

DOI: 10.11766/trxb201909090476

李梦瑶, 蒋湘艳, 金海如. AM 真菌共生系统中硝态氮吸收转运途径及对寄主生长的作用[J]. 土壤学报, 2020, 57 (6): 1483–1491.

LI Mengyao, JIANG Xiangyan, JIN Hairu. Modes of uptake and translocation of  $\text{NO}_3^-$  affecting growth of host plants in arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. Acta Pedologica Sinica, 2020, 57 (6): 1483–1491.

# AM 真菌共生系统中硝态氮吸收转运途径及对寄主生长的作用\*

李梦瑶, 蒋湘艳, 金海如<sup>†</sup>

(浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江金华 321004)

**摘要:** 利用 AM 真菌 (*Glomus intraradices*) 与毛根农杆菌质粒 DNA 转化的胡萝卜根 (Ri T-DNA transformed carrot roots) 建立的双重培养系统, 以及同位素示踪技术探究 AM 真菌共生系统中硝态氮  $\text{NO}_3^-$  转运吸收途径, 对铵态氮和硝态氮吸收合成精氨酸进行研究; 并开展农田试验研究铵态氮和硝态氮吸收转运对寄主生长的影响。研究发现 AM 真菌菌丝在  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_3^-$  共存时, 优先吸收  $\text{NH}_4^+$ 。当 AM 真菌的根外菌丝用  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  处理 1 周时, 虽然根外菌丝的自由氨基酸未被  $^{15}\text{N}$  标记, 包括精氨酸, 但是菌根组织中的自由氨基酸被  $^{15}\text{N}$  标记, 揭示了  $^{15}\text{NO}_3^-$  沿着菌丝直接转运至菌根组织而不是来自于精氨酸转运的新模式; 而根外菌丝用  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  处理时菌根组织中只有精氨酸被  $^{15}\text{N}$  标记, 而其他氨基酸合成的氮素主要来自菌丝室运转来的  $^{14}\text{NO}_3^-$ , 所以未被标记。AM 真菌根外菌丝加  $^{13}\text{C}_6$ -葡萄糖, 培养 6 周后, 发现菌根组织的精氨酸和蛋白质均未发现  $^{13}\text{C}$ , 说明其根外菌丝不能利用葡萄糖。菌丝室加  $^{13}\text{C}_{1,2}$ -乙酸钠后, 菌根组织的精氨酸和蛋白质均发现  $^{13}\text{C}$ , 分别为  $8.5\% \pm 2.3\%$  和  $7.6\% \pm 0.7\%$ , 说明其根外菌丝能吸收利用乙酸盐中的碳素。菌丝室加  $^{13}\text{C}_{1,2}$ -乙酸钠+ $^{15}\text{NO}_3^-$  后, 随着氮源的增加, 其自由精氨酸浓度提高为  $54.2\% \pm 19.3\%$ , 菌根蛋白质中精氨酸浓度变化不大; 同时菌根组织的精氨酸和蛋白质中 C/N 同位素标记丰度大大提高, 分别为  $57.4\% \pm 4.8\%$  和  $50.3\% \pm 2.8\%$ , 说明菌丝室加碳源乙酸和氮源, 可以提高精氨酸的合成。大田试验中, 在低磷条件下, 接种 AM 真菌并添加硝酸钾后菌根化甜玉米茎叶重明显提高, 相比对照的甜玉米提高了 12.28%; 硫酸铵则不如硝酸钾对 AM 真菌菌根化甜玉米株重的促进作用, 反而是降低了其生物量 8.19%, 尿素则降低了 13.02%, 但尿素再加有机肥则可以缓解对生物量的降低作用。

**关键词:** 丛枝菌根真菌; 碳源; 氮源; 精氨酸;  $^{15}\text{N}$  标记;  $^{13}\text{C}$  标记

中图分类号: Q939.96 文献标志码: A

## Modes of Uptake and Translocation of $\text{NO}_3^-$ Affecting Growth of Host Plants in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis

LI Mengyao, JIANG Xiangyan, JIN Hairu<sup>†</sup>

(College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004, China)

\* 国家自然科学基金项目 (41371291) 和浙江省公益技术应用研究计划项目 (LGN20D010002) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41371291) and the Project of Zhejiang Public Welfare Technology Application Research Plan (No. LGN20D010002)

<sup>†</sup> 通讯作者 Corresponding author, E-mail: hrjin@zjnu.cn

作者简介: 李梦瑶 (1995—), 女, 吉林吉林人, 硕士研究生, 主要从事菌根真菌代谢研究。E-mail: 396315349@qq.com

收稿日期: 2019-09-09; 收到修改稿日期: 2019-11-27; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2020-03-23

**Abstract: 【Objective】**Effects of uptake and translocation of  $\text{NO}_3^-$  in arbuscular mycorrhizal symbiosis and formation of arginine (Arg) in extraradical mycelium (ERM) and mycorrhizal root when ERM was exposed to  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$ , affecting growth of their host plants were studied. **【Method】**In this study a dual split culture system was established with Ri T- DNA transformed carrot root and *Glomus intraradices* (*Rhizophagus intraradices*) and the  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  isotope tracing technique was used to explore pathways of the uptake and transport of  $\text{NO}_3^-$ , and determine how much arginine accumulated in ERM and mycorrhizal root after  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$  was absorbed and translocated in the fungal compartment, and a field experiment was conducted too to address how uptake and translocation of  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$  affect growth of the host plants. **【Result】**Results show that AM hypha preferred to uptake  $\text{NH}_4^+$  over  $\text{NO}_3^-$  when they both were available in the soil. When AM extraradical hypha were exposed to  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  for 1 week, though the free amino acids, include Arg, in the extraradical mycelium (ERM) were not labelled by  $^{15}\text{N}$ , those in the mycorrhizal tissues were, indicating that  $^{15}\text{NO}_3$  in the fungal compartment were transported directly via mycelium into mycorrhizal tissues rather than any new translocation mode; on the contrary, when extraradical hypha were cultured with  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ , only Arg was  $^{15}\text{N}$ -labelled therein, while the form of nitrogen composed of other amino acids in the ERM was  $^{14}\text{NO}_3$  translocated mainly from the hypha compartment and hence not labelled. While exposed to  $^{13}\text{C}_6$ -Glucose for 6 weeks, the ERM was found to have no  $^{13}\text{C}$ -labelled Arg or protein, which indicates that ERM is unable to utilize glucose. When exposed to  $^{13}\text{C}_{1,2}$ -acetate, the ERM was found to have Arg and protein  $^{13}\text{C}$  labelled up to  $8.5\%\pm 2.3\%$  and  $7.6\%\pm 0.7\%$ , respectively; when exposed to  $^{13}\text{C}_{1,2}$ -acetate plus  $^{15}\text{NO}_3^-$ , the ERM increased the concentration of free Arg with increasing N input, up to  $54.2\%\pm 19.3\%$  and  $^{13}\text{C}$  labelled Arg and protein up to  $57.4\%\pm 4.8\%$  and  $50.3\%\pm 2.8\%$ , respectively, which indicates that increased C and N inputs in the hypha compartment may promote formation of Arg. In the field experiment, in the field low in P level, addition of  $\text{KNO}_3$  increased significantly weight of the AM-inoculated sweet corn plants by 12.28%, as compared to the control, but addition of  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  did not have such an effect and instead decreased biomass of the plants by 8.19%, and addition of urea did by 13.02%; however amendment of organic manure to urea application mitigated the adverse effect. **【Conclusion】**There are two different modes of AM fungi absorbing and transporting ammonium and nitrate. AM fungi absorb and transport ammonium nitrogen ( $\text{NH}_4^+$  and urea), via GS-GOGAT in ERM, and most of the absorbed nitrogen is integrated into Arg molecules, and the synthesized arginine is intactly transported to the intraradical mycelium by ERM. Meanwhile,  $\text{NO}_3^-$  in the AM fungi symbiosis, as revealed by the isotope tracing technique, is adsorbed by ERM and transported via ERM to intraradical mycelium. Application of  $\text{NO}_3$  may promote growth of the AM fungi-hosted sweet corn, while application of  $\text{NH}_4^+$  may affect the crop reversely.

**Key words:** Arbuscular mycorrhizal fungi; Carbon source; Nitrogen source; Arginine;  $^{15}\text{N}$  labelling;  $^{13}\text{C}$  labelling

同位素示踪技术及酶学和基因表达分析至今已证实 AM 真菌吸收氮素并转运给植物, 其能利用无机态的铵态氮、硝态氮, 有机态的氨基酸等<sup>[1-5]</sup>, 而且 Jin 等<sup>[5-7]</sup>利用 AM 真菌 (*Glomus intraradices*) 与毛根农杆菌质粒 DNA 转化的胡萝卜根 (Ri T-DNA transformed carrot roots) 建立的双重培养系统研究提出了 AMF 菌丝内氮素运转模型, 即 AM 真菌也可以从土壤吸收多种不同来源的氮, 如  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$  和氨基酸, 这些不同的氮源通过 AM 真菌根外菌丝内谷氨酰氨合成酶-谷氨酸合成酶 (GS-GOGAT) 途径被吸收利用, 而吸收的氮大都整合入精氨酸 (Arg) 分子, 合成的精氨酸可以被 AM 真菌根外菌丝完整地运转至根内菌丝, 而且可以在菌丝体内双向运转, 再将被输送的精氨酸通过尿素循环 (urea cycle) 释

放出 N, 以  $\text{NH}_4^+$  形式传递给植物寄主。这为进一步研究 AM 真菌对氮素的吸收和传递特点提供了理论依据。

该途径的研究是以容易吸收利用的  $\text{NH}_4^+$  作为氮源而证明精氨酸在菌丝中大量积累, 但是以  $\text{NO}_3^-$  为氮源时并未发现菌丝中有大量精氨酸的积累, 故并不清楚  $\text{NO}_3^-$  的吸收和转运过程。尽管研究表明 AM 真菌的 ERM 能吸收不同无机态氮 ( $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_3^-$ ), 当两者共存时 AM 真菌通常先利用  $\text{NH}_4^+$ <sup>[1-2]</sup>, 因为由硝酸盐还原酶 (nitrate reductase, NR) 转化  $\text{NO}_3^-$  需要更多能量, 所以相较于  $\text{NO}_3^-$  更有效。而且根外菌丝吸收转运  $\text{NH}_4^+$  的能力高于  $\text{NO}_3^-$ , 如 Tanaka 和 Yano<sup>[8]</sup>指出根外菌丝吸收  $\text{NH}_4^+$  向寄主植物传递的氮较  $\text{NO}_3^-$  高 10 倍; 相比较  $\text{NH}_4^+$ , 虽然吸收了

$\text{NO}_3^-$  但并非均传递给植物,一部分停留在菌丝体内,所以测得的寄主植物根系  $^{15}\text{N}$  丰度显著高于地上部。这种对硝酸盐氮吸收传递的低效性可能是由于其高流动性,但 Tanaka 和 Yano 认为可能是 AM 真菌在氮传递上的一种歧视性。Tanaka 和 Yano 分析了根内菌丝利用其 ERM 转运的  $^{15}\text{N}$  来合成细胞壁,但未测量根内菌丝和根外菌丝氨基酸中  $^{15}\text{N}$  的区别,没有进一步揭示硝酸盐氮的转运过程。

关于  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_3^-$  吸收分子机制,转录组研究揭示了部分在孢子、IRM、ERM 中表达的真菌  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_3^-$  转运蛋白,其中, GintAMT1 转运蛋白的表达是底物诱导型而且受  $\text{NH}_4^+$  供应和真菌  $\text{NH}_4^+$  水平所调节<sup>[9]</sup>,低浓度可诱导 AM 真菌的转运蛋白 GintAMT1 表达,而在高浓度下其表达被抑制。相比较,GintAMT2 在 N 限制条件下在 ERM 组成型表达,当不同氮源加入缺氮的 ERM 时瞬即可以被诱导,对不同 N 源下代谢生成的  $\text{NH}_4^+$  水平具有维持作用<sup>[10]</sup>。GintAMT3 在 IRM 中的表达受底物浓度和 C 供应调节,在高 P 情况下其表达量增加<sup>[11]</sup>。不同转运蛋白在真菌不同部位转录水平不同说明不同转运蛋白在氮的吸收和运输中起着不同作用。ERM 中 GintAMT1 转录水平高说明其参与真菌菌丝从土壤中获取  $\text{NH}_4^+$  的过程,GintAMT2 在 IRM 中特异性表达说明其在真菌从共生系统的交界面处起重吸收作用<sup>[10]</sup>。GintAMT3 在高 P 情况下表达量增加说明当 AM 真菌获取更多 P 的同时也转移更多的 N 给寄主<sup>[11]</sup>。外界供应  $\text{NO}_3^-$  能刺激 *Rhizophagus irregularis* ERM 中真菌  $\text{NO}_3^-$  转运蛋白的表达,但内部  $\text{NH}_4^+$  水平或者下游代谢物谷氨酰胺的提高会抑制这个转运蛋白的表达<sup>[12]</sup>。在不同氮源下 AM 真菌  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_3^-$  转运蛋白的表达特征说明氮分解代谢阻遏能够控制 AM 真菌从土壤中吸收  $\text{N}^{[13]}$ 。

尽管在 AM 真菌对不同无机氮 ( $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_3^-$ ) 的吸收特性、不同传递效果和基因表达差异有所研究,但是并未研究清楚培养介质中  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_3^-$  对寄主生长的影响,尤其不清楚  $\text{NO}_3^-$  吸收、转运途径及其转运后菌丝和菌根组织中氮的分配。研究表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。邓胤等<sup>[14]</sup>发现在高浓度的外界氮 ( $10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 或磷 ( $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 下,接种 AM 真菌反而使植物生物量下降。李侠和张俊伶<sup>[15]</sup>发现接种 AM 真菌 (*Rhizofagus*

*G. intraradices*, *G. mosseae*) 降低寄主植物地上部含 N 量和干重。但是在正常的供氮 ( $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和磷 ( $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 时,接种 AM 真菌显著提高玉米的生物量,这是改善 P 营养的结果,而对 N 营养影响小<sup>[14]</sup>。此外,虽然 Bago 等<sup>[16]</sup>研究了 AM 真菌的 ERM 可以吸收乙酸盐和甘油,但不吸收葡萄糖;Jiang 等<sup>[17]</sup>发现了植物传递脂类物质给共生 AM 生长繁殖; Fellbaum 等<sup>[13]</sup>发现碳的存在刺激了 AM 真菌氮素的吸收和转运;但是这些工作并未研究碳源或脂类以及外源氮对精氨酸合成的影响,因为精氨酸是 AM 真菌共生系统中氮素吸收和转运的载体,所以这些外源的吸收利用对氮素载体精氨酸合成和转运的影响也需要进一步研究揭示。本文将利用同位素示踪技术、AM 真菌 (*Glomus intraradices*) 与毛根农杆菌质粒 DNA 转化的胡萝卜根 (Ri T-DNA transformed carrot roots) 建立的双重培养系统及农田试验研究这些问题。

## 1 材料与方法

### 1.1 离体培养菌根

采用分隔培养皿方法将毛根农杆菌质粒 DNA 转化的胡萝卜根 (Ri T-DNA trans-formed carrot roots) (*Daucus carota* L.) 于  $24^\circ\text{C}$  培养在含有  $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  植物胶的改进型 M 培养基中<sup>[5]</sup>。菌根室的培养基依照 Jin 等<sup>[5]</sup>方法改进后限制氮浓度。

### 1.2 对不同碳、氮源的吸收和 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 的标记

氮素吸收和  $^{15}\text{N}$  标记实验在经改良不含葡萄糖的液体 M 培养基中进行<sup>[18]</sup>。用  $180 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  代替  $288 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 标记的  $^{15}\text{N}$  底物为氮素唯一来源。 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  标记的底物 (98%) 为:  $[^{15}\text{N}, 98\%]\text{KNO}_3+^{13}\text{C}_{1,2}$  乙酸盐或  $^{13}\text{C}_6$ -葡萄糖、 $[^{15}\text{N}]\text{KNO}_3$  ( $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、 $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、 $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  ( $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和  $[^{15}\text{N}, 98\%]^{15}\text{NH}_4\text{SO}_4$ 。标记物溶液过滤消毒后加至  $60 \text{ mm}$  灭菌培养皿中培养,不加其他氮源。配好培养基后调节 pH 至 6.0。每种氮源重复处理 6 个培养皿,作为 3 个重复。

### 1.3 游离氨基酸提取

培养 1 天、3 天、1 周、3 周和 6 周后,用  $38 \mu\text{m}$  网状筛收集菌根和菌丝及孢子,去离子水清洗。样品冷冻干燥后加入少许酸洗过的沙用研钵研磨,用

4℃  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  缓冲液 (pH = 8, 含 0.2%  $\text{NaN}_3$ ) 提取。提取液在 40 mL  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  缓冲液中于 4℃ 透析 24 h, 透析膜允许分子量 2 000 的分子透过。收集渗透液, 冷冻干燥后 -20℃ 储存。然后溶解于 2 mL  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl, 装入阳离子交换柱 (0.3 mL 的 DOWEX 50 X 8-200-阳离子型), 柱先用  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{OH}$ 、 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl 和去离子水润洗, 再用去离子水洗至流出液为中性。用 5 mL 去离子水洗下柱的中性复合物, 再用 2 mL  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{NH}_4\text{OH}$  洗脱收集游离氨基酸。洗提液收集后冷冻干燥用于 GC-MS 和 HPLC 分析。孢子中游离氨基酸提取和分析时用外标法计算各种氨基酸的浓度, 每个样品重复 3 次。

#### 1.4 AM 真菌菌根中可溶性蛋白质的酶水解

1.3 中透析膜内物质离心后, 上层含有可溶性蛋白质, 冷冻干燥后重新悬浮在  $600 \mu\text{L}$   $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  缓冲液中 (pH = 8, 含 0.2%  $\text{NaN}_3$ )。加入新鲜溶解蛋白酶 ( $2 \mu\text{L}$  氨肽酶 M,  $2 \mu\text{L}$  链霉菌蛋白酶 E,  $2 \mu\text{L}$  羧肽酶 Y),  $30^\circ\text{C}$  振荡培养 6 h。加入新鲜的酶继续培养 6 h,  $4^\circ\text{C}$   $10\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  转下离心 10 min, 上层清液冷冻干燥并重新悬浮于 2 mL 水中, 随后冷冻干燥悬浮于 1 mL 水中。所得可溶性蛋白氨基酸按照 1.3 步骤纯化, 用 MS 进行  $^{15}\text{N}$  的测定。

#### 1.5 自由氨基酸的同位素分析

用 GC-MS 分析标记氨基酸<sup>[5]</sup>。从组织中提取的氨基酸进行衍生化反应。先加入 10~20  $\mu\text{L}$  的 N, N-二甲基甲酰胺 (DMF), 根据样品量加 30~50  $\mu\text{L}$  的 N-甲基-N-特丁基二甲基硅烷-三氟乙酰胺 (MTBSTFA),  $110^\circ\text{C}$  电炉上加热 30 min。

甲基硅烷化的提取物注射入 Finnigan Trace MS 2000 设备,  $0.25 \mu\text{m}$  厚的石英毛细管柱 (直径 0.25 mm, 长 30 m, RTX-5MS, Restek Inc. Flemington, NJ), 此柱连接到质谱仪的四极质量检测器 (Thermo Electron, Madison WI) 上, He 作为载气, 流速  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。程序升温:  $110^\circ\text{C}$  2 min,  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  升温至  $260^\circ\text{C}$ , 维持 5 min。电子冲击离子化能量 70 eV, 检测器扫描质量范围  $150\sim 600 \text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$ , 时间 0.5 s, 与 20 种标准氨基酸比较, 鉴定样品中的氨基酸。除 Arg 外, Orn 和其他氨基酸通过 N- (特丁基二甲基硅) -N-甲基三氟乙酰胺 (MTBSTFA) 衍生化后测定 M-57 离子确定。

#### 1.6 HPLC 分析氨基酸的含量

根据 Endres 和 Mercier<sup>[19]</sup>的方法用 Waters<sup>TM</sup> (Milford, MA) 717HPLC 系统测定各种氨基酸含量。设备包括 Waters510 自动取样器和泵, 一个 Waters 可调吸收检测器和 Millenium 数据处理软件。提取的氨基酸溶解于  $500 \mu\text{L}$   $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl, Pico-Tag 工作台上真空干燥, 加入乙醇、水和三乙胺 (体积比 2: 2: 1) 后真空干燥。随后加入乙醇、水、三乙胺和异硫氰酸苯酯 (体积比 7: 1: 1: 1) 室温放置 20 min, 进行氨基酸衍生反应, 衍生物真空干燥后备用。每个样品取 20  $\mu\text{L}$  注射至反相 C18 柱 (3.9 mm 内径  $\times$  150 mm 长)。38 mL 的 Pico-Tag 洗脱液 A 和 B 作为流动相; 洗脱液流速为  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 其中洗脱液 B 比例逐渐上升。检测波长 254 nm。测定前所有溶液真空条件除气 1 min。与已知标准氨基酸的峰值和保留时间比较, 计算样品中各种氨基酸的含量。

#### 1.7 AM 真菌不同无机态氮吸收利用对寄主植物甜玉米生长的实验

在特制培养盒中加入适量灭菌的沙土。选取饱满的新鲜甜玉米种子, 消毒后播种。接种 AM 真菌根内球囊霉 (*G. intraradices*), 每隔一周, 施加改良的霍格兰德营养液 50 mL 补充营养, 培养一段时间后移栽入大田中。继续施加改良的霍格兰德营养液, 共施加 5 次, 同时补充不同氮素 (尿素、尿素+有机肥、硝酸钾、硝酸钙和硫酸铵)。氮浓度为  $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的无机氮源。此外, 分别施加浓度为  $0.15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (高磷) 和  $0.05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (低磷) 的磷酸二氢钾溶液, 每次 100 mL。实验玉米共生长 60 d 后回收分析其株重。甜玉米试验每种氮源重复处理 15 株。

#### 1.8 统计分析

对重复样品分析得到的结果采用 SPSS 18.0 软件进行相关统计分析。

## 2 结 果

#### 2.1 AM 真菌对不同无机态氮素的吸收特征

图 1a 表明 AM 真菌共生系统中根外菌丝用  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  处理 1 周后, 根外菌丝中的自由氨基酸 (除了谷氨酰胺 Gln) 未被  $^{15}\text{N}$  标记, 但  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  处理后, 其氨基酸  $^{15}\text{N}$  标记含量很高, 说明  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_3^-$  共存时, AM 真菌菌丝优先吸收  $\text{NH}_4^+$ 。

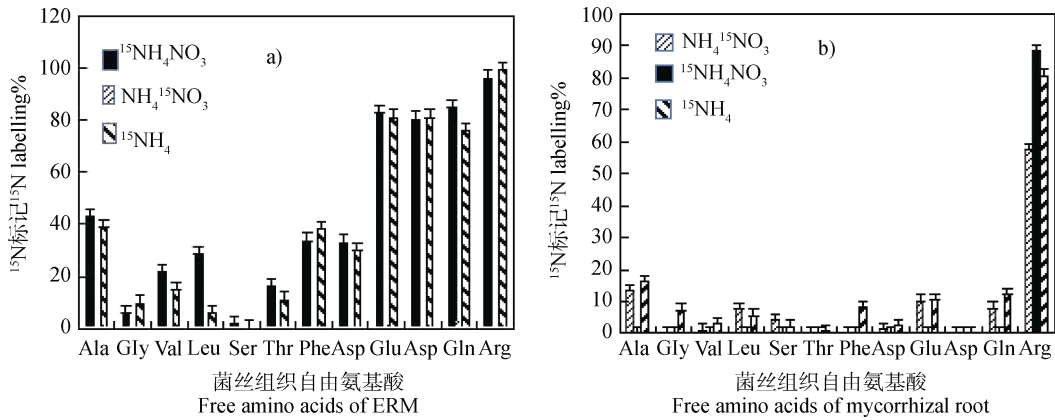


图 1 AM 真菌共生系统中菌丝室用  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  或  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  处理 6 天时其根外菌丝 (a) 和菌根组织 (b) 自由氨基酸的  $^{15}\text{N}$  标记

Fig. 1  $^{15}\text{N}$  labelling of free amino acids in extraradical mycelium (ERM) (a) and mycorrhizal tissues (b) in the hypha compartment of the AM fungi symbiosis treated with  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  or  $^{15}\text{NH}_4$  for 6 days

但是, 如图 1b, 当 AM 真菌的根外菌丝用  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  处理 1 周后, 虽然根外菌丝的自由氨基酸未被  $^{15}\text{N}$  标记, 包括精氨酸, 但菌根组织中的自由氨基酸被  $^{15}\text{N}$  标记, 其中精氨酸  $^{15}\text{N}$  丰度为 57%, 其他氨基酸丙氨酸 (Ala), 亮氨酸 (Leu), 丝氨酸 (Ser), 谷氨酸 (Glu) 和谷氨酰胺 (Gln) 也被标记, 而甘氨酸 (Gly), 缬氨酸 (Val), 苯丙氨酸 (Phe), 天门冬氨酸 (ASP) 未被标记。相比较, 根外菌丝在  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  培养时菌根组织中仅精氨酸被  $^{15}\text{N}$  标记的

结果, 其他氨基酸合成主要来自从菌丝室运转来的  $^{14}\text{NO}_3^-$ , 所以未被标记, 而只有从菌丝室运转来的精氨酸被  $^{15}\text{N}$  标记。当菌丝室只有  $^{15}\text{NH}_4^+$  培养时, 菌根组织的其他大多数氨基酸被  $^{15}\text{N}$  标记。

## 2.2 AM 真菌共生系统中外源碳和氮源对菌丝合成精氨酸的影响

AM 真菌根外菌丝加  $^{13}\text{C}_6$ -葡萄糖培养 6 周后, 菌根组织的精氨酸和蛋白质中均未发现  $^{13}\text{C}$  (表 1), 说明其根外菌丝不能利用葡萄糖。而无侵染的根组

表 1 外源碳和氮源对菌根组织及其蛋白质中精氨酸浓度和同位素丰度的影响

Table 1 Effect of exogenous carbon and nitrogen input on formation and  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  labelling of Arg in mycorrhizal tissues and protein

外源碳源/氮源 Exogenous carbon/nitrogen	菌根自由精氨酸浓度 Free AA of Myc root/%	菌根蛋白质中精氨酸浓度 Arg concentration of protein of Myc root/%	菌根自由精氨酸 $^{13}\text{C}$ 或 $^{15}\text{N}$ 丰度 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labelling of free AA of Myc root/%	菌根蛋白质中 $^{13}\text{C}$ 或 $^{15}\text{N}$ 丰度 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labelling of protein of Myc root/%
无侵染根组织+ $^{13}\text{C}_6$ -葡萄糖 Uncolonized root+ $^{13}\text{C}_6$ -Glucose	10.9±4.8b	10.2±0.5a	22.8±1.8b	17.7±1.0b
菌丝室+ $^{13}\text{C}_1, 2$ 乙酸钠 ERM+ $^{13}\text{C}_1, 2$ -acetate	10.3±0.3b	8.3±0.8b	8.5±2.3c	7.6±0.7b
菌丝室+ $^{13}\text{C}_1, 2$ 乙酸钠+ $^{15}\text{NO}_3$ ERM+ $^{13}\text{C}_1, 2$ -acetate+ $^{15}\text{NO}_3$	54.2±19.3a	8.0±0.7b	57.4±4.8b	50.3±2.8a
菌丝室+ $^{13}\text{C}_6$ -葡萄糖 ERM+ $^{13}\text{C}_6$ -Glucose	5.6±0.2c	6.7±0.4b	0	0
菌丝室+ $^{15}\text{NH}_4$ ERM+ $^{15}\text{NH}_4$	14.1±2.3b	11.7±0.3a	96.5±1.5%a	9.9±0.9b

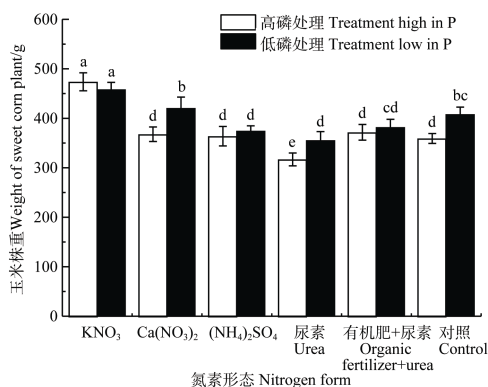
注: 同一列中无相同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。Note: Different letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level.

织培养于  $^{13}\text{C}_6$ -葡萄糖 6 周后, 根组织中的自由精氨酸  $^{13}\text{C}$  丰度为  $22.8\% \pm 1.8\%$ , 根蛋白质中  $^{13}\text{C}$  丰度为  $17.7\% \pm 1.0\%$ , 表明根组织可以吸收利用葡萄糖合成精氨酸, 其自由精氨酸浓度为  $10.9\% \pm 4.8\%$ , 菌根蛋白质中精氨酸浓度为  $10.2\% \pm 0.5\%$ 。菌丝室加  $^{13}\text{C}_{1,2}$ -乙酸钠后, 菌根组织的精氨酸和蛋白质中都发现有  $^{13}\text{C}$  标记, 分别为  $8.5\% \pm 2.3\%$  和  $7.6\% \pm 0.7\%$ , 说明其根外菌丝能吸收利用乙酸盐中的碳素, 此时其自由精氨酸浓度为  $10.3\% \pm 0.3\%$ , 菌根蛋白质中精氨酸浓度为  $8.3\% \pm 0.8\%$ 。

菌丝室加  $^{13}\text{C}_{1,2}$  乙酸钠+ $^{15}\text{NO}_3$  后, 随着氮源的增加, 其自由精氨酸浓度提高为  $54.2\% \pm 19.3\%$ , 菌根蛋白质中精氨酸浓度变化不大, 为  $8.0\% \pm 0.7\%$ ; 同时菌根组织的精氨酸和蛋白质中 C/N 同位素标记丰度大大提高, 分别为  $57.4\% \pm 4.8\%$  和  $50.3\% \pm 2.8\%$ 。说明菌丝室增加可利用碳源乙酸和氮源, 可以提高精氨酸的合成。

### 2.3 AM 真菌吸收利用不同无机态氮对寄主植物甜玉米生长的影响

大田试验中 (如图 2), 在低磷条件下, 接种 AM 真菌并添加硝酸钾菌根化玉米茎叶重明显提高, 相对无菌根化低磷条件下的甜玉米提高了 12.28%, 其次硝酸钙也有提高作用, 可提高 2.94%; 硫酸铵则不如硝酸钾对 AM 真菌菌根化甜玉米株重的促进作用, 反而是降低了其生物量 8.19%, 尿素则降低了 13.02%, 但尿素和有机肥则缓解这种生物量抑制作用。



注: 图中同一处理无相同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。Note: Different letters in the same treatment indicate significant difference at 0.05 level.

图 2 不同氮素形态在高磷和低磷下对甜玉米株重的影响  
Fig. 2 Effect of form of applied nitrogen on per-plant weight of sweet corn cultured in soil high /low in P concentration

在高磷条件下, 接种 AM 真菌并添加硝酸钾菌根化玉米穗重显著提高, 相对无菌高磷提高达 31.75%, 其次硝酸钙提高 2.43%; 硫酸铵则不如硝酸钾, 只有 1.32%, 尿素在高磷下则减少其生物量 11.97%, 施加尿素和有机肥则缓解抑制作用, 反而提高 3.52%。

## 3 讨论

### 3.1 AM 真菌吸收和转运无机态氮素的模式差异

AM 真菌可以吸收无机态氮素  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_3^-$ , 不过更易吸收前者, 因为消耗更少的能量。而且在 ERM 中能将吸收的  $\text{NH}_4^+$  通过菌丝内谷氨酰氨合成酶-谷氨酸合成酶 (GS-GOGAT) 途径整合入精氨酸, 并且迅速通过菌丝转运给根内组织, 进而通过精氨酸分解酶释放出尿素和鸟氨酸, 再将尿素分解为氨传递给寄主植物利用。这个途径由 Jin 等<sup>[5]</sup> 通过同位素示踪技术发现和证明, 与 Tisserant 等<sup>[20]</sup> 从转录组学分析的结果一致, 即氮素吸收关键途径酶如谷氨酸合成酶、谷氨酰胺合成酶、精氨酸琥珀酸合成酶 (argininosuccinate synthetase)、精氨酸琥珀酸裂解酶、精氨酸分解酶、鸟氨酸氨基转移酶、鸟氨酸脱羧酶和脲酶等基因的高表达。

尽管 AM 真菌更易吸收  $\text{NH}_4^+$ , 但是对土壤中的  $\text{NO}_3^-$ , 不管是其孢子、ERM 和 IRM 都能吸收, 这由 Jin 等<sup>[5, 21]</sup> 用同位素示踪已经证明, 而且 Tisserant 等<sup>[20]</sup> 从转录组学分析也揭示了硝酸盐还原酶 (Nitrate reductase) 和亚硝酸盐还原酶 (nitrite reductase) 基因在孢子、ERM、IRM 中皆有表达, 其转录水平在 IRM 中很高。这说明硝酸盐直接在 ERM 中被同化的少, 而是能在寄主植物根内的真菌组织 IRM 中被还原<sup>[20, 22]</sup>。亚硝酸盐被亚硝酸盐还原酶还原, 一个编码 AM 真菌亚硝酸盐还原酶的基因在孢子和 IRM 中有较高表达水平<sup>[20]</sup>, 这与 AM 真菌菌根中 IRM 里的真菌硝酸盐还原酶的高转录水平结果一致, 此时, 菌根植物中植物硝酸盐还原酶转录水平比非菌根植物中的低<sup>[22, 23]</sup>, 这说明植物亚硝酸盐还原酶被从真菌转移到寄主植物的还原态 N 所抑制<sup>[24]</sup>。

于是, AM 真菌对  $\text{NO}_3^-$  的吸收和还原大部分是根内菌丝完成, 说明部分氮可能是以  $\text{NO}_3^-$  形式转运, 验证了 Johansen 等<sup>[25]</sup> 早期推测氮是以  $\text{NO}_3^-$  为主

的形式在菌丝内转移。这与同位素示踪的研究结果一致, 即当 AM 真菌的根外菌丝用  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  处理 1 周时, 虽然根外菌丝的自由氨基酸未被  $^{15}\text{N}$  标记, 包括精氨酸, 但是菌根组织中的自由氨基酸被  $^{15}\text{N}$  标记, 其他氨基酸丙氨酸 (Ala)、亮氨酸 (Leu)、丝氨酸 (Ser)、谷氨酸 (Glu) 和谷氨酰胺 (Gln) 也被标记, 而甘氨酸 (Gly)、缬氨酸 (Val)、苯丙氨酸 (Phe)、天门冬氨酸 (ASP) 未被标记, 这样的结果可能不是来自于精氨酸转运来的, 而是来自于  $^{15}\text{NO}_3^-$  沿着菌丝的直接转运 (类似精氨酸 (Arg) 转运), 在根内菌丝先被硝酸盐还原酶转化为  $\text{NH}_4^+$  进而被利用合成氨基酸 (也有部分  $\text{NH}_4^+$  传递给了寄主细胞利用); 当菌丝室 ERM 只有  $^{15}\text{NH}_4^+$  处理时, 菌根组织的其他大多数氨基酸被  $^{15}\text{N}$  标记, 说明这些  $^{15}\text{N}$  主要来自精氨酸转运的 N; 然而当 ERM 用  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  处理时, 发现只有精氨酸被  $^{15}\text{N}$  标记, 其他氨基酸未被标记, 其合成可能主要来自从菌丝室扩散或运转来的  $^{14}\text{NO}_3^-$ , 所以, 只有从菌丝室转运来的精氨酸被  $^{15}\text{N}$  标记而其他氨基酸则未被标记。这表明 AM 真菌对无机氮素存在两种不同的吸收模式, 即对  $\text{NH}_4^+$  是通过菌丝吸收整合入精氨酸, 再通过菌丝转运至 IRM, 在 IRM 被分解成  $\text{NH}_4^+$  再传递给寄主, 而对于  $\text{NO}_3^-$  则除了小部分被 ERM 吸收还原为  $\text{NH}_4^+$ , 大部分则是通过菌丝扩散或转运至 IRM 再被吸收利用, 这与 Hildebrandt 等<sup>[23]</sup>的结论是一致的, 而且 Drechsler 等<sup>[26]</sup>进一步发现在水稻菌根中四个硝酸根输运蛋白基因 *NPF2.2/PTR2*, *NPF1.3*, *NPF6.4* 和 *NPF4.12* 受 AM 真菌诱导高表达, 支持了该结论。

### 3.2 外源碳和氮素对 AM 真菌合成精氨酸的影响

精氨酸是 AM 真菌菌丝转运氮素的载体。在菌丝和菌根组织中的精氨酸浓度反映了其合成、转运及分解的平衡结果。Jin 等<sup>[5]</sup>用 HPLC 分析了 AM 菌丝吸收利用  $\text{NH}_4^+$  合成精氨酸的浓度, 是菌丝中自由氨基酸的主要成分。本研究发现 AM 真菌根外菌丝加  $^{13}\text{C}_6$ -葡萄糖, 培养 6 周后, 菌根组织的精氨酸和蛋白质均未发现  $^{13}\text{C}$ , 说明其根外菌丝不能利用葡萄糖。菌丝室加  $^{13}\text{C}_{1.2}$  乙酸钠后, 菌根组织的精氨酸和蛋白质中均发现  $^{13}\text{C}$ , 说明其根外菌丝能吸收利用乙酸盐中的碳素; 菌丝室加  $^{13}\text{C}_{1.2}$  乙酸钠+ $^{15}\text{NO}_3^-$  后, 随着氮源的增加, 其自由精氨酸浓度提高为

54.2%±19.3%, 菌根蛋白质中精氨酸浓度变化不大; 同时菌根组织的精氨酸和蛋白质中 C/N 同位素标记丰度大大提高。说明菌丝室增加可利用碳源乙酸和氮源, 可以提高精氨酸的合成, 但是不清楚精氨酸合成是在根内菌丝还是寄主根内合成为主。在 AM 真菌共生系统施加有机质, 可以部分分解为氨基酸和有机酸 (乙酸等) 等再被菌丝吸收利用, 减少从寄主吸收碳水化合物, 从而缓解 AM 真菌对寄主生物量的抑制作用。

### 3.3 AM 真菌吸收不同氮素对寄主植物生长的影响

大田试验中, 本研究发现在低磷条件下, 接种 AM 真菌, 并添加硝酸钾后, 菌根化玉米茎叶重明显提高。硫酸铵则不如硝酸钾对 AM 真菌菌根化甜玉米株重的促进作用, 尿素则降低了 13.02%, 但是尿素再加有机肥则可以缓解这种生物量抑制作用。Thirkell 等<sup>[27]</sup>也报道了 AM 真菌菌丝接触有机质后可以提高寄主植物氮和磷水平, 同时也提高了寄主生物量。

在高磷条件下, 接种 AM 真菌并添加硝酸钾后, 菌根化玉米穗重明显提高; 硫酸铵则不如硝酸钾, 尿素在高磷下则减少其生物量 11.97%, 施加有机肥则缓解抑制作用, 反而提高 3.52%。相比较, 国内邓胤等<sup>[14]</sup>研究了不同氮磷水平对玉米生长的影响, 以  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  为氮源, 在高浓度外界氮和磷下, 接种 AM 真菌对玉米营养无贡献, 只有在正常氮浓度  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 显著提高生物量。显然, 该作者没有区别 AM 真菌对不同无机态氮素的吸收差别。冉琼和钟章成<sup>[28]</sup>则发现 AM 真菌能够通过促进玉米幼苗 N、P 吸收及叶绿素含量增加, 光化学效率、气孔导度增大, 从而提高玉米幼苗光合作用能力促进生长。

相比  $\text{NO}_3^-$ , 植株根系同化  $\text{NH}_4^+$ , 需要更多的碳水化合物, 而 AMF 也需要从根组织获得碳水化合物 (糖和脂类) 进行生长繁殖, 即  $\text{NH}_4^+$  和 AMF 竞争根组织中的碳水化合物, 因而植株供应  $\text{NH}_4^+$  时会抑制 AMF 生长, 也会减少植株生物量。Yoneyama 等<sup>[29]</sup>发现低浓度的外界氮能增加高粱 (*Sorghum vulgare*) 根分泌的独角金内酯 (strigolactones, 一种根系分泌物), 并且提供单一的  $\text{NO}_3^-$  为氮源诱导根系分泌独角金内酯的量较  $\text{NH}_4^+$  高, 提高约 1 倍。这样导致施加  $\text{NO}_3^-$  可以增加 AM 真菌菌丝生长并提高吸收养分传递给寄主的能力。

## 4 结 论

AM 真菌对铵和硝态氮的吸收和转运有两种不同模式, 对于铵态氮 ( $\text{NH}_4^+$ 和尿素), AM 真菌通过根外菌丝内谷氨酰氨合成酶-谷氨酸合成酶 (GS-GOGAT) 途径被吸收利用的, 而吸收的氮大都整合入精氨酸 (Arg) 分子, 合成的精氨酸可以被 AM 真菌根外菌丝完整地运转至根内菌丝, 而且可以在菌丝体内双向运转, 再将被输送的精氨酸通过尿素循环 (urea cycle) 释放出 N, 以  $\text{NH}_4^+$ 形式传递给植物寄主。对于硝态氮  $\text{NO}_3^-$ , 则除了小部分被 ERM 吸收还原为  $\text{NH}_4^+$ 进入尿素循环, 大部分则是通过根外菌丝转运 (可以排除菌丝扩散作用, 经检测培养基中  $\text{NO}_3^-$ 浓度很低, 数据未发表) 至 IRM 的丛枝结构 (检测菌根组织中积累了  $\text{NO}_3^-$ , 数据未发表), 进而推测在硝酸盐还原酶 (Nitrate reductase) 和亚硝酸盐还原酶作用下形成铵, 再传递给寄主植物利用 (硝酸还原酶基因表达数据; 宿主植物受到 AM 真菌诱导的铵吸收转运蛋白基因的表达数据在后续文章中发表)。这个新模式是首次报道了硝态氮  $\text{NO}_3^-$ 转运吸收途径。

尽管 AM 真菌根外菌丝对  $\text{NH}_4^+$ 的吸收速率是  $\text{NO}_3^-$ 的 10 倍, 但是农田试验中发现对寄主植物氮素营养及生长的影响并不是一致的。无论在高磷和低磷土壤中, 施加  $\text{NH}_4^+$ 态氮降低寄主生物量, 而施加  $\text{NO}_3^-$ 态氮则促进寄主生物量, 施加尿素和有机肥可以缓解铵或尿素对寄主生长的抑制作用。这说明了 AM 真菌共生系统对硝态氮  $\text{NO}_3^-$ 的吸收和转运模式更有利于寄主植物的生长, 其潜在的不同作用机制有待进一步用系统的基因组学、转录组学和代谢组学等方法研究阐明。该结论将对高效利用 AM 真菌生物肥料, 提高农作物种植产量具有重要指导意义。

## 参考文献 (References)

- [ 1 ] 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[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50 ( 4 ): 251—260.
- [ 2 ] Hawkins H J, George E. Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil, 2000, 226 ( 2 ): 275—285.
- [ 3 ] Hodge A, Fitter A H. Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107 ( 31 ): 13754—13759.
- [ 4 ] Govindarajulu M, Pfeffer P E, Jin H R, et al. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. Nature, 2005, 435 ( 7043 ): 819—823.
- [ 5 ] Jin H R, Pfeffer P E, Douds D D, et al. The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. New Phytologist, 2005, 168 ( 3 ): 687—696.
- [ 6 ] Jin H R, Jiang X Y. Chromatographic analysis of nitrogen utilization and transport in arbuscular mycorrhizal fungal symbiosis//Chromatography - The most versatile method of chemical analysis[M]. 2012. IntechOpen, DOI: 10.5772/48469.
- [ 7 ] Jin H R, Liu J, Liu J, et al. Forms of nitrogen uptake, translocation, and transfer via arbuscular mycorrhizal fungi: A review[J]. Science China Life Sciences, 2012, 55 ( 6 ): 474—482.
- [ 8 ] Tanaka Y, Yano K. Nitrogen delivery to maize via mycorrhizal hyphae depends on the form of N supplied[J]. Plant, Cell and Environment, 2005, 28( 10 ): 1247—1254.
- [ 9 ] López-Pedrosa A, González-Guerrero M, Valderas A, et al. GintAMT1 encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2006, 43 ( 2 ): 102—110.
- [ 10 ] Pérez-Tienda J, Testillano P S, Balestrini R, et al. GintAMT2, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2011, 48 ( 11 ): 1044—1055.
- [ 11 ] Calabrese S, Pérez-Tienda J, Ellerbeck M, et al. GintAMT3—a low-affinity ammonium transporter of the arbuscular mycorrhizal *Rhizophagus irregularis*[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 679. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00679>.
- [ 12 ] Tian C J, Kasiborski B, Koul R, et al. Regulation of the nitrogen transfer pathway in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Gene characterization and the coordination of expression with nitrogen flux[J]. Plant Physiology, 2010, 153 ( 3 ): 1175—1187.
- [ 13 ] Fellbaum C R, Gachomo E W, Beesetty Y, et al. Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109 ( 7 ): 2666—2671.
- [ 14 ] Deng Y, Luo W Q, Zhu J S, et al. Effects of AMF on growth of maize under different N and P supply levels[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24 ( 12 ):



- 301—303. [邓胤, 罗文倩, 朱金山, 等. 不同氮磷水平条件下接种 AMF 对玉米生长的影响[J]. 中国农学通报, 2008, 24 (12): 301—303.]
- [ 15 ] Li X, Zhang J L. Uptake of ammonium and nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2009, 15(3): 683—689. [李侠, 张俊伶. 丛枝菌根根外菌丝对铵态氮和硝态氮吸收能力的比较[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15 (3): 683—689.]
- [ 16 ] Bago B, Pfeiffer P E, Shachar-Hill Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas[J]. Plant Physiology, 2000, 124 (3): 949—958.
- [ 17 ] Jiang Y N, Wang W X, Xie Q J, et al. Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi[J]. Science, 2017, 356 (6343): 1172—1175.
- [ 18 ] Becard G, Fortin J A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots[J]. New Phytologist, 1988, 108 (2): 211—218.
- [ 19 ] Endres L, Mercier H. Amino acid uptake and profile in bromeliads with different habits cultivated *in vitro*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2003, 41 (2): 181—187.
- [ 20 ] Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddas P, et al. The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont[J]. New Phytologist, 2012, 193 (3): 755—769.
- [ 21 ] Jin H R, Jiang D H, Zhang P H. Effect of carbon and nitrogen availability on metabolism of amino acids in germinating spores of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Pedosphere, 2011, 21 (4): 432—442.
- [ 22 ] Kaldorf M, Schmelzer E, Bothe H. Expression of maize and fungal nitrate reductase genes in arbuscular mycorrhiza[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998, 11 (6): 439—448.
- [ 23 ] Hildebrandt U, Schmelzer E, Bothe H. Expression of nitrate transporter genes in tomato colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus[J]. Physiologia Plantarum, 2002, 115 (1): 125—136.
- [ 24 ] Bailly J, Debaud J C, Verner M C, et al. How does a symbiotic fungus modulate expression of its host-plant nitrite reductase?[J]. New Phytologist, 2007, 175 (1): 155—165.
- [ 25 ] Johansen A, Jakobsen I, Jensen E S. Hyphal transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus of N applied to the soil as ammonium or nitrate[J]. Biology and Fertility of Soils, 1993, 16 (1): 66—70.
- [ 26 ] Drechsler N, Courty P E, Brulé D, et al. Identification of arbuscular mycorrhiza-inducible Nitrate Transporter 1/Peptide Transporter Family (NPF) genes in rice[J]. Mycorrhiza, 2018, 28 (1): 93—100.
- [ 27 ] Thirkell T J, Cameron D D, Hodge A. Resolving the ‘nitrogen paradox’ of arbuscular mycorrhizas: Fertilization with organic matter brings considerable benefits for plant nutrition and growth[J]. Plant, Cell & Environment, 2016, 39 (8): 1683—1690.
- [ 28 ] Ran Q, Zhong Z C. Effect of AMF on the photosynthetic characteristics and growth of maize seedlings under the stress of drought, high calcium and their combination in Karst area[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35 (2): 460—467. [冉琼, 钟章成. 模拟岩溶旱钙土壤基质中 AM 真菌对玉米幼苗光合生长的影响[J]. 生态学报, 2015, 35 (2): 460—467.]
- [ 29 ] Yoneyama K, Xie X N, 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[J]. Planta, 2007, 227 (1): 125—132.

(责任编辑: 卢萍)