

菌根际及菌丝酸性磷酸酶活性的简易测试

宋勇春 李晓林* 冯 固 张福锁

(中国农业大学植物营养系, 北京 100094.*联系人, Email: lixl@mx.cei.gov.cn)

摘要 以红三叶草为材料, 利用五室隔网培养方法, 研究了接种条件下对菌根植物根系及其根外菌丝进行酸性磷酸酶活体染色的可行性. 结果表明, 接种菌根真菌能明显提高根系的酸性磷酸酶活性, 在测试试纸上呈现出较深的菌根印, 反应时间以 1 h 为宜. 菌丝在测试试纸上也形成了明显的菌丝印, 证明菌丝能分泌酸性磷酸酶.

关键词 菌丝 活体染色 酸性磷酸酶 菌根印 菌丝印

活体染色技术主要基于以琼脂作为一种基质, 已被发展为观测植物根际化学变化的方法. 如 pH 变化、氧化过程、有机酸分泌、铁还原和锰还原及各种无机磷酸盐的溶解. 为了测试磷酸酶活性, Dinkelaker 等人^[1]借鉴 Warren 等人^[2]在动物学上酸性磷酸酶活体染色的方法成功地演示了根土界面植物根际酸性磷酸酶的活性. 此试验的目的在于建立一种快速、直接的方法来定性评价菌根及其根外菌丝分泌酸性磷酸酶的能力.

1 材料与方法

试验采用有机玻璃制成的五室培养装置(见图 1). 包括 1 个根室、2 个菌丝室和 2 个外室, 根室和菌丝室之间用孔径 30 μm 的尼龙网隔开, 使根系限制在根室中生长, 而菌根菌丝则可以穿过尼龙网到边室土壤中吸收养分, 达到区分根系吸收区的目的. 菌丝室和外室之间用 0.45 μm 的膜隔开, 将菌丝限制在菌丝室内, 并在隔膜处相对富集.

供试土壤来自中国农业大学昌平长期定位肥料试验地只施氮肥的小区, 施氮水平为 270 $\text{kg/h} \cdot \text{m}^2$. 供试土壤理化性状见表 1.

供试作物为红三叶草(*Trifolium pratense* L); 供试菌根菌种为 *Glomus mosseae*, 先用砂土盆栽三叶草繁殖, 生长 3 个月后用已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.

试验设两个处理, 分别为接种和不接种(对照)菌根真菌, 各处理均施有

50 mg 的 P 植酸钠(Na-phytate), 200 mg 的 $\text{N}(\text{NH}_4\text{NO}_3)$, 200 mg 的 $\text{K}(\text{K}_2\text{SO}_4)$, 50 mg 的 $\text{Mg}(\text{MgSO}_4)$ 和 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 $\text{Zn}(\text{ZnSO}_4)$. 作物生长期追施一次氮肥($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 保证氮素供应充足. 将 30 g 接种剂和 120 g 土壤完全混匀后装入菌根处理的根室, 对照组则加入相同重量的灭菌处理的接种剂和 10 mL 菌种滤液, 以保证微生物区系的一致性. 菌丝室土壤为 100 g, 外室土壤为 150 g. 三叶草种子在 10% H_2O_2 中浸泡 10 min 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 70 粒, 并在各室土壤表面覆盖一层石英砂以减少水

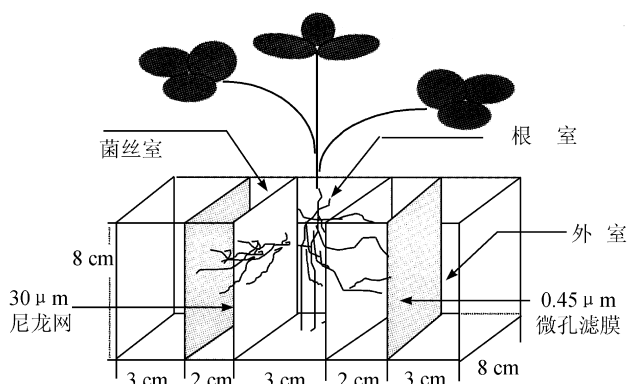


图 1 试验装置示意图

分蒸发. 试验在生长室中进行, 生长期间温度维持在 20 ~ 28℃, 光照时间为 15 h/d, 每天 8:00~23:00 用生物镓灯补充光照.

表 1 供试土壤理化性状

有机质(O.M) / %	有效磷(Olsen-P) /mg · kg ⁻¹	碱解氮 (Alk-hydro N)/ mg · kg ⁻¹	速效钾 (NH ₄ OAc-K) /mg · kg ⁻¹	pH 值 (CaCl ₂)
1.24	2.56	87.2	100.3	7.5

三叶草生长 50 d 后, 将五室装置在隔网处和隔膜处打开, 对菌根及菌丝进行活体染色.

(i) 活体染色方法所需化学试剂. α-萘基磷酸二钠盐(C₁₀H₇O₄PNa₂), 分子量为 268.1, Sigma 试剂. 固红 TR 重氮盐/ Fast Red TR (C₇H₆N₂Cl · C₁₀H₇O₆S₂), 分子量为 440.9, Sigma 试剂. 柠檬酸三钠(Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O), 分子量为 294.10, 分析纯.

(ii) 试剂配制及要求. (a) 50 mmol · L⁻¹ pH=5.6, 7.0 和 9.0 的柠檬酸三钠缓冲液: 称取 14.705 0 g 柠檬酸三钠, 用 1 mol · L⁻¹ HCl 或 NaOH 调到所需 pH. (b) 基质溶液: 称取 10.053 8 g (37.5 mmol · L⁻¹) α-萘基磷酸二钠盐溶于相应 pH 的柠檬酸三钠缓冲液中. (c) Fast Red TR 溶液: 称取 1.190 4 g (2.7 mmol · L⁻¹) Fast Red TR 溶于相应 pH 的柠檬酸三钠缓冲液中. 试剂(a)可在 0 ~ 4℃冰箱中贮存 1 个月, 试剂(b)和试剂(c)应在使用前 2 h 内配制.

(iii) 操作步骤. 进行活体染色前, 先将配制好的基质溶液和 Fast Red TR 溶液以 1 : 10 体积比混合均匀后倒入一培养皿中, 溶液量以浸没所需使用的测试试纸为准(任何结构好的惰性滤纸都可作为磷酸酶活体染色的测试试纸, 推荐使用 Whatman, MN 260, Machery-Nagel 层析纸). 把试纸(Whatman 层析纸)放入加有反应液的培养皿中, 10 s 后取出放在有机玻璃板上, 过量的溶液用吸水纸除去(试纸的浸透和风干应在通风橱中进行以防止有毒挥发物污染环境, 并可加速滤纸的干燥过程). 试纸干燥之后, 将其边缘部分(5 mm)切掉, 因为这部分试纸中含有更高浓度的 Fast Red TR 显色剂(与试纸的其他部位相比), 而过高浓度的 Fast Red TR 将导致试验中试纸上的指示剂反应增强而呈现出一定的颜色反应. 尔后, 将处理好的试纸直接铺于打开的根面上(不同处理中试纸应放在根面的相同部位). 为保证试纸与根面的良好接触, 减少水分蒸发, 可用胶片或塑料膜盖在试纸上, 再将试验装置恢复原状(整个显色过程必须在植物正常生长的状态下进行, 以保证供试植物根系和菌根化植物根系的正常生理活性). 0.5 或 1 h 后取下试纸并观察显色结果.

2 试验结果

试验结果见图 2 ~ 4. 植株生长 50 d 后, 将培养装置在隔网及隔膜处打开, 可以看到接种的三叶草植株根系生长密集、分布范围广, 而对照处理根系数量少, 分布稀疏.

图 2 为将浸有反应基质溶液(pH = 5.6)的试纸直接贴于上述不同处理的植物根系所得的结果. 从图 2 可以看出, 三叶草根系和菌根化三叶草根系分泌的胞外酸性磷酸酶在试纸上均产生了或深或浅的根印和菌根印. 但由于反应时间不同, 所得结果不同. 图 2(a)和(b)为反应 0.5 h 时所获得的菌根印和根印, 从图可以看出, 菌根化植物根系比非菌根化植物根系形成的根印深而且数量多; 图 2(c)和(d)为反应 1 h 时所得菌根印和根印, 从图可以看出, 菌根化植物根系与非菌根化植物根系形成根印的规律与反应 0.5 h 所得的结果一致, 但这时形成的根印颜色更深, 更便于观察. 然而, 反应时间再延长, 形成的根印和菌根印不再进一步加深(图片

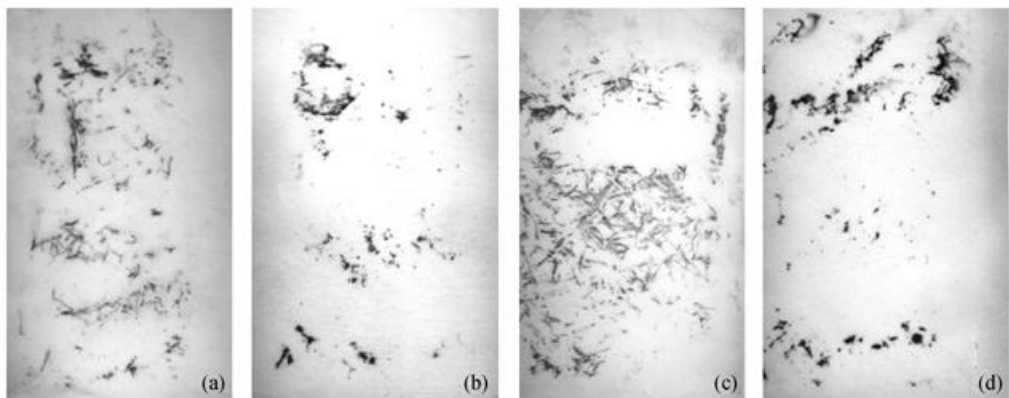


图 2

(a) 接种处理反应 0.5 h 后所得菌根印；(b) 对照处理反应 0.5 h 后所得根印；(c) 接种处理反应 1 h 后所得菌根印；(d) 对照处理反应 1 h 后所得根印

未列出).

试验发现该颜色反应在 $\text{pH} = 7.0$ 时仍能进行, 但反应已比 $\text{pH} = 5.6$ 时减弱; 在 $\text{pH} = 9.0$ 时颜色反应已被强烈抑制, 甚至在试纸上没有留下任何印记.

图 3 和图 4 为用实体解剖镜(Wild Photomakroskop M400)摄像所得结果. 图 3 为靠近菌丝室 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜一侧的土体中形成的浓密的菌丝. 从图 3 可以看出, 菌丝大多为透明的且表面有明显的粘液物质, 表明这些菌丝仍具有较强的活力. 图 4 为将反应基质溶液直接滴于图 3 所示的新取的微孔滤膜上所得的菌丝印. 从图 4 可以看出, 具有酸性磷酸酶活性的菌丝在试纸上均呈现出或深或浅的印迹, 而且在没有菌丝分布的土体部分也表现出一定的颜色反应, 从图中看为灰色或浅灰色. 说明在试验中由于土壤微生物的活动, 土壤已具有较高的酸性磷酸酶活性.

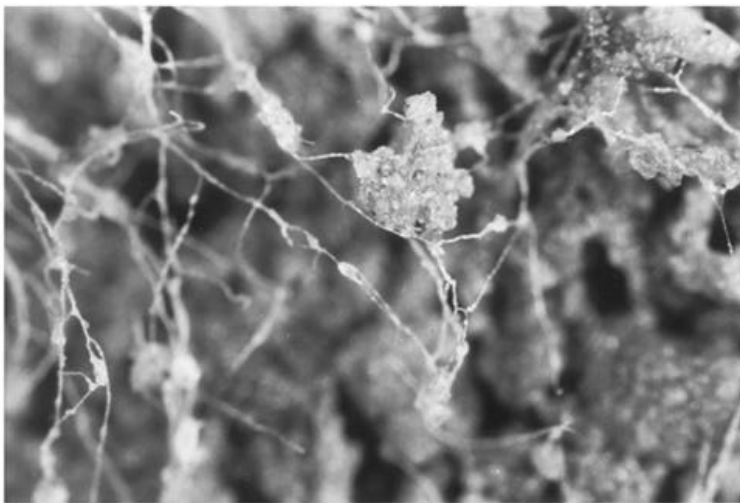


图 3 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜一侧土体中形成的菌丝体($\times 160$)

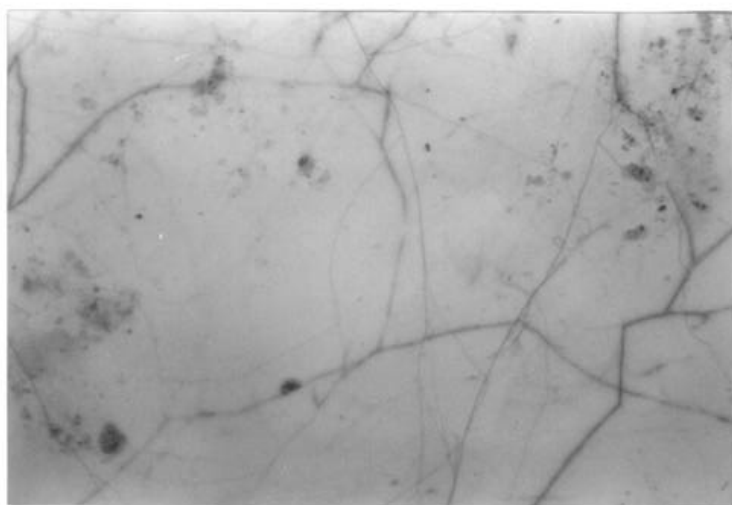


图4 将反应基质溶液直接滴于微孔滤膜上所得到的菌丝印迹($\times 250$)

磷酸酶作为一种胞外酶,与根表皮细胞壁密切相关^[3,4]。试验中所得到的菌根印迹主要来自于菌根化植物根系根表皮细胞所释放的具有活性的酸性磷酸酶。某些酸性磷酸酶活性可能来自土壤微生物^[5]。因为无论接种与否,土壤中均有一定数量的细菌和放线菌,通常这些土壤微生物活性的贡献是很小的,在根区土壤中表现出很低的磷酸酶活性(图4)。菌根印的深浅反映了根系不同部位酸性磷酸酶活性的强弱,这与 Shaykh^[3]和 Dinkelaker^[1]的研究结果相一致。

试验中菌根印的深浅取决于作用时间(图2),随反应时间延长菌根印迹颜色加深,与 Dinkelaker^[1]在植物根系上得到的结果相似,而此试验发现1 h后颜色反应即趋于停止,颜色不再加深。对其他植物种类和土壤,最佳反应时间是否相同还需通过试验来确定。

试验中使用了不同pH值的试纸,证明了所测结果是酸性磷酸酶而不是碱性磷酸酶对 α -奈基磷酸二钠盐的水解起作用,因为此颜色反应在pH=7.0以上被强烈抑制。在pH=7.0时的颜色强度稍弱于pH=5.6,可能由于土壤具有较强的pH缓冲能力而使颜色反应仍能进行。据 Dinkelaker^[1]报道,反应基质的选择是活体演示酸性磷酸酶方法成功与否的关键。如采用测定根系及土壤磷酸酶活性的反应基质pNPP(对硝基苯磷酸二钠)时,在反应一段时间后由于颜色扩散,将使根印比较模糊,而用 α -奈基磷酸二钠盐作反应基质,反应终产物不溶解也不会扩散^[6]。因此,在试纸上可出现明显的菌根印迹。此外,使用 α -奈基磷酸二钠盐有利于在低pH时使 α -奈酚和Fast Red TR染色剂之间的反应顺利进行,因为酸性磷酸酶在低pH值时可表现出最大活性^[7]。利用 α -奈基磷酸二钠盐简易方法可以在最适pH(5.6)下直接、连续、直观地对酸性磷酸酶进行定性。

虽然文中所描述的方法不能取代离体测定酸性磷酸酶活性的标准方法,然而,试纸活体染色法是非破坏性的,可应用于菌根植物根系及其根外菌丝磷酸酶定性。由于方法中省去了洗根步骤,不需要考虑磷酸酶活性损失,而且可以同时看到菌根根系和周围土壤的磷酸酶活性的强弱,尤其是可通过颜色深浅的差异来定性鉴定根区范围内磷酸酶活性的高低。这一方法还可以用来比较不同品种或基因型植物的磷酸酶活性与生长时期、供磷部位、温度和其他

环境因素与植物根系利用有机磷能力之间的关系。但缺点是该方法还不能排除土壤及土壤微生物的干扰,测试中必须设相应的对照。

致谢 本文由陆景陵教授精心修改,特此致谢。本工作为国家自然科学基金(批准号: 39790100)资助项目。

参 考 文 献

- 1 Dinkelaker B, Marschner H. *In vivo* demonstration of acid phosphatase activity in the rhizosphere of soil-grown plants, *Plant and Soil*, 1992, 144: 199~205
- 2 Warren R J, Moss D W. An automated continuous monitoring procedure for the determination of acid phosphatase activity in serum. *Clin Chim Acta*, 1977, 77: 179~188
- 3 Shaykh M M, Roberts L W. A histochemical study of phosphatases in root apical meristems. *Ann Bot*, 1974, 38: 165~174
- 4 Felipe M R, Pozuelo J M, Cintas A M. Acid phosphatase localization at the surface of young corn roots. *Agrochim*, 1979, 23: 143~150
- 5 Tarafdar J C, Claassen N. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants though the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. *Biol Fertil Soil*, 1988, 5: 308~312
- 6 Gundlach G, Muhlhausen B. Untersuchungen zur kupplung des 1-naphthols mit fast-red-TR. Untersuchungen zur optimierung einer kontinuierlichen bestimmung der sauren phosphatase, 1. Mitteilung *J Clin Chem Clin Biochem*, 1980, 18: 603~610
- 7 Moss D W. Acid phosphatases. In: Bergmeyer J, Grabl M, eds. *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol IV. Weinheim: Verlag Chemie, 1984. 92~106

(1999-07-01 收稿, 1999-09-20 收修改稿)