

# 菌根真菌磷酸酶活性对红三叶草生境中土壤有机磷亏缺的影响

宋勇春, 李晓林\*, 冯 固

(中国农业大学植物营养系, 北京 100094)

**摘要:** 利用 PVC 分室培养装置研究了菌根际和菌丝际磷酸酶活性变化与土壤有机磷亏缺间的关系。结果表明, 施用有机磷(植酸钠)能促进菌根根系侵染, 提高土壤磷酸酶尤其是酸性磷酸酶的活性。使菌丝际范围变宽。菌丝际的存在使土壤有机磷亏缺范围加大。与非菌根植物相比, 由于菌根真菌的作用, 植物能更容易地从有机磷中获得磷营养以满足植物生长的需要, 从而使其干物重和磷吸收量更高。

**关键词:** 菌根际; 菌丝际; 磷酸酶活性; 有机磷; 菌根真菌

## Effect of phosphatase activity on soil organic phosphorus loss in the environment of clover growth

SONG Yong-Chun, LI Xiao-Lin, FENG Gu (Department of Plant Nutrition, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** To study the relationship between activity of phosphatase and soil organic phosphorus in the rhizosphere and hyphosphere, mycorrhizal and non-mycorrhizal red clover (*Trifolium pratense* L.) were grown 10 weeks in sterilized soils in PVC pots with three compartments, a top one for root growth (rhizosphere), the central one for hyphal growth (hyphosphere) and the bottom where root and hyphae could not penetrate. The results showed that different phosphorus sources exerted different effects on soil phosphatase activity. Organic phosphate (Na-phytate) promoted phosphatase activity much more than  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Infection rate was also increased by organic phosphate more than by  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Dry weight and P uptake of red clover increased significantly in the treatments inoculating mycorrhizal fungus (*Glomus versiforme*) than those of non-mycorrhizal treatments. Soil organic phosphorus concentration decreased within the range by the affected hyphae.

**Key words:** mycorrhizosphere; hyphosphere; activity of phosphatase; organic phosphorus; mycorrhizal fungus

文章编号: 1000-0933(2001)07-1130-06 中图分类号: S154 文献标识码: A

草地占全国国土面积的 40%, 是我国国土上最广阔的植被, 分布在范围广泛的生态环境中。当前草地生态环境恶化已经到了令人严重忧虑的程度。草原生态系统中植被与土壤之间构成一个相互作用、相互影响、相互制约协调发展的统一系统。土壤退化所导致的土壤肥力下降会引起植被生境的恶化。磷素作为植物生长发育的必需营养元素之一, 不仅是植物体内许多重要化合物的组分, 而且还以多种途径参与植物体内的各种代谢过程, 在人类赖以生存的土壤-植物-动物生态系统中, 磷起着其它元素不可替代的作用<sup>[1]</sup>。植

基金项目: 国家重点基础研究规划项目(G1999011807)和国家自然科学基金(40071050)资助项目

收稿日期: 2000-06-05; 修订日期: 2000-12-26

\* 联系作者

陆景陵先生生态力学数据致谢。

作者简介: 宋勇春(1970~), 女, 黑龙江省萝北县人, 博士。主要从事根际微生物生态学研究。现在南京大学生命科学院工作。

物所需磷素一般是通过根系由土壤中吸获得。土壤对水溶性磷酸盐的吸附和固定致使磷肥利用率不高是制约作物增产的重要因素,而通过生物活化是解决这一问题的重要途径之一。

丛枝菌根(AM)真菌可侵染众多植物,通过增加宿主植物对土壤磷的吸收和利用,从而改善植物磷素营养而促进其生长发育的现象已为人们所熟知。土壤中约有 20%~80% 的磷以有机形式存在,有机磷循环对磷的有效性和生态系统的可持续发展有重要作用<sup>[2]</sup>。但有机磷只有在水解转化为无机磷后才能大量被植物利用,有机磷水解又直接与磷酸酶或植酸酶的作用有关<sup>[3]</sup>。多年来关于菌根对土壤无机磷利用机理的研究已有大量工作,也取得了长足进展,但关于丛枝菌根真菌能否分泌磷酸酶及其在提高土壤有机磷利用效率中的作用研究较少,且有争议。Joner 和 Jakobsen 认为菌丝能降解膜界面以外的土壤无机磷,但不影响土壤有机磷的含量<sup>[4]</sup>。Tarafdar 和 Marschner 指出,接种菌根真菌可以增加土壤磷酸酶活性,促进土壤有机磷的水解<sup>[5]</sup>。本试验以需磷量大的豆科牧草红三叶草为供试植物,利用分室培养系统研究了根际、菌根际和菌丝际的土壤磷酸酶活性变化和土壤有机磷亏缺间的关系来说明 AM 菌根真菌磷酸酶在有机磷矿化中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验用盆

采用 PVC 管(内径 9.2cm)制成的三室隔网装置(见图 1),包括根室(高 8cm)、菌丝室(高 4cm)和土壤管(高 4cm),根室和菌丝室之间用孔径 30 $\mu$ m 的尼龙网隔开,使根系限制在根室中生长,而菌根菌丝可以穿过尼龙网到菌丝室土壤中吸收养分,达到将根系吸收区分离的目的。菌丝室与土壤室之间用 0.45 $\mu$ m 的微孔滤膜隔开,使菌丝不能穿过,以在隔膜处形成一菌丝际。

### 1.2 供试土壤

采自中国农业大学昌平长期肥料定位试验地只施氮肥的小区,施氮(N)水平为 270kg/hm<sup>2</sup>。土壤过 2mm 筛后,在 121℃ 下高压蒸汽灭菌 2h,以消除土壤中的真菌孢子和其它土壤微生物。供试土壤农化性状如下:有机质(O.M)1.24%,全氮 0.08%。速效氮 87.2mg/kg,有效磷(Olsen-P)3.06mg/kg,总磷 27.2mg/kg,速效钾(NH<sub>4</sub>OAC-A)100.3mg/kg,pH7.5。

### 1.3 供试作物和菌根菌种

供试作物红三叶草(*Trifolium pratense* L.)。供试菌根菌种由中国农业科学院土壤肥料研究所汪洪钢提供。菌根真菌(*Glomus versiforme*)经玉米繁殖 3 个月,用含有受真菌侵染的根段和含有菌丝的根际土壤作为菌根接种剂。

### 1.4 试验设计

试验设 3 种施肥处理,分别为不施磷肥(CK)、施无机磷磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)和施有机磷植酸钠(Na-phytate),施磷量为 P(50mg/kg)。每个施肥处理又分别设接种 *Glomus versiforme*(+M)和不接种(-M)处理,共 6 个处理,每个处理重复 5 次。各处理均施有 N(NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)200mg/kg、K(K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)150 mg/kg、Mg(Mg-SO<sub>4</sub>)50mg/kg 和 Zn(ZnSO<sub>4</sub>)5mg/kg。作物生长期间追施 1 次氮肥 N(50mg/kg),以保证氮素供应充足。

### 1.5 接种方法

将 50g 接种剂和 500g 土壤完全混匀后装入接种菌根处理的根室,对照组则加入相同重量经灭菌处理的接种剂和 10ml 菌种滤液,以保证土壤微生物区系一致。菌丝室土壤为 340g。

### 1.6 播种

三叶草种子在 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液中浸泡 10min 进行表面消毒,而后置于湿润的滤纸上放置一昼夜使之发芽,每盆在根室中播 100 粒,并在根室土壤表面覆盖一层石英砂以减少水分蒸发。

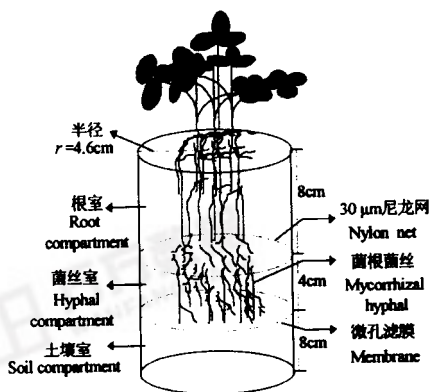


图 1 试验装置示意图

Fig. 1 Diagram of the pot used

1.7 温度和光照

试验在生长室中进行,生长期温度维持在 20~25℃,光照时间为 14h/d,每天 8:00~22:00 用生物镉灯补充光照。

1.8 收获和测定

三叶草生长 10 周后收获,将根系取出洗净后,称取 0.5g 鲜根用锥虫蓝染色后以方格交叉法测定菌根侵染率和根系长度。收获后将边室土壤按 1mm 和 5mm 间距切取新鲜土样,用于测定土壤磷酸酶活性。用改进的 Tabatabai & Brimmer 方法测定磷酸酶: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 CaCl<sub>2</sub> 充分混匀,用定量滤纸过滤。试验中须设相应的无土和无基质对照。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 NaCO<sub>3</sub> 作缓冲液。酶活性单位(Eu)为小时每克土水解 1μmol PNPP(对硝基苯磷酸二钠)的值。

2 试验结果

2.1 接种菌根真菌的生长效应

由各管理红三叶草的根系菌根侵染率(见表 1)可以看出,未接种菌根真菌的处理均未发现有菌根侵染,而接种菌根真菌的植株不论根室土壤施磷处理如何都有较高度度的侵染,但磷酸二氢钾处理菌根侵染率明显低于其它处理。收获后对 0.45μm 微孔滤膜显微观察发现,其上布满了大量的菌丝(图 2)。从表 1 还可以看出,不接种条件下,菌丝室施用不同磷源对红三叶草植株生长影响不大。与不接种处理相比,AM 菌根对红三叶草植株生长有显著促进作用,接种处理的植株干物重显著增加。施用磷酸二氢钾和植酸钠两种磷源显著增加了红三叶草植株的干物重,其对植株干物重的增加幅度远大于相应的不接种处理,其中磷酸二氢钾的生长效应大于植酸钠(表 1)。上述结果表明,接种 AM 菌根真菌提高了不同磷源对红三叶草的生物有效性。

表 1 植株干物重、菌根侵染率及吸磷总量

Table 1 Dry weight of plant, mycorrhizal infection rate and total P uptake

| 处理<br>Treatment                 | 菌根侵染率             |          | 干物重               |         | 吸磷总量(mg/pot) |         |
|---------------------------------|-------------------|----------|-------------------|---------|--------------|---------|
|                                 | Infection rate(%) |          | Dry weight(g/pot) |         | P uptake     |         |
|                                 | -M                | +M       | -M                | +M      | -M           | +M      |
| CK                              | 0                 | 68.5 a * | 4.51 a            | 9.34 c  | 3.02 a       | 9.14 c  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0                 | 52.2 b   | 4.75 a            | 12.78 a | 3.16 a       | 15.71 b |
| Na-phytate                      | 0                 | 63.4 ab  | 4.53 a            | 11.79 b | 3.09 a       | 17.62 a |

\* 应用 LSD 法检验处理间差异程度,同一列中的不同字母表示差异达到 5%显著水平(下同) The LSD method was used to test the significance of difference,mean values followed the same letters in a collum are not significantly different at  $p\leq0.05$

表 1 的结果还表明,植株的吸磷量不仅受磷源的影响而且还与菌根形成与否密切相关。不论是植株地上部还是根系的吸磷量皆以既不施磷也未接种菌根的处理最低。施用不同磷源都增加了红三叶草植株的吸磷量,不接种条件下,表现为磷酸二氢钾处理的吸磷量增加幅度大于植酸钠。接种条件下,植酸钠处理植株吸磷总量高于磷酸二氢钾处理。上述结果表明,接种菌根真菌,菌根化植株根系活化利用磷的能力增强。接种 *Glomus versiforme* 提高了根系利用有机磷(植酸钠)的能力。

2.2 根室土壤磷酸酶活性比较

图 3 为各处理土壤酸性与碱性磷酸酶活性变化图。可以看出,接种后各处理根室土壤酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性都有所增加。与种植前相比,根际土壤酸性磷酸酶活性增加 7.2~16 倍,碱性磷酸酶活性增加 2.6~5.3 倍。酸性磷酸酶活性明显高于碱性磷酸酶活性,可见酸性磷酸酶在供试土壤中占主要地位。然而,同一磷源条件下接种与不接种处理间的酸性磷酸酶活性差异不大。这说明在根室土壤中根系诱地产生的磷酸酶占主要地位,植物根系对酸性磷酸酶的贡献比菌根真菌更大。从图 3 还可以看出有机磷处理增

加了根际土壤的酸性磷酸酶活性,而无机磷处理则有降低根际土壤酸性磷酸酶活性的趋势,碱性磷酸酶活性也有相似趋势。



图 2 0.45 $\mu\text{m}$  微孔滤膜上形成了浓密的菌丝网( $\times 250$ )  
Fig. 2 Hyphae accumulated on the  
0.45 $\mu\text{m}$  membrane

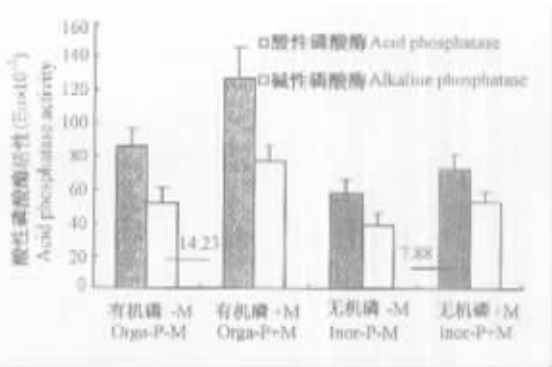


图 3 根室磷酸酶活性比较  
Fig. 3 Compare phosphatase activity in  
the root compartment

2.3 菌根际和菌丝际土壤磷酸酶活性变化规律

从图 4 可以看出,对无机磷而言,接种处理酸性磷酸酶活性远高于不接种处理。菌丝室土壤磷酸酶活性在距根表 3mm 范围内变化最大,3~9mm 次之,之后变化渐小直到某一相对稳定的水平,在 40mm 处由于微孔滤膜的阻隔作用使菌丝在此富集,引起磷酸酶活性明显升高,其影响范围大约为 1~2mm,受菌丝影响的这一区域称为菌丝际。而对有机磷处理而言,受菌根真菌影响的菌丝际范围更大( $>2\text{mm}$ )(图 4),可见有机磷处理真菌的贡献比无机磷更大,这与 Tarafdar 和 Marschner 的研究结果一致<sup>[5]</sup>。

菌根际和菌丝际的碱性磷酸酶活性变化趋势与酸性磷酸酶相似,但接种菌根真菌对其影响较小。菌丝际范围也比酸性磷酸酶影响区域小(1mm 左右)(图 5)。从以上结果可以看出,接种菌根真菌对酸性磷酸酶的影响大,推测菌丝能分泌胞外酸性磷酸酶。

图 4 和图 5 的结果表明菌根真菌对磷酸酶活性有贡献,其贡献大小取决于磷酸盐形态。有机磷能提高磷酸酶的活性并能促进菌丝的生长。菌根菌丝对酸性磷酸酶的贡献比碱性磷酸酶大,菌丝对整个菌丝室土壤磷酸酶活性的影响不一致,距根表 3mm 范围内变化较大,菌丝室土壤磷酸酶活性比不受根系或菌丝影响的土壤室的活性高。

2.4 菌根际和菌丝际土壤有机磷变化

从图 6a 可以看出,接种条件下距根表 9mm 范围内,由于菌丝的作用,有机磷都明显低于远根处形成一个较大的磷亏缺区,整个菌线室内有机磷处理的土壤有机磷含量低于无机磷处理。在隔网处(0.45 $\mu\text{m}$  微孔滤膜),由于菌丝不能穿过,因此在此处聚集形成一个菌丝际,从图 6a 可以看出此处有机磷含量下降系菌丝磷酸酶活化的结果。这一区域影响的范围约为 2~3mm。整体上看图 6a 似两个阶梯,0~9mm 土壤有机磷亏缺是菌根的影响产生的。40~42mm 形成的有机磷亏缺区是菌丝的影响产生的。对照图 4 和图 5,正好是倒阶梯形,从图 4~图 6a 可以看出磷酸酶活性越高处,土壤有机磷含量越低,二者成显著的负相关关系( $r = -0.892, p < 0.01, n = 19$ )。而不接种条件下只在

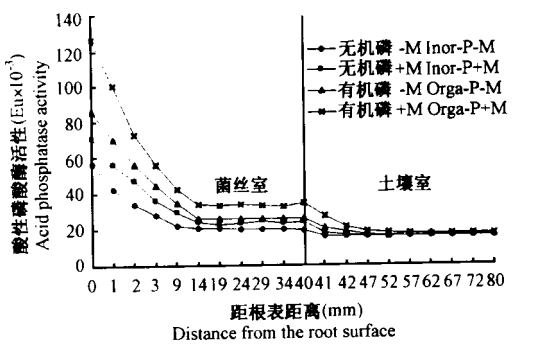


图 4 菌丝室和土壤室磷酸酶活性比较  
Fig. 4 Compare activity of phosphatase  
in hyphal and soil compartment

距根表 3mm 左右的范围内出现明显的有机磷亏缺区(图 6b)其它层次的土壤有机磷含量基本一致,没有磷亏缺出现。

从以上结果可以看出,菌根菌丝的存在确实能使土壤有机磷发生亏缺,这对有效磷含量低的土壤中生长的红三叶草的磷营养具有重要意义。

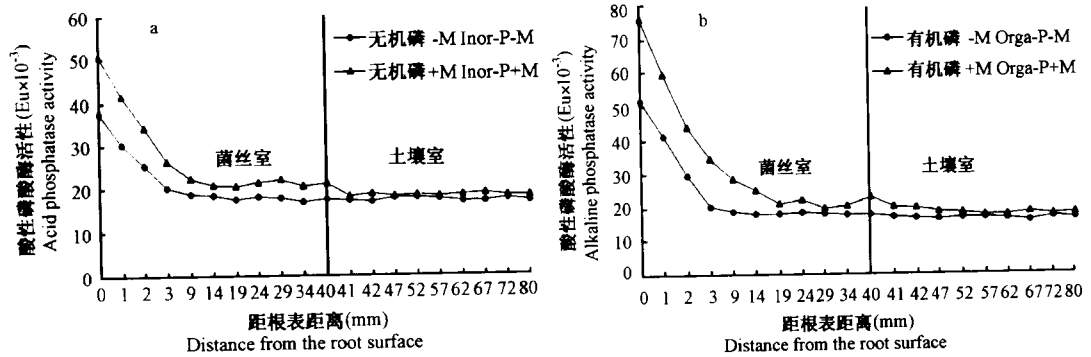


图 5 菌丝室和土壤室磷酸酶活性比较

Fig. 5 Compare activity phosphatase in hyphal and soil compartment

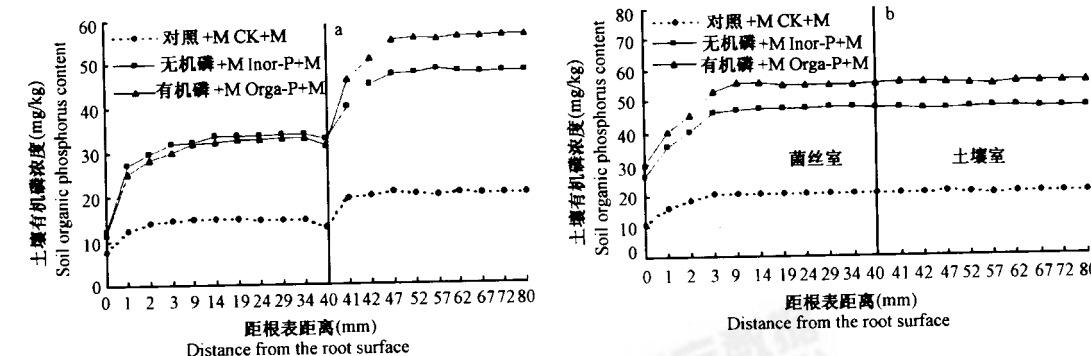


图 6 菌丝室和土壤室土壤有机磷变化比较

Fig. 6 Compare soil organic phosphorus in hyphal and soil compartment

3 讨论

决定有机磷有效性的两个主要因素是磷源的溶解性和它对植物和土壤磷酸酶的敏感性。已经证实,外生菌根真菌(特别是在树木上)可以产生胞外酸性磷酸酶促进有机磷源的磷释放<sup>[6]</sup>。目前尚不能确定菌根真菌是否能产生胞外酸性磷酸酶。本试验的结果(图 4 和图 5)提供了外生菌丝体产生酸性磷酸酶的直接证据。通常认为增加菌根际和根系活性可以提高磷酸酶活性,因为磷酸酶是诱导酶。土壤有机磷含量高可以增加植物来源的磷酸酶活性,也增加了菌丝分枝和真菌的腐生生长。根室中根系总长度数量大,根室内菌丝不可能对菌根植物的磷酸酶活性贡献更多。因为植物只分泌酸性磷酸酶<sup>[7]</sup>,故碱性磷酸酶活性的增加主要归功于丛枝菌根真菌,而植物生长在灭菌条件下其它微生物作用是不存在的,只能是菌根真菌的作用。

Dodd 等发现受 *Glomus mosseae* 侵染的植物根际的磷酸酶活性来源于植物根系和丛枝菌根<sup>[8]</sup>。本试验条件下,使根室和菌丝室分离,接种或不接种菌根真菌的整个根室和菌丝室磷酸酶活性的明显差异,进一步证实了菌丝能产生磷酸酶(图 4 和图 5)。Gianinazzi 等曾用组织化学方法定位受菌根真菌侵染的根系磷酸酶,在超微结构水平上证明了植物根细胞的细胞质和菌根菌丝生长尖端存在酸性磷酸酶活性<sup>[9]</sup>。

本试验选用的植酸钠作为一种模式物质,可以用来证实从枝菌根根外菌丝磷酸酶的贡献及其对有机磷的利用,另外,植酸钠溶解性好并是磷酸酶的反应底物,施用于土壤后由于其移动性强而会扩大其生长效应。所以,进一步研究应选用其它形态的植酸盐来证明磷酸酶的水解作用,更能说明问题。

本试验的结果证明了菌根真菌产生的磷酸酶在有机磷矿化中起作用。菌根在有机磷矿化中的作用可以是直接的或间接的,菌根产生的磷酸酶或其它种类的酶对有机磷的水解是其矿化的直接原因<sup>[8]</sup>;有研究证实菌根际比非菌根际磷酸酶活性更高<sup>[4]</sup>。所谓菌根对有机磷的间接矿化是指菌根菌丝只能在其它土壤微生物或那些与菌根真菌相连的微生物将有机磷矿化后才能获得磷。Jayachandran 等指出,在人工介质和灭菌土壤中发生的有机磷矿化没有土壤微生物参与<sup>[10]</sup>。从目前的研究中还不能确定所观察的矿化是否是直接作用的影响,但均证实菌根植物能从难溶性磷源中得到磷。然而,目前研究中所用的分室隔网技术不能确定所观察到的矿化是菌根作用的直接结果还是与菌根相连的微生物区系的间接影响。

本试验根室土壤中的有机磷可通过根和菌根真菌磷酸酶的作用被矿化,在菌丝室有机磷亏缺区扩展到 2mm 之外。有机磷亏缺和菌丝际磷酸酶活性间有很高的相关性。这些结果表明,菌丝际的有机磷亏缺是真菌作用的结果,这表明除了外生菌丝的影响外,菌根和非菌根植物获得磷的模式一致。从所得结果可以看出(图 4~图 6),对土壤分割应更细才能确定有机磷的确切亏缺范围,而不致造成假象,进一步研究时应加以改进。

本试验是在灭菌条件下进行的,除菌根真菌外接种与不接种处理各项指标无差异,因此菌丝际多亏缺的有机磷只能是菌根菌丝矿化作用的结果。本试验证明了菌根真菌的外生菌丝能产生磷酸酶,从而使菌根植物能从有机磷源中获得更多可利用的磷。但由于本试验无法排除菌种中所含其它微生物的影响,还不能对所得结果下定论,深入研究菌根真菌解有机磷的作用机制应集中在排除微生物的干扰上。

从以上研究结果可以看出,接种菌根真菌后各磷源的利用率都大大提高,如果能将菌根真菌广泛应用于难溶性磷含量高的草地土壤,将可大幅度提高牧草作物的产草量,在不施磷的情况下获得同样的增的效果。并可减少大量施用磷肥所造成的环境污染,在维持农业的可持续发展中具有重要的生态意义。

## 参考文献

- [1] 王庆仁,李继云,李振声. 高效利用土壤磷素的植物营养学研究. 生态学报,1999,19(3):417~421.
- [2] Suanne Krämer,Douglas M. Acid and alkaline phosphatase dynamics and their relationship to soil microclimate in a semiarid woodland. *Soil Biology & Biochemistry*,2000,32:179~188.
- [3] Beck E,Fußeder A and Kraus M. The maize root system in situ:evaluation of structure and capability of utilization of phytate and inorganic soil phosphates. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*,1989,152:159~167.
- [4] Joner E J and Jakobsen I. Contribution by two arbuscular mycorrhizal fungi to P uptake by cucumber(*Cucumis sativus* L.) from <sup>32</sup>P-labelled organic matter during mineralisation in soil. *Plant and Soil*,1994,163:203~209.
- [5] Tarafdar J C and Marchner H. Efficiency of VAM hyphae in utilisation of organic phosphorus by wheat plants. *Soil Science and Plant Nutrition*,1994,40:593~600.
- [6] HaeuBling N and Marschner H. Organic and inorganic soil phosphates and acid phosphatase activity in the rhizosphere of 80-year-old norway spruce tree. *Biol Fertil Soil*,1989,8:128~133.
- [7] Tarafdar J C. Use of electrofocussing technique for characterizing the phosphatases in the soil and root exudates. *Journal of the Indian Society of Soil Science*,1989,37:393~395.
- [8] Dodd J C,Burton C C,Burns R G,et al. Phosphatase activity associated with the roots and the rhizosphere of plants infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New phytologist*,1987,107:163~172.
- [9] Gianinazzi S,Gianinazzi Pearson V D. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Ultrastructural localization of acid and alkaline phosphatase in onion roots infected by *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd). *New Phytol.*,1979,82(1):127~132.
- [10] Jayachandran K,Schwab A P,Hetrick B A D. Mineralisation of organic phosphorus by Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry*,1992,24:897~903.