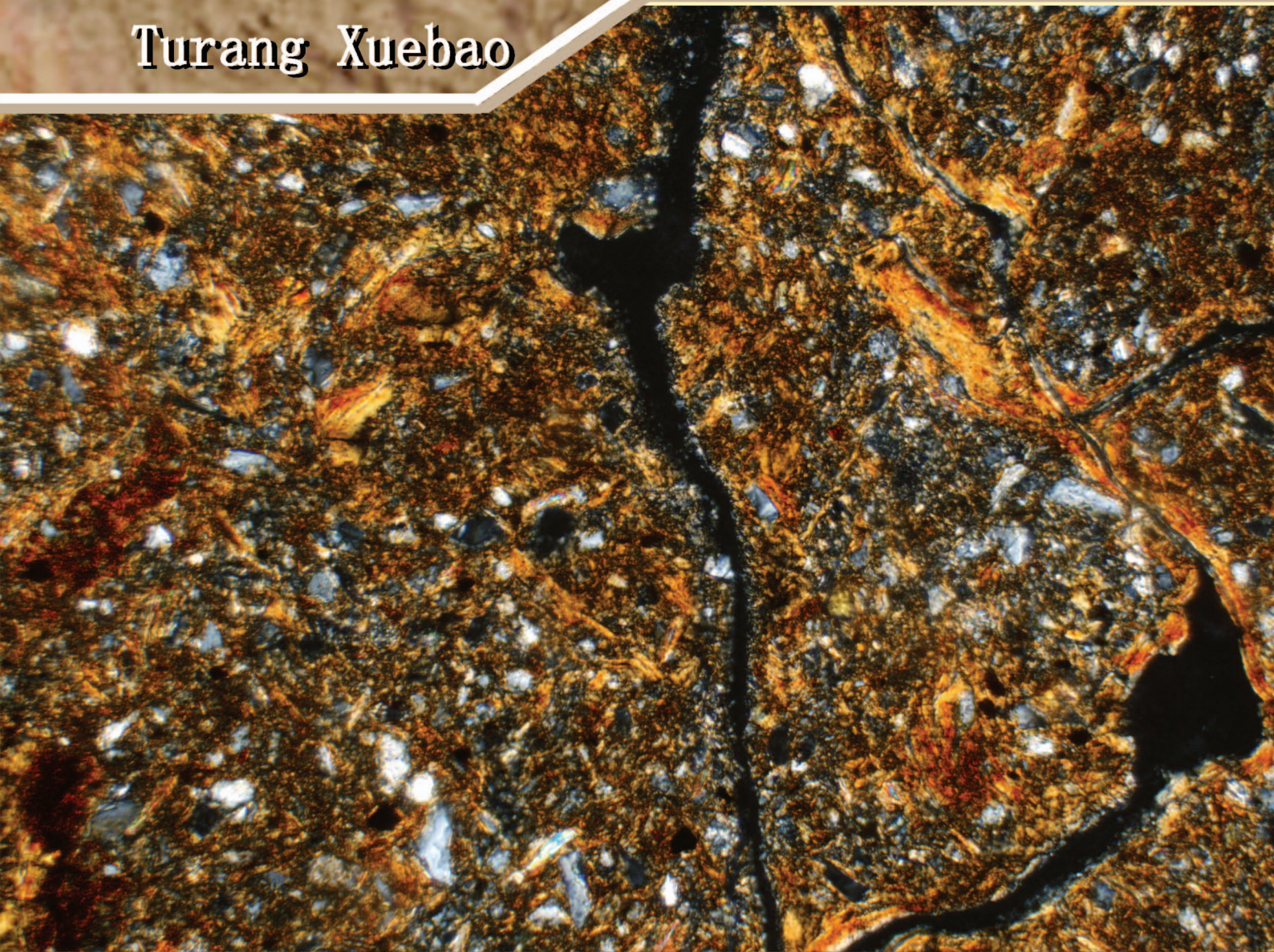


ISSN 0564-3929

Acta Pedologica Sinica 土壤学报

Turang Xuebao



中国土壤学会 主办
科学出版社 出版

2015

第 52 卷 第 2 期

Vol.52 No.2

《土壤学报》编辑委员会

主 编: 史学正

执行编委: (按姓氏笔画为序)

丁维新	巨晓棠	王敬国	王朝辉	史 舟	宇万太	朱永官
李永涛	李芳柏	李保国	李 航	吴金水	沈其荣	张玉龙
张甘霖	张福锁	陈德明	邵明安	杨劲松	杨明义	杨林章
林先贵	依艳丽	周东美	周健民	金继运	逢焕成	胡 锋
施卫明	骆永明	赵小敏	贾仲君	徐国华	徐明岗	徐建明
崔中利	常志州	黄巧云	章明奎	蒋 新	彭新华	雷 梅
窦 森	廖宗文	蔡祖聪	蔡崇法	潘根兴	魏朝富	

编辑部主任: 陈德明

责任编辑: 汪枏生 卢 萍 檀满枝

土 壤 学 报

Turang Xuebao

(双月刊, 1948年创刊)

第52卷 第2期 2015年3月

ACTA PEDOLOGICA SINICA

(Bimonthly, Started in 1948)

Vol. 52 No. 2 Mar., 2015

编 辑 《土壤学报》编辑委员会
地址: 南京市北京东路71号 邮政编码: 210008
电话: 025 - 86881237
E-mail: actapedo@issas.ac.cn

Edited by Editorial Board of Acta Pedologica Sinica
Add: 71 East Beijing Road, Nanjing 210008, China
Tel: 025 - 86881237
E-mail: actapedo@issas.ac.cn

主 编 史学正
主 管 中国科学院
主 办 中国土壤学会
承 办 中国科学院南京土壤研究所

Editor-in-Chief Shi Xuezheng
Superintended by Chinese Academy of Sciences
Sponsored by Soil Science Society of China
Undertaken by Institute of Soil Science,
Chinese Academy of Sciences

出 版 科 学 出 版 社
地址: 北京东黄城根北街16号 邮政编码: 100717

Published by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North Street,
Beijing 100717, China

印刷装订 北京中科印刷有限公司
总 发 行 科 学 出 版 社
地址: 北京东黄城根北街16号 邮政编码: 100717
电话: 010 - 64017032
E-mail: journal@mail.sciencep.com

Printed by Beijing Zhongke Printing Limited Company
Distributed by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North Street,
Beijing 100717, China
Tel: 010 - 64017032
E-mail: journal@mail.sciencep.com

国外发行 中国国际图书贸易总公司
地址: 北京399信箱 邮政编码: 100044

Foreign China International Book Trading Corporation
Add: P. O. Box 399, Beijing 100044, China

国内统一刊号: CN 32-1119/P

国内邮发代号: 2-560

国外发行代号: BM45

定价: 60.00元

国 内 外 公 开 发 行



ISSN 0564-3929



9 770564 392156

DOI: 10. 11766/trxb201401250051

黑土农田施加 AM 菌剂对大豆根际菌群结构的影响*

宋福强 程 蛟 常 伟[†] 孟剑侠 赵天琦 王 辰

(黑龙江大学生命科学学院, 哈尔滨 150080)

摘 要 为揭示在黑土农田条件下施加丛枝菌根 (AM) 菌剂对作物根际微生物群落的影响, 试验以大豆为研究对象, 田间播种时分别施加根内球囊霉 (*Glomus intraradices*, GI) 和摩西球囊霉 (*Glomus mosseae*, GM) 两种 AM 菌剂, 以单施化肥处理 (F) 和不施加 AM 菌剂及化肥处理 (CK) 作为对照, 采用传统与现代分子生物学手段, 研究大豆根际土壤中菌群结构及根系内 AM 真菌多样性。结果表明: GI、GM 处理的大豆菌根侵染率最高达到 78.3% 和 86.6%; GI、GM、F 处理的大豆根际土壤中可培养细菌、真菌和放线菌三大菌群的数量与 CK 处理相比显著提高 ($p < 0.05$)。分离大豆结荚期根际土壤中 AM 真菌孢子, 共获得 *Acaulospora* 属真菌 3 种, *Glomus* 属真菌 7 种, 孢子密度均较低, *G. intraradices* 和 *G. mosseae* 均为各自处理的优势种群。对大豆结荚期根系和根际土壤 PCR-DGGE 图谱条带的丰度及优势条带测序分析, 结果表明根际土壤中的 AM 真菌菌群数明显高于根系中 AM 真菌的菌群数量, GI 处理的大豆根际土壤中 AM 真菌丰度值最大, GM 处理大豆根系里的 AM 真菌丰度值最大, F 处理的根际土壤中总 AM 真菌的数量最少; 施加 AM 菌剂处理的大豆根系及根际土壤中的优势菌群分别为外源施加的两种 AM 真菌。

关键词 AM 真菌; 微生物群落; 菌根侵染率; 变性梯度凝胶电泳; 丰度

中图分类号 Q89 **文献标识码** A

东北黑土区是世界上仅有的三大块黑土带之一, 其土壤具有土质肥沃、质地疏松以及有机质丰富等特征, 是我国重要的商品粮生产基地^[1]。但是由于长期的过度垦殖和不良的经营管理方式, 该地区农田黑土质量退化问题日益严重^[2]。土壤微生物是土壤生态系统中极其重要和最为活跃的部分^[3], 在土壤养分转化循环、系统稳定性和抗干扰能力以及土壤可持续生产中占据主导地位, 控制着土壤生态系统功能的关键过程^[4], 因此向土壤中施用生物肥是土壤修复和维持黑土区农田生产力的重要举措^[5]。丛枝菌根 (Arbuscular mycorrhiza, AM) 真菌是土壤中广泛分布的一类微生物, 其菌丝体能侵入到宿主植物组织细胞内部, 在根部皮层细胞内产生“泡囊”和“丛枝”两大典型结构^[6]。目前, 以 AM 真菌为主要生物成分的 AM 菌剂研制与应用已引起了一些学者的高度关注。

AM 真菌能与绝大多数高等植物根系形成互惠

共生体。目前, 已经发现并报道的 AM 真菌超过 200 种, 而豆科和禾本科植物是形成 AM 最普遍的植物^[7]。随着研究的发展, 对 AM 真菌作用的认识也越来越深入, 其在植物群落结构、演替和稳定性方面均具有重要的生态学意义^[8-10]。笔者在前期工作中开展了在黑土农田环境中施加 AM 菌剂对大豆生长效应的研究, 证实了 AM 真菌对大豆的生长有积极的促进作用^[11]。本研究继续以大豆-AM 真菌-微生物多样性为研究切入点, 采用传统的平板稀释涂布法对大豆根际土壤可培养的细菌、真菌、放线菌三大菌群分离、培养和计数, 采用 PCR-变性梯度凝胶电泳方法对大豆根系和根际土壤中不能纯培养的 AM 真菌菌群结构分析, 旨在揭示外源施加 AM 真菌对植物根际菌群结构的影响, 为 AM 菌剂的推广应用提供基础资料, 研究结果对黑土农业可持续性发展和合理利用具有一定的现实意义。

* 国家自然科学基金面上项目 (31270535)、黑龙江省自然科学基金重点项目 (ZD201206)、黑龙江省杰出青年科学基金项目 (JC201306) 和黑龙江大学高层次人才支持计划项目 (Htd2010-12) 资助

[†] 通讯作者, E-mail: changwei@hlju.edu.cn

作者简介: 宋福强 (1969—), 男, 黑龙江齐齐哈尔市人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事菌根学方面研究

收稿日期: 2014-01-25; 收到修改稿日期: 2014-04-09

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试大豆品种为“龙豆二号”,黑龙江省农业科学院提供。供试 AM 菌剂为根内球囊霉 (*Glomus intraradices*, GI) 和摩西球囊霉 (*G. mosseae*, GM), 菌剂中 AM 真菌孢子含量约为 $1\ 630$ 个 $20\ \text{g}^{-1}$ (黑龙江大学生命学院制备)。供试化肥为磷酸二铵, 来自黑龙江省农业科学院。

1.2 田间试验设计与管理

试验地设在黑龙江省哈尔滨市呼兰区黑龙江大学科研试验田。试验田的前茬作物为玉米。土壤 pH 6.89, 有机质含量 $12.9\ \text{g}\ \text{kg}^{-1}$ 、全氮 $9.18\ \text{g}\ \text{kg}^{-1}$ 、全磷 (P_2O_5) $6.25\ \text{g}\ \text{kg}^{-1}$ 、全钾 $15.42\ \text{g}\ \text{kg}^{-1}$ 、碱解氮 $196.3\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ 、有效磷 $124.2\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ 、速效钾 $131.8\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ 。试验设为 4 个处理:(1)GM, 单施加 GM 菌剂(按 $225\ \text{kg}\ \text{hm}^{-2}$ 用量);(2)GI, 单施加 GI 菌剂(按 $225\ \text{kg}\ \text{hm}^{-2}$ 用量);(3)F, 正常施加磷酸二铵(按 $225\ \text{kg}\ \text{hm}^{-2}$ 用量);(4)CK, 不施加 AM 菌剂及化肥处理。每个处理重复 3 次共划分 12 个小区, 每小区 $15\ \text{m} \times 2\ \text{m}$, 随机排列。周围设置保护带。其余管理措施与大田种植大豆相同。

1.3 指标测定

1.3.1 菌根侵染率的测定 采用 KOH 脱色-酸性品红染色方法^[12]。大豆出苗期、分枝期、开花期和结荚期随机选取 50~100 条根段, 然后进行透明、染色、脱色、制片、镜检观察, 按照下式计算侵染率。菌根侵染率 = (AM 真菌侵染的根段数/检测根段总数) $\times 100\%$ 。

1.3.2 大豆结荚期根际土壤中可培养微生物菌落计数 细菌分离采用牛肉膏蛋白胨培养基, 真菌分离采用虎红培养基, 放线菌分离采用高氏 1 号培养基。分别称取每个处理的新鲜土样, 按 10 倍稀释法逐一稀释, 进行涂布平板^[13]、计数, 每个处理重复 3 次。

1.3.3 大豆结荚期根际土壤 AM 真菌孢子密度的测定和鉴定 取不同处理大豆根际土壤, 采用湿筛倾析蔗糖离心法分离根际土壤中的 AM 真菌孢子, 并在解剖镜下计数, 计算每 $10\ \text{g}$ 烘干土中的孢子数^[14]。挑选出孢子, 采用形态学鉴定法, 根据孢子的大小、颜色、孢壁结构、连孢菌丝的特征以及在各种封片剂中的理化反应等, 参照 Schenck 和 Perez^[15] 的“VA 菌根真菌鉴定手册”以及 INVAM 网 (<http://>

www.invam.caf.wvu.edu) 上的鉴定图片, 并参阅近几年发表的新种、新记录种以及国内外种属描述特征资料, 按照 Morton 和 Redecker^[16] 的分类系统进行 AM 真菌种的鉴定。

1.3.4 PCR-DGGE 方法分析大豆根系及根际土壤 AM 真菌菌群结构 大豆植株根系基因组提取采用的是植物基因组快速抽提试剂盒, 根际土壤基因组提取采用的是土壤基因组提取试剂盒 (E. Z. N. A. Soil DNA Kit), 按照其使用说明操作。

大豆根系与根际土壤中 AM 真菌 Nested-PCR 扩增采用的 PCR 引物为 AM 真菌的特异性通用引物^[17], 通过三轮 PCR 反应扩增出大豆根系及根际土壤 AM 真菌特异性片段。PCR 扩增引物如表 1 所示, 第一次 PCR 扩增采用真菌 18S rDNA 通用引物对 GeoA2 和 Geo11; 第二次 PCR 扩增采用 AM 真菌特异性引物对 NS31-GC 和 AM1; 第三次 PCR 扩增采用 18S rDNA NS31-Glo1 区通用引物对 NS31-GC 和 Glo1。取不同试验处理的第三次 PCR 扩增产物各 $5\ \mu\text{l}$, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 Nested-PCR 扩增结果。

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 Primers for PCR amplification

引物 Primer	碱基序列 Sequences
GeoA2	5'-CCAGTAGTCATATGCTTGTCTC-3'
Geo11	5'-ACCTTGTACGACTTTTACTTCC-3'
AM1	5'-GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA-3'
NS31-GC	5'-TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3'
Glo1	5'-GCCTGCTTTAAACACTCTA-3'

注: NS31-GC 的 5'端 5'-CGCCCGGGCGCGCCCGGGCGGGGGCGGGCACGGGG-3' 序列 Note: the 5' end of NS31-GC is 5'-CGCCCGGGCGCGCCCGGGCGGGGGCGGGCACGGGG-3'

DGGE 条件优化方法参照文献[18], 电泳检测方法参照文献[19]。DGGE 条带的回收、测序及分析参照文献[20]。

1.4 数据分析

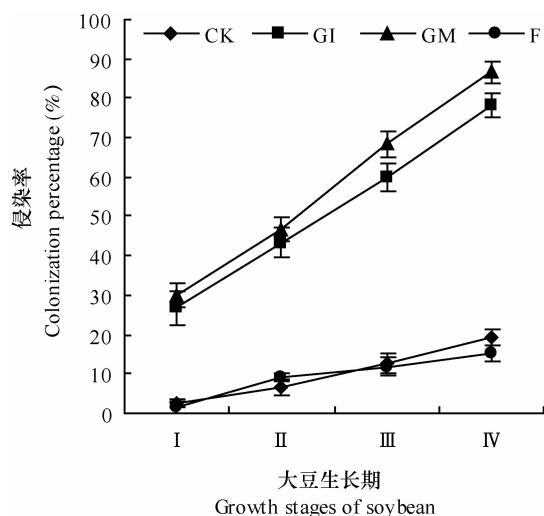
DGGE 数据采用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件进行分析; 其他试验数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理及 Duncun 单因素方差分析。

2 结 果

2.1 大豆菌根侵染率的变化

对 GI、GM、F 和 CK 处理的大豆在出苗期、分枝

期、开花期和结荚期分别取样测定菌根侵染率,结果如图 1 所示。随着大豆整个生长时期的变化,两种 AM 真菌均能很好地与大豆形成菌根共生体,并且侵染率随着生长时间的增加呈现逐渐增大的趋势。不同试验处理均在大豆结荚期时菌根侵染率达到最高(GI 处理为 78.3%,GM 处理为 86.6%)。从大豆整个生长期来看,GM 处理的菌根侵染率均高于 GI 处理,表明 GM 与大豆的共生关系更密切,根系内可见大量的菌丝和孢囊。同时,F 处理和 CK 处理的大豆在各个生长时期也检测到了有 AM 真菌的侵染,在大豆结荚期最高侵染率分别达到 15.3% 和 16.0%,表明土著 AM 真菌也能与大豆形成菌根共生体,CK 处理略高于 F 处理,可能原因是施肥对 AM 真菌的侵染有一定的抑制作用,但与 CK 相比差异不显著($p > 0.05$)。



注: I, 出苗期; II, 分枝期; III, 开花期; IV, 结荚期; GI, 施加根内球囊霉 (*G. intraradices*, GI) 处理; GM, 施加摩西球囊霉 (*G. mosseae*, GM) 处理; F, 施加化肥处理; CK, 不施加 AM 菌剂及化肥处理。下同 Note: I, Seedling stage; II, Branching stage; III, Flowering stage; IV, Pod-setting stage; GI, Inoculation with *G. intraradices*; GM, Inoculation with *G. mosseae*; F, Fertilization; CK, No inoculation and no fertilization. The same below

图 1 不同试验处理下大豆的菌根侵染率变化

Fig. 1 Mycorrhizal colonization rate of soybean root relative to treatment

2.2 不同试验处理对大豆根际土壤可培养微生物数量的影响

细菌、真菌和放线菌是土壤中重要的微生物类群。从表 2 的数据可以看出,大豆根际土壤中真菌的数量最少,细菌的数量最多,施加化肥与施加 AM 菌剂均能提高土壤中细菌、真菌和放线菌的数量。其中 F 处理对土壤中的细菌和放线菌影响最大,而 GM 处理对土壤中真菌的影响较大。施加 AM 菌剂

能提高土壤中三大菌群的数量,可能是由于菌根真菌侵染大豆根系形成共生体后能分泌某种物质促进土壤根际微生物的生长和繁殖。而施加化肥能提高土壤根际微生物的数量,可能是由于化肥改善大豆根系周围土壤的养分情况,促进作物根系生长,进而促进了根际微生物的繁殖。

表 2 不同试验处理大豆根际土壤中微生物数量

Table 2 Population of microbes in soybean rhizospheric soil relative to treatment

处理 Treatment	细菌 Bacteria (10^6 cfu g ⁻¹ soil)	真菌 Fungi (10^3 cfu g ⁻¹ soil)	放线菌 Actinomycetes (10^4 cfu g ⁻¹ soil)
CK	37.7 ± 1.8b	12.0 ± 1.2b	32.0 ± 1.2c
GI	48.7 ± 1.5ab	19.0 ± 1.2a	41.0 ± 1.2b
GM	50.0 ± 3.2a	22.3 ± 2.0a	44.0 ± 0.6ab
F	56.0 ± 2.9a	19.3 ± 0.9a	46.3 ± 1.5a

注:表中的数值为平均值 ± 标准误 ($n = 3$)。同列不同小写字母表示数值差异显著 ($p < 0.05$) Note: The values in the table are means ± SE ($n = 3$). Different lowercase letters in the same column indicate significant difference between treatments in population of soil microbes ($p < 0.05$)

2.3 大豆根际土壤中 AM 真菌的形态学鉴定

在大豆根际土壤中共分离获得 3 种无梗囊霉属 (*Acaulospora*) 和 7 种球囊霉属 (*Glomus*) 的 AM 真菌 (表 3)。其中包括外源施加的 GM 和 GI 两种球囊霉属真菌,孢子形态见图 2。在大豆结荚期根际土壤中 AM 真菌孢子密度很低,可能原因是土壤中本身 AM 真菌的数量较少,或者与部分孢子已萌发以菌丝体的方式存在于土壤中有关。从不同处理大豆根际土壤中 AM 真菌孢子密度与出现频度分析, *Glomus* sp. 1 和 *Glomus* sp. 2 可能是土壤中主要的土著 AM 真菌类群,土壤中不含有土著 *G. intraradices* 和 *G. mosseae* 真菌,但在外源施加 GM、GI 菌剂的情况下, *G. intraradices* 和 *G. mosseae* 真菌仍能成为各自处理的主要生理类群,占据主导生态位。

2.4 不同试验处理大豆根系及根际土壤中 AM 真菌的 18S rDNA 鉴定与分析结果

2.4.1 大豆根系及根际土壤基因组的提取效果

大豆根系总基因组的提取采用的是植物基因组快速抽提试剂盒,经过 1% 的琼脂糖凝胶电泳直接检测,目的条带单一、清晰可见、没有拖尾现象,说明 DNA 提取的效果较好。从图 3a 中可以看出,CK、GI 和 GM 这 3 个试验处理的大豆根系基因组大于 15 000 bp,而 F 处理的大豆根系基因组略小于前

3 个处理,大小约为 15 000 bp。而 4 个试验处理的大豆根际土壤总基因组片段大小也均为 15 000 bp 左右,如图 3b。

2.4.2 大豆根系及根际土壤基因组的 PCR 扩增结

果 从不同试验处理的样品进行基因组 PCR 扩增,三次 PCR 扩增后,经 1% 的琼脂糖电泳检测得到的大豆根系与根际土壤的 DNA 片段大小如图 4 所示。

表 3 不同试验处理大豆结荚期根际土壤 AM 真菌孢子

Table 3 Density of AM fungal spores in soybean rhizospheric soil at the pod-setting stage relative to treatment

处理 Treatment	孢子密度 Spore density (pieces 10 g ⁻¹ soil)	鉴定结果 Identification	孢子图编号 Sporephoto No.
CK	15	<i>Glomus</i> sp. 1	1
	23	<i>Glomus</i> sp. 2	2
	5	<i>G. versiforme</i>	6
	2	<i>Acaulospor</i> sp. 1	10
	106	<i>G. intraradices</i>	5
GI	8	<i>G. etunicatum</i>	4
	5	<i>Glomus</i> sp. 1	1
	11	<i>Glomus</i> sp. 2	2
	2	<i>A. spinosa</i>	7
	88	<i>G. mosseae</i>	3
GM	11	<i>Glomus</i> sp. 1	1
	9	<i>Glomus</i> sp. 2	2
	1	<i>A. rehmi</i>	9
	18	<i>Glomus</i> sp. 2	2
F	3	<i>G. versiforme</i>	6
	2	<i>Glomus caledonium</i>	8

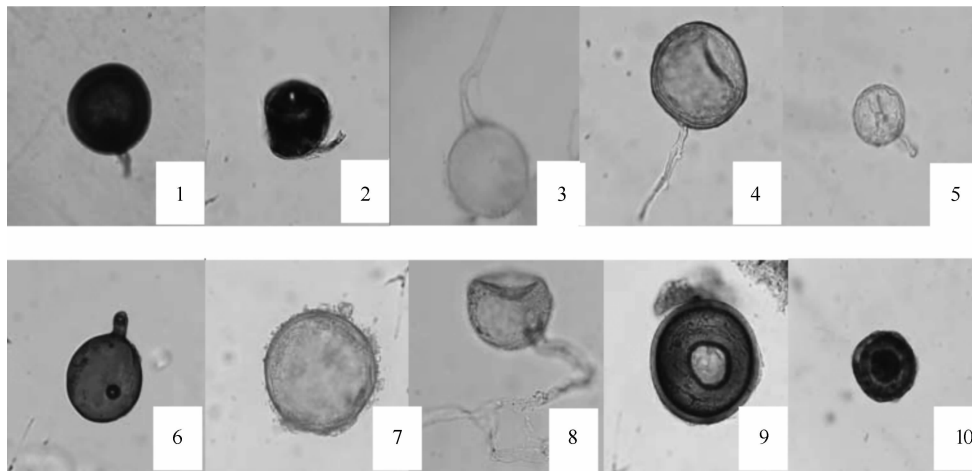
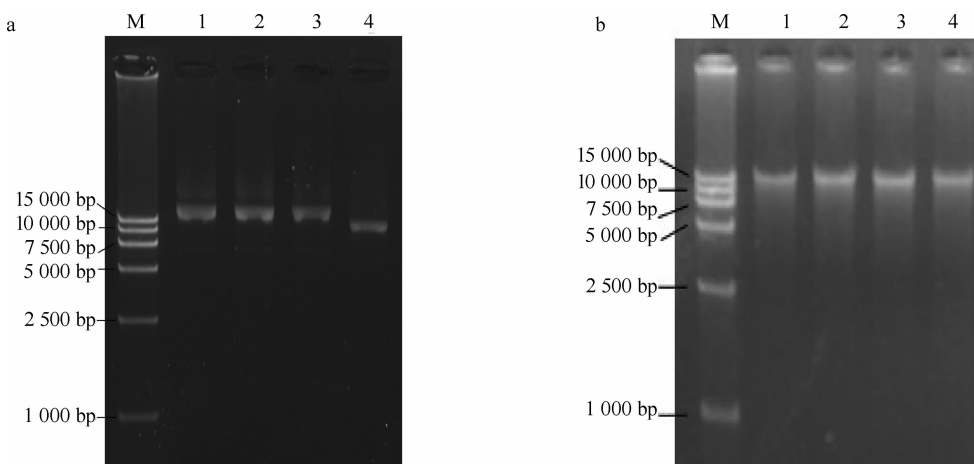


图 2 不同处理大豆结荚期根际土壤中孢子形态

Fig. 2 Morphology of spores in soybean rhizospheric soil at the pod-setting stage of soybean relative to treatment

2.4.3 DGGE 图谱条带的丰度分析 DGGE 图谱条带丰度是表示某一区域内物种的总数,用来统计不同试验处理泳道内所有条带数强度,客观反映了某一微生物群落中优势微生物所占的比例。通

过 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件对 DGGE 图谱各泳道中不同试验处理大豆根系的 DGGE 条带的丰度值进行分析,GM 处理大豆根系里的 AM 真菌丰度值最大,然后依次为 GI、CK 和 F 处理(见图 5a),说明 4



注: M, DL15 000 DNA Marker; 1, 对照; 2, 施加根内球囊霉 (*G. intraradices*, GI); 3, 施加摩西球囊霉 (*G. mosseae*, GM); 4, 施加化肥处理, 下同
 Note: M, DL15 000 DNA Marker; 1, CK; 2, Inoculation with *G. intraradices* (GI); 3, Inoculation with *G. mosseae* (GM); 4, Fertilization. The same below

图 3 不同试验处理大豆根系(a)及根际土壤(b)基因组

Fig. 3 Genome of the soybean root system (a) and rhizospheric soil (b) relative to treatment

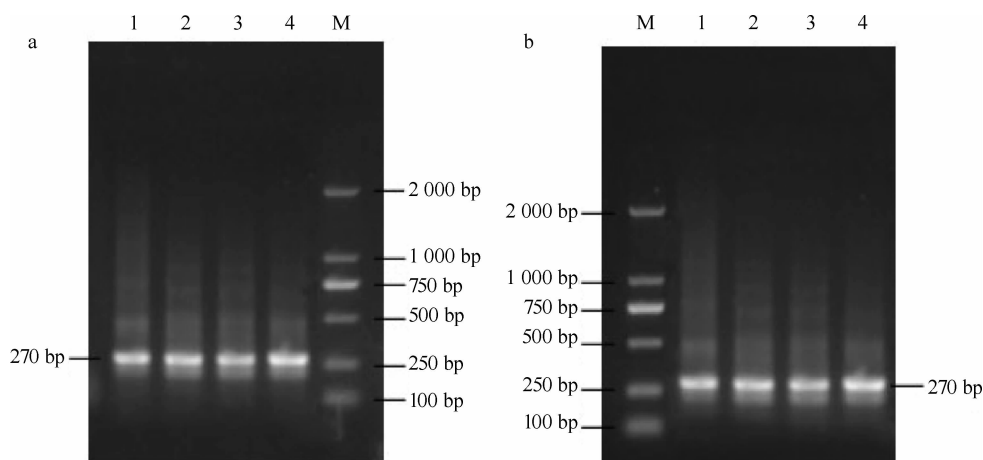


图 4 大豆根系(a)和根际土壤(b)第三次 PCR 结果

Fig. 4 The third round of PCR of the soybean root system (a) and rhizospheric soil (b)

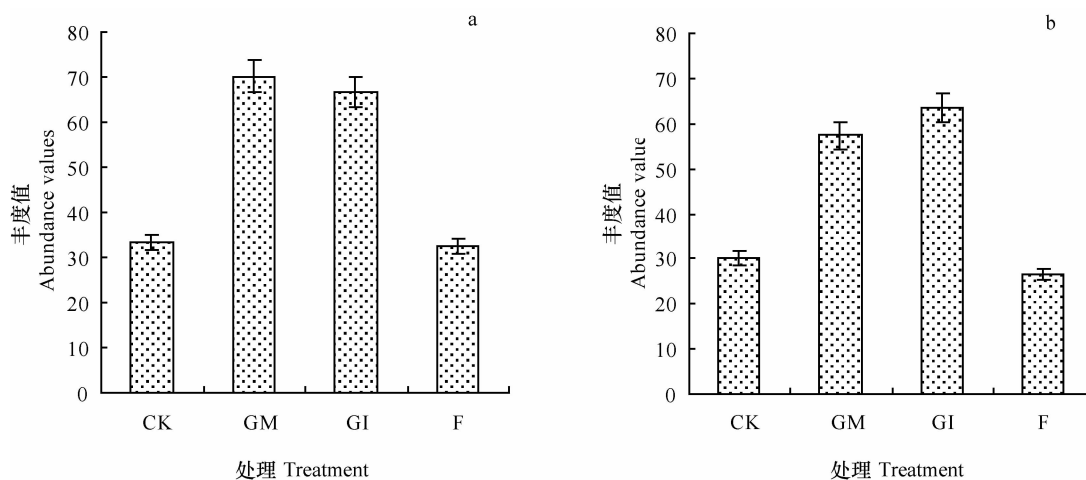


图 5 大豆根系(a)和根际土壤(b)DGGE 泳道丰度值

Fig. 5 Lane abundance of soybean root system DGGE (a) and rhizospheric soil DGGE (b)

个试验处理中,GM 处理侵染大豆根系的 AM 真菌的数量最多、强度最大。对不同试验处理的大豆根际土壤中的 DGGE 条带的丰度值进行分析,GI 处理的大豆根际土壤丰度值最大,其次为 GM、CK 和 F 处理(见图 5b),说明 GI 处理的土壤中总的 AM 真菌的数量最多,而 F 处理的土壤中总 AM 真菌的数量最少。

2.4.4 DEEG 条带的回收、测序及分析 通过 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件分析大豆根系与根际土壤的 DEEG 图谱,对所获得的 14 条优势条带(根系中

R1 ~ R6 共计 6 条,根际土壤中 S1 ~ S8 共计 8 条)进行回收。回收后的样品用第三次 PCR 扩增的引物进行扩增,PCR 的产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明扩增产物的 DNA 片段大小与 DGGE 上样品条带大小一致,且条带较亮,说明回收成功。对所选取的 14 条优势条带所对应的阳性克隆的菌液送至上海生工生物工程有限公司进行测序,测序结果在 NCBI 中进行 BLASTn 分析,与 GenBank 中的序列进行比对,获得各序列的同源性信息见表 4。

表 4 DGGE 条带序列的 BLASTn 结果

Table 4 BLASTn of the DGGE band sequences

条带编号 Band No.	序列长度 Sequence size (bp)	NCBI 数据库中最相似菌种(登录号) The strains which have the highest identity from NCBI (Accession)	E 值 Evalue	相似性 Max identity
R1	236	Uncultured <i>Glomus</i> (AM946878)	9e-114	99%
R2	230	Uncultured <i>Glomus</i> (HQ263061)	9e-104	97%
R3	236	<i>Glomus mosseae</i> (JN715800)	2e-115	99%
R4	232	<i>Glomus mosseae</i> (FR751303)	1e-111	98%
R5	233	<i>Glomus intraradices</i> (FR717169)	4e-112	99%
R6	231	Uncultured <i>Glomus</i> (FM875902)	2e-110	98%
S1	236	Uncultured <i>Glomus</i> (JN559818)	1e-117	99%
S2	236	Uncultured <i>Glomus</i> (JGQ336519)	2e-115	99%
S3	236	<i>Glomus mosseae</i> (JN715800)	2e-115	99%
S4	231	Uncultured <i>Glomus</i> (EF177559)	7e-105	97%
S5	230	<i>Glomus viscosum</i> (AJ505812)	4e-107	97%
S6	239	Uncultured <i>Glomus</i> (HQ424229)	5e-111	98%
S7	233	<i>Glomus intraradices</i> (FR717169)	4e-112	98%
S8	233	Uncultured <i>Glomus</i> (FR821567)	5e-111	98%

表中数据表明,这 14 条优势条带与已知的 AM 真菌具有较高的相似性,其中 R3 和 S3 所代表的菌群与摩西球囊霉(*G. mosseae*)有较高的相似性,相似性达到 99%,R5 和 S7 所代表的条带与根内球囊霉(*G. intraradices*)具有较高的相似性,相似性达到 98%,而这两种 AM 真菌分别为本试验外源施加的 AM 菌剂,说明本试验外源施加的两种 AM 菌剂与土著的 AM 真菌相比在大豆根系及根际土壤中均具有优势性。R1、R2、R6、S1、S2、S4、S6、S8 这 8 条条带所代表的菌群均属于未知 AM 真菌,与 Uncultured *Glomus* 具有高度的相似性。S5 所代表的菌群与黏性球囊霉(*G. viscosum*)具有高度的相似性,相似性达到 97%。通过以上结论可知,大豆根系及根

际土壤中的 14 条优势条带均属于球囊霉属(包括外源施加的两种 AM 真菌),其中 GM 和 GI 处理的大豆根系及根际土壤中的优势菌群分别为外源施加的两种 AM 真菌。

3 讨论

本试验选用两种 AM 菌剂(*G. intraradices* 和 *Glomus mosseae*)在黑土农田施加试验,在大豆结荚期测得菌根侵染率最高达到 78.3% 和 86.6%,说明选用的 2 种 AM 菌剂均与大豆形成了良好的共生关系,该结果与贺学礼等^[21]研究相一致。实验中 F 与 CK 处理的大豆也有 AM 真菌侵染,但侵染率很低,这

可能与土著 AM 真菌菌群数量过少有关(见表 3)。

试验中施加 AM 菌剂处理的大豆根际土壤中可培养的细菌、真菌和放线菌的数量要明显高于 CK 处理, F 处理对土壤中三大微生物种群的数量也均有显著的提高, 并且细菌和放线菌的数量要优于施加 AM 菌剂的两个试验处理。AM 真菌影响了植物根围微生物多样性特征的结果与喻会平^[22]、郭欢^[23]等的研究结果相一致。

AM 真菌是土壤生态系统中广泛分布的微生物类群, 由于不能人工纯培养, 制约了对其深入研究和应用。近年来, PCR-DGGE 技术在 AM 真菌多样性的研究方面已经得到了应用^[24], 使人们对这种土壤微生物有了进一步认识。本研究中 DGGE 结果表明在大豆根际土壤中的 AM 真菌菌群数明显高于大豆根系中的 AM 真菌的菌群数量, 并且在大豆根系及根际土壤中发现的优势菌均为本试验外源施加的 AM 真菌, 表明试验外源施加的两种 AM 菌剂比大田土壤中土著 AM 真菌具有优势性, 并且在大豆根系中也具有优势性, 结果证实了田间人工施加 AM 菌剂的可行性, 为明确外源施加 AM 真菌与土著 AM 真菌之间的竞争关系提供了理论依据。

4 结 论

田间施加根内球囊霉 (*Glomus intraradices*, GI) 和摩西球囊霉 (*Glomus mosseae*, GM) 两种 AM 菌剂均能与大豆植株建立良好的共生体系, 菌根侵染率分别是 CK 处理的 4.9 倍和 5.4 倍。施加 AM 菌剂及施加化肥均能显著提高大豆根际土壤中可培养的细菌、真菌和放线菌三大微生物类群数量。采用湿筛倾析蔗糖离心法分离大豆结荚期根际土壤中 AM 真菌孢子, 共获得 *Acaulospora* 属真菌 3 种, *Glomus* 属真菌 7 种(其中包括外源施加的 2 种 *Glomus* 属真菌), 但孢子密度均很低, 外源施加的 2 种 *Glomus* 属真菌成为根际土壤中主要的 AM 真菌类群。采用 PCR-DGGE 方法对大豆根系及根际土壤中的 AM 真菌菌群结构进行分析, 获得的 14 条优势条带均属于球囊霉属 (*Glomus*), 其中大豆根系及根际土壤中的 5 条优势条带与试验所施加的两种 AM 真菌 (*G. intraradices*, *G. mosseae*) 具有较高的相似性。证明了田间人工施加 AM 菌剂的有效性及其可能性。

参 考 文 献

- [1] 魏丹, 杨谦, 迟凤琴. 东北黑土区土壤资源现状与存在问题. 黑龙江农业科学, 2006(6):69—72. Wei D, Yang Q, Chi F Q. The soil resource conditions and the problems in northeast black soil regions (In Chinese). Heilongjiang Agricultural Sciences, 2006(6):69—72
- [2] 于磊, 张柏. 中国黑土退化现状与防治对策. 干旱区资源与环境, 2004, 18(1):99—103. Yu L, Zhang B. The degradation situation of black soil in China and its prevention and counter measures (In Chinese). Journal of Arid Land Resources and Environment, 2004, 18(1):99—103
- [3] Jenkinson D S, Ladd J N. Microbial biomass in soil: Measurement and turnover//Paul E A, Ladd J N. Soil biochemistry. New York: Dekker, 1981: 415—471
- [4] 李秀英, 赵秉强, 李絮花, 等. 不同施肥制度对土壤微生物的影响及其与土壤肥力的关系. 中国农业科学, 2005, 38(8):1591—1599. Li X Y, Zhao B Q, Li X H, et al. Effects of different fertilization systems on soil microbe and its relation to soil fertility (In Chinese). Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(8):1591—1599
- [5] 魏巍, 许艳丽, 朱琳, 等. 长期施肥对黑土农田土壤微生物群落的影响. 土壤学报, 2013, 50(2):373—380. Wei W, Xu Y L, Zhu L, et al. Effects of long-term fertilization on soil microbial community of black soil farmland (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2013, 50(2):373—380
- [6] 王保民, 任萌圃. 丛枝菌根应用研究进展. 湖北农业科学, 2004(3):56—59. Wang B M, Ren M P. Progress in the application of arbuscular mycorrhiza research (In Chinese). Hubei Agricultural Sciences, 2004(3): 56—59
- [7] 吴强盛, 邹英宁, 王贵元. 丛枝菌根真菌生态学研究进展. 长江大学学报:自然科学版农学卷, 2007, 4(2):76—80. Wu Q S, Zou Y N, Wang G Y. Progress of arbuscular mycorrhizal fungi ecology (In Chinese). Journal of Yangtze University: Nature Science Edition Agricultural Science Volume, 2007, 4(2): 76—80
- [8] Streitwolf-Engel R, van der Heijden M G A, Wiemken A, et al. The ecological significance of arbuscular mycorrhizal fungal effects on clonal reproduction in plants. Ecology, 2001, 82(10): 2846—2859
- [9] van der Heijden M G A, Boller T, Wiemken A, et al. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. Ecology, 1998, 79(6): 2082—2091
- [10] Koch A M, Kuhn G, Fontanillas P, et al. High genetic variability and low local diversity in a population of arbuscular mycorrhizal fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(8): 2369—2374
- [11] 宋福强, 程蛟, 常伟, 等. 田间施加 AM 菌剂对大豆生长效应的影响. 中国农学通报, 2013, 29(6):69—74. Song F Q, Cheng J, Chang W, et al. The impact of AM fungi on soybean growth with AM inoculum addition in field (In Chinese). Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(6):69—74
- [12] Phillips J M, Hayman D S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society, 1970, 55(1): 158—161

- [13] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002. Zhao B, He S J. Microbiology experiment (In Chinese). Beijing: Science Press, 2002
- [14] 唐明, 黄艳辉, 盛敏, 等. 内蒙古盐碱土中 AM 真菌的多样性与分布. 土壤学报, 2007, 44(6): 1104—1110. Tang M, Huang Y H, Sheng M, et al. Inner Mongolia AM fungi in saline alkaline soil diversity and distribution (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2007, 44(6): 1104—1110
- [15] Schenck N C, Perez Y. Manual for the identification of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. 2nd ed. Gainesville, Florida, USA: Synergistic Publications, 1988: 1—233
- [16] Morton J B, Redecker D. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraflopus*, based on concordant molecular and morphological characters. Mycologia, 2001, 93(1): 181—195
- [17] 接伟光. 黄檗 (*Phellodendron amurense*) 丛枝菌根真菌鉴定及菌群结构分析. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2008. Jie W G. The analysis of the arbuscular mycorrhizal fungi identification and microbial community in the rhizosphere of *Phellodendron amurense* (In Chinese). Harbin: Heilongjiang University, 2008
- [18] 李瑾. 硫素对不同大豆品种 AM 真菌侵染影响及菌群结构分析. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2011. Li J. Sulfur of different soybean varieties AM fungal infection and microbial community structure analysis (In Chinese). Harbin: Heilongjiang University, 2011
- [19] 黄京华, 骆世明, 曾任森, 等. 磷胁迫下 AMF 对玉米生长的影响. 广西农业生物科学, 2006, 25(4): 321—324. Huang J H, Luo S M, Zeng R S. Effects of AMF on maize plant growth under phosphorus stress (In Chinese). Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science, 2006, 25(4): 321—324
- [20] 王雪. 利用 PCR-DGGE 技术分析不同生境黄檗 AM 真菌多样性. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2009. Wang X. Analysis of *Phellodendron amurense* AM fungal diversity in different habitats by PCR-DGGE technology (In Chinese). Harbin: Heilongjiang University, 2009
- [21] 贺学礼, 赵丽莉, 杨宏宇. 毛乌素沙地豆科植物丛枝真菌分布研究. 自然科学进展, 2006, 16(6): 684—688. He X L, Zhao L L, Yang H Y. Maowusu sandland leguminous plants to arbuscular fungi distribution research (In Chinese). Advances in Nature Science, 2006, 16(6): 684—688
- [22] 喻会平, 夏海乾, 张恒, 等. 复合肥配施油枯对植烟土壤根际微生物的影响. 贵州农业科学, 2010, 38(5): 122—124. Yu H P, Xia H Q, Zhang H, et al. Effect of combined application of compound fertilizer and rapeseed cake on rhizospheric microbes of tobacco soils (In Chinese). Guizhou Agricultural Sciences, 2010, 38(5): 122—124
- [23] 郭欢, 曾广萍, 刘红玲, 等. 丛枝菌根真菌对红花根围微生物多样性特征的影响. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1214—1224. Guo H, Zeng G P, Liu H L, et al. How arbuscular mycorrhiza fungi affect on rhizosphere microbe diversity of *Carthamus tinctorius* L. in Xinjiang (In Chinese). Microbiology China, 2013, 40(7): 1214—1224
- [24] 蔡柏岩, 葛菁萍, 接伟光, 等. 黄檗根围丛枝菌根真菌菌群组成. 菌物学报, 2009, 28(4): 512—520. Cai B Y, Ge J P, Jie W G, et al. The community composition of the arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of *Phellodendron amurense* (In Chinese). Mycosystema, 2009, 28(4): 512—520

IMPACT OF INOCULATION WITH AM FUNGI ON MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE IN SOYBEAN RHIZOSPHERE IN FARMLAND OF BLACK SOIL

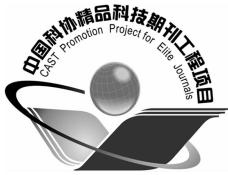
Song Fuqiang Cheng Jiao Chang Wei[†] Meng Jianxia Zhao Tianqi Wang Chen
(School of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

Abstract To explore impact of inoculation with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on microbial community structure in soybean rhizosphere, a field experiment was carried out using soybean as object of the study. Two different strains of AM fungi, *Glomus intraradices* (GI) and *Glomus mosseae* (GM), were inoculated into the experiment field with soybean seeds in Treatments GI and GM, respectively, and not in Treatments F (fertilized only) and CK (neither fertilized nor inoculated) as control for comparison. Traditional and modern molecular biological approaches were employed to investigate microbial community structure in the rhizosphere and AM fungi diversity in the root system of the soybean. Results show that both the two strains of AM fungi could colonize soybean roots, forming mycorrhizal symbionts in the field, with colonization rate reaching 78.3% and 86.6% in Treatments GI and GM, respectively, and 15.3% and 16.0% in Treatments F and CK, respectively, which indicates that indigenous AM fungi can also form mycorrhizal symbionts in the field, but their colonization rates were much lower. Analysis using the dilution-plate method of community structure of culturable microbes in the soybean rhizosphere revealed that Treatments GI, GM and F all significantly elevated the abundance of the three soil microbiota: bacteria, fungi and actinomycetes, as compared with CK ($p < 0.05$). The effect was the highest on

bacteria and actinomyces in Treatment F and on fungi in Treatment GM. Besides, the wet sieve decantation and sucrose centrifugation method was used to isolate AM fungal spores from the rhizospheric soil samples collected at the pod-setting stage of soybean. As a result, 3 species in *Acaulospora* genus and 7 in *Glomus* genus were obtained, with *G. intraradices* and *G. mosseae* being the dominant species, separately, in the genera and they were all quite low in spore density. Afterwards, PCR-DGGE was carried out, to explore band abundance and sequence dominant bands of the PCR-DGGE profiles in the root system and rhizospheric soil of soybean at the pod-setting stage. Molecular detection shows that the population of AM fungi was remarkably higher in the soybean rhizospheric soil than in the soybean root system, and the abundance of AM fungi was the highest in the soybean root system of Treatment GM, while the population of AM fungi in soil was the lowest in Treatment F. In Treatments GI and GM, the dominant fungus species in both soybean root system and rhizospheric soil were the inoculated exogenous AM fungi, which demonstrates the effectiveness and feasibility of application of AM inoculants. The findings of this study has supplied some basic data for promotion of the application of AM fungi inoculant in the field.

Key words AM fungi; Microbial community; Mycorrhizal colonization rate; DGGE; Abundance

(责任编辑: 卢 萍)



土壤学报

(Turang Xuebao)



第 52 卷 第 2 期 2015 年 3 月

目 次

综述与评论

- 理论施氮量的改进及验证——兼论确定作物氮肥推荐量的方法 巨晓棠(249)
- 森林土壤氧化亚氮排放对大气氮沉降增加的响应研究进展 方华军 程淑兰 于贵瑞等(262)

研究论文

- 商丹盆地黄土母质发育土壤的微形态特征及其诊断意义 庞奖励 黄春长 查小春等(272)
- 基于土壤氮素平衡的氮肥推荐方法——以水稻为例 宁运旺 张永春(281)
- 三峡库区紫色土的碎石分布特征 王小燕 王天魏 蔡崇法等(293)
- 黄土区坡耕地土壤结皮对入渗的影响 吴秋菊 吴 佳 王林华等(303)
- 基于局部加权回归的土壤全氮含量可见-近红外光谱反演 陈颂超 冯来磊 李 硕等(312)
- 五价砷在中国南方两类典型土壤中的迁移特征 李璐璐 张 华 周世伟等(321)
- 柠檬酸盐对黑云母表面溶解及微结构变化的影响 李继福 张文君 鲁剑巍等(329)
- 活化过硫酸钠氧化土壤对挥发性有机污染物吸附特性的影响 丁浩然 王 磊 龙 涛等(336)
- 退化喀斯特森林植被自然恢复中土壤有机碳 $\delta^{13}\text{C}$ 值特征 黄宗胜 喻理飞 符裕红等(345)
- 缓释复合肥对茄子产量和不同采果期品质的影响 王 菲 李银科 王正银等(355)
- 氮肥和秸秆施用对稻麦轮作体系下土壤剖面 N_2O 时空分布的影响 潘晓健 刘平丽 李 露等(364)
- 应用 ^{15}N 示踪法研究咸水滴灌棉田氮肥去向 张 文 周广威 闵 伟等(372)
- 中国南方基础工程建设中土壤生态修复技术体系与实践 徐国钢 程 睿 赖庆旺等(381)
- 黑土农田施加 AM 菌剂对大豆根际菌群结构的影响 宋福强 程 蛟 常 伟等(390)
- 自生固氮菌对土壤钾的活化作用 张 亮 袁 玲 黄建国(399)
- 长期保护性耕作对纤维素降解基因 *cbh 1* 多样性的影响 陈 坤 李传海 朱安宁等(406)
- 模拟条件下土壤硝化作用及硝化微生物对不同水分梯度的响应 刘若萱 张丽梅 白 刃等(415)
- 水力侵蚀影响下土壤有机碳和微生物数量动态变化特征 喻 为 李忠武 黄金权等(423)

研究简报

- 土壤制图中土壤类型配色模型构建与应用 徐爱国 张维理 张怀志等(431)
- 土壤专题图中采样点点位标识模型的构建 张怀志 张维理 徐爱国等(440)
- 非对称混合电解质体系中恒电荷颗粒表面与 Stern 电位的测定 樊会敏 赵 艳 刘新敏等(446)
- 植被重建下露天煤矿排土场边坡土壤碳储量变化 李俊超 党廷辉 薛 江等(453)
- 滨海盐渍化土壤理化性质与小麦生产间的关系 谢文军 张衍鹏 张 森等(461)

信息

- 第 20 届国际土壤与耕作研究组织大会 (414)
- 《土壤学报》2014 年度审稿专家名录 (467)

封面图片: 陕西丹凤盆地土壤黏化层典型微形态(由庞奖励提供)

CONTENTS

Reviews and Comments

- Improvement and validation of theoretical N rate (TNR)—Discussing the methods for N fertilizer recommendation Ju Xiaotang(261)
- Study on the responses of nitrous oxide emission to increased nitrogen deposition in forest soils; A review Fang Huajun, Cheng Shulan, Yu Guirui, et al. (270)

Research Articles

- Micromorphological features of soils derived from loess in Shangdan Basin and their significance in soil diagnosis Pang Jiangli, Huang Chunchang, Zha Xiaochun, et al. (279)
- Soil nitrogen balance based recommendation of nitrogen fertilization; A case study of rice ... Ning Yunwang, Zhang Yongchun(292)
- Spatial distribution of rock fragments in purple soil in Three Gorges Reservoir Area Wang Xiaoyan, Wang Tianwei, Cai Chongfa, et al. (301)
- Effects of soil crusts on infiltration in slope land in the Loess Area Wu Qiuju, Wu Jia, Wang Linhua, et al. (311)
- Vis-NIR spectral inversion for prediction of soil total nitrogen content in laboratory based on locally weighted regression Chen Songchao, Feng Lailei, Li Shuo, et al. (319)
- Migration of pentavalent antimony in two types of soils typical to South China Li Lulu, Zhang Hua, Zhou Shiwei, et al. (327)
- Effects of citrate dissolving surface and altering microstructure of biotite Li Jifu, Zhang Wenjun, Lu Jianwei, et al. (335)
- Effect of soil oxidation with reactivated sodium persulfate on sorption of volatile organic contaminants Ding Haoran, Wang Lei, Long Tao, et al. (343)
- Characteristics of $\delta^{13}\text{C}$ value of soil organic carbon under naturally restoring degenerative karst forest Huang Zongsheng, Yu Lifei, Fu Yuhong, et al. (353)
- Effects of slow-release compound fertilizer on yield and quality of eggplant relative to timing of harvest Wang Fei, Li Yinke, Wang Zhengyin, et al. (362)
- Spatial and temporal distributions of soil profile N_2O as affected by N fertilization and straw incorporation in the rice-wheat rotation system Pan Xiaojian, Liu Pingli, Li Lu, et al. (371)
- Fate of fertilizer N in saline water drip-irrigated cotton field using ^{15}N tracing method Zhang Wen, Zhou Guangwei, Min Wei, et al. (379)
- Soil ecology remediation technical system and its practice in infrastructure construction in South China Xu Guogang, Cheng Rui, Lai Qingwang, et al. (389)
- Impact of inoculation with AM fungi on microbial community structure in soybean rhizosphere in farmland of black soil Song Fuqiang, Cheng Jiao, Chang Wei, et al. (397)
- Mobilization of potassium in soils by *Azotobacter* Zhang Liang, Yuan Ling, Huang Jianguo(404)
- Effects of long-term conservation tillage on diversity of cellulose degradating gene *cbh I* in Fluvo-aquic soil Chen Kun, Li Chuanhai, Zhu Anning, et al. (413)
- Response of nitrification and nitrifier to change in soil moisture content under simulated conditions Liu Ruoxuan, Zhang Limei, Bai Ren, et al. (421)
- Dynamics of soil microbial population and organic carbon under water erosion Yu Wei, Li Zhongwu, Huang Jinquan, et al. (430)

Research Notes

- Construction of a color matching model for soil types and its application to soil mapping Xu Aiguo, Zhang Weili, Zhang Huaizhi, et al. (439)
- Development of soil sampling point labeling model for the matic soil maps Zhang Huaizhi, Zhang Weili, Xu Aiguo, et al. (445)
- Principle for determination of surface potential and Stern plane potential of constant charged particles in asymmetric mixed electrolyte solutions Fan Huimin, Zhao Yan, Liu Xinmin, et al. (452)
- Variability of soil organic carbon storage in dump slope of opencast coal mine under revegetation Li Junchao, Dang Tinghui, Xue Jiang, et al. (460)
- Relationships between soil physicochemical properties and wheat production in coastal saline soil Xie Wenjun, Zhang Yanpeng, Zhang Miao, et al. (466)

Cover Picture: Typical micromorphological photos in Horizon Bt of the soil profile in Danfeng Basin, Shaanxi Province, China (by Pang Jiangli)