

不同 AM 菌根菌分泌的磷酸酶对根际土壤有机磷的影响

苏友波¹ 林 春¹ 张福锁² 李晓林²

(1 云南农业大学资源与环境学院 昆明 650201; 2 中国农业大学植物营养系 北京 100094)

摘 要 以三叶草为材料,利用 3 室隔网培养方法,研究了 4 种 AM 菌根菌侵染三叶草后对根际土壤酸性和碱性磷酸酶活性以及菌丝酶活性对土壤有机 P 的影响。结果表明,接种 AM 菌根菌(9 周)对根际土壤酸性和碱性磷酸酶活性均有增强作用,但作用强度主要取决于菌丝在土壤中的生长状况,*Glomus* 属菌根菌在整个菌丝室(0~6cm)都影响土壤磷酸酶的活性,其活性在整个菌丝室中都比 *Gigaspora* 的高。同一属不同种的根际土壤磷酸酶活性差异不大。AM 菌根根际土壤磷酸酶对土壤有机 P 的降解有很强的促进作用。

关键词 AM 菌根;三叶草;磷酸酶;土壤有机 P

中图分类号 Q 949.32; S541.2⁺·2; Q 948.12⁺·3

磷是所有植物生长的必需营养元素,是细胞核、细胞质、核甘酸和酶的组成成份,也是植物体内能量的主要组分和主要提供者^[1,2],我国大部分地区土壤虽然总 P 含量很高,但土壤中可溶性磷酸盐含量仅为 1μmol/L,甚至更小,因此 P 成为限制作物生长的重要因子。然而,在自然界中存在着一种能与 90% 以上的陆生植物形成共生体的 AM 菌根菌。它能增强宿主植物对土壤无机 P 的吸收和利用,改善植物 P 营养。有关菌根对无机 P 利用机理研究,人们取得了许多进展,但关于 AM 菌根能否降解和吸收有机 P 方面的研究还不多,有限的报道也是观点不一。Ezawa^[3]等人用细胞化学方法证明了侵入植物体内的菌根菌(*Gigaspora margarita*)菌丝有酸性和碱性磷酸酶活性。但 Joner^[4]等却发现侵入黄瓜后的菌根菌丝并不影响土壤磷酸酶活性。为了进一步探讨不同 AM 菌根菌对土壤磷酸酶活性的影响及其对土壤有机 P 的活化和吸收机制。本试验以三叶草为材料,测定了菌根和非菌根植物根际土壤磷酸酶活性以及土壤 P 浓度的变化。

1 材料方法

1.1 材料

试验用盆:采用有机玻璃制成的 3 室盆栽装置,包括 1 个中室和 2 个边室,中室和边室之间用孔径 30μm 的尼龙网隔开,以将根系生长限制在中室,而菌根菌丝可以穿过尼龙网到边室土壤中吸收养分,达到将根系吸收区与菌丝吸收区相区分的目的。

供试土壤:采自中国农业大学昌平长期肥料定位试验地,共采集 2 种不同施肥处理的小区耕层土壤。土壤 1 为只施 N 肥的小区土壤,施 N 水平为 270 kg/hm²;土壤 2 为在施肥水平分别为 N 270 kg/hm² 和 P₂O₅ 135 kg/hm² 的基础上,增施有机肥 7500kg/hm²。供试土壤的主要养分含量见表 1。土壤过 1mm 筛后在 120℃ 下高压蒸汽灭菌 2h,以消除土壤中的真菌孢子。

供试作物:红三叶草(*Trifolium Pratense* L.)。

菌根菌种:供试菌种为(*Glomus mosseae*, *Glomus versiformeae*, *Gigaspora margarita* 以及 *Gigaspora rosea*) 4 种菌种。

表 1 供试土壤基本性状
Table 1 Some properties of the soil used

土 壤	有机质 (g/kg)	有效 P (mg/kg)	碱解 N (mg/kg)	速效 K (mg/kg)
土壤 1	13.9	8.09	75.3	85.6
土壤 2	15.4	31.22	78.8	102.0

1.2 方法

试验设计：试验设 5 个处理。土壤 1 用作中室植物根系生长的介质。土壤 2 用于外室。分别用 4 种菌种接种(+M)和一个不接种菌根菌(-M)CK 处理。每个处理重复 3 次。作物生长期间追施 1 次 N 肥，保证植物 N 素充足供应。

接种菌根：接种剂和土壤 1 按 15：100 混匀后装入菌根处理的中室，对照组则加入相同重量的灭菌处理的接种土。装盆后各室土壤容重为 1.3g/cm³。

播种：三叶草种子在 10% H₂O₂ 中浸泡 10min，进行表面消毒，而后置于湿润的滤纸上放置 1 昼夜使之发芽，每盆播种 40 粒，并在土壤表面覆盖一层石英砂以减少水分的蒸发。

温度和光照：试验在玻璃网室中进行，生长期间温度在 25~35℃，光照时间为每天 14 h。

收获和测定：三叶草生长 9 周后收获，将根系取出清洗干净后，称取 1g 鲜根用酸性品红染色以方格交叉法测定根系长度和菌根侵染率。根系其余部分和地上部经烘干、磨细后，测定元素含量。

土壤 P 的测定：收获后将外室土壤按 1mm、3mm 或 10mm 等 3 种间距切取新鲜土样，称取鲜土 2g，用 40ml pH8.5 的 NaHCO₃ 溶液浸提，恒温(25℃)振荡 30min 过滤测定。土壤 Olsen-P 用磷钼兰法；土壤总有效 P 测定用等量滤液在 120℃的高压灭菌锅内氧化 45min，磷钼兰法测定；两者之差即为土壤有

机 P 含量。

土壤磷酸酶活性测定：磷酸酶测定基于 Tabatabai and Bremner^[5]的方法，并稍做改进。取鲜土 0.5g，加 0.2ml 甲苯浸提土壤中的磷酸酶，再加 5ml 含对硝基苯磷酸二钠 1mg/ml 的反应底物溶液，放入 30℃培养箱中培养 1h，然后用 4ml 0.5mol/L NaOH 终止酶反应，再加 1ml 0.5mol/L CaCl₂ 充分混匀，用定量滤纸过滤。滤液在 410nm 处比色。测定酸性磷酸酶时，用 0.1mol/L pH5.2 的醋酸缓冲液；测定碱性磷酸酶时，用 0.5mol/L pH8.5 的 NaHCO₃ 作缓冲液。酶活性单位 Eu=水解 PNPP 1μmol / (g 土 • min)。

2 试验结果

2.1 植株生长和菌根侵染率

不同处理三叶草生长量和菌根侵染率见表 2。结果表明，不接种菌根菌的处理没有菌根侵染。接种情况下，*Glomus* 属菌根菌对三叶草的侵染远高于 *Gigaspora* 属。在植物生长量上，不接种菌根菌的三叶草干重最低，而菌根侵染后植物生长量都有不同程度的提高，*Glomus* 属菌根菌对植物生长的促进作用远大于 *Gigaspora* 属。菌根侵染植物能够影响根的生长，*Glomus* 属菌根菌能够促进根的生长，而 *Gigaspora* 属不能促进根的生长，对根的生长反而有抑制作用。

表 2 菌根侵染率和植物生长量
Table 2 Mycorrhizal infection rate and plant dry weight and root length

处 理	菌根侵染率 (%)	干物重 (g/盆)		根系长度 (m/盆)
		地上部	根系	
K(-M)	0	3.19±0.11	0.91±0.08	90.59±15.26
+ <i>Glo.Mosseae</i>	56.42±5.61	7.18±0.24	1.52±0.15	149.50±19.85
+ <i>Glo.Versiforme</i>	50.48±8.29	6.83±0.17	1.21±0.25	133.92±34.16
+ <i>Gig.Margarita</i>	27.34±7.89	4.16±0.12	1.03±0.07	92.21±11.20
+ <i>Gig.Rosea</i>	21.6±2.46	4.06±0.08	0.99±0.10	73.54±13.32

*平均值±标准差

2.2 植物吸 P 量和菌丝贡献

表 3 为各处理三叶草植株含 P 量、P 吸收量及其菌丝吸收 P 量。结果说明，接种菌根都会影响植物的含 P 量，*Glomus* 属对寄主含 P 量的影响程度大于 *Gigaspora* 属。在植物吸 P 总量上，相同属不同种的菌根菌处理中植物的吸 P 量基本一致，但是不同属的菌根菌对根系和地上部组织吸 P 量的增加程度却相差很大，*Glomus* 属的宿主吸 P 量是对照的

3~4 倍，而 *Gigaspora* 属侵染的宿主的吸 P 总量与相应的非菌根植物差别不大。如把菌根植物与相应对照植物 P 吸收量的差值视为根外菌丝的表观吸 P 量，那么 *Glomus* 属的菌根菌对植物吸 P 总量的贡献将是 *Gigaspora* 属的 6~7 倍，*Glomus* 属的菌根菌能为宿主提供 70%左右的 P 素营养，而 *Gigaspora* 属菌根菌只能为宿主提供 20%左右的 P 素。

表 3 不同处理植物含 P 量、吸 P 量和菌丝贡献

Table 3 Phosphorus concentration in plant, P uptake by plant and hyphal contribution

处 理	植株含 P 量 (g/kg)		P 吸收量(mg/盆)				菌丝贡献 (%)
	地上部	根系	地上部	根系	总量	mg/盆	
CK(-M)	1±0.4	1.2±0.6	3.3±0.98	1.21±0.64	4.51±1.62	0.00	0
+ <i>Glo.Mosseae</i>	1.6±0.1	2.3±0.2	11.5±0.78	3.52±0.24	15.02±1.02	10.51	70.0
+ <i>Glo.Versiforme</i>	1.6±0.2	2.2±0.3	10.92±0.97	2.69±0.35	13.61±1.32	9.10	67.3
+ <i>Gig.Margarita</i>	1.1±0.3	1.4±0.5	4.6±0.86	1.45±0.57	6.05±1.43	1.54	25.1
+ <i>Gig.Rosea</i>	1.1±0.2	1.3±0.4	4.49±0.58	1.3±0.43	5.79±1.01	1.28	22.0

* 平均值 ±标准差。

2.3 根际土壤磷酸酶活性变化

4 种处理土壤中酸性和碱性磷酸酶活性随距根表面的距离变化见(图 1 和图 2)。从图 1 可见,所有 5 种处理的酸性磷酸酶活性随距根距离的变化都有相同趋势,即靠近隔网根表处酶活性最高,随后逐渐降低到一稳定水平。菌根侵染三叶草后对土壤酸性磷酸酶活性的影响在不同菌根菌上表现不同,对于 *Glomus* 属的菌根菌,接种后使整个外室范围内酸性磷酸酶活性都程度不同的有所提高。在 55~60mm 处对磷酸酶的贡献尤为突出。对于

Gigaspora 属的菌根菌,虽然在靠近根室处酸性磷酸酶活性都非常高,但从整个菌丝室来看,土壤中的酸性磷酸酶活性与对照的酶活性的变化基本一致,它对土壤酸性磷酸酶贡献很小。同一属的不同菌根菌对土壤中的酸性磷酸酶的贡献基本相似。土壤碱性磷酸酶变化趋势与酸性磷酸酶表现出相似趋势(图 2)。*Gigaspora* 属的菌根菌在靠近根室的碱性磷酸酶活性不如酸性磷酸酶高。*Gigaspora* 属的菌根菌接种后对碱性磷酸酶的贡献不大。

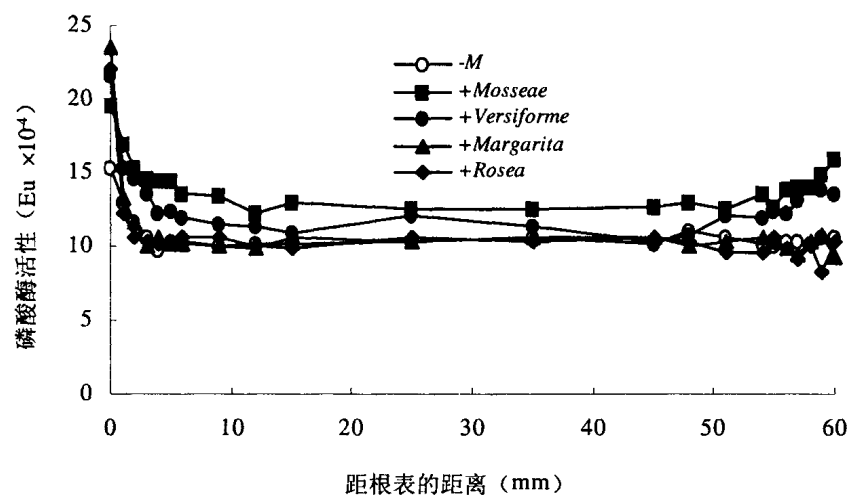


图 1 不同处理三叶草根际土壤酸性磷酸酶的变化

Fig. 1 Change in acid phosphatase activity in the rhizosphere of clover under different treatments

2.4 不同处理土壤有机 P 的变化

不同处理土壤中有机 P 含量随距根表的距离变化见图 3。从图 3 可见所有 5 种处理的有机 P 随距根表距离的变化都有相同的趋势,即靠近隔网(根表)端最低,形成 P 的亏缺区;距离根表的距离越远,土壤有机 P 含量越高;但是在 55~60cm 处,土壤有机 P 含量有下降的趋势。不同的菌根菌对土壤总有机 P 的影响表现各异,接种 *Glomus* 属的菌根菌后,

整个菌丝室内土壤有机 P 含量都明显降低。而接种 *Gigaspora* 属的菌根菌后土壤有机 P 含量与对照相比没有明显变化。*Glomus* 属的 *Mosseae* 种和 *Versiforme* 种之间在吸收利用土壤有机 P 方面作用程度相同。*Gigaspora* 属的两个种之间在吸收利用土壤有机 P 方面也没有明显区别。

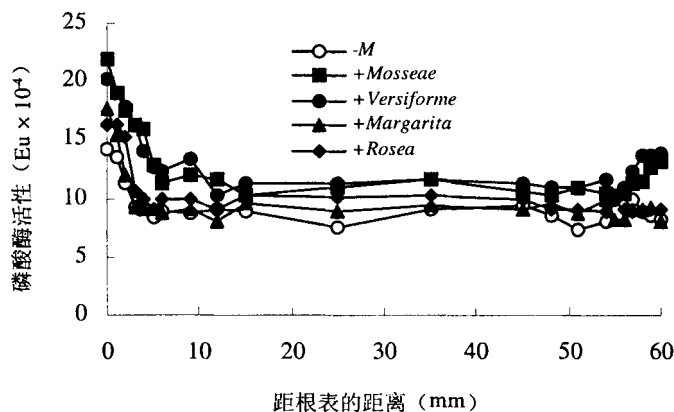


图 2 不同处理三叶草根际土壤碱性磷酸酶的变化

Fig. 2 Change in acid phosphatase activity in the rhizosphere of clover under different treatments

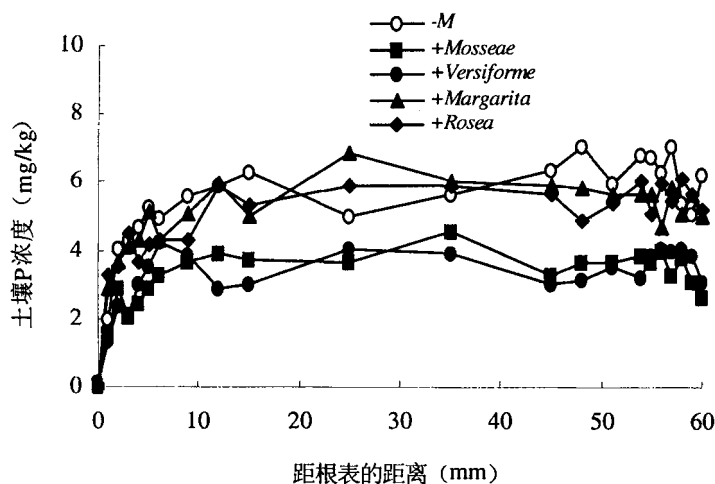


图 3 不同处理三叶草根际土壤有机磷的变化

Fig. 3 Change in organic phosphate in the rhizosphere of clover under different treatments

3 讨论

接种不同的菌根菌都能程度不同的影响三叶草的生长,其主要原因是菌根菌丝生长到根系不能到达的土壤中吸收土壤 P 素,并运输给三叶草根系,对于不同的菌根菌它能到达的外室土壤的范围不一样,所获得的养分空间也不一样,所以造成了吸收和运输给三叶草的 P 素的差异(表 3)这与 Pearson^[6]和 Smith^[7]的结果一致。从菌丝吸收 P 的绝对数量看, *Glomus* 属的菌根菌对 P 的贡献大于 *Gigaspora* 属的菌根菌(表 3)。*Glomus* 属的菌根菌侵染宿主后能不断地从外室为宿主提供 P 素营养,宿主也能为菌根菌提供碳水化合物,保证菌根菌正常发育的能量需要,所以它能够源源不断地侵染宿主的根系,使菌根侵染率高达 50% 以上。同时宿主由于得到充足的

P 营养,其生长量超过对照的 2 倍。对于 *Gigaspora* 属的菌根菌侵染宿主后,虽然也能为宿主提供 P 营养,但其生长范围仅限根室,在根室获得的 P 素已远远不够宿主植物的生长需要,但是为了能获得更多的碳水化合物来满足菌根菌本身的生长需要,它也在不断地侵染宿主根系,从而造成对宿主生长的不利影响,所以它反而影响了宿主植物三叶草的生长(表 2)。

本试验用土是冲积性母质砂姜潮土,为碱性土,由于 *Glomus* 属的菌根菌适宜在碱性土壤中生长^[9],*Glomus* 属的菌丝体比 *Gigaspora* 属的菌丝体长,所以使它在空间上获取 P 素的范围扩大,造成它们的宿主 P 含量、生长量之间产生很大差异(表 2、3)。

从整个菌丝室来看,接种 *Glomus* 属的菌根菌能

明显提高磷酸酶活性,尤其是 55~60mm 处的酶活性明显比周围土壤酶活性高,这可能是菌丝在 60mm 附近相对富积所致。而接种 *Gigaspora* 属的菌根菌处理的磷酸酶活性强弱在菌丝室中与对照处理相比基本一致,其酶活性只在根室才表现强烈。通过显微镜观察,发现 *Gigaspora* 属的菌根菌菌丝只生长在宿主的根表,很少有菌丝能到达根室以外的菌丝室中,而 *Glomus* 属的菌根菌菌丝却能在菌丝室外侧 6cm 处聚集。菌丝密集的区域酶活性有增强的趋势。由此推测不同属的菌根菌的磷酸酶活性存在差异,土壤中磷酸酶活性与菌丝生长范围密切相关。当然也不能排除菌根菌刺激土壤细菌的生长繁殖而增加磷酸酶分泌量的间接作用。在相同属不同种的菌根处理条件下,其酶活性的差异不大。

不同菌根菌对寄主 P 的供应存在差异^[6,7]。由于不同属的菌根菌的酶活性的差异,造成了活化和吸收土壤 P 素的差异(图 3)。AM 菌根菌侵染三叶草后,为了满足三叶草 P 素的需要,AM 菌根分泌磷酸酶来活化土壤有机 P 并吸收运输给三叶草。酶活性高的地方土壤有机 P 含量明显降低。说明 AM 菌根真菌可以增强土壤磷酸酶的活性,能促进土壤有机 P 的水解^[8]。不同属的 AM 菌根真菌在降解土壤有机 P 方面存在明显的差异。接种 *Glomus* 属的菌根菌后,土壤有机 P 含量明显下降。而 *Gigaspora* 属的菌根菌对土壤有机 P 的降解则不如 *Glomus* 属的菌根菌。同一属内的不同菌种对土壤有机 P 的降解吸收作用基本相同(图 3)。

参考文献

- 1 Boulter D, Jeremy JJ, Wilding M. Amino acids liberated into the culture medium by pea seedling roots. *Plant Soil*, 1966, 4: 121~127
- 2 Epstein E. Mineral nutrition of plants. New York, J Wiley and Sons., Inc, 1972, 51~56
- 3 Ezawa T, Saito M and Yoshida T. Comparison of phosphatase localization in the intraradial hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus spp* and *Gigaspora spp*. *Plant and Soil*, 1995, 176: 57~63
- 4 Joner EJ and Jakobsen I. Growth and extracellular phosphors activity of AM Hyphae as influenced by soil organic matter. *Soil Boil Biochem.*, 1995, 27, 9: 1153~1159
- 5 Tabatabai MA and Bremner JM. Use of p-nitrophenyl phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant root and microorganisms. *Biol Fertil Soil*, 1969, 5: 308~312
- 6 Pearson JN and Jakobsen I. The relative contribution of hyphae and roots to phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizas plants. Measured by dual. Labeling with ³²P and ³²P. *New Phytol.*, 1993, 124: 489~494
- 7 Smith SE, Dickson S, Morris C. Transfer of Phosphate from fungus to plant in AM mycorrhizas: calculation of the area of symbiotic interface and of fluxes of P from two different fungi to *Allium porrum* L. *New Phytol.*, 1994, 127, 93~99
- 8 Tarafdar JC and Marschner H. Phosphatase activity in the rhizosphere and hyphosphere of VAM wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. *Soil Boil Biochem.* 1994, 26: 387~395
- 9 张美庆, 王幼珊, 邢礼军. 我国东、南沿海地区 AM 真菌群落生态分布研究. *菌物系统*, 1998, 17 (3): 274~277

EFFECT OF ARBASCULAR MYCORRHIZA FUNGI (*Glomus Mosseae*, *Glomus Versiformea*, *Gigaspora Margarita* and *Gigaspora Rosea*) ON PHOSPHATASE ACTIVITIES AND SOIL ORGANIC PHOSPHATE CONTENT IN CLOVER RHIZOSPHERE

Su Youbo¹ Lin Chun¹ Zhang Fusuo² Li Xiaolin²

(1 College of Recourses and Environment, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201;

2 College of Recourses and Environment, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract In order to study whether there is genetic diversity among AMF in utilizing soil organic phosphate, a pot experiment was carried out to study effect of arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus Mosseae*, *Glomus Versiformea*, *Gigaspora Margarita* and *Gigaspora Rosea*) on acid and alkaline phosphatase activities and soil phosphate in the

(下转第 343 页)

- 6 高小力. 软件组件技术及其在 GIS 中的应用. 测绘标准
化, 2001, 17(1): 17~19
- 7 汪卫民. RS 和 GIS 在农业领域的应用与展望. 计算机与
农业, 1998, (2): 4~7
- 8 刘震. 遥感、地理信息系统集成的研究. 遥感学报, 1997,
1 (2): 157~159

SOIL AND FERTILIZER EXPERT SYSTEM BASED ON RS, GIS AND GPS

Nie Yan¹ Zhou Yong¹ Tian Youguo² Ren Yi² Wang Shanqin¹

(1 Key Lab of Subtropical Soil Resources and Environment in HuaZhong Agriculture University, Wuhan 430070; 2 Soil and Environment
Department of the Center of Popularization and Service about Agricultural Technology of the Department of Agriculture, Beijing 100026)

Abstract With extensive application of computer technology and 3S (GIS、RS and GPS) in agriculture, traditional agriculture is turning into precise agriculture , and hence an agricultural expert system comes into being. Aimed at the status quo of soil nutrition management and fertilization technology , this paper probes into how to design a soil and fertilizer expert system based on the factors of soil fertility, fertilization and crop, and by adopting advanced technologies such as object-oriented programming (VB), database (Access) and 3S. This kind of expert system can not only guide farmers in applying fertilizers rationally, but also provide manager and businessman with decision-making service. so it is of high practicability and high extension value, and will create good economic and social benefits expecially in the lakeside plains.

Key words Expert system, VB, 3S, Soil fertility, Fertilization

(上接第 338 页)

rhizosphere of clover. The pot was separated by 30i m nylon net into three compartments. the central one was for root growth, and the other two for hyphal growth. The two outer compartments were filled with soils collected from field plots either receiving chemical fertilizer or manure in a long-term fertilizer experiment. The treatments consisted of sterilized soil either uninoculated or inoculated with AMF. Soil phosphatase and phosphate were examined, separately, 9 weeks after sowing. The results showed that the activities of acid and alkaline phosphatase were increased with mycorrhizal inoculation. AMF *Glomus* increased soil phosphatase activity in the whole hyphae compartment. Soil phosphatase activities were higher in the *Glomus* hyphae compartment than in the *Gigaspora* hyphae compartment. While there was no difference between AMF of the same genus. Decomposition of organic phosphate compound was promoted by the AMF phosphatase efficiently.

Key words Arbuscular Mycorrhizal Fungus, Clover; Acid phosphatase, Alkaline phosphatase, Soil organic phosphate