

丛枝菌根真菌根内菌丝碱性磷酸酶活性与菌根共生效应的研究*

冯海艳** 冯 固 宋建兰 王敬国 李晓林***

(中国农业大学资源与环境学院 北京 100094)
(农业部植物营养学重点实验室)

摘 要 试验研究 3 种丛枝菌根真菌根内菌丝碱性磷酸酶活性与菌根共生效应的结果表明,3 种丛枝菌根真菌对宿主植物的效应不同,与接种 *G. spp* 处理和未接种对照相比,接种 *G. m* 和 *G. i* 处理显著增加玉米地上部和根系干物质质量、P 浓度和吸 P 量,但两者间无显著差异;而接种 *G. spp* 处理与对照无显著差异。播种后 35d 时接种 *G. m* 和 *G. i* 处理根内菌丝碱性磷酸酶活性显著高于接种 *G. spp* 处理,而前二者间无显著差异,且随生长时间的变化趋势相似,35d 时酶活性最高,35~50d 呈迅速下降趋势,至 70d 时酶活性仍下降且趋于平缓。*G. spp* 酶活性则一直处于较低水平,随生长时间的延长略有起伏。即接种不同丛枝菌根真菌时,根内菌丝碱性磷酸酶活性高的菌根真菌对玉米生长促进作用较大,可提高玉米 P 营养状况;反之则对玉米生长和 P 营养状况无明显促进作用,且与对照无显著差异。出苗后 35d 时根内菌丝碱性磷酸酶活性是预测丛枝菌根真菌对玉米生长效应的有效生理指标之一。

关键词 丛枝菌根真菌 碱性磷酸酶活性 玉米 菌根共生效应

Studies on the relationship between the activity of alkaline phosphatase in intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizae fungi and efficiency of mycorrhizal symbiosis. FENG Hai-Yan, FENG Gu, SONG Jian-Lan, WANG Jing-Guo, LI Xiao-Lin (Department of Plant Nutrition, China Agricultural University; Key Laboratory of Plant Nutrition, Ministry of Agriculture, Beijing 100094), *CJEA*, 2004, 12(2): 124~127

Abstract The effects of the activity of alkaline phosphatase in intraradical hyphae of three arbuscular mycorrhizae fungi on the growth of maize are studied in this paper. The results show that *G. m* and *G. i* inoculated treatments can significantly improve the dry weight of the maize plants, P concentration and P uptake by maize plants compared with *G. spp* inoculated treatment. But there is no significant difference between *G. m* and *G. i* treatments. At 35 days after sowing (DAS), alkaline phosphatase (ALP) activity in intraradical hyphae of *G. m* and *G. i* is significantly higher than that of *G. spp*, however no significant difference appears between *G. m* and *G. i*. The changes of alkaline phosphatase activity of *G. m* and *G. i* at the infection age show similar trends. Alkaline phosphatase activity is highest at 35 DAS, but decreases sharply from 35 to 50 DAS and then keeps stable up to 70 DAS. As far as *G. spp* concerned, there is a little fluctuation of alkaline phosphatase activity at infection age, and the enzyme activity always keeps very low. In other words, when inoculating arbuscular mycorrhizae fungi with high alkaline phosphatase activity (35 DAS), the maize has a great improvement of dry weight and P nutrition. Otherwise, there is no significant effect when the maize is inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi of low alkaline phosphatase activity. In conclusion, ALP activity in intraradical hyphae at 35 DAS is a useful physiology marker for predicting AM fungi effect on mycorrhizal plants.

Key words Arbuscular mycorrhizae fungi, Activity of alkaline phosphatase, Maize, Efficiency of mycorrhizal symbiosis

丛枝菌根 (Arbuscular Mycorrhizae, AM) 真菌能与绝大多数高等植物形成共生体系,但丛枝菌根真菌与其宿主植物间共生关系无严格的专一性,且不同丛枝菌根真菌对植物生长的影响不同^[1~4]。相同土壤条件下菌种特性或宿主植物特性均会影响菌根效应的大小^[5]。碱性磷酸酶 (ALP) 是丛枝菌根共生体系中 1 种特异性的酶^[6],一些研究表明碱性磷酸酶活性的大小反映了菌根真菌活性强弱^[7]。根内菌丝磷酸酶活性表示菌根内部活性菌丝占全部菌丝的比例,代表菌根共生体中参与 P 代谢的菌丝比例^[8]。本试验以玉米为宿主植物,研究了接种 3 种不同菌根真菌的玉米生长变化及其与根内菌丝碱性磷酸酶活性的关系,为探寻预测菌根效应的生理指标提供理论依据。

* 中国与欧洲联盟合作项目 (MYCHINTEC-ICA4-CT-2000-30014) 部分研究内容

** 通讯新址:中国地质大学地球科学与资源学院(北京 100083)

*** 通讯作者

收稿日期:2003-03-06 改回日期:2003-04-30

1 试验材料与方 法

试验采用有机玻璃加工制成的 3 室培养装置,中室为接种室,左、右两室分别为真菌室和根系伸展室,真菌室与接种室间用 30 μ m 孔径尼龙网分隔,接种室与根系伸展室间用 1mm 孔径尼龙网分隔。根系伸展室内装入供试土壤(系中国农业大学昌平试验站长期肥料定位试验低 P 区土壤 Olsen-P 4.26mg/kg),真菌室装入直径为 1~2mm 的玻璃珠。供试玉米品种为“农大 108”,供试菌种为 *Glomus mosseae* 93(G. m, 由北京市农林科学院提供)、*Glomus intraradices* (G. i, 由法国国家农业研究所 LPA-INRA 提供)和 *Glomus* spp WUM26(G. spp, 由欧洲菌种中心 BEG 提供)。试验设未接种(对照,CK)、接种 G. m、G. i 和 G. spp 4 个处理,每处理 15 次重复,播种前将 200mg/kg N(NH₄NO₃)、150mg/kg K(K₂SO₄)、50mg/kg Mg(MgSO₄·7H₂O) 和 5mg/kg Zn(ZnSO₄·7H₂O)、50mg/kg P(Na-phytate)与土壤充分混匀,土壤过 2mm 筛于 120 $^{\circ}$ C 高压蒸汽灭菌 2h 以消除土著菌的干扰,于播种前将 330g 灭菌处理土壤装入接种室,于种子下方 1cm 深处平铺 30g 接种剂,其上覆 80g 土。对照组则加入相同重量的灭菌接种剂和 20mL 菌种滤液以保证微生物区系一致性。根系伸展室装入土壤 870g,真菌室装入无菌玻璃珠。自接种室和真菌室浇水且待水分渗透均匀后播种,接种室中播 4 粒玉米种子(播种前用 100g/kg H₂O₂ 对种子表面消毒 10min 后于蒸馏水中浸泡 2h),并在土壤表面覆 1 层石英砂,出苗后每盆留 2 株苗。

试验在菌根培养室中进行,生长期间温度维持在 20~30 $^{\circ}$ C,光照时间为 14h/d,每天 8:00~22:00 以生物镉灯补充光照,分别于玉米出苗后 35d、50d、70d 收获测定。取细根在冰水浴中洗净后切成 1cm 长根段,部分作侵染率测定,部分保存于液 N 中用于根内菌丝碱性磷酸酶的测定。称取 0.5g 鲜根以曲利苯蓝染色、制片镜检,计算菌根侵染率比例。取混合均匀的根于 20mL 酶解液(0.05mol/L pH9.2 三羟甲基氨基甲烷-柠檬酸,0.5g/kg 山梨醇,15U/mL 纤维素酶和 15U/mL 果胶酶)中室温下培养 2h,倾出酶液后加入染色液(0.05mol/L pH9.2 三羟甲基氨基甲烷-柠檬酸,1mg/mL α -萘酸性磷酸盐,1mg/mL 固蓝 RR 盐,0.5mg/mL 氯化镁,0.8mg/mL 氯化锰)置室温下培养过夜,最后倾出染色液于 10g/kg 次氯酸钠溶液中浸泡 5min 后再用水洗,选取 30 条根段制片,镜检深棕色颗粒状沉淀物,根据 Trouvelot 和 Gianiazzi-Pearson 方法计算根内菌丝碱性磷酸酶(ALP)活性。用钒钼黄比色法测定植株 P 含量。用 SAS 统计软件进行数据方差分析,用最小显著差异法(LSD)进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 接种不同菌根真菌对玉米生长的影响

接种不同菌根真菌对玉米生长的影响不同,3 个不同收获期接种 G. m 和接种 G. i 处理间玉米地上部干物质质量无显著差异,但二者均显著高于接种 G. spp 和未接种对照,而接种 G. spp 处理地上部干物质质量与未接种对照间无显著差异(见图 1a)。

出苗后 35d 时接种 G. i 处理玉米根系干物质质量显著高于未接种对照,而接种 G. m 和接种 G. spp 处理玉米根系干物质质量与未接种对照间无显著差异;出苗后 50d 时 3 个接种处理玉米根系干物质质量与未接种对照均无显著差异;出苗 70d 时接种 G. i 和接种 G. m 处理玉米根系干物质质量显著高于未接种对照和接种 G. spp 处理,且接种 G. spp 处理与未接种对照间无显著差异。3 个接种处理相比,3 个收获期接种 G. i 和接种 G. m 处理玉米根系干物质质量均显著高于接种 G. spp 处理,而接种 G. i 与接种 G. m 处理间前 2 个收获期无显著差异,出苗后 70d 时接种 G. i 显著高于接种 G. m 处理(见图 1b)。

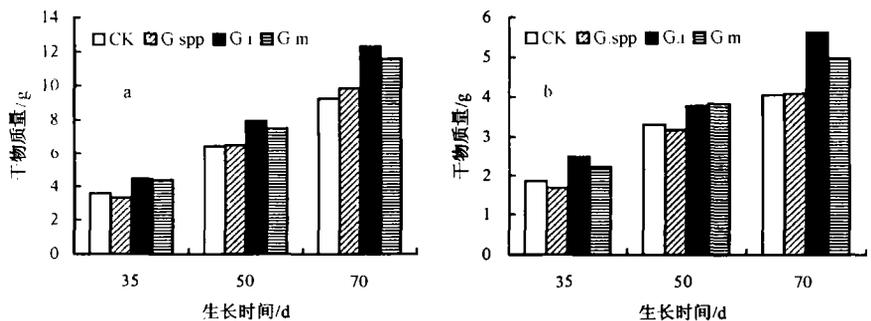


图 1 接种与未接种菌根真菌对玉米地上部(a)和根系(b)干物质质量的影响
Fig.1 Shoot(a) and root(b) dry weight of maize plants inoculated without or with AM fungi at days 35,50,70 after sowing

2.2 接种不同菌根真菌对玉米植株 P 营养状况的影响

接种不同菌根真菌对玉米植株 P 浓度的影响不同,3 个收获期接种 G. i 和接种 G. m 处理间玉米地上部

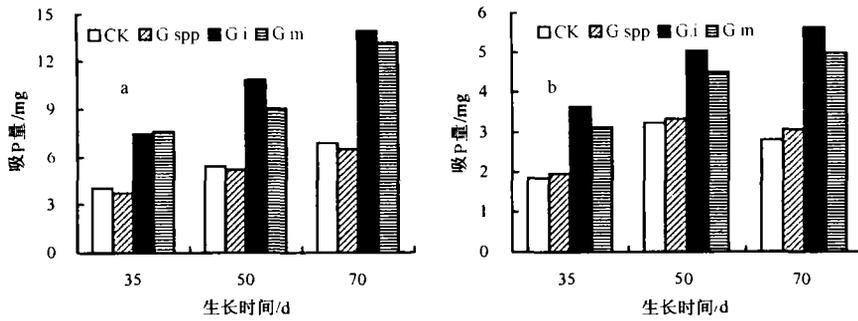


图 2 接种与未接种菌根真菌对玉米地上部(a)和根系(b)吸 P 量的影响

Fig.2 Shoots P(a) and roots P(b) uptake by maize plants inoculated without or with AM fungi at days 35, 50, 70 after sowing

P 浓度无显著差异,但二者均显著高于接种 G. spp 和未接种对照,且接种 G. spp 处理与未接种对照间差异不显著(见表 1)。出苗后 35d 和 70d 时接种 G. i 和接种 G. m 处理玉米根系 P 浓度均显著高于接种 G. spp 和未接种对照处理,而接种 G. spp 处理与未接种对照间差异不显著。出苗后 50d 时接种 G. i 处理玉米根系 P 浓度显著高于接种

G. spp 和未接种对照处理,且接种 G. m 和接种 G. spp 处理与未接种对照间均无显著差异。

接种不同菌根真菌对玉米植株吸 P 量的影响不同,3 个收获期接种 G. i 和 G. m 处理间玉米地上部和根系吸 P 量无显著差异,但二者均显著高于接种 G. spp 和未接种处理,而接种 G. spp 处理玉米地上部和根系吸 P 量与未接种处理间均无显著差异(见图 2a 和 b)。

2.3 接种不同菌根真菌对玉米侵染率的影响

菌根侵染率是反映真菌和植物之间亲合力的指标,本试验所有未接种处理玉米根系均未侵染,而 3 个接种处理则有不同程度侵染(见表 2)。表 2 表明出苗后 35d 时 G. i 侵染玉米的潜力显著高于接种 G. spp 处理,而 G. m 侵染玉米的潜力则介于二者

表 1 接种不同菌根真菌对玉米植株 P 浓度的影响*

Tab.1 P concentration of maize plants inoculated without or with AM fungus at days 35, 50, 70 after sowing

处 理 Treatments	地上部 P 浓度/g·kg ⁻¹ P concentration in shoot			根系 P 浓度/g·kg ⁻¹ P concentration in root		
	时间/d Times					
	35	50	70	35	50	70
CK	1.12b	0.84b	0.75b	1.00b	0.97b	0.70b
G.spp	1.11b	0.78b	0.66b	1.15b	1.04b	0.75b
G.i	1.68a	1.36a	1.13a	1.46a	1.33a	1.01a
G.m	1.73a	1.21a	1.14a	1.40a	1.16ab	1.00a

* 应用 LSD 法检验处理间差异水平,同栏不同字母表示差异达 5% 显著水平,下同。

表 2 接种不同菌根真菌对玉米侵染率的影响*

Tab.2 Infection rate of maize roots inoculated with different AM fungus at days 35, 50, 70 after sowing

处 理 Treatments	菌根侵染频率(F)/% Mycorrhizal infection frequency			菌根侵染强度(M)/% Mycorrhizal infection intensity			丛枝丰富度(A)/% Arbuscular abundance		
	时间/d Times								
	35	50	70	35	50	70	35	50	70
CK	0c	0c	0c	0d	0c	0d	0c	0c	0c
G.spp	62.4b	29.3b	58.0b	16.3c	6.8c	14.9c	0.7c	1.5c	0.1c
G.i	93.3a	87.3a	94.7a	78.7a	73.5a	73.5a	72.1a	62.4a	70.6a
G.m	83.5ab	81.7a	86.0a	61.4b	61.5b	61.5b	62.4a	40.1b	40.3b

* F(%)表示菌根真菌对植物根系的侵染频率,是 1 种真菌侵染某种宿主植物根系的潜力;M(%)表示菌根真菌对植物根系的侵染强度,它与用方格交叉法测定的菌根侵染率相似;A(%)则表示丛枝在根系中丰富程度。

2.4 接种不同菌根真菌根内菌丝碱性磷酸酶活性变化

根内菌丝碱性磷酸酶活性发生频率反映了某菌根真菌活性菌丝在根内分布的最大潜力,出苗后 35d 接种 G. i 和接种 G. m 处理间碱性磷酸酶活性发生频率无显著差异,但二者显著高于接种 G. spp 处理;出苗后 50d 3 个菌根真菌处理间均无显著差异;出苗后 70d 接种 G. m 处理的 F% 明显高于接种 G. i 和接种 G. spp 处理,而接种 G. i 和接种 G. spp 处理间无显著差异。接种 G. i 和接种 G. m 处理碱性磷酸酶活性发生频率随生长时间的延长呈下降趋势,且接种 G. i 处理下降速率高于接种 G. m 处理,而接种 G. spp 处理则呈先升后降趋势(见图 3)。根内菌丝碱性磷酸酶活性的发生强度反映根内菌丝碱性磷酸酶活性的强弱,出苗后 35d 接种 G. i 和接种 G. m 处理间根内菌丝碱性磷酸酶活性发生强度无显著差异,但二者显著高于接种 G. spp 处

间。出苗后 50d 和 70d 时 G. i 和 G. m 侵染玉米的潜力显著高于接种 G. spp 处理,但二者间无显著差异。3 个收获期内 3 种菌根真菌侵染强度差异均达显著水平,接种 G. i 处理侵染强度 > G. m > G. spp。丛枝是丛枝菌根形成的特殊器官,作为 P 传递的主要部位^[9] 其形成对共生体系有重要作用,出苗后 35d 时 G. i 和 G. m 处理在玉米根系中形成丛枝丰富度显著高于接种 G. spp 处理。出苗后 50d 和 70d 时 3 个接种处理在根系中形成丛枝丰富度为 G. i > G. m > G. spp。

理;出苗后 50d 和 70d 时 3 种菌根真菌处理根内菌丝碱性磷酸酶活性发生强度均无显著差异;且接种 *G. m* 和接种 *G. i* 处理根内菌丝碱性磷酸酶活性发生强度均呈出苗后 35d 最高,之后至 50d 时迅速降低,50~70d 呈缓慢降低趋势,而接种 *G. spp* 处理整个生长期均呈低-高-低平缓变化趋势(见图 4)。

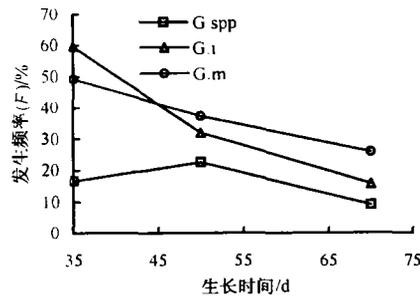


图3 根内菌丝碱性磷酸酶活性发生频率

Fig.3 Frequency of ALP activity of fungi in root revealed by ALP staining

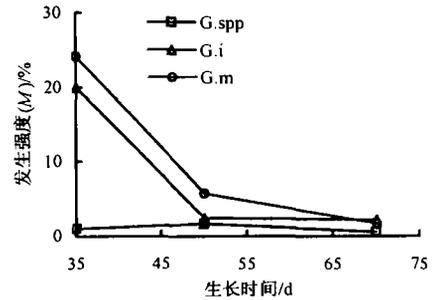


图4 根内菌丝碱性磷酸酶活性发生强度

Fig.4 Intensity of ALP activity of fungi in root revealed by ALP staining

3 小结与讨论

在 3 个收获期玉米接种 *G. m* 和 *G. i* 处理根内菌丝碱性磷酸酶活性均表现出高-低-低变化趋势,表明真菌在宿主植物生长前期碱性磷酸酶活性的提高,与植物生长加速过程相一致,而酶活性的降低则随侵染时间的延长而减弱,这与 Tisserant B. 等^[7]用野生型 *Platanus × acerifolia* (A. t.) 接种 *Glomus spp* (LPA7) 的试验结果相一致。已有研究结果表明碱性磷酸酶活性可判断丛枝菌根的侵染效率,是评价丛枝菌根真菌活性的生理指标^[7]。本试验出苗后 35d 时根内菌丝碱性磷酸酶活性高的菌根真菌 *G. i* 和 *G. m* 处理在玉米整个生长期均表现出明显促进生长效应,而根内菌丝碱性磷酸酶活性低的菌根真菌 *G. spp* 处理则无明显效应。故宿主植物生长发育前期根内菌丝碱性磷酸酶活性是预测丛枝菌根真菌效应的有效生理指标之一。

参 考 文 献

- Guillemin J. P., Orozco M. O., et al. Influent of phosphate fertilization on fungal alkaline phosphatase and succinate dehydrogenase activities in arbuscular mycorrhiza of soybean and pineapple. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 1995, 53:63~69
- Bago B., Azcon-Aguilar C., Piche Y. Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia*, 1998, 90:1~62
- Bentiveng S. P., Bever J. D., Morton J. B. Genetic variation of morphological characters within a single isolate of the endomycorrhizal fungus *Glomus clarum* (Glomaceae). *American Journal of Botany*, 1997, 84:9~1216
- Smith F. A., Smith S. E., Tansley Review. Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol.*, 1997, 137(96):3~388
- Miranda M. Hart, Richard J. Reader, John N. Klironomos. Life-history strategies of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to their successional dynamics. *Mycologia*. 2001, 93(6):1186~1194
- Masanori Saito. Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* becher and hall. *New Phytol.*, 1995, 129:425~431
- 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. *Mycol. Res.*, 1993, 97(2):245~250
- Rasmus Kjøller, Søren Rosendahl. Effects of fungicides on arbuscular mycorrhizal fungi: differential responses in alkaline phosphatase activity of external and internal hyphae. *Biology and Fertility of Soil*, 2000, 31:361~365
- Smith S. E., Dickson S., Morris C., et al. Transfer of phosphate from fungus to plant in VA 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