

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (6) :788 – 794; 4 June 2015  
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140461

## 磷与信号抑制剂对外生菌根真菌分泌草酸的调控作用

杨红军, 李勇, 黄建国\*

西南大学资源环境学院, 重庆 400715

**摘要:**【目的】磷是树木生长的必需营养元素之一, 磷素营养丰缺条件下, 研究外生菌根真菌的草酸分泌及调控有益于揭示它们活化利用土壤无机磷的机理。【方法】试验设置低、正常、高 3 种不同磷浓度, 液体培养外生菌根真菌, 研究了磷和  $\text{Ca}^{2+}$  信号/阴离子通道抑制剂对草酸分泌的调控作用。【结果】外生菌根真菌能分泌大量的氢离子和草酸、乙酸、苹果酸、柠檬酸和丁二酸等多种有机酸, 对溶解难溶性无机磷有重要作用。在外生菌根真菌分泌的有机酸中, 草酸占 15.14% – 36.01%; 低磷促进草酸分泌, 正常和高磷则产生抑制作用; 培养液磷浓度和菌丝含磷量分别与供试菌种的草酸分泌速率呈显著或极显著负相关, 相关系数依次为  $r = -0.264^*$  和  $r = -0.349^{**}$ ,  $n = 60$ , \* 表示显著 ( $P \leq 0.05$ ), \*\* 表示极显著 ( $P \leq 0.01$ ), 说明磷能调控外生菌根真菌分泌草酸。在低磷胁迫下, 钙调蛋白抑制剂、 $\text{Ca}^{2+}$  通道抑制剂、 $\text{Ca}^{2+}$  内膜通道抑制剂和阴离子通道抑制剂显著抑制外生菌根真菌分泌草酸。但是, 在正常和高磷条件下, 草酸分泌速率低, 未响应  $\text{Ca}^{2+}$  信号/阴离子通道抑制剂。【结论】供试外生菌根真菌能分泌大量的氢离子和有机酸 (尤其是草酸), 有益于溶解土壤无机磷, 改善寄主植物的磷营养; 供磷水平调控草酸分泌速率; 在低磷胁迫下,  $\text{Ca}^{2+}$  信号是介导外生菌根真菌分泌草酸的信号因子。

**关键词:** 外生菌根真菌, 磷,  $\text{Ca}^{2+}$  信号, 草酸

**中图分类号:** X172      **文章编号:** 0001-6209 (2015) 06-0788-07

磷是树木生长的必需营养元素之一。在热带和亚热带森林土壤中, 无机磷占土壤总磷量的 50% – 80%, 主要以矿物态磷酸盐形式存在<sup>[1]</sup>, 溶解后才能被树木吸收利用。

外生菌根真菌是森林生态系统的重要成分, 它们与木本植物形成菌根后, 外延菌丝伸入土壤, 扩大养分吸收空间<sup>[2]</sup>。显微观察表明, 外延菌丝能穿透坚硬的岩石和土壤矿物, 形成充满菌丝的微孔, 其顶端的有机酸浓度高达 1000  $\mu\text{mol/L}$ , 它们与矿物中

的铁、铝、钙、镁离子发生络合作用, 导致矿物溶解, 释放磷、钾、钙、镁等矿质元素, 供给寄主植物<sup>[3-5]</sup>。松树和桉树形成外生菌根后, 能有效利用矿物态磷酸盐, 保持正常生长, 而非菌根植物则相反<sup>[6-7]</sup>。利用磷灰石和磷铁矿在培养牛肝菌 (*Boletus* sp.)、松乳菇 (*Lactarius deliciosus*)、彩色豆马勃 (*Pisolithus tinctorius*) 和粘盖牛肝菌 (*Suillus bovinus*) 时, 它们能分泌大量的草酸、乙酸、苹果酸等有机酸, 溶解利用矿物态磷酸盐<sup>[8-11]</sup>。此外, 在豆科植物缺磷时, 分

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (40771112, 41171215); 中央高校基本科研业务费专项资金 (XDJK2014C105); 西南大学博士基金项目 (SWU112083)

\* 通信作者。Tel: +86-23-68251249; E-mail: [huang99@swu.edu.cn](mailto:huang99@swu.edu.cn)

**作者简介:** 杨红军 (1978 年-) 男, 陕西洛南人, 讲师, 博士, 从事农业微生物研究。E-mail: [yanghongjun8@126.com](mailto:yanghongjun8@126.com)

**收稿日期:** 2014-09-28; **修回日期:** 2014-12-15

泌有机酸速率增加,促进矿物风化,反之降低难溶性无机磷的利用<sup>[12-15]</sup>。因此,磷的丰缺状况可能调控外生菌根真菌分泌有机酸,进而影响土壤矿物态磷的活化。

游离  $\text{Ca}^{2+}$  是细胞内重要的第二信使,调控其生命活动。在动、植物体内, $\text{Ca}^{2+}$  信号具有多种生理和生化功能,如参与神经传导、激活或抑制阴/阳离子通道、调节物质吸收与分泌、介导病原菌侵入的抗性和免疫反应等<sup>[16-17]</sup>。在外生菌根真菌细胞内, $\text{Ca}^{2+}$  信号和阴离子通道活性调控钾离子吸收<sup>[18]</sup>。所以,磷、钙信号和阴离子通道也可能调控外生菌根真菌分泌草酸,但目前未见有关报道。为此,试验设置不同的供磷状况,研究了外生菌根真菌的生长和草酸分泌,以及草酸分泌对信号抑制剂的响应。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌种

在预备试验的基础上,选用我国不同生态条件下,具有代表性的外生菌根真菌为供试菌种,包括彩色豆马勃(*Pisolithus tinctorius* Pt 01),从云南省普洱市思茅松林土壤(pH 值 5.77)中分离获得;松乳菇(*Lactarius deliciosus* Ld 01)和双色牛肝菌(*Boletus bicolor* Bo 11),来源于北亚热带重庆市金佛山的马尾松林土壤(pH 值 4.23);粘盖牛肝菌属(*Suillus bovinus* Sb 05)广泛分布于寒温带的油松森林土壤中,采自于内蒙古大青山(pH 6.47)<sup>[19]</sup>,由内蒙古农业大学白淑兰教授捐赠。试验前,将供试菌种接种于 Pachlewski 固体培养基上,25  $\square$ ℃ 暗培养 14 d 备用。

### 1.2 试验设计

在每升 Pachlewski 培养液中加入 0.649 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  代替  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,并分别加入 0.229、1.147、5.736 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  形成低磷、正常供磷和高磷培养液。各取 25 mL 置于 150 mL 三角瓶中,103.4 kPa,121.3℃ 蒸汽灭菌 30 min,冷却后接种一块直径约 6 mm 的固体菌块,25  $\pm$  1℃ 暗培养 21 d。合并菌丝生物量较小的培养瓶,尽量使各瓶菌丝生物量基本一致。然后,每瓶加入 1 mL 0.1 mol/L  $\text{CaCl}_2$  继续培养 24 h,再更换 25 mL 磷浓度不同的相应培养液,并设置如下处理:(1) 150  $\mu\text{mol/L}$  三氟拉嗪(TFP,钙调蛋白抑制剂);(2) 8  $\mu\text{mol/L}$  剂钉红(RR,内膜

钙通道抑制);(3) 150  $\mu\text{mol/L}$  异搏定(VP,钙离子通道抑制剂);(4) 15  $\mu\text{mol/L}$  尼弗灭酸(NIF,阴离子通道抑制剂);(5) 对照(不加任何抑制剂)。由此形成 4 个菌种  $\times$  3 种供磷水平  $\times$  4 种抑制剂的三因素试验,各处理重复 5 次。在 25  $\pm$  1℃ 条件下,暗培养 48 h。

### 1.3 测定项目与方法

过滤收集菌丝,去离子水洗净,80℃ 烘干至恒重,测定生物量;用硫酸-过氧化氢消化菌丝,用钼蓝比色法测定其含磷量<sup>[20]</sup>。收集滤液,用 PHS-3C 精密酸度计测定氢离子( $\text{H}^+$ )浓度,再经 0.1N HCl 酸化后用高效液相色谱仪(日本 HITACHI 公司生产)测定有机酸含量。其色谱条件为:Diode Array L-7455 紫外检测器,检测波长 210 nm;Ion-300 有机酸分析专用柱(Phenomenex, Torrance, CA, USA),柱温 35℃,压力 450 Psi;2.5 mmol/L 硫酸为流动相,流速 0.5 mL/min,进样量 20  $\mu\text{L}$ 。测定的有机酸包括草酸、柠檬酸、苹果酸、丁二酸、乙酸等,其保留时间(min)依次是 9.57、11.52、13.31、15.95、20.72。

### 1.4 数据处理

试验数据用 Excel 整理,SPSS Statistics 17.0 进行 LSD 法多重比较( $P < 0.05$ )和 Pearson 法相关分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌丝生长

外生菌根真菌的生长速率因菌种不同而异。培养 21 d 之后,Ld 01 的生物量最高,为 29.58 mg/flask,Pt 01 和 Sb 05 次之,分别是 17.65 mg/flask 和 15.66 mg/flask,Bo 11 最低,为 7.13 mg/flask。

### 2.2 外生菌根真菌的含磷量

随培养液中的磷浓度提高,供试菌种含磷量显著增加,高浓度比低浓度增加 1.94 - 26.6 倍(图 1)。此外 Bo 11 的含磷量最高,Ld 01、Pt 01 和 Sb 05 之间无显著差异。

### 2.3 外生菌根真菌的有机酸分泌

表 1 可见,在供试菌种的培养液中,均检测出草酸和乙酸;Ld 01 和 Sb 05 的存在乳酸;Bo 11、Pt 01 和 Ld 01 的含有柠檬酸;Bo 11 和 Ld 01 的有丁二酸。其中,Bo 11 培养液的草酸浓度最高,Ld 01 次之,Pt

01 和 *Sb* 05 最低, 高低相差 6.40 倍; 培养液中的乙酸浓度变化于 38.88 – 49.40 mg/L, 菌种间无显著差异。5 种有机酸的总浓 *Bo* 11 和 *Ld* 01 显著高于 *Pt* 01 和 *Sb* 05, 相差 3 倍以上。此外, 草酸占有机酸总浓度的 15.14% – 36.01%。

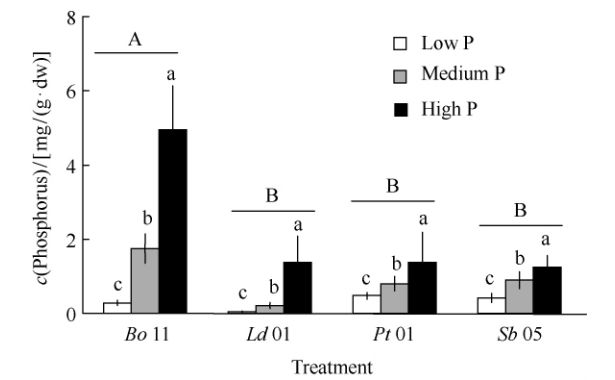


图 1. 外生菌根真菌的含磷量 [mg/(g·dw)]  
Figure 1. Contents of phosphorus in the ectomycorrhizal fungi [mg/(g·dw)].

2.4 外生菌根真菌的 H<sup>+</sup> 分泌

在 *Bo* 11 和 *Ld* 01 的培养液中, H<sup>+</sup> 总浓度显著高于 *Pt* 01 和 *Sb* 05, 相差 1.71 倍。5 种有机酸电离产生的 H<sup>+</sup> 浓度合计为 3.26 × 10<sup>-3</sup> – 5.58 × 10<sup>-2</sup> mg/L, 变化趋势同 H<sup>+</sup> 总浓度, 但仅占 H<sup>+</sup> 总浓度的 1.36% – 8.45% (表 2)。

2.5 磷和钙信号/阴离子通道抑制剂对菌丝分泌草酸的影响

表 3 可见, 供试菌种不同, 分泌草酸的平均速率也不同。其中, *Bo* 11 最高 [4.84 mg/(g·dw·d)], *Ld* 01 次之 [1.02 mg/(g·dw·d)], 而 *Sb* 04 和 *Pt* 01 分泌速率较低, 变化于 0.37 – 0.49 mg/(g·dw·d) 之间, 高低相差 13.08 倍。

供磷水平也显著影响外生菌根真菌分泌草酸。其分泌速率低磷时最高, 正常供磷次之, 高磷最低, 平均值分别为 2.48 mg/(g·dw·d) (低磷)、1.65 mg/(g·dw·d) (正常供磷) 和 0.91 mg/(g·dw·d) (高磷)。

表 1. 培养液中的有机酸浓度 (mg/L)

Table 1. The concentrations of organic acids in the liquid culture mediums (mg/L)						
Strain	Oxalate	Malate	Citricite	Succinate	Acetate	Total
<i>Bo</i> 11	103.78a	ND	42.88a	92.19a	49.40a	288.25a
<i>Ld</i> 01	42.07b	136.92a	30.81ab	19.01b	49.03a	277.84a
<i>Pt</i> 01	21.00c	ND	15.73b	ND	43.43a	80.16b
<i>Sb</i> 05	16.22c	14.91b	ND	ND	38.88a	70.01b

ND means not detected.

表 2. 培养液 H<sup>+</sup> 浓度 (mg/L)

Table 2. The concentrations of protons in the liquid culture mediums (mg/L)				
Strain	<i>Bo</i> 11	<i>Ld</i> 01	<i>Pt</i> 01	<i>Sb</i> 05
Total H <sup>+</sup>	0.66a	0.51a	0.25b	0.24b
H <sup>+</sup> ionized from organic acids	5.58 × 10 <sup>-2</sup> a	3.87 × 10 <sup>-2</sup> a	3.63 × 10 <sup>-3</sup> b	3.26 × 10 <sup>-3</sup> b
Total H <sup>+</sup> to H <sup>+</sup> ionized organic acids (%)	8.45	7.59	1.45	1.36

In each line, the dates followed by different letters means significantly different (P < 0.05).

菌种和供磷条件不同, 钙信号/阴离子通道抑制剂对菌丝分泌草酸速率的影响也不一样。在低磷条件下, 钙信号/阴离子通道抑制剂均显著降低草酸分泌速率。在正常供磷条件下, 钙信号/阴离子通道抑制剂抑制 *Ld* 01 分泌草酸, 但对 *Bo* 11、*Sb* 05 和 *Pt* 01 的草酸分泌速率无显著影响 (VP 对 *Pt* 01 例外)。在高磷条件下, 钙信号/阴离子通道抑制剂对供试菌种分泌草酸无显著影响。

2.6 外生菌根真菌草酸和氢离子分泌速率与磷的相关性

表 4 可见, 培养液磷浓度与菌丝含磷量呈极显著正相关, 与菌丝草酸和氢离子分泌速率显著或极显著负相关, 相关系数依次为 0.457<sup>\*\*</sup>、-0.264<sup>\*</sup> 和 -0.539<sup>\*\*</sup> (n = 60); 菌丝含磷量也与草酸和氢离子分泌速率呈极显著负相关, 相关系数分别为 -0.349<sup>\*\*</sup> 和 -0.378<sup>\*\*</sup> (n = 60)。此外, 草酸与氢离子分泌速率呈极显著正相关 (r = 0.776<sup>\*\*</sup>, n = 60)。

表 3. 磷和信号抑制剂对外生菌根真菌分泌草酸速率的影响

Table 3. Effects of phosphorous and signal inhibitors on oxalate efflux rate of the ectomycorrhizal fungi

P levels	Signal inhibitors	Oxalate efflux rate [mg / (g•dw•d) ]			
		Bo 11	Ld 01	Pt 01	Sb 05
Low P	CK	8. 86a	3. 77a	0. 80a	0. 63a
	RR	5. 28bcd	2. 19c	0. 61bc	0. 45bcd
	TFP	6. 80b	2. 79b	0. 44de	0. 46bcd
	NIF	5. 81bc	1. 52d	0. 54bcd	0. 33def
	VP	5. 60 bed	1. 95cd	0. 47cde	0. 27f
	averages	6. 47	2. 44	0. 57	0. 43
Middle P	CK	5. 28bcd	1. 60d	0. 71ab	0. 53ab
	RR	5. 38 bed	0. 14e	0. 56 bed	0. 44bcd
	TFP	5. 35 bed	0. 19e	0. 54 bed	0. 41bcd
	NIF	5. 29 bed	0. 22e	0. 57 bed	0. 36bede
	VP	4. 59de	0. 14e	0. 39de	0. 37bede
	averages	5. 18	0. 46	0. 55	0. 42
High P	CK	2. 95f	0. 13e	0. 47cde	0. 23f
	RR	2. 37f	0. 19e	0. 41de	0. 32def
	TFP	3. 49ef	0. 22e	0. 31e	0. 25f
	NIF	2. 59f	0. 12e	0. 33e	0. 28ef
	VP	2. 90f	0. 13e	0. 28e	0. 29ef
	averages	2. 86	0. 16	0. 36	0. 27
K Effect		p = 0. 0001 **	p = 0. 0001 **	p = 0. 0001 **	p = 0. 1719ns
Inhibitor Effect		p = 0. 1672ns	p = 0. 0002 **	p = 0. 0002 **	p = 0. 0016 **
K × Inhibitor		p = 0. 0029 **	p = 0. 0001 **	p = 0. 0324 *	p = 0. 0006 **
Effect of strain		p = 0. 0001 **			

The dates followed by different letters means significantly differences ( $P < 0.05$ ). \* Means significant differences ( $P \leq 0.05$ ), \*\* means extremely significant differences ( $P \leq 0.01$ ). ns means not significant differences ( $P > 0.05$ ).

表 4. 培养液磷浓度、含磷量、草酸和氢离子分泌速率之间的相关性

Table 4. Correlation coefficients among concentration of phosphorus in culture media, content of phosphorus in the ectomycorrhizal fungi and efflux ratio of proton and oxalate by the fungi

Correlation coefficients	P in culture media	Fungal P content	Oxalate efflux rate	H <sup>+</sup> efflux rate
P in culture media	1			
Fungal P content	0. 475 **	1		
Oxalate efflux rate	- 0. 264 *	- 0. 349 **	1	
H <sup>+</sup> efflux rate	- 0. 539 **	- 0. 378 **	0. 776 **	1

\*\* means extremely significant differences ( $P \leq 0.01$ ), \* means significant differences ( $P \leq 0.05$ ).

3 讨论

3.1 外生菌根真菌分泌 H<sup>+</sup> 和有机酸的生物学意义

在石灰性土壤中, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> /HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 通过一系列沉淀反应形成氟磷灰石和羟基磷灰石; 在酸性土壤中, 无机磷以铁、铝磷酸盐为主, 如粉红磷铁矿和赤磷矿等, 还存在被水合 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 包裹的磷酸盐矿物, 即蔽蓄态磷 (O-P)。因此, 土壤无机磷绝大部分以矿

物形式存在, 难于被植物吸收利用<sup>[21]</sup>。在供试菌种的培养液中, 有机酸电离产生的 H<sup>+</sup> 仅占 H<sup>+</sup> 总浓度的 1.36% – 8.45%, 说明外生菌根真菌直接分泌了大量的 H<sup>+</sup>。在低磷环境中, 吸磷能力强的豆科植物通过分泌 H<sup>+</sup> 溶解土壤无机磷, 尤其是氟磷灰石和羟基磷灰石等, 提高其生物有效性<sup>[22]</sup>。外生菌根真菌感染树木根系之后, 外延菌丝广泛分布于土壤中, 成为木本植物吸收养分的重要辅助器官。外延菌丝通过分泌 H<sup>+</sup>, 也可能有效活化土壤中的矿物态磷, 供给树木营养<sup>[23 – 24]</sup>。

从供试菌种的培养液中,分别检测到草酸、柠檬酸、苹果酸、丁二酸和乙酸等有机酸,与 Jennifer、Scholl 和 Landeweert 等<sup>[25-27]</sup>的研究结果相似,说明外生菌根真菌能分泌多种有机酸。其中,供试菌种均能分泌草酸和乙酸,且是主要有机酸之一。值得注意的是,草酸属共轭酸,不仅酸性强,而且  $[\text{Al}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]^{3-}$  和  $[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]^{3-}$  的络合常数分别高达  $2.0 \times 10^{-16}$  和  $3.9 \times 10^{-16}$ ,可络合岩石和含磷矿物晶格中的铁、铝离子,使之风化分解,释放钾、磷、钙、镁等营养元素<sup>[28]</sup>。乙酸的分子量小,电离系数大 ( $1.75 \times 10^{-5}$ ),可直接溶解含磷矿物<sup>[18]</sup>。因此,外生菌根真菌分泌的草酸和乙酸有益于活化难溶性无机磷,满足树木营养需要。

### 3.2 磷对外生菌根真菌 $\text{H}^+$ 和有机酸调控作用

随培养液中的磷浓度提高,外生菌根真菌的含磷量增加,但  $\text{H}^+$  和草酸分泌速率降低。培养液磷浓度与供试菌种分泌  $\text{H}^+$  和草酸的速率分别呈显著或极显著负相关,相关系数依次为  $r = 0.264^*$  和  $r = 0.539^{**}$  ( $n = 60$ ); 菌丝含磷量也与之类似 ( $r_{\text{H}^+} = -0.378^{**}$ ,  $r_{\text{草酸}} = -0.349^{**}$ ,  $n = 60$ )。说明在供磷不足和吸收较少的条件下,促进外生菌根真菌分泌  $\text{H}^+$  和草酸,反之亦然。若类似现象发生在森林土壤中,即在缺磷时,外延菌丝含磷量较低,分泌  $\text{H}^+$  和草酸的速率增加,促进含磷矿物溶解,释放磷酸盐,供给吸收;相反,在磷丰富的土壤中,外生菌根真菌分泌  $\text{H}^+$  和草酸的速率降低,减少含磷矿物溶解,避免淋溶损失。因此,磷对外生菌根真菌分泌  $\text{H}^+$  和草酸的调控作用既能改善树木磷素营养,又具减少土壤养分淋失的生理和生态意义。

### 3.3 信号介导对外生菌根真菌分泌草酸的影响

低磷刺激供试菌种分泌草酸,  $\text{Ca}^{2+}$  信号/阴离子通道抑制剂对供试菌种分泌草酸均表现出抑制效应。在研究中,这些钙信号抑制剂在短期内对草酸分泌无抑制现象,随着时间的延长,抑制作用才逐渐显现(表3),说明  $\text{Ca}^{2+}$  信号可能是介导外生菌根真菌分泌草酸的信号因子。因此,推测外生菌根真菌缺磷时,原初信号可能作用于细胞内的第二信使——钙调素(CaM),改变细胞内外的游离  $\text{Ca}^{2+}$  的分布,通过信号传递启动级联反应,促进草酸合成酶基因表达或提高草酸合成酶活性,刺激阴离子通道分泌草酸。相反,在正常供磷时,  $\text{Ca}^{2+}$  信号/阴离子通道抑制剂对 Bo11、Sb 05 和 Pt 01 分泌草酸无显著

影响,仅 Ld 01 可能因草酸分泌速率高,而受到  $\text{Ca}^{2+}$  信号/阴离子通道抑制剂的抑制。在供应高磷时,外生菌根真菌分泌草酸均未响应  $\text{Ca}^{2+}$  信号/阴离子通道抑制剂,说明改善磷素营养抑制草酸合成酶基因表达或相关酶活性,这与铝胁迫下外生菌根真菌分泌草酸的机制相似<sup>[29]</sup>。

## 4 结论

鉴于以上研究,得出如下结论:

(1) 外生菌根真菌可分泌大量氢离子,以及草酸、乙酸、苹果酸、柠檬酸和丁二酸等有机酸,有益于矿物态无机磷释放,改善寄主植物的磷营养。

(2) 外生菌根真菌可分泌草酸,同时受到供磷水平的调控。在森林土壤中,此调控作用具有改善森林磷素营养,防止土壤养分淋失的生理和生态意义。

(3) 低磷胁迫下,  $\text{Ca}^{2+}$  信号是介导外生菌根真菌分泌草酸的信号因子。

## 参考文献

- [1] Marschner H. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2<sup>nd</sup> eds. London: Academic Press, 1995.
- [2] Huang JG, Lapeyrie F. Ability of ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N to increase the growth of Douglas fir seedlings and their phosphorus and potassium uptake. *Pedosphere*, 1996, 6 (3): 217-223.
- [3] Jentschke G, Brandes B, Kuhn AJ, Schröder WH, Douglas L. Interdependence of P, N, K and Mg translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytologist*, 2001, 149 (2): 327-337.
- [4] Hoffland E, Kuyper TW, Wallander H, Plassard C, Gorbushina AA, Haselwandter K, Holmström S, Landeweert Renske, Lundström US, Rosling A, Sen R, Smits MM, van Hees PAW, van Breemen N. The role of fungi in weathering. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2004, 2 (5): 258-264.
- [5] Marie-Pierre T, Claude N, Christophe C. Rhizosphere impact on the dissolution of test minerals in a forest ecosystem. *Geoderma*, 2009, 153 (1-2): 147-154.
- [6] Cairney JWG. Ectomycorrhizal fungi: the symbiotic route to the root for phosphorus in forest soils. *Plant and Soil*, 2011, 344 (1-2): 51-71.
- [7] Plassard C, Dell B. Phosphorus nutrition of mycorrhizal

- trees. Tree Physiology*, 2010, 30 (9) : 1129-1139.
- [8] Plassard C, Fransson P. Regulation of low-molecular weight organic acid production in fungi. *Fungal Biology Reviews*, 2009, 23 (1-2) : 30-39.
- [9] Wei LL, Chen CR, Xu ZH. Citric acid enhances the mobilization of organic phosphorus in subtropical and tropical forest soils. *Biology Fertility Soils*, 2010, 46: 765-769.
- [10] Rosling A. Trees, mycorrhiza and minerals—field relevance of in vitro experiments. *Geomicrobiology Journal*, 2009, 26 (6) : 389-401.
- [11] Xu B, Li B, Qin L, Li X. Solubilization of rock phosphate by different ectomycorrhizal fungi (in solution culture). *Journal of Jilin Agricultural University*, 2000, 22 (4) : 76-80. (in Chinese)
- 徐冰, 李白, 秦岭, 李晓林. 不同外生菌根真菌对难溶性磷的活化. 吉林农业大学学报, 2000, 22 (4) : 76-80.
- [12] Wang S, Han X, Yan J, Li X, Qiao Y. Effects of low molecular weight organic acids on P accumulation in soybean (*Glycinemax* L.) and inorganic P form transformation in soil. *Chinese Journal of Ecology*, 2009, 28 (8) : 1550-1554. (in Chinese)
- 王树起, 韩晓增, 严君, 李晓慧, 乔云发. 低分子量有机酸对大豆磷积累和土壤无机磷形态转化的影响. 生态学杂志, 2009, 28 (8) : 1550-1554.
- [13] Zhao W, Zhang L, Chang Q, Zhang C, Xiong Z. The research progress of organic acids metabolism in leguminous plant under phosphorus deficiency. *Pratacultural Science*, 2011, 28 (6) : 1207-1213. (in Chinese)
- 赵文杰, 张丽静, 畅倩, 张聪颖, 熊忠宽. 低磷胁迫下豆科植物有机酸分泌研究进展. 草业科学, 2011, 28 (6) : 1207-1213.
- [14] Ryan PR, Delhaize E, Jones DL. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2001, 52: 527-560.
- [15] Ryan PR, James RA, Weligama C, Delhaize E, Rattey A, Lewis DC, Bovill D, McDonald G, Rathjen TM, Wang E, Fettell NA, Richardson AE. Can citrate efflux from roots improve phosphorus uptake by plants? Testing the hypothesis with near-isogenic lines of wheat. *Physiologia Plantarum*, 2014, 151 (3) : 230-242.
- [16] Yang TPB. Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends in Plant Science*, 2003, 8 (10) : 505-512.
- [17] Yin Y, Xu B, Luo J, Zhu D, Meng J.  $Ca^{2+}$  signaling pathways associated with the invasion of *streptococcus pneumoniae* to type II pneumocytes. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43 (6) : 788-792. (in Chinese)
- 尹一兵, 徐邦牢, 罗进勇, 朱旦, 孟江萍. 钙信号转导途径介导肺炎链球菌侵袭人肺 II 型上皮细胞. 微生物学报, 2003, 43 (6) : 788-792.
- [18] Yang H, Li Y, Yuan L, Shi A. Regulation of potassium supply and signal inhibitors on acetate effluxes by ectomycorrhizal fungi. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34 (5) : 1126-1133. (in Chinese)
- 杨红军, 李勇, 袁玲, 时安东. 钾和信号抑制剂对外生菌根真菌分泌乙酸的调控作用. 生态学报, 2014, 34 (5) : 1126-1133.
- [19] Bai S, Liu Y, Zhou J, Dong Z, Fan R. Resources investigation and ecological study on ectomycorrhizal fungi in Daqingshan Mountains Inner Mongolia. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26 (3) : 837-841. (in Chinese)
- 白淑兰, 刘勇, 周晶, 董智, 樊荣. 大青山外生菌根真菌资源与生态研究. 生态学报, 2006, 26 (3) : 837-841.
- [20] 杨剑虹, 王成林, 代亨林. 土壤农化分析与环境监测. 北京: 中国大地出版社, 2008.
- [21] Hinsinger P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*, 2001, 237 (2) : 173-195.
- [22] Cheng LY, Bucciarelli B, Shen JB, Allan D, Vance CP. Update on *white lupin* cluster root acclimation to phosphorus deficiency. *Plant Physiology*, 2011, 156 (3) : 1025-1032.
- [23] Sousa NR, Franco AR, Ramos MA, Oliveira RS, Castro PML. Reforestation of burned stands: The effect of ectomycorrhizal fungi on *Pinus pinaster* establishment. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43 (10) : 2115-2120.
- [24] Reis FS, Ferreira ICFR, Martins A. Effect of the mycorrhizal symbiosis time in the antioxidant activity of fungi and *Pinus pinaster* roots, stems and leaves. *Industrial Crops and Products*, 2012, 35 (1) : 211-216.
- [25] Jennifer KM, Lori A, Melanie D. Ectomycorrhizal fungal hyphae communities vary more along a pH and nitrogen gradient than between decayed wood and mineral soil microsites. *Botany*, 2014, 92 (6) : 453-463.
- [26] van Scholl L, Hoffl E, van Breemen N. Organic anion exudation by ectomycorrhizal fungi and *Pinus sylvestris* in response to nutrient deficiencies. *New Phytologist*, 2006,

170 (1) : 153-163.

- [27] Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW, van Breemen N. Linking plants torocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology &Evolution*, 2001, 16 (5) : 248-254.
- [28] Li Q, Huang J. Advance of improvement of potassium nutrition in trees by ectomycorrhizal fungi. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2011, 39 (6) : 107-110. (in Chinese)
- 李倩, 黄建国. 外生菌根真菌改善树木钾素营养的研

究进展. 贵州农业科学, 2011, 39 (6) : 107-110.

- [29] Wang M, Yuan L, Zhou Z, Yang H, Huang J. Efflux of oxalate and uptake of nitrogen, phosphorus and potassium by ectomycorrhizal fungal isolates in vitro in response to aluminum stress. *Scientia Silvae Sinicae*, 2012, 48 (2) : 82-88. (in Chinese)
- 王明霞, 袁玲, 周志峰, 杨红军, 黄建国. 铝对外生菌根真菌草酸分泌及氮磷钾吸收的影响. 林业科学, 2012, 48 (2) : 82-88.

# Effect of phosphorus supply and signal inhibitors on oxalate efflux in ectomycorrhizal fungi

Hongjun Yang, Yong Li, Jianguo Huang<sup>\*</sup>

College of Resources & Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** [Objective] Phosphorous (P) is one of the essential elements for tree growth in forests. It is beneficial to characterize oxalate secretion by ectomycorrhizal fungi in response to P supply for understanding the mechanism of P mobilization in soils. [Method] In the present experiment, the influence of P supplies and inhibitors of  $\text{Ca}^{2+}$  signal / anion channel on oxalate efflux in ectomycorrhizal fungi was studied in the pure liquid culture with various P concentrations. [Results] Ectomycorrhizal fungi released a large amount of  $\text{H}^{+}$  and organic acids such as oxalate, acetate, malate, citrate and succinate, which are important for mobilization of insoluble P in the soils. Oxalate accounted for 15.14% to 36.01% of the total organic acids released by the fungi and was accelerated in culture solution under the condition of low P supply, but inhibited under normal and high P. [Conclusion] Ectomycorrhizal fungi released a large amount of  $\text{H}^{+}$  and organic acids, particularly oxalate, which might be beneficial to inorganic P mobilization in the soils and improvement of P nutrition for their host plants.

**Keywords:** ectomycorrhizal fungi, phosphorus,  $\text{Ca}^{2+}$  signal, oxalate

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (40771112,41171215)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel: +86-23-68251249; E-mail: huang99@swu.edu.cn

Received: 28 September 2014 / Revised: 15 December 2014