

长期不同施肥对棕壤 AM 真菌群落结构的影响

李冬冬^{1,2}, 罗培宇^{1,2*}, 韩晓日^{1,2}, 杨劲峰^{1,2}, 蔡芳芳^{1,2}, 刘天驰^{1,2}

(1 沈阳农业大学土地与环境学院, 辽宁沈阳 110866; 2 土壤肥料资源高效利用国家工程实验室, 辽宁沈阳 110866)

摘要:【目的】探明长期不同施肥条件下玉米-大豆轮作棕壤丛枝菌根 (Arbuscular mycorrhizal, AM) 真菌群落结构的变化及其影响因素。【方法】以沈阳农业大学棕壤肥料长期 (38 年) 定位试验耕层土壤 (0—20 cm) 为材料, 于 2016 年 4 月选取其中 6 个施肥处理: 1) 不施肥 (CK); 2) 单施化学氮肥 (N); 3) 施用化学氮磷肥 (NP); 4) 施用化学氮磷钾肥 (NPK); 5) 单施有机肥 (M); 6) 有机肥和化学氮磷肥配施 (MNP)。采用 PCR-DGGE 和克隆测序, 分析了棕壤 AM 真菌群落结构, 并结合环境因素进行冗余分析和典型对应分析。【结果】施用有机肥处理土壤有机碳 (TOC)、全氮 (TN)、全磷 (TP)、全钾 (TK)、碱解氮 (AHN)、有效磷 (AP)、速效钾 (AK)、可溶性有机碳 (DOC) 含量显著高于单施化肥和不施肥处理, 且趋势表现为有机肥处理 > 化肥处理 > CK; 与 CK 相比, 单施化肥处理显著降低了土壤 pH 值, 施用有机肥处理显著提高了土壤 pH 值。长期施肥显著改变了土壤中的 AM 真菌孢子密度, 施用有机肥处理的孢子密度显著高于单施化肥处理和不施肥处理。冗余分析结果表明, 土壤 pH 与 AM 真菌多样性指数和均匀度均呈显著负相关, 而孢子密度与 AP、TK、AHN 呈显著正相关, AM 真菌多样性指数与孢子密度则不相关。聚类分析表明长期不同施肥将棕壤中 AM 真菌分为两大类群, 分别为不施肥区和施肥区, 其相似度仅为 42%。通过割胶克隆测序得出从土壤样品中分离的 AM 真菌种群主要为球囊霉菌, 典型对应分析表明 AP、AK、TOC、NH₄⁺-N 显著影响 AM 真菌的群落组成。【结论】长期定位施肥改变了棕壤的理化性质, 从而对 AM 真菌的群落结构产生了显著影响。

关键词: 丛枝菌根真菌; 棕壤; 长期定位试验; 群落结构

Influence of long-term fertilization on structures of arbuscular mycorrhizal fungi community in a brown soil

LI Dong-dong^{1,2}, LUO Pei-yu^{1,2*}, HAN Xiao-ri^{1,2}, YANG Jin-feng^{1,2}, CAI Fang-fang^{1,2}, LIU Tian-chi^{1,2}

(1 College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2 National Engineering Laboratory for Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources, Shenyang 110866, China)

Abstract: 【Objectives】 This study aims to explore changes of community structures of AM (Arbuscular mycorrhizal) fungi and to find out main factors of affecting the structures in a corn-soybean rotation system and a long-term fertilization trial for 38 years in a brown soil. 【Methods】 Soil samples (0–20 cm) were taken from six treatments of the long-term fertilization trial in April 2016, 1) no fertilization (CK); 2) chemical N input (N); 3) chemical N and P input (NP); 4) chemical N, P and K input (NPK); 5) pig manure (M); and 6) pig manure plus chemical N and P (MNP). Soil samples were analyzed using PCR-DGGE, cloning and sequencing techniques, and the relationship between community of AM fungi and environmental factors was analyzed using the redundancy analysis and canonical correlation analysis. 【Results】 The results showed that the contents of total organic C (TOC), total N (TN), total P (TP), total K (TK), alkali-hydrolysable N (AHN), available P (AP), readily available K (AK) in the organic fertilizer treatments were significantly higher than those in the CK treatment and chemical fertilizer treatments, and the trend is: organic fertilizer > chemical fertilizer > CK. Compared with the CK treatment, the chemical fertilizer treatments decreased soil pH, while the organic

收稿日期: 2017-09-16 接受日期: 2017-10-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41501305); 国家科技支撑计划 (2013BAD08B04, 2013BAD07B03) 资助。

联系方式: 李冬冬 E-mail: ldd103062@163.com; * 通信作者 罗培宇 E-mail: ibtyoufe@163.com

fertilizer treatments increased soil pH. The redundancy analysis showed that pH had significantly negative correlation with the diversity and evenness of AM fungi. AP, TK and AHN had significantly positive correlation with spore density. There was no correlation between AM fungi diversity index with spore density. The cluster analysis showed that the community structures of AM fungi were divided into two groups, namely, non fertilization group and fertilization group, and their similarity was only 42% under the long-term fertilization. The result of sequencing showed that AM fungi species isolated from soil samples were mainly glomeromycota. The canonical correlation analysis showed AP, AK, TOC and $\text{NH}_4^+\text{-N}$ significantly influenced the species of AM fungi. 【Conclusions】 The long-term fertilization changed community structures of AM fungi by changing soil physicochemical properties.

Key words: Arbuscular mycorrhizal fungi; brown soil; long-term experiment; community structure

丛枝菌根 (Arbuscular mycorrhizal, AM) 真菌广泛存在于农田生态系统中, 它能够与绝大多数陆生植物根系形成菌根^[1]。许多研究表明, AM 真菌能改善根际土壤环境^[2-3], 活化土壤中的矿质养分^[4], 促进植物对养分的吸收; 并且还具有增强植物抗病性、抗逆性, 增加农作物产量、改善产品品质的功能^[5-7]。然而 AM 真菌生长会受到许多因素的影响, 其中土壤类型是影响 AM 真菌群落结构的重要因素之一^[8-9]。张美庆等^[10]研究发现, 球囊霉属适应性最强, 在潮土、红壤、棕壤、石灰土、水稻土出现率最高, 摩西球囊霉属在所有土类中均有发现, 无梗囊霉属在赤红壤、砖红壤和水稻土中出现较多; 硬囊霉属在赤红壤和砖红壤中居多; 巨孢囊霉科的 2 属在棕壤和水稻土中出现较多。除此之外, 耕作制度、施肥等常见的农田管理措施也对 AM 真菌的数量和多样性有显著影响^[7, 11]。在大多数条件下, 耕作会降低 AM 真菌生物量、减少 AM 真菌多样性^[12-13]; 轮作中不同作物会对土壤中 AM 真菌的群落组成和数量有不同的影响^[14]。而施肥对 AM 真菌的影响研究结果并不一致, 研究表明长期定位施肥显著改变了 AM 真菌的孢子密度和群落^[15]; 有研究表明, 不同形态磷肥的施入对其群落组成和生物量没有影响^[16], 而 Muchane 等^[17]研究表明, 可溶性磷肥的施入可以增加 AM 真菌的定殖; Souza 等^[18]认为, 施用有机肥有利于提高 AM 真菌的多样性, 改变其群落组成; 而 Joner 研究表明施用有机肥会对 AM 真菌产生消极影响^[19], 这可能是由于土壤类型、施肥结构和耕作制度不同引起的。

目前, 关于棕壤长期轮作施肥对 AM 真菌群落结构的影响研究较少。本试验在 38 年棕壤长期轮作施肥的基础上, 分析影响 AM 真菌群落结构的因素, 以期为今后对土壤 AM 真菌进行调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤来源及试验设计

供试土壤样品采自沈阳农业大学棕壤肥料长期定位试验地 (北纬 $40^{\circ}48'$, 东经 $123^{\circ}33'$)。该试验地始于 1979 年, 到 2016 年已有 38 年的历史, 采用玉米—玉米—大豆轮作, 2016 年种植玉米。该试验地的基本概况如罗培宇等^[20]所述。本试验选取其中 6 个施肥处理: 1) 不施肥 (CK); 2) 单施化学氮肥 (N); 3) 施用化学氮磷肥 (NP); 4) 施用化学氮磷钾肥 (NPK); 5) 单施有机肥 (M); 6) 有机肥和化学氮磷肥配施 (MNP), 所有肥料作为基肥在播种前一次性施入土壤。有机肥为猪廐肥, 平均含有机质 119.6 g/kg, 全 N 5.6 g/kg、 P_2O_5 8.3 g/kg、 K_2O 10.9 g/kg。化学氮、磷、钾肥分别为尿素、过磷酸钙和硫酸钾。肥料具体施用量见表 1。

1.2 样品采集

土壤样品在 2016 年 4 月 23 日播种前采集, 各处理选取 12 个点, 采样深度为 0—20 cm, 每 3 个点充分混匀, 剔除砾石、植物根系等杂物, 过 1 mm 筛, 一部分用于测定可溶性有机碳、铵态氮及提取土壤总 DNA; 另一部分风干后用于测定土壤 pH、有机碳、全氮、全磷、全钾、碱解氮、速效钾、有效磷、孢子密度。

1.3 土壤理化性质测定

土壤可溶性有机碳用 K_2SO_4 浸提法测定, 即称取鲜土 10 g 加入 50 mL 0.5 mol/L K_2SO_4 溶液振荡 1 h, 然后在 $4000 \times g$ 离心力下离心 10 min, 上清液用 0.45 μm 滤膜过滤, 滤液用 Vario EL II 型 TOC 仪进行测定^[21]。铵态氮含量用 0.01 mol/L CaCl_2 浸提法, 采用连续流动分析仪 (AutoAnalyzer3, 德国 Seal 公司) 上机测定。全氮、有机碳采用元素分析仪测定。

表 1 各处理的肥料施用量
Table 1 Application rates of the long-term fertilizer treatments

处理 Treatment	化肥用量 Chemical fertilization rates (kg/hm ²)			猪厩肥用量 (t/hm ²) Pig manure amount
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	
NP	120/30	60/90	0/0	0/0
NPK	120/30	60/90	60/90	0/0
N	120/30	0/0	0/0	0/0
CK	0/0	0/0	0/0	0/0
MNP	120/30	60/90	0/0	27/0
M	0/0	0/0	0/0	27/0

注 (Note): 种植作物 1979—1980 年为玉米, 1981 年为大豆, 每 3 年重复 1 次; 表中斜杠前数值为玉米种植年份施用量, 斜杠后为大豆种植年份施用量; 尿素、过磷酸钙及硫酸钾换算成有效养分形式 (N、P₂O₅、K₂O) The crop planted in 1979–1980 was maize and planted in 1981 was soybean. Repeat each three years. The value in front of the slash in the table is the application rate of fertilizer in corn planting year, and after the slash is the application rate of fertilizer in soybean planting year; Urea, calcium superphosphate and potassium sulphate are converted to effective components (N, P₂O₅ and K₂O).

pH、全磷、全钾、有效磷、速效钾、碱解氮根据土壤农化分析方法测定^[22]。AM 真菌孢子密度采用湿筛倾析—蔗糖离心法, 从 20 g 风干土中筛取孢子并进行孢子密度统计^[23]。

1.4 土壤 DNA 提取

土壤 DNA 采用 Powersoil® DNA isolation kit 试剂盒 (MO BIO, Laboratories Inc, German) 进行提取, 提取完的 DNA 置于 -20℃ 冰箱待用。

1.5 目的片段的扩增

AM 真菌的目的序列扩增采用巢式 PCR, 第一轮反应体系为 10 × PCR Buffer (不含 Mg²⁺) 5 μL, dNTP 4 μL (2.5 mmol/L), MgCl₂ 3 μL (2.5 mmol/L), NS1 (10 mmol/L) 1.5 μL, NS41 (10 mmol/L) 1.5 μL, *Taq* 酶 (2 U/μL) 1 μL, DNA 模板 1 μL, 加 ddH₂O 至 50 μL。第二轮反应体系与第一轮相同。为了提高 DGGE 的分辨率, 笔者在第二轮 PCR 上游引物前

加了个 GC 夹 (CGCCCGCCGCGCCCGCGCGCCGTCCGCGCCCGCCCGCCCG)。由于 AM1 和 NS31 不能扩增原囊霉科 (Archaeosporaceae) 和类球囊霉科 (Paraglomaceae) 的 AM 真菌, 因此添加了另一对引物 ARCH1311 和 NS8 来扩增原囊霉科和类球囊霉科。本试验所用的聚丙烯酰胺凝胶的浓度为 6%, 变性剂范围 30%~50%, 电泳缓冲液 1 × TAE, 电泳电压 60 V, 时间为 16 h。PCR 具体条件如表 2 所示。

1.6 DGGE 割胶回收测序

从 DGGE 图谱中切取清晰、具有代表性的条带, 用聚丙烯酰胺凝胶 DNA 回收试剂盒 (北京康维) 进行目的基因的回收。回收后的 DNA 用 AM 真菌的特异性引物 NS31 和 AM1 进行 PCR 扩增验证, 然后交由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司进行克隆测序。

表 2 AM 真菌目的序列 PCR 反应条件
Table 2 PCR conditions of AM fungi

引物名称 Primer	引物序列 (5'—3') Primer sequence (5'—3')	反应条件 PCR conditions
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	94℃ 预变性 3 min; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 7 min (一轮)
NS41	CCCGTGTGAGTCAAATTA	
GC-NS31	TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC	
AM1	GTTTCCCGTAAAGGCGCCGAA	An initial denaturation at 94℃ for 3 min; 30 cycles of 1 min at 94℃, 1 min at 50℃ and 1 min at 72℃; and final extension for 7 min at 72℃ (the first round)
GC-ARCH1311	TGCTAAATAGCCAGGCTGY	
NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA	
		An initial denaturation at 94℃ for 3 min; 28 cycles of 30 s at 94℃, 45 s at 58℃ and 45 s at 72℃; and final extension for 7 min at 72℃ (the second round)

1.7 数据分析及处理

图表制作采用 Microsoft Office Excel 2010, 方差分析采用 SPSS 19.0 (最小显著差数法, LSD); 冗余分析 (redundancy analysis, RDA) 及典型对应分析 (canonical correlation analysis, CCA) 采用 CANOCO 4.5 软件; DGGE 图谱分析采用 Quantity one 4.6 软件; DNA 序列比对在 Gen Bank 数据库的 BLAST 程序中进行相似性搜索, 查找与目的条带亲缘关系最近的序列。

Shannon 指数 (H) 计算公式: $H = -\sum Pi \times Pi$, 其中 Pi 为第 i 个条带的光密度值占其在泳道全部条带光密度值的比例。

2 结果与分析

2.1 长期定位施肥对棕壤理化性质的影响

长期施肥显著改变了棕壤的理化性质 (表 3)。M 处理的 pH 最高, 为 6.51; N 处理的 pH 最低, 为 4.61; 与 CK 相比, 施用有机肥处理土壤 pH 升高, 而单施化肥处理土壤 pH 降低, 说明施用有机肥可在一定程度上降低土壤酸度, 提高土壤 pH。施肥显著提高了土壤有机碳 (TOC)、全氮 (TN)、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、可溶性有机碳 (DOC) 含量, 而与单施化肥处理相比,

施用有机肥处理显著提高了土壤 TOC、TN、全磷 (TP)、有效磷 (AP)、碱解氮 (AHN) 的含量。

2.2 长期施肥下 AM 真菌群落多样性分析

各处理的 DGGE 图谱如图 1 所示, 不同施肥处理的条带数量、亮度、位置都有所不同。从供试土壤中共分离出 23 条条带, 其中 band 1、band 4、band 8、band 9 等 (图中白色标记) 经测序不属于 AM 真菌 (本研究中相关的 Shannon-Wiener 指数、聚类分析、典型对应分析均根据 DGGE 图谱中 AM 真菌条带处理分析得出)。其中 N 和 NPK 处理的条带数最多, band 10、band 15、band 16 是所有处理共有的条带, 说明施肥未对这几种 AM 真菌生长造成影响; band 7、band 12 和 band 2、band 11 分别是 N 和 NPK 处理特有的条带, 说明单施氮肥、氮磷钾配施促进了该 AM 真菌的生长; 而 band 18 是有机肥区特有条带, 该种 AM 真菌可能是由有机肥带入土壤中的或者是被土著激发的。图 1 还显示, 施用有机肥处理和单施化肥处理的条带位置、亮度显著不同, 说明棕壤 AM 真菌群落结构会受到施入肥料种类的影响。

Shannon 指数 (H) 也称多样性指数, 在生态学中, 它常被用来预测物种的多样性水平。由表 4 和图 1 可知, 单施化肥处理的 H 指数高于 CK 和施用

表 3 供试土壤的理化性质

Table 3 Physical and chemical properties of test soils

处理 Treatment	pH (H ₂ O)	有机碳 (g/kg) TOC	全氮 (g/kg) Total N	全磷 (g/kg) Total P	全钾 (g/kg) Total K
CK	5.50 ± 0.03 c	9.00 ± 0.08 e	0.90 ± 0.01 e	0.32 ± 0.01 d	15.68 ± 0.64 b
N	4.61 ± 0.04 f	10.30 ± 0.00 cd	1.03 ± 0.01 cd	0.34 ± 0.01 d	16.45 ± 0.46 b
NP	5.30 ± 0.01 d	10.60 ± 0.06 c	1.06 ± 0.01 c	0.32 ± 0.01 d	15.62 ± 0.69 b
NPK	4.95 ± 0.01 e	10.15 ± 0.19 d	1.02 ± 0.04 d	0.44 ± 0.01 c	17.72 ± 0.22 b
M	6.51 ± 0.03 a	13.35 ± 0.00 b	1.34 ± 0.01 b	0.66 ± 0.02 b	18.02 ± 0.38 ab
MNP	5.76 ± 0.01 b	16.80 ± 0.02 a	1.68 ± 0.01 a	1.16 ± 0.02 a	20.58 ± 0.30 a

处理 Treatment	有效磷 (mg/kg) Avail. P	速效钾 (mg/kg) Avail. K	碱解氮 (mg/kg) Alk.-hydr. N	铵态氮 (mg/kg) NH ₄ ⁺ -N	可溶性有机碳 (mg/kg) DOC
CK	0.94 ± 0.00 d	76.60 ± 0.57 d	98.38 ± 0.19 c	0.98 ± 0.06 e	37.42 ± 0.71 c
N	3.10 ± 0.11 d	78.28 ± 1.53 d	102.34 ± 0.61 c	11.87 ± 0.04 a	62.07 ± 0.81 b
NP	10.42 ± 0.11 cd	84.96 ± 1.00 d	99.10 ± 0.12 c	2.00 ± 0.04 d	51.96 ± 0.93 bc
NPK	16.40 ± 0.38 c	100.33 ± 3.06 c	106.69 ± 0.41 c	4.72 ± 0.10 b	51.12 ± 1.25 bc
M	102.33 ± 0.10 b	113.37 ± 1.53 b	125.71 ± 0.45 b	4.10 ± 0.20 c	70.09 ± 0.50 b
MNP	145.04 ± 0.67 a	132.42 ± 3.52 a	149.22 ± 0.76 a	4.39 ± 0.18 bc	153.85 ± 0.64 a

注 (Note): 同列数据后不同字母表示处理间差异显著 (LSD 法, $\alpha = 0.05$) Values followed by different letters in the same column are significantly different among the treatments (LSD method, and $\alpha = 0.05$).

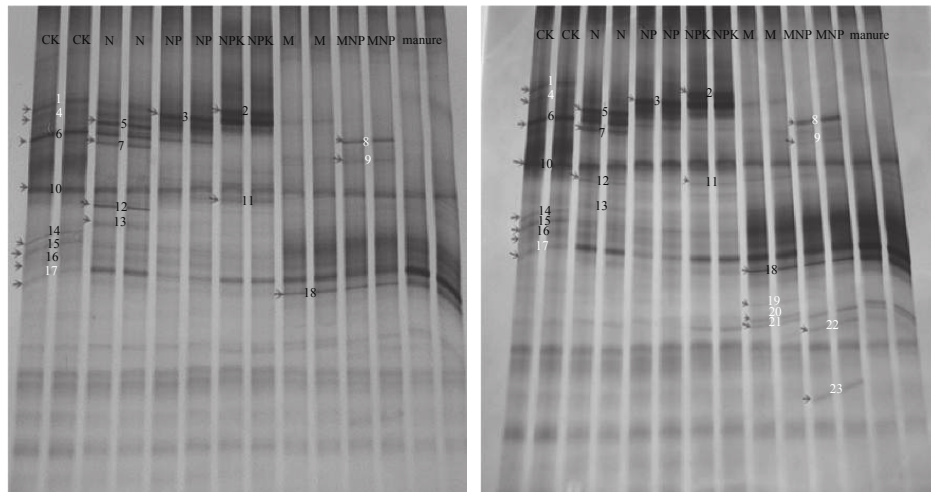


图 1 不同施肥处理土壤 AM 真菌的 DGGE 图谱

Fig. 1 DGGE banding patterns of soil AM fungi in different treatments

表 4 不同施肥处理下 AM 真菌多样性指数
Table 4 Diversity indices of AM fungi in different fertilization treatments

处理 Treatment	香农指数 (<i>H</i>) Shannon-Wiener	均匀度 (<i>E</i>) Evenness	条带数 Bands
CK	1.93 ± 0.03 c	0.989 ± 0.00 a	5
N	2.28 ± 0.06 a	0.993 ± 0.00 a	9
NP	2.06 ± 0.04 b	0.987 ± 0.00 a	7
NPK	2.17 ± 0.00 a	0.986 ± 0.00 a	9
M	1.82 ± 0.07 c	0.993 ± 0.00 a	5
MNP	1.92 ± 0.03 c	0.976 ± 0.02 a	5

注 (Note): 同列数据后不同字母表示处理间差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters indicate significant difference at 5% level among the treatments.

有机肥处理, 而施用有机肥区的多样性低于 CK, 尤其是单施有机肥处理的多样性最低, 这说明单施化肥可使土壤 AM 真菌多样性提高, 而施用有机肥反而会抑制原有土著 AM 真菌有抑制生长的趋势。在本研究中, 条带数变化与多样性变化趋势基本一致; 而各处理间的均匀度无显著差异, 均匀度指数为 0.976~0.993, 说明施肥对 AM 真菌的均匀度影响不大。

如图 2 所示, 长期施肥显著改变了土壤中的 AM 真菌孢子密度。施用有机肥处理的孢子密度显著高于单施化肥处理和不施肥处理。其中 MNP 处理的孢子密度最高, 每克土为 33.3 个, 而 CK 处理的孢子密度最低, 每克土为 10.7 个; 单施化肥处理的孢子密度则介于两者之间, 每克土为 18.6~21.8 个。

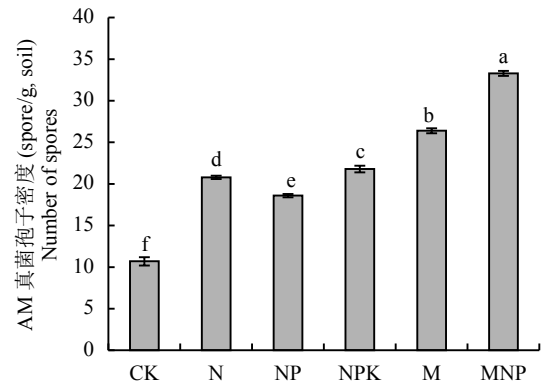


图 2 不同施肥处理下的孢子密度

Fig. 2 Spore densities of different fertilization treatments

[注 (Note): 柱上不同字母表示处理间差异达 5% 显著水平 Different letters above the bars indicate significant difference at 5% level among the treatments.]

这表明施肥有利于孢子的产生, 而施用有机肥土壤中的 AM 真菌孢子密度增加的幅度则更大。

对 AM 真菌的 *H* 指数、均匀度及孢子密度和土壤理化性质进行了冗余分析 (图 3), 第一和第二排序轴解释了 99.91% 的变量 ($P < 0.05$, 通过蒙特卡罗检验)。其结果表明, 长期轮作施肥条件下, pH、AP、AHN、全钾 (TK) 与 AM 真菌多样性指数和均匀度均呈负相关, 其中 pH 与 AM 真菌多样性呈显著负相关, 其相关系数为 0.89, 而 AP、AHN、TK 与 AM 真菌多样性的相关系数分别为 0.45、0.33、0.12, 相关性较小; AM 真菌孢子密度与 TK、AHN、AP 呈显著正相关而与土壤 pH 相关性较小, 与 TK、AHN、AP、pH 的相关系数分别为 0.92、0.91、0.89、0.37, 而其余理化性质均与它们无相关性。另

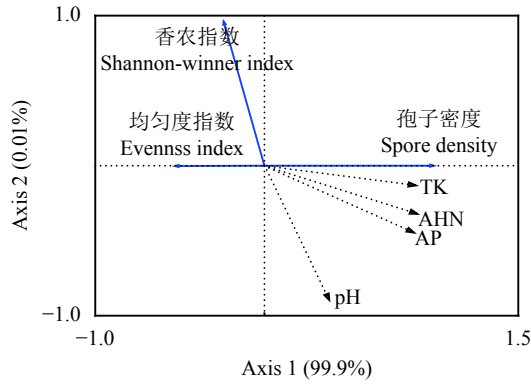


图 3 AM 真菌与土壤理化性质的冗余分析
Fig. 3 Redundancy analysis depicting the relationship among soil physicochemical properties and AM fungi

外，从图中可以看出 AM 真菌多样性与其孢子密度无相关性，其相关系数仅为 0.0025。

2.3 AM 真菌群落结构分析及其影响因素

对 DGGE 图谱中优势条带进行割胶回收，经克隆测序后共获得 23 个序列，在 GenBank 数据库的 BLAST 程序中进行序列比对，寻找与其亲缘关系最为接近的序列 (图 4)，结果表明 band 3、band 5 分别与 GenBank 数据库中 Uncultured Glomus (LN616600.1)、(EF041057.1) 同源性都达到了 100%，band 2、band 6、band 7、band 10、band 11、band 12、band 13、band 14、band 15、band 16、band 18 与 GenBank 数据库中的未培养的球囊霉门 (Uncultured Glomeromycota) 相似度较高。

图 1 和图 4 表明，38 年长期定位施肥对 AM 真菌的种群分布产生了很大的影响，一些只出现在化

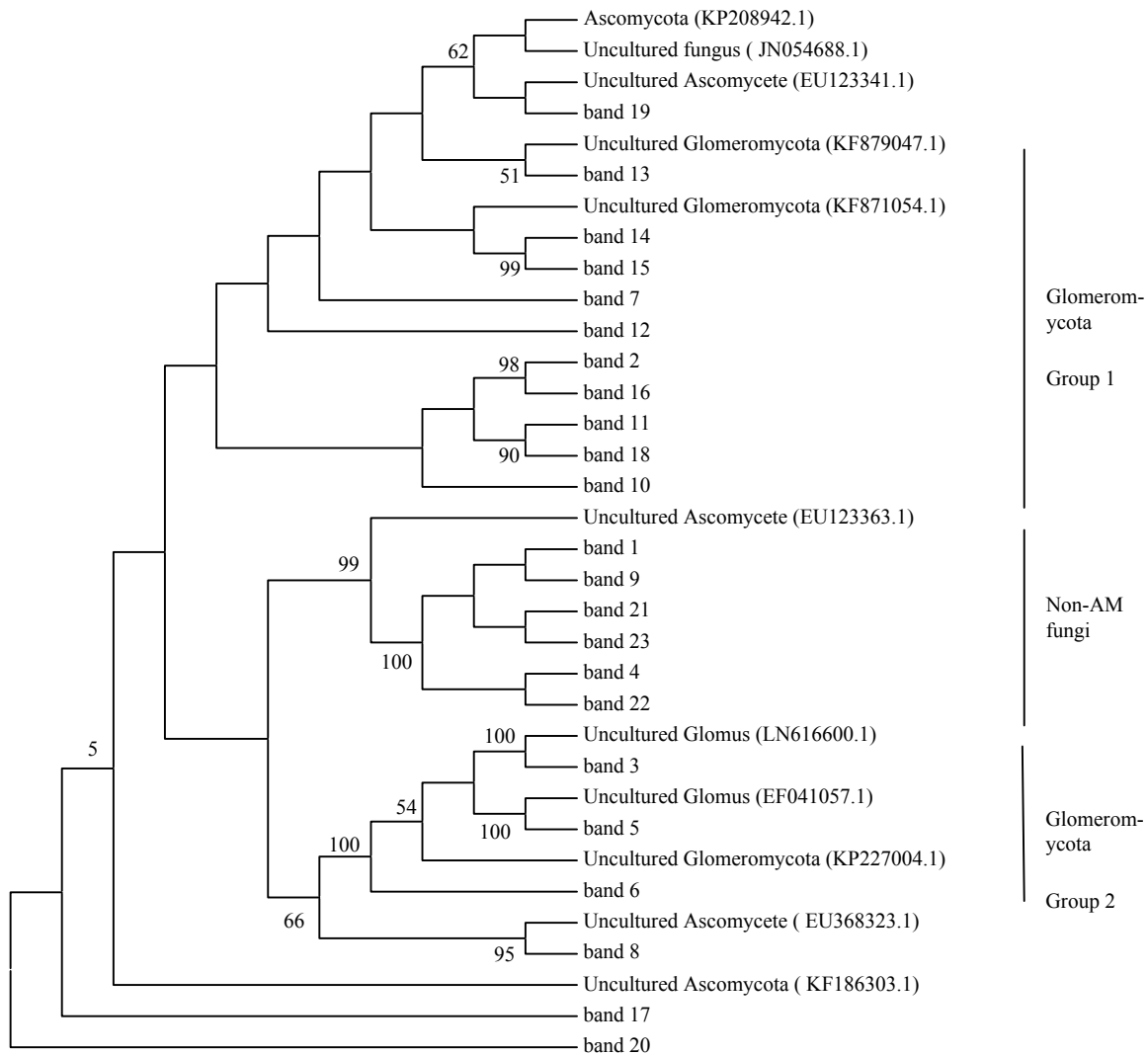


图 4 不同处理 AM 真菌系统发育树
Fig. 4 Phylogenetic tree of AM fungi with different treatments

肥处理, 如 band 3[Uncultured Glomus (LN616600.1)、band 5[Uncultured Glomus (EF0410-57.1)], 说明施用化肥可以使它们富集; 另一些只出现在有机肥处理, 如 band 18[Uncultured Glomeromycota (KF871054.1)] 是由猪厩肥带入到土壤中, 以上说明不同施肥种类对 AM 真菌产生的影响是不同的。

本研究成功分离了 AM 真菌和一些非 AM 真菌。AM1 和 NS31 是被大量使用的群落研究的引物, 能够特异扩增真菌, 但是有研究显示该引物对仍有缺陷。首先, 引物不能扩增原囊霉科和类球囊霉科的 AM 真菌^[24], 因此本研究利用引物 ARCH1311 和 NS8 进行原囊霉科和类球囊霉科 AM 真菌的扩增, 结果并没有扩增出原囊霉科和类球囊霉科, 说明本地土壤中不存在这两科的 AM 真菌; 另外, 本研究中也扩增出了一些非 AM 真菌, 说明选择的引物对特异性有欠缺, 这与前人研究结果相同^[25-26], 但我们未将非 AM 真菌列入结果分析过程, 因此其不会对研究结果造成影响。

对 DGGE 图谱的聚类分析表明 (图 5), 长期施肥将棕壤 AM 真菌分为了不施肥处理与施肥处理两大类群, 其中施肥处理又分为了单施化肥处理和施用有机肥处理两大类群, 它们的群落结构相似度分别为 42% 和 47%, 说明不同施肥使棕壤 AM 真菌种类产生了显著的变化。其中相似度最高的是 M 和 MNP 处理, 其相似度达到 81%, 这表明施用有机肥能显著改变棕壤 AM 真菌群落结构; 而 N 与 NP、NPK 的相似度分别为 61%、57%, 说明化肥配合施用也会对 AM 真菌的群落结构产生影响。

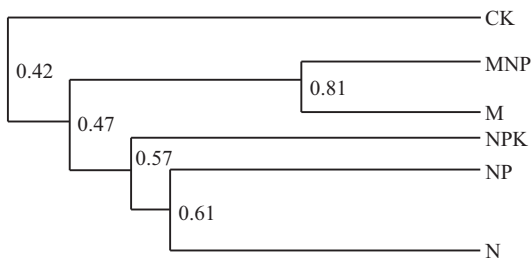


图 5 不同施肥处理中 AM 真菌 UPGMA 聚类图谱
Fig. 5 UPGMA dendrogram of AM fungi in different fertilization treatments

由图 6 可知, 影响棕壤 AM 真菌群落结构的主要因素为 AP、AK、TOC、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 。其中 band 10、band 15、band 16 并不受这些土壤因素的影响, 在各施肥处理下均有分布; band 18 与 AP、AK、TOC 为显著正相关, band 5、band 6、band 7、band 12、

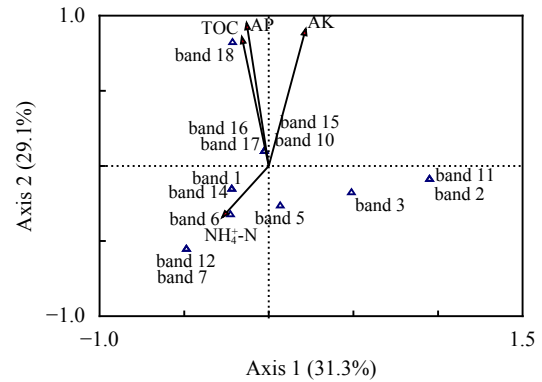


图 6 AM 真菌核糖核酸型与土壤因子的典型对应分析
Fig. 6 Results of the canonical correlation analysis of AM fungi ribotypes and soil factors

[注 (Note): 核糖核酸型由三角形表示, 根据核酸凝胶迁移位置来命名 Ribotypes are represented by triangles and named according to the migration position on the gels.]

band 14 与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 呈显著正相关, 而其余均与土壤因素呈显著负相关。第一和第二排序轴解释了 60.4% 的变量 ($P < 0.05$, 通过蒙特卡罗检验)。

3 讨论与结论

在农田生态系统中, AM 真菌的生长会受到很多非生物因素的影响, 其中包括土壤类型、pH、土壤养分等, 同时也会受到施肥数量、种类的影响。目前关于施肥对 AM 真菌的影响已经有很多报道, 但关于长期轮作施肥对棕壤 AM 真菌的影响研究报道较少。

在本研究中, 不同施肥处理的 AM 真菌多样性指数、均匀度、条带数均有一定的区别, 其中单施化肥处理比不施肥、施有机肥处理的种群多样性要高, 这说明长期施用化肥、有机肥会不同程度地影响 AM 真菌的群落多样性。冗余分析结果显示, pH、AP、AHN、TK 对 AM 真菌的均匀度、多样性指数影响最大。Harley 等^[27]研究发现, 在矿质养分中, 土壤磷素密切影响 AM 真菌的生长, 速效磷过低或过高都会抑制 AM 真菌生长发育。由表 3 可知, 在有机肥区土壤中磷的含量显著高于化肥区, 因此该处理下 AM 真菌的多样性较低, 这与张海波等^[28]和 Harley 等^[27]研究结果一致, 其原因可能由于高磷条件下导致植物根系细胞膜通透性降低和根系分泌物发生变化, 对土壤中 AM 真菌的生长产生抑制作用, 导致土壤中的 AM 真菌多样性减少^[29]; 而另一些研究表明 AM 真菌多样性与有效磷存在正相关关系^[30-31], 这表明 AM 真菌对施肥条件具有选择性,

这为深入认识 AM 真菌多样性与施肥的关系, 对 AM 真菌功能基因 (如控制磷循环的基因) 的研究可能会大有裨益。

有研究报道, 土壤 pH 是影响 AM 真菌多样性的重要土壤因子之一, 其通过影响孢子萌发和菌丝生长来影响产孢量, 进而影响 AM 真菌多样性, 一般偏酸的土壤更有利于 AM 真菌产孢^[12]。但是在本研究中土壤 pH 并不是通过影响 AM 真菌产孢而对其多样性产生影响。这可能由于土壤类型和耕作制度等不同造成的, 需要进一步研究。

长期施肥显著改变了土壤中的孢子密度, 土壤养分可以直接或间接影响真菌产孢。然而关于土壤理化性质对孢子密度的影响研究结果不尽相同。韩涛等^[32]研究发现孢子密度与土壤理化性质并没有明显的相关性, 而吴勇^[33]研究表明孢子密度与土壤 pH 和有效磷呈正相关, 胡文武等^[34]的研究则表明与土壤有效磷呈负相关。这可能与土壤类型、作物种类、施肥方式、气候类型不同等有关。在本研究中发现土壤 AP、AHN、TK 与 AM 真菌孢子密度呈显著正相关, 这可能是由棕壤长期轮作施肥造成的。

本研究通过 CCA 分析发现, 土壤 AM 真菌种群结构受到 AP、AK、TOC、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的影响。长期不同施肥显著改变了这些土壤化学性质, 进而影响了 AM 真菌种群结构, 其中土壤磷水平对其分布影响较大, 这是由于不同种类的 AM 真菌对磷的响应机制不同^[35]; 土壤中的 TOC、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 对其分布也有一定的影响, 这是由于微生物生长离不开碳源和氮源, 而 AM 真菌对不同碳源、数量在一定程度上产生选择性, 从而导致了不同的分布特征^[36], 而氮源对其影响鲜有报道, 需要进一步研究; 另外, 在速效钾对 AM 真菌的影响机制方面仍需进一步探究。通过聚类分析和 CCA 分析可以看出, 长期定位施肥是通过改变土壤的理化性质而改变了 AM 真菌生长的环境, 使其产生了不同的群落结构, 最终将棕壤 AM 真菌分为了施肥处理与不施肥处理代表的两大类群, 这也表明 AM 真菌对施肥条件具有选择性^[37]。虽然 AM 真菌多样性指数与 pH、AP、AHN、TK 有关, 但是其种群结构却与 AP、AK、TOC、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 等有关, 因此下一步结合作物根系内侵染的 AM 真菌, 找出其中的优势菌群, 从而通过改变相关的土壤理化性质来调控优势菌群, 这将对农业生产具有重要意义。

本研究使用 DGGE 技术来分析 AM 真菌的群落结构, 但此技术存在自身的局限性。虽然本研究通

过 DGGE 技术成功分离了 AM 真菌和一些非 AM 真菌, 并依据 DGGE 图谱去掉非 AM 真菌条带校正后得到 AM 真菌多样性指数数据, 但其与实际值之间可能还存在差距; 另外, DGGE 不能全面分析土壤中全部微生物群落, 只能对微生物群落中数量大于 1% 的优势种群进行分析^[38], 而本研究中 6 个处理所获得 AM 真菌条带仅为 14 条, 通过割胶测序仅获得 7 个 OTU。因此采用 DGGE 分析可能低估了土壤中的 AM 真菌多样性, 这些都可能是由于 PCR 引物特异性与覆盖度不足造成^[39]。因此在以后的研究中应对 AM 真菌的引物进行优化以提高其特异性, 或采用 Illumina Miseq、第三代测序 (Pac Bio)、生物标记物等方法来最大程度地保证结果的准确性。

长期轮作施肥显著改变了棕壤的理化性质, 而对 AM 真菌群落结构产生了影响。棕壤 AM 真菌多样性与土壤 pH 呈显著负相关, 而与孢子密度无相关性, 引起 AM 真菌种群变化的主要因素为 AP、AK、TOC、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 。由于土壤中存在的 AM 真菌是其定殖到作物根系内的前提, 而何种 AM 真菌是定殖到作物体内的优势种类则需要进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] Cheng L, Booker F L, Tu C, *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi increase organic carbon decomposition under elevated CO_2 [J]. *Science*, 2012, 337(6098): 1084.
- [2] Li Y, Chen Y L, Li M, *et al.* Effects of arbuscular mycorrhizal fungi communities on soil quality and the growth of cucumber seedlings in a greenhouse soil of continuously planting cucumber[J]. *Pedosphere*, 2012, 22(1): 779–787.
- [3] 邓胤, 申鸿, 罗文倩, 等. 不同氮素形态比例条件下接种 AMF 对玉米氮同化关键酶的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2009, 15(6): 1380–1385.
Deng Y, Shen H, Luo W Q, *et al.* Effects of AMF on key enzymes of nitrogen assimilation in maize under different ammonium to nitrate ratios[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2009, 15(6): 1380–1385.
- [4] 张贵云. 不同农业措施对丛枝菌根真菌群落结构和侵染效应的影响[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2013.
Zhang G Y. Effects of different agricultural practices on community structure and colonization rate of arbuscular mycorrhizal fungi[D]. Nanjing: PhD Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2013.
- [5] Gosling P, Hodge A, Goodlass G, *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming[J]. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 2006, 113(1–4): 17–35.
- [6] Christopherr B, Tonyj V. Maize drought tolerance: Potential improvements through arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. *Field Crops Research*, 2008, 108(1): 14–31.
- [7] 闫飞扬, 段廷玉, 张峰. 农业管理措施对 AM 真菌功能影响的研究进展[J]. *草业科学*, 2014, 31(12): 2230–2241.

- Yan F Y, Duan T Y, Zhang F. Effects of agricultural managements on the function of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *Pratacultural Science*, 2014, 31(12): 2230–2241.
- [8] Fritz O, Endre L, Arno B, *et al.* Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2010, 42(5): 724–738.
- [9] Silva I R D, Mello C M A D, Neto R A F, *et al.* Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi along an environmental gradient in the Brazilian semiarid[J]. *Applied Soil Ecology*, 2014, 84: 166–175.
- [10] 张美庆, 王幼珊. 我国东、南沿海地区AM真菌群落生态分布研究[J]. *菌物系统*, 1998, 17(3): 274–277.
- Zhang M Q, Wang Y S. The ecological distribution of AM fungi community in south and east coast of China[J]. *Mycosystema*, 1998, 17(3): 274–277.
- [11] Mcgonigle T P, Yano K, Shinhama T. Mycorrhizal phosphorus enhancement of plants in undisturbed soil differs from phosphorus uptake stimulation by arbuscular mycorrhizae over non-mycorrhizal controls[J]. *Biology & Fertility of Soils*, 2003, 37(5): 268–273.
- [12] Bedini S, Avio L, Argese E, *et al.* Effects of long-term land use on arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin-related soil protein[J]. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 2007, 120(2–4): 463–466.
- [13] Beare M H, Hu S, Coleman D C, *et al.* Influences of mycelial fungi on soil aggregation and organic matter storage in conventional and no-tillage soils[J]. *Applied Soil Ecology*, 1997, 5(3): 211–219.
- [14] Dodd J C, Arias I, Koomen I, *et al.* The management of populations of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in acid-infertile soils of a savanna ecosystem. 1. The effect of pre-cropping and inoculation with VAM-fungi on plant growth and nutrition in the field[J]. *Plant & Soil*, 1990, 122(2): 241–247.
- [15] Wu F, Dong M, Liu Y, *et al.* Effects of long-term fertilization on AM fungal community structure and Glomalin-related soil protein in the Loess Plateau of China[J]. *Plant & Soil*, 2011, 342(1–2): 233–247.
- [16] Beauregard M S, Gauthier M P, Hamel C, *et al.* Various forms of organic and inorganic P fertilizers did not negatively affect soil- and root-inhabiting AM fungi in a maize-soybean rotation system[J]. *Mycorrhiza*, 2013, 23(2): 143.
- [17] Muchane M N, Jama B, Othieno C, *et al.* Influence of improved fallow systems and phosphorus application on arbuscular mycorrhizal fungi symbiosis in maize grown in western Kenya[J]. *Agroforestry Systems*, 2010, 78(2): 139–150.
- [18] Souza T A F D, Rodrigues A F, Marques L F. Long-term effects of alternative and conventional fertilization I: Effects on arbuscular mycorrhizal fungi community composition[J]. *Russian Agricultural Sciences*, 2015, 41(6): 454–461.
- [19] Joner E J. The effect of long-term fertilization with organic or inorganic fertilizers on mycorrhiza-mediated phosphorus uptake in subterranean clover[J]. *Biology & Fertility of Soils*, 2000, 32(5): 435–440.
- [20] 罗培宇, 樊耀, 杨劲峰, 等. 长期施肥对棕壤氨氧化细菌和古菌丰度的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23(3): 678–685.
- Luo P Y, Fan Y, Yang J F, *et al.* Influence of long-term fertilization on abundance of ammonia oxidizing bacteria and archaea in brown soil[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2017, 23(3): 678–685.
- [21] Tu C L, Liu C Q, Lu X H, *et al.* Sources of dissolved organic carbon in forest soils: evidences from the differences of organic carbon concentration and isotope composition studies[J]. *Environmental Earth Sciences*, 2011, 63(4): 723–730.
- [22] 鲍士旦. 土壤农化分析 (第三版) [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- Bao S D. *Soil and agricultural chemistry analysis (Third Edition)* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000.
- [23] An Z Q, Hendrix J W, Hershman D E, Henson G T. Evaluation of the "most probable number" (MPN) and wet-sieving methods for determining soil-borne populations of endogonaceous mycorrhizal fungi[J]. *Mycologia*, 1990, 82(5): 576–581.
- [24] Redecker D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots[J]. *Mycorrhiza*, 2000, 10(2): 73–80.
- [25] Douhan G W, Petersen C, Bledsoe C S, *et al.* Contrasting root associated fungi of three common oak-woodland plant species based on molecular identification: host specificity or non-specific amplification?[J]. *Mycorrhiza*, 2005, 15(5): 365–372.
- [26] 李昕竺. 烟草丛枝菌根真菌(AMF)多样性研究[D]. 成都: 四川农业大学硕士学位论文, 2013.
- Li X Z. The diversity of AMF in tobacco soil and plant[D]. Chengdu: MS Thesis of Sichuan Agricultural University, 2013.
- [27] Harley J L, Smith S E. Mycorrhizal symbiosis[J]. *Quarterly Review of Biology*, 2008, 3(3): 273–281.
- [28] 张海波, 梁月明, 冯书珍, 等. 土壤类型和树种对根际土丛枝菌根真菌群落及其根系侵染率的影响[J]. *农业现代化研究*, 2016, 37(1): 187–194.
- Zhang H B, Liang Y M, Feng S Z, *et al.* The effects of soil types and plant species on arbuscular mycorrhizal fungi community and colonization in the rhizosphere[J]. *Research of Agricultural Modernization*, 2016, 37(1): 187–194.
- [29] Graham J H, Leonard R T, Menge J A. Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation[J]. *Plant Physiology*, 1981, 68(3): 548.
- [30] 胡从从, 郭清华, 贺学礼, 等. 蒙古沙冬青伴生植物AM真菌多样性[J]. *西北农业学报*, 2016, 25(6): 921–932.
- Hu C C, Guo Q H, He X L, *et al.* Diversity of arbuscular mycorrhiza fungi near to the associated plants of *Ammopiptanthus mongolicus*[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2016, 25(6): 921–932.
- [31] 刘佳. 长期施肥对农田土壤丛枝菌根真菌生物多样性及群落结构的影响[D]. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 2009.
- Liu J. Effect of long-term fertilization on the diversity and community structure of arbuscular fungi in Northwest China[D]. Lanzhou: MS Thesis of Lanzhou University, 2009.
- [32] 韩涛, 辛国荣, 韩晓鸽, 等. 暖季型草坪草根际AMF感染及孢子密度季节动态研究[C]. 中国草学会 2013 学术年会论文集, 2013.
- Han T, Xin G R, Han X G, *et al.* Seasonal dynamics of rhizosphere AMF colonization and spore density in warm season turf-grasses[C]. *Proceedings of the 2013 annual conference of Chinese Grassland Society*, 2013.
- [33] 吴勇. 中国不同区域红树林AMF侵染及土壤孢子密度特征研究[D]. 广州: 中山大学硕士学位论文, 2013.

- Wu Y. Colonization and spore densities of AMF in mangroves located in different regions of China[D]. Guangzhou: MS Thesis of Sun Yat-sen University, 2013.
- [34] 胡文武, 吴勇, 郭健桦, 等. 东寨港红树林丛枝菌根真菌侵染和孢子密度及其影响因子研究[J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2015, 54(2): 106–111.
- Hu W W, Wu Y, Guo J H, *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi colonization and spore density in mangrove species and their influence factors in Dongzhaigang nature reserve[J]. Journal of Sun Yatsen University (Natural Science Edition), 2015, 54(2): 106–111.
- [35] 张美庆, 王幼珊, 邢礼军. 环境因子和AM真菌分布的关系[J]. 菌物系统, 1999, (1): 25–29.
- Zhang M Q Wang Y S, Xing L J. The relationship between the distribution of AM fungi and environment factors[J]. Mycosystema, 1999, (1): 25–29.
- [36] Blackwood C B, Paul E A. Eubacterial community structure and population size within the soil light fraction, rhizosphere, and heavy fraction of several agricultural systems[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2003, 35(9): 1245–1255.
- [37] Egertonwarburton L, Allen M F. Endo- and ectomycorrhizas in *Quercus agrifolia* Nee. (Fagaceae): patterns of root colonization and effects on seedling growth[J]. Mycorrhiza, 2001, 11(6): 283–290.
- [38] 刘权钢, 金东淳, 刘敬爱. DGGE技术在土壤微生物多样性分析上的研究进展[J]. 延边大学农学学报, 2012, 34(2): 170–176.
- Li Q G, Jin D C, Liu J A. Research progress of DGGE technique for soil microbial diversity analysis[J]. Journal of Agricultural Science Yanbian University, 2012, 34(2): 170–176.
- [39] 林先贵, 胡君利, 戴珏, 等. 丛枝菌根真菌群落结构与多样性研究方法概述及实例比较[J]. 应用与环境生物学报, 2017, (2): 343–350.
- Lin X G, Hu J L, Dai Y, *et al.* Overview and comparison of research methods for determining the community structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2017, (2): 343–350.