

丛枝菌根利用氮素研究进展

邓 胤¹, 申 鸿¹, 郭 涛^{1,*}

(西南大学资源环境学院, 重庆 400715)

摘要: 氮素是植物需求量最大的元素, 丛枝菌根真菌与植物形成共生体后能从土壤中获得无机氮、简单的氨基酸, 还能利用一些复杂的有机态氮。考虑到 NH_4^+ 在土壤中的移动性低及丛枝菌根真菌的专性共生菌的特点, 丛枝菌根真菌吸收 NH_4^+ 对植物的贡献较大。近年来的研究发现丛枝菌根真菌内存在与氮素代谢有关的鸟氨酸循环, 而精氨酸则是菌丝内氮素转移的主要形式。综述最近的 AMF 对氮素的吸收、转运、同化、交换等方面的文献, 旨在揭示丛枝菌根真菌氮素利用特点, 阐明丛枝菌根真菌在氮循环系统中的重要作用。

关键词: 丛枝菌根真菌; 氮素利用; 精氨酸; 生态系统

文章编号: 1000-0933 (2009) 10-5627-09 中图分类号: Q143, Q948 文献标识码: A

Review of researches on nitrogen utilized by arbuscular mycorrhiza

DENG Yin¹, SHEN Hong¹, GUO Tao^{1,*}

College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(10): 5627 ~ 5635.

Abstract: Nitrogen, as the most demands of nutrient element for plants, can be uptake by the symbiosis of arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) and host plant with different forms, such as inorganic nitrogen, simple amino acid, even some complicated organic nitrogen and so on. Since the NH_4^+ expresses low mobility in soil and AMF belongs to the obligate fungi, it can be accounted that AMF possess the major contribution for host plant about NH_4^+ uptake. Some recent researches showed the existing of ornithine cycle related to nitrogen transport in AMF, and the arginine may take the mostly nitrogen transfer role in the AMF hypha. In this article, we attempt to outline the mechanism of nitrogen metabolism such as uptake, transport, assimilation and exchange in AMF, and focus on the characteristic of AMF nitrogen utilization. Forthmore, we hope to elucidate why AMF take an important role in nitrogen cycle of the ecosystem.

Key Words: arbuscular mycorrhizal fungi; nitrogen utilization; arginine; ecosystem

菌根 (mycorrhiza) 是菌根真菌与植物根系形成的共生体, 丛枝菌根真菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) 是其中一类分布最为广泛、数量最多的菌根真菌。目前已知地球上 90% 的维管植物具有丛枝菌根^[1], 丛枝菌根的形成能改善宿主植物的矿质营养状况, 提高植物抗病、抗干旱、抗盐害、抗重金属害等诸多特性, 增强植物在各种环境中的适应性^[2]。

丛枝菌根真菌对植物生长贡献最大的一方面是增强了矿质元素的摄取, 其中对于磷营养状况的改善在早期的研究中便得到证实^[3,4], 而氮素作为植物需求量最大的营养元素, AMF 对其利用状况的研究开展较晚。在自然和农业生态系统中, 氮素往往是限制植物生长的重要因素^[5], 菌根技术要在农业、林业、环境修复和作为生物肥料等方面普遍应用, 全面掌握 AMF 与植物各种营养之间的关系是必须的, 而不是仅限于磷素。近年来, 关于丛枝菌根与氮的研究被引起重视, 不仅在对氮素的吸收形态、吸收量上展开大量工作, 更上升到生化

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40701085); 西南大学科研启动基金资助项目 (SWUB 2006044)

收稿日期: 2008-12-02; 修订日期: 2009-02-05

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: guotaoshd@yahoo.com.cn

生理的层次。现从丛枝菌根对氮素的利用特点、氮素在 AMF 中的转运方式及 AMF 在氮循环中的作用上对以往的研究和最新的进展作一个系统的阐述。

1 丛枝菌根真菌与植物氮素营养

1.1 丛枝菌根对无机态氮的利用

无机态的氮是植物的重要氮源,其中铵态氮和硝态氮是植物能直接利用的两种主要的无机氮形态^[6]。Haines 和 Best 于 1976 年便观察到接种摩西球囊霉(*Glomus mosseae*)的胶皮枫香树(*Liquidambar styraciflua*)具有较强的养分吸收能力,从而减少了氮在土壤中的淋失^[4],但其没有指出菌根真菌对无机氮直接吸收作用,也没有指出菌根能有效利用何种形态的无机氮。在不同的生态环境中,土壤中的铵态氮和硝态氮所占比例往往有较大的差异,因而区分菌根对不同无机氮的利用能力成为必要。

早期的关于无机氮的研究大都是围绕菌根对铵态氮和硝态氮的利用能力上展开的。Cuenca^[7]应用刺桐(*Erythrina variegata*)为宿主植物,在供应 NO_3^- 为单一氮源时,发现接种 AMF 的刺桐生物量均高于不接种处理约 2 倍,氮含量也有所提高,说明菌根可能利用了 NO_3^- ,但 Cuenca 所作研究没有考虑 AMF 可能首先改善了宿主磷素状况进而间接提高了植物含氮量。Azcón 等^[8,9]通过向不接种的植物施加磷肥来弥补菌根的磷效应,并用含有 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的基质来检验根外菌丝的吸收作用,发现接种 AMF 的植物 ^{15}N 丰度显著高于施磷的不接种处理,说明菌根能直接利用无机态的硝态氮,其还认为菌根吸收硝态氮的量与土壤中硝态氮含量和植物氮素营养水平有关。

AMF 不仅能利用 NO_3^- ,还能利用外界的 NH_4^+ ,很多研究对 AMF 利用 NO_3^- 和 NH_4^+ 的能力做了比较,发现 AMF 对 NH_4^+ 的吸收量较大^[10,11]。Hawkins^[12]利用 Ri T-DNA 转移胡萝卜根的研究发现单位重量的摩西球囊霉(*Glomus mosseae*)菌丝吸收的 $^{15}\text{NH}_4^+$ 显著高于 $^{15}\text{NO}_3^-$,其数值高达 15 倍,且其单位重量的菌丝吸收 NH_4^+ 的速率大于 NO_3^- 。Hawkins^[13]还通过向网隔分室系统的菌丝室投加 $^{15}\text{NH}_4^+$ 和 $^{15}\text{NO}_3^-$,说明了 AMF 根外菌丝能直接吸收 NH_4^+ 和 NO_3^- 并转移给植物,且 NH_4^+ 的吸收速率高于 NO_3^- 。Yoko 等^[14]使用网隔分室系统的研究也表明,聚绣球孢菌(*Glomus aggregatum*)的根外菌丝吸收 $^{15}\text{NH}_4^+$ 并转运给玉米(*Zea mays* L.)的量约是 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的 10 倍。

AMF 吸收 NO_3^- 和 NH_4^+ 对植物的贡献与它们在土壤中的移动性有关: NO_3^- 在土壤中移动性高,能通过扩散快速到达植物根系^[15],有无菌根的植物都能良好地吸收利用; NH_4^+ 易被土壤胶体所吸附,在土壤中的移动性差,其在根系形成一个亏缺区^[16],AMF 的根外菌丝能延伸至亏缺区外吸收 NH_4^+ ,这样就扩大了根系吸收面,获得较多的 NH_4^+ ,因此菌丝对 NH_4^+ 的吸收可能有更大的意义。在农业生态系统中,由于人为因素的存在,土壤中的 NH_4^+ 含量较低,一般情况下不会成为植物获得 N 的限制因素,只有在干旱条件下,土壤中的 NO_3^- 移动性下降时,菌根对 NH_4^+ 的吸收才发挥一定的作用^[17],所以 AMF 在大田生产中对于氮素的改善还比较小,这也限制了 AMF 作为大田生产的应用。

上面的大量研究因为植物——丛枝菌根真菌组合不同,对不同无机氮的吸收有很大的差异,并且有研究说明外界无机氮的浓度以及植物生长各个时期对氮的需求状况会显著影响 AMF 菌丝吸收和转运氮素的量^[18]。AMF 菌丝对无机氮的利用需在宿主植物不同的生育期加以讨论,其中是否存在一个阈值(由植物对氮素的需求量决定)来启动菌丝对氮素的吸收和转运也有待被证实。AMF 可能是作为植物的一个备用氮源存在的,在需要时便提供,如 Yoko^[14]便指出根外菌丝虽然吸收了 NO_3^- ,但并不是都转移给了植物,一部分则停留在菌丝体内,所以测得的宿主植物根系 ^{15}N 丰度显著高于地上部。针对于宿主植物与 AMF 氮素供应调节方式的研究目前较少,需结合植物和真菌信号来开展,这也是深入了解 AMF 氮营养特点的发展方向。

1.2 丛枝菌根对有机态氮的利用

土壤中的绝大部分 N 为有机态,主要为氨基酸态氮、氨基糖态氮和腐殖质氨基酸^[19]。丛枝菌根真菌也能吸收、利用像甘氨酸、谷氨酸、精氨酸等一些简单的有机氮,AMF 利用此部分有机氮的能力在一些研究中表现

并不一致,但多数实验结果表明菌根对氨基酸的吸收、传递能力低于 NH_4^+ [12,20,21]。

土壤中的有机氮很大比例是以复杂的分子形态存在的,大多不能被植物直接所使用,如能将此部分有机氮作为氮源,在改善植物氮素营养的作用上是不可忽视的。Hodge [22] 通过网隔分室系统的研究发现 *Glomus hoi* 的根外菌丝能利用复杂的有机态氮——氮源为 ^{13}C 和 ^{15}N 双标记的研磨后的黑麦草叶 (*Lolium perenne* L.), Joanne 和 Hodge [23] 还在另外的研究中发现根内球囊霉 (*Glomus intraradices*) 也拥有较强的有机氮利用能力,这与其拥有大量根外菌丝的形态结构存在一定的关系。Nayyar [24] 分别利用明球囊霉 (*Glomus clarum*)、近明球囊霉 (*Glomus claroideum*) 和根内球囊霉 (*Glomus intraradices*) 作为菌种侵染俄国野生黑麦 (*Psathyrostachys juncea*),发现 3 种菌种的存在均加速了菌丝室内有机氮的矿化,相对不接种处理平均提高了 228%。

Hodge 小组所作研究并没有发现 ^{13}C 随 ^{15}N 一起转移给宿主植物根系,说明 AMF 可能是将大分子的有机氮分解后加以利用。AMF 根外菌丝能刺入土壤颗粒中并分泌一些水解酶加速植物组织的降解,如纤维素酶、果胶酶、木葡聚糖酶等 [24]。AMF 除了有对有机氮矿化的直接作用外,还能通过改变土壤微生物的结构间接加速有机氮的矿化,Schimel 和 Weintraub [25] 的模型反应 AMF 的根外菌丝能给其菌际微生物供应 C,为此,微生物则参与有机物的分解。AMF 对有机氮的矿化是通过多种作用共同实现的,在这些研究中实验氮源均为植物组织,如果 AMF 能利用更多复杂形态的有机氮,这便能使植物氮素来源多元化,提高植物在自然生态系统中对氮源的竞争力。

1.3 外界氮对丛枝菌根真菌的影响

丛枝菌根真菌的侵染率、丛枝丰度、菌丝密度和孢子密度等形态结构反应了 AMF 生长状况,也是 AMF 与植物共生效应发挥的一个物质基础。研究表明,随宿主和真菌的组合及外界环境条件的不同,AMF 的侵染率、菌丝密度和孢子密度等有较大的差异,其中也表现在不同的供氮水平和供氮形态上。多数情况下低浓度的外界 N 会提高菌根真菌侵染率 [26,27],相同浓度下,提供单一的 NH_4^+ 为氮源时丛枝菌根真菌的侵染率比单一的 NO_3^- 低 [14,28],这与高浓度的 NH_4^+ 对 AMF 和根细胞的毒害作用存在一定的关系。另外,由于铵态氮吸收后需立即在根中同化,此过程耗费大量的碳水化合物,而减少了构建菌根结构所需光合产物的供给,AMF 的生长受一定的影响。值得注意的是 AMF 的侵染率和菌丝密度与宿主植物生长和氮素的获得并不相关,相同条件下,侵染率和菌丝密度的改变可能对磷素的获得影响较大,很大程度上改变了植物的 N/P 比 [29],而对氮素吸收的影响较小。侵染率和菌丝密度等只能作为 AMF 对氮素利用的一个参考因素,不能以此来定论 AMF 对氮素的吸收利用能力。

近几年对于氮素与丛枝菌根真菌的关系不只是停留在侵染率与菌丝量的研究上,还结合生态系统与植物信号物质等开展了一些新的工作:Kate [30] 使用脂肪酸甲脂分析方法 (FAME) 研究发现当土壤中堆积大量的氮肥时,在短期内不但改变了土壤微生物的组成,还减少了土壤中 AMF 的丰度,扰乱了 AMF 与植物的共生关系;Kaori [31] 发现低浓度的外界氮能增加高粱 (*Sorghum vulgare*) 根分泌的 strigolactones (一种根系分泌物,是促进丛枝菌根真菌菌丝分支及侵染植物的化学信号 [32,33]) 的量,与磷有类似的效果,并且提供单一的 NO_3^- 为氮源诱导根系分泌的 strigolactones 的量比 NH_4^+ 高,提高约 1 倍。这些研究结果进一步阐述了外界氮对 AMF 的影响,也与前面的结论相一致,即随外界氮浓度的提高,AMF 生长受抑制,表现为侵染率和菌丝密度有所下降,另外 NH_4^+ 含量对 AMF 的影响更大。

2 丛枝菌根真菌改善植物氮营养的机理

AMF 吸收氮素并转运给植物已通过同位素示踪技术被证实,其能利用无机态的铵态氮、硝态氮,有机态的氨基酸等 [7,12,21]。然而,随实验条件不同,AMF 吸收的氮素对植物的贡献出现较大的差异,系统地了解 AMF 对氮素的利用能力不能只停留在对吸收形态和吸收量的研究上,必须深入到氮素代谢的生化生理方面。近年来出现了较多的这方面的研究,对此加以归纳阐述。

2.1 丛枝菌根真菌与氮代谢酶

无机氮在植物体内的同化方式主要是通过 GS-GOGAT 途径,即吸收的 NO_3^- 通过硝酸还原酶 (nitrate

reductase, NR) 和亚硝酸还原酶转化为 NH_4^+ , NH_4^+ 再通过 GS-GOGAT 途径两个酶——谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 和谷氨酸合成酶的作用转化为谷氨酸, 谷氨酸经转氨基作用转化为各种氨基酸, 进一步合成蛋白质等含氮化合物。GS-GOGAT 途径中硝酸还原酶和谷氨酰胺合成酶是两个重要的限速酶^[5]。

AMF 与植物形成共生体在一定程度上影响了植物的代谢系统, 接种 AMF 通常会改变植物地上部 NR 和 GS 的活性^[34,35]。Azcón^[36] 研究发现接种 *Glomus fasciculatum* 不仅提高了洋葱 (*Allium cepa* L.) 地上部的 NR 和 GS 活性, 还提高了其根系的 NR 和 GS 活性, 并且根系的提升幅度更大。邓胤、郭涛 (未发表) 也发现, 在 NH_4^+ 含量较高的培养条件下接种 AMF 显著提高了玉米 (*Zea mays* L.) 根系的 GS 活性, 而对叶片中 GS 活性影响较小, 叶片中的 GS 的功能并不仅限于参与氮的代谢, GS 的另一个作用是参与光呼吸中释放 NH_3 的再同化, 其释放速率有时高出无机氮同化的几倍, 由于氨的夸质膜渗透前伴随有质子的释放, 而地上部消化质子的能力有限, 所以吸收的 NH_4^+ 很大部分是在根中被同化, 再以氨基酸和酰胺的形式运往地上部^[37], 由此根系 GS 活性更能反应植物同化氮的能力。

在 GS-GOGAT 途径中, NH_4^+ 的同化需要大量的碳水化合物作为骨架^[38], 而异养型的 AMF 需要植物提供碳水化合物来维持生长, 这样就增加了碳水化合物在根系的分配比例, 所以 NR 和 GS 活性在根系得以更好的表现。NR 和 GS 等酶反应都需要磷酸盐参与^[39], AMF 侵染首先改善的是植物的磷营养状况, Azcón^[37] 通过向不接种 AMF 的洋葱施加磷肥也达到了提高 NR 和 GS 活性的目的, 但提高幅度不如接种 AMF 的处理。NR 和 GS 活性的提高可能是接种 AMF 的直接结果, 也可能是改善磷营养带来的间接作用。目前, 关于 AMF 与植物氮代谢酶的研究较少, 进一步了解两者之间的关系需要更为深入、系统的研究。

2.2 氮在丛枝菌根真菌内的转运过程

菌根植物可通过根系直接吸收或 AMF 菌丝吸收两种方式获取氮素, 有研究发现菌丝提供给植物的氮素可占植物获取总氮的 30% 左右^[40], 植物通过菌丝获得的氮素不容忽视。然而, 早期的研究并没有指出氮素在菌丝内的代谢、转运方式, 很大程度上限制了研究氮素在根际土壤中的变化特征及植物——菌根真菌之间物质交流的调控。

2.2.1 丛枝菌根真菌细胞内的 GS-GOGAT 循环

根外菌丝能对土壤中的无机氮进行吸收并转移, 说明菌丝体内可能存在一套氮代谢系统。早期的研究发现 AMF 孢子和菌丝都具有 NR 活性^[41,42], Smith^[43] 也在 AMF 菌丝体内检测到 GS 活性, 其推测菌丝内存在 GS-GOGAT 这一途径。随着分子生物和 PCR 技术的应用, 研究方式不断多样化, López^[44] 检测到根内球囊霉 (*Glomus intraradices*) 细胞内存在对 NH_4^+ 高度亲和性的转运体, 并且其菌丝内还存在与 NO_3^- 和 NH_4^+ 吸收、同化有关的一系列酶; Manjula^[45] 等通过检测根外菌丝中 GS-GOGAT 途径有关酶的 mRNA 的表达水平证明了 GS-GOGAT 途径的存在; Breuninger^[46] 的研究还发现 GS 在 AMF 的每个生命阶段都被组成表达, 且当提供单一的铵态氮源时, GS 活性更高。这些研究都说明菌丝内也存在和植物类似的 GS-GOGAT 途径, 并且是菌丝同化无机氮的重要途径。如此便能解释 Azcón^[36] 和邓胤所作研究中接种 AMF 对植物根系 NR 和 GS 活性提高更多的部分原因, 因为测定的植物根系 NR 和 GS 活性包括了菌丝内的 NR 和 GS 活性, 地上部则没有。

菌丝吸收的 NO_3^- 必须经通过硝酸还原酶和亚硝酸还原酶转化为 NH_4^+ 才能进入 GS-GOGAT 循环, 此还原过程要消耗 ATP, 是一个耗能过程, 吸收并同化 NO_3^- 比 NH_4^+ 多出一个步骤, 消耗了更多的能量。丛枝菌根真菌是一类专性活体共生菌, 其不能制造有机物, 只能从植物获得碳水化合物, 选择消耗能量少的吸收代谢途径对于碳能源的经济利用有重要的意义, 在这点上, AMF 可能更偏好于吸收 NH_4^+ 。

另外, 在 NH_3 的同化中还存在谷氨酸脱氢酶 (glutamate dehydrogenase, GDH) 途径, 在正常供氮条件下, GDH 途径同化的 NH_3 较少^[5]。Robinson^[47] 认为在 C 源缺乏的条件下, GDH 可能在持续同化 NH_4^+ 上有重要作用。Jean^[48] 的研究发现接种根内球囊霉 (*Glomus intraradices*) 的 Ri T-DNA 胡萝卜根的 GDH 活性约是不接种的 2 倍, 其推测在 NH_4^+ 的同化上, GS 可能在菌丝的快速生长时期活性较高, 发挥主要作用, 而 GDH 则在菌丝生长的稳定期才发挥一定的作用。

2.2.2 氮在丛枝菌根真菌菌丝内的转运方式

植物根系吸收的氮通常以 NO_3^- 或富氮化合物的形式向地上部运输,AMF 是否存在同植物同样的运输方式? Johansen 等早期推测氮是以 NO_3^- 为主的形式在菌丝内转移^[49,50],因为 NH_3 易渗透质膜,高浓度的 NH_3 对细胞有毒害作用,以 NH_3 为主的转运方式可能性较小。Kaldorf^[51] 在丛枝中检测到了硝酸还原酶活性,说明有部分氮可能是以 NO_3^- 形式转运的,但此类推测都缺乏直接有效的证据。

以往的研究发现菌丝内存在大量的游离氨基酸(精氨酸为主),可能是菌丝内氮素的储存形式^[52,53]。Bago^[54] 等以此为依据推测菌丝内存在同动物氮代谢相同的鸟氨酸循环(urea cycle),氮在菌丝内不是以无机态的形式,而是以有机态的形式运输,精氨酸(arginine, Arg)则是主要形态。Manjula^[45] 等采用不同¹⁵N 和¹³C 标记的氮源,以同位素示踪技术来定位氮素在菌丝和根系之间的流动情况,其还通过实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 的方法,检测了 GS-GOGAT 途径及鸟氨酸循环的关键酶的 mRNA 水平,说明了氮素的变化方式,给 Bago 的推测提供了数据支持。另外,Cristina 和 Jin 等人在 Bago 推测的基础上也将该理论加以证实和补充。现将他们所归纳的氮素在 AMF 内的转运方式概括为图 1。

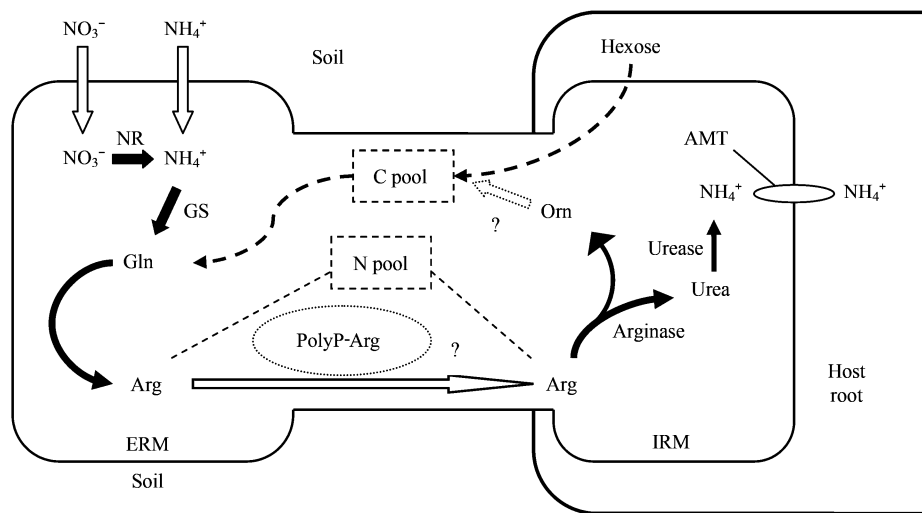


图 1 氮在丛枝菌根真菌菌丝内和根系之间的转运机理的图示

Fig. 1 The model of N transport and metabolism in the symbiotic system between arbuscular mycorrhizal fungi and root

NO_3^- 或 NH_4^+ 被根外菌丝吸收后经过 NR 和 GS-GOGAT 循环同化,再由鸟氨酸循环的合成途径转化为 Arg;ERM 中 NH_4^+ 的存在抑制了 arginase 和 urease 的活性,保证 Arg 不被分解,转化后的 Arg 可能是与 PolyP 捆绑的方式从 ERM 移动至 IRM,而 ERM 中低浓度的 NH_4^+ 诱导了 arginase 和 urease 的活性,Arg 最终被分解为 NH_4^+ 并通过 AMT 转移至根细胞;Orn 分解产生的氨基酸可能在 IRM 中分解并转移至 ERM NO_3^- or NH_4^+ is taken up by the fungal ERM and assimilated via NR and the GS-GOGAT cycle, then to Arg by the anabolic arm of the urea cycle; The presence of NH_4^+ in the ERM inhibits the activity of arginase and urease; Arg may binds to PolyP and move to the IRM; The IRM is deficient in nitrogen, which favors the activity of arginase and urease leading to production of NH_4^+ , which is transferred to the root via AMT; Amino acids from Orn breakdown may be catabolized within the IRM or translocated to the ERM

ERM: 根外菌丝 extraradical mycelium,IRM: 根内菌丝 intraradical mycelium,NR: 硝酸还原酶 nitrate reductase,GS: 谷氨酰胺合成酶 glutamine synthetase,PolyP:多聚磷酸盐 polyphosphate,Arg: 精氨酸 Arginine,Arginase: 精氨酸酶, Urea: 脲酶 Urease, Orn: 鸟氨酸 Ornithine, AMT: ammonium transporters NH_4^+ 转运蛋白,己糖 Hexose

AMF 菌丝内的转运、变化情况主要分为 3 个步骤:

(1) 氮素在根外菌丝内的同化

Manjula^[45] 和 Cristina^[55] 通过向菌丝室供应¹⁵NH₄⁺ 培养后发现根外菌丝中的大部分 Arg 被¹⁵N 所标记,被¹⁵N 标记 Arg 可占整个被¹⁵N 标记的游离氨基酸的 90%,而大量的游离氨基酸(尤其是 Arg、Orn、Lys 和 His)

通常存在于菌丝的液泡中^[56],这说明菌丝吸收的 N 大部分转化为 Arg 储存于液泡中。Manjula 也检测到根外菌丝有大量 GS 的表达 mRNA,说明 GS-GOGAT 途径是根外菌丝同化无机氮的主要途径。AMF 根外菌丝吸收的 NO_3^- 和 NH_4^+ 在 NR 和 GS 等酶的催化下同化为谷氨酸(Gln),Gln 通过鸟氨酸循环的合成途径转化为 Arg 成为氮素的储存源(N pool)(图 1)。

(2) 氮素在菌丝内的转移

Cristina^[55]测得 N(以 Arg 为主的形式)能以 $3\text{nmol mg}^{-1}\text{ fresh weight h}^{-1}$ 的速度从根外菌丝向根内菌丝转移,其在菌丝间的转移速度接近于磷,而目前还没有检测到菌丝间存在高效的 Arg 转运体,存储于液泡中的 Arg 如果在菌丝间不断跨膜运输必然消耗大量的能量及 C,推测 Arg 可能和多聚磷酸盐(PolyP)协同运输,即 P、N 在菌丝内是同时转运的。另外,AMF 具有特殊的无隔多细胞核结构,其液泡可能在菌丝间变形为管状,或通过原生质变形而形成管状液泡脉冲,这样 Arg 便能在此管状液泡中顺浓度梯度从根外菌丝向根内菌丝移动^[54](图 1)。

(3) 氮素在根内菌丝的释放并传递给根系

N 以 Arg 的形式转运到根内菌丝中,如果也是以 Arg 或其它有机态的形式传递给宿主根细胞,那么 C 也必然随 N 转移。实际上,菌丝内的 ^{13}C 并没有随着 ^{15}N 一起传递给根系^[45,57],说明 N 是以无机态的形式在菌丝和根系之间传递的。近年来的研究发现,在根内菌丝中存在有较高活性的精氨酸酶(arginase)和脲酶(urease),arginase 活性的受 Arg 诱导及 NH_4^+ 抑制,根内菌丝中 NH_4^+ 浓度必然较低^[55]。Manjula^[45]发现鸟氨酸循环中,与精氨酸分解有关的酶的基因在根内菌丝中成倍地表达,有的比根外菌丝高出 10 倍,而与 NH_4^+ 转移有关的 NH_4^+ 转运蛋白(ammonium transporters, AMT)的基因在根内菌丝中也被高效地表达。说明在根内菌丝中,Arg 首先在 arginase 和 urease 的催化下,通过鸟氨酸循环的分解途径释放出 NH_4^+ 和鸟氨酸(Ornithine, Orn), NH_4^+ 再通过 AMT 迅速地转移给植物根细胞,维持根内菌丝中 NH_4^+ 的低水平,参与转运的 C 在根内菌丝中以某一形态转返回根外菌丝,继续参与代谢(图 1)。

GS-GOGAT 途径和鸟氨酸循环的联合作用保障了氮素在菌丝和根系之间的持续转移。选择 Arg 作为菌丝内氮素储存和转移的主要形态有一定的生理意义,其能解除高浓度的 NH_4^+ 对真菌产生的毒性。Arg 是鸟氨酸循环中的重要中间产物,能快速地在根外菌丝和根内菌丝间转变为其它形态,如在根内菌丝中通过酶的催化转化为尿素进而分解释放出 NH_4^+ 。另外,以无机氮(NH_4^+ 为主)的形态向宿主提供 N 能控制 C 的流出,对于自身不能制造有机物的 AMF 有很重要的意义,而单靠 GS-GOGAT 这一途径是无法实现氮的同化和 NH_4^+ 的释放整个过程的。

Manjula 等人提出的模型对氮素在 AMF 菌丝内的变化及转运做了一个比较完整的归纳,为进一步研究 AMF 对氮素的利用特点提供了依据,但此转运模式还有无法解释的地方,如 Arg 在菌丝间的传递方式,根内菌丝释放的 Orn 的去向,此模式的调节方式和激活信号等。还需要大量的研究加以完善。

3 丛枝菌根真菌在氮循环中的生态作用

有关 AMF 氮素利用特点的研究不断深入的同时,其在氮循环中的生态作用也一步步被揭示。早期的研究便发现大部分豆科植物都有较强的菌根依赖性,AMF 的存在能显著提高豆科植物生物量和结瘤数^[4,58]。AMF 与根瘤菌发挥协同效应的主要原因是改善了植物的磷素营养状况,而根瘤菌和固氮菌等土壤微生物在土壤氮素的累积上发挥重要作用,所以 AMF 在全球 N_2 的固定上充当了一个辅助角色。

在多数农田的土壤中, NO_3^- 是无机氮的主要形态, NH_4^+ 含量较低,并不成为限制因素。前面所述由于 NO_3^- 与 NH_4^+ 在土壤中的移动性以及同化二者所消耗能量的差异,AMF 对于 NH_4^+ 吸收意义更大,在农田土壤环境中菌根所发挥氮营养的效应还比较低,其对植物营养的贡献主要体现在磷素上。而在自然生态系统中,土壤中的无机氮多以 NH_4^+ 的形态存在^[59],AMF 在氮素和磷素的吸收上都具有重要意义,菌根的氮营养效应在此生态系统中发挥的空间更大。另外,植物不能直接利用的有机氮占了土壤全氮的很大比例,Hodge^[23]所作的菌根利用有机氮的研究的培养时间仅 42d,便能检测出菌丝吸收、转移了 32% 的有机氮氮源,其使用的网

隔分室装置中,能从根室到达菌丝室的根外菌丝占少数,在自然生态系统中,没有网隔的限制,菌丝对有机氮的利用能力理论上应更高,再者如果把实验周期延长至 1a 或 2a 又会出现什么效果? AMF 在土壤中拥有庞大的数量,并且是稳定地存在于土壤中^[4],不管 AMF 促进有机氮矿化的原理是什么,仅仅是对有机氮矿化的微弱作用也会深远地影响土壤氮素的形态(数量效应)。矿化的加速、有效氮的增多使更多的氮分布于植物中,加速了氮素的循环。

土壤微生物的数量和结构组成对土壤的养分含量、形态、结构等都具有重要作用,AMF 也属于土壤微生物的组成部分,其对土壤微生态有着重要影响。Klopatek^[60]发现 AMF 的存在降低了土壤中的硝化细菌的总量,Cavagnaro^[61]研究指出 AMF 使大田土壤的硝化作用有所降低,显然 AMF 的介入影响了土壤中的硝化细菌,在土壤氮素形态的转化上也发挥了一定作用。另外,Angel^[62]的研究说明 AMF 与土壤中的动物也具有联系,其向接种 AMF 的玉米(*Zea mays* L.)根际土壤中加入热带蚯蚓(*Balanteodrilus pearsei*)显著提高了玉米的吸氮量,相比 AMF 或蚯蚓单独存在时更明显。在此研究中,引入蚯蚓显著降低了 AMF 的侵染率,而 Reddel^[63]在蚯蚓排泄物中发现了完整的 AMF 孢子和菌丝,证明 AMF 的根外菌丝和孢子成为了蚯蚓的食物,而蚯蚓在改善土壤结构方面有重要作用,AMF 在无意中改变了土壤结构。

综合菌根的氮营养特点及与土壤微生物和动物之间的关系,AMF 在生态系统对氮的固定、分布、形态结构等都产生了重要影响。AMF 的根外菌丝具有狭长、无隔、多分支的结构^[4],是一种适合物质长距离运输的形态,而大量的根外菌丝及菌丝之间形成的菌丝桥在全球的土壤中建立了一个庞大的营养物质交流网络,其中也包括了氮素营养,AMF 与土壤中与众多动植物及微生物构建了一个极其复杂的生态系统,是生态系统中不可缺少的一环。

4 展望

丛枝菌根真菌能帮助植物获取氮素营养,这已在很多的盆栽实验或离体组织培养实验中得到证实。然而随实验条件不同,结果往往相差较大,这也限制了菌根在大田生产中的应用。AMF 菌丝内氮素转变模型的建立,为进一步研究 AMF 对氮素的吸收和转移特点提供了理论依据,将来如能结合植物和真菌信号展开深入研究,想必在 AMF 对氮素的利用上会取得更多、更有价值的成果。

AMF 对有机氮具有降解能力也预示着 AMF 在氮素循环中占有更重要的位置,而以后开展的与 AMF 有关的生态系统方面的研究也应与 AMF 利用各种氮素的机理相结合,从微观和宏观两个方面来分析。近来完成的毛果杨(*Populus trichocarpa*)和水稻(*Oryza sativa*)的基因组序列发现二者相比无菌根的十字花科植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)都含有具有数目巨大的 AMT(主要参与 NH_4^+ 的跨膜运输)表达基因^[64]。菌根植物与菌根真菌在长时期的进化中演变出了一套相互依存的代谢系统,菌根植物在氮素的获取上可能更依赖于菌根真菌,而以往的研究可能低估了菌根真菌在氮素供给方面的生态作用。

References:

- [1] Jeffries P. Use of mycorrhizae in agriculture. CRC Crit Rev Biotech, 1987, 15:319—357.
- [2] Koide R T and Mosse B. A history of research on arbuscular mycorrhiza. Mycorrhiza, 2004, 14:145—163.
- [3] Gavito M E and M H Miller. Early phosphorus nutrition, mycorrhizae development, dry matter partitioning and yield of maize. Plant and Soil, 1998, 199: 177—186.
- [4] Li X L, Feng G. Ecology and physiology of VA mycorrhizae. Beijing: Huawen Press, 2001.
- [5] H. Marschner, Li C J, Wang Z Y, et al. Mineral Nutrition of Higher Plant. Beijing: China Agricultural University Press, 2001. 160—168.
- [6] Lu J L. Plant Nutrition(2nd, Volume one). Beijing: China Agricultural University Press, 2003. 25—31.
- [7] Cuenca G and Azcón R. Effects of ammonium and nitrate on the growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal *Erythrina poeppigiana* O. I. Cook seedlings. Biol Fertil Soil, 1994, 18:249—254.
- [8] Azcón R, Ruiz-Lozano J M and Rodriguez. Differential contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to plant nitrate uptake (^{15}N) under increasing N supply to the soil. Can J Bot, 2001, 79:1175—1180.
- [9] Azcón R, Rodriguez R and Amora-Lazcano E, et al. Uptake and metabolism of nitrate in mycorrhizal plants as affected by water availability and N concentration in soil. European Journal of Soil Science, 2008, 59:131—138.

- [10] Li X, Zhang J L. Uptake of different forms of Nitrogen by hyphae of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2007, 21(2):195—200.
- [11] Toussaint J P, St-Arnaud M, Charest C. Nitrogen transfer and assimilation between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith and Ri T-DNA roots of *Daucus carota* L. in an in vitro compartmented system. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50: 251—260.
- [12] Hawkins H, Anders Johansen, Eckhard George. Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 2000, 226:275—285.
- [13] Hawkins H, George E. Reduced ^{15}N -nitrogen transport through arbuscular mycorrhizal hyphae to *Triticum aestivum* L. supplied with ammonium vs. nitrate nutrition. *Botany*, 2001, 87:303—311.
- [14] Yoko Tanaka, Katsuya Yano. Nitrogen delivery to maize via mycorrhizal hyphae depends on the form of N supplied. *Plant, Cell and Environment*, 2005, 28:1247—1254.
- [15] Tinker P B H, Nye P H. *Solute Transport in the Rhizosphere*. Oxford: Oxford Univ. Press, 2000.
- [16] Smith S E. Mycorrhizas of autotrophic higher plants. *Biol Rev*, 1980, 55:475—510.
- [17] Azcón R, Gómez M, Tobar R M. Physiological and nutritional responses by *Lactuca sativa* L. to nitrogen sources and mycorrhizal fungi under drought conditions. *Biol Fertil Soil*, 1996, 22:156—161.
- [18] Mader P, Vierheilig H, Streitwolf-Engel R, *et al.* Transport of ^{15}N from a soil compartment separated by a polytetrafluoroethylene membrane to plant roots via the hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*, 2000, 146:155—161.
- [19] Young J L and R W Aldag. Inorganic forms of nitrogen in soil. In: *Nitrogen in agricultural soils*. Stevenson F. J. ed. Agronomy Monograph. 22. ASA, Madison, WI, 1982. 43—66.
- [20] Jin H, Pfeffer P E, Douds D D, *et al.* The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 2005, 168:687—696.
- [21] Jean B C, Philip J M, Jean B. Effect of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* on the uptake of amino nitrogen by *Lolium perenne*. *New Phytol*, 1997, 137:345—349.
- [22] Hodge A, Campbell C, Fitter A H. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquisition nitrogen directly from organic material. *Nature*, 2001, 413: 297—299.
- [23] Joanne L, Hodge A, Fitter A H. Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytologist*, 2008, 181:199—207.
- [24] Atul-Nayyar A, Hamel C, Hanson K, *et al.* The arbuscular mycorrhizal symbiosis links N mineralization to plant demand. *Mycorrhiza*, 2008, 12.
- [25] Schimel J P, Weintraub M N. The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biol Biochem*, 2003, 35:549—563.
- [26] Chen N, Wang Y S, Yang Y J, *et al.* Effects of nutrient solutions with different ratios of N to P. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2007, 13(1):143—147.
- [27] Corkidi L, Diane L, Rowland, *et al.* Nitrogen fertilization alters the functioning of arbuscular mycorrhizas at two semiarid grasslands. *Plant and Soil*, 2002, 240:299—310.
- [28] Cornejo P, Borie F, Rubio R, *et al.* Influence of nitrogen source on the viability, functionality and persistence of *Glomus etunicatum* fungal propagules in an Andisol. *Applied Soil Ecology*, 2007, 35:423—431.
- [29] Valentine A J, Osborne B A, Mitchell D T. Form of inorganic nitrogen influences mycorrhizal colonization and photosynthesis of cucumber. *Scientia Horticulturae*, 2002, 92:229—239.
- [30] Kate B, Rhae A D, Jean K. Increased N availability in grassland soils modifies their microbial communities and decreases the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38:1583—1595.
- [31] Kaori Y, Xiaonan X, Kusumoto D, *et al.* Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta*, 2007, 227:125—132.
- [32] Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 2005, 435:824—827.
- [33] Akiyama, Hayashi H. Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Ann Bot*, 2006, 97:925—931.
- [34] Azcón R, Gómez M and Tobar R. Effects of nitrogen source on growth, nutrition, photosynthetic rate and nitrogen metabolism of mycorrhizal and phosphorus-fertilized plants of *Lactuca sativa* L. *New Phytol*, 1992, 121:227—234.
- [35] Azcón R, Gómez M and Tobar R. Physiological and nutritional responses by *Lactuca sativa* L. to nitrogen sources and mycorrhizal fungi under drought conditions. *Biol Fertil Soils*, 1996, 22:156—161.
- [36] Azcón R, Tobar R. Activity of nitrate reductase and glutamine synthetase in shoot and root of mycorrhizal *Allium cepa* effect of drought stress. *Plant Science*, 1998, 133:1—8.
- [37] Raven J R. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *J. Experimental Botany*, 2002, 58: 769—792.
- [38] Smith S E. Mycorrhizas of autotrophic higher plants M. *Biol. Rev*, 1980, 55:475—510.
- [39] Hageman R H and Reed A J. Nitrate reductase from higher plants. *Met. Enzymol*, 1980, 49: 270—280.

- [40] Frey B, Schuepp H. Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays* L. *New Phytologist*, 1993, 124: 221 — 230.
- [41] Sundaresan P, Rata N V, Gunasera P, *et al.* Studies on nitrate reduction by VAM fungal spores. *Current Sci*, 1988, 57:84 — 85.
- [42] Kraldorf M, Zimmer W and Bothe H. Genetic evidence for the occurrence of assimilatory nitrate reductase. *Mycorrhiza*, 1994, 5:23 — 28.
- [43] Smith S E, John B T, Smith F A, *et al.* Activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in *Trifolium subterraneum* L. and *Allium cepa* L.: Effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. *New Phytol*, 1985, 99:211 — 227.
- [44] López-Pedrosa A, Gonzalez-Guerrero M, Valderas A, *et al.* *GintAMT1* encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genet Biol*, 2006, 43:102 — 110.
- [45] Manjula G, Philip E P, Hairu J, *et al.* Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 2005, 435:819 — 823.
- [46] Breuninger M, Trujillo C G, Serrano E, *et al.* Different nitrogen sources modulate activity but not expression of glutamine synthetase in arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41:542 — 552.
- [47] Robinson S A, Slade A P, Fox G G, *et al.* The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiol*, 1991, 95:509 — 516.
- [48] Jean-Patrick T, Marc S A and Christiane C. Nitrogen transfer and assimilation between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith and Ri T-DNA roots of *Daucus carota* L. in an in vitro compartmented system. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50:251 — 260.
- [49] Johnson A, Jakobsen I, Jensen E S. Hyphal transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus of N applied to the soil as ammonium or nitrate. *Biol Fertil Soil*, 1993, 16:66 — 70.
- [50] Ruiz-Lozano J M, Azcón R. Mycorrhizal colonization and drought stress exposition as factors affecting nitrate reductase activity in lettuce plants. *Agric Ecosyst Environ*, 1996, 60:175 — 181.
- [51] Kaldorf M, Schmelzer E, Bothe H. Expression of maize and fungal nitrate reductase genes in arbuscular mycorrhiza. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 1998, 11:439 — 448.
- [52] Pateman J A, Kinghorn J R. Nitrogen metabolism. In: Smith J E, Berry D R, eds. *The Lamentous Fungi*, Vol. 2. Biosynthesis and metabolism. London, UK: Edward Arnold Press, 1975. 159 — 237.
- [53] Jennings D H. *The Physiology of Fungal Nutrition*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1995.
- [54] Bago B, Shachar-Hill Y, Pfeffer P E. Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *New Phytologist*, 2001, 149:4 — 8.
- [55] Cristina C, Helge E, Carmen T, *et al.* Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology*, 2007, 144:782 — 792.
- [56] Messenguy F, Colin D, Have J. Regulation of compartmentation of amino pools in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on metabolic control. *European Journal of Biochemistry*, 1980, 108:439 — 447.
- [57] Fitter A H, Graves J D, Watkins N K, *et al.* Carbon transfer between plants and its control in networks of arbuscular mycorrhizas. *Functional Ecology*, 1998, 12: 406 — 412.
- [58] Robson A D, O'Hara G W, Abbott L K. Involvement of phosphorus in nitrogen fixation by subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Plant Physiol*, 1981, 8:427 — 436.
- [59] Rice E L, Pancholy S K. Inhibition of nitrification by climate ecosystems. *American Journal of Botany*, 1972, 59:1033 — 1040.
- [60] Klopatek C C, Klopatek J M. Nitrifiers and mycorrhizae in pristine and grazed Pinyon-Juniper ecosystems. *Arid Soil Res and Rehabil*, 1997, 11: 331 — 342.
- [61] Cavagnaro T R, Jackson L E, Scow K M, *et al.* Effects of Arbuscular Mycorrhizas on Ammonia Oxidizing Bacteria in an Organic Farm Soil. *Microbial Ecology*, 2007, 54:618 — 626.
- [62] Ortiz-Ceballos A I, Pena-Cabral J J, Carlos F, *et al.* Mycorrhizal colonization and nitrogen uptake by maize: combined effect of tropical earthworms and velvetbean mulch. *Biol Fertil Soils*, 2007, 44:181 — 186.
- [63] Reddel P, Spain A V. Earthworms as vectors of viable propagules of mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem*, 1991, 23:767 — 774.
- [64] Michel C, Damien B, Annick B. Ammonia: a candidate for nitrogen transfer at the mycorrhizal interface. *Trends in Plant Science*, 2006, 11(6): 263 — 266.

参考文献:

- [4] 李晓林, 冯固. 丛枝菌根生态生理. 北京: 华文出版社, 2001.
- [5] H. Marschner, 李春俊, 王震宇, 等. 高等植物的矿质营养. 北京: 中国农业大学出版社, 2001. 160 ~ 168.
- [6] 陆景陵. 植物营养学(第二版上册). 北京: 中国农业大学出版社, 2003. 25 ~ 31.
- [10] 李侠, 张俊伶. 丛枝菌根根外菌丝对不同形态氮素的吸收能力. 核农学报, 2007, 21(2): 195 ~ 200.
- [26] 陈宁, 王幼珊, 杨延杰, 等. 不同氮磷比例营养液对 AM 真菌生长发育的影响. 植物营养与肥料学报, 2007, 13(1): 143 ~ 147.