

丛枝菌根真菌研究中土壤灭菌方法综述

谢越, 杨高文, 周翰舒, 张英俊

(中国农业大学草地研究所, 北京 100193)

摘要:丛枝菌根真菌与植物根系的共生关系是当今微生物领域的研究热点之一。建立无丛枝菌根真菌的对照则是此研究的难点。本研究综述了高温灭菌法、 γ 射线灭菌法、化学熏蒸法、苯菌灵抑制法和物理割断法5种常用方法。每种方法各有利弊,高温灭菌法、 γ 射线灭菌法和化学熏蒸法适用于室内试验,但前两者对土壤理化性质有一定的影响,化学熏蒸法会破坏环境;苯菌灵抑制法和物理割断法适用于室外试验,其中前一种方法会破坏环境,需严格控制药剂用量,后一种方法虽环保,但可能影响土壤中水分和营养成分的交换。因此,研究者应根据研究环境和目的选择适宜的方法。

关键词:丛枝菌根真菌(AMF);高压蒸汽法; γ 射线灭菌;化学熏蒸;苯菌灵;物理割断法

中图分类号:S154.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0629(2012)05-0724-09

* 1

植物与丛枝菌根真菌(AMF)共生现象在自然界中分布十分普遍。从1885年第1篇关于菌根的研究到现在,人们对这种共生关系的探索还在不断进行中^[1]。在植物生长过程中,AMF会影响幼苗建植^[2-3]、植物生长^[4-5]和繁殖^[6]。很多研究指出,AMF可以提高植物对养分的吸收^[7-10],影响水分的代谢^[11],提高植物的产量^[12-15],改善作物品质^[16-17],增加植物抗性^[18-22]。从生态学角度上来看,不同植物对不同AMF的依赖性不同,导致植物间竞争力发生改变,从而影响到植物群落的多样性^[23-24]。与此同时,植物也会作用于AMF并影响AMF的生物量和多样性^[25-26],而植物根系分泌物可以促进根系周围的AMF菌丝分支^[27]。如今,美国、澳大利亚以及欧洲不仅在植物个体水平上对AMF进行研究,也扩展到了植物群体水平上,而我国在植物群体水平上的研究还相对匮乏^[28]。

在AMF研究中,无AMF对照是研究AMF作用的关键,因为只有通过与无AMF条件下植物的生长反应相比较,才能反映AMF对植物的作用。在对土壤进行灭菌的过程中,最理想的状态是获得在灭菌过程中没有引起任何土壤理化性质变化,并且杀灭了所有AMF的灭菌土壤^[29]。只有在这样

的灭菌土壤中进行试验,才能不引入对试验结果产生干扰的其他因素。欧美国家对已有的建立无AMF的方法进行了探究^[30-31],而我国缺乏对其方法的研究。现有方法或多或少都会对土壤理化性质以及土壤微生物群落产生影响。本研究将对现在常用的几种设置无AMF对照的方法进行综述,旨在为研究者根据目的选择适宜的方法提供依据。

1 常用方法

目前,在AMF研究中,常根据试验条件将灭菌方法分为室内灭菌法和室外灭菌法。室内灭菌法包括高温灭菌法、 γ 射线灭菌法和化学熏蒸法。高温灭菌法是通过高温来杀灭土壤中的微生物,从而达到无菌状态; γ 射线灭菌法是依据 γ 射线能量高、穿透力强的特点,采用 Co^{60} 放射出 γ 射线,使细胞内各种活性物质例如DNA之间的C-C键发生断裂,从而达到杀死土壤微生物的目的;化学熏蒸法常采用化学试剂(如氯仿、甲醛或甲基溴)对土壤进行熏蒸,从而杀灭土壤生物。室外灭菌法包括杀真菌剂苯菌灵抑制法和物理割断法。苯菌灵是一种广谱、高效的内吸性杀真菌剂,它通过抑制真菌的细胞分裂来达到灭菌效果;物理割断法是将丙烯腈-苯乙烯-丁二烯(ABS)管的管外四周开4个孔,然后用

收稿日期:2011-07-30 接受日期:2011-10-12
基金项目:国家自然科学基金项目(21028120);牧草产业技术体系项目(ncyctx-037)
作者简介:谢越(1988-),女,四川乐山人,在读硕士生,研究方向为草地生态与管理。E-mail:xiyuede@yahoo.com.cn
通信作者:张英俊 E-mail:zhangyj@cau.edu.cn

孔径为 35 μm 的筛子封住管孔及管底,使植物根部无法通过网筛而细菌等可以通过。然后将管埋入野外试验地中,每周旋转管 45°以切断进入管内的外源菌丝。

各种方法都有自己的优点和缺点以及不同的适用条件,表 1 为常用几种方法的比较。在实际应用中,应根据具体情况选择对土壤和环境影响较小的方法。

表 1 常用建立无 AMF 对照方法比较

Table 1 Comparison of common methods to establish non-AMF

方法 Method	优点 Merit	不足 Drawback	适用条件 Suitable condition
高温灭菌法 Autoclaving	操作简单,成本低,无环境污染 Easy operation, low input, no contamination	引起土壤理化性质和生物特性变化,影响其他生物 Change chemical, physical and biological properties of soil, affect other creatures	室内试验/原生菌群和外源 AMF Indoor experiments/original AMF community and non-original AMF
γ 射线灭菌法 γ -irradiation	避免高温对土壤的伤害,无环境污染 Avoid harmness from high temperature to soil, no contamination	需专业人员操作,成本较高,对土壤性质有部分影响,影响其他生物 Experts needed, high input, partial effects on properties of soil, affect other creatures	室内试验/原生菌群和外源 AMF Indoor experiments/original AMF community and non-original AMF
化学熏蒸法 Chemical fumigation	操作简单,成本低 Easy operation, low input	污染环境 Contamination	室内试验/原生菌群和外源 AMF Indoor experiments/original AMF community and non-original AMF
苯菌灵抑制法 Benomyl	操作简单 Easy operation	污染环境,可能影响其他生物 Contamination, may affect other creatures	室外试验/原生菌群 Outdoor experiments/original AMF community
物理隔断法 Severance of hyphae	无环境污染 No contamination	操作较为复杂,可能影响土壤中物质交换 Hard operation, may affect transiton of substance	室外试验/原生菌群 Outdoor experiments/original AMF community

2 室内灭菌法

2.1 高温灭菌法 高温灭菌通常在 120 $^{\circ}\text{C}$ 下灭菌 30 min 到 4 h 不等。有研究指出^[30],采用高温灭菌对土壤进行灭菌的最短时间为 20~30 min,时间越长给土壤带来的伤害越大。Darbar 和 Lakzian^[31]报道了高温灭菌、化学熏蒸、微波灭菌以及紫外线灭菌几种灭菌方式对土壤微生物和化学性质的影响,发现上述方法中高温灭菌法对减少微生物量作用最好。

高温灭菌法会影响土壤的理化性质(pH 值、阳离子含量、团聚体等)^[30,32-33]和生物特性(呼吸作用)。由于高温灭菌法改变了土壤的理化、生物性质,那么势必产生对植物的毒副作用,因此一般经过高温灭菌的土壤需要放置一段时间,以使土壤里可挥发的毒素释放出来。对于毒副作用产生原因的说法各不相同。有学者对高温灭菌土壤的营养元素进

行分析发现,灭菌后土壤中可溶性锰含量会增加^[33-35],并认为这是植物毒副作用形成的原因。Wolf 等^[36]在对不同土壤类型的试验中还发现锰含量增加了 5 倍而铁的含量却下降了。Rovira 和 Bowen^[37]在其试验中采用土壤洗出液培养植物,发现毒副作用主要来源于可溶性的物质,并认为土壤对植物的毒副作用可能是来自于有毒的有机物的形成;Darbar 和 Lakzian^[31]也认为对土壤理化性质的改变来源于可溶性有机酸的释放。然而 Smith 和 Smith^[35]通过将高温灭菌和没有处理过的土壤混合之后与没有处理的土壤进行比较,发现高温灭菌土壤不存在对植物生长以及菌根真菌侵染的影响。

许多研究提出接种微生物(真菌和细菌)可以减轻高温灭菌所引起的土壤对植物的毒副作用^[37]。Al-Khalie^[38]采用花生(*Arachis hypogaea*)为材料报道了施用土壤微生物提取液可以促进 AMF 的孢

子形成和对花生的侵染率,从而促进了花生的生长。然而,Manian 等^[39]对番茄(*Lycopersicon esculentum*)生长与 AMF 的关系中却得出了相反的结论。尽管目前关于土壤其他微生物对 AMF 的作用机理以及相互作用还未研究清楚,但是其他微生物会干扰 AMF 的表现和生态生产力是肯定的^[40]。因此,在对 AMF 与植物的关系研究中,设计无菌根真菌对照试验时,灭菌土壤应该加入筛除了 AMF 的土壤浸提液,以消除缺少其他微生物对试验结果的影响。

由于高温灭菌法杀灭了土壤中所有微生物,因此可用于原生土壤中 AMF 群落对植物影响的研究,也可以通过灭菌之后再接种特定菌种来研究特定 AMF 菌种或菌群与植物的关系。在许多研究中还可以看到高温灭菌法对 AMF 的灭菌作用是很有效的。但高温带来的毒副作用是无法避免的,因此,减少毒副作用对试验结果的干扰是试验设计中不可忽视的一个环节。很多研究者在研究中采取灭菌土与接种结合的对照来减小毒副作用的干扰,同时灭菌后土壤应敞开放置一段时间来释放其中的有毒物质。总的来说,高温灭菌法存在一些不足,但由于其操作简单、成本低,仍然在菌根研究中被广泛应用。由于其操作条件的限制,该方法较为适用于室内试验,对野外试验来说并不可取。

2.2 γ 射线灭菌法 有些 AMF 试验也会采用 γ 射线灭菌法^[41-42]。采用不同剂量的辐射,将会产生不同的灭菌效果^[43-45]。例如,大多数土壤在放射量为 10 kGy 时会减少放线菌、真菌和无脊椎动物的量;在 20 kGy 时,主要的细菌就会死去;当放射量增加到 70 kGy 时,具有抗辐射能力的细菌也会死去。 γ 射线灭菌法的优点在于,它采用的是低温灭菌方式,所以排除了高温给土壤带来的伤害,因此许多学者认为它是最有效的灭菌方式。

γ 射线灭菌法会引起土壤一些化学性质的改变。但许多研究指出,它对土壤的理化性质和生物活性影响小于高温灭菌方式^[46-48]。McLaren 等^[49]指出 γ 射线灭菌后的土壤仍然存在着酶活性并且该土壤对番茄是没有毒性的。Salonius 等^[32]对高温灭菌和 γ 射线灭菌两种方式对土壤理化性质进行了比较,结果显示 γ 射线灭菌法对可溶性有机物和电

解质的影响小于高温灭菌法,且经 γ 射线灭菌后的土壤其微生物要比高温灭菌土壤中生长得更好。 γ 射线灭菌法会影响土壤的化学性质,例如硝态氮与铵态氮的比例^[46]。McNamara 等^[44]通过对 ISI(Institute for Scientific Information)数据库过去 50 年的相关文献考证发现, γ 射线灭菌法是相比于高温灭菌法、化学灭菌法的一种高效的、没有化学污染的灭菌方法,并提出风干土壤后进行灭菌处理可稳定土壤的化学性质。同时,对比 γ 射线灭菌后接种 AMF 的土壤与没有处理过的土壤,发现前者的效果比后者低 5%,这可能是由于灭菌导致的土壤营养元素改变造成的。但是, γ 射线灭菌法由于成本高,需要专业人员操作以及其操作的安全性,在以往的研究中此法的采用不及高温灭菌法普遍。

γ 射线灭菌除了对土壤中原生 AMF 群落与植物关系的研究外,同样也可以通过灭菌后再接种来研究特定 AMF 菌种或群落和植物关系。现在, γ 射线灭菌法对土壤性质产生的影响是否会引起对植物的毒副作用还尚无定论。同时,由于 γ 射线灭菌法灭菌时对其他微生物群落也有所影响,因此在对土壤原生 AMF 研究的试验设计中,设计灭菌土与接种的对照以及施以不含 AMF 的土壤浸提液是很有必要的。 γ 射线灭菌法虽然对土壤的影响小于高温灭菌法,但由于操作条件的安全性以及高成本,它也不适用于野外试验。

2.3 化学熏蒸法 Brookes 等^[50]指出,氯仿熏蒸增加了土壤中铵和有机碳的含量。但 Darbar 和 Lakzian^[31]在研究中指出,化学熏蒸法对土壤的伤害介于高温灭菌法和 γ 射线法之间。很多科学家对化学熏蒸法都提出了具体的操作指导^[51]。但由于各种化学试剂本身的理化性质和毒性,熏蒸法都需要对熏蒸后土壤进行通气,以减少化学试剂在土壤中的残留以及对土壤的伤害。化学熏蒸法操作比以上两种方法简单,且灭菌效果也不错,许多研究者都采取此方法来获得无 AMF 的对照组^[52-53]。但是,由于化学试剂的毒性以及对环境的污染作用,例如甲基溴会分解出溴,这对臭氧层有破坏作用,导致现在很多人对化学熏蒸法并不提倡,并且许多方法在国外已经被禁止使用。因此,本研究将不对该方法进行详细描述。

3 室外灭菌法

由于上述方法在操作上的局限性,所以它们在室内盆栽试验时更为适用。但盆栽试验在试验环境与真实的环境相差很大,其试验结果并不能真实代表 AMF 在环境中的作用。在进行野外试验时,需要操作更为简单、工作量小的方法。因此,将介绍以下两种在野外试验中常用的方法。

3.1 苯菌灵抑制法 苯菌灵是目前 AMF 原位试验中最常用的灭菌方法。在我国 AMF 的研究中,也有学者将该法用于室内盆栽试验以获得低 AMF 处理^[54]。苯菌灵的施用量以及施用频率将决定其灭菌效果,而 Pedersen 和 Sylvia^[55]认为苯菌灵的灭菌效果也与施用时间有关。基于上述决定因素, Kahiluoto 等^[45]对土壤取样时间和苯菌灵施用量进行了研究,他指出苯菌灵的施用量为 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤时足以创建一个无 AMF 的对照,而最有效的苯菌灵施用时间是在播种前。同时,苯菌灵的降解速度也会影响其对 AMF 的抑制作用,降解速度会受到微生物活动以及水分含量的影响,在无植物栽培的土壤中苯菌灵一些分解物的半衰期从 2 周到 7 周不等^[56]。现在,大多数试验多采取每 2~3 周施用一次苯菌灵来降低苯菌灵的失效^[57-58]。O'Connor 等^[58]发现,苯菌灵对 AMF 的抑制作用也会随着苯菌灵施用的深度而降低。Karanika 等^[23]提到,苯菌灵对于 AMF 的侵染的抑制作用可能会因为植物群落的不同而发生变化。Pedersen 和 Sylvia^[55]也指出,苯菌灵对 AMF 的抑制作用也会因为菌种的不同而有所差异。

Hartnett 和 Wilson^[59]、Smith 等^[60]都认为施用苯菌灵对于野外试验来说非常有用,并且 Hartnett 和 Wilson^[59]认为在野外试验中施用苯菌灵优于其他方法。苯菌灵被认为是最好的杀菌剂,因为它能有效减少 AMF 的侵染^[61-63],并对植物和其他非目标生物的副作用最小^[64]。O'Connor 等^[58]报道,反复施用苯菌灵只会稍微增加土壤毒性;Kahiluoto 和 Vestberg^[65]也通过试验证明,施用苯菌灵不会产生植物毒素。Hartnett 和 Wilson^[59]指出苯菌灵对土壤的营养元素 N 的影响小于 γ 射线灭菌法且不会升高土壤 P 的含量^[66]。但是,苯菌灵并不是在所有试验中都有良好的抑制表现^[67]。近年来,

出现了苯菌灵的一些替代杀菌剂,例如托布津和多菌灵。有研究报道,托布津对 AMF 侵染有抑制作用,但并没有提出它可以成为有效的苯菌灵的替代物^[68]。因此,苯菌灵依然是使用最为广泛的杀真菌剂。

据报道,施用苯菌灵可能会对土壤性质和其他生物造成影响。Welsh 等^[69]通过对施用苯菌灵的土壤进行测定,发现施用苯菌灵的土壤比无处理的土壤的 pH 值低而氧化还原能力强,这样可以抑制 AMF 的呼吸作用,从而达到抑制 AMF 活性的作用。由于苯菌灵的生物毒性,苯菌灵可能对寄生真菌^[70]和线虫有抑制作用,如果苯菌灵对病原微生物和线虫有影响,那么施用苯菌灵可能会促进植物的生长,从而干扰试验结果。与此相反,有人提出苯菌灵对其他非目标生物,如藻类或细菌的抑制作用很小^[71]。Fitter 和 Nichols^[64]以及 Hartnett 和 Wilson^[59]也提出苯菌灵主要作用于 AMF。虽然苯菌灵在对 AMF 的抑制作用上表现不错,但它和化学熏蒸法一样对环境有一定的破坏作用^[72]。

尽管存在以上还未经证实的问题,但是由于其操作方便且对 AMF 抑制作用效果较好,苯菌灵抑制法仍然被大多数人所认可并广泛应用于野外试验中^[62,73-74]。但是,如何施用苯菌灵才能稳定并提高苯菌灵对 AMF 的抑制作用,减少其对环境的影响,目前还没有一个具体的指导。在今后的研究中,如何减少 AMF 对其他微生物潜在的抑制作用是试验设计中需要考虑的因素。由于苯菌灵属于内吸性杀真菌剂,是否可以在试验前幼苗建植时就对植物施以苯菌灵,从而达到减轻对其他生物的影响可以在以后的研究中进行探讨。此外,寻找一种新的、对 AMF 专一性更好的苯菌灵替代物也是解决问题的一个方法。

3.2 物理割断法 如何实施野外试验且对环境无害是许多学者迫切想解决的问题。根据多年对 AMF 的研究,Johnson 等^[75]设计了一种利用物理原理来设置无 AMF 环境的方法:采用内径为 18 mm、外径为 2 mm 的 ABS 管,在管外四周开 4 个窗户,总面积大约为管外表面积的 50%,然后将孔径为 35 μm 的筛子粘到管内以及管底,使得植物根部无法通过网筛而细菌等可以通过,在试验中将灭好菌的

土壤填入管中,然后将管埋入野外试验地中,并每周将管旋转 45°以切断外源菌丝进入管内。这个装置需要注入事先灭好菌的土,因此仍然会存在其他灭菌方法带来的危害。

这个方法优于其他方法的地方在于,在原位试验中,它可以保证植物在无菌土壤中生长的同时还可以与外界环境进行营养元素和水分交换,使试验可以在更接近真实的自然条件下进行。同时,试验证实该方法将 AMF 侵染率从 55%降低到了 10%^[75]。在随后的研究中,许多学者对该方法进行了一些细微的改变,使得该方法可以用于 AMF 的其他研究方向中。例如,Johnson 等^[76]将这个方法运用于 AMF 对营养元素的转运研究中;Cheng 和 Baumgartner^[77-78]通过此法切断葡萄(*Vitis vinifera*)藤和金花菜(*Medicago hispida*)之间的菌丝,进而研究了两种植物间的氮素转换;Nottingham 等^[79]和 Moyano 等^[80]都根据物理隔断方法研究了菌根呼吸作用;Duan 等^[81]采用此法研究了土壤扰动和植物残留物对 AMF 侵染和菌丝生长的影响。

但是,Johnson^[75]同时提出这个方法也会导致破坏土壤与网筛界面上的团聚体以及降低这个区域土壤的孔隙度,会对 PVC 管与周围环境的水分和营养元素交换造成一定的影响。然而,采用这个方法展开原位试验不用担心像化学方法一样带来的环境问题,且可以有效控制 AMF 的侵染。

4 总结与展望

从以上综述可以看出,在今后的研究中应根据不同的研究对象采用不同的灭菌方法。高温灭菌法和 γ 射线灭菌法由于杀灭了土壤中所有的生物,因此可通过外缘接种 AMF 来研究特定真菌或菌群与植物关系;而化学熏蒸法、苯菌灵抑制法和物理隔断法一般用于土壤原生 AMF 的研究。

同样,不同的试验条件也应采取不同的灭菌方法。在室内试验中, γ 射线灭菌法比高温灭菌法对土壤理化性质影响较小。因此,在条件允许的情况下, γ 射线灭菌法比高温灭菌法所带来的对土壤的影响更小,从而对试验结果的干扰更小更好,但两种方法由于操作限制不太适用于野外试验;化学熏蒸法的灭菌效果不错,但是其污染性使其备受争议。在室外试验中,苯菌灵抑制法可能会影响到土壤中

其他生物,但对土壤理化性质影响较小,且其抑制效果不稳定。物理隔断法对其他微生物和环境没有影响,但其可能会在网筛界面和土壤之间形成孔隙,从而影响水分和营养元素的交换。

由于人们对 AMF 研究兴趣的日益浓厚,相信不久的将来上述方法将得到改进。在以后的试验设计中,减少或避免这些因素对试验的干扰是必须考虑的。高温灭菌法和 γ 射线灭菌法可以通过加入土壤浸提液来减轻对土壤微生物的影响,但不能避免其对土壤理化性质的影响;在苯菌灵抑制法中,若要使灭菌效果有效且不对环境造成伤害,必须在试验前进行预试验,严格确定苯菌灵的施用量和频率。另外,提高苯菌灵的内吸性或在幼苗期使用苯菌灵,或许可以减少苯菌灵的用量,但这需要进一步验证。同时,寻找对环境无影响的苯菌灵替代品,或研发可通过植物叶片吸收的、对植物和环境无害的化学试剂则可避免对土壤生物和环境的负面影响。物理隔断法在旋转时会产生空隙从而影响物质的交换,可对试验装置进行改进以减少旋转所产生的空隙。总的来说,寻找能抑制 AMF 的活性、新型环保的化学试剂是改进灭菌方法发展新趋向,这将对室内室外试验都有很大的促进作用,这将进一步推动丛枝菌根真菌的研究。

参考文献

- [1] 刘润进,陈应龙. 菌根学[M]. 北京:科学出版社,2007:6-7.
- [2] Waddar K H, Lakshman H C. Effect of AM fungi on seedlings of *Tamarindus indica* L. and *Azadirachta indica* Juss for integrated nursery stock[J]. International Journal of Plant Protection, 2010, 3(2): 248-252.
- [3] Pindi P K, Reddy S R, Reddy S M. Effect of inoculations of AMF and other bioinoculants on the growth of two agroforestry tree seedlings[J]. Advances in Plant Sciences, 2010, 23(1): 121-123.
- [4] Saia S, Ruisi P, Amato G, et al. Effects of arbuscular mycorrhizal symbiosis on growth and N_2 fixation of *Trifolium alexandrinum* under late drought stress conditions[A]. In: Schnyder H, Isselstein J, Taube F, et al. Grassland in A Changing World[M]. Kiel, Germany: Proceedings of the 23rd General Meeting of The European Grassland Federation, 2010: 842-844.

- [5] Madejon E, Doronila A I, Sanchez-Palacios J T, *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and biosolids enhance the growth of a native Australian grass on sulphidic gold mine tailings [J]. *Restoration Ecology*, 2010, 18(s1):175-183.
- [6] Varga S. Effects of arbuscular mycorrhizas on reproductive traits in sexually dimorphic plants[J]. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2010, 8;S11-S24.
- [7] Shen H, Yang H J, Guo T. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and ammonium:nitrate ratios on growth and pungency of spring onion plants [J]. *Journal of Plant Nutrition*, 2011, 34(5):743-752.
- [8] Amaya-Carpio L, Davies F T, Fox T, *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi and organic fertilizer influence photosynthesis, root phosphatase activity, nutrition, and growth of *Ipomoea carnea* ssp. *fistulosa* [J]. *Photosynthetica*, 2009, 47(1):1-10.
- [9] He SL, Liu B Y, Fang D H, *et al.* Effects of VA mycorrhiza (*Glomus epigaeum*) on the mineral nutrition for *Camellia sinensis* and their mechanisms [J]. *Journal of Southwest Agricultural University*, 1994, 16(5):492-496.
- [10] Miransari M. Arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen uptake [J]. *Archives of Microbiology*, 2011, 193(2):77-81.
- [11] Zhu X, Song F, Liu T, *et al.* Arbuscular mycorrhizae reducing water loss in maize plants under low temperature stress [J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2010, 5(5):591-593.
- [12] Wang F Y, Tong R J, Shi Z Y, *et al.* Inoculations with arbuscular mycorrhizal fungi increase vegetable yields and decrease phoxim concentrations in carrot and green onion and their soils [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(2):16949.
- [13] Leigh J, Hodge A, Fitter A H. Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material [J]. *New Phytologist*, 2009, 181(1):199-207.
- [14] Zarea M J, Ghalavand A, Goltapeh E M, *et al.* Effects of mixed cropping, earthworms (*Pheretima* sp.), and arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus mosseae*) on plant yield, mycorrhizal colonization rate, soil microbial biomass, and nitrogenase activity of free-living rhizosphere bacteria [J]. *Pedobiologia*, 2009, 52(4):223-235.
- [15] 李敏, 姜德锋, 孟祥霞, 等. 丛枝菌根对芋头生长产量和品质的影响 [A]. 国艺学进展 [M]. 南京: 东南大学出版社, 1998: 654-657.
- [16] Ordookhani K, Khavazi K, Moezzi A, *et al.* Influence of PGPR and AMF on antioxidant activity, lycopene and potassium contents in tomato [J]. *African Journal of Agricultural Research*, 2010, 5(10):1108-1116.
- [17] 樊丽. 丛枝菌根真菌对草莓耐盐性及果实品质的影响 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [18] Affokpon A, Coyne D L, Lawouin L, *et al.* Effectiveness of native West African arbuscular mycorrhizal fungi in protecting vegetable crops against root-knot nematodes [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47(2):207-217.
- [19] Sikes B A. When do arbuscular mycorrhizal fungi protect plant roots from pathogens [J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2010, 5(6):763-765.
- [20] Asrar A W A, Elhindi K M. Alleviation of drought stress of marigold (*Tagetes erecta*) plants by using arbuscular mycorrhizal fungi [J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2011, 18(1):93-98.
- [21] Wu Q S, Zou Y N, Liu W, *et al.* Alleviation of salt stress in citrus seedlings inoculated with mycorrhiza: changes in leaf antioxidant defense systems [J]. *Plant Soil and Environment*, 2010, 56(10):470-475.
- [22] 徐淑君. 丛枝菌根真菌对猕猴桃高温干旱抗性研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [23] Karanika E D, Mamolos A P, Alifragis D A, *et al.* Arbuscular mycorrhizas contribution to nutrition, productivity, structure and diversity of plant community in mountainous herbaceous grassland of northern Greece [J]. *Plant Ecology*, 2008, 199(2):225-234.
- [24] van der Heijden M G A. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems [J]. *Ecology Letters*, 2008, 11(6):296-310.
- [25] Thoms C, Gattinger A, Jacob M, *et al.* Direct and indirect effects of tree diversity drive soil microbial diversity in temperate deciduous forest [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2010, 42(9):1558-1565.
- [26] Hu C J, Fu B J, Liu G H, *et al.* Vegetation patterns influence on soil microbial biomass and functional diversity in a hilly area of the Loess Plateau, China [J].

- Journal of Soils and Sediments, 2010, 10(6): 1082-1091.
- [27] Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Nature, 2005, 435(7043): 824-827.
- [28] 石伟琦. 丛枝菌根真菌对内蒙古草原大针茅群落的影响[J]. 生态环境学报, 2010(2): 344-349.
- [29] Bank T L, Kukkadapu R K, Madden A S, *et al.* Effects of gamma-sterilization on the physico-chemical properties of natural sediments[J]. Chemical Geology, 2008, 251(1-4): 1-7.
- [30] Trevors J T. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil[J]. Journal of Microbiological Methods, 1996, 26(1-2): 53-59.
- [31] Darbar S R, Lakzian A. Evaluation of chemical and biological consequences of soil sterilization methods[J]. Caspian Journal of Environmental Sciences, 2007, 5(2): 87-91.
- [32] Salonijs P O, Robinson J B, Chase F E. A comparison of autoclaved and gamma-irradiated soils as media for microbial colonization experiments[J]. Plant and Soil, 1967, 27(2): 239-248.
- [33] Boyd H W. Manganese toxicity to peanuts in autoclaved soil[J]. Plant and Soil, 1971, 35(1): 133.
- [34] Williamslinera G, Ewel J J. Effect of autoclave sterilization of a tropical adept on seed germination and seedling growth[J]. Plant and Soil, 1984, 82(2): 263-268.
- [35] Smith F A, Smith S E. Mycorrhizal infection and growth of *Trifolium-Subterraneum*: Use of sterilized soil as a control treatment[J]. New Phytologist, 1981, 88(2): 299-309.
- [36] Wolf D C, Dao T H, Scott H D, *et al.* Influence of sterilization methods on selected soil microbial, physical, and chemical-properties[J]. Journal of Environmental Quality, 1989, 18(1): 39-44.
- [37] Rovira A D, Bowen G D. Effects of micro-organisms upon plant growth. 2. detoxication of heat-sterilized soils by fungi and bacteria[J]. Plant and Soil, 1966, 25(1): 129-142.
- [38] Al-Khaliel A S. Effects of arbuscular mycorrhization in sterile and non-sterile soils[J]. Tropical Life Sciences Research, 2010, 21(1): 55-70.
- [39] Manian S, Edathil T T, Udaiyan K. Vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization and growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in autoclaved soil[J]. Perantika Journal of Tropical Agricultural Science, 1995, 18(2): 95-101.
- [40] Miransari M. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(4): 917-930.
- [41] Pearson J N, Jakobsen I. Symbiotic exchange of carbon and phosphorus between cucumber and 3 arbuscular mycorrhizal fungi[J]. New Phytologist, 1993, 124(3): 481-488.
- [42] Janouskova M, Seddas P, Mrnka L, *et al.* Development and activity of *Glomus intraradices* as affected by co-existence with *Glomus claroideum* in one root system[J]. Mycorrhiza, 2009, 19(6): 393-402.
- [43] Stotzky G, Mortenson J L. Effect of gamma radiation on growth and metabolism of microorganisms in an organic soil[J]. Soil Science Society America Journal, 1959, 23(2): 125-127.
- [44] McNamara N P, Black H I J, Beresford N A, *et al.* Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils[J]. Applied Soil Ecology, 2003, 24(2): 117-132.
- [45] Kahiluoto H, Ketoja E, Vestberg M. Creation of a non-mycorrhizal control for a bioassay of AM effectiveness 1. Comparison of methods[J]. Mycorrhiza, 2000, 9(5): 241-258.
- [46] Eno C F, Popenoe H. Gamma radiation compared with steam and methyl bromide as a soil sterilizing agent[J]. Soil Science Society America Journal, 1964, 28(4): 533-535.
- [47] Shih K L, Souza K A. Degradation of biochemical-activity in soil sterilized by dry heat and gamma-radiation[J]. Origins of Life and Evolution of the Biosphere, 1978, 9(1): 51-63.
- [48] Berns A E, Philipp H, Narres H D, *et al.* Effect of gamma-sterilization and autoclaving on soil organic matter structure as studied by solid state NMR, UV and fluorescence spectroscopy[J]. European Journal of Soil Science, 2008, 59(3): 540-550.
- [49] McLaren A D, Luse R A, Skujins J J. Sterilization of soil by irradiation and some further observations on soil enzyme activity[J]. Soil Science Society America Journal, 1962, 26(4): 371-377.

- [50] Brookes P C, Kragt J F, Powlson D S, *et al.* Chloroform fumigation and the release of soil-nitrogen—the effects of fumigation time and temperature [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1985, 17(6): 831-835.
- [51] Alef K, Nannipieri P. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry* [M]. New York: Academic Press, 1995.
- [52] Kumar A, Sharma S, Mishra S. Influence of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and salinity on seedling growth, solute accumulation, and mycorrhizal dependency of *Jatropha curcas* L [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2010, 29(3): 297-306.
- [53] Ghosh S, Verma N K. Growth and mycorrhizal dependency of *Acacia mangium* Willd. inoculated with three vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in lateritic soil [J]. *New Forests*, 2006, 31(1): 75-81.
- [54] 张璐, 张倩, 叶宝兴. 盐胁迫下丛枝菌根真菌(AMF)对紫花苜蓿生长的影响 [J]. *山东农业科学*, 2010(3): 32-37.
- [55] Pedersen C T, Sylvia D M. Limitations to using benomyl in evaluating mycorrhizal functioning [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1997, 25(2): 163-168.
- [56] Lee L S, Sassman S A, Bischoff M, *et al.* Degradation of N,N'-dibutylurea (DBU) in soils treated with only DBU and DBU-Fortified Benlate Fungicides [J]. *Journal of environmental quality*, 2004, 33(5): 1771-1778.
- [57] Cahill J F, Elle E, Smith G R, *et al.* Disruption of a belowground mutualism alters interactions between plants and their floral visitors [J]. *Ecology*, 2008, 89(7): 1791-1801.
- [58] O'Connor P, Manjarrez M, Smith S E. The fate and efficacy of benomyl applied to field soils to suppress activity of arbuscular mycorrhizal fungi [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2009, 55(7): 901-904.
- [59] Hartnett D C, Wilson G W T. The role of mycorrhizas in plant community structure and dynamics: lessons from grasslands [J]. *Plant and Soil*, 2002, 244(1-2): 319-331.
- [60] Smith M D, Hartnett D C, Rice C W. Effects of long-term fungicide applications on microbial properties in tallgrass prairie soil [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32(7): 935-946.
- [61] Pimienta-Barrios E, Del Castillo-Aranda M E G, Munoz-Urias A, *et al.* Effects of benomyl and drought on the mycorrhizal development and daily net CO₂ uptake of a wild platyopuntia in a rocky semi-arid environment [J]. *Annals of Botany*, 2003, 92(2): 239-245.
- [62] Zhang Q A, Zhang L, Weiner J, *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi alter plant allometry and biomass-density relationships [J]. *Annals of Botany*, 2011, 107(3): 407-413.
- [63] Fitter A H. Water relations of red clover *Trifolium pratense* L. as affected by va mycorrhizal infection and phosphorus supply before and during drought [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1988, 39(202): 595-603.
- [64] Fitter A H, Nichols R. The use of benomyl to control infection by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi [J]. *New Phytologist*, 1988, 110(2): 201-206.
- [65] Kahiluoto H, Vestberg M. Creation of a non-mycorrhizal control for a bioassay of AM effectiveness 2. Benomyl application and soil sampling time [J]. *Mycorrhiza*, 2000, 9(5): 259-270.
- [66] Bentivenga S P, Hetrick B A D. Relationship between mycorrhizal activity, burning, and plant productivity in tallgrass prairie [J]. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 1991, 69(12): 2597-2602.
- [67] McGonigle T P, Fitter A H. Growth and phosphorus inflows of *Trifolium repens* L. with a range of indigenous vesicular-arbuscular mycorrhizal infection levels under field conditions [J]. *New Phytologist*, 1988, 108(1): 59-65.
- [68] Wilson G W T, Williamson M W. Topsin-M: the new benomyl for mycorrhizal-suppression experiments [J]. *Mycologia*, 2008, 100(4): 548-554.
- [69] Welsh A K, Burke D J, Hamerlynck E P, *et al.* Seasonal analyses of arbuscular mycorrhizae, nitrogen-fixing bacteria and growth performance of the salt marsh grass *Spartina patens* [J]. *Plant and Soil*, 2010, 330(1-2): 251-266.
- [70] Newsham K K, Fitter A H, Watkinson A R. Root pathogenic and arbuscular mycorrhizal fungi determine fecundity of asymptomatic plants in the field [J]. *Journal of Ecology*, 1994, 82(4): 805-814.
- [71] Allison V J, Rajaniemi T K, Goldberg D E, *et al.* Quantifying direct and indirect effects of fungicide on an old-field plant community: an experimental null-community approach [J]. *Plant Ecology*, 2007,

- 190(1):53-69.
- [72] Torstensson L, Wessen B. Interactions between the fungicide benomyl and soil-microorganisms[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1984, 16(5):445-452.
- [73] Helgason T, Merryweather J W, Young J P W, *et al.* Specificity and resilience in the arbuscular mycorrhizal fungi of a natural woodland community[J]. *Journal of Ecology*, 2007, 95(4):623-630.
- [74] Camargo-Ricalde S L, Montano N M, Reyes-Jaramillo I, *et al.* Effect of mycorrhizae on seedlings of six endemic *Mimosa* L. species (Leguminosae-Mimosoideae) from the semi-arid Tehuacan-Cuicatlan Valley, Mexico [J]. *Trees-Structure and Function*, 2010, 24(1):67-78.
- [75] Johnson D, Leake J R, Read D J. Novel in-growth core system enables functional studies of grassland mycorrhizal mycelial networks[J]. *New Phytologist*, 2001, 152(3):555-562.
- [76] Johnson D, Leake J R, Ostle N, *et al.* In situ (CO₂)-C-13 pulse-labelling of upland grassland demonstrates a rapid pathway of carbon flux from arbuscular mycorrhizal mycelia to the soil[J]. *New Phytologist*, 2002, 153(2):327-334.
- [77] Cheng X M, Baumgartner K. Arbuscular mycorrhizal fungi-mediated nitrogen transfer from vineyard cover crops to grapevines[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2004, 40(6):406-412.
- [78] Cheng X M, Baumgartner K. Effects of mycorrhizal roots and extraradical hyphae on N-15 uptake from vineyard cover crop litter and the soil microbial community [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38(9):2665-2675.
- [79] Nottingham A T, Turner B L, Winter K, *et al.* Arbuscular mycorrhizal mycelial respiration in a moist tropical forest [J]. *New Phytologist*, 2010, 186 (4):957-967.
- [80] Moyano F E, Kutsch W L, Schulze E D. Response of mycorrhizal, rhizosphere and soil basal respiration to temperature and photosynthesis in a barley field[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39(4):843-853.
- [81] Duan T Y, Facelli E, Smith S E, *et al.* Differential effects of soil disturbance and plant residue retention on function of arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis are not reflected in colonization of roots or hyphal development in soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2011, 43(3):571-578.

A review on methods of sterilization and inhibition of arbuscular mycorrhizal fungi in Soil

XIE Yue, YANG Gao-wen, ZHOU Han-shu, ZHANG Ying-jun

(The Institute of Grassland Science, China Agricultural University, Beijing 100093, China)

Abstract: A symbiotic relationship between arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plant roots is one of the hottest studies in the microbial research field currently. Establishing a non-AMF control group (non-AMF soil) is a key point to reveal effects of arbuscular mycorrhizal fungi on plants. This paper summarizes 5 methods, including autoclaving, chemical fumigation, γ -irradiation, benomyl and severance of hyphae, to establish non-arbuscular mycorrhizal fungi control groups. Autoclaving, chemical fumigation and γ -irradiation can be adopted in indoor experiments, while the former two may affect the physical and chemical characteristics of soil and the latter is not environmental-friendly. Benomyl and severance of hyphae are suitable for outdoor experiments. The quantity of benomyl should be rigidly controlled due to its negative effects on the environment. Though severance of hyphae would not damage the environment, it may affect the exchange of water and nutrition between plants and soil. Thus, researchers should choose suitable methods for their studies according to environment and purpose of the study.

Key words: arbuscular mycorrhizal fungi (AMF); autoclaving; γ -irradiation; chemical fumigation; benomyl; severance of hyphae