菌根真菌促进植物吸收利用氮素机制的研究进展*

孙秋玲[1,2] 戴思兰[1] 张春英[2**] 魏翔莺[2,3]

([1]北京林业大学园林学院,国家花卉工程技术研究中心,北京 100083;[2]上海市园林科学研究所,上海 200232;[3]福建农林大学园艺学院,福州 350002)

摘 要 作为自然界最为普遍的一种植物共生体,菌根能够极大地促进植物对氮素的吸收和利用,其中菌根真菌在共生结构功能中发挥了重要作用。本文分别从菌根解剖构造、生理生化和分子生物学方面系统总结了菌根真菌促进植物吸收和利用氮素的研究现状。重点介绍了菌根真菌可利用的氮素形态及影响其利用的主要因素、菌根真菌的氮代谢途径GS-GOGAT以及菌根真菌中存在的鸟氨酸循环途径,指出精氨酸是菌丝内氮转运的主要形式,NH_3可能为菌根真菌和植物界面质外体的主要转运形式。

关键词 菌根;氮素形态;分离基因;代谢途径;生理反应;解剖特征

中图分类号 S718.81 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2012)5-1302-09

Mechanisms of mycorrhizal fungi in promoting nitrogen uptake and utilization by plants: A review. SUN Qiu-ling[1,2], DAI Si-lan[1], ZHANG Chun-ying[2**], WEI Xiang-ying[2,3] ([1]*College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, National Engineering Research Center for Floriculture, Beijing* 100083, *China*; [2]*Shanghai Landscape and Gardening Research Institute, Shanghai* 200232, *China*; [3]*College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou* 350002, *China*). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, **31**(5): 1302-1310.

Abstract: Mycorrhiza is the most common symbiosis in nature, which can greatly promote the nitrogen uptake and utilization by host plants. In the function of the mutualistic symbiosis, mycorrhizal fungi play an important role. This paper summarized the research progress in the mechanisms of mycorrhizal fungi in promoting the nitrogen uptake and utilization by plants from the aspects of mycorrhizal anatomical structure, physiology, biochemistry, and molecular biology, with the focus on the available nitrogen forms and the factors affecting their utilization, the nitrogen metabolic pathways GS-GOGAT in mycorrhzal fungi, and the ornithine cycle in mycorrhizal fungi. It was pointed out that arginine was the main nitrogen translocation form within the hyphae, and NH_3 could be the main nitrogen translocation form in the interfacial apoplast.

Key words: mycorrhiza; nitrogen form; isolated genes; metabolic pathway; physiological responses; anatomical feature.

菌根(mycorrhizae)是自然界最为普遍的一种植物共生现象,地球上97%的有花植物都能形成菌根(刘文科,2003)。它是指土壤中的一类真菌与高等植物营养根系形成的一种共生体。根据菌根形态学及解剖学特征,菌根可分为3种主要类型,即外生菌根(ectomycorrhizas,ECM)、内生菌根及内外生菌根(ectoendomycorrhizas,EEM)。而内生菌根包括丛枝菌根(arbuscular mycorrhizas,AM)、杜鹃花类菌根(ericoid mycorrhizas,ERM)、兰科菌根(orchid mycorrhizas,OM)、水晶兰类菌根(monotropoid mycorrhizas,MM)、浆果鹃类菌根(arbutoid mycorrhizas,ARM)等(Harley,1989)。菌根共生体可极大地促进植物对水分和矿物质营养元素的吸收和利用,尤其是对P、N、Zn、Cu的吸收(Clark & Zeto,2000; Parniske,2008)。氮素作为植物的生命元素,对于植物的生长有着至关重要的作用,它不仅是生物有机体的组成成分,而且还参与一些酶以及叶绿素的合成,直接关系到植物细胞的分裂和生长。实际上,植物的生长和产量完全依赖于土壤中的氮含量,尤其是有

*国家自然科学基金项目(30972409)资助。

**通讯作者 E-mail: mayzhang55@yahoo.com.cn

收稿日期:2011-12-14 接受日期:2012-02-19

效氮含量(Gobert & Plassard,2008)。其中菌根真菌对氮素的吸收是植物氮吸收的一个重要的途径(Johansen & Jensen,1996)。以 AM 真菌和植物为材料进行盆栽试验,结果显示:植物根系全氮的 21% ~ 50% 都来自于与其共生的根外菌丝的吸收(Toussaint *et al.*,2004; Jin *et al.*,2005; Manjula *et al.*,2005),在外生菌根这个比例甚至达到了 75%(Jargeat *et al.*,2003)。除对无机氮吸收的促进作用外,菌根还可以加速土壤有机氮的矿化从而使得有机氮成为植物可利用的氮素(Hodge *at al.*,2001)。目前,关于菌根真菌促进植物吸收和利用氮素的机制研究已经取得了一定进展,但是其内部的分子机理以及调节机制仍处于研究的起步阶段,深入研究该促进机制有助于更好地理解菌根本身及其在整个自然生态系统中的作用,进而有助于将菌根转化为生产力,使其在农业可持续发展和生态修复中发挥生物肥料、生物保护者以及生态调节器的重要作用。本文对菌根真菌促进植物吸收氮素的研究现状进行了系统总结,并对目前研究中存在的问题进行了分析,以期为更好地促进菌根真菌研究提供依据。

1 菌根真菌可利用的氮素形态及其影响因素

1.1 菌根真菌可利用的氮素形态

自然生态系统中,土壤中的氮营养元素可分为无机氮和有机氮,其中 NO_3^--N 和 NH_4^+-N 是植物可直接利用的两种主要无机氮形态(陆景陵,2003)。大部分植物不能利用有机氮,即使一些植物具有分泌蛋白酶或者利用蛋白质降解产物的能力,它们也在很大程度上依赖于与其共生的菌根真菌来吸收这部分氮(Paungfoo-Lonhienne *et al.*,2008)。试验证明,不论是 AM 植物、外生菌根植物还是杜鹃花类菌根植物,在以 NO_3^--N、NH_4^+-N 以及某些氨基酸为唯一氮源情况下,接种植物生长势均明显优于未接种植物,且植株氮含量也高于同期对照中的氮含量(Tibbett & Sanders,2002; Wallander,2002)。这说明菌根化植物具有吸收无机氮和有机氮的能力,但此类试验并没有揭示这种促进作用是菌根真菌直接吸收氮所致,还是菌根真菌的存在所产生的间接促进作用。利用网格分室培养植物结合同位素标记技术,研究者证明:菌根真菌可以直接吸收外界的 $^{15}NO_3^-$-N、$^{15}NH_4^+$-N 和某些有机氮并将其转运至寄主植物(Manjula *et al.*,2005; Cristina *et al.*,2007)。Talbot 和 Treseder(2010)搜集了近 60 年的文献报道,总结了 26 种菌根真菌对 20 种常见氨基酸的吸收作用,发现所调查的菌根真菌至少可以利用一种形式的氨基酸作为生长的唯一氮源,而其中的氨基酸也至少能被一种菌根真菌利用。除了氨基酸这样的单体态有机氮,AM 真菌还能够利用一些难分解的有机态氮(如蛋白质、几丁质以及 DNA)作为生存的唯一氮源(Manjula *et al.*,2005),并可以加快土壤中有机氮的矿化(Hawkins *et al.*,2000)。以野生黑麦和不同 AM 真菌为试验材料,Atul-Nayyar 等(2009)发现:接种 AM 真菌后,植物生长环境中矿化氮数量显著高于对照,碳氮比显著低于对照。尽管如此,不同的菌根真菌对氮素的利用能力差异很大。有的菌根真菌比较喜好无机态氮,有的菌根真菌吸收有机态氮的能力较强(Mader *et al.*,2000; Manjula *et al.*,2005; 尹丽娟等,2010)。

1.2 影响菌根真菌利用氮素效率的因素

影响菌根真菌吸收氮素的因素大致可分为化合物本身特性和环境两部分。其中 NO_3^--N 在土壤中的移动性很强,能通过扩散作用快速到达植物根系(Tinker & Nye,2000)。一般情况下,NO_3^--N 不会成为菌根化植物吸收氮素的难题,只有在干旱条件下,水分含量的下降才会导致其在土壤中的移动性降低。而 NH_4^+-N 则易被土壤胶体所吸附,在土壤中的移动性较差,往往在根系周围形成一个亏缺区(Smith,1980),这就为菌根真菌发挥作用提供了前提。

相对而言,菌根真菌对有机氮的吸收较复杂。土壤中的有机氮包括一部分脂肪族氮化合物,与多糖结合的氮化合物以及一部分芳香族氮化合物,并且各种形式处于一个动态变化的过程(Talbot & Treseder,2010)。一方面,菌根真菌对氨基酸等低聚合有机氮的吸收与土壤中氮素的相对丰度值以及氨基酸的碳结构相关;另一方面,有机氮在分子量、粘合强度和结构等方面差异很大,这些都是菌根真菌对有机氮降解和吸收的影响因子,其中分子量的影响作用尤为突出。例如,某些菌根真菌能够利用一些单体形态或者低聚合形态的氮,而高聚合态氮只能降解为单体或者低聚合态氮时才能被真菌吸收(Abuzinadah & Read,1986)。另外,杜鹃花类菌根真菌可利用的有效碳含量可影响其对氨基酸的吸收和产生胞外酶的能力(Whittaker & Cairney,2001)。在高浓度的葡萄糖条件下,杜鹃花类菌根真菌(*Rhizoscyphus ericae*)能够从谷氨酸盐中吸收 91% 的氮,而低浓度下仅能吸收 72%(Grelet *et al.*,2005)。但

是碳氮营养与宿主植物氮素吸收利用之间的相关性以及它们之间的影响机制至今还不清楚。

2 菌根真菌促进植物利用氮素的分子机理

2.1 菌根真菌中已分离到的与氮素转运、代谢相关的基因

2.1.1 菌根真菌中已分离到的与氮素转运相关的基因 菌丝体能够吸收无机氮、氨基酸、多肽甚至某些简单的蛋白质,说明其体内必然存在吸收这些氮化合物的转运蛋白。外生菌根真菌中氮素转运蛋白的研究相对其他菌根真菌类型早。目前已经分离到来自不同菌根真菌的铵盐转运蛋白基因共6个,外生菌根真菌有5个(Javelle *et al.*,2001,2003; Montanini *et al.*,2002; Willmann *et al.*,2007),另一个是2006年由 Lápez-Pedrosa 等 AM 真菌中分离得到的 *GintAMT*1。这些转运蛋白基因包括 *AMT*1、*AMT*2、*AMT*3 类型,同属于 *Mep/Amt* 多基因家族。其(*AMT*2 和 *AMT*3)首次克隆是2001年在外生菌根真菌 *Hebeloma cylindrosporum* 中进行(Javelle *et al.*,2001),随后 Javelle 从该菌中克隆到了 *Mep/Amt* 家族中3个铵盐转运蛋白基因,并对其进行了系统发育关系和表达分析,结果证明细胞内氮库对于铵盐转运蛋白基因的表达有调节作用(Javelle *et al.*,2003)。研究者还分别从外生菌根真菌和 AM 真菌中分离到3个与 NO_3^--N 转运相关的转运蛋白基因:*HcNrt*2(Jargeat *et al.*,2003)、*TbNrt*2(Montanini *et al.*,2006)、*GiNT*(Tian *et al.*,2010),并且得出 NO_3^--N 可以诱导这些基因的表达。

虽然氨基酸转运体系已经在高等植物(Okumoto *et al.*,2002)、酵母菌(Regenbrg *et al.*,1999)以及丝状真菌(Struck *et al.*,2002;Trip *et al.*,2002)中得到了广泛而深入的研究,但是菌根真菌中目前为止只发现了4个相关基因(表1),其中2个基因是从外生菌根真菌 *Amanita muscaria* 和 *Hebeloma cylindrosporum* 中发现的(Nehls *et al.*,1999;Wipf *et al.*,2002),但研究者并未对基因的表达进行分析,*AmAAP*1 的表达分析也只是在纯培养下的 *A. muscaria* 菌丝中进行,没有在植物菌根共生体中进行验证。Cappellazzo 等(2008)最近从 AM 真菌中分离到一种氨基酸转运蛋白基因:*GmosAAP*1,通过酵母异源功能互补试验和吸收试验证明:*GmosAAP*1 能够通过与质子耦合的途径运输脯氨酸,整个运输过程对 pH 和能量有很强的依赖性。对其进行系统发育关系分析,结果发现:*GmosAAP*1 与真菌的氨基酸通透酶基因聚合在一起,与植物体内的转运蛋白基因明显分离。Morel(2008)、Benjdia 等(2006)还从外生菌根真菌中分离到了转运尿素和多肽的转运蛋白基因:*PiDur*3、*HcPTR*2A、*HcPTR*2B,这些都为菌根真菌利用氮素机理的研究提供了一定的分子依据。

2.1.2 菌根真菌中已分离到的与氮素代谢相关的基因 近年来,研究者相继从外生菌根真菌和 AM 真菌中分离得到无机氮代谢途径中的相关基因(表2),表达模式分析证明:这些基因编码的蛋白直接参与真菌体内氮素的代谢反应。其中 AM 真菌的研究较为深入。该类真菌促进植物利用氮素是由两个区域的反应配合完成:根外菌丝中氮素的合成代谢;

表1 现已分离到的菌根真菌中编码氮素转运蛋白的基因
Table 1 Isolated nitrogen transporter genes in mycorrhizal fungi

氮化合物	菌根真菌	名称	文献来源	菌根类型
铵盐	*Hebeloma cylindrosporum*	*HcAmt*1 *HcAmt*2 *HcAmt*3	Javelle *et al.*,2001,2003	ECM
铵盐	*Tuber borchii*	*TbAmt*1	Montanini *et al.*,2002	ECM
铵盐	*Amanita muscaria*	*AmAmt*2	Willmann *et al.*,2007	ECM
硝酸盐	*Hebeloma cylindrosporum*	*HcNrt*2	Jargeat *et al.*,2003	ECM
硝酸盐	*Tuber borchii*	*TbNrt*2	Montanini *et al.*,2006	ECM
尿素	*Paxillus involutus*	*PiDur*3	Morel *et al.*,2008	ECM
氨基酸	*Amanita muscaria*	*AmAAP*1	Nehls *et al.*,1999	ECM
氨基酸	*Hebeloma cylindrosporum*	*HcGAP*1	Wipf *et al.*,2002	ECM
多肽	*Hebeloma cylindrosporum*	*HcPTR*2A	Benjdia *et al.*,2006	ECM
多肽	*Hebeloma cylindrosporum*	*HcPTR*2B	Benjdia *et al.*,2006	ECM
寡肽	*Hebeloma cylindrosporum*	*HcOPT*1	Müller *et al.*,2007	ECM
氨基酸	*Glomus mosseae*	*GlmosAAP*1	Cappellazzo *et al.*,2008	AM
氨基酸	*Glomus intraradices*	*GintAAP*1	Cappellazzo *et al.*,2008	AM
铵盐	*Glomus intraradices*	*GintAMT*1	López-Pedrosa *et al.*,2006	AM
硝酸盐	*Glomus intraradices*	*GiNT*	Tian *et al.*,2010	AM

表 2 现已分离得到的菌根真菌中编码不同氮代谢酶的基因
Table 2 Genes involved in the metabolism of nitrogen compounds characterized in mycorrhizal fungi

酶	菌根真菌	名称	文献来源	菌根类型
硝酸还原酶	*Tuber borchii*	*TbNar*1	Genbank	ECM
硝酸还原酶	*Hebeloma cylindrosporum*	*HcNar*1	Genbank	ECM
亚硝酸还原酶	*Tuber borchii*	*TbNir*1	Genbank	ECM
亚硝酸还原酶	*Hebeloma cylindrosporum*	*HcNir*1	Genbank	ECM
谷氨酰胺合成酶	*Tuber borchii*	*TbGLN*1	Genbank	ECM
谷氨酰胺合成酶	*Hebeloma cylindrosporum*	*HcGLN*1	Javelle *et al*. ,2003	ECM
谷氨酰胺合成酶	*Glomus intraradices*	*GiGS*1	Tian *et al*. ,2010 Manjula *et al*. ,2005	AM
谷氨酰胺合成酶	*Glomus intraradices*	*GiGS*2	Tian *et al*. ,2010	AM
谷氨酸合成酶	*Glomus intraradices*	*GiGlu*S	Tian *et al*. ,2010	AM
Carbamoyl-phosphate synthase glutamine chain	*Glomus intraradices*	*GiCPS*	Tian *et al*. ,2010	AM
精氨琥珀合成酶	*Glomus intraradices*	*GiASS*	Tian *et al*. ,2010	AM
精氨琥珀酸裂解酶	*Glomus intraradices*	*GiAL*	Tian *et al*. ,2010	AM
精氨酸酶	*Glomus intraradices*	*GICAR*1	Tian *et al*. ,2010	AM
鸟氨酸氨基转移酶	*Glomus intraradices*	*GiOAT*1	Tian *et al*. ,2010 Manjula *et al*. ,2005	AM
鸟氨酸脱羧酶	*Glomus intraradices*	*GiODC*	Tian *et al*. ,2010	AM
脲酶	*Glomus intraradices*	*GiURE*	Tian *et al*. ,2010	AM
谷氨酸合成酶	*Tuber borchii*	*TbGOGAT*	Genbank	ECM
谷氨酸脱氢酶	*Hebeloma cylindrosporum*	*HcGDH*1	Javelle,2003	ECM
谷氨酸脱氢酶	*Tuber borchii*	*TbGDH*1	Genbank	ECM

根内菌丝氮素的分解代谢。其中 NH_4^+-N 经真菌膜上的转运蛋白进入根外菌丝后,第一步反应催化酶为谷氨酰胺合成酶(GS),而 NO_3^--N 吸收后需先经硝酸还原酶(NR)以及亚硝酸还原酶(NiR)还原为 NH_4^+-N。GS 和 NR 是氮代谢途径中的关键限速酶,其活性的高低可直接影响真菌利用氮素的水平。在 AM 真菌中,精氨酸(Arg)被认为是菌根真菌吸收利用氮素重要的中间产物,根外菌丝吸收的氮经一系列酶促反应后主要生成 Arg,继而以 Arg 的形式输送至根内菌丝(Bago *et al*. ,2001),与 Arg 合成相关的酶包含谷氨酰胺合成酶(GS)、磷酸合成酶(CPS)、谷氨酸酶(Glus)、精氨琥珀酸裂解酶(AL)、精氨琥珀合成酶(ASS)等。CPS 参与 Arg 嘧啶的生物合成。ASS 和 AL 是 Arg 合成最后两步的催化酶。而与 Arg 分解相关的酶包含精氨酸酶(CAR)、鸟氨酸氨基转移酶(OAT)、鸟氨酸脱羧酶(ODC)以及脲酶(URE),脲酶最终催化尿素分解为氨和 CO_2。Tian 等(2010)分析了这些酶基因的时空表达,发现:当添加 4 mol · L^{-1} KNO_3 时,根外菌丝中与 Arg 合成相关的酶基因表达量在 4 h 时快速增加,8 h 时达到最大值,随后在 72 h 内降到起始水平。而与 Arg 分解相关的基因在根外菌丝中表达量很低,在根内菌丝中的表达量快速上升。说明外界氮诱导了与 Arg 合成及分解相关基因的表达,且该表达受时间和空间调控。其中不同的 GS 对氮素的亲和性不同,基因表达模式各异,推测不同的 GS 可能行使不同的功能。现已发现的 *GiGS*1 更有可能是编码低氮水平下铵盐同化酶的基因,而 *GiGS*2 则在高浓度氮条件下参与氮的代谢。一般认为 ODC 与鸟氨酸的分解以及多胺的合成有关,而 Tian 等(2010)发现 *GiODC* 在根内菌丝和根外菌丝中的表达都很稳定,并没有因外界氮供给而发生太大的变化,这就说明 *GiODC* 在菌根真菌中的作用主要是多胺的合成而非鸟氨酸的水解。

2.2 菌根真菌中的氮代谢及转运

植物中无机氮的同化有两条途径:一条是 NADP 依赖的谷氨酸脱氢酶途径,另一条是谷氨酰胺合成酶-谷氨酸合成酶途径(GS-GOGAT)(Manjula *et al*. ,2005)。在正常供氮情况下,植物主要利用 GS-GOGAT 途径同化无机氮,即生物体吸收的 NH_4^+ 在 GS 的作用下与谷氨酸盐的羧基相结合,合成谷氨酰胺,然后谷氨酸和谷氨酰胺作为转氨作用和酰

胺态氮转移反应中的氮供体参与反应。谷氨酸是许多转氨酶重要的氨基氮供体,而谷氨酰胺这一酰胺态氮则用于合成许多必要的代谢物,比如核酸、氨基糖、组氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和各种辅因子(Javelle *et al.*,2003)。

而菌根真菌能从土壤中吸收无机氮并转运给寄主植物,说明菌丝体内可能存在一套氮代谢系统。在外生菌根中,早已发现外生菌根真菌通过GS/GOGAT途径将吸收的氮合成氨基酸(Vezina *et al.*,1989; Chalot *et al.*,1994)。研究者早期在AM真菌孢子和菌丝体内发现了NR和GS活性(Stmdaresan *et al.*,1988; Kraldoff *et al.*,1994),由此推测AM菌丝体内存在与植物体内相同的氮代谢途径GS-GOGAT。Hodge等(2001)成功从AM真菌(*Glomus mosseae*)中分离到编码GS的cDNA全长,同时还得到了*Glomus intraradices*中该基因的cDNA片段;Manjula等(2005)通过检测AM根外菌丝中GS-GOGAT途径有关酶的mRNA水平证明了AM中GS-GOGAT途径的存在,并且是菌丝同化无机氮的重要途径(邓胤等,2009)。

菌丝体所吸收的氮素经代谢反应后运送至植物体内的研究主要是在AM中进行。早期有人推测氮素是以NO_3^--N为主的形式在菌丝内转移(Johansen *et al.*, 1993),但是缺乏必要的证据。Bago等(2001)以AM菌丝体内高浓度的Arg含量为依据推测AM菌丝内存在同动物氮代谢相同的鸟氨酸循环,精氨酸为菌丝内运输的主要形态。此后的生理实验和分子试验结果均支持上述假说(Manjula *et al.*,2005;Cristina *et al.*,2007),并指出AM真菌中鸟氨酸循环的合成和分解代谢被Arg的长距离运输所分开,与Arg合成相关的基因优先在根外菌丝中表达,而与精氨酸分解有关的基因在根内菌丝中高表达。另有证据表明,Arg通过与多聚磷酸盐结合的形式在根外菌丝中运输,而磷在真菌体内是以多聚磷酸盐的形式转运的。因此菌丝体内磷与氮的运输可能是协同运输,而非独立进行,这种运输方式可保证最大限度地降低运输过程中的碳消耗。

上述模式的提出对于人们更好地理解AM真菌促进植物氮素吸收机理有很大帮助,但是许多细节仍待进一步完善,如Arg在菌丝间的传递方式,根内菌丝中Arg的平衡离子是什么?释放的鸟氨酸的去向,此模式的调节方式和激活信号等。除此人们对于菌根真菌有机氮代谢过程中的基因了解还很少,需要进行更多的研究工作证实。

2.3 氮素在菌根真菌和植物根系细胞界面质外体的转运

虽然菌根真菌吸收氮素并将其提供给寄主植物这一观点早已得到证实,但根内菌丝直接提供给植物的氮形态至今未确定。由于先前的同位素标记试验和酶学试验显示:当施予NH_4^+-N时,谷氨酸盐和Arg分别为外生菌根真菌和AM真菌中氮的主要积累形态,所以氨基酸曾被认为是菌根真菌和植物根系细胞界面质外体氮素转运的主要形式(Chalot & Brun,1998),但现有的研究更倾向于无机氮为其转运形式。研究者从蓼蒺苜蓿(*Medicago truncatula*)和日本百脉根(*Lotus japonicus*)根系中分离得到了编码NO_3^--N转运蛋白的基因,当外界施加NO_3^--N后,该基因在菌根根系中上调表达,由此推测硝态氮有可能是氮在该界面质外体的转运形态(Hohnjec *et al.*,2005);Manjula(2005)和Jin等(2005)发现,^{13}C元素虽然是随氮素一起由根外菌丝运输至根内菌丝,但是并没有出现在寄主植物细胞中,结合核磁共振的光谱图以及基因表达分析,推测Arg分解产生的NH_4^+可能为该界面质外体氮转运的主要形式。同一时间,Selle等(2005)在外生菌根中也得到了一致的推测。Gutther等(2009)利用激光显微切割技术从菌根根系中获得含有丛枝的细胞群体,并从中分离得到一种编码高亲和性铵盐转运蛋白的基因——*LjAMT*2.2,研究发现:此基因在菌根中高度上调表达,并且对酸性pH有很强的依赖性,酵母异源功能互补试验证明,该转运蛋白与NH_4^+的转运密切有关。NH_4^+占到了整个环丛枝区域全部NH_4^+/NH_3的99.998%,是*LjAMT*2.2吸收的主要形式,然而其在卵母细胞中的转运特点显示,*LjAMT*2.2转运的是NH_3,而非NH_4^+。考虑到环丛枝区域属一个酸性环境,并且细胞膜两侧的转运机制属电中性转运机制,Gutther(2009)提出,*LjAMT*2.2可能吸收NH_4^+,然后在跨膜转运前去质子,并释放无电荷的NH_3至植物根细胞质中。这种机制不仅避免了高浓度NH_4^+对植物细胞的毒害作用,去质子后的H^+留在界面质外体,保持并增强了H^+的梯度,保证了在此界面发生的依赖于H^+的转运进行。

图1展示了AM吸收利用无机氮的代谢调控模型,首先根外菌丝通过不同的转运蛋白从土壤中吸

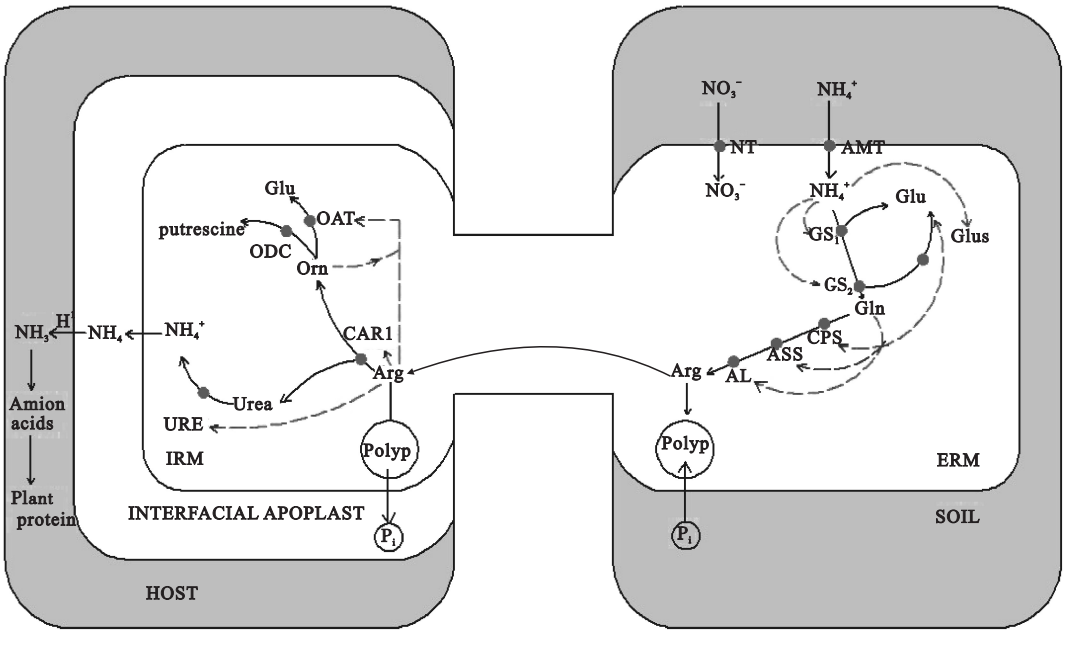


图 1 无机氮在 AM 中的转运、代谢调控途径模型

Fig. 1 Model of nitrogen transport and metabolism in the arbuscular mycorrhizal fungi

黑色箭头代表无机氮代谢反应的方向,圆点代表各个反应步骤中起作用的酶,虚线箭头代表氮代谢途径中相应基因的可能调控机制。来源于 Jin *et al.*, 2005; Guether *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2010。

收不同形式的无机氮,然后通过一系列的反应,将其合成 Arg,菌丝随后以 Arg 与多聚磷酸盐结合的形式将氮运至根内菌丝,通过鸟氨酸循环的分解代谢途径将 Arg 分解为 NH_4^+,NH_4^+在经植物细胞膜转运之前,在菌丝与植物细胞的界面质外体释放 H^+ 和 NH_3,NH_3 随后进入植物细胞质,参与植物的新陈代谢。

3 菌根真菌促进植物吸收利用氮素的生理机制

除极少数例外(Turnbull *et al.*,1996; Nasholm *et al.*,1998; Bennett *et al.*,2004),大部分植物并不具备利用氨基酸等有机氮的能力(Cappellazzo *et al.*,2008)。菌根真菌可以通过自身分泌或者间接促进寄主分泌有机质或其他物质的途径对这部分氮加以利用。研究发现,杜鹃花类菌根可以分泌胞外蛋白酶、糖酶、几丁质酶等从蛋白质以及复杂有机质中吸收 N 素(张春英和戴思兰,2008);接种 AM 真菌也可增加土壤根际蛋白酶、脲酶等酶的活性,从而加快有机氮的矿化速度(Hawkins,2000; 宋福强等,2004)。除此之外,多种类型菌根均可以分泌质子和有机酸,改变根系生长介质的 pH,从而促进难容性物质的降解。宋福强等(2004)发现:接种 AM 真菌可使植物根际 pH 降低,并且降低幅度与菌根侵染率呈正相关关系。在菌根真菌运输矿质元素动力学方面,有研究证明 NO_3^--N 吸收的驱动能力来自于细胞膜两侧与之耦合的质子电化学梯度,例如,植物可通过与两个 H^+ 同向运输的机制吸收硝态氮(徐敏等,2002)。此外,菌丝管道中原生质具有双向流动特征,周边细胞质按一个方向流动,中央细胞质按相反方向高速流动,这种高速流动是促进宿主植物高效吸收矿质元素的生理基础。

另外,菌根真菌的侵染可以直接促进寄主植物地上部和地下部 NR 和 GS 活性升高,而这两个酶是植物氮素代谢的两个关键限速酶(Marschner,2001)。Gomez 等(2009)用 AM 真菌 *Glomus intraradices* 侵染 *Medicago truncatula*,并从侵染细胞中分离到了 *Glomus intraradices* 的一个 *AUTT* 同系物,而 *AUTT* 被认为是细胞进行自我吞噬的一个标志,由此推测 AM 的丛枝有可能存在自噬现象,这就为丛枝本身是菌根氮源一部分的观点提供了分子证据(Gomez *et al.*,2009)。

4 菌根真菌促进植物利用氮素的解剖构造基础

从解剖特征上看,菌根主要是通过扩大植物的吸收面积,缩短养分运输距离的方式促进植物吸收和利用氮素的。首先,菌根拥有庞大的根外菌丝,其

数量和长度上远远超过幼根根毛,在根系周围形成庞大的网状菌丝体结构。且根外菌丝细长的结构可保证菌丝比较容易地穿插进难分解的有机质吸收一些植物根系难以吸收的复杂氮素(Benjdia *et al.*, 2006)。另外,AM真菌的菌丝体不具备隔膜,营养元素在菌丝中可以快于植物根系几倍的速度进行传递(Li *et al.*,1991)。除菌丝本身特性外,菌根真菌的侵染可有效地促进寄主植物根系的生长(王剑敏等,2011),尤其是对于没有根毛结构的杜鹃花科植物而言,该意义更为重大。

其次,植物组织水平上,菌根的丛枝、菌丝圈、菌丝节和哈氏网等结构的形成均扩大了菌丝与植物细胞的接触面积,其中AM环丛枝膜可增加皮层细胞膜面积至少10倍(Gomez *et al.*,2009)。有的外生菌根菌丝甚至可以直接侵入植物髓部形成髓部哈氏网,菌丝体吸收的养分和水分可直接输送至髓部(郑来友等,2003)。李宝珍等(2007)在研究氮饥饿水稻利用不同形态氮素的差异时发现,菌根可以降低水稻的根冠比,而根冠比的减小与养分供应的增加相关联(Alexander *et al.*,1984)。细胞外的根外菌丝还可在土壤中聚集形成菌索组织,并普遍存在菌丝融合、隔部分或全部消解等现象;在菌根共生体细胞学水平上,AM真菌的侵染可使寄主植物细胞质膜、细胞骨架成分及结构发生改变,如,膜蛋白的变化、膜上离子通道的形成等,它还可以改变细胞骨架主要成分微管、微丝的数量和长度,甚至使微管部分或完全解聚,降低细胞质的黏滞度(郑玲和吴小琴,2008)。虽然缺乏直接的证据,但是这些结构的变化在一定程度上可能与氮素利用相关。

另外,液泡作为植物和真菌细胞的储藏器和排泄器,在营养物质的分解、转运和吸收过程中,无疑起着重要作用。外生菌根真菌对氮、磷有较强的吸收和储存能力,且氮、磷主要储于液泡中(Kottke *et al.*,1998; 钱晓鸣等,2001)。Arg在AM真菌利用氮素过程中起着重要的中间介导作用,近90%的Arg都储存在菌丝体液泡中(Jin *et al.*,2005; Manjula *et al.*,2005)。而丝状真菌的液泡也不只是简单的球形结构,有时会形成复杂的管状系统,推测这可能在养分的长距离运输中发挥重要作用(Cole *et al.*,1998; Uetake *et al.*,2002)。

5 存在问题

尽管关于菌根真菌促进植物吸收和利用氮素的研究取得了上述进展,但是不论是解剖、生理还是分子方面,都是一些不完整的信息,菌根真菌吸收氮素的信号传导途径还不清楚,菌根真菌侵染引起的相关的菌根根系解剖结构变化、生理现象等还很难准确解释。加之现今的研究多是从外生菌根和AM入手,其他菌根类型的研究基本处于空白。菌根真菌促进植物吸收和利用氮素机制研究中的分子证据多数来源于菌根真菌,而寄主植物中与共生直接相关的氮素代谢基因很少,菌根的存在究竟是如何影响寄主植物,植物又启动了一套怎样的与非菌根植物不同的机制目前还不清楚,另外,有机氮作为植物生长的一个重要的、具有高开发潜力的氮素供应源已经开始受到人们的重视,但关于菌根化植物利用有机氮的研究还不够深入。随着RNA干扰和TILLING(定向诱导基因组局部突变)等反向遗传学技术的成熟,各种模式植物基因组测序工作的展开,以及激光显微切割技术在菌根研究上的应用,菌根真菌促进植物利用氮素的机制将不断被揭示,实现菌根真菌在人为控制下有目的地促进农业、林业以及花卉等产业的发展。

参考文献

邓 胤, 中 鸿, 郭 涛. 2009. 丛枝菌根利用氮素研究进展. 生态学报, **29**(10): 5627-5635.

李宝珍, 辛伟杰, 徐国华. 2007. 氮饥饿水稻利用不同形态氮素的差异及其生理机制. 土壤学报, **44**(2): 274-279.

刘文科. 2003. 菌根. 植物杂志, (4): 36-37.

陆景陵. 2003. 植物营养学. 北京: 中国农业大学出版社.

钱晓鸣, 黄耀坚, Kottke I. 2001. 用电子能量消失谱法研究*P. tinctorius*-*P. massoniana*菌根. 厦门大学学报(自然科学版), **40**(5): 1156-1162.

宋福强, 杨国亭, 孟繁荣, 等. 2004. 丛枝菌根化大青杨苗木根际微域环境的研究. 生态环境, **13**(2): 211-216.

王剑敏, 尹丽娟, 张春英. 2011. 云锦杜鹃根系内生真菌PH和氮源适应性研究. 上海农业学报, **27**(1): 77-79.

徐 敏, 史庆华, 李 敏. 2002. AM真菌对姜生长和产量的影响. 山东农业科学, (4): 22-23.

尹丽娟, 张春英, 杨 兵. 2010. 云锦杜鹃菌根真菌吸收氮源特性及其接种效应. 中国农业科学, **43**(4): 868-872.

张春英, 戴思兰. 2008. 云锦杜鹃菌根及其菌根真菌多样性研究(博士学位论文). 北京: 北京林业大学.

郑来友, 李文细, 成小飞, 等. 2003. 彩色豆马勃与松树形成内外生菌根的研究. 林业科学研究, **116**: 262-268.

郑 玲, 吴小芹. 2008. 植物菌根共生体结构的研究进展. 南京林业大学学报(自然科学版), **32**(5): 135-139.

Marschner H(李春俭译). 2001. 高等植物的矿质营养. 北京: 中国农业大学出版社.

Abuzinadah, RA, Read DJ. 1986. The role of proteins in the ni-

trogen nutrition of ectomycorrhizal plants. Ⅰ. Utilization of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*, **103**: 481–493.

Alexander C, Alexander IJ, Hadley G. 1984. Phosphate uptake by *Doodyera repens* in relation to mycorrhizal infection. *New Phytologist*, **97**: 401–411.

Atul-Nayyar A, Hamel C, Hanson K, *et al*. 2009. The arbuscular mycorrhizal symbiosis links N mineralization to plant demand. *Mycorrhiza*, **19**: 239–246.

Bago B, Shachar-Hill Y, Pfeffer PE. 2001. Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *New Phytologist*, **149**: 4–8.

Benjdia M, Rikirsch E, Müller T, *et al*. 2006. Peptide uptake in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*: Characterization of two di- and tripeptide transporters (*HcPTR*2A and B). *New Phytologist*, **170**: 401–410.

Bennett JN, Prescott CE. 2004. Organic and inorganic nitrogen nutrition of western red cedar, western hemlock and salal in mineral N-limited cedar-hemlock forests. *Oecologia*, **141**: 468–476.

Cappellazzo G, Lanfranco L, Fitz M, *et al*. 2008. Characterization of an amino acid permease from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology*, **147**: 429–437.

Chalot M, Brun A, Finlay RD, *et al*. 1994. Metabolism of [^{14}C] glutamine by ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology*, **140**: 1641–1649.

Chalot M, Brun A. 1998. Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiology Reviews*, **22**: 21–44.

Clark RB, Zeto SK. 2000. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Plant Nutrition*, **23**: 867–902.

Cole L, Orlovich DA, Ashford AE. 1998. Structure, function and motility of vacuoles in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, **24**: 86–100.

Cristina C, Helge E, Carmen T, *et al*. 2007. Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology*, **144**: 782–792.

Gobert A, Plassard C. 2008. The beneficial effect of mycorrhizae on N utilization by the host-plant: Myth or reality? // Varma A, ed. Mycorrhiza. Berlin: Springer-Verlag: 209–240.

Gomez SK, Javot H, Deewatthanawong P, *et al*. 2009. *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biology*, **9**: 10 doi: 10.1186/1471-2229-9-10.

Grelet GA, Meharg AA, Alexander IJ. 2005. Carbon availability affects nitrogen source utilisation by *Hymenoscyphus ericae*. *Mycological Research*, **109**: 469–477.

Guether M, Neuha B, Balestrini R, *et al*. 2009. A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology*, **150**: 73–83.

Harley JL. 1989. The significance of mycorrhiza. *Mycological Research*, **92**: 129–139.

Hawkins HJ, Johansen A, George E. 2000. Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, **226**: 275–285.

Hodge A, Campbell CD, Fitter AH. 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature*, **413**: 297–299.

Hohnjec N, Vieweg ME, Puhler A, *et al*. 2005. Overlaps in the transcriptional profies of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different Glomus fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology*, **137**: 1283–1301.

Jargeat P, Rekangalt D, Verner MC, *et al*. 2003. Characterisation and expression analysis of a nitrate transporter and nitrite reductase genes, two members of a gene cluster for nitrate assimilation from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum*. *Current Genetics*, **43**: 199–205.

Javelle A, Morel M, Rodríguez-Pastrana BR, *et al*. 2003. Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (*Amt*) and ammonium-metabolizing enzymes (GS, NADP-GDH) in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Molecular Microbiology*, **47**: 411–430.

Javelle A, Rodríguez-Pastrana BR, Jacob C, *et al*. 2001. Molecular characterization of two ammonium transporters from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEBS Letters*, **505**: 393–398.

Jin H, Pfeffer PE, Douds DD, *et al*. 2005. The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, **168**: 687–696.

Johansen A, Jensen ES. 1996. Transfer of N and P from intact or decomposing roots of pea to barley interconnected by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Soil Biology and Biochemistry*, **28**: 73–81.

Kottke I, Qian XM, Pritsch K, *et al*. 1998. *Xerocomus badius-Picea abies*, an ectomycorrhiza of high activity and element storage capacity in acidic soil. *Mycorrhiza*, **7**: 267–275.

Kraldoff M, Zimmer W, Botlle H. 1994. Genetic evidence for the occurrence of assimilatory nitrate reductase. *Mycorrhiza*, **5**: 23–28.

Li XL, George E, Marschner H. 1991. Extension of the phosphorus depletion zone in VA-mycorrhizal white clover in a calcareous soil. *Plant and Soil*, **136**: 41–48.

López-Pedrosa A, González-Guerrero M, Valderas A, *et al*. 2006. GintAMT1 encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology*, **43**: 102–110.

Mader P, Vierheilig H, Streitwolf-Engel R, *et al*. 2000. Transport of ^{15}N from a soil compartment separated by a polytetrafluoroethylene membrane to plant roots via the hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, **146**: 155–161.

Manjula G, Philip EP, Haim J, *et al*. 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular symbiosis. *Nature*, **435**: 819–823.

Montanini B, Moretto N, Soragni E, *et al*. 2002. A high-affinity ammonium transporter from the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*. *Fungal Genetics and Biology*, **36**: 22–34.

Montanini B, Viscomi A, Bolchi A, *et al*. 2006. Functional

properties and differential mode of regulation of the nitrate transporter from a plant symbiotic ascomycete. *Biochemical Journal*, **394**: 125-134.

Morel M, Jacob C, Fitz M, *et al*. 2008. Characterization and regulation of *PiDur*3, a permease involved in the acquisition of urea by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Fungal Genetics and Biology*, **45**: 912-921.

Müller T, Avolio M, Olivi M, *et al*. 2007. Nitrogen transport in the ectomycorrhiza association: The *Hebeloma cylindrosporum-Pinus pinaster* model. *Phytochemistry*, **68**: 41-51.

Nasholm T, Ekblad A, Nordin A, *et al*. 1998. Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature*, **392**: 914-916.

Nehls U, Kleber R, Wiese J, *et al*. 1999. Isolation and characterization of a general amino acid permease from the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. *New Phytologist*, **144**: 343-349.

Okumoto S, Schmidt R, Tegeder M, *et al*. 2002. High affiity amino acid transporters specifically expressed in *xylem parenchyma* and developing seeds of *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, **277**: 45338-45346.

Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, **6**: 763-775.

Paungfoo-Lonhienne C, Lonhienne T, Rentsch D, *et al*. 2008. Plants can use protein as nitrogen source without assistance from other organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the Unite States of America*, **105**: 4524-4529.

Regenbrg B, During-Olsen L, Kielland-Brandt MC, *et al*. 1999. Substrate specifiity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, **36**: 317-328.

Selle A, Willmann M, Grunze N, *et al*. 2005. The high-affiity poplar ammonium importer *PttAMT*1.2 and its role in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, **168**: 697-706.

Smith SE. 1980. Mycorrhizas of autotrophic higher plants. *Biological Review*, **55**: 475-510.

Stmdaresan P, Rata NV, Gunasem P, *et al*. 1988. Studies on nitrate reduction by VAM fungal spores. *Current Science*, **57**: 84-85.

Struck C, Ernst M, Hahn M. 2002. Characterization of a developmentally regulated amino acid transporter (*AAT*1*p*) of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Molecular Plant Pathology*, **3**: 23-30.

Talbot JM, Treseder KK. 2010. Controls over mycorrhizal uptake of organic nitrogen. *Pedobiologia*, **53**: 169-179.

Tian C, Kasiborski B, Koul R, *et al*. 2010. Regulation of the nitrogen transfer pathway in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Gene characterization and the coordination of expression with nitrogen. *Plant Physiology*, **153**: 1175-1187.

Tibbett M, Sanders FE. 2002. Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. *Annals of Botany*, **89**: 783-789.

Tinker PB, Nye PH. 2000. Solute transport in the rhizosphere. Oxford: Oxford University Press.

Toussaint JP, St-Arnaud M, Charest C. 2004. 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*, **50**: 251-260.

Trip H, Evers ME, Konings WN, *et al*. 2002. Cloning and characterization of an aromatic amino acid and leucine permease of *Penicillium chrysogenum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1565**: 73-80.

Turnbull MH, Schmidt S, Erskine PD, *et al*. 1996. Root adaptation and nitrogen source acquisition in natural ecosystems. *Tree Physiology*, **16**: 941-948.

Uetake YK, Kojima T, Ezawa T. 2002. Extensive tubular vacuole system in an arbuscular myeorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *New Phytologist*, **154**: 761-768.

Vezina LP, Margolis HA, McAfee BJ, *et al*. 1989. Changes in the activity of enzymes involved with primary nitrogen metabolism due to ectomycorrhizal symbiosis in jack pine. *Physiologia Plantarum*, **75**: 55-62.

Wallander H. 2002. Utilization of organic nitrogen at two different substrate pH by different ectomycorrhizal fungi growing in symbiosis with *Pinus sylvestris* seedlings. *Plant and Soil*, **243**: 23-30.

Whittaker SP, Cairney JWG. 2001. Influence of amino acids on biomass production by ericoid mycorrhizal endophytes from *Woollsia pungens* (Epacridaceae). *Mycological Research*, **105**: 105-111.

Willmann A, Weifl M, Nehls U. 2007. Ectomycorrhiza-mediated repression of the high-affinity ammonium importer gene *AmAMT*2 in *Amanita muscaria*. *Current Genetics*, **51**: 71-78.

Wipf D, Benjdia M, Tegeder M, *et al*. 2002. Characterization of a general amino acid permease from *Hebeloma cylindrosporum*. *FEBS Letters*, **528**: 119-124.

作者简介 孙秋玲,女,1985年生,硕士研究生,主要从事杜鹃花类菌根氮素吸收的相关研究。E-mail: sql2yyshf@163.com

责任编辑 魏中青