

## 创新机遇

## NMT 功能创新：活体样品微米级空间 pH 检测

供稿 中关村 NMT 产业联盟编辑部

## 编者按：

真菌定殖可以激活盐胁迫下杨树根部质子泵的活性，促进向根表分泌更多的  $H^+$ ，降低根表 pH，从而有效改善盐胁迫下杨树根吸收  $NO_3^-$  受阻的不良状况。非损伤微测技术（NMT）除了可以动态检测这一过程中根表泌  $H^+$  的实时速率，还能创新性地观察根表微米级空间 pH 的精细变化，真正实现了对  $H^+$  的“动静结合”监测。



New Phytologist

Full paper | Open Access |

**Amelioration of nitrate uptake under salt stress by ectomycorrhiza with and without a Hartig net**

Gang Sa, Jun Yao, Chen Deng, Jian Liu, Yinan Zhang, Zhimei Zhu, Yuhong Zhang, Xujun Ma, Rui Zhao, Shanzhi Lin, Cunfu Lu, Andrea Polle , Shaoliang Chen

First published: 12 February 2019 | <https://doi.org/10.1111/nph.15740> | Citations: 10

## 基本信息

**主题：**NMT 发现定殖真菌致根际酸化促  $NO_3^-$  吸收 为菌根通过保持营养吸收促宿主植物耐盐提供证据

**期刊：**New Phytologist

**影响因子：**7.299 (2019 年)

**标题：**Amelioration of nitrate uptake under salt stress by ectomycorrhiza with and without a Hartig net

**作者：**北京林业大学陈少良、撒刚、邓晨、Jun Yao，哥廷根大学 Andrea Polle

**检测样品：**银灰杨根

**检测离子 / 分子指标：** $H^+$ 、 $NO_3^-$

收稿日期：2022-10-10；接收日期：2022-10-10  
编辑 E-mail: yanhan@nmtia.org.cn

**摘要：**盐胁迫是阻碍杨树吸收氮素营养的重要环境因子。本文描述了盐度对外生菌根中质子驱动的硝酸盐流速的影响以及哈蒂氏网对硝酸盐吸收的重要性。研究采用两种卷边网褶菌 (*Paxillus involutus*) 菌株进行根部定殖：一种是 MAJ，形成典型的外生菌根结构（地幔和哈蒂氏网），一种是 NAU，定殖根具薄而疏松的菌丝鞘。将真菌定殖和非定殖的银灰杨 (*Populus canescens*) 用 NaCl 处理后，检测根表面 pH、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 流速、硝酸盐转运蛋白 (PcNRT1.1、1.2、2.1) 和质膜 H<sup>+</sup>-ATPase (PcHA4、8、11) 的转录。不论是否存在哈蒂氏网，菌株定殖都能增强根系 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的吸收，降低表面 pH 值并刺激宿主植物的 NRTs 和 HA4。在盐胁迫下，未定殖的根部表现出较强的净 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 外排，而真菌定殖对根表面 pH 和 H<sup>+</sup>-ATPase 的有益作用避免了 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的损失。在所有条件下，抑制 H<sup>+</sup>-ATPases 可消除 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 内流。研究发现，刺激 H<sup>+</sup>-ATPase 对于外植体对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 吸收的有利影响是至关重要的，而哈蒂氏网的存在对于 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 转运的改善并不是必需的。菌根可能会通过保持 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 营养来促进宿主植物适应盐害环境。

**关键词：**非损伤微测技术，盐胁迫，菌根，硝酸根，哈蒂氏网，NRT

## 1. 离子 / 分子流实验结果

由于 <sup>15</sup>N 跟踪确实揭示了运输的 N 化合物的身份，研究使用非损伤微测技术 (NMT) 来确定杨树在有无真菌定殖以及响应盐胁迫时的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 流速变化。NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的流速沿着根尖 (100~2100 μm) 在测试液中保持恒定 (0.1 mM 低 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 图 2a)。NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 流速的大小和方向明显受 NaCl 处理和真菌定殖的影响 (图 1a)。无菌根 (non-mycorrhizal, NM) 杨树的根尖表现出适度的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 吸收，而真菌定殖的根表现出 7.4~11.8 倍的吸收 (图 1a)。很显然，这种刺激不需要哈蒂氏网，因为与 NM 根相比，用 MAJ 或 NAU 定殖的根会使 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 吸收增加 (图 1a)。此外，在盐胁迫下，真菌定殖的根保持了 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的净吸收，而 NM 根在短期和长期盐胁迫下显示出 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的净外排 (图 1a)。无论是对照还

是盐处理，NAU 和 MAJ 的纯菌株均表现出 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 内流 (图 3)。

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的吸收需要 H<sup>+</sup> 的协同运输，因此取决于外部环境的 pH 值。随后研究检测了 NM 和真菌定殖的根表面的 pH 值。沿 NM 根的 pH 值是稳定的 (图 2b)，平均值为 5.41 (图 1b)。真菌定殖导致根表面酸性更高，pH 值范围为 5.05~5.12 (图 1b, 图 2b)。长期的盐胁迫导致 NM 植物的 pH 值明显上升至约 pH 值 5.8 (P<0.001)。在真菌定殖的植物中，盐处理也引起 pH 升高，导致根表面的 pH 值约为 5.4，类似于 NM 对照根的 pH 值 (图 1b, 图 2b)。盐诱导植物根系 pH 值的增加是由于根表面 H<sup>+</sup> 外排速率下降。无论对照条件如何，或短期或长期盐胁迫，NAU 的表面 pH 值与 MAJ 定殖的根的表面 pH 值没有差别 (图 1b)。

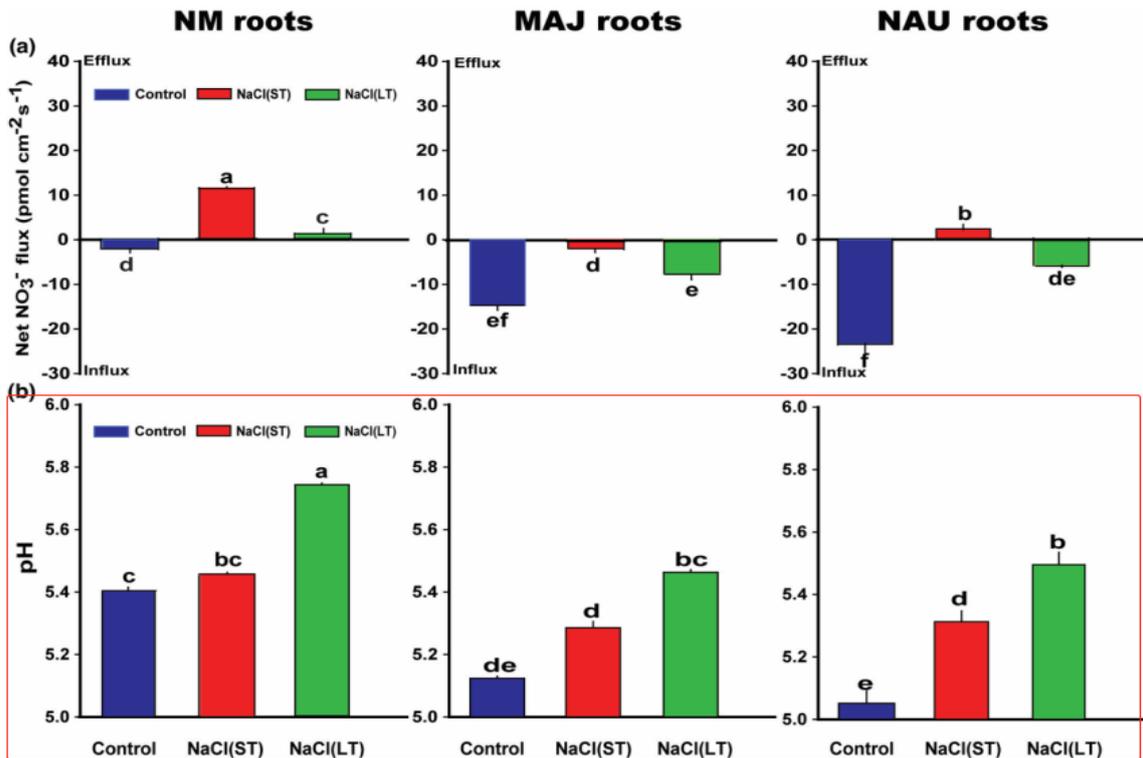


图 1. NaCl 对有无菌株定殖的银灰杨根表面的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 流速和 pH 值的影响。  
正值代表 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 外排，负值代表 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 吸收。

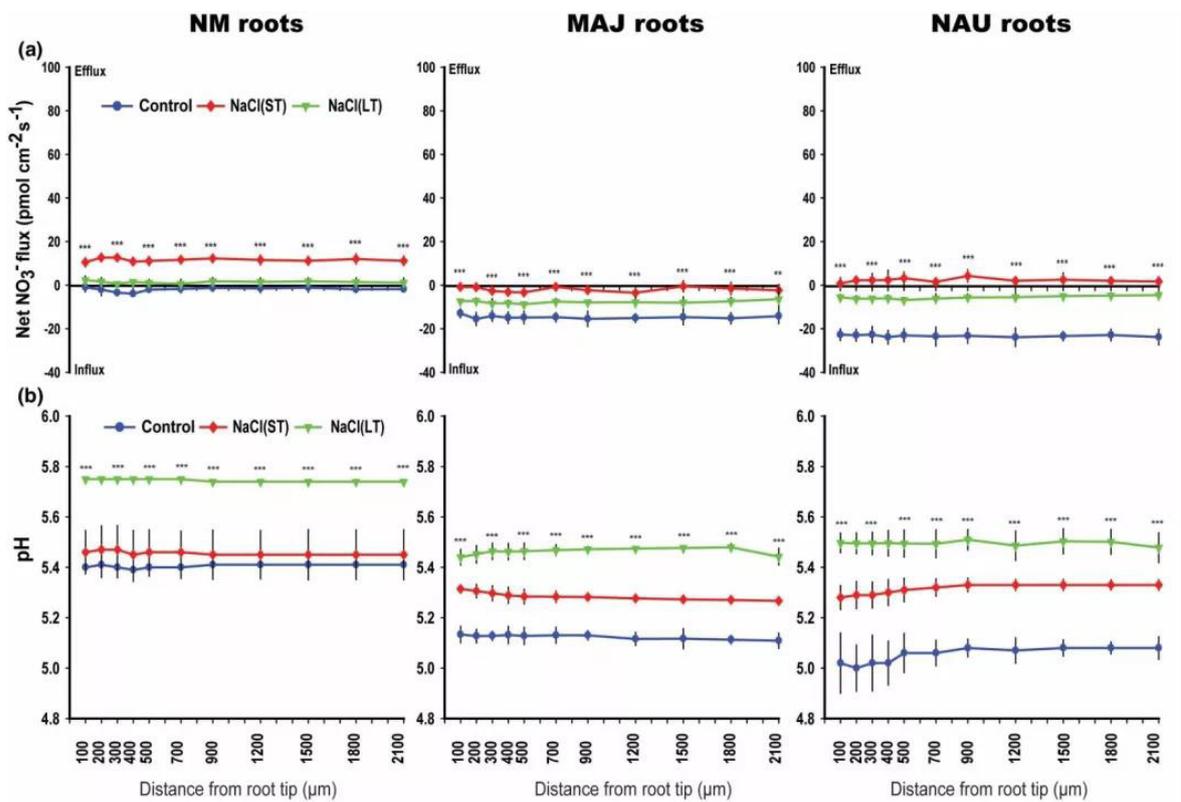


图 2. NaCl 对有无菌根接种的杨树 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 稳态流速和根表 pH 的影响。  
正值代表 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 外排，负值代表 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 吸收。

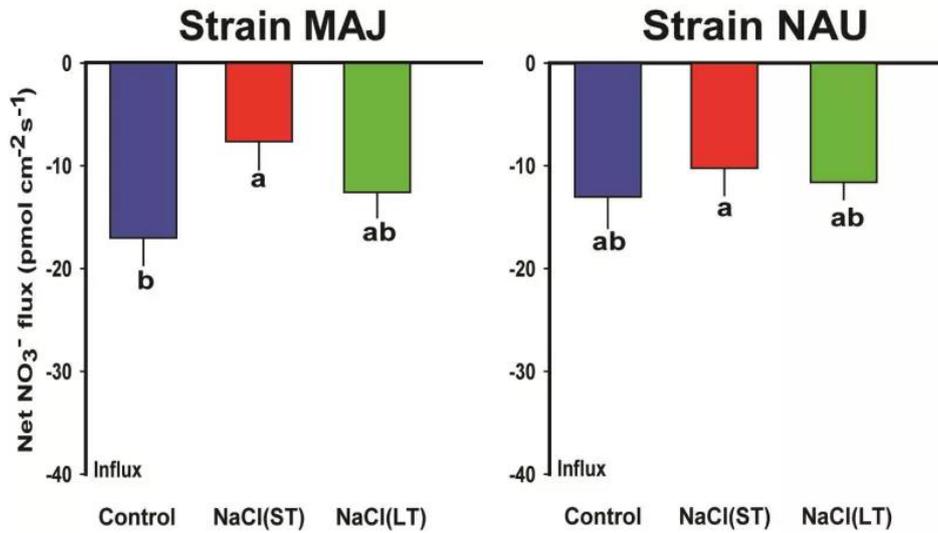


图 3. NaCl 对 MAJ 和 NAU 菌株 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 稳态流速影响。  
正值代表 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 外排，负值代表 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 吸收。

为了监测 H<sup>+</sup> 梯度对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 吸收的重要性，用原钒酸盐 (orthovanadate, 质膜 H<sup>+</sup>-ATPase 抑制剂) 抑制 H<sup>+</sup>-ATPase。抑制剂显著提高了 NM 和真菌定殖根表面的 pH 值 (图 4b, 图 5b)，表明 H<sup>+</sup> 泵被有效抑制。

H<sup>+</sup> 流速检测结果证实，在对照和盐胁迫下，原钒酸盐抑制剂使净 H<sup>+</sup> 外排转向内流 (图 6)。无论是否存在真菌定殖或盐胁迫，都会导致 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 释放 (图 4a, 图 5a)。

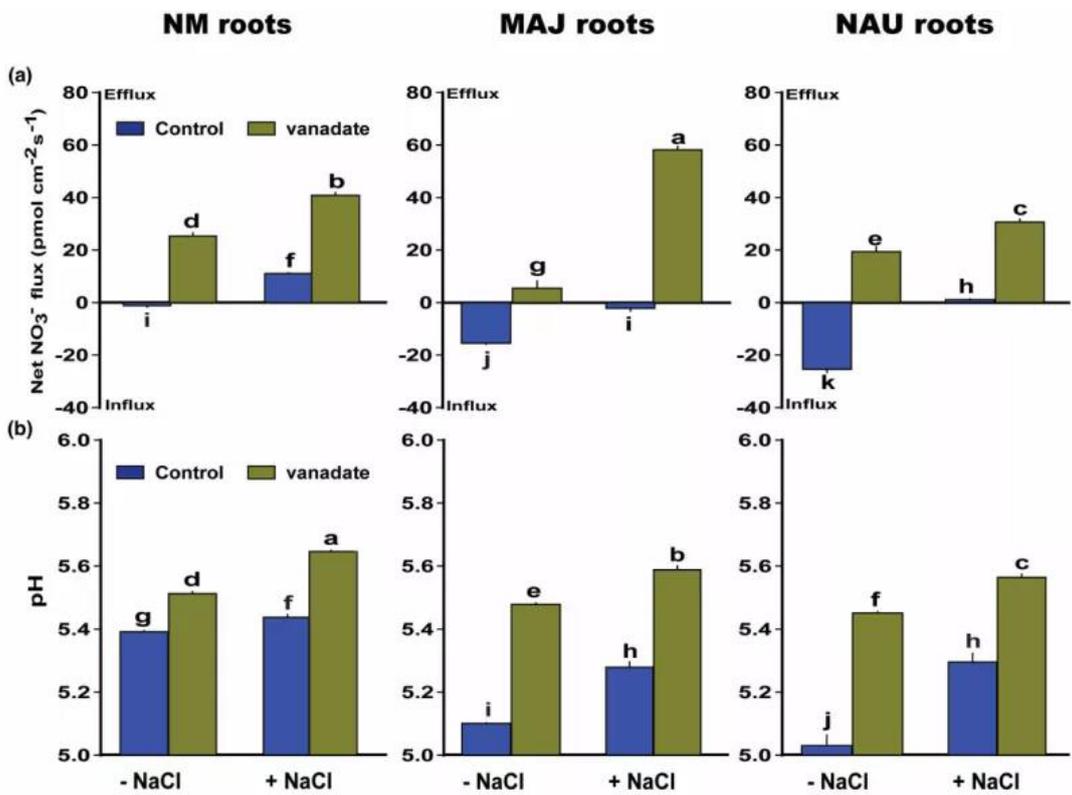


图 4. 在有无菌根定殖和有无 NaCl 的情况下，原钒酸盐对银灰杨根表面 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 流速和 pH 的影响。  
正值代表 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 外排，负值代表 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 吸收。

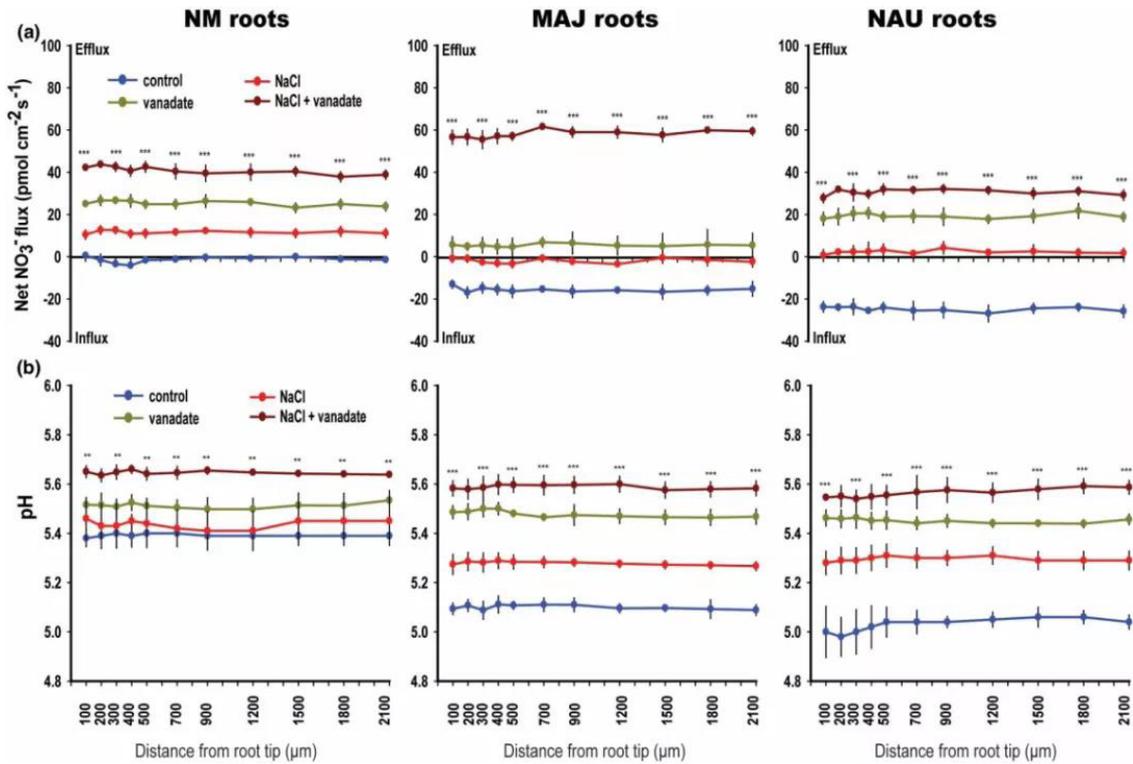


图 5. 原钒酸盐对 NaCl 胁迫下有无菌根接种的杨树 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 稳态流速和根表 pH 的影响。  
正值代表 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 外排，负值代表 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 吸收。

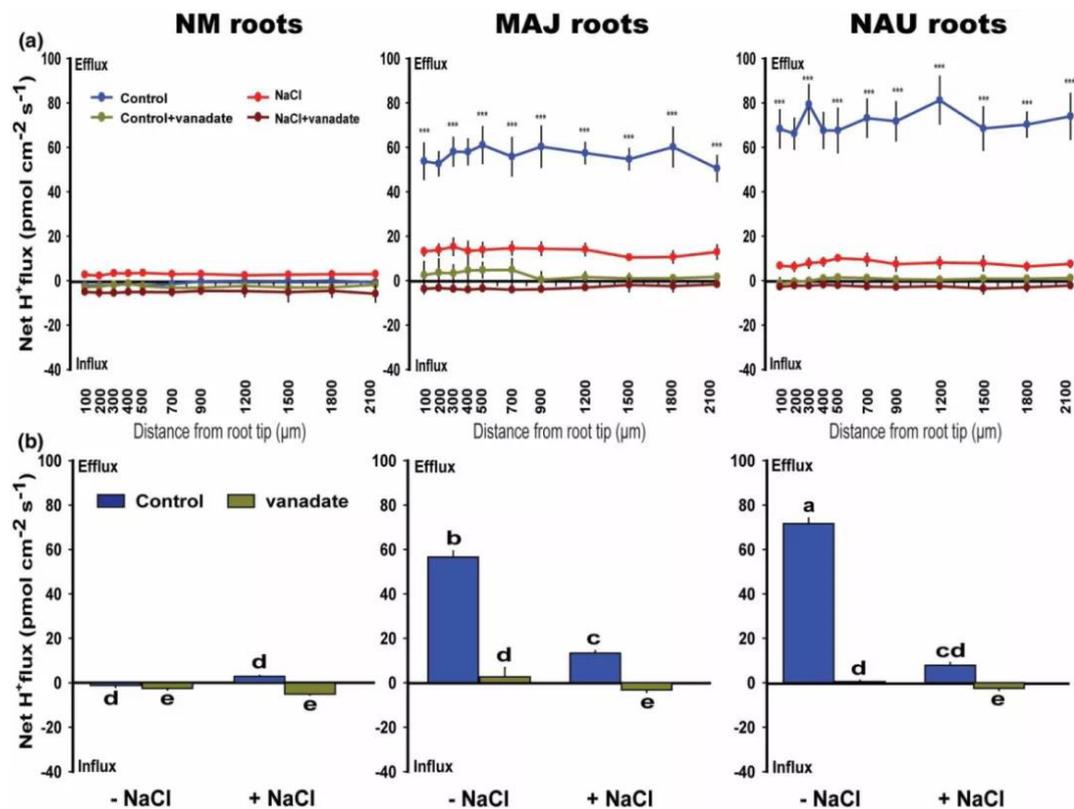


图 6. 原钒酸盐对 NaCl 胁迫下有无菌根接种的杨树 H<sup>+</sup> 稳态流速的影响。  
正值代表 H<sup>+</sup> 外排，负值代表 H<sup>+</sup> 吸收。

## 2. 离子 / 分子流实验处理方法

将银灰杨的根分别在有无 *P. involutus* 菌株 (MAJ 和 NAU) 的情况下接种 30 d, 然后再用 0 或 100 mM NaCl 处理 24 h (短期, ST) 或 7 d (长期, LT)。

## 3. 其他实验结果

1) 与 NM 杨树相比, MAJ 或 NAU 定殖的杨树根和茎中 15N 的富集度更高。

2) 真菌定殖和盐胁迫改变了杨树根系中低亲和力和高亲和力硝酸盐转运蛋白 (NRTs) 的转录水平。

3) 长期盐胁迫下, NR 和 NiR 的活性呈下降趋势。

4) 尽管盐诱导的 *PcHA4* 转录水平有所下降, 但在盐胁迫下, 真菌定殖的 *PcHA4* 转录水平仍高于 NM 根系。

5) 与 NM 相比, *P. involutus* 定殖的根表现出更高的质膜超极化。

6) MAJ 定殖的根在距顶端 500~900  $\mu\text{m}$  处表现出更高的  $\text{O}_2$  吸收率。

## 4. 结论

本研究证明了外生菌根真菌 *P. involutus* 定殖的杨树根系对  $\text{NO}_3^-$  的净吸收增强, 并且几种 NRTs 和 HAs 的表达增加。无哈蒂氏网的 *P. involutus* 菌株 NAU 引起  $\text{NO}_3^-$  净流速增加, NRT 和 HA 转录水平增加, 类似于用 MAJ 定殖形成典型的外菌根结构的根。

研究认为真菌对增强  $\text{NO}_3^-$  运输能力的有益影响被盐胁迫所否定。不过, 由于真菌定殖的根表面酸度高于 NM 根的表面酸度, 因此 *Paxillus* 菌株 MAJ 和 NAU 维持了盐胁迫下根  $\text{NO}_3^-$  的稳态。盐胁迫诱导 NM 根系  $\text{NO}_3^-$  外排受到菌根激活的  $\text{H}^+$ -ATPases 的抑制, 明显地在质膜上形成了足以使  $\text{NO}_3^-$  保留的  $\text{H}^+$  梯度。而菌根真菌是如何影响  $\text{H}^+$  泵活性以及宿主 *PcNRT* 和 *PcHAs* 转录调控的, 在未来需要继续研究, 同时对于科研学者们来说这也是一次创新机遇。总体而言, 本研究的结果为菌根共生体在养分吸收和胁迫改善方面的功能提供了新的见解。

(责任编辑: 李雪霏)