

低 pH 对 AM 真菌侵染三叶草根系的影响

蔡彬^{1,2}, 姚青³, 王燕⁴, 朱俊晨¹, 朱红惠²

(1 江西农业大学 生命科学与工程学院, 江西 南昌 330045; 2 广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州 510070; 3 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642; 4 广东省科技图书馆, 广东 广州 510070)

摘要:以白三叶草 *Trifolium pratense* 为宿主, 接种 AM 真菌(根内球囊霉 *Glomus intraradices* 和珠状巨孢囊霉 *Gigaspora margarita*), 设置 2 个土壤 pH(5.5 和 6.5), 研究低 pH 对 AM 真菌侵染三叶草根系的影响。研究发现, 在短暂(12 d)的 pH 处理后, 植株生物量没有受到不同 pH 处理的影响; 但是, 不同 pH 和不同菌种都对 AM 真菌的根系侵染率、根系碱性磷酸酶(ALP)活性、外生菌丝 ALP 活性产生显著的影响, 菌种和 pH 之间没有交互作用。低 pH 对上述 3 个指标具有抑制效应。根内球囊霉侵染的根系上述 3 个指标均大于珠状巨孢囊霉侵染的根系, 而且珠状巨孢囊霉对低 pH 更为敏感。试验数据表明, 在影响植株的生物量之前, 低 pH 已经对 AM 真菌的侵染产生显著影响。

关键词:低 pH; AM 真菌; 侵染; 碱性磷酸酶(ALP)活性

中图分类号: Q948

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2008)03-0033-04

Influence of Low pH on the Colonization of Clover Roots by AM Fungi

CAI Bin^{1,2}, YAO Qing³, WANG Yan⁴, ZHU Jun-chen¹, ZHU Hong-hui²

(1 College of Bioscience & Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2 Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070, China;

3 College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

4 Guangdong Library of Science & Technology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: The influences of pH (5.5 and 6.5) on mycorrhizal colonization of clover (*Trifolium repens*) roots by AM fungi *Glomus intraradices* and *Gigaspora margarita* were investigated. Low pH (5.5) did not affect biomass of host plant. However, low pH treatment resulted in significant reduction in mycorrhizal colonization and alkaline phosphatase (ALP) activities of host roots and AM external hyphae. Furthermore, *Gigaspora margarita* was more sensitive to low pH and its inoculation led to higher decrease in the above three parameters compared with *Glomus intraradices* inoculation. The results suggested that low pH affects AM colonization before it affects biomass of host plants.

Key words: low pH; AM fungi; colonization; alkaline phosphatase(ALP) activity

自然界大多数植物只有菌根, 而没有纯粹的根系, 除少数显花植物外, 多数植物都可以形成菌根。丛枝菌根(arbuscular mycorrhizae, AM)是一种分布最广和最常见菌根, 它是由 AM 真菌与陆生植物形成的一种共生体。AM 真菌能帮助共生植物改善其

周围土壤条件^[1], 提高植物对土壤中磷、氮、钾、锌、铁、铜等矿物质营养元素的吸收^[2,3], 提高植物在恶劣环境(例如盐胁迫、土壤酸化、重金属污染、病虫害、干旱等^[4-6])下的生存能力, 而植物提供 AM 真菌生长所必需的碳源。

收稿日期: 2007-08-30

作者简介: 蔡彬(1983—), 男, 硕士研究生; 通讯作者: 朱红惠(1970—), 女, 研究员, 博士, E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

基金项目: 国家自然科学基金(30570060); 广东省自然科学基金研究团队项目(E05202480)

我国长江以南广大地区约占国土面积的 1/3, 丰富的水热资源保证了较高的植物生产力。但是该区域土壤多呈酸性, 且随着工业化的进展, 排入大气中的二氧化硫等酸性气体增加, 酸雨出现的频率越来越高, 进一步加速了酸化过程。酸化土壤中矿物质营养元素的流失, 改变了土壤结构, 导致土壤贫瘠化, 影响植物根系的正常发育, 阻碍了植物对营养的吸收, 最终影响了植物的生长发育^[7]。调查表明, 在东南沿海的酸性红壤中栖息着丰富的 AM 真菌资源^[8], 利用这些 AM 真菌可以显著改善植物在酸性土壤中的生长表现^[9], 因此 AM 真菌在酸性土壤中具有很好的应用前景。AM 真菌(尤其是外源 AM 真菌)本身对酸性的适应性如何, 是直接决定能否在酸性土壤中利用 AM 真菌的关键问题。本项目通过研究低 pH 对 AM 真菌侵染植物根系的影响, 来了解 AM 真菌对酸性土壤的适应性, 为将来 AM 真菌资源在长江以南大面积的红壤区域和其他酸化严重地区的利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

宿主植物为白三叶草 *Trifolium repens*, 供试菌种为根内球囊霉 *Glomus intraradices* 和珠状巨孢囊霉 *Gigaspora margarita* (由广东省微生物研究所菌种保藏中心扩繁), 接种剂为烟草 *Nicotiana tabacum* 的根段、菌丝、孢子和土壤的混合物。栽培容器为黑色塑料盆(7 cm × 5 cm), 塑料盆中的栽培介质为蛭石与土壤体积比为 3:1 的混合物。

1.2 方法

试验在广东微生物研究所进行。种子用 $\varphi = 10\%$ 的 NaClO_3 表面消毒 30 min, 再用蒸馏水漂洗 15 min, 之后放在灭过菌的滤纸上放入 28 °C 的培养箱中催芽, 每盆定植 3 株苗。为比较土壤 pH 对 AM 真菌侵染根系的影响, 每个菌种设置 2 个土壤 pH, 即 pH6.5 (作为对照的中性 pH 处理) 和 pH5.5 (低 pH 处理)。每处理 6 个重复, 共有 12 盆。由于低 pH 能够严重抑制根系的生长, 为了获得足够的根系进行相关测定, 本试验的前 8 周, 植株生长在栽培介质中, 浇水从第 8 周开始进行不同 pH 处理, 即分别用 pH5.5 和 pH6.5 的 Hoagland 营养液(1/4 强度的磷营养)浇水, 连续 12 d (每天 10 mL), 然后采样测定。

样品收获后测定地上部和根系的鲜质量, 将根系剪成 1~2 cm 的根段, 然后将其分成 2 部分: 一部分利用曲利本蓝进行染色^[10], 用于测定根系侵染率; 另一部分按照 Zhu 等^[11]的报道, 进行根系碱性磷酸酶(ALP)活性的测定。用尖镊子(OHM, 德国)从根

系表面和土壤中收集外生菌丝, 测定其 ALP 活性, 测定方法见文献[12]。

所有数据利用 SPSS13.0 统计软件进行二因子方差分析(Two-way ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 不同 pH 条件下植株的生物量

从图 1 中可以看出, 不论是接种根内球囊霉还是珠状巨孢囊霉, 不同 pH 处理对三叶草的地上部和根系生物量的影响不明显; 同样, 不论是 pH6.5 还是 pH5.5, 不同菌种对三叶草的生物量也没有产生显著影响。这表明, 在处理时间较短(12 d)的条件下, 不同的 pH 处理没有明显影响三叶草的生物量, 而且, 2 个 AM 真菌菌种对三叶草生物量的影响也类似。

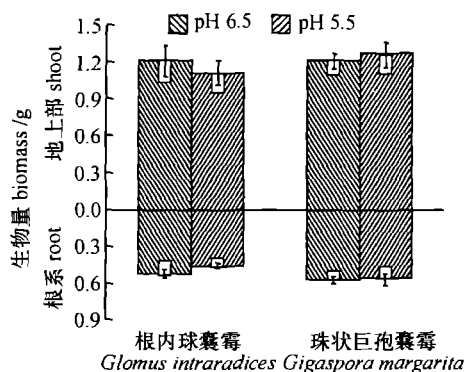


图 1 不同 pH 条件下 AM 真菌侵染的三叶草的生物量
Fig. 1 Biomass of clover plants colonized by AM fungi at different pH conditions

2.2 不同 pH 条件下三叶草根系侵染率和 ALP 活性

从表 1 可以看出, pH 的差异对 AM 真菌根系侵染率具有很大的影响, pH5.5 显著地降低了根内球囊霉和珠状巨孢囊霉对根系的侵染。此外, 菌种之间也存在明显差异, 根内球囊霉对根系的侵染率显著高于珠状巨孢囊霉对根系的侵染率。但是, 根据 pH5.5 和 pH6.5 条件下侵染率的差距, 可以看出珠状巨孢囊霉对低 pH 更敏感。在 pH5.5 条件下根内球囊霉的侵染率降低幅度仅为 6.4%, 而珠状巨孢囊霉甚至达到了 24.0%。

从表 1 中可以发现, pH 对根系 ALP 活性和外生菌丝 ALP 活性的影响很大, pH5.5 显著地降低 AM 真菌侵染根系的 ALP 活性和外生菌丝的 ALP 活性。总的来说, 根内球囊霉的降低幅度小于珠状巨孢囊霉的降低幅度, 前者的根系和外生菌丝 ALP 活性的降低幅度分别是 15.0% 和 29.4%, 而后者分别是 30.1% 和 42.3%。这一趋势与菌种之间侵染率的趋势一致。另外, 表 1 还表明根系 ALP 活性的降低幅度小于外生菌丝 ALP 活性的降低幅度。

表 1 不同 pH 条件下 AM 真菌对三叶草根系的侵染和 ALP 活性的影响

Tab. 1 Influence of AM fungi on the colonization and ALP activity of clover plant roots at different pH conditions

菌种 fungal species	pH	根系侵染率 root colonization/%	根系 ALP 活性 root ALP activity/%	外生菌丝 ALP 活性 external hyphae ALP activity/%
根内球囊霉	6.5	79.9±2.8	62.2±3.8	36.0±1.2
<i>Glomus intraradices</i>	5.5	74.8±1.0	52.9±3.8	25.4±2.8
珠状巨孢囊霉	6.5	59.9±3.5	47.9±6.3	24.1±1.4
<i>Gigaspora margarita</i>	5.5	45.5±3.7	33.5±6.0	13.9±1.1

表 2 2 个 pH 水平下 2 个菌种侵染的三叶草相关指标的二因子方差分析¹⁾

Tab. 2 Two-way ANOVA of parameters related to clover plants colonized by two AM fungi at two pH levels

变异来源 resources of variation	根系侵染率 root colonization	根系 ALP 活性 root ALP activity	外生菌丝 ALP 活性 external hyphae ALP activity	地上部鲜质量 shoot fresh mass	根鲜质量 root fresh mass
菌种 fungal species	0.000 ***	0.011 *	0.000 ***	0.487	0.044 *
pH	0.010 **	0.049 *	0.000 ***	0.823	0.222
菌种 × pH fungal species × pH	0.145	0.630	0.893	0.469	0.344

1) *, **, *** 分别表示 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 水平下的显著性

3 讨论与结论

AM 真菌适应于中性和微酸性的土壤中^[13], 土壤的 pH 过高或过低对 AM 真菌侵染影响很大. 本试验中, 与 pH6.5 相比, pH5.5 极显著地降低了根内球囊霉和珠状巨孢囊霉对根系的侵染率, 证实了低 pH 对 AM 真菌侵染过程的抑制. 同样, Clark 等^[14-15]的试验在根内球囊霉上也得到相似的结果: 由此可以推测, 在酸性土壤中, 低 pH 抑制植物生长不仅仅是对根系生长与发育的直接抑制, 而且还可能通过抑制菌根的形成来削弱根系对养分的吸收.

关于低 pH 对 AM 真菌 ALP 活性的影响的报道并不多见. 本试验的结果表明, 低 pH 可以极显著地降低根系和外生菌丝的 ALP 活性, 这很可能是因为 ALP 活性的表达严格受到环境 pH 的影响, 通常需要碱性的环境条件. 本试验的结果还发现, 在低 pH 条件下, 外生菌丝 ALP 活性的降低幅度明显大于根系 ALP 活性, 即外生菌丝 ALP 活性对环境 pH 更为敏感, 这种敏感性取决于是否与低 pH 土壤产生直接的接触.

ALP 是 AM 共生体系中一种特异性的酶^[16], 研究表明 ALP 活性的大小可用作判断 AM 真菌的侵染效率^[17], 是评价 AM 真菌功能强弱的生理指标. 菌根内 ALP 活性表示菌根内部具有 ALP 活性的真菌

2.3 各指标的方差分析

根据方差分析可以看到, 根系侵染率在不同菌种之间和不同 pH 之间的差异分别达到 $P < 0.001$ 的极显著水平和 $P < 0.01$ 的极显著水平; 根系 ALP 活性在菌种之间和不同 pH 之间的差异均达到 $P < 0.05$ 的显著水平; 外生菌丝 ALP 活性在不同菌种之间和不同 pH 之间的差异均达到 $P < 0.001$ 的极显著水平; 除了根鲜质量在不同菌种之间存在 $P < 0.05$ 的显著差异外, 菌种和 pH 对生物量没有显著的影响 (表 2). 此外, 菌种和 pH 之间没有互相作用. 方差分析结果表明, 低 pH 能够显著抑制 AM 真菌对根系的侵染、根系和外生菌丝的 ALP 活性; 根内球囊霉对根系的侵染、ALP 活性也显著高于珠状巨孢囊霉.

组织的比例, 也代表菌根共生体中参与 P 代谢的真菌组织的比例^[18]. 外生菌丝 ALP 活性则是 P 在外生菌丝中代谢活性的指标之一. 另外, 根内的 ALP 活性与磷代谢密切相关, 因为有证据表明 ALP 参与了运输到丛枝的聚磷酸盐的降解^[19]. 显然, 低 pH 对根内 ALP 活性的抑制可能削弱 AM 真菌的功能. 对于 AM 真菌外生菌丝的磷酸酶活性的研究大多以酸性磷酸酶 (ACP) 为对象^[20], 但是也有报道指出外生菌丝的磷酸酶活性在酸性和碱性条件下都存在, 只不过酸性条件下的活性大于碱性条件下的活性^[21]. 本试验仅测定了 pH9.2 条件下外生菌丝的 ALP 活性, 其 ACP 活性对低 pH 的响应如何, 有待于进一步研究.

本试验中, 在根系侵染、ALP 活性、根鲜质量等指标上菌种之间存在显著的差异. 总的来看, 珠状巨孢囊霉比根内球囊霉对低 pH 更为敏感, 导致珠状巨孢囊霉在低 pH 条件下的侵染和功能下降的幅度更大. 有研究指出, *Glomus* 和 *Gigaspora* 2 个属的 AM 真菌在生理代谢上存在很大的差异^[12], 这也许可以很好地解释本试验中出现的菌种差异.

本试验中的植株生物量在 2 个 pH 条件下没有差异, 这是因为在试验的前期未进行不同 pH 的处理, 而是在生长 8 周后进行了短期 (12 d) 的 pH 处理, 由于栽培介质对低 pH 具有一定的缓冲性, 因此植株的生物量尚未产生差异. 但是在同样条件下,

AM 真菌的侵染、ALP 活性等有显著地降低,表明 AM 真菌对低 pH 的敏感程度高于宿主. 由于 AM 真菌能够促进宿主的养分吸收和生长,因此根据本试验所得数据可以推测,随着试验的延长,低 pH 最终必然降低生物量.

参考文献:

- [1] RILLING M C, STEINBERG P D. Glomalin Production by an arbuscular mycorrhizal fungus: A mechanism of habitat modification [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34: 1371-1374.
- [2] LI Xiao-lin, GEORGE E, MARSCHNER H. Extension of the phosphorus depletion zone in VAM white clover in a calcareous soil [J]. *Plant and Soil*, 1991, 136: 41-48.
- [3] LI Xiao-lin, GEORGE E, MARSCHNER H. Acquisition of phosphorus and copper by VA-mycorrhizal hyphae and root to shoot transport in white clover [J]. *Plant and Soil*, 1991, 136: 49-57.
- [4] CLARK R B, ZETO S K, ZOBEL R W. Arbuscular fungi isolate effectiveness on growth and root colonization of panicum vgtum in acidic soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31: 1757-1763.
- [5] AUJE R M. Water relation, drought and VA mycorrhizal symbiosis [J]. *Mycorrhiza*, 2001, 11: 3-42.
- [6] JONE E J, LEYVAL C. Time course of heavy metal uptake in maize and clover as affected by root density and different mycorrhizal inoculation regime [J]. *Biology and Fertilizer of Soil*, 2001, 33: 351-357.
- [7] 付晓萍, 田大伦. 酸雨对植物的影响研究进展 [J]. *西北林学院学报*, 2006, 21(4): 23-27.
- [8] 张美庆, 王幼珊. 我国东南沿海地区 AM 真菌群落生态分布研究 [J]. *菌物系统*, 2003, 7(3): 274-277.
- [9] 葛均青, 于贤昌, 王竹红. VAM 对植物矿质营养的效应 [J]. *土壤*, 2002(6), 337-343.
- [10] PHILLIPS J M, HAYMAN D S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection [J]. *Transactions of the British Mycological Society*, 1970, 55: 158-160.
- [11] ZHU Hong-hui, YAO Qing, SUN Xiao-tang, et al. Colonization, ALP activity and plant growth promotion of native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi at low pH [J]. *Soil Biology Biochemistry*, 2007, 39: 942-950.
- [12] BODDINGTON C L, DODD C J. Evidence that differences in phosphate metabolism in mycorrhizas formed by species of *Glomus* and *Gigapora* might be related to their life-cycle strategies [J]. *New Phytologist*, 1999, 142: 531-538.
- [13] 董昌金, 赵斌. 影响丛枝菌根真菌孢子萌发的几种因素研究 [J]. *植物营养与肥料学报*, 2003, 9(4): 489-494.
- [14] CLARK R B, ZETO S K. Growth and root colonization of mycorrhizal maize grown on acid and alkaline soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28: 1505-1511.
- [15] CLARK R B, ZETO S K. Mineral acquisition by mycorrhizal maize grown on acid and alkaline soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28: 1495-1503.
- [16] MASANORI S. Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall [J]. *New Phytologist*, 1995, 129: 425- 431.
- [17] TISSERANT B, GIANINAZZI-PEARSON V, GIANINAZZI S, et al. In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections [J]. *Mycological Research*, 1993, 97(2): 245-250.
- [18] KJØLLER R, ROSENDAHL S. Effects of fungicides on arbuscular mycorrhizal fungi: Differential responses in alkaline phosphatase activity of external and internal hyphae [J]. *Biology and Fertility of Soil*, 2000, 31: 361-365.
- [19] TOSHIHIRO A, GARYR D. Expression of alkaline phosphatase genes in arbuscular mycorrhizas [J]. *New Phytologist*, 2004, 162: 525-534.
- [20] VANAARLE I M, OLSSON P A, SÖDERSTRÖM B. Arbuscular mycorrhizal fungi respond to the substrate pH of their extraradical mycelium by altered growth and root colonization [J]. *New Phytologist*, 2002, 155: 173-182.
- [21] JONER E J, JOHANSEN A. Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi [J]. *Mycological Research*, 2000, 104: 81-86.

【责任编辑 李晓卉】