

丛枝菌根真菌对三叶草根分泌的有机酸组分和含量的影响

张玉凤, 冯 固*, 李晓林

(农业部植物营养学重点实验室, 教育部植物-土壤相互作用重点实验室, 中国农业大学资源与环境学院植物营养系, 北京 100094)

摘要:比较洗根法、层析纸法和琼脂膜法收集土培条件下生长的菌根化和非菌根化三叶草根分泌物的效果。试验采用三室根箱装置, 将根系与菌丝生长空间分开, 三叶草生长 56d 后, 打开三室根箱装置, 由于尼龙网的阻挡作用使根系均匀垫积在尼龙网内侧并形成根垫。分别采用洗根法、层析纸法和琼脂膜法 3 种方法收集三叶草根分泌物, 并通过高效液相色谱方法测定分泌物中草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、顺丁烯二酸、反丁烯二酸、柠檬酸、丁二酸等有机酸的含量。结果表明: 3 种收集方法收集的三叶草分泌的有机酸无论在种类上还是在数量上都存在相当大的差别。从检测到的有机酸种类来看, 琼脂膜法收集检测到苹果酸、乙酸、顺丁烯二酸、柠檬酸、丁二酸和乳酸 6 种有机酸; 洗根法收集的分泌物检测到酒石酸、苹果酸、乙酸、顺丁烯二酸、柠檬酸、丁二酸和乳酸 7 种有机酸; 层析纸法收集的分泌物检测到酒石酸、苹果酸、柠檬酸和乳酸 4 种有机酸。从收集到的有机酸数量来看, 洗根法收集到的有机酸总量为 $29.97 \sim 232.7 \mu\text{g}/(\text{gfw} \cdot 2\text{h})$; 琼脂膜法集到的有机酸总量为 $1.5 \sim 7.3 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot 2\text{h})$; 层析纸法收集的有机酸总量为 $0.23 \sim 6.58 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot 2\text{h})$ 。丛枝菌根真菌侵染对三叶草根分泌的有机酸的组分和含量都有一定影响, 洗根法和琼脂膜法收集到的分泌物都表现出菌根化三叶草分泌的有机酸总量低于非菌根化三叶草的趋势。琼脂膜法和层析纸法是目前比较合适的收集土培植物根分泌物的方法。琼脂膜法可以反映植物的自然分泌状况, 对分泌物吸附容量大, 但琼脂膜在根系表面容易失水, 准确定量有一定的困难, 其结果只能是半定量; 层析纸法的操作简单, 能反映植物的自然分泌状况, 但层析纸的吸附容量低, 用于收集分泌物数量较大的植物可能更为合适; 洗根法不是收集土培菌根分泌物的理想方法, 此法虽然容易定量, 但在收集的过程中, 根系将遭受暂时的营养胁迫, 不能真实反映植物的自然分泌状况, 同时此方法容易伤害根系造成细胞内物质泄漏。

关键词:丛枝菌根真菌; 分泌物; 有机酸

The effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the components and concentrations of organic acids in the exudates of mycorrhizal red clover

ZHANG Yu-Feng, FENG Gu, LI Xiao-Lin (Department of Plant Nutrition, China Agricultural University; Key Laboratory of Plant Nutrition, MOA; Key Laboratory of Plant-Soil Interaction, MOE, Beijing 100094, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(1): 30~37.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(49961005, 50071050); 中国科学院阜康站开放基金资助项目

收稿日期:2001-10-18; **修订日期:**2002-11-11

作者简介:张玉凤(1972~), 女, 山东聊城人, 博士。主要从事菌根分泌物的研究。E-mail: zhangyufeng 1972@163.com

* 通讯联系人 Author for correspondence, E-mail: fenggu@mx.cei.gov.cn

Foundation item: The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 49961005, No. 50071050) and Opening Foundation of Fukang ecological station of CAS

Received date: 2001-10-18; **Accepted date:** 2002-11-10

Biography: ZHANG Yu-Feng, Doctor. Mainly engaged in the root exudates of arbuscular mycorrhizal plants.

Abstract: Three compartment pots were used to compare the rinsing root method, chromatography paper method and agar sheet method which were used to collect root exudates from the roots of mycorrhiza and non-mycorrhiza red clover. Each pot was separated into three parts by 30 μm nylon mesh, a central one for root growth and two outer ones for growth of arbuscular mycorrhizal hyphae. Roots layers were formed on the both sides of central compartment 8 weeks after planting. Root exudates were collected by putting filter paper or agar sheet on the root surface for 2 hours. After that, the plants were taken out and washed to clean the soil particles. The plants were then kept in deionized water for another 2 hours to collect roots exudates. The concentrations of tartaric, malic, lactic, acetic, maleic, citric and succinic acids in root exudates collected by the three methods were detected by high performance liquid chromatography. The results showed that both the components and the concentrations of organic acids in the exudates collected by three methods were different. Tartaric, malic, lactic, acetic, maleic, citric and succinic acids were detected in the exudates collected by rinsing root method. There was no tartaric acid in the exudates collected by agar sheet method and only tartaric, malic, acetic and citric acids in the exudates collected by chromatography paper method. The total amount of organic acids collected by root-rinsing method was $29.97 \sim 232.7 \mu\text{g}/(\text{g. fw} \cdot 2\text{h})$, while agar sheet method and chromatography paper method collected organic acids about $1.5 \sim 7.3 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot 2\text{h})$ and $0.23 \sim 6.58 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot 2\text{h})$, respectively. The total amount of organic acids in mycorrhizal plants collected by rinsing root method and agar sheet method were higher than that of non-mycorrhizal plants. Agar sheet method and chromatography paper method were proper for collection of root exudates. However, the absorption capacity of chromatography paper was low, it was probably suitable for the plant with a large amount of root exudates. Agar sheet method could reflect the situation of the plants exudation, but the loss of water from the agar sheet made it a semiquantitative method. Rinsing root method was not a good one for collecting root exudates of plants growing in soil due to the difficulty of washing out the fine clay from root surface. It also easily injures roots and causes leakage of solutes in roots.

Key words: arbuscular mycorrhizal fungi; root exudates; organic acid

文章编号:1000-0933(2003)01-0030-08 中图分类号:Q945.12.S154.S182 文献标识码:A

在石灰性土壤上,丛枝菌根能够活化土壤难溶性磷,改善植物磷营养状况^[1]。其机理被认为有3种:①丛枝菌根菌丝直径小,比表面比根毛大,与土壤颗粒接触更加紧密^[2];②丛枝菌根释放 H^+ 降低土壤 pH 值^[3];③丛枝菌根分泌有机酸螯合金属离子,使与金属离子结合的磷酸根释放出来。前两种机理都有了实验证据,而第3种机理由于受研究方法的限制,至今尚无定论。许多水培试验证明,在缺磷条件下,植物本身通过分泌质子和有机酸来降低根际 pH 值,提高根际难溶性磷的吸收和利用^[4,5]。Lipton 等报道缺磷的植物可通过分泌大量有机酸特别是苹果酸和柠檬酸活化根际土的难溶性磷^[6]。Gardner 等发现白羽扇豆 (*Lupinus albus* L.) 在缺磷时可在排根处大量分泌柠檬酸,其释放量占总干重的 11%,柠檬酸活化的磷可以满足白羽扇豆生长的需要^[7]。

由于丛枝菌根真菌不能离体培养,而只有与宿主植物共生时才能生存,这就在某种程度上限制了对丛枝菌根分泌物的研究。目前有关菌根分泌物的收集主要采用洗根法,该方法虽容易定量,但不能反映植物的自然分泌状况^[8,9]。为了收集植物自然生长状况下的根系分泌物,1995 年 Azaieh 提出用琼脂膜法原位收集菌根分泌物,由于琼脂膜中的水分难以控制,故无法准确定量^[10]。从此之后对菌根分泌物的研究方法未取得任何突破性的进展。1999 年 Neumann 提出了用层析纸法定位收集水培白羽扇豆根分泌物^[11]。该方法为收集土壤菌根分泌物提供了一种新思路。

正是由于缺少收集、提取、鉴定土壤条件下菌根分泌物的有效方法,及土壤中微生物对分泌物的吸收、利用及分泌物本身多组分、易分解和易污染的特性,使得菌根分泌物的有效提取、分离与准确测定十分困

难。有关此方面的报道较少,研究结果多不统一。针对上述情况,本试验的主要目的是比较洗根法、层析纸法和琼脂膜法收集土壤条件下生长的三叶草根分泌物的效果;探讨丛枝菌根对植物根分泌物的组分和含量是否有影响,为揭示丛枝菌根活化磷机理提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验装置 采用有机玻璃加工而成的三室根箱装置(见图1)。中室和两边室之间用 $30\mu\text{m}$ 孔径的尼龙网相隔,把根系限制在中室内生长,而丛枝菌根菌丝则可以穿过尼龙网伸展到两边室去吸收养分,从而达到将植物根系和根外菌丝在生长空间上分开的目的。

1.2 供试土壤 采用北京大兴县庞各庄乡的砂土。风干,过 2mm 筛,用高压灭菌锅在 121°C 蒸汽压下灭菌 2 小时,以杀灭土壤中的土著菌根真菌,风干备用。土壤的基本理化性状为:全氮 0.027% , Olsen-P 8.11mg/kg ,速效钾 $(\text{NH}_4\text{Ac-K}) 47.90\text{mg/kg}$,缓效钾 $(1\text{mol/L HNO}_3\text{-K}) 611.4\text{mg/kg}$, pH 值(盐浸) 8.10 。

1.3 供试作物 红三叶草(*Trifolium pratense* L.)。

1.4 丛枝菌根菌种 *Glomus mosseae*。预先经三叶草盆栽繁殖,含有菌根真菌孢子、根外菌丝、感染的植物根段及根际土壤的混合物用作菌根菌接种剂。

1.5 试验设计 本试验设置 20mg/kg P (P_{20}) 和 150mg/kg P (P_{150}) 两个施磷水平,每个施磷水平分接种 (+M) 和不接种 (-M) 菌根真菌,共 4 个处理即 $\text{P}_{20}-\text{M}$, $\text{P}_{20}+\text{M}$, $\text{P}_{150}-\text{M}$, $\text{P}_{150}+\text{M}$, 每个处理 4 次重复。为保证其它养分的正常供应,同时施入 $\text{N}(\text{NH}_4\text{NO}_3)$ 100mg/kg , $\text{K}(\text{KCl}) 150\text{mg/kg}$, 所有肥料均与土壤混匀后作基肥施入。

1.6 接种方法 将接种剂与供试土壤按 $15:100$ 的比例混匀装入丛枝菌根处理的中室,对照处理则加入相同重量灭菌处理的菌种土和菌种滤液,以保持处理间除真菌外的其它微生物区系一致。

1.7 播种 三叶草种子在 10% 双氧水中浸泡 10min , 进行表面消毒,而后置于湿润的滤纸上催芽,然后播于中室土壤中,每室 30 粒,并在土壤表面覆盖一层约 0.5cm 石英砂以减少水分的蒸发。

1.8 生长条件 试验在室内进行,生长期温度控制在 $20\sim 25^\circ\text{C}$ 之间,光照时间为每天 14h ,用金属卤化物灯照射。采用定量浇水方式,土壤湿度维持在田间持水量的 $70\%\sim 80\%$ 。

1.9 分泌物的收集、提取、测定

1.9.1 层析纸法 将新购层析纸(Whatman cat No. 3030 861, England)剪成 $6\text{cm}\times 6\text{cm}$ 的纸片,用甲醇和去离子水分别清洗 3 遍,以除去干扰液相色谱测定的杂质,每次 15min ,风干,储于棕色瓶中备用。

8:00 左右往三室根箱中浇水,浇水量达土壤饱和持水量,以保证收集期间供给三叶草充足的水分。用称量勺将根基部松散的土壤轻轻拢在一起。打开已浇足水的三室根箱装置的外室,揭掉尼龙网膜,可以看到根系均匀垫积,并形成根垫。如果有少量的土壤掉在根垫上面,则用塑料勺或其它不损伤根系的物品将土壤轻轻弄掉。然后用戴着塑料手套的手捏住层析纸的角,将其轻轻贴在根垫表面,这样可以避免伤害根系。盖上洗净的塑料膜,以防止外室土壤粘在层析纸上,盖上外室,以保持土壤和根的完整性,然后将该根箱置于光照培养灯下(收集期间温度为 $23\sim 25^\circ\text{C}$), 2h 后取出层析纸片,置于盛有 15ml 去离子水的塑料瓶中,立即振荡离心,或振荡后用超声波处理 10min ,通过高效液相色谱测定有机酸含量。

1.9.2 琼脂膜法 琼脂膜的制备 按琼脂与水为 $100:1$ 的比例称取一定量的琼脂,用去离子水溶解、煮沸,冷却至室温,加入微生物抑制剂(Micropur Sicherer Trinkwasser, Germany, 用量为 0.01g/L),防止微生物对根分泌物的再吸收,利用模板制备厚度为 0.8cm 的琼脂膜。模板体积为 $8.5\times 7\times 0.8\text{cm}^3$ 。

琼脂膜法的收集方法与层析纸法相同。取出琼脂膜后,可以看到不同处理的琼脂膜厚度不同,原因是根系吸收琼脂膜上的水分,不同处理根系生长状况不同,因此吸收的水分不同,由此可见该方法不能进行

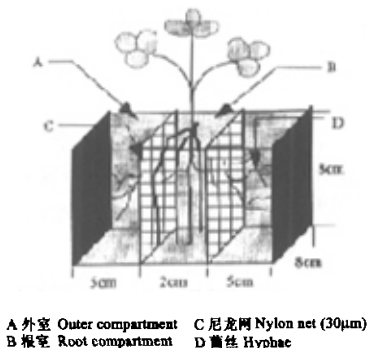


图1 试验装置

Fig. 1 Experiment pot

准确定量。然后将琼脂膜于冰柜中冷冻储存,测定前化冻,过滤,通过高效液相色谱测定有机酸含量。

1.9.3 洗根法 取出中室,先用自来水将根洗净,再用去离子水冲洗3遍,然后放入300ml去离子水中收集分泌物,2h后取出植株,立即向收集液中加入微生物抑制剂(Micropur Sicheres Trinkwasser, Germany, 用量为0.01g/L),以防止微生物对根分泌物的分解,然后过滤根分泌物收集液,除去残余根段,将溶液用真空旋转蒸发仪在40℃下浓缩蒸干,用20ml去离子水溶解,过滤,并通过高效液相色谱测定有机酸含量。

1.9.4 仪器、试剂及测定条件 仪器为高效液相色谱(LC-10A 岛津,日本)、紫外分光光度计(UV-2201 岛津,日本)、pH计(ATC, PICCOLO, HANNA, 美国)、分析电子天平(Sartorius, GmbH, Gottingen, 德国)。

试剂 琼脂(粉状, Q/H82-0096-93, 进口分装);有机酸标准样品——草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、顺丁烯二酸、反丁烯二酸、柠檬酸、丁二酸(均购于美国Sigma公司或德国Merck公司),试剂为分析纯;配制流动相的试剂——磷酸(H_3PO_4)为色谱纯,磷酸二氢钾(KH_2PO_4)为分析纯(均购于北京试剂公司)。

流动相的制备 制备18mM的磷酸二氢钾溶液,并用磷酸调到pH至2.22,超声波脱气后过0.45μm的滤膜,冷藏备用。

标准溶液的配制 精确称取草酸5.0mg、酒石酸10.0mg、苹果酸10.0mg、乳酸0.01ml、乙酸0.01ml、顺丁烯二酸1.0mg、反丁烯二酸1.0mg、柠檬酸10.0mg和丁二酸20.0mg分别置于100ml容量瓶中,用流动相溶解并定容到刻度。取各自的母液混合,顺丁烯二酸和反丁烯二酸稀释100倍,其余各酸均稀释10倍作为工作液,其它浓度的标准溶液参照以上方法配制。

9种有机酸测定的色谱条件 色谱柱为RP-ODS-C18;流动相为pH2.22的18mM磷酸二氢钾缓冲液;检测波长为214nm;流速为0.3ml/min;进样量为20μl;柱温为37℃。

1.10 测定项目及方法

根分泌物中有机酸采用高效液相色谱。菌根侵染率采用酸性品红-方格交叉划线法^[12]。植株含磷量采用 $H_2SO_4-H_2O_2$ 消煮,钼钒黄比色法。

2 结果与分析

2.1 不同供磷水平下,接种丛枝菌根真菌对三叶草生长的影响

丛枝菌根真菌对植物根系的侵染率是表征菌根形成的指标。由表1可见,不接种处理均未发现丛枝菌根真菌侵染;接种处理的施磷量为150mg/kg的菌根侵染率小于施磷量为20mg/kg的处理,且差异达显著水平。

施磷量为20mg/kg时,接种丛枝菌根真菌使三叶草地上部和根干重均明显增加,增幅达到显著水平,这表明丛枝菌根有促进三叶草生长的作用。

施磷量为150mg/kg时,接种处理的三叶草地上部、根干重分别比不接种处理降低了5.52%、10.18%,但未达显著水平。表明丛枝菌根对植物的

生长量影响不大,由于菌根真菌仍需要从宿主植物获取光合产物,因此对植物的生长产生一定的抑制作用。由表2可以看出,同一供磷水平下,接种处理的三叶草地上部、根系磷浓度和吸磷总量均显著高于不接种处理,表明无论施量为20mg/kg还是150mg/kg,接种丛枝菌根真菌都改善了植物的磷营养状况。

从菌根菌丝对三叶草磷营养贡献来看,施磷量为20mg/kg时菌丝吸磷量占植株总磷量的比例为73.2%,而施磷量为150mg/kg时,菌丝贡献仅为15.9%。表明在本试验条件下,土壤有效磷相对偏低时,丛枝菌根真菌促进植物对磷营养吸收才能获得显著效果。

表1 不同供磷水平下,接种丛枝菌根真菌对三叶草的侵染率和干物量的影响

Table 1 AM colonization and dry weight of red clover

处理 Treatment	菌根侵染率(%) AM colonization	干物重(克/盆) Dry weight (g/pot)	
		地上部 Shoot	根 Root
P ₂₀ -M	0 c*	1.42c	0.47c
P ₂₀ +M	50.26a	2.66b	0.84b
P ₁₅₀ -M	0 c	3.08a	1.67a
P ₁₅₀ +M	38.57b	2.91ab	1.50a

* 应用S.S.R法进行方差分析,同一列中的数据标记不同字母表示差异达到5%的显著水平,下同 * Data in same column followed by different letters indicate significantly difference ($P < 0.05$), the same below

2.2 不同供磷水平下,接种丛枝菌根真菌对三叶草根分泌的有机酸的组分和含量的影响

2.2.1 琼脂膜法收集的三叶草根分泌的有机酸的组分和含量 将用琼脂膜法收集的有机酸换算为单位面积琼脂膜上提取的有机酸含量列于表3(由于无法准确计算与琼脂膜接触根系表面积或重量,所以将用琼脂膜法收集的有机酸换算为单位面积琼脂膜上提取的有机酸含量。层析纸法与此法相同)。结果表明,接种处理与不接种处理有机酸种类有一定差别。不接种处理中检测到的有机酸为苹果酸、乳酸、乙酸、顺丁烯二酸、柠檬酸、丁二酸,接种处理在施磷量为20mg/kg条件下未检测到苹果酸,在施磷量为150mg/kg时未检测到苹果酸和乙酸。

接种处理与不接种处理的三叶草根分泌的有机酸数量有差别。施磷量为20mg/kg和施磷量为150mg/kg的接种处理的有机酸总量分别比不接种处理减少了63.42%、72.68%。原因可能与接种菌根真菌改善了植株体内磷营养状况(表2),导致根细胞质膜透性降低有关。因为Ratnaycke等指出,菌根对根细胞质膜透性的改变与菌根改善磷营养状况有关^[13];James等的试验证明在低磷条件下,接种菌根真菌能提高植株的含磷量,使根细胞质膜透性降低,进而导致根分泌物数量减少^[8]。

施磷水平对三叶草根分泌的有机酸数量也有影响。不接种菌根真菌时,施磷量为150mg/kg的有机酸总量比施磷量为20mg/kg的减少了24.90%;接种菌根真菌时,施磷量为150mg/kg的有机酸总量比施磷量为20mg/kg减少了43.82%。

从理论上讲,植物根分泌物不应该出现乳酸,然而本试验检测到乳酸,可能是收获、制样过程中其它微生物的干扰。本试验中还检测到草酸,由于每个处理草酸的峰值特别高(可能是草酸峰值出现较早,杂质随其出来的原因),故未将其列于表中(以下同)。

表3 琼脂膜法收集的三叶草根分泌的有机酸组分和含量

Table 3 The components and concentrations of organic acids in the exudates of Mycorrhizal red clover(collected by agar sheet)

处理 Treatment	有机酸含量(μg/(cm ² ·2h))The concentrations of organic acids						总量 Total
	苹果酸 Malic	乳酸 Lactic	乙酸 Acetic	顺丁烯二酸 Maleic	柠檬酸 Citric	丁二酸 Succinic	
P ₂₀ -M	0.14 ±0.04	1.09 ±0.08	1.26 ±0.22	0.01 ±0	4.18 ±0.25	0.62 ±0.06	7.31 ±0.65
P ₂₀ +M		0.82 ±0.09	0.31 ±0.03	0.01 ±0	0.83 ±0.05	0.70 ±0.05	2.67 ±0.16
P ₁₅₀ -M	0.02 ±0.01	0.92 ±0.05	1.48 ±0.07	0.01 ±0	1.40 ±0.3	1.66 ±0.07	5.49 ±0.4
P ₁₅₀ +M	—	0.29 ±0.02	—	0.01 ±0	0.55 ±0.06	0.64 ±0.03	1.50 ±0.11

— 代表未检测出,下同 Not detected,the same below

2.2.2 洗根法收集的三叶草根分泌的有机酸的组分和含量 将用洗根法收集的有机酸换算为单位根鲜重的有机酸含量列于表4(由于本试验中没测根面积,只测了根干重、根鲜重和根体积,将有机酸换算为单位根干重、根鲜重和根体积后其趋势一致,而且大部分文献中以单位根鲜重含的有机酸为表示单位,所以本试验将用洗根法收集的有机酸换算为单位根鲜重的有机酸含量)。结果表明,接种处理与不接种处理

表2 不同供磷水平下,接种丛枝菌根真菌对三叶草植株磷浓度和吸磷总量的影响

Table 2 The effect of AM on P of red clover at different Phosphorus levels

处理 Treatment	磷浓度(%)		吸磷总量(mg/pot)			菌丝贡献(%)
	P con.		P uptake			The contribution of hyphae
	地上部 Shoot	根 Root	地上部 Shoot	根 Root	整株 Total	
P ₂₀ -M	0.09c	0.13c	13.00c	6.00c	19.00	
P ₂₀ +M	0.18a	0.27a	48.00b	23.00b	71.00	73.24
P ₁₅₀ -M	0.15b	0.19b	48.00b	31.00ab	79.00	
P ₁₅₀ +M	0.19a	0.25a	56.00a	38.00a	94.00	15.96

* 菌丝贡献(%)=(接种处理整株吸磷总量-不接种处理整株吸磷总量)×100/接种处理整株吸磷总量
The contribution of hyphae(%)=(the total P uptake of the plant inoculated treatment-the total P uptake of the plant non-inoculated treatment)×100/ the total P uptake of the plant inoculated treatment

有机酸种类不同,不同施磷量下有机酸种类也不相同。不接种处理在施磷量为 20mg/kg 水平下,检到的有机酸为酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、顺丁烯二酸、柠檬酸、丁二酸,在施磷量为 150mg/kg 水平下未检测到乳酸、顺丁烯二酸;接种处理在施磷量为 20mg/kg 条件下未检测到乙酸,在施磷量为 150mg/kg 时未检测到顺丁烯二酸、丁二酸。

接种处理与不接种处理三叶草根分泌的有机酸数量有差别。两种施磷量下接种处理的有机酸总量分别比不接种处理减少了 84.57%、76.58%。

不同施磷水平下有机酸数量也有差别。不接种丛枝菌根真菌时,施磷量为 150mg/kg 的有机酸总量比施磷量为 20mg/kg 的减少了 45.00%;接种丛枝菌根真菌时,施磷量为 150mg/kg 的有机酸总量比施磷量为 20mg/kg 的减少了 16.52%。

表 4 洗根法收集的三叶草根分泌的有机酸组分和含量

Table 4 The components and concentrations of organic acids in the exudates of Mycorrhizal red clover (Rinsing root method)

处理 Treatment	有机酸含量(μg/(gfw·2h)) The concentration of organic acid							总量 Total
	酒石酸 Tartaric	苹果酸 Malic	乳酸 Lactic	乙酸 Acetic	顺丁烯二酸 Maleic	柠檬酸 Citric	丁二酸 Succinic	
P ₂₀ -M	3.57	79.01	13.83	27.48	0.05	100.37	8.41	232.70
	±0.36	±5.31	±2.03	±1.06	±0.02	±9.87	±0.35	±18.98
P ₂₀ +M	1.17	14.60	9.03	—	0.03	2.79	8.28	35.90
	±0.24	±2.4	±1.03	—	±0.01	±0.28	±0.37	±4.32
P ₁₅₀ -M	—	9.12	2.06	56.22	—	58.89	1.70	127.99
	—	±1.06	±0.25	±4.03	—	±3.26	±0.06	±8.66
P ₁₅₀ +M	0.35	7.28	1.99	17.04	—	3.32	—	29.97
	±0.1	±0.23	±0.17	±2.04	—	±0.23	—	±2.77

2.2.3 层析纸法收集的三叶草根分泌的有机酸的组分和含量 将用层析纸法收集的有机酸换算为单位面积层析纸上提取的有机酸含量列于表 5。结果表明,利用振荡提取方法,施磷量为 20mg/kg 时,接种处理与不接种处理的有机酸种类相同,只检测到苹果酸;施磷量为 150mg/kg 时,接种处理与不接种处理的有机酸种类不同,不接种处理中只检测到乳酸,接种处理中检测到酒石酸和乳酸。

表 5 层析纸法收集的三叶草根分泌的有机酸的组分和含量

Table 5 The components and concentrations of organic acids in the exudates of Mycorrhizal red clover (Collected by chromatography paper)

提取方法 Extract method	处理 Treatment	有机酸含量(μg/(cm ² ·2h)) The concentrations of organic acids				总量 Total
		酒石酸 Tartaric	苹果酸 Malic	乳酸 Acetic	柠檬酸 Citric	
振荡提取 Shake	P ₂₀ -M	—	0.23±0.10	—	—	0.23±0.10
	P ₂₀ +M	—	0.44±0.19	—	—	0.44±0.19
	P ₁₅₀ -M	—	—	4.70±0.27	—	4.70±0.27
	P ₁₅₀ +M	0.19±0.05	—	1.06±0.03	—	1.25±0.08
超声波提取 Ultrasonic	P ₂₀ -M	—	—	5.98±0.46	0.60±0.06	6.58±0.52
	P ₂₀ +M	—	—	5.38±0.36	0.66±0.04	6.04±0.4
	P ₁₅₀ -M	—	—	0.61±0.14	—	0.61±0.14
	P ₁₅₀ +M	—	—	—	—	—

就超声波提取法而言,施磷量为 20mg/kg 时,接种处理与不接种处理有机酸种类相同,检测到乳酸和柠檬酸;施磷量为 150mg/kg 时,接种处理与不接种处理有机酸种类不同,不接种处理中检测到乳酸,而接种处理中未检测到有机酸。在施磷量为 150mg/kg 条件下,利用振荡法提取接种处理中含有酒石酸和乳酸,而用超声波法提取的未检测到有机酸,初步表明层析纸法的提取方法不完善,需要进一步研究和改进。

无论利用振荡提取法还是超声波提取法,接种处理与不接种处理三叶草根系分泌的有机酸数量都有差别。就振荡提取法而言,在施磷量为 20mg/kg 条件下,接种处理的有机酸总量比不接种处理增加了 47.73%;施磷量为 150mg/kg 时,接种处理的有机酸总量比不接种处理减少了 73.40%。不接种菌根真菌时,施磷量为 150mg/kg 的有机酸总量比施磷量为 20mg/kg 的增加了 95.11%;接种菌根真菌时,施磷量为 150mg/kg 的有机酸总量比施磷量为 20mg/kg 的增加了 64.8%。

利用超声波提取时,在施磷量为 20mg/kg 条件下,接种处理的有机酸总量比不接种处理减少了 8.21%;不接种菌根真菌时,施磷量为 150mg/kg 的有机酸总量比施磷量为 20mg/kg 的减少了 90.73%。

3 讨论

丛枝菌根真菌与植物建立共生关系后,不仅显著影响植物生长、代谢及根系形态的改变,而且引起根分泌物的变化。未形成共生体时,根分泌物直接释放入土壤中,菌根形成后,真菌对分泌物进行过滤,其中一部分被真菌作为营养而利用,由于真菌对分泌物的利用及菌根的代谢,到达土壤中的分泌物数量和组成发生了很大改变^[11]。Renne, Leyval 等的试验结果表明,接种外生菌根真菌后,寄主植物根系分泌的有机酸种类发生变化,总量无明显变化,单位根干重的有机酸含量降低^[15]。菌根际有机酸的组分与非菌根际不同,数量也有差别^[16]。产生以上不同结果的原因是收集、提取、鉴定土壤条件下根分泌物的方法不一致,而且定量标准也不统一。不过,可以肯定的是接种菌根真菌后有机酸数量、组分发生变化。

本试验中收集到的接种处理的三叶草根系分泌的有机酸数量、组分不同于不接种处理的。由于用琼脂膜法、洗根法及层析纸法收集的有机酸的定量标准不同,所以无法对其进行数量比较,只能比较其趋势。3 种方法收集的有机酸总量呈现出的趋势基本一致,即无论施磷量为 20mg/kg 还是施磷量为 150mg/kg 条件下,基本都是接种处理有机酸含量高于不接种处理。

比较 3 种收集方法可以看出,层析纸法操作简单、层析纸成分中含杂质少,测定过程中不影响峰值。而且收集过程是在不破坏根系的情况下进行的原位收集,所以收集到的根分泌物能反映植物的自然分泌状况。但由于层析纸的吸附容量低,提取方法不完善,所以检测到的有机酸种类最少(仅 4 种)。Neumann 用层析纸法提取了白羽扇豆释放的根分泌物,认为用该方法提取根分泌物是可行的^[14]。然而本研究采用层析纸法未得到理想的结果,其原因可能是 Neumann 测定的植物为白羽扇豆,该作物在缺磷条件下可以释放大量的柠檬酸,相比之下,三叶草根分泌物的释放量较少,用层析纸提取的三叶草根分泌物不足以得到检测,表明此法可能更适用于根分泌物释放量较大的植物。

琼脂膜法也能反映植物的自然分泌状况,而且琼脂膜吸附容量比层析纸法大,提取出的有机酸种类较多(6 种),但琼脂膜容易失水。为了克服这一问题,Azaizah H. A. 提出往琼脂中加入渗透剂,然而加入渗透剂后又出现了难以将分泌物与琼脂分开的问题。此外,测定时渗透剂对峰值有影响^[10]。因此这一方法只能是半定量的,不过目前该法是收集土壤三叶草根分泌物的理想方法,如果琼脂膜上水分问题能得到解决,则该方法将更加完善。

洗根法虽容易定量,但在收集过程中,根系将遭受暂时的营养胁迫,因此不能真实反映植物的自然分泌状况,而且收集液常常遭受粘附在根系上的微小土壤颗粒的污染,特别是菌根真菌根外菌丝将土壤颗粒紧紧粘附其上,难以冲洗下来,而且该法只能收集整株植物根系的分泌物,而不能进行定位研究。此外,洗根过程中,根系将遭受机械损伤,收集到的溶液为根系分泌物和细胞泄漏液的混合物,由收集到的有机酸种类最多(7 种)得到佐证,因此此法不是收集土壤植物根分泌物的理想方法。

References

- [1] Yao Q., Li X. L., Feng G., *et al.* Mobilization of sparingly soluble inorganic phosphates by external mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant and Soil*, 2001, **230**: 279~285.
- [2] Hayman D. S., Mosse B. Plant growth response to Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae. II. Increased uptake of labile P from soil. *New Phytol.*, 1972, **71**: 41~47.
- [3] Li X. L., Geoghe E., Marschner H. Phosphorus depletion and pH decrease at the root-soil and hyphae-soil

- interfaces of VAM white clover fertilized with ammonium. *New Phytol.*, 1991, **119**:397~404.
- [4] Dinkelaker B, Hengeler C, Neumann G, *et al.* Root exudates and mobilization of nutrients. In: Rennenberg H, Eschrich W and Ziegler H eds; *Trees-contributions to modern tree physiology*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, 1997. 441~452.
- [5] Hoffland E, Boogaard V D, *et al.* Biosynthesis and root exudation of citric and malic acid in phosphate-starved rape plants. *New Phytol.*, 1992, **122**:675~680.
- [6] Lipton D S, Blanchar R W, Blevins D G. Citrate malate and succinate concentration in exudates from P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L seedlings. *Plant physiol.*, 1987, **85**:315~317.
- [7] Gardner W K, Barber D A, Parbery D G. The acquisition of phosphorus by lupinus albus L. ■. The probable mechanism by which phosphorus movement in the soil/root interface is enhanced. *Plant and Soil*, 1983, **70**:107~124.
- [8] James H, Graham, Robert T, *et al.* Membrane-Mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of Vesicular-Arbuscular mycorrhiza formation. *Plant physiol.*, 1981, **68**:548~552.
- [9] Rovira A D and Daney C B. Biology of the rhizosphere. In: Carson E. W. ed. *The plant root and its environment*. Charlottesville; Univ Virginia Press, 1974. 153~204.
- [10] Azaiz H A, Marschner H V, Romheld, *et al.* Effects of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and other soil microorganisms on growth mineral nutrient acquisition and root exudation of soil-grown maize plants. *Mycorrhizal*, 1995, **5**:321~327.
- [11] Neumann G, Martinoia E and Romheld V. Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta*, 1999, **208**:373~382.
- [12] Biermann B, Linderman R G. Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizas; a proposed method towards standardization. *New Phytol.*, 1981, **87**:63~67.
- [13] Ratnayake M R T, Leonard J A, Menge. Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhizal formation. *New Phytol.*, 1978, **81**:543~552.
- [14] Rambelli A. The rhizosphere of mycorrhizae. In: Marks G C and Kozlowski T T eds; *Ectomycorrhizae (Their Ecology and Physiology)*. New York; Academic Press, 1973.
- [15] Rnne, Leyval, Jacques, *et al.* Rhizodeposition and net release of soluble organic compounds in pine and beech seedlings inoculated with rhizobacteria and ectomycorrhizal fungi. *Biology and Fertility of Soil*, 1993, **15**: 259~267.
- [16] Leyval C and Berthelin J. Interactions between ectomycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria; phosphorus mobilization from different inorganic phosphates. In: Giovannozzi-Sermanni G and Nanipieri P eds. *Current Perspectives in environmental Biogeochemistry*. Rome; Consiglio Nazionale delle ricerche-IPRA, 1988.