

多环芳烃污染对丛枝菌根真菌生物学性状的影响

宗 炯, 朱雪竹, 凌婉婷*, 阙 弘

(南京农业大学土壤有机污染控制与修复研究所, 南京 210095)

摘要:通过温室盆栽试验,以侵染率、丛枝率、菌根长度、菌丝密度、泡囊数、孢子数等为指标,系统地研究了多环芳烃(PAHs)污染对丛枝菌根真菌(AMF)生物学性状的影响。供试 AMF 为幼套球囊霉 *Glomus etunicatum*(Ge)、摩西球囊霉 *Glomus mosseae*(Gm)和层状球囊霉 *Glomus lamellosum*(Gla),供试 PAHs 为菲和芘。土壤中菲和芘含量分别为 41.87、42.80 mg·kg⁻¹ 时,接种 AMF 后 35~65 d, AMF 各项生物学指标随培养时间延长均呈增大的趋势;65~75 d,由于部分丛枝衰老和消解导致 AMF 侵染率、丛枝率和菌根长度下降。接种 AMF 后 65 d,与无污染对照相比,供试 PAHs 污染胁迫下 AMF 侵染率、丛枝率、菌根长度变小,且随 PAHs 污染强度增大这 3 项 AMF 指标趋小;AMF 菌丝密度和孢子数变化与 PAHs 污染强度密切相关,供试高浓度 PAHs 污染下 AMF 菌丝延伸和孢子形成受到抑制,导致菌丝密度和孢子数减小,低浓度 PAHs 污染下该 2 项指标增大;供试 PAHs 污染胁迫下 AMF 泡囊数未发生显著变化。

关键词:多环芳烃;丛枝菌根真菌;菌丝;土壤

中图分类号:X171.5 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2014)02-0305-08 doi:10.11654/jaes.2014.02.015

Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Biological Characteristics of Arbuscular Mycorrhizal Fungi

ZONG Jiong, ZHU Xue-zhu, LING Wan-ting*, QUE Hong

(Institute of Organic Contaminant Control and Soil Remediation, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on mycorrhizal colonization rate, arbuscule rate, mycorrhizal root length, hyphal density, vesicle and spore numbers of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), were investigated in a pot experiment. Phenanthrene and pyrene were selected to represent PAHs. AMF were *Glomus etunicatum* (Ge), *Glomus mosseae* (Gm), and *Glomus lamellosum* (Gla). At 41.87 and 42.80 mg·kg⁻¹ of phenanthrene and pyrene concentrations in soil, respectively, all examined parameters of AMF increased with incubation time during 35~65 d after inoculation. However, the mycorrhizal colonization rate, arbuscule rate, and mycorrhizal root length of AMF decreased 65~75 d after inoculation, due to death and degradation of arbuscules. The mycorrhizal colonization rate, arbuscule rate, and mycorrhizal root length of AMF decreased with increasing PAHs concentrations in soils. The hyphal density and spore production of AMF reduced at high PAHs concentrations, whereas promoted at low concentrations. The vesicle number of AMF changed little under the stress of PAHs at the tested concentrations.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); arbuscular mycorrhizal fungi (AMF); hyphae; soil

多环芳烃(PAHs)是环境中广泛存在的一类持久性有机污染物(POPs),难降解,具有致癌、致畸和致突变作用。PAHs 水溶性差,易被土壤吸附、并分配于土壤有机质中,据报道,地球上超过 90%的 PAHs 存在于土壤中^[1-2]。进入土壤后 PAHs 可通过食物链传递

并被生物富集,严重威胁着生态安全和人群健康。目前已发现的 PAHs 及其衍生物有 400 余种,美国环保局(EPA)将其中 16 种列为优先控制污染物,我国也将 7 种 PAHs 列入优先控制污染物的黑名单。据报道,我国河北省大清河流域部分农田土壤中 PAHs 含量高达 3 231.6 ng·g⁻¹,如何防治土壤 PAHs 污染以保障农产品安全备受关关注^[3-4]。

丛枝菌根真菌(AMF)是一类常见的植物促生菌,能与地球上 90%以上的维管束植物形成互利共生体。多数研究已证实,AMF 能提高植物对养分(如 P、N)的吸收、促进植物生长、增强植物抗逆能力,另外

收稿日期:2013-07-21

基金项目:国家自然科学基金(21077056, 41171193, 41171380, 51278252);江苏省科技支撑计划(BE2011780)

作者简介:宗 炯(1988—),男,江苏泰州人,硕士研究生。主要从事土壤污染控制与修复方向研究。

E-mail:2011103084@njau.edu.cn

*通信作者:凌婉婷 E-mail:lingwanting@njau.edu.cn

AMF 也可改善土壤质地和结构性^[5-8]。AMF 侵染植物根系后产生大量菌丝、丛枝和泡囊,菌丝的不断生长形成庞大的根外菌丝网并产生大量孢子^[9]。大量报道表明,AMF 可显著提高植物根际修复 PAHs 污染土壤的效率并可影响植物吸收 PAHs。研究发现,与未侵染组相比,AMF 侵染率高的三叶草修复菲和芘污染土壤的效果更好,形成的丛枝菌根促进了土壤中菲和芘的降解^[10-11]。Verdin 等^[12]发现,AMF 菌丝中可检出蒽,证实了菌丝具有从土壤中吸收积累 PAHs 的能力;也有学者指出,AMF 庞大的菌丝可以吸收有机污染物并转化为其自身和宿主的养分源^[13]。Caspar 等^[14]研究发现,AMF 泡囊中酯性物质的存在有助于宿主固定和吸附有机污染物,并在收获的 AMF 孢子中直接检测到菲,表明孢子可直接从土壤中吸收菲并通过生物作用固定和积累。然而遗憾的是,与 AMF 影响根际修复和植物吸收 PAHs 的大量报道相比,有关 PAHs 污染对 AMF 侵染率、丛枝率、菌根长度、菌丝密度、泡囊数、孢子数等生物学性状系统性的影响,国内外相关资料却很少。

菲、芘是土壤环境中多见的代表性 PAHs^[10]。本文拟通过温室盆栽试验,研究土壤中菲和芘复合污染对 AMF 侵染率、丛枝率、泡囊数、菌根长度、菌丝密度和孢子数的影响,为下一步利用 AMF 调控植物根际修复效率、减低作物污染风险等提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菲和芘购自德国 Fluka 公司,纯度>98%;曲利苯蓝购自北京化学试剂公司;二氯甲烷、丙酮、正己烷、乳酸、甘油和层析用硅胶(200~300 目)均为分析纯,甲醇为色谱纯。

供试植物为紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)。供试 AMF 菌剂选用幼套球囊霉 *Glomus etunicatum* (Ge)、摩西球囊霉 *Glomus mosseae* (Gm)和层状球囊霉 *Glomus lamellosum* (Gla)。AMF 菌剂为孢子、菌丝、根段和沙土组成的混合物,由北京市农林科学院植物营养与

资源研究所丛枝菌根真菌种质资源库(BGC)提供。

供试土样采自南京市江宁区旱作水稻土表层(0~20 cm),土壤类型为黄棕壤,其 pH6.02,有机质含量 24.1 g·kg⁻¹,砂粒、粉粒和粘粒含量分别为13.4%、61.9%和 24.7%,土样为无污染土壤(总 PAHs<0.2 mg·kg⁻¹)。土样采集后风干、过 2 mm 筛备用。试验用沙为河沙,水洗后晾干过 2 mm 筛。将土壤与河沙按 3:1 的质量比进行混合,多次过 2 mm 筛后备用。

污染土样制备^[15]:配制含不同浓度菲和芘的丙酮溶液,加入上述土壤中,待丙酮挥发后,充分搅拌均匀、过 2 mm 筛 15 次,制得一系列菲和芘含量不同的污染土样,置于储藏架上静置 10 d 后备用;测得各土样(标号为 S0、S1、S2、S3、S4 和 S5)中的菲和芘含量如表 1 所示,其中 S0 为无 PAHs 污染对照土样。

1.2 试验方法

称取 350 g 土样于盆钵中,均匀加入 20 g AMF 菌剂覆盖其上,再覆盖相应的 100 g 土样,加入 80 mL 水至 50%田间持水量。紫花苜蓿种子用 10%的双氧水消毒后,置于培养箱催芽,待 5 d 出苗后移栽到各盆钵中,1 周后间苗,每盆留苗 7 株。试验设 S0、S1、S2、S3、S4、S5 共 6 个菲和芘污染强度处理组,生长 65 d 后收获、采样。S2 处理组(污染强度高于 S2 时植物生长受到影响)另外设置 35 d、45 d、55 d、65 d、75 d 等 5 个采样时间。各处理组分别接种 Ge、Gm 和 Gla,每个处理设置 3 个重复。植物在南京农业大学智能温室中进行培养,试验期间温度控制为白天 30 ℃,夜晚 25 ℃。植物生长过程中定期浇水,每周施加一次 15 mL 标准 Hoagland 营养液,每 5 d 随机交换盆钵位置。采样时采集植物地下部,用去离子水洗净,用滤纸蘸干后立即测定侵染率等指标,同时采集少量土样,混匀并经常温干燥后待测。

1.3 分析方法

侵染率测定:采用改良的 Phillips 等^[16]的方法,剪取 1 cm 左右的根段于 Eppendorf 管中,加入 10%的 KOH 浸泡,90 ℃下水浴 1 h,接着用 2%的 HCl 酸化 5 min,然后用 0.05% Tryan Blue 染色过夜,经乳酸甘油

表 1 污染土样中菲和芘的初始含量

Table 1 Initial concentrations of phenanthrene and pyrene in contaminated soils

多环芳烃(PAHs)	初始含量 Concentrations of PAHs in soils/mg·kg ⁻¹					
	S0	S1	S2	S3	S4	S5
菲(Phenanthrene)	NC	19.04(0.86)	41.87(4.51)	59.80(1.24)	79.20(3.17)	106.72(3.61)
芘(Pyrene)	NC	20.64(0.15)	42.80(5.20)	63.20(0.90)	79.01(6.13)	96.60(2.23)

注:S0 为无污染土壤(总 PAHs<0.2 mg·kg⁻¹,菲、芘<0.01 mg·kg⁻¹);NC 表示 Not Contaminated;括号内数字为标准差。

溶液脱色后,置于显微镜下利用感染比例法计算。

丛枝率测定:采用 Trouvelot 等^[17]的方法,即根段按照侵染程度(0%、<1%、<10%、<50%、>50%和>90%)分为5个级段,每个级段按照含有丛枝的程度(无、少量、正常和大量)分为4个数量级,剪取30根1 cm长的侵染根段,将每根根段填入侵染级段下面的数量级栏,用于统计数据计算。

菌根长度测定:采用 Giovannetti 等^[18]的方法,利用上述测定侵染率的染色方法,同时测定植物总根长,利用网格交叉法,分别计算根段的交叉点数和被侵染根段的交叉点数,获得菌根长度。

菌丝密度测定:采用 Jakobsen 等^[19]的真空泵微孔滤膜抽滤法,称取待测土样置于烧杯中,加入250 mL水和少量土壤分散剂,静置5 min后充分搅拌,将悬浊液过不同孔径的筛子,经过蒸馏水洗涤后将下筛物质冲入搅拌机并搅拌30 s,将悬浊液转移至三角瓶中,使用移液枪分两次吸取10 mL(每次5 mL)至微孔滤膜(0.45 μm)上进行抽滤,滴加曲利苯蓝染色后置于显微镜下观察25个视野,利用网格交叉法计算。

孢囊率测定:采用挑取根段高倍显微镜观察数目的方法,以“孢囊数 $\cdot\text{cm}^{-1}$ 根”为计数单位^[20]。

孢子数测定:采用毕银丽等^[21]报道的曲利苯蓝染色-湿筛法测定,取土壤样品于烧杯中浸泡30 min,搅拌后通过不同孔径的上中下三层筛,清水冲洗筛出物到清洁试管后滴加曲利苯蓝染色,经90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min后,将筛出物过筛清洗、置于体视显微镜下观察,以“孢子数(个 $\cdot\text{g}^{-1}$ 干土)”为计量单位。

1.4 统计方法

采用 Excel 2003 及 SPSS 18.0 统计软件进行试验结果的数据整理,采用 Duncan's 新复极差测验法进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 AMF 侵染率

菌根侵染率不仅反映出植物受 AMF 感染的程度,也反映了 AMF 对植物的亲合能力及其与植物互利共生的程度。已有研究表明,高浓度 PAHs 污染可以破坏丛枝菌根的结构和功能,侵染率变化就是其主要表现之一^[22]。

不同采样时间(35~75 d)下 AMF 侵染率差异明显($P<0.05$)。如图1所示,在 S2 污染强度下,随着培养时间延长,3种 AMF 对紫花苜蓿的侵染率均表现为先增大后减小的趋势。35 d 时 Ge、Gm 和 Gla 与宿主

植物的侵染率分别为 14.67%、19.33%和 13.67%;65 d 时 3 种 AMF 侵染率则达最大值,分别为 59.33%、64.67%、55.33%;75 d 时 3 种 AMF 侵染率则下降,例如,相比 65 d 时 Ge 侵染率下降 21.91%。供试 Ge、Gm 和 Gla 同属 *Gigaspora* 属,同一收获时间下,Ge、Gm 和 Gla 的侵染率差异不显著,表明同一属 AMF 对宿主的依赖性和菌根效应相似。

PAHs 污染对 AMF 侵染率有抑制作用。如图2所示,接种 AMF 后 65 d,与无污染对照(S0)相比,不同污染强度(S1至S5)下 Ge、Gm 和 Gla 的侵染率下降幅度分别为 12.91%~35.40%、4.95%~35.40%和 13.29%~35.14%。高浓度 PAHs 污染对 AMF 的毒害作用更显著,S4 和 S5 处理下 AMF 侵染率显著小于 S1 和 S2 处理($P<0.05$)。此外,所有处理的 Ge、Gm 和 Gla 侵染率均超过了 38%,说明供试条件下 3 种 AMF 与紫花苜蓿均可建立一定的共生关系。

2.2 AMF 丛枝率

丛枝是 AMF 菌丝在受侵染植物的根部皮层经连续二分叉生长所形成的结构,是 AMF 与植物进行物质交换的器官,即植物供给真菌糖类等物质以及真菌输送给植物磷酸盐、铵盐等^[23]。丛枝的多少是计算侵染率

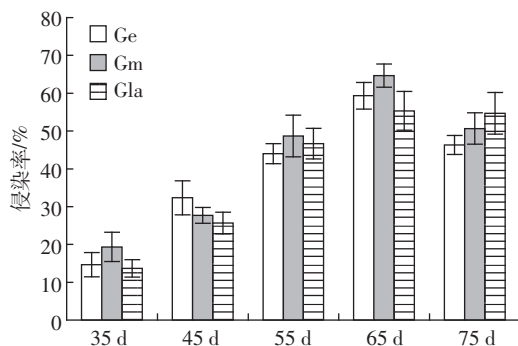


图1 不同时间 AMF 侵染率的变化

Figure 1 Changes of colonization rate of AMF over time

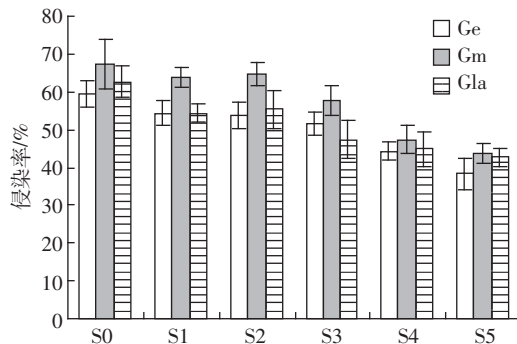


图2 不同 PAHs 污染强度对 AMF 侵染率的影响

Figure 2 Effects of PAHs on colonization rate of AMF

的影响因素之一,所以丛枝率与侵染率具有关联性^[17]。

如图3所示,在S2污染强度下,接种AMF后35~75 d,AMF丛枝率表现为先增加后降低的趋势。随着培养时间延长,Ge、Gm和Gla的丛枝率分别从35 d时的7.08%、6.05%和6.77%增长到65 d时的18.00%、18.27%和15.04%,后期75 d时丛枝率有所下降,与不同时间下AMF侵染率的变化规律一致。同一收获时间下不同AMF的丛枝率有所差异,Ge、Gm和Gla间丛枝率相差15.70%~27.70%。

污染土壤中PAHs的存在抑制了AMF丛枝的形成。如图4所示,接种AMF后65 d,相比无污染对照处理S0、S1至S5污染处理中Ge、Gm和Gla的丛枝率分别下降10.11%~67.11%、5.57%~71.82%和10.05%~57.03%。随着PAHs污染强度增大,AMF丛枝率有下降趋势,且污染强度越高,AMF丛枝结构受破坏程度越强。例如,S1和S2处理下,AMF丛枝率与对照相比差异很小,但S4和S5处理下,AMF丛枝的形成受到显著抑制($P<0.01$),S5处理下,Ge、Gm和Gla的丛枝率比S1时分别下降63.41%、70.16%和51.62%。

2.3 AMF菌根长度

菌根是植物根系与菌根真菌形成的一种共生体。

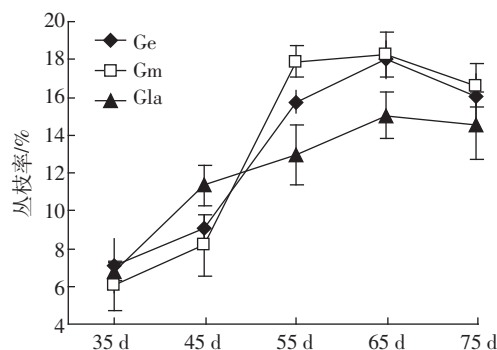


图3 不同时间AMF丛枝率的变化

Figure 3 Change of arbuscule rate of AMF over time

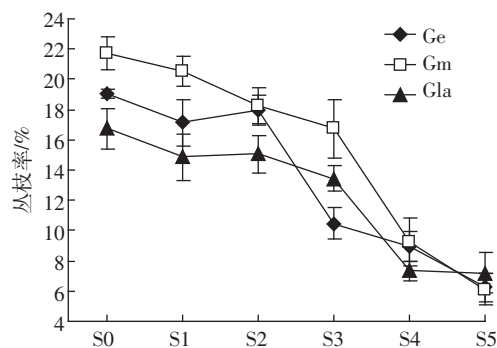


图4 不同PAHs污染强度对AMF丛枝率的影响

Figure 4 Effect of PAHs on arbuscule rate of AMF

菌根长度是指被真菌侵染部分的根长,也是反映菌根侵染情况的指标。菌根可增大宿主植物的吸收范围、提高其亲合力^[6],与AMF提高植物根际修复PAHs污染土壤的能力密切相关。菌根长度是以侵染率和宿主根系长度为基础计算而来,因此菌根长度与侵染率的高低及宿主根系数量正相关。

在35~75 d内,接种Ge、Gm和Gla处理的AMF菌根长度见图5。在S2污染强度下,随着培养时间延长,菌根长度总体表现为先增加后略有降低的趋势,与不同时间下AMF侵染率和丛枝率的变化规律较为相似。接种Ge、Gm和Gla所形成的菌根长度在35 d时最小,分别为1.41、1.62、1.40 $\text{dm} \cdot \text{根}^{-1}$,65 d时三者的菌根长度相比35 d时分别增加711.05%、683.61%和690.58%,75 d时Ge和Gm形成的菌根长度相比65 d时分别下降10.74%和6.06%,但Gla的菌根长度则增加25.16%,这可能与Gla侵染的宿主植物根系在65~75 d内仍大幅度增长有关。

菲和芘污染影响AMF菌根形成。如图6所示,接种AMF后65 d,与无污染对照处理S0相比,低污染强度下S1和S2处理的菌根长度有所提高,例如S1

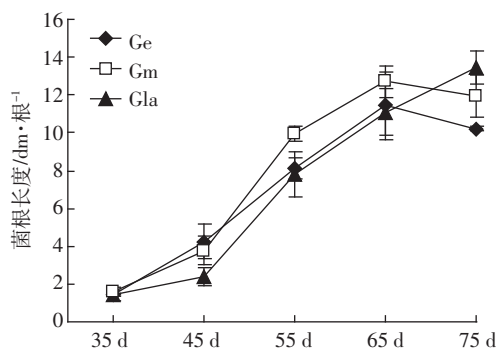


图5 不同时间AMF菌根长度的变化

Figure 5 Change of mycorrhizal root length of AMF over time

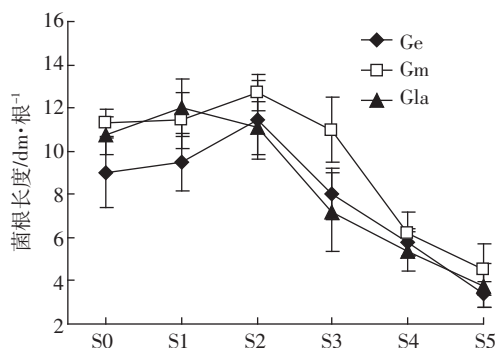


图6 不同PAHs污染强度对AMF菌根长度的影响

Figure 6 Effect of PAHs on mycorrhizal root length of AMF

处理下接种 Gla 所形成的菌根长度增加了 12.05%, S2 处理下接种 Ge 和 Gm 所形成的菌根长度分别增加 27.36% 和 12.57%, 这表明低浓度 PAHs 污染可促进植物根系发育。但 S4、S5 高污染强度处理下接种 AMF 形成的菌根相比 S0 下降明显 ($P < 0.05$), Ge、Gm 和 Gla 的菌根长度降幅分别达 62.51%、60.00% 和 67.50%, 这可能与高浓度 PAHs 污染导致 AMF 侵染率下降有关。

2.4 AMF 菌丝密度

AMF 产生足够菌丝是拥有较高侵染率与较长侵染根段的前提, 孢子萌发侵染植物后形成大量菌丝, 菌丝在植物体内产生根内菌丝, 延伸到土壤中形成根外菌丝。大量延伸的根外菌丝可以帮助宿主植物吸收根系本身在空间位置上吸收不到的养分^[9], 使得植物根系更发达, 间接影响植物对 PAHs 的吸收量。

在 35~75 d 内, AMF 菌丝密度显著增大 ($P < 0.05$)。如图 7 所示, 在 S2 污染强度下, 随着培养时间延长, 三种 AMF 的菌丝密度不断增大。35 d 时 Ge、Gm 和 Gla 的菌丝密度最小, 分别为 140.39、161.47、146.56 $\text{cm} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土, 75 d 时 AMF 菌丝密度达到最大值, 分别比 35 d 时增大 144.31%、141.40% 和 130.52%。不同 AMF 形成的菌丝密度有所差异, 其中 Gm 具有更强的产菌丝能力, 相同时间点 Gm 的菌丝密度显著高于 Ge 与 Gla。生长后期 (65~75 d) AMF 根外菌丝仍具有很强的延伸潜力, 此时菌丝密度的增长斜率仍较大。

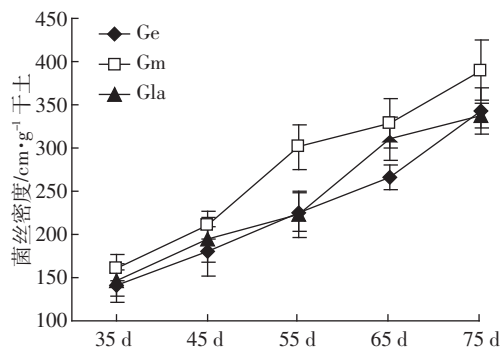


图 7 不同时间 AMF 菌丝密度的变化

Figure 7 Change of hyphal density of AMF over time

菲和芘污染影响 AMF 菌丝的形成。如图 8 所示, 接种 AMF 后 65 d, 与无污染对照 S0 相比, 低浓度 PAHs 污染处理对 AMF 菌丝的生长有一定促进作用, 例如 S1 处理下 Ge、Gm 和 Gla 的菌丝密度分别增大 15.90%、6.47% 和 22.09%; 高浓度 PAHs 污染处理则对 AMF 菌丝的生长具有抑制作用, 例如 S5 处理下

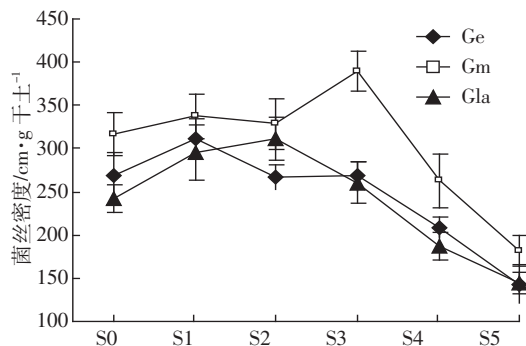


图 8 不同 PAHs 污染强度对 AMF 菌丝密度的影响

Figure 8 Effect of PAHs on hyphal density of AMF

Ge、Gm 和 Gla 的菌丝密度相比 S0 时下降 46.84%、42.70% 和 40.34%。不同 PAHs 污染浓度下 AMF 的菌丝密度呈先增大后减小的趋势, Ge、Gm 和 Gla 的菌丝密度分别在 S1、S3 和 S2 时达到最大值, 分别为 311.6、389.8、311.1 $\text{cm} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土, 其中 Gm 能够适应更高强度的 PAHs 污染 (S3), 具有更强的抗性。

2.5 AMF 泡囊数

泡囊形态为球形、椭圆形和不规则形, 它的产生晚于丛枝的形成, 具有繁殖和储藏营养的功能, 所以泡囊数目的多少一定程度上可反映共生植物的营养状况。泡囊可分为皮层细胞内的菌丝顶端膨大形成的胞内泡囊以及胞间菌丝产生隔膜而形成的胞间泡囊^[24], 泡囊数的多少与菌丝含量具有相关性。

培养时间延长有利于 AMF 泡囊的产生。菲和芘污染 (S2) 下 AMF 的泡囊数随培养时间的变化见图 9。总体来看, 在 S2 污染强度下, 随着培养时间 (35~75 d) 延长 AMF 所产生的泡囊数增加, 35 d 时三种 AMF 产生的泡囊数最低, 65 d 时 Gm 产生的泡囊数达到最大值, 较 35 d 时增加 634.69%, 75 d 时 Ge 和 Gla 产生的泡囊数达到最大值, 较 35 d 时分别增加 946.24% 和 973.45%。泡囊的大量形成发生在 AMF 收获后期,

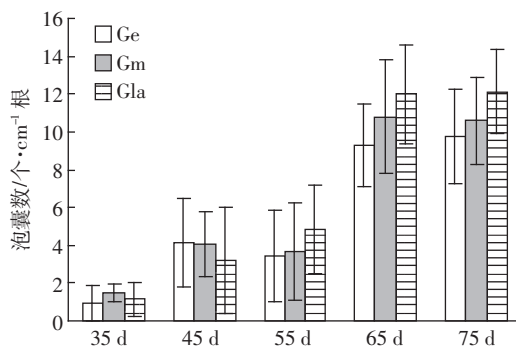


图 9 不同时间 AMF 泡囊数的变化

Figure 9 Change of vesicle number of AMF over time

65~75 d 时 AMF 泡囊数显著高于收获前期(35~55 d) ($P<0.05$)。与 55 d 时相比, Ge、Gm 和 Gla 的泡囊数在 65 d 时分别增加 167.15%、194.28%和 146.41%。

供试条件下 PAHs 污染强度的变化对 AMF 泡囊数没有显著影响。如图 10 所示, 接种 AMF 后 65 d, 与无污染对照 S0 相比, S1 至 S5 污染处理下 AMF 泡囊数没有显著差异, Ge、Gm 和 Gla 的平均泡囊数分别为 6.99、9.96、11.89 个·cm⁻¹ 根, 表明供试 PAHs 污染强度对 AMF 产泡囊能力没有显著的促进或抑制效应。不同 AMF 产泡囊能力有所差异, 例如, 相同条件下 Gla 的产泡囊能力显著高于 Ge ($P<0.05$), 前者产生的泡囊数比 Ge 高 9.55%~76.19%。

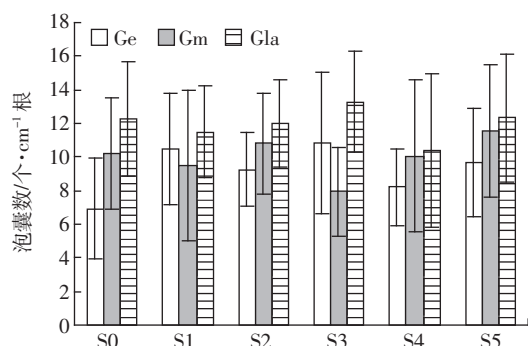


图 10 不同 PAHs 污染强度对 AMF 泡囊数的影响
Figure 10 Effect of PAHs on vesicle number of AMF

2.6 AMF 孢子数

根外孢子形态为圆形或椭圆形, 不仅是储藏营养的器官, 而且是从枝菌根真菌重要的繁殖体和幸存体^[21]。AMF 根外菌丝的顶端形成孢子, 绝大部分孢子脱落后分布于根际土壤中, 因此孢子数的多少与菌丝有相关性。

培养时间延长有利于 AMF 根外孢子的形成。如图 11 所示, 在 S2 污染强度下, 接种 AMF 后 35~75 d, AMF 所产生的孢子数持续增多, 35 d 收获时 Ge、Gm

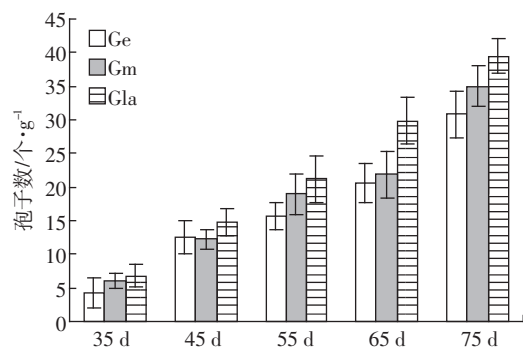


图 11 不同时间 AMF 孢子数的变化
Figure 11 Changes of spore number of AMF over time

和 Gla 的孢子数分别为 4.17、6.10、6.74 个·g⁻¹ 干土, 75 d 收获时三者的增长率分别达到 638.55%、473.69%和 485.75%, 与不同时间下 AMF 菌丝密度的变化规律一致。不同 AMF 的产孢能力差异明显, 同一收获时间下, Gla 形成的根外孢子数比 Ge 和 Gm 分别高 17.95%~61.55%和 10.52%~36.76%。

PAHs 污染强度的不同会影响 AMF 产孢子的能力。如图 12 所示, 接种 AMF 后 65 d, 由 S0 至 S5 处理的 Ge、Gm 和 Gla 的平均产孢子数分别为 16.76、18.82、22.41 个·g⁻¹ 干土。PAHs 污染强度提高 (S1 增至 S5), AMF 产生的孢子数表现为先增加后降低的趋势, S3 处理下 Ge、Gm 和 Gla 的孢子数达到最大值、分别为 21.51、28.56、38.53 个·g⁻¹ 干土。与无污染对照处理 S0 相比, 低污染强度 (S1、S2 和 S3) 下 PAHs 促进了 AMF 孢子的产生, 特别是 S3 处理时 3 种 AMF 孢子数的增加最为突出 ($P<0.05$); 而高污染强度 (S4 和 S5) 下 AMF 孢子的形成明显受到抑制。相同条件下, 不同 AMF 的产孢子能力有所差异, 其中 Gla 具有更强的产孢子能力, 相同处理下 Gla 的孢子数均高于 Ge 和 Gm 的孢子数, 这与 Gla 具有较强的产泡囊能力相一致。

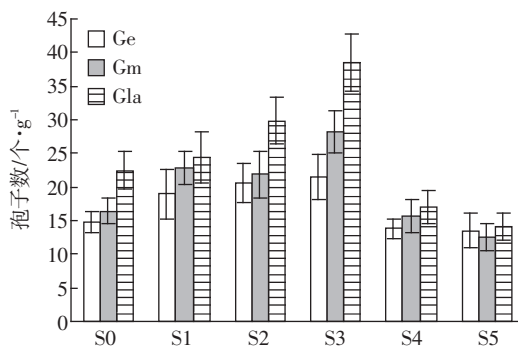


图 12 不同 PAHs 污染强度对 AMF 孢子数的影响
Figure 12 Effect of PAHs on spore number of AMF

3 讨论

AMF 不同结构的形成与其生长过程相关联。AMF 侵染植物过程中产生丛枝、菌根、根外菌丝、泡囊和孢子等结构^[6,25]。刘媿等^[24]在研究 AMF 生长和发育过程中发现, AMF 在完成其生命周期过程中, 不同结构的形成时间有所差异。AMF 孢子萌发后, 经过 3~4 周与宿主植物形成菌根, 此后菌丝开始迅速生长, 不断延伸的根内菌丝在中后期开始大量形成丛枝、泡囊等器官, 而延伸到根外的菌丝在后期则产生大量孢子^[26]。本研究结果表明, 在 S2 污染强度下, 接种 AMF

后 35~65 d, AMF 侵染率、丛枝率、菌根长度、菌丝密度、泡囊数、孢子数等生物学指标均随培养时间延长而增加;菌根和菌丝从 35 d 开始大量形成,丛枝在 45 d 后数目显著增加,孢子和泡囊在 55 d 后大量产生,末期 75 d 收获时 AMF 的泡囊数、菌丝密度和孢子数仍明显增加。显然,AMF 基本生物学性状的变化与时间关系密切。

侵染率反映了 AMF 与植物共生关系的程度^[22], AMF 不同结构大量产生是形成高侵染率的基础。本实验中,在 35~65 d 内,随时间延长 3 种 AMF 对紫花苜蓿的侵染率增大,至 75 d 时侵染率有所降低,这与 Gao 等^[27]的研究结果相似。后期 75 d 收获时 AMF 的侵染率、丛枝率与菌根长度均有所下降,这可能与部分丛枝在细胞中存活时间较短有关^[28],随着丛枝的退化、衰老和消解,引起丛枝率和侵染率下降,从而以侵染率为基础计算的菌根长度数值也随之降低。

PAHs 污染胁迫影响 AMF 的结构和活性。Wilton 等^[29]发现,AMF 是异养型微生物,污染土壤中 AMF 活性下降与宿主植物光合产物的减少有关。在 PAHs(芘)污染土壤中,植物产生更多的根系分泌物强化微生物对 PAHs 的降解,借此缓解 PAHs 对植物的胁迫^[30]。当宿主合成的光合产物部分被分配用于形成分泌物时,通过根系输送给 AMF 的食物(碳水化合物)有所减少,导致 AMF 的生长和活性受到抑制,从而影响了 AMF 结构的形成。Gabellom 等^[31]发现,有机毒物污染胁迫下植物光合作用降低,根系的 C/N 比有所下降,AMF 侵染率、丛枝率和泡囊数变小。Debiane 等^[32]研究得出,蒽污染下 AMF 菌丝量和产孢量低于无污染对照组,且高浓度污染下 AMF 的菌丝生长量和产孢子数显著低于低浓度培养下的菌丝密度和孢子数。本研究结果显示,菲和芘污染下 AMF 侵染率下降明显,单位根长的丛枝数和菌根长度随着菲和芘污染强度的增大而呈下降趋势,高强度污染(S4 和 S5)时 AMF 的菌丝密度和孢子数远低于无污染对照 S0 处理。这些结果进一步验证了有机污染物(如 PAHs)胁迫抑制 AMF 的活性和结构的形成。

低浓度 PAHs 污染下 AMF 的菌丝生成量与产孢子数未受到明显抑制,至少少量 PAHs 的存在会刺激 AMF 菌丝的延伸与孢子的形成。如图 8、图 12 所示,与无污染对照处理 S0 相比,低浓度菲和芘污染胁迫下 AMF 的菌丝密度和孢子数有所增加,这一结果与 Debiane 等^[32]报道过的低浓度蒽污染时 AMF 孢子数和菌丝密度比无污染时下降的结果并不一致,但在

O₃ 等其他污染胁迫时也出现过菌丝密度和孢子数增加的现象^[33-34]。菌丝形成量增加可能是因为 AMF 能直接利用有机污染物,将其转化为自身和宿主的养分源^[13]。低浓度 PAHs 对 AMF 及宿主植物的胁迫作用有限,AMF 形成的庞大密集菌丝网能吸收和降解部分 PAHs。孢子是 AMF 处于外界不利环境时产生的一种休眠体,一般形成于植物生长的晚期,此时 AMF 处于恶劣生存环境,低浓度菲和芘污染使 AMF 提前应对外界不利环境,促使孢子早熟,进而导致 AMF 孢子数增加。PAHs 胁迫下 AMF 的泡囊数未受到明显影响(图 10),可能是因为储藏营养的泡囊大量形成于植物养分摄入较多时^[34],本试验定期添加营养液使得各试验组养分供应充足,所以无论 PAHs 污染强度如何变化,泡囊数目没有显著性响应。

4 结论

(1)在 S2 污染强度下,接种 AMF 后 35~65 d, AMF 侵染率、丛枝率、菌根长度、菌丝密度、泡囊数、孢子数等随培养时间延长而增大;65~75 d,由于部分丛枝衰老和消解导致侵染率、丛枝率和菌根长度减小。同一时间下供试 3 种 AMF 结构的形成有所差异;Gm 具有更强的产菌丝能力,平均菌丝密度比 Ge 和 Gla 高 20.46%和 14.79%,Gla 具有更强的产孢子能力,平均孢子数比 Ge 和 Gm 分别高 33.72%和 19.11%。

(2)不同菲和芘污染强度下 AMF 生物学指标的响应存在差异。AMF 与植物侵染的程度及丛枝和菌根的形成随污染强度增大受抑制作用增强,高污染强度(S4 和 S5)同时还抑制 AMF 菌丝延伸和孢子形成。与无污染对照处理(S0)相比,低污染强度处理(S1、S2 和 S3)促进了 AMF 菌丝和孢子产生,Ge、Gm 和 Gla 的平均菌丝密度增大 4.86%、11.09%和 19.39%,平均孢子数增大 37.68%、48.36%和 38.63%。

参考文献:

- [1] Wilson S C, Jones K V. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review[J]. *Environment Pollution*, 1993, 81(3): 229-249.
- [2] Meudec A, Dussauze J, Jourdin M, et al. Gas chromatographic-mass spectrometric method for polycyclic aromatic hydrocarbon analysis in plant biota[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1108(2): 240-247.
- [3] Keith L H, Telliard W A. Priority pollutants: I-A perspective view[J]. *Environmental Science and Technology*, 1979, 13(4): 416-423.
- [4] 吕金刚, 毕春娟, 陈振楼, 等. 上海市崇明岛农田土壤中多环芳烃分布和生态风险评价[J]. *环境科学*, 2012, 33(12): 4270-4275.
- LÜ Jin-gang, BI Chun-juan, CHEN Zhen-lou, et al. Distribution and e-

- cological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soil of the Chongming Island in Shanghai[J]. *Environmental Science*, 2012, 33(12):4270–4275.
- [5] 王曙光, 林先贵, 施亚琴. 丛枝菌根与植物的抗逆性[J]. 生态学报, 2001, 20(3):27–30.
- WANG Shu-guang, LIN Xian-gui, SHI Ya-qin. Effect of arbuscular mycorrhiza on resistance of plants to environmental stress[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2001, 20(3):27–30.
- [6] 刘润进, 李晓林. 丛枝菌根及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 43.
- LIU Run-jin, LI Xiao-lin. Arbuscular mycorrhizal and application[M]. Beijing: Science Press, 2000:43.
- [7] Mosse B. Advances in the study of vesicular–arbuscular mycorrhiza[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1973, 11:171–196.
- [8] Miller R M, Jastrow J D. The role of mycorrhizal fungi in soil conservation[J]. *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*, 1992: 29–44.
- [9] 陈宁, 王幼珊, 李晓林, 等. 宿主植物栽培密度对AM真菌生长发育的影响[J]. 菌根系统, 2003, 22(1):88–94.
- CHEN Ning, WANG You-shan, LI Xiao-lin, et al. The effects of cultivated densities of host plant on the development of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *Mycosystema*, 2003, 22(1):88–94.
- [10] 程兆霞, 凌婉婷, 高彦征, 等. 丛枝菌根对砒污染土壤修复及植物吸收的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2008, 14(6):1178–1185.
- CHENG Zhao-xia, LING Wan-ting, GAO Yan-zheng, et al. Impacts of arbuscular mycorrhizal on plant uptake and phytoremediation of pyrene in soils[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2008, 14(6):1178–1185.
- [11] 陈瑞蕊, 林先贵, 尹睿, 等. 有机污染土壤中菌根的作用[J]. 生态学报, 2005, 24(2):176–180.
- CHEN Rui-rui, LIN Xian-gui, YIN Rui, et al. Effect of mycorrhizae on bioremediation of soil polluted by organic matters[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2005, 24(2):176–180.
- [12] Verdin A, Lounes H S, Fontaine J, et al. Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation[J]. *Mycorrhiza*, 2006, 16(6):397–405.
- [13] 王曙光, 林先贵. 菌根在污染土壤生物修复中的作用[J]. 农村生态环境, 2001, 17(1):56–59.
- WANG Shu-guang, LIN Xian-gui. Effect of mycorrhiza on bioremediation of polluted soil[J]. *Rural Eco-Environment*, 2001, 17(1):56–59.
- [14] Caspar M L, Cabello M N, Cazau M C, et al. Effect of phenanthrene and Rhodotorula glutinis on arbuscular mycorrhizal fungus colonization of maize roots[J]. *Mycorrhiza*, 2002, 12(2):55–59.
- [15] Gao Y Z, Ling W T. Comparison for plant uptake of phenanthrene and pyrene from soil and water[J]. *Biology and Fertility of Soil*, 2006, 42(5):387–394.
- [16] Phillips J M, Hayman D S. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection[J]. *Transactions of the British Mycological Society*, 1970, 55(1):158–161.
- [17] Trouvelot A, Kough J L, Pearson V G. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle[J]. *Mycorrhizae: Physiology and Genetics*, 1986: 217–221.
- [18] Giovannetti M, Mosse B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots[J]. *New Phytol*, 1980, 84(3):489–500.
- [19] Jakobsen I, Abbott L K, Robosen A D. External hyphae of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L.[J]. *New Phytologist*, 1992, 120(3):371–380.
- [20] Liu R J, Luo X S. A new method to quantify the inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *New Phytol*, 1994, 128(1):89–92.
- [21] 毕银丽, 吴王燕. 染色法: 一种改进的丛枝菌根孢子密度快速测定方法[J]. 能源环境保护, 2007, 21(2):9–11.
- BI Yin-li, WU Wang-yan. Dyeing method: A kind of the method for mycorrhizal spore density quick improved measurement[J]. *Energy Environment Protection*, 2007, 21(2):9–11.
- [22] Gange A C, Ayres R L. On the relation between arbuscular mycorrhizal colonization and plant 'benefit'[J]. *Oikos*, 1999, 87(3):615–621.
- [23] Fitter A H, Helgason T, Hodge A. Nutritional exchanges in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Implication for sustainable agriculture[J]. *Fungal Biology Review*, 2011, 25(1):68–72.
- [24] 刘妮, 贺学礼. 黄芪幼苗丛枝菌根形成过程研究[J]. 河北林果研究, 2008, 23(3):311–314.
- LIU Ti, HE Xue-li. Research on the formation course of arbuscular mycorrhizae from *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge seedlings[J]. *Hebei Journal of Forestry and Orchard Research*, 2008, 23(3):311–314.
- [25] Heijden M, Sanders I R. Mycorrhizal ecology[M]. New York: Springer-Verlag, 2002.
- [26] Holley J D, Peterson R L. Development of a vesicular–arbuscular mycorrhiza in bean roots[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1979, 57(19):1960–1978.
- [27] Gao Y Z, Cheng Z X, Ling W T, et al. Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae contribute to the uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by plant roots[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(18):6895–6901.
- [28] Bonfante P, Perotto S. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plant[J]. *New Phytologist*, 1995, 130(1):3–21.
- [29] Wlton B T, Hoylan A M, Perez M M, et al. Rhizosphere microbial communities as a plant defense against toxic substances in soils[J]. *Bioremediation Through Rhizosphere Technology*, 1994, 563(7):82–92.
- [30] Yoshitomi K J, Shann J R. Corn (*Zea mays* L.) root exudates and their impact on ^{14}C -pyrene mineralization[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(12–13):1769–1776.
- [31] Cabello M N. Hydrocarbon pollution: Its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF)[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 22(3):233–236.
- [32] Debiane D, Carcon G, Verdin A, et al. In vitro evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2008, 64(2):120–127.
- [33] 王曙光, 冯兆忠, 王效科, 等. 大气臭氧浓度升高对丛枝菌根(AM)及其功能的影响[J]. 环境科学, 2006, 27(9):1872–1877.
- WANG Shu-guang, FENG Zhao-zhong, WANG Xiao-ke, et al. Effect of elevated atmospheric O_3 on arbuscular mycorrhizal (AM) and its function[J]. *Environmental Science*, 2006, 27(9):1872–1877.
- [34] 王鹏腾, 刁晓君, 王曙光. 大气 O_3 浓度升高对2种基因型矮菜豆丛枝菌根(AM)结构及球囊霉素蛋白产生的影响[J]. 环境科学, 2012, 33(10):3667–3675.
- WANG Peng-teng, DIAO Xiao-jun, WANG Shu-guang. Effect of elevated O_3 on the arbuscular mycorrhizal (AM) structure and glomalin production in two genotypes of snap bean[J]. *Environmental Science*, 2012, 33(10):3667–3675.