活性也升高,在 50、200、600 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度镉胁迫下接种 AM 真菌的葡萄叶片 POD 酶活性分别较对照增加 2.10、2.68、3.12 倍,显著($p<0.05$)高于未接种叶片酶活性(分别为 1.62、2.08、2.40 倍);而接种葡萄的根部(分别增加

1.63、2.62、3.10 倍)和未接种部分(分别增加 1.53、2.51、2.96 倍)差异不显著,这说明接种 AM 真菌能在较高的镉胁迫范围内促进 POD 酶的含量,但对叶片的促进作用优于根部。

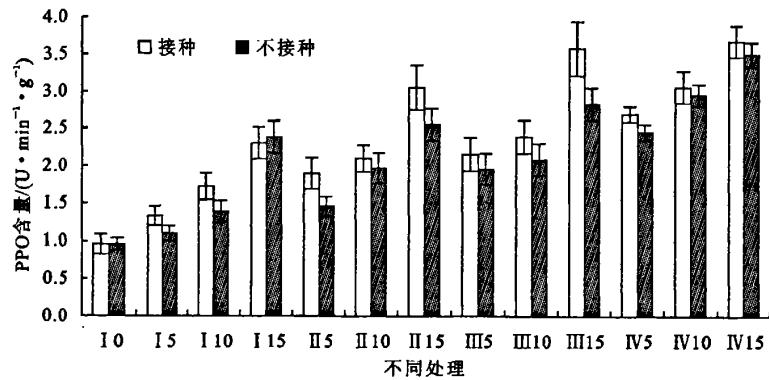


图 1 不同浓度镉胁迫下赤霞珠叶片 PPO 含量的变化

Fig. 1 The changes of PPO in *C. sauvignon* leaves under different cadmium stresses

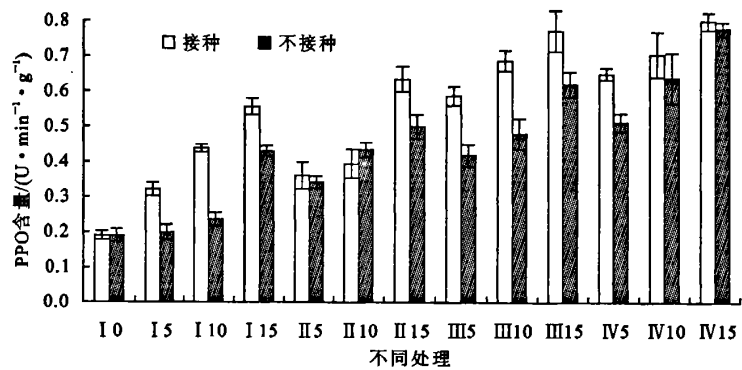


图 2 不同浓度镉胁迫下赤霞珠根部 PPO 含量的变化

Fig. 2 The changes of PPO in *C. sauvignon* roots under different cadmium stresses

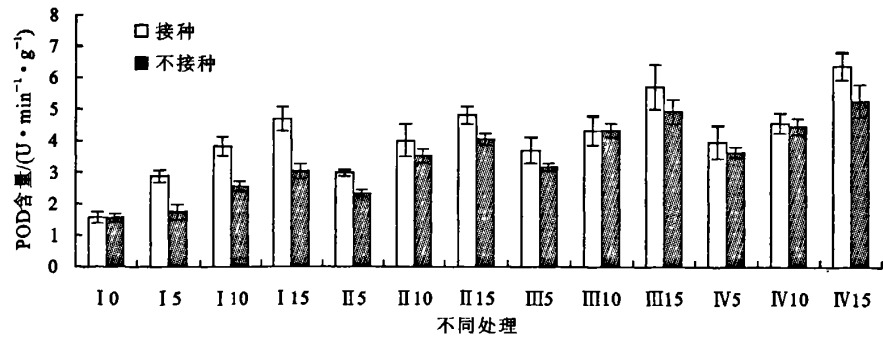


图 3 不同浓度镉胁迫下赤霞珠叶片 POD 含量的变化

Fig. 3 The changes of POD in *C. sauvignon* leaves under different cadmium stresses

2.4 镉胁迫下接种 AM 真菌对 PAL 活性的影响

通过对不同处理下葡萄叶片和根部 PAL 含量进行分析(图 5、图 6)可以看出,随着镉处理浓度的提高和时间的延长,葡萄叶片和根部的 PAL 保护酶

含量均呈递增趋势,且根部 PAL 酶含量低于叶片。在 0、50、200、600 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度镉胁迫时,15 d 后接种 AM 真菌葡萄叶片的 PAL 分别增加 1.82、1.01、1.74、1.95 倍,而非接种葡萄叶片 PAL 的含

量仅增加 0.69、0.68、1.43、1.56 倍,显著低于接种苗木;在镉胁迫浓度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时接种与非接种葡萄叶片差异达到极显著 ($p < 0.01$);接种葡萄苗木的根部 PAL 含量也显著高于未接种部分。

这说明在浓度 $0 \sim 600 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 镉胁迫下接种 AM 真菌能够诱发苯丙烷类代谢,促进葡萄苗木 PAL 酶含量的增加。

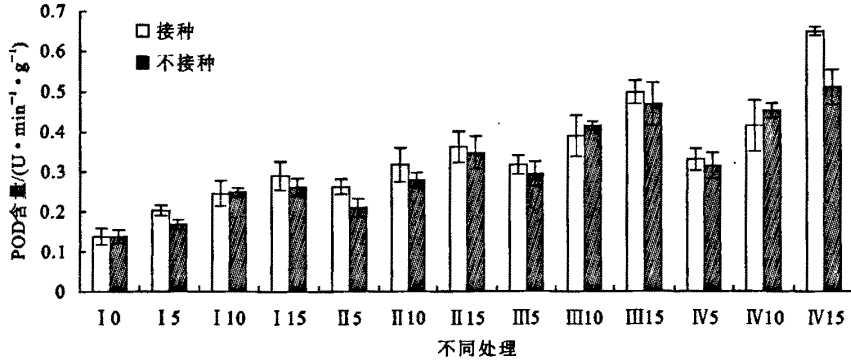


图 4 不同浓度镉胁迫下赤霞珠根部 POD 含量的变化

Fig. 4 The changes of POD in *C. sauvignon* roots under different cadmium stresses

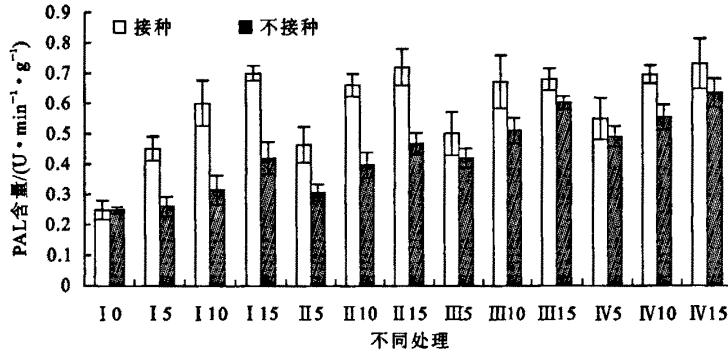


图 5 不同浓度镉胁迫下赤霞珠叶片 PAL 含量的变化

Fig. 5 The changes of PAL in *C. sauvignon* leaves under different cadmium stresses

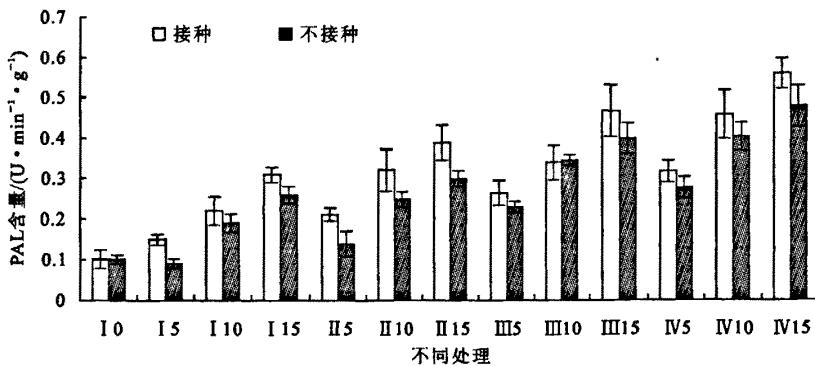


图 6 不同浓度镉胁迫下赤霞珠根部 PAL 含量的变化

Fig. 6 The changes of PAL in *C. sauvignon* roots under different cadmium stresses

3 结论与讨论

植物在遭受逆境胁迫时,可以通过某些生理生化变化来增强自身的抗逆性,从而减弱逆境所带来的伤害,如渗透调节物质的合成、保护酶活性的升高^[15-16]。在镉胁迫下,最先受到影响的是葡萄的

根系,镉胁迫影响葡萄根系水分及离子的吸收,从而改变根系的形态建成、生理代谢等;同时根系可对镉胁迫产生一系列生理反应。本试验中,在镉胁迫条件下,AM 真菌通过对葡萄根系的侵染增加根系的吸收面积以及产生一些根系分泌物促进保护酶活性提高的方式来提高葡萄的抗性。随着镉离子浓度的

增加,AM 真菌对葡萄幼苗根段的侵染率先上升后下降。这说明接种 AM 真菌对葡萄受到重金属盐胁迫时具有一定的缓解作用,但有一定的浓度限制。多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)在酚类化合物聚合成木质素时起重要作用。它们的重要特性就是催化细胞壁酚类化合物氧化形成更疏水的聚合物如木质素,这可以加固细胞壁,减少植物被病原菌侵染的可能性。所以,PPO、POD 是植物提高自身抗病性的物质代谢基础。结果表明,接种 AM 真菌的葡萄植株在镉胁迫下具有较高的酶活性,显著高于未接种葡萄植株。因此接菌葡萄能减弱镉胁迫对植株细胞膜的伤害而提高植株的抗性。苯丙氨酸解氨酶(PAL)是苯丙烷类代谢途径中的关键酶,结果表明,接种 AM 真菌能在 0~600 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的镉胁迫下促进 PAL 活性的提高,降低重金属镉对葡萄苗木的毒害,但最大承受浓度还有待于以后的研究。

参考文献:

[1] 贺学礼,刘妮,安秀娟,等.水分胁迫下 AM 真菌对柠条锦鸡儿(*Caragana korshinskii*)生长和抗旱性的影响[J].生态学报,2009,29(1):47-52.
[2] 王奇燕,张振文,刘世秋. AM 真菌在赤霞珠扦插苗上的应用研究[J].酿酒科技,2008(6):75-78.
[3] 郭绍霞,姜洪波,刘宁,等. AM 真菌对 3 种花卉生长发育的影响[J].辽宁林业科技,2008(4):22-25.
[4] 毕银丽,吴福勇.菌根对煤矿废弃物生态恢复的营养动力学影响[J].农业工程学报,2006,22(5):147-152.

[5] 程兆霞,凌婉婷,高彦征,等.丛枝菌根对砷污染土壤修复及植物吸收的影响[J].植物营养与肥料学报,2008,14(6):1178-1185.
[6] JAMAL A, AYUB N, USMAN M, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance zinc and nickel uptake from contaminated soil by soybean and lentil [J]. Int J Phytoremed, 2002, 4(3): 205-221.
[7] 王发园,林先贵.丛枝菌根-植物修复重金属污染土壤研究中的热点[J].生态环境,2006,15(5):1086-1090.
[8] 杨旭,向昌国,刘志霄.重金属污染对土壤动物的影响[J].中国农学通报,2008,24(12):454-457.
[9] RUFYIKIRI G, DECLERCK S, THIRY Y. Comparison of ^{233}U and ^{33}P uptake and translocation by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in root organ culture conditions[J]. Mycorrhiza, 2004, 14(3):203-207.
[10] 王发园,林先贵.丛枝菌根在植物修复重金属污染土壤中的作用[J].生态学报,2007,27(2):793-801.
[11] HEGGO A, ANGLE J S, CHAN R L. Effects of mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1990,22:865-869.
[12] 刘润进,陈应龙.菌根学[M].北京:科学出版社,2007.
[13] 孙群,胡景江,曹翠玲,等.植物生理学研究技术[M].陕西杨陵:西北农林科技大学出版社,2006.
[14] 高俊凤.植物生理学实验技术[M].西安:世界图书出版公司,2000.
[15] 戴青,韩刚,孙德祥,等.干旱胁迫下杨柴的抗氧化防御系统研究[J].西北林学院学报,2008,23(4):1-4.
[16] 冯蕾,白志英,路丙社,等. NaCl 胁迫对色木槭和流苏膜脂过氧化及抗氧化酶活性的影响[J].西北林学院学报,2008,23(4):5-7.

(上接第 73 页)

[4] 王良信.摘欧洲赤松和欧洲云杉粗提取物的胃保护作用[J].国外医药(植物药分册),2002,17(1):26.
[5] NEUFFER M G, EHCOC J R. Paraffin oil technique for treating corn pollen with chemical mutagens [J]. MAYDICA, 1978,22:21-28
[6] 赵秋玲,杨海浴,黄慧玲,等.小陇山林区欧洲云杉引种试验初报[J].甘肃农业科技,2006(6):17-19.
[7] 王军辉,张建国,张守攻,等.青海云杉硬枝扦插的激素、年龄、和位置效应研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(7):65-71.
[8] 四川粗枝云杉纸浆材协作组.挪威云杉无性系林业发展现状与趋势[J].西南林学院学报,2001,21(1):57-63.
[9] MATS H C A, INGER E. Rooting success of cutting from young *Picea abies* in transition to flowering competent phase [J]. Scand J For Res, 1999,14:498-504.
[10] 金明深,崔永林,朴光日.无性系林业的实用化现状[J].延边大学农学报,2004,26(1):20-26.

[11] BENTZER B G. Rooting and early shoot characteristics of *Picea abies* (L.) Karst cutting originating from shoots with enforced vertical growth [J]. Scand J For Res,1988,3:481-491 .
[12] KLEINSCHMIT J, SCHMIDT J. Experiences with *Picea abies* cutting propagation in Germany and problems connected with large scale application [J]. Silvae Genetica,1997,26:5-6.
[13] MEIER-DINKEL A J. Ageing in Tree Specie ; Present Knowledge[M] //Rodriqez R. Plant Ageing-Basic and Applied Approaches. New York and London: Plinum Press, 1990.
[14] 张含国.欧洲云杉的无性繁殖[J].国外林业,1992,22(4):8-10.
[15] 董健,黄国学,吴月亮,等.欧洲云杉嫩枝扦插育苗技术[J].东北林业大学学报,2001,29(4):57-59.