

云南松根际与非根际磷酸酶活性与磷的有效性

沈有信^{1,2}, 周文君¹, 刘文耀¹, 戴开结^{1,3}

1. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 中南林学院, 湖南 长沙 410004

摘要:通过对采集自滇中红壤区域的不同林龄云南松的根际与非根际土,以及不同磷补充量下根袋法培养的距云南松幼苗不同距离土壤的磷酸酶和有效磷的测定,探讨了根际与非根际土的磷酸酶变化及其与有效磷之间的关系。云南松根际及非根际都含有大量的磷酸酶,且这些磷酸酶的活性在根际土中较高。酸性磷酸酶是云南松土壤中的主要酶类,中性磷酸酶次之。培养实验结果显示,无论是根际土、近根际土还是远根际土,外界补充的磷量越低,其酸性和中性磷酸酶的活性越高,反映出磷饥饿对磷酸酶的诱导。但磷酸酶的变化同土壤有效磷的相关性不显著。因而酶数量增加不是云南松对磷饥饿的唯一适应性机制,它的变化或许只是磷胁迫下的一种症状。

关键词: 云南松; 磷酸酶; 有效磷; 根际与非根际土

中图分类号: S154.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-2175 (2005) 01-0091-04

土壤中的磷可分为无机磷和有机磷两大类。植物虽能吸收少部分的有机磷^[1],但大部分有机磷必须经过酶转化成无机磷后才能被吸收利用^[2,3]。磷酸酶主要来源于植物根系和土壤微生物的分泌物,对土壤中有机磷的水解有重要贡献,其活性的高低甚至可以作为诊断植株磷素丰缺的指标^[4,5]。磷在土壤中的移动性很小且极易被固定,植物一般仅能吸收距根表面1-4 mm根际土壤中的磷^[6],植物通过一系列的生理生化过程不断改善根际的磷素营养状况,在多种植物根际已经发现磷酸酶数量的增加^[7~10],植物在感受磷饥饿时能刺激磷酸酶的产生^[11]。

云南松 (*Pinus yunnanensis*) 是云贵高原广泛分布的主要针叶用材树种和荒山造林的先锋树种,其占云南省总林地面积的52%左右,其木材蓄积量占有林蓄积的32%左右^[12]。目前,随着国家实施天然林保护与退耕还林工程,云南松林的分布面积将更加扩大,云南松林保护与培育研究成为云贵高原森林资源经营管理及其可持续发展的重要任务之一^[13]。红壤是云南松自然分布区的主要土壤类型,但其土壤中有效磷含量很低^[14]。研究云南松酶的变化及其与磷有效性之间的关系对揭示其在该种低磷土壤上的适应机制具有重要意义,但至少少见有关其酶研究的报道。本文在野外和室内培养实验的基础上,探讨了云南松在低磷环境下的根际与非根际土磷酸酶变化及其与磷有效性之间的关系。

1 研究方法

1.1 土样采集

在云南中部的通海县秀山森林公园内

(24°8′~24°12′N, 102°43′~102°49′E), 用生长锥取心木确定树木的年龄后,选取同一等高线坡位(2000 m, NW)的115年、65年、45年、25年林龄的云南松林样地。每样地内以S布点法选取有代表性的样树3棵,每树下按不同方向设3个取样点,选取样点的同时尽量避免其它植物的干扰。先用铁铲除去枯枝落叶层,然后用铁镐和铁锹小心沿树干基部开始挖去上层覆土,逐段逐层地沿侧根生长方向追踪,找到须根部分,剪下分枝,小心将须根部分带土取出,用小刀将距根2 mm以上的土壤轻轻剥离作为非根际土收集,抖落其余土壤作为根际土并用小毛刷将不能抖落的沾附在根上的土轻轻刷下一并装入土袋^[9]。每棵样树的3个取样点的土壤样作为1个混合样,将混合样带回实验室处理。同时每个样地内取0~20 cm土层土壤作常规土壤分析。该区属中亚热带高原季风气候,年平均温度15.6℃,年均降水量869.5 mm,5月~10月为雨季,从11月到次年4月为旱季。海拔范围1990~2050 m,土壤类型为红壤。

1.2 培养实验

在上述野外样地内采集心土层土壤,带回实验室后磨细过60目筛,混入百菌清(1:500倍)后密封放置2 d,开封15 d后使用。此土壤有机质(C)质量分数0.302%, pH 4.0, 全N质量分数0.036%, 全P质量分数0.013%, 有效N质量分数50.1 mg/kg, 有效P质量分数0.3 mg/kg。为研究不同磷状况下酶的变化,分别设计了无磷(OP)、低磷(LP, 83.5 mg/kg)、正常磷(MP, 176 mg/kg)3种磷水平处理,

基金项目: 云南省自然科学基金项目(2002c0069 m); 中国科学院“百人计划”项目

作者简介: 沈有信(1966-), 男, 助理研究员, 硕士, 主要从事植物营养与生态系统修复研究。E-mail: yxshen@xtbg.ac.cn

收稿日期: 2004-08-27

保持每处理的 N (166 mg/kg) 和 K (150 mg/kg) 的数量于正常水平^[15]。称取百菌清处理后的土壤 1 200 g 混入相应肥料处理后, 取 100 g 装入根袋, 将根袋置入塑料盆内, 填入其余土壤并使根袋内的土壤与外面土壤持平。取露白云南松种子 25 粒播入根袋中, 用纯水保持土壤湿润。每种处理 6 个重复。于播种 90 d 和 180 d 后各取 3 组重复采集土样。取样时将根袋内的土壤仔细弃根后作为根际土, 距离根袋 2 cm 范围内的土壤为近根际土, 5 cm 以后的土壤为远根际土。鲜土做土壤磷酸酶分析后风干, 用来测定有效磷含量。在采集土壤的同时, 将各处理的松苗取出, 洗净后测定生物量和磷含量。

1.3 分析测试

1) 磷酸酶活性的测定: 用改进的 Hoffman 法^[16]测定, 称取鲜土样 5.00 g, 加入 0.8 mL 甲苯处理, 然后加入相对应的缓冲液(碱性磷酸酶用 pH=10.0 的硼酸盐缓冲液; 中性磷酸酶用 pH=7.0 的柠檬酸缓冲液, 酸性磷酸酶用 pH=5.0 的醋酸盐缓冲液)与基质在 37 °C 恒温箱中培养 12 h 后, 过滤, 分取 1 mL 于 100 mL 容量瓶中显色, 并用 722—S 分光光度计于 570 nm 处比色。以每 1 kg 土壤中的磷酸酶所能氧化的酚的 mg 数表示土壤中的酶活性。

2) 全磷: 酸溶—钼锑抗比色法;

3) 有效磷: Bray 法, 0.03 mol/L NH₄F-0.025N HCL 浸提, 钼锑抗比色法;

4) pH 值: 1 mol/L KCl 浸提(土 水质量比=1:2.5), 电极法测定。

2 结果与分析

2.1 不同林龄云南松根际土与非根际土酶活性与有效磷

云南松根际土和非根际土中都含有大量的磷酸酶(表 1)。从表 1 可看出, 无论是根际土还是非

根际土, 酸性磷酸酶的活性略高于中性磷酸酶, 但远高于碱性磷酸酶。根际土的磷酸酶活性高于非根际土, 通过成对样本 T 检验表明, 酸性($t=5.082^{**}$, $t_{0.01}=3.11$, $n=12$)、中性($t=5.750^{**}$, $t_{0.01}=3.11$, $n=12$)、碱性($t=3.813^{**}$, $t_{0.01}=3.11$, $n=12$)磷酸酶在根际和非根际土中的活性差异都达极显著水平。不同林龄之间, 根际和非根际土的各种磷酸酶活性差异无明显规律。由平均值看, 根际土的酸性磷酸酶活性是非根际土的 1.7 倍, 根际土的中性磷酸酶活性是非根际土的 1.5 倍, 根际土的碱性磷酸酶活性是非根际土的 2.3 倍, 根际土的总磷酸酶活性是非根际土的 1.7 倍。无论是根际土还是非根际土, 有效磷的质量分数都很低。根际土壤有效磷质量分数高于非根际土, 经成对样本 t 检验, 这种差异达到极显著($t=4.421^{**}$, $t_{0.01}=2.2$, $n=12$)水平。不同林龄间的根际土($P=0.256$)及非根际土($P=0.022$)有效磷质量分数之间的差异不显著, 但各年龄段的云南松根际土和非根际土有效磷的质量分数差异明显随林龄的增大而减小, 25 年, 45 年, 65 年和 115 年林龄的根际土与非根际土有效磷质量分数平均值的差异分别达 183.16%, 123.46%, 102.48%, 34.25%。无论是根际还是非根际, 有效磷的质量分数与酸性($r_{\text{根际}}=0.503$, $r_{\text{非根际}}=0.139$, $r_{0.05}=0.532$, $n=12$)、中性($r_{\text{根际}}=0.314$, $r_{\text{非根际}}=0.192$, $n=12$)、碱性磷酸酶活性($r_{\text{根际}}=0.229$, $r_{\text{非根际}}=0.564$, $n=12$)和总酶($r_{\text{根际}}=0.233$, $r_{\text{非根际}}=0.214$, $n=12$)间的相关性不显著。

2.2 不同供磷状况下根系周围酶活性与磷有效性

实验室条件下给予不同磷供应后进行为期 3 个月和 6 个月的云南松幼苗培养试验, 土壤中均未检测出碱性磷酸酶, 而酸性和中性磷酸酶的活性在由根际到远根际间呈现出明显的梯度降低(表 2), 其中根际土的酸性磷酸酶活性是远根际土的 1.3-3.1

表 1 不同年龄云南松根际土和非根际土有效磷及磷酸酶活性

Table 1 Available P and Phosphatase activity in the rhizosphere and the non-rhizosphere of <i>Pinus yunnanensis</i>											w(酚)/(mg·kg ⁻¹)	
年龄/a	pH		w(有效 P)/(mg·kg ⁻¹)		酸性磷酸酶		中性磷酸酶		碱性磷酸酶		总磷酸酶	
	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR
115	3.56	3.71	1.96	1.46	162.23	88.56	161.91	102.30	16.28	7.05	340.42	197.91
65	3.56	3.65	1.14	0.56	183.85	104.74	179.15	118.23	38.62	19.76	401.62	242.73
45	3.62	3.68	2.46	1.10	162.58	142.69	164.47	135.30	35.17	24.64	363.22	302.63
25	3.65	3.77	3.19	1.13	187.05	85.02	178.61	92.32	44.99	12.18	410.65	189.52
T 检验(n=12)	5.887**		4.421**		5.082**		5.750**		3.813**		5.615**	
以每 kg 土壤中的磷酸酶所能氧化的酚的 mg 数表示土壤中的酶活性。R：根际 rhizosphere。NR：非根际 non-rhizosphere												

倍, 平均为 2.0 倍; 近根际土是远根际土的 0.8~1.5 倍, 平均为 1.1 倍; 根际土的中性磷酸酶活性是远根际土的 1.2~2.4 倍, 平均为 1.7 倍, 近根际土是远

根际土的 0.3~1.1 倍, 平均为 0.9 倍。在有外界磷源补充后, 在距根的所有距离范围内的酸性和中性磷酸酶活性都有较大比例的下降, 且补充的磷越多,

表 2 不同磷源供应下距云南松幼苗不同距离土壤的磷酸酶活性与磷有效性

Table 2 Phosphatase and phosphorus in different soil areas from seedling roots of *Pinus yunnanensis* under different phosphorus supplies w(酚)/(mg·kg⁻¹)

项目	土样	培养 3 月			培养 6 月		
		OP	LP	MP	OP	LP	MP
酸性磷酸酶	R	261.2	234.7	179.9	267.1	226.3	185.5
	NR	211.8	119.3	83.2	204.0	111.3	92.7
	Bulk	204.2	96.3	92.6	178.0	148.4	56.8
中性磷酸酶	R	206.4	180.2	142.3	66.8	89.0	81.6
	NR	131.3	80.9	66.6	63.1	63.1	18.6
	Bulk	156.4	75.4	71.5	59.4	51.9	50.1
有效磷	R	0.26	3.10	2.10	0.41	1.26	2.49
	NR	0.26	1.40	2.68	0.26	0.91	5.33
	Bulk	0.91	2.18	5.60	0.37	2.26	5.02
pH	R	4.37	4.35	4.28	4.4	4.48	4.44
	NR	4.38	4.35	4.36	4.54	4.46	4.44
	Bulk	4.41	4.35	4.39	4.61	4.49	4.49
生物量/(g·盆 ⁻¹)		1.56	1.16	1.35	1.49	1.95	2.93
植株含磷量/%		0.236	0.231	0.252	0.104	0.113	0.107

R: 根际土。NR :近根际土(距根袋 2 cm 范围内土壤)。Bulk: 远根际土(距根袋 5 cm 以上的土壤)。OP: 无磷供给。LP: 低磷供给(83.5 mg/kg); 正常磷供给(176 mg/kg)

酶的绝对数量越低。反过来看，补充磷量的降低即磷饥饿能刺激磷酸酶数量的增加。培养 6 个月后，根际土、近根际土和远根际土的各种酶活性较培养 3 个月时都呈下降趋势，中性磷酸酶表现更为明显。在未施磷时，有效磷质量分数在根际及非根际都很低，随着磷的补充，有效磷质量分数也在增加，统计检验表明，各施磷处理间有效磷质量分数的差异达到极显著水平 ($p<0.001$)。虽然根际及根际周围的有效磷质量分数低于远根际土，但这种差异未达到显著水平 ($P=0.08$)。根际或非根际酶活性的增加，并未导致有效磷质量分数的增加。但磷源的补充以及由此引发的有效性磷质量分数的增加直接导致了云南松生物量的差异，无磷处理时，6 个月的生物量仅较 3 个月处理的略有增加，但正常磷处理状况下，这种生物量的增加是成倍的，相反植株体内的磷质量分数则成倍下降。

3 讨论

磷酸酶是有机磷转化的关键性酶^[2]。在云南松森林和室内的培养实验都表明，云南松根际及其周围都含有大量的磷酸酶(表 1 和表 2)，且这些磷酸酶的活性在根际土中较高。野外林地内的根际土的酸性磷酸酶、中性磷酸酶、碱性磷酸酶、总磷酸酶活性平均为非根际土的 1.7 倍、1.5 倍、2.3 倍、1.7 倍。培养实验条件下根际土的酸性磷酸酶活性平均是远根际土的 2.0 倍；而根际土的中性磷酸酶活性是远根际土的 1.7 倍。在其它物种中也发现这种趋势，如玉米^[8,11]，杉木^[17]，radiata pine (*Pinus radiata*)^[9]。Radersma 和 Grierson^[10] 对热带混农林

系统中的玉米及 4 个混生树种 (*Grevillea robusta*, *Cassia spectabilis*, *Tithonia diversifolia*, *Eucalyptus grandis*) 的根际与非根际土的酸性磷酸酶的测定表明，根际土的磷酸酶活性是非根际土的 2~5 倍，比本研究中云南松差异值大，这可能与不同地区的土壤理化性状、不同种类植物的生理生态学特性等有关。

培养实验结果显示，无论是根际土、近根际土还是远根际土，外界补充的磷量越低，其酸性和中性磷酸酶的活性越高(表 2)，表明有效磷的供应状态对酶的数量有重要影响作用，也即根和土壤微生物在受到磷饥饿刺激时能增加酶的数量，而这种增加在根际范围更为明显。但这种增加与土壤有效磷之间没有显著相关关系，酶量高时甚至有效磷含量很低(表 2)。林地内的根际土与非根际土的酶活性与有效磷质量分数之间也无显著相关关系，因而根际与非根际之间的磷酸酶增量和缺磷导致的磷酸酶增量不足以反映云南松根际及非根际土壤有效磷的变化，也即磷酸酶的变化同土壤磷活化的相关性不显著。这样的结论与其它植物的研究结果一致^[7, 10, 17]。酶与有效磷之间的这种低相关性可能与红壤中较低的有机磷成分有关，无机磷成分在红壤中占有绝对的优势^[16]，磷饥饿状况下云南松根际酶量的增加所导致的有机磷的水解量有限；而另一方面植物在磷饥饿时通过增加有机酸分泌量和 H⁺ 离子释放量等其它机制所活化的土壤无机磷成分较多^[10, 18]。因而酶数量增加不是云南松对磷饥饿的唯一适应性机制，它的变化或许只是磷胁迫下的一

种症状。

参考文献：

- [1] ISLAM A, MANDAL R, OSMAN K T. Direct absorption of organic phosphate by rice and jute plants[J]. *Plant and Soil*, 1979, 53: 49-54.
- [2] PANT H K, WARMAN P R. Enzymatic hydrolysis of soil organic phosphorus by immobilized phosphatases[J]. *Biology and Fertility of Soil*, 2000, 30:306-311.
- [3] GYANESHWAR P, KUMAR G N, PAREKH L J, et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants[J]. *Plant and soil*, 2002, 245(1):83-93.
- [4] 刘芷宇. 植物的磷素营养和土壤磷的生物有效性[J]. *土壤*, 1992, 24(2): 97-101.
LIU Z Y. Plant phosphorus nutrition and its soil biological availability[J]. *Soil*, 1992, 24(2): 97-101.
- [5] STADON W J, DUCHESNE L C, TREVORS J T. Acid phosphatase, alkaline phosphatase and arylsulfatase activities in soils from a jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) ecosystem after clear-cutting, prescribed burning, and scarification[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1998, 27:1-4.
- [6] 李庆逵. 现代磷肥的研究进展[J]. *土壤学进展*, 1986(2): 1-7.
LI Q K. Research progress on phosphorous fertilizer[J]. *Progress in Soil Science*, 1986(2):1-7.
- [7] TARAFDER J C. Phosphatase activity in the rhizospheres and its relation to the depletion of soil organic phosphorus[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1987, 3:199-204.
- [8] KANDELER E, MARSCHNER P, TSCHERKO D, et al. Microbial community composition and functional diversity in the rhizosphere of maize[J]. *Plant and Soil*, 2002, 238(2): 301-312.
- [9] SCOTT J T, CONDRON L M. Dynamics and availability of phosphorus in the rhizosphere of a temperate silvopastoral system[J]. *Biology and Fertility of Soil*, 2003, 39:65-73.
- [10] RADERSMA S, GRIERSON P F. Phosphorus mobilization in agroforestry: Organic anions, phosphatase activity and phosphorus fractions in the rhizosphere[J]. *Plant and Soil*, 2004, 259(1-2): 209-219.
- [11] YUN S J. Induction of maize acid phosphatase activities under phosphorus starvation[J]. *Plant and Soil*, 2001, 237(1): 109-115.
- [12] 薛纪如, 姜汉桥. 云南森林[M]. 昆明: 云南科技出版社. 1988.
XUE J R, JIANG H Q. *Forests of Yunnan*[M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press. 1986.
- [13] 周蛟, 张兆国, 伍昌盛, 等. 云南松母树林施肥方式研究[J]. *西南林学院学报*, 2000, 20(3): 132-138.
ZHOU J, ZHANG Z G, WU C S, et al. Research on applying fertilizer of *Pinus yunnanensis* seed tree forests[J]. *Journal of Southwest Forest College*, 2000, 20(3):132-138.
- [14] 吴征镒. 云南植被[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
WU Z Y. *Vegetation of Yunnan* [M]. Beijing: Science Press. 1987.
- [15] 刘芷宇, 李良谟, 施卫明. 根际研究法[M]. 南京: 江苏科技出版社, 1992.
LIU Z Y, LI L M, SHI W M. *Research methods in rhizosphere*[M]. Nanjing: Jiangsu Science and technology Press. 1992.
- [16] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社. 1986.
GUAN S Y. *Soil Enzyme and its research methods*[M]. Beijing: Agriculture Press. 1986.
- [17] 陈弘俊, 李传涵. 杉木根际与非根际土壤酶活性比较[J]. *林业科学*, 1994, 30(2):170-175.
CHEN H J, LI C H. Comparison in enzyme activities between the soils in rhizosphere and non-rhizosphere[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 1994, 30(2):170-175.
- [18] HINSINGER P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review[J]. *Plant and soil*, 2001, 237(2): 173-195.

Soil phosphatase and P availability in rhizosphere and non-rhizosphere of *Pinus yunnanensis*

SHEN You-xin^{1, 2}, ZHOU Wen-jun¹, LIU Wen-yao¹, DAI Kai-jie^{1, 3}

1. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;

3. Central South Forestry University, Changsha 410004, China

Abstract: Soil phosphatase and available P of the rhizosphere and non-rhizosphere of *Pinus yunnanensis* with different ages in central part of Yunnan Province, and of different distance from *P. yunnanensis* seedlings under different P supply at the laboratory had been studied. There were large quantity of phosphatase distributed at the rhizosphere and non-rhizosphere of *P. yunnanensis*, among which acid phosphatase was the major one and followed by alkaline phosphatase. Result from the implantation of seedlings showed that, anywhere of the distance from the seedling roots, the less the supply of P, the higher the amount of acid and alkaline phosphatase, which implied that phosphatase can be induced by P starvation. The relationship between changes of phosphatase and changes of available P was not significant. So the increase of phosphatase was not a unique adoption mechanisms of *P. yunnanensis* under P starvation, it may be a symptom only.

Kew words: *P. yunnanensis*; Phosphatase; Available P; Rhizosphere and non-rhizosphere