

球囊霉素相关土壤蛋白根际环境功能研究进展

黄 艺* 王东伟 蔡佳亮 郑维爽

北京大学环境科学与工程学院, 北京 100871

摘 要 球囊霉素(glomalin)是从枝菌根真菌产生的一种含有金属离子的耐热糖蛋白,能够改善土壤结构,固定土壤中的重金属,近期被更名为球囊霉素相关土壤蛋白(glomalin-related soil protein)。该文从球囊霉素的定义、性质与环境功能等方面对相关文献进行了综述,认为目前对球囊霉素的共识仍停留在理论假设蛋白的程度上,包括:1)该蛋白可能是热激蛋白60 (HSP 60)的同系物;2)该蛋白所携带的阳离子可能随着土壤性质的改变而不同。目前还没有清楚确切地定义球囊霉素的真实分子结构与理化性质。今后需从分子层面对球囊霉素予以深入研究。同时,需要不断改进球囊霉素的提取和测定方法,以便进一步探讨球囊霉素固定重金属离子的机理,提高植物的重金属抗性。

关键词 丛枝菌根真菌,球囊霉素,球囊霉素相关土壤蛋白,重金属

Review of glomalin-related soil protein and its environmental function in the rhizosphere

HUANG Yi*, WANG Dong-Wei, CAI Jia-Liang, and ZHENG Wei-Shuang

College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

Abstract

Glomalin (or glomalin-related soil protein) is thought to be produced by arbuscular mycorrhizal fungi. It is a thermotolerant glycoprotein that contains metal ions and has special physical and chemical characteristics. The structure and function of glomalin have been intensively studied. We review progress in the characterization and properties of glomalin as well as its environmental functions in the rhizosphere (especially its chelation of heavy metals). Research has shown that glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60 and can carry different metal ions because of different kinds of soil. Further research on methods for its measurement is urgently needed.

Key words arbuscular mycorrhizal fungi, glomalin, glomalin-related soil protein, heavy metals

球囊霉素(glomalin)是从枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)分泌的一类含有金属离子的耐热糖蛋白,近期将其更名为球囊霉素相关土壤蛋白(glomalin-related soil protein),文中简称为球囊霉素。它能很好地固定土壤中的重金属,同时也是土壤主要有机物质之一。球囊霉素的研究最初始于对AMF提高植物抗逆性机理的探讨。由于AMF可与大多数陆地植物形成互惠共生体,并广泛存在于环境中(Miller *et al.*, 1995; Smith & Read, 1997; Rillig *et al.*, 1999a, 1999b),因此球囊霉素也广泛存在于环境中。球囊霉素组成和性质的特异性,使其在土壤结构和土壤有机质组成中具有十分重要的意义。例如,它可以改善土壤结构;作为土壤的主要碳源;而固定重金属这一最主要的环境功能,使球囊霉素在土壤重金属污染的生物修复中具有潜在价值

(Franzluebbers *et al.*, 2000; Rillig *et al.*, 2002a, 2003; Rillig & Mummey, 2006; Chern *et al.*, 2007)。尽管目前国内外对球囊霉素真实分子结构及性质的了解还较为模糊,但随着相关研究的不断深入,尤其是球囊霉素测定方法的不断完善,人们对其结构、组成、分类以及环境功能的认识将会进一步深入。

1 球囊霉素的定义

1.1 球囊霉素的发现

1996年,美国马里兰大学的Wright和Upadhyaya在121 °C高温下用20 mmol·L⁻¹的柠檬酸钠溶液从AMF菌丝表面提取了一种能够和单克隆抗体MAb32B11发生免疫性荧光反应的未知蛋白,并发现此蛋白非常稳定,难溶于水,而且只有用偏碱性的柠檬酸钠溶液才能提取得到。进一步的研究发现,

球囊霉素是AMF分泌产生的一类糖蛋白,它可以产生于AMF宿主植物的根部或者根际土壤中根外菌丝的表面,并能从菌丝表面脱落进入土壤中(Wright & Upadhyaya, 1996)。Wright等(1998)进一步用pH为8.0、50 mmol·L⁻¹的柠檬酸钠溶液在121 °C、高压条件下从12份未经耕作过的酸性土壤中提取出一种含量丰富而且性质不同寻常的蛋白质,他们将这种从土壤中提取的蛋白质与从AMF菌丝中提取的蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)比较分析后发现,二者的条带基本一致。

由于球囊霉素的性质独特,且在土壤生态系统中含量较多,因此,它在某种意义上具有生态学功能,对改善土壤有机结构和土壤特性、甚至在整个陆地生态系统的生态过程中发挥着重要作用。

1.2 球囊霉素的分类

球囊霉素在土壤中普遍存在(Wright & Upadhyaya, 1998; Nichols, 2003)。由于目前土壤中提取球囊霉素的方法尚不能得到高纯度的球囊霉素,一些研究者对球囊霉素的来源仍有质疑,所以迄今为止球囊霉素仍然被看做一类理论假设的分泌物蛋白。最初测定方法的基本原理是:先提取土壤中的球囊霉素,再用考马斯亮蓝法(Bradford)测定提取液中的球囊霉素含量,或者应用AMF单克隆抗体MAb32B11进行酶联免疫(ELISA)反应测定(Rillig, 2004)。整个过程的关键步骤是获得球囊霉素提取液,提取液中球囊霉素的含量及特异性直接影响后续考马斯亮蓝和酶联免疫反应。根据最初土壤中球囊霉素的提取方法,球囊霉素被分为4类,分别为总球囊霉素(total glomalin)、易提取球囊霉素(easily extractable glomalin)、免疫反应球囊霉素(immunoreactive total glomalin)和免疫反应易提取球囊霉素(immunoreactive easily extractable glomalin)。原本测定方法即考马斯亮蓝法,使用的前提是除了球囊霉素以外的所有非热稳态土壤蛋白在提取过程中都能够被破坏,然而这一假设并没有被证实。基于此,Rillig (2004)建议使用球囊霉素相关土壤蛋白(glomalin-related soil protein, GRSP)来代替球囊霉素,因为其更适合描述球囊霉素在天然有机物中的存在形式。同时,将球囊霉素分为BRSP (bradford-reactive soil protein)、EE-BRSP (easily extractable BRSP)、IRSP (immunoreactive soil protein)和EE-IRSP (easily extracted immunoreactive soil

protein)等4类,已替代原来相对应的术语。Rosier等(2006)的研究证明,当前的提取程序并没有除去所有的非球囊霉素类物质,所以用考马斯亮蓝法测定土壤中的AMF分泌球囊霉素时会受到其他蛋白的影响,特别是当土壤中有有机物含量非常高时不适用。然而Bolligera等(2008)用多种方法测定了GRSP的纯度,结果表明其中的主要成分仍然是球囊霉素。

2 球囊霉素的性质

2.1 球囊霉素的物理化学特性

球囊霉素在常态下不溶于水,具有一定的热稳定性(Wright & Upadhyaya, 1996)。球囊霉素主要由蛋白质和碳水化合物组成,其中碳水化合物为葡萄糖或蔗糖。球囊霉素的结构还没有完全确定,可能的分子式是在疏水作用下重复单体相互结合的复杂产物(Nichols, 2003)。最初研究发现,球囊霉素是一种携带铁离子的糖蛋白。之后的试验表明,不同性质的土壤中球囊霉素所携带的阳离子不同(Wright & Upadhyaya, 1998; Nichols, 2003)。据估计,球囊霉素的分子量约为355,碳含量约占45%(Lovelock *et al.*, 2004; Nichols & Wright, 2006)。球囊霉素在土壤中的停留时间较长,从热带雨林土壤中提取球囊霉素,用¹⁴C标记后进行研究测定,结果发现球囊霉素的降解周期大约为6–42年(Rillig *et al.*, 2001)。Steinberg和Rillig (2003)进一步测定了AMF菌丝和球囊霉素的降解率,结果表明,培养150天后,菌丝长度减少了60%,而球囊霉素的量只下降了25%。因此,球囊霉素在环境中的性质比较稳定,较难降解;换言之,球囊霉素在环境中的停留时间较长,对环境影响较为持久。

2.2 球囊霉素的生物学特性

球囊霉素本质上是AMF体内、由产球囊霉素基因控制产生的、存在于AMF菌丝表面的、并可以脱落进入土壤中的蛋白质。AMF菌丝不直接从土壤中获取碳、氮营养元素,却可以提供给土壤大量的有机碳和氮,这一直是难以解开的谜团(Hodge *et al.*, 2001)。Driver等(2005)对AMF进行了离体培养,研究球囊霉素的运动过程,结果表明球囊霉素不会直接释放到土壤中,而是牢牢地固定在菌丝细胞壁和真菌孢子中,随着二者的衰亡和降解后释放到土壤中,就解开了之前的谜团。

Gadkar和Rillig (2006)通过离体培养AMF, 隔离出一条MAb32B11免疫反应条带, 对球囊霉素的基因序列进行原始的推断描述。该蛋白质可以与MAb32B11进行交叉反应, 初步假定球囊霉素是热激蛋白60 (HSP 60)的同系物。Purin和Rillig (2008)进一步利用电镜等技术手段, 通过单克隆抗体来确定球囊霉素的细胞定位。然而到目前为止, 球囊霉素与土壤中各类蛋白质分段物质的关系尚未弄清 (Schindler *et al.*, 2007)。

3 球囊霉素的根际环境功能

3.1 球囊霉素能够改善土壤结构

Wright和Upadhyaya (1998)的研究表明, 球囊霉素在土壤中的浓度(通常以 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 为单位)与土壤聚合稳定性呈现正相关性。Rillig等(2002a)的试验结果指出, 球囊霉素是影响土壤聚合稳定性的一个非常重要的因素。总体而言, 球囊霉素能在土壤中积累, 并且改善土壤结构, 使土壤朝着适合植物生长的方向变化 (Franzluebbers *et al.*, 2000; Rillig *et al.*, 2002a; Rillig & Mummey, 2006)。

3.2 球囊霉素是土壤的主要碳源

AMF属于球囊菌门, 可能是最古老的陆生生物之一 (Pawlowska, 2005), 而在菌根共生体中, 对球囊霉素的研究正是源于对AMF的研究。研究表明, 土壤中的球囊霉素会导致植物排放更多的 CO_2 (Rillig *et al.*, 1999b, 2000), 进而加速全球变暖 (Rillig *et al.*, 2002b), 因此对球囊霉素与土壤碳源之间关系的研究正在深入推进。球囊霉素一般占土壤总有机碳的27%左右; 在泥炭土中, 球囊霉素往往占到总有机碳的52% (Comis, 2004), 大量球囊霉素会逐渐变为土壤碳源 (Rillig *et al.*, 2003)。Chern等 (2007)试验发现, 泥炭土中球囊霉素的含量相对较高, 进一步证明有机碳的含量与球囊霉素的含量之间呈现正相关性 (Lovelock *et al.*, 2004)。Rillig等 (2007)总结出两类土壤蛋白质能够固定和扰动土壤中的有机碳, 分别为: (1)碎屑沉积蛋白, 是细胞衰亡后分解释放的; (2)微生物表面活性蛋白, 例如, 疏水蛋白、球囊霉素等, 这也再次证明了球囊霉素和土壤碳素的相关性。另外, Lovelock等 (2004)的试验发现, 球囊霉素可以作为AMF菌丝生长的指示剂。贺学礼等 (2008)在我国西北的毛乌素沙漠沙地进行试验, 也发现球囊霉素能够指示沙漠土壤AMF

的活动情况以及土壤的生态状况, 这为将来用球囊霉素作为土壤肥力的指示因子提供了试验依据。

3.3 球囊霉素对土壤重金属的固定作用

由植物的根、土壤微生物以及土壤所构成的根际环境, 其pH、氧化还原电位(Eh)、根系分泌物及微生物、酶活性、养分等状态均与周围的土壤环境不同。重金属进入根际土壤中, 受pH变化的影响, 会发生沉淀或溶解反应。根际土壤的Eh和还原性分泌物能使多价态的重金属离子发生改变, 进而影响其毒性效应 (张从和夏立江, 2000)。关于植物重金属抗性的研究最初主要集中在有机酸上, 直到有试验表明蛋白质可以与重金属离子发生络合反应 (Spiro, 1981), 从而对其进行固定 (Ross, 1994; Gardea-Torresdoy *et al.*, 1997)。例如, 莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 细胞壁上的糖蛋白能大量固定 Cd^{2+} (Cain & Allen, 1980)。作为一种蛋白质, 球囊霉素也具有络合重金属的能力, 因此被看做重金属 (例如, Cd^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Mn^{2+} 等) 污染土壤的生物稳定剂 (Chern *et al.*, 2007)。Vodnik等 (2008)研究指出, 球囊霉素固定的Pb量与土壤中总Pb量呈现正相关, 占土壤中总Pb量的0.8%–15.5%; 球囊霉素固定的Zn量与土壤中总Zn量呈现负相关。同时, 研究还发现球囊霉素优先固定Pb, 因此可以认为当土壤中的重金属污染不止一种时, 球囊霉素优先固定哪种重金属离子是不一样的, 这主要是由球囊霉素的选择性和土壤的具体性质来决定的。在一般情况下, 球囊霉素能够固定土壤有机物中43%的 Pb^{2+} 和20%的 Zn^{2+} 。在植物重金属抗性研究方面, Subramanian等 (2009)发现在 Zn^{2+} 不同的(能够通过浓度变化调整土壤生物体的生长)浓度条件下, 接种AMF和不接种AMF的土壤表现出不一样的生化性质, 也就是说, 菌根可以使 Zn^{2+} 的可利用性提高, 这与AMF分泌的球囊霉素有很大关系。

4 研究展望

综上所述, 球囊霉素广泛存在于环境中, 不仅能够改善土壤结构, 是土壤中的主要碳源, 而且还能固定土壤中的重金属, 提高植物的重金属抗性。然而, 对球囊霉素的共识仍停留在理论假设蛋白的程度上, 这主要是由于目前还没有清楚确切地定义球囊霉素的真实分子结构与理化性质, 所以, 亟待从分子层面对球囊霉素予以深入研究。

球囊霉素的定义主要依赖于对其的测定方法, 测定方法的改变会导致其命名的不断修订。虽然在科学界普遍认为球囊霉素产自于内生菌根真菌, 然而其真实的来源仍需要不断地探讨与证明。目前, 仍不能获得高纯度的球囊霉素阻碍了对其性质的探讨, 因此不断改进提取测定方法也是进一步研究的迫切需要。在此基础上才能够进一步探讨球囊霉素固定重金属离子的机理, 提高植物对重金属的抗性。

致谢 国家自然科学基金(20777004)资助。

参考文献

- Bolliger A, Nallab A, Magida J, de Neergaarda A, Nallab AD, Bog-Hansen TC (2008). Re-examining the glomalin-purity of glomalin-related soil protein fractions through immunochemical, lectin-affinity and soil labelling experiments. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 887–893.
- Cain JR, Allen RK (1980). Use of a cell wall-less mutant strain to assess the role of the cell wall in cadmium and mercury tolerance by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 25, 797–803.
- Chern EC, Tsai DW, Ogunseitan OA (2007). Deposition of glomalin-related soil protein and sequestered toxic metals into watersheds. *Environmental Science & Technology*, 41, 3566–3572.
- Comis D (2004). Glomalin: hiding place for a third of the world's stored soil carbon. *Australia Farm*, 14, 64–66.
- Driver JD, Holben WE, Rillig MC (2005). Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 101–106.
- Franzluebbers AJ, Wright SF, Stuedemann JA (2000). Soil aggregation and glomalin under pastures in the Southern Piedmont USA. *Soil Science Society of America Journal*, 64, 1018–1026.
- Gadkar V, Rillig MC (2006). The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. *FEMS Microbiology Letters*, 263, 93–101.
- Gardea-Torresdey JL, Cano-Aguilera I, Webb R, Gutierrez-Corona F (1997). Enhanced copper adsorption and morphological alterations of cells of copper-stressed *Mucor rouxii*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 435–441.
- He XL (贺学礼), Bai CM (白春明), Zhao LL (赵丽莉) (2008). Spatial distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in *As-tragalus adsurgens* root-zone soil in Mu Us sand land. *Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报)*, 19, 2711–2716. (in Chinese with English abstract)
- Hodge A, Campbell CD, Fitter AH (2001). An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature*, 413, 297–299.
- Lovelock CE, Wright SF, Clark DA, Ruess RW (2004). Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. *Journal of Ecology*, 92, 278–287.
- Miller RM, Reinhardt DR, Jastrow JD (1995). External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia*, 103, 17–23.
- Nichols KA (2003). *Characterization of Glomalin, A Glycoprotein Produced by Arbuscular Mycorrhizal Fungi*. PhD dissertation, University of Maryland, MD.
- Nichols KA, Wright SF (2006). Carbon and nitrogen in operationally defined soil organic matter pools. *Biology and Fertility of Soils*, 43, 215–220.
- Pawlowska TE (2005). Genetic processes in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 251, 185–192.
- Purin S, Rillig MC (2008). Immuno-cytolocalization of glomalin in the mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 1000–1003.
- Rillig MC (2004). Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science*, 84, 355–363.
- Rillig MC, Caldwell BA, Wosten HAB, Sollins P (2007). Role of proteins in soil carbon and nitrogen storage: controls on persistence. *Biogeochemistry*, 85, 25–44.
- Rillig MC, Field CB, Allen MF (1999a). Soil biota responses to long-term atmospheric CO₂ enrichment in two California annual grasslands. *Oecologia*, 119, 572–577.
- Rillig MC, Hernandez GY, Newton PCD (2000). Arbuscular mycorrhizae respond to elevated atmospheric CO₂ after long-term exposure: evidence from a CO₂ spring in New Zealand supports the resource-balance model. *Ecology Letters*, 3, 475–478.
- Rillig MC, Mummey DL (2006). Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, 171, 41–53.
- Rillig MC, Ramsey PW, Morris S, Paul EA (2003). Glomalin, an arbuscular mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. *Plant and Soil*, 253, 293–299.
- Rillig MC, Wright SF, Allen MF, Field CB (1999b). Rise in carbon dioxide changes soil structure. *Nature*, 400, 628–628.
- Rillig MC, Wright SF, Eviner VT (2002a). The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant and Soil*, 238, 325–333.
- Rillig MC, Wright SF, Nichols KA, Schmidt WF, Torn MS (2001). Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant and Soil*, 233, 167–177.

- Rillig MC, Wright SF, Shaw MR, Field CB (2002b). Artificial ecosystem warming positively affects arbuscular mycorrhizae but decreases soil aggregation. *Oikos*, 97, 52–58.
- Rosier CL, Hoye AT, Rillig MC (2006). Glomalin-related soil protein: assessment of current detection and quantification tools. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 2205–2211.
- Ross SM (1994). *Toxic Metals in Soil Plant Systems*. John Wiley and Sons, London.
- Schindler FV, Mercer EJ, Rice JA (2007). Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 320–329.
- Smith SE, Read DJ (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego. 605.
- Spiro TG (1981). *Copper Proteins*. John Wiley and Sons, New York.
- Steinberg PD, Rillig MC (2003). Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 191–194.
- Subramanian KS, Tenshia V, Jayalakshmi K, Ramachandran V (2009). Biochemical changes and zinc fractions in arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) inoculated and uninoculated soils under differential zinc fertilization. *Applied Soil Ecology*, 43, 32–39.
- Vodnik D, Grcman H, Macek I, van Elteren JT, Kovacevic M (2008). The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Science of the Total Environment*, 392, 130–136.
- Wright SF, Upadhyaya A (1996). Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science*, 161, 575–586.
- Wright SF, Upadhyaya A (1998). A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 198, 97–107.
- Wright SF, Upadhyaya A, Buyer JS (1998). Comparison of N-linked oligosaccharides of glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi and soils by capillary electrophoresis. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 1853–1857.
- Zhang C (张从), Xia LJ (夏立江) (2000). *Bioremediation Technology of Polluted Soil* (污染土壤生物修复技术). China Environmental Science Press, Beijing. 306. (in Chinese)

责任编辑: 郭良栋 责任编辑: 李 敏