

DOI: 10.13332/j.1000-1522.20150399

不同林分及农田土壤中球囊霉素蛋白组成特征差异研究

仲召亮 王文杰 张文天 王琼

(东北林业大学森林植物生态重点实验室)

摘要:球囊霉素相关土壤蛋白(GRSP)是由丛枝菌根真菌产生的一种不易溶于水的糖蛋白,对GRSP化学结构特征认知的匮乏,很大程度上限制了GRSP的生态学地位及其应用前景。本文选取东北林业大学实验林场5种林分及其毗邻农田为研究对象,通过多种技术手段,来揭示GRSP的特征及其在不同林型和农田中的差异。研究发现GRSP含有O—H和N—H伸缩振动带、C—H伸缩振动带、C=O和COO—伸缩振动带、COO—伸缩振动带和C—H弯曲收缩带、C—O和Si—O—Si伸缩振动带5种官能团。紫外吸收峰位置在225~248 nm之间,OD值在0.9~2.0之间。X射线衍射结果显示GRSP含有石英、蒙脱石、伊利石、斜长石、伊利石蒙脱石混层和未知的a物质及b物质等多种矿物质,相对结晶度均较低,平均晶粒尺寸分别为25.83、17.93、14.50、21.45、28.45、28.10和17.40 nm。此外,通过X光电子能谱发现GRSP含有C1s、Al2p、O1s、Si2p、P2p、Ca2p、K2p、N1s、Fe2p、Mg1s和Na1s 11种元素,平均所占百分比为28.9%、7.0%、43.4%、9.8%、0.4%、1.0%、0.6%、1.4%、2.1%、0.7%和7.8%。GRSP的化学特征在不同林型及农田中也存在着一定的差异,其中官能团差异最大的是蒙古栎和白桦林的C—H伸缩振动带(5.5倍),差异最小的是水曲柳和白桦林的O—H和N—H伸缩振动带(1.3倍),胡桃楸林GRSP的OD值最大。GRSP矿物质种类也有所不同,其中只有水曲柳和蒙古栎林中包含斜长石、伊利石蒙脱石混层、a物质、b物质,其余矿物质在所有林型和农田的GRSP中均有发现。石英的晶粒尺寸差异最大,达到5.2倍,最小的为斜长石仅相差17%。落叶松林中的蒙脱石相对结晶度是水曲柳林的5.1倍,而b物质在水曲柳林和蒙古栎林中的相对结晶度仅相差4%。同样,C1s、O1s、Si2p、N1s和Na1s等元素在所有林型和农田中都可被检测到,其中GRSP各元素在不同林型及农田中的差异在1.1~31.6倍之间。我们的研究结果显示不同植被类型中GRSP组成特征可能具有很大的差异,同时GRSP中含有不同土壤矿物说明土壤组成对GRSP也有一定影响,本文对GRSP的化学结构特征的客观揭示,有助于探索GRSP对农田及森林土壤生态功能影响方面的深层机制。

关键词:球囊霉素相关土壤蛋白;林地和农田;红外光谱;紫外光谱;x射线衍射;x射线光电子能谱

中图分类号:S714.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-1522(2016)04-0107-09

ZHONG Zhao-liang; WANG Wen-jie; ZHANG Wen-tian; WANG Qiong. **Compositional variation of glomalin-related soil protein in different forest stands and farmland.** *Journal of Beijing Forestry University* (2016)38(4) 107-115 [Ch, 25 ref.] Key Laboratory of Forest Plant Ecology Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang, 150040, P. R. China.

Glomalin-related soil protein (GRSP), a glycoprotein produced by the hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi, is well known for its significant ecological role in soil function, while lack of cognition of GRSP chemical structural characteristics has largely restricted the ecological status and application prospect of GRSP. In this study, five tree species and adjacent farmland have been investigated to uncover the structural characteristic of GRSP and the inter-specific differences through a variety of technical methods. We found that GRSP contained five functional groups, i. e. O—H and N—H stretching, C—H stretching, C=O and COO— stretching, symmetric COO— stretching, C—H bending, C—O and Si—O—Si stretching. Ultraviolet spectrum showed that the peak wavelength of GRSP was 225~248 nm and OD value was 0.9~2.0. XRD data showed that GRSP contained seven mineral

收稿日期:2015-11-06 修回日期:2015-12-30

基金项目:黑龙江省杰出青年基金(JC201401)、国家自然科学基金(41373075、31170575)、中央高校基本科研业务费专项资金项目(2572014EA01)资助。

第一作者:仲召亮。主要研究方向:植物、土壤生态学。Email:zhongzhao liang999@163.com 地址:150040 黑龙江省哈尔滨市和兴路26号东北林业大学森林植物生态重点实验室。

责任作者:王文杰,教授,博士生导师。主要研究方向:森林植物、土壤生态学。Email:Wjwang225@hotmail.com 地址:同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

substances (quartz, montmorillonite, illite, plagioclase, illite & montmorillonite mixed-layer, and two unrecognizable substances), and their relative crystallinity was quite low with average grain size 25.83, 17.93, 14.50, 21.45, 28.45, 28.10 and 17.40 nm, respectively. Moreover, XPS data found 11 elements of C1s, Al2p, O1s, Si2p, P2p, Ca2p, K2p, N1s, Fe2p, Mg1s and Na1s in GRSP, and their average percentages were 28.9%, 7.0%, 43.4%, 9.8%, 0.4%, 1.0%, 0.6%, 1.4%, 2.1%, 0.7% and 7.8%, respectively. Tree species and farmland practices strongly affected GRSP composition. The biggest difference of function group was C—H stretching between Mongolian oak and birch (5.5 fold), while the minimum difference was O—H and N—H stretching between Manchurian ash and birch (1.3 fold). *Juglans mandshurica* had the highest Uv-OD values. Mineral types of GRSP were also different. Manchurian ash (*Fraxinus mandshurica*) and Mongolian oak (*Quercus mongolica*) forests contained plagioclase, illite & montmorillonite mixed-layer, and two unrecognizable substances, and more soil mineral substances were found in GRSP from other tree species and farmland. The 5.2-fold difference of quartz grain size was found in different vegetations, while plagioclase had the minimum inter-species differences (17%). Relative crystallinity of montmorillonite in larch plantation was 5.1 fold higher than that in Manchurian ash, while very smaller differences in two unrecognizable substances (4% variation of b substance) were found between Manchurian ash and Mongolian oak forests. C1s, O1s, Si2p, N1s and Na1s could be found in GRSP from all forests and farmland, and their variation was 1.1–31.6 fold. Our study confirms that GRSP composition varies greatly among different vegetational types, and soil minerals could also affect the composition owing to variable soil minerals in GRSP. Clarification of the influencing mechanism of GRSP through revealing the GRSP compositional characteristics in this study is helpful for restoring soil ecological functions of farmland and forest soils in this region.

Key words GRSP; forest stands and farmland; IR; UV; XRD; XPS

Wright 等^[1]于 1996 年发现了球囊霉素相关土壤蛋白 (glomalin-related soil protein, GRSP), 证明其是一种由丛枝菌根真菌产生且含金属离子的糖蛋白^[1-2]。随着 GRSP 的发现及相关研究的深入, 其性质功能逐渐被业界发现和认可, 其在土壤生态系统中的生态学功能、生态学地位也日益受到重视。GRSP 能提高土壤团粒结构的稳定性和抗侵蚀能力^[3], GRSP 还可以通过改善土壤的物理性质, 从而提高土壤微生物的活性来达到提高土壤质量的目的^[4], 促进退化土壤的恢复。另外, GRSP 是有机质的主要组成部分, 是土壤有机碳、氮的重要来源^[2], 对增强土壤肥力、促进植物生长起到明显的作用^[5]。

东北地区是中国重要的粮食产区, 也是我国三大国有林区之一。2012 年东北地区粮食产量为 11 175.0 万 t, 占全国粮食总产量的 19.0%, 近 10 年来总产量占全国的 34.0%, 为我国提供了超过三分之一的商品粮^[6]。但是近些年来由于不合理的耕种制度和不断增强的生产活动, 黑土区农田生态环境不断恶化, 黑土地加速退化, 生产能力明显下降^[7], 所以对黑土地农田的保护刻不容缓。与农田相对应的森林生态系统在涵养水分、保育土壤、固碳制氧、净化环境、调节气候、保护生物多样性、缓解城市噪

声等众多方面发挥着不可替代的重要作用^[8-9], 但由于长期过量采伐、土壤退化及人类活动等原因, 致使森林资源数量下降、林地生产力下降, 森林结构处于不稳定状态^[9], 所以急需对非健康的东北地区森林资源现状做出积极响应。

目前, 大部分研究集中于 GRSP 的含量或 GRSP 含量与土壤因子的关系: 如内蒙古中北部表层 (0~40 cm) 土壤中 GRSP 平均含量为 1.44 mg/g, 其与有机碳、氮、C/N 呈显著正相关^[10]。河北中部地区 GRSP 平均含量在 1.41~3.18 mg/g 之间^[11] 等, GRSP 与 pH 存在的显著相关关系也常见报道^[12]。但是关于 GRSP 组成特性方面的研究较少^[13], 亟待被研究和证明。

如今科学技术的进步为 GRSP 性质特征的研究提供了手段, 通过红外光谱分析研究化合物官能团组成为可能^[14], 紫外吸收光谱技术使得灵敏、快速测定蛋白质浓度成为现实^[15], X 光电子能谱及 X 射线衍射分析法确定元素种类及蛋白质相对结晶度及结晶尺寸已是成熟技术^[14], 基于此, 本文选取东北地区典型的落叶松 (*Larix gmelinii*)、胡桃楸 (*Juglans mandshurica*)、白桦 (*Betula platyphylla*)、水曲柳 (*Fraxinus mandschurica*)、蒙古栎 (*Quercus mongolica*) 等林型以及附近的农田为研究对象, 运

用上述技术手段对不同林分间、农田与林地间的GRSP性质特征进行系统的研究及对比分析,以阐明GRSP的基本性质特征,丰富GRSP的研究,为今后相关研究提供可靠依据,并填补GRSP性质特征研究等相关领域的空白,同时为本地区退化农田修复及提高东北地区森林系统功能提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

本文实验样地位于哈尔滨市区二、三环之间的东北林业大学实验林场($45^{\circ}15' N, 128^{\circ}37' E$)。土壤为地带性黑钙土,地形平缓(坡度 $<5^{\circ}$)且水分条件良好。该地区属于温带季风气候,夏季高温多雨,冬季寒冷。年平均气温 $3.5^{\circ}C$,年平均降水量 534 mm 。

落叶松人工林实验样地于1959年春季用2年实生苗定植。初植密度 $0.5\text{ m} \times 1\text{ m}$ 。经45年管护经营,林分郁闭度达0.8,2005年调查显示,在 0.5 hm^2 林地上有兴安落叶松432株,平均树高22 m,平均胸径18 cm,最大达24 cm,活立木蓄积为 58.86 m^3 ,生长速度不次于天然林。

胡桃楸人工林实验样地为1951年春季用2年实生苗造林,初植密度为 $0.75\text{ m} \times 1.5\text{ m}$,当年成活率为80%。经55年管护经营,已形成茂密的森林,郁闭度在0.7左右,具有森林景观的特征。2005年调查林木平均树高为18 m,平均胸径为20 cm。

水曲柳人工林实验样地为1951年春季用2年实生苗造林,初植密度为 $0.5\text{ m} \times 1.5\text{ m}$,当年成活率90%。2005年调查发现,林分郁闭度在0.8以上,在 0.5 hm^2 林地上有水曲柳林木440株,平均树高20 m,平均胸径18 cm,最大胸径达38 cm,活立木蓄积量为 76.99 m^3 。

白桦人工林实验样地为1960年春季用2年生实生白桦苗造林,初植密度为 $0.5\text{ m} \times 1\text{ m}$,当年成活率达95%。2005年森林经理调查显示,在 0.5 hm^2 林地上有白桦活立木493株,平均树高为19 m,平均胸径为16 cm,最大胸径为26 cm,活立木蓄积量为 53.81 m^3 。

蒙古栎人工林实验样地为1959年春季穴状直播造林,初植密度为 $0.5\text{ m} \times 1\text{ m}$,出苗成活率达90%。经45年的管护经营,林木生长繁茂,林分郁闭度在0.8以上,林分仅有乔木层,无灌木层和草本层。2005年 0.35 hm^2 林地内有蒙古栎886株,平均树高为14 m,平均胸径为14 cm,最大胸径为18 cm,活立木蓄积量为 65.60 m^3 。农田主要种植蔬菜、玉米等。

1.2 土壤样品采集

本文在每个林型和农田中选取1个标准样地(共6个)进行土壤样品采集。样地大小为 $20\text{ m} \times 20\text{ m}$,在每个样地中挖取4个 $0\sim20\text{ cm}$ 的土壤剖面,去除表层上的凋落物,将4个同一深度剖面的土壤样品进行混合,代表所测定样地该深度土壤的平均水平。从野外带回实验室的土壤样品,风干后去除植物根系、砖头石块等杂质,混合均匀、磨碎,过 0.25 mm 的筛并保存待用。

1.3 GRSP的提纯

称取每个样地表层($0\sim20\text{ cm}$)土样 1 g 于离心管中,加入8 mL柠檬酸钠溶液(50 mmol/L , $\text{pH}=8$),经高压蒸汽灭菌($121^{\circ}C, 60\text{ min}$)后离心($4000\text{ r/min}, 15\text{ min}$)提取上清液。重复以上操作直至上清液淡黄色为止。用 $\text{HCl}(0.1\text{ mol/L})$ 调节上清液至 $\text{pH}=2.1$,冰浴 $1\text{ h}, 4000\text{ r/min}$,离心 15 min 。弃上清,沉淀物用 0.1 mol NaOH 完全溶解,转入透析袋($\text{DW}=8000\sim14000\text{ Da}$, scientific research special, USA)在去离子水中透析 60 h (12 h 换次水)。透析液离心($10000\text{ r/min}, 10\text{ min}$)去除可能存在的其余杂质后冻干(Scientz-10N,中国宁波新芝生物技术股份有限公司),待用^[16]。

1.4 红外光谱观测(Infrared spectroscopy, IR)

称取 2 mg 冻干样与 200 mg 溴化钾混合烘干研磨,压片,然后进行红外光谱观察^[13]。红外光谱仪型号为IRAffinity-1 (SHIMADZU, Japan),波谱范围 $400\sim4000\text{ cm}^{-1}$ 。各官能团相对含量由ImageJ2x所计算相对面积表示。

波谱范围如图1所示。

1.5 紫外光谱观测(UV spectrophotometer, UV)

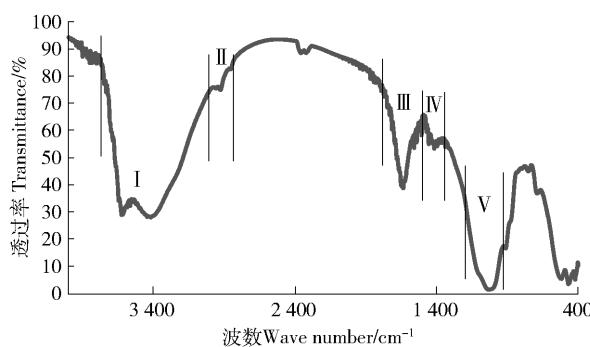
称取 1.0 mg 冻干样溶解于 1 mL $0.1M$ 的氢氧化钠溶液,然后稀释10倍。紫外吸收光谱仪检测(UV-2550; SHIMADZU Co., Kyoto, Japan),扫描波长范围 $250\sim450\text{ nm}$ ^[13]。

1.6 X射线衍射(X-ray diffraction, XRD)

加 4 mL 超纯水将冻干样品溶解,混匀后,用胶头滴管滴到载物片上,真空干燥 24 h 后,进行X射线衍射观察。X射线衍射仪器型号为日本理学D/Max 2200型(Rigaku, Japan),光管为Philips生产,靶材为Cu,扫描步距 0.02° ,电流电压为 $30\text{ mA}, 40\text{ kV}$,衍射范围 2θ 为 $10^{\circ}\sim40^{\circ}$ 。测量速度 0.03 s/步 ^[14]。

1.7 X光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)

参照Li等^[14]方法:加 4 mL 超纯水将GRSP冻干样溶解,混匀后用胶头滴管滴到样品台上,真空干燥 24 h 后,进行X射线光电子能谱观察。X射线光



I. 羧酸、酚类、醇类的 O—H 伸缩振动带, 有机胺类、酰胺的 N—H 伸缩振动带, 芳香族 C—H 的伸缩振动带(波数范围为 3 750 ~ 3 000 cm⁻¹); II. 脂肪族 C—H 伸缩振动带(波数范围为 3 000 ~ 2 820 cm⁻¹); III. 羧酸、酮类、氨基化合物中的 C=O 伸缩振动带, 羧酸盐类中不对称的 COO—伸缩振动带(波数范围为 1 800 ~ 1 480 cm⁻¹); IV. 羧酸盐类中对称的 COO—伸缩振动带, —CH₂—和—CH₃ 基团的 C—H 弯曲收缩带(波数范围为 1 480 ~ 1 320 cm⁻¹); V. 多糖中 C—O 的伸缩振动带, 黏土矿物和氧化物 Si—O—Si 伸缩振动带(波数范围为 1 200 ~ 930 cm⁻¹)。I, a mixture of O—H stretching of carboxylic acid, phenols, alcohols, clay minerals and oxides, N—H stretching of organic amines, amides, and aromatic C—H stretching (wave number of 3 750 ~ 3 000 cm⁻¹); II, aliphatic C—H stretching (wave number of 3 000 ~ 2 820 cm⁻¹); III, a mixture of C=O stretching of carboxylic acid, ketones and amides, and asymmetric COO— stretching of carboxylic acid salts (wave number of 1 800 ~ 1 480 cm⁻¹); IV, a mixture of symmetric COO— stretching of carboxylic acid salts and C—H bending of —CH₂— and —CH₃ groups (wave number of 1 480 ~ 1 320 cm⁻¹); V, a mixture of C—O stretching of polysaccharide and Si—O—Si stretching in clay minerals and oxides (wave number of 1 200 ~ 930 cm⁻¹)。

图 1 红外官能团示意图

Fig. 1 Sketch map of infrared functional groups

电子能谱仪器型号为 K-Alpha (thermo scientific, USA), 测试条件是 X 射线 80 kV 30 mA, MgKa 线。

首先对样品进行宽扫, 扫描范围为 1 000 ~ 0 eV, 分析材料中所含元素。根据宽扫结果分别对 C1s、Al2p、O1s、Si2p、P2p、Ca2p、K2p、N1s、Fe2p、Mg1s 和 Na1s 进行扫描, 得到不同元素的特征峰, 计算特征曲线面积, 得到 GRSP 中这几种元素的相对含量。利用 C1s 峰(285.00 eV)作样品结合能校正。

1.8 数据处理

通过 Office 2010 进行数据的初步处理, 图形拟合。ImageJ2x (<http://www.Imagej.en.softonic.com/>) 进行红外官能团面积计算。Jade 5 对 X 射线衍射图谱进行平滑, 寻峰, 最后计算晶粒的相对结晶度及尺寸(相对结晶度 = $c/(c+a) \times 100\%$), 其中 c 为结晶区面积, a 为无定形区面积^[17]。

2 结果与分析

2.1 不同树种及农田中红外光能团及紫外特征比较

通过红外光谱分析发现, GRSP 包含 5 类官能团(图 1), 其中官能团 II 在各林型中差异最大, 蒙古栎林(338)达到白桦林的 5.5 倍。差异最小的为官能团 I, 水曲柳林(14 787)是白桦林的 1.3 倍。另外蒙古栎林的 III、IV 含量最高, 其次为水曲柳林, 白桦的 III、IV 含量最低分别为蒙古栎林的 33.3% 和 28.6%。胡桃楸林的 V 含量最高为 3 814, 其次为水曲柳林, 白桦林的 V 含量最低, 仅为胡桃楸林的 50% (表 1)。

通过紫外光谱分析发现, GRSP 在 225 ~ 248 nm 波长范围内出现吸收峰, 且在不同林型中吸光度有所差异。通过比较发现胡桃楸林中 GRSP 的 OD 值最大, 是最低值白桦林的 2.2 倍。落叶松林次之, 约为白桦林的 1.9 倍。其余林型在 1.1 ~ 1.4 倍之间(表 1)。

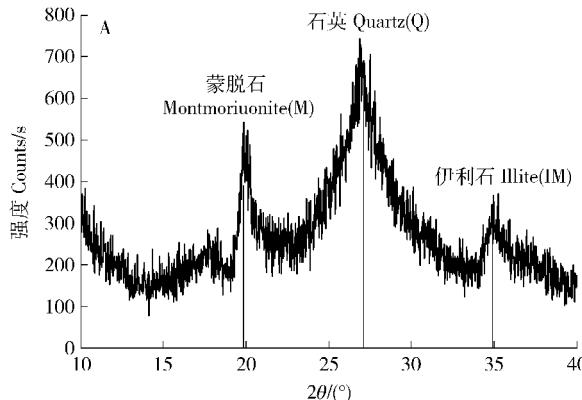
表 1 红外官能团、紫外光谱分析

Tab. 1 Data analysis of functional group and UV

编号 Number	林型 Forest type	红外光谱 IR					波长 Wave length/ nm	OD 值 OD value
		I	II	III	IV	V		
1	农田 Farmland	12 295	94	1 795	425	3 661	228	1.393
2	胡桃楸林 <i>Juglans mandshurica</i> plantation	11 934	79	1 830	350	3 814	248	2.048
3	落叶松林 <i>Larix gmelinii</i> plantation	12 048	239	1 727	282	2 770	244	1.746
4	白桦林 <i>Betula platyphylla</i> plantation	11 394	62	1 544	276	1 998	233	0.935
5	水曲柳林 <i>Fraxinus mandschurica</i> plantation	14 787	258	4 222	880	3 719	226	1.112
6	蒙古栎林 <i>Quercus mongolica</i> plantation	14 065	338	4 547	981	3 313	225	1.232

2.2 X射线衍射分析不同树种及农田中GRSP的矿物质组成

通过X射线衍射发现,GRSP包含有多种矿物质。但是在不同林型中的GRSP所包含的矿物质种类有所不同。如:农田、胡桃楸、落叶松、白桦均含有蒙脱石、石英、伊利石3种矿物质(图2)。而水曲柳、蒙古栎除了包含有蒙脱石、石英、伊利石之外还包含有斜长石、伊利石蒙脱石混层以及 2θ 为 31.8° 的a物质和 2θ 为 38.0° 的b物质(图2)。a、b物质具体成分,暂时还不清楚,有待进一步研究。白桦林中石英的晶粒尺寸最大(59.20 nm)是尺寸最小的

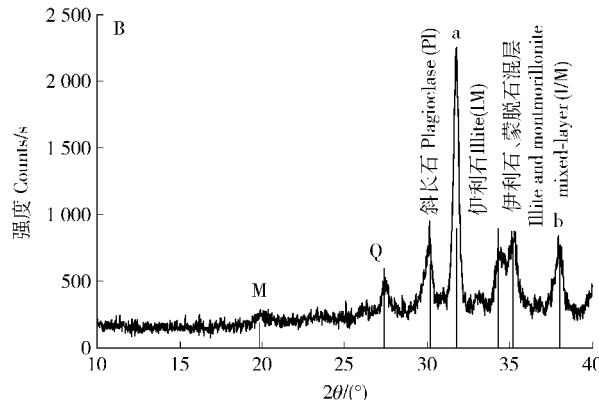


A 农田、胡桃楸、落叶松和白桦林示意图 Farmland, *Juglans mandshurica*, *Larix gmelinii* and *Betula platyphylla* plantations

a、b 为未知物质 a and b mean unknown substance 下同。The same below.

图2 球囊霉素相关土壤蛋白的矿物质示意图

Fig. 2 Sketch map of mineral substance in GRSP



B 水曲柳和蒙古栎林示意图 *Fraxinus mandschurica* and *Quercus mongolica* plantations

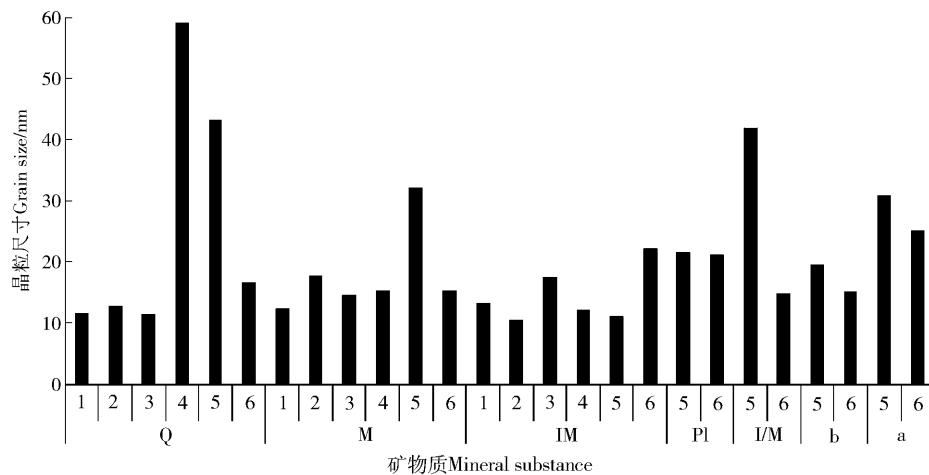


图3 不同林型及农田中各矿物质晶粒尺寸

Fig. 3 Grain size of mineral substance in different forest stands and farmland

白桦林中石英的相对结晶度最高为5.5%,是相对结晶度最低的水曲柳林的3.8倍,其次落叶松林为水曲柳林的2.9倍。蒙脱石的相对结晶度在落叶松林中最高(6%),农田次之(5.6%),水曲柳林依然最低为落叶松林的1/5,其余林型相对结晶度在4.4%~1.3%之间。但是水曲柳林中伊利石的

落叶松的5.2倍,其次为水曲柳林为落叶松林的3.8倍。水曲柳林中的蒙脱石矿物晶粒尺寸最大为32.3 nm,农田中蒙脱石尺寸最小仅为水曲柳林的38.3%其他林型蒙脱石晶粒尺寸均在17.70~14.60 nm之间。蒙古栎林中伊利石晶粒尺寸最大(22.20 nm),是胡桃楸林的2.1倍、农田的1.7倍。水曲柳林中的斜长石、伊利石蒙脱石混层、a物质、b物质普遍高于蒙古栎林,其中伊利石蒙脱石混层差异达到2.8倍,a物质1.2倍,b物质1.3倍,斜长石晶粒尺寸基本无差别(图3)。

相对结晶度最高达到8.2%,农田最低仅为水曲柳林的1/4,其余林型均在2.8%~2.3%之间。斜长石与b物质在水曲柳林中高于蒙古栎林,且没有明显差异。但是蒙古栎林中的伊利石蒙脱石混层和a物质明显高于水曲柳林,分别为后者的4.9倍和1.4倍(图4)。

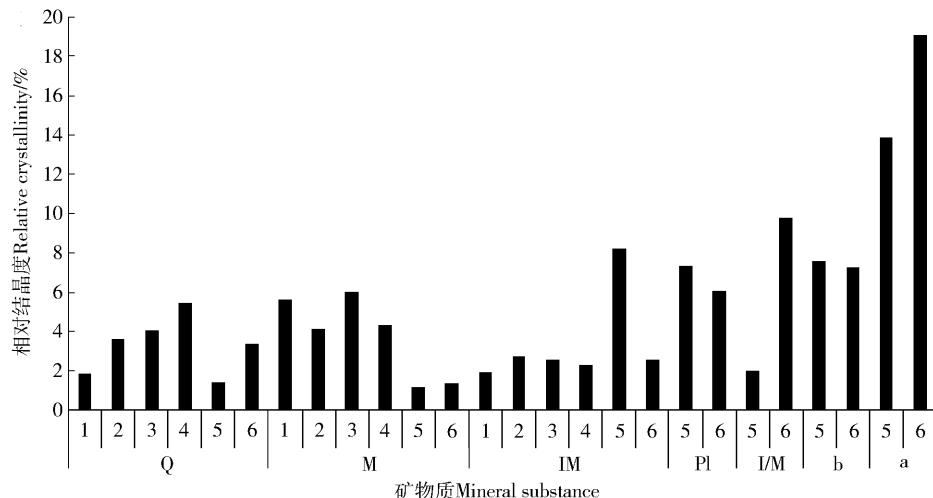


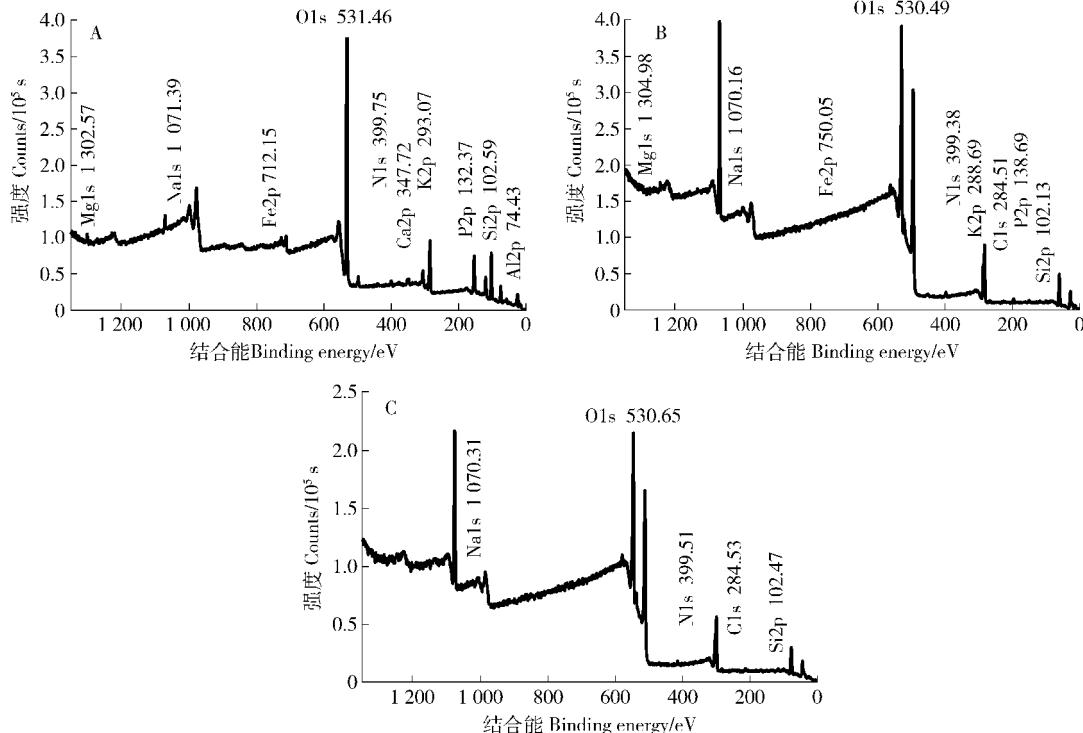
图4 不同林型及农田中各矿物质相对结晶度

Fig. 4 Relative crystallinity of mineral substance in different forest stands and farmland

2.3 不同林型及农田中 GRSP 的元素组成及含量

分析

通过 GRSP 的 X 光电子能谱分析可以发现 GRSP 包含有多种元素,但是在不同林型及农田中元素种类有所差异。如:农田,胡桃楸,落叶松,白桦林中包含 11 种元素 (C1s、Al2p、O1s、Si2p、P2p、Ca2p、K2p、N1s、Fe2p、Mg1s、Na1s) (图 5A),而蒙古栎林包含除了 Al2p 和 Ca2p 之外的 9 种元素 (图 5B),水曲柳林仅包含 C1s、O1s、Si2p、N1s、Na1s 这 5 种元素 (图 5C)。



A. 农田、胡桃楸、落叶松和白桦林 Farmland, *Juglans mandshurica*, *Larix gmelini* and *Betula platyphylla* plantations; B. 蒙古栎林 *Quercus mongolica* plantation; C. 水曲柳林 *Fraxinus mandshurica* plantation

图5 不同林型及农田各元素示意图

Fig. 5 Sketch map of element in different forest stands and farmland

种元素 (图 5C)。

不同林型中所包含的元素所占百分比也有较大差异,如:水曲柳林中 C1s 和 Na1s 的百分比高于其他林型及农田,分别是百分比最低的落叶松林、白桦林的 1.7 倍和 31.6 倍,其中 Na1s 的百分比在不同林型及农田中的差异是所有元素中最大的。百分比次之的均是蒙古栎林,其他林型 C1s 在 34.79% ~ 24.02% 之间,Na1s 的百分比在 1.3% ~ 0.7% 之间。O1s 和 Si2p 的百分比均按照落叶松、胡桃楸、农田、

白桦、水曲柳、蒙古栎林顺序依次递减,最大百分比差异分别为1.2倍和13.7倍。农田中N1s(1.74%)、Mg1s(0.95%)百分比最高,分别是百分比最低的蒙古栎林的1.7倍和2.6倍。白桦林中P2p(0.54%)和Ca2p(1.23%)百分比最高,其次为农田,百分比最低的均为落叶松林分别是白桦林的50%和75%。落叶松林中有最高百分比的Fe2p和

Al2p,分别是百分比最低的蒙古栎林和农田的3.6倍和1.1倍,其余林型Fe2p百分比在2.6%~2.3%之间,Al2p含量在7.3%~6.8%之间。K2p的最高百分比被发现于蒙古栎林中,是百分比最低的白桦林的5倍,其余林型差异不大均在0.6%~0.4%之间(图6)。

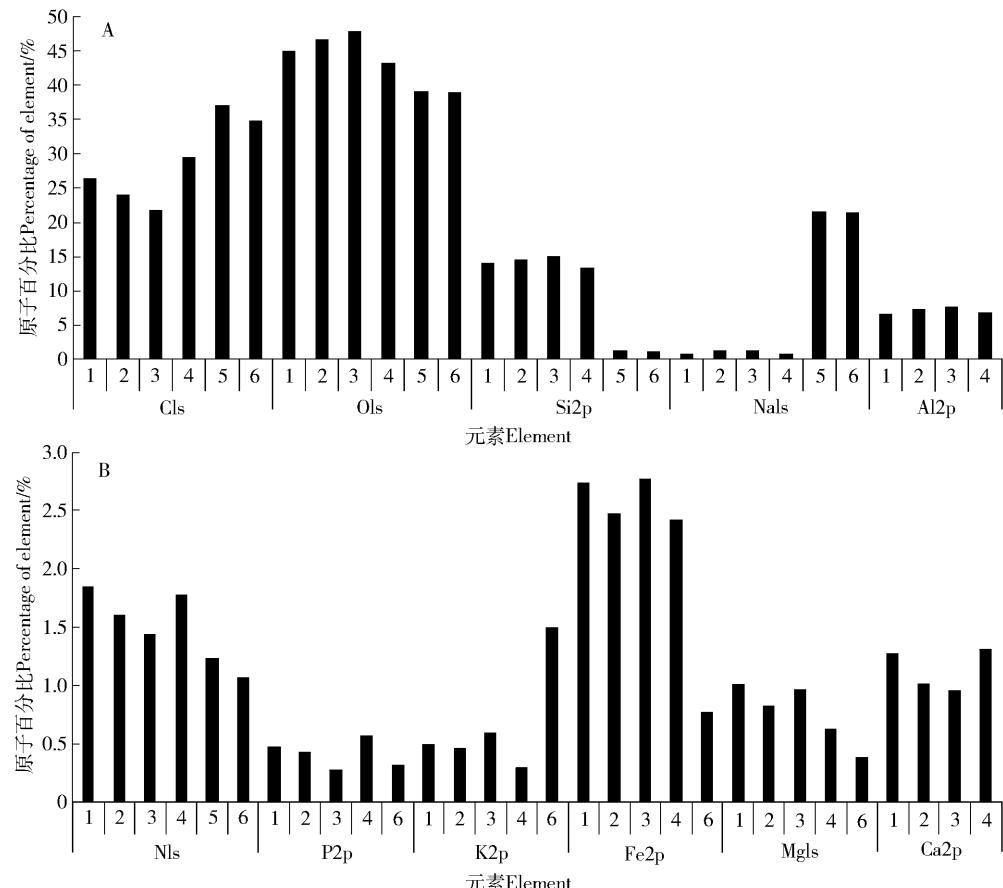


图6 不同林型及农田中各元素的原子百分比

Fig. 6 Percentage of element in different forest stands and farmland

3 讨 论

3.1 GRSP 性质特征的阐明

GRSP组成特征的相关研究十分重要,这是因为分子的稳定性主要决定于自身化学组成特征。比如,GRSP的疏水性和铁结合作用使GRSP避免被水分溶解,并且可以有效的阻止GRSP被微生物分解为黏性矿物质或者其他有机质^[4],而GRSP的化学组成特征就决定了其疏水性和铁结合能力。近些年GRSP组成特征研究已然成为热点,Wright等^[18]就提出GRSP具有凝集素结合能力,并且通过高效毛细管电泳法表明GRSP是一种带有天冬酰胺链的糖蛋白。Aguilera等^[19]通过激光共聚焦扫描电镜发现GRSP在铝离子胁迫下的具有自体荧光效应等。而通过红外光谱研究发现GRSP在2 920 cm⁻¹为C—

H伸缩振动带,3 400 cm⁻¹处为O—H伸缩振动带,O—H弯曲振动带在1 400 cm⁻¹处被发现^[20],我们的研究得到同样的结果。并且在此基础上我们总结发现了GRSP包含有5种官能团,分别为O—H和N—H伸缩振动带、C—H伸缩振动带、C=O和COO—伸缩振动带、COO—伸缩振动带和C—H弯曲收缩带、C—O和Si—O—Si伸缩振动带(图1),与Wang等^[13]的研究中官能团种类相符,其中除C—H伸缩振动带之外,本研究中其他官能团组含量均高于其相应官能团的1.0~2.5倍之间,含量有所增加。但是其研究指出GRSP含有7种类型的官能团,较本文多2种,以上差异可能是不同地区及不同树种下真菌受环境影响,所分泌的代谢产物有所差异造成的。本研究的紫外吸收峰位置在225~248 nm(表1),与Wang等^[13]295 nm的研究结果有

所不同,平均OD值为1.41是其研究的1.2倍。通过X射线衍射技术我们发现,GRSP包含有石英、蒙脱石、伊利石、I/M以及 2θ 为31.8°的a物质和 2θ 为38.0°的b物质(图2),而Gillespie等^[16]和Wang等^[13]分别通过X射线近边结构光谱及X射线衍射技术对GRSP的分析中都没有明确指出其包含哪种矿物质或笼统的计算出晶粒尺寸和相对结晶度,但是本研究在发现这几种矿物质的基础上更进一步的明确了不同矿物质的晶粒尺寸及相对结晶度(图3、图4),为今后相关矿物质研究做出贡献。但是具体a、b为哪种矿物质、是否是GRSP所特有的,还有待进一步研究,所以这也是本文的重要发现之一。正如前文所说,多种技术的运用^[13,17,20-21]为GRSP在各方面的研究提供帮助,但是几乎没有对GRSP包含的元素种类及含量的相关研究,本研究揭示了GRSP包含有C1s、Al2p、O1s、Si2p、P2p、Ca2p、K2p、N1s、Fe2p、Mg1s和Na1s11种元素(图5),并明确了各元素所占的百分含量,其中C1s、O1s、Si2p和Al2p在GRSP中所占的百分比较高,Na1s、P2p、K2p、Mg1s和Ca2p所占的百分比较低(图6),这是本研究的另一个重要发现。以上这些发现是对前人在GRSP方面研究的重要补充,丰富了GRSP相关领域的研究,对今后GRSP的组成特征、及性质特征方面相关研究提供重要依据和参考。

3.2 不同林型及农田间GRSP性质特征有差异

基于当下东北地区重点农业保护和林业恢复问题,我们有必要更深入的了解不同森林类型和农田在土壤真菌蛋白等深层次的机制。GRSP在不同土地利用方式下存在一些差异^[21-22],现在关于不同森林类型及农田土壤GRSP的研究多集中在含量上的差异或者与土壤因子的相关关系。如许加等^[23]在研究铅锌矿污染区时发现,圆柏、侧柏、黄连木、核桃、刺槐、太白杨、水青冈林中GRSP含量在0.1~0.22 mg/g之间,并且与速效磷和速效钾含量呈极显著正相关($P < 0.01$)。陕西地区狼牙刺林中GRSP含量为3.48 mg/g^[24],伯乐树林中GRSP平均含量在2.79~4.81 mg/g之间^[25],而农田中GRSP的含量在1.4~3.18 mg/g之间^[12],但是关于不同土地类型GRSP化学性质的差异研究很少被报道^[16]。本研究则侧重于更深层次的探究不同林型及农田中GRSP的化学性质上的差异,如白桦林中GRSP所包含的5类官能团和OD值在所有林型和农田中均为最低值,其中官能团差异在1.3~5.5倍之间,OD值仅为胡桃楸林的45.7%(表2)。而水曲柳和蒙古栎林的GRSP包含元素种类较少,但含有矿物种类最多,其中水曲柳林的GRSP中各物质

的平均晶粒尺寸较大达到28.74 nm,平均相对结晶度较高为5.9%,农田的平均晶粒尺寸和相对结晶度均最小,分别为12.43 nm、3.1%,这可能因为农田在长期的耕种过程中影响了矿物质的结晶能力,而水曲柳林对矿物质的结晶能力起到一定促进作用。农田、胡桃楸、落叶松和白桦林的GRSP包含有11种元素为最多,蒙古栎林次之(9个),水曲柳林最少(5个)(图5),并且不同元素在各林型及农田中所占比例也存在数倍的变化(图6)。

4 结 论

球囊霉素相关土壤蛋白包含有多种官能团(5种)、矿物质(7种其中2种未知物质)及元素(11种),其中在水曲柳和蒙古栎林中的2种未知物质是本文重要发现,有待今后进一步研究。其相对结晶度均较低,平均晶粒尺寸在14.50~28.45 nm之间,紫外吸收范围225~248 nm,OD值在0.9~2.0之间。

GRSP化学特征在不同林型及农田间均达到数倍差异,其中官能团差异为1.3~5.5倍,晶粒尺寸1.1~5.2倍,结晶度1.1~5.1倍,各元素所占百分比差异在1.1~31.6倍之间。本文客观、多角度的阐明了GRSP的深层化学机制,拓宽了GRSP相关领域的研究,极大的丰富了GRSP的相关研究,并且研究显示植被类型对GRSP组成特征可能具有较大影响,这或许会为GRSP与土壤因子的相关关系、促进植物生长的原因作出分子层面的解释。同时,为东北地区农田及森林的相关研究提供参考和思路,为分子层面上优化东北农林产业结构作出可能的贡献。

参 考 文 献

- [1] WRIGHT S, FRANKE-SNYDER M, MORTON J, et al. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots[J]. Plant and Soil, 1996, 181(2): 193~203.
- [2] 李涛,赵之伟. 丛枝菌根真菌产球囊霉素研究进展[J]. 生态学杂志,2005, 24(9): 1080~1084.
- [3] LI T, ZHAO Z W. Advances in researches on glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi [J]. Chinese Journal of Ecology, 2005, 24(9): 1080~1084.
- [4] RILLIG M C, WRIGHT S F, NICHOLS K A, et al. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils[J]. Plant and Soil, 2001, 233(2): 167~177.
- [5] JASTROW J D, MILLER R M, LUSSENHOP J. Contributions of interacting biological mechanisms to soil aggregate stabilization in restored prairie [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1998, 30(7): 905~916.
- [6] 杨茂秋,冯固,白灯莎,等. VA菌根对玉米吸收利用磷肥的影响[J]. 土壤肥料, 1992(4): 36~41.
- [7] YANG M Q, FENG G, BAI D S, et al. Influence of VA

- mycorrhiza of corn absorb the phosphate fertilizer [J]. *Soil Fertilizer*, 1992(4): 36-41.
- [6] 美国锋,李宏,郑浩,等.东北商品粮基地土地保障关键技术研究:技术需求与研究框架[J].*国土与自然资源研究*,2015(2):37-39.
- GUAN G F, LI H, ZHENG H, et al. Research on key technologies of land security of commodity grain base in northeast China [J]. *Territory & Natural Resources Study*, 2015(2):37-39.
- [7] 张中美. 黑龙江省黑土耕地保护对策研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2009.
- ZHANG Z M. Research on countermeasures of Heilongjiang province black-soil cropland protection [D]. Urumchi: Xinjiang Agricultural University, 2009.
- [8] 王兵,鲁绍伟. 中国经济林生态系统服务价值评估[J].*应用生态学报*,2009,20(2):417-425.
- WANG B, LU S W. Evaluation of economic forest ecosystem services in China [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(2):417-425.
- [9] 王兵,鲁绍伟,尤文忠,等. 辽宁省森林生态系统服务价值评估[J].*应用生态学报*,2010,21(7):1792-1798.
- WANG B, LU S W, YOU W Z, et al. Evaluation of forest ecosystem services value in Liaoning Province [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010,21 (7):1792-1798.
- [10] 王诚煜,冯海艳,杨忠芳,等. 内蒙古中北部球囊霉素相关土壤蛋白的分布及其环境影响[J].*干旱区研究*, 2013, 30(1): 22-28.
- WANG C Y, FENG H Y, YANG Z F, et al. Glomalin-related soil protein distribution and its environmental affecting factors in the Northeast Inner Mongolia [J]. *Arid Zone Research*, 2013, 30 (1): 22-28.
- [11] 唐宏亮,刘龙,王莉,等. 土地利用方式对球囊霉素土层分布的影响[J].*中国生态农业学报*,2009,17(6):1137-1142.
- TANG H L, LIU L, WANG L, et al. Effect of land use type on profile distribution of glomalin [J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2009,17(6):1137-1142.
- [12] 王明元,夏仁学. 不同pH值下丛枝菌根真菌对枳生长及铁吸收的影响[J].*微生物学报*,2009, 49(10):1374-1379.
- WANG M Y, XIA R X. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and iron uptake of *Poncirus trifoliata* under different pH [J]. *Acta Microbiologica Sinica* ,2009, 49(10):1374-1379.
- [13] WANG Q, WU Y, WANG W J, et al . Spatial variations in concentration, compositions of glomalin related soil protein in poplar plantations in northeastern China, and possible relations with soil physicochemical properties[J/OL]. *The Scientific World Journal*,2014: 1-13 [2015-10-30]. <http://dx.org/10.115/2014/160403>.
- [14] LI Y H, WANG H M, WANG W J, et al. Ectomycorrhizal influence on particle size, surface structure, mineral crystallinity, functional groups, and elemental composition of soil colloids from different soil origins[J/OL]. *The Scientific World Journal*, 2013;1-13[2015-10-30]. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/698752>.
- [15] 朱元荣,吴丰昌,林樱. 紫外吸收光谱积分法分析蛋白质浓度:以碱性磷酸酶为例[J].*光谱学与光谱分析*,2013,33 (7): 1845-1849.
- ZHU Y R, WU F C, LIN Y. Quantitative analysis of protein concentration by absorption peak integration method of
- spectroscopic; taking alkaline phosphatase as an example [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*,2013,33(7):1845-1849.
- [16] GILLESPIE A W, FARRELL R E, WALLEY F L, et al. Glomalin-related soil protein contains non-mycorrhizal-related heat-stable proteins, lipids and humic materials[J]. *Soil Biology and Biochemistry* ,2011,43(4): 766-777.
- [17] 徐斌,满建民,韦存虚. 粉末X射线衍射图谱计算植物淀粉结晶度方法的探讨[J].*植物学报*,2012,47(3):278-285.
- XU B, MAN J M, WEI C X. Methods for determining relative crystallinity of plant starch X-ray powder diffraction spectra [J]. *Chinese Bulletin of Botany*,2012,47(3):278-285.
- [18] WRIGHT S F, UPADHYAYA A, BUYER J S, et al. Comparison of N-linked oligosaccharides of glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi and soils by capillary electrophoresis [J]. *Soil Biology and Biochemistry* , 1998, 30(13):1853-1857.
- [19] AGUILERA P, BORIE F, SEGUEL A. Fluorescence detection of aluminum in arbuscular mycorrhizal fungal structures and glomalin using confocal laser scanning microscopy [J]. *Soil Biology and Biochemistry* , 2011,43(12): 2427-2431.
- [20] SCHINDLER F V, MERCER E J, RICE J A. Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content[J]. *Soil Biology and Biochemistry* , 2007, 39(1): 320-329.
- [21] 祝飞,赵庆辉,邓万刚,等. 不同土地利用方式下球囊霉素相关土壤蛋白与有机碳及土壤质地的关系[J].*安徽农业科学*,2010,38(23):12499-12502.
- ZHU F, ZHAO Q H, DENG W G, et al. Relationships among glomalin related soil protein, SOC and soil texture under different land use types [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences* , 2010,38(23):12499-12502.
- [22] RILLIG M C, RAMSEY P W, MORRIS S, et al. Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change[J]. *Plant and Soil*, 2003,253:293-299.
- [23] 许加,唐明. 铅锌矿污染区不同林木根际丛枝菌根真菌与土壤因子的关系[J].*西北农林科技大学学报(自然科学版)*,2013, 41(5):75-80.
- XU J, TANG M. Relationship between arbuscular mycorrhizal fungi and soil factors in the rhizosphere of different tree species in Pb-Zn polluted mine [J]. *Journal of Northwest Agriculture and Forestry University (Nature Science Edition)* , 2013,41(5):75-80.
- [24] 黄玲玲,李莎,唐明. 石油污染土壤中不同人工林木根际丛枝菌根真菌与球囊霉素的研究[J].*西北植物学报*,2012,32(3): 573-578.
- HUANG L L, LI S, TANG M. Arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in the rhizosphere of different plant species grown in oil-contaminated soil[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalis Sinica* , 2012,32(3):573-578.
- [25] 张静,唐旭利,郑克举,等. 赤红壤地区森林土壤球囊霉素相关蛋白测定方法[J].*生态学杂志*,2014,33(1):249-258.
- ZHANG J, TANG X L, ZHENG K J, et al. An improved procedure for glomalin-related soil protein measurement in subtropical forest[J]. *Chinese Journal of Ecology*,2014,33(1):249-258.

(责任编辑 范娟
责任编辑 孙向阳)