

四种 AM 真菌接种剂的田间效应及其分子检测研究*

郑世学 董秀丽 喻子牛 赵斌

(华中农业大学生命科学技术学院, 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要 采用灭菌土壤生产了 4 种 AM 真菌接种剂。在盆栽条件下测试了接种剂的质量, 结果显示, 4 种接种剂促进玉米生长效果明显, 地上部分生物量均显著高于对照 ($p < 0.01$); 以 MPN 试验检测了接种剂的侵染能力, 结果表明每克接种剂中真菌的繁殖体数在 95~1400 之间。将 AM 真菌的预接种技术和农业生产上的营养钵育苗技术相结合, 进行了玉米的田间试验, 结果显示, 玉米根系的 AM 真菌感染率早期增长较快, 然后趋于平稳; AM 真菌接种剂 A (*Glomus constrictum*)、C (*Glomus* 三种菌混合) 和 D (*G. intraradices*) 对玉米籽粒产量有显著的增产效果 ($p < 0.05$); 玉米籽粒的淀粉含量和磷含量也高于对照。运用特异性分子探针和 nested-PCR 技术, 从田间接种 AM 真菌 *Glomus intraradices* 和 *G. mosseae* 的玉米根样中粗提 DNA 进行特异性扩增, 成功地从感染根段中检测到特定的接种 AM 真菌。本工作从分子水平为评价高效 AM 真菌的应用潜力、研究 AM 真菌之间及其与其他微生物之间的相互关系奠定了基础。

关键词 AM 真菌接种剂; MPN 试验; 田间试验; 玉米; nested-PCR

中图分类号 Q93 文献标识码 A

丛枝菌根 (Arbuscular mycorrhiza, AM) 真菌存在于 80% 以上的维管植物中, 具有促进植物矿质营养吸收、增强宿主在不良环境中的抗逆性和改善土壤团粒结构等功能^[1]; AM 真菌的多样性是决定植物群落多样性的重要因素^[2]。但是, 其严格共生的特性和有限的接种剂来源限制了理论与应用方面的研究^[3]。因此, 发展并应用新的技术是丛枝菌根研究的重要任务。

由于 AM 真菌至今仍然不能被纯培养的特性, 其分类鉴定、生理生态以及遗传学研究都有相当的难度, 可喜的是, 分子生物学的发展为 AM 真菌的深入研究开启了大门。在传统研究方法中, 很难根据根内菌丝的形态学指标进行分类鉴定^[4], 给生态学等许多研究工作带来困难。近年来, 在核糖体基因分析的基础上, 设计出了 AM 真菌种或属水平的特异性引物, 以 PCR 或 nested-PCR 扩增, 实现了 AM 真菌在根内和土壤中的特异性检测^[5~7]。该技术已经成功应用于多方面的研究, 如盆栽条件下用于区分植物根段内侵染的不同 AM 真菌^[6]; 用于研究 AM 真菌的遗传多样性^[7]; 施用污泥情况下, 检测 AM 真

菌在根和土壤中的区系, 以评价污泥对环境的影响^[8]等。

本研究的目的是探索将营养钵育苗技术和 AM 真菌预接种技术结合起来, 促进植物对磷等矿质营养的吸收以提高产量, 从而减少化肥的施用并减轻土壤污染的压力, 为 AM 真菌的规模应用提供依据。同时尝试在田间条件下, nested-PCR 技术对土壤和根内 AM 真菌的特异性检测, 为进一步研究人工接种真菌的动态分布及其与土著 AM 真菌的竞争关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 接种剂与 AM 真菌 接种剂 A: *Glomus constrictum* Trappe (HAU-01, 由本室分离纯化, 英国国际生物技术研究所以鉴定)。

接种剂 B: *G. etunicatum* Becker & Gerdemann (HAU-E4, 由本室分离纯化, 英国国际生物技术研究所以鉴定)。

接种剂 C: 三种 *Glomus* 混合接种剂, 其中有 *G.*

* 国家自然科学基金项目(30270051)和欧盟项目(INCO-DEV Project ICA4-CF-2000-30014)资助

- 通讯作者, E-mail: binzhao@mail.hzau.edu.cn; Tel: 027-87281809; Fax: 027-87280670

作者简介: 郑世学, 在职博士生, 从事微生物学科研究和教学工作。E-mail: zhengsx@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2003-12-11; 收到修改稿日期: 2004-03-03

mosseae (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe 和 *G. intraradices* Schenck & Smith (Endo-1, 由法国 Endorize 公司提供)。

接种剂 D: *G. intraradices* Schenck & Smith (BEG141, 由法国 INRA-Dijon 提供)。

1.1.2 玉米(*Zea mays*) 品种为掖单 13, 购自湖北省种子集团公司, 用于接种剂的盆栽试验、接种剂生产和田间试验。

1.1.3 紫云英(*Astragalus sinicum*) 用于接种剂生产和 MPN 试验。

1.2 接种剂的生产

采用过筛灭菌的 1:1 (v/v) 砂石土壤混合物以盆栽方式进行, 砂土混合物 pH 值 6.8。AM 真菌繁殖体为植物根段、AM 真菌孢子和根外菌丝等土壤混合物。

在盆栽钵的下层装入砂土混合物至 70% 的高度, 按总体积 7% 的量平铺一层 AM 真菌接种剂, 再覆盖一层砂土混合物, 套种经过表面消毒及催芽的玉米和紫云英种子, 每盆 3 棵玉米, 10 棵紫云英, 最上层覆盖直径 0.8 mm 的玻璃珠。设置不含 AM 真菌的空白对照组, 所有处理均 4 次重复。光照室内培养, 光照强度 10 170 lx, 每天 12 h, 温度 20~28℃。定量补充含磷(P) 量 10% 的 Hoagland 营养液。4 个月时收获, 将根段剪碎并充分混匀, 备用。

1.3 接种剂的质量测试

1.3.1 接种剂有效性检测盆栽试验 采用 1.2 所述盆栽方式进行, 每盆装入总量 5.0 kg 的砂土混合物, 宿主植物为玉米。2 个月时收获, 将宿主植物地上部分于 60℃ 烘干至恒重后称重。

1.3.2 接种剂侵染能力检测的最大或然数 (Most probable number, MPN) 试验 参照 Porter^[9] 所述方法。以半水培法种植宿主植物。将接种剂用灭菌土壤进行 10 倍系列稀释, 然后分别装入黑塑料管 (3 cm × 10 cm) 中, 黑塑料管底部浸没于含磷量 10% 的 Hoagland 营养液中, 每个稀释度 4 管, 种植经过灭菌并催芽的紫云英种子 3 棵, 出苗 7 天后间苗保留 2 株植物。光照室内培养, 光照强度 10 170 lx, 每天 12 h, 昼夜温度 20~28℃。40 天后收获, 黑塑料管内的植物根收获后用于曲利苯蓝染色^[10], 每管均独立染色。显微镜下检查每管的所有染色根段, 观察是否被真菌感染。统计每个稀释度 4 个重复中真菌感染的管数。查最大或然数表, 计算每克接种剂中 AM 真菌繁殖体数。

1.4 田间试验

1.4.1 田间土壤的基本情况 试验田的前茬作物为小麦, 土壤 pH 值为 7.69。田间土壤速效 N、P、K 分别按照碱解氮扩散法、0.5 mol L⁻¹ NaHCO₃ 法和 1 mol L⁻¹ NH₄OAc 浸提法测定, 分别为 132.28 mg kg⁻¹、27.26 mg kg⁻¹ 和 208.98 mg kg⁻¹。

MPN 试验结果显示, 土壤中 AM 真菌的本底水平为每克土壤中含 25 个繁殖体。

1.4.2 营养钵技术与接种 AM 真菌接种剂 将耕作土壤与 7% (v/v) 的接种剂混合均匀, 设置不加接种剂的空白对照。用模具做成高 10 cm、直径 4 cm 的柱状土块, 其上部有一小穴, 每个小穴中播入玉米种子, 其上再覆盖一层细土, 施用足够的水分。然后搭盖农用塑料薄膜, 注意保温保湿和通风处理。待苗出齐后间苗, 每个营养钵保留 1 株健壮苗。3~4 周后, 检测真菌根段感染率, 移栽至田间。

1.4.3 田间试验的设计与管理 参照赵仁^[11] 所述方法, 试验田被划分为 15 个小区, 每小区 5.0 m × 2.5 m。周围设置保护带。每组 5 个小区, 随机排列, 分别种植接种了 A、B、C 和 D 四种接种剂的营养钵, 以未接种真菌的营养钵作为对照, 共 3 次重复。每小区 5 行, 每行 15 株植物。玉米成熟后去边行计算产量。

不施用 P 肥, 其他按照当地农业措施管理。

1.5 根样的曲利苯蓝染色

采用修改后的 Phillips^[10] 的方法。将长约 1 cm 的植物根段洗净, 10% KOH 透明, 95℃ 处理 1 h, 水洗后于 2% HCl 中浸泡中和 5 min, 冲洗后置于 0.08% 曲利苯蓝染色液中, 沸水浴 30 min, 水洗, 取样镜检。计算 AM 真菌的根段感染率。

1.6 以 nested-PCR 技术探测植物根内的 AM 真菌

1.6.1 AM 真菌 DNA 样品的制备 从田间不同小区分别收集植物根样, 经曲利苯蓝法染色。挑取侵染有 AM 真菌的玉米根段, 每段长约 1 cm, 置于 eppendorf 管中, 加入 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl 40 μl (pH8), 将根段用塑料碾棒 (Sigma) 充分碾碎, 再加入 20% chelex-100 (BioRad) 10 μl。沸水浴 5 min, 冰上冷却 1 min, 3 000 r min⁻¹ 离心 1 min, 吸取 5 μl 上清液作为第一次 PCR 的模板 DNA。用成熟的 AM 真菌孢子作为阳性对照, 每管一个孢子, 充分碾碎, 其余处理步骤与根段处理相同。

1.6.2 用于 nested-PCR 的引物 nested-PCR 共进行两次, 第一次 PCR 采用真核生物通用性引物 LR1-NDL22, 第二次 PCR 采用 AM 真菌种特异性引物

8.22 和 5.25 分别与 LR1 和 NDL22 配对进行扩增。LR1-NDL22 扩增序列覆盖核糖体 25S rDNA 中 D1~

D2 区域,为碱基高度可变区^[6]。PCR 使用的引物见表 1,引物的配对和扩增片段的大小见表 2。

表 1 PCR 引物的碱基序列和来源
Table 1 Base sequence and source of PCR primers

引物 Primer	碱基序列 Sequence	Tm(°C)	来源 Source
LR1	5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GA-3'	58	[6]
NDL22	5'-TGG TCC GTG TTF CAA GAC G-3'	58	[6]
8.22	5'-AAC TCC TCA CGC TCC ACA GA-3'	62	[6]
5.25	5'-ATC AAC CTT TTG AGCTCG-3'	52	[12]

表 2 PCR 引物配对和扩增片段的大小
Table 2 Primer pairs and size of amplification products

AM 真菌 AM fungi	引物配对与扩增片段大小 Primer pairs and size of amplification products		
	LR1-NDL22	LR1-8.22	5.25-NDL22
<i>G. intraradii</i> ces	742 bp	455 bp	—
<i>G. mosseae</i>	747 bp	—	372 bp

1.6.3 PCR 反应体系 反应总体积为 20 μ l, 分别为: 超纯水 9.3 μ l, 10 \times PCR 缓冲液 2 μ l, 2 mmol L⁻¹ dNTP 2 μ l, 10 μ mol L⁻¹ 引物各 0.8 μ l, 5U μ l⁻¹ Taq 酶 0.2 μ l (PCR 反应所用药品购自大连宝生物工程公司), 模板 DNA 5 μ l。PCR 仪为 MJ research 130。

PCR 反应程序为: 起始温度 95 °C 3 min; 变性温度 93 °C 1 min, 退火温度 58 °C (第一次 PCR) 或 62 °C (第二次 PCR) 1 min, 延伸温度 72 °C 1 min, 共 30 次循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。第一次 PCR 反应的产物稀释 500 倍, 作为第二次 PCR 反应的模板 DNA。

用 1 \times TAE 缓冲液制作 1.2% 琼脂糖凝胶, PCR 反应产物 5 μ l 与溴酚蓝混合点样, 电泳完毕, 用 EB 溶液染色, 紫外灯下观察照相^[13]。

1.7 统计分析

文中数据采用 Microsoft Excel 软件进行方差分析, 以不同小写英文字母表示处理间差异达到显著水平。

2 结果与分析

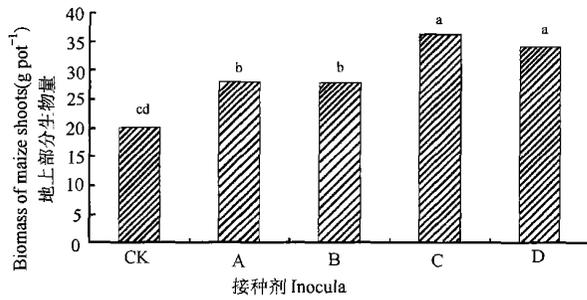
2.1 四种 AM 真菌接种剂的质量

对 AM 真菌接种剂的质量检验一般包括两个方

面, 即 AM 真菌的侵染能力和有效性的测试^[14]。侵染能力是指真菌进入根内以及在根内延展的能力。有效性是指对作物的增产效果和抗不良环境的能力。测试接种剂侵染能力的方法较多, 常用的有孢子计数法、接种势法和最大或然数法^[9], 其中最大或然数法建立在实际接种的基础上, 能够反映接种剂的实际侵染能力, 是最为准确的测试方法^[15]。本试验在盆栽条件下测试了接种剂的增产效果; 以 MPN 试验测试了接种剂的侵染能力。

MPN 试验表明, 每克接种剂 A、B、C、D 中 AM 真菌的繁殖体数分别为: 95、1 400、1 400 和 400。Sylvia 和 Jarstfer^[3] 总结了不同种类接种剂的繁殖体数。采用气雾法生产的无固体基质的接种剂, 每克干根中有几百至数千繁殖体数。田间自然条件下生产的接种剂每克土中通常小于 10 繁殖体数。盆栽方法生产的 AM 接种剂繁殖体数的范围从两百至数百不等。本试验所生产的接种剂中包含的真菌繁殖体数与上述结果一致, 具有较高的侵染能力。

从 2 个月时盆栽条件下玉米地上部分生物量的比较(图 1) 看, 4 种接种剂促进玉米生长的效果均非常明显。方差分析显示, 当 $p < 0.01$ 时, 差异极显著。



注: 不同小写英文字母表示处理间差异达到 1% 的显著水平
 Note: Different letters superposing columns indicate significantly different levels ($p < 0.01$)

图 1 盆栽条件下 4 种接种剂对玉米地上部分生物量的影响
 Fig. 1 Effect of inocula on dry weight of maize shoots

上述两个方面的试验结果表明, 在控制条件下所检测的 4 种接种剂的质量均较高, 适合于进行下一步的田间试验。

2.2 田间玉米根样的 AM 真菌感染率

共分三次采集玉米根样, 分别是玉米营养钵移

栽前、移栽后的 1 个月和 2 个月时, 经曲利苯蓝染色检测真菌感染率(表 3)。第一次取样随机选取 3 株植物; 第二次和第三次取样, 每小区田间随机取 3 株植物检测真菌感染率。结果显示, 移栽前、移栽后的 1 个月和 2 个月时接种处理组感染率分别在 31.2% ~ 37.0% 之间、42.4% ~ 50.0% 之间和 46.4% ~ 53.0% 之间, 均明显高于对照, 表明 4 种接种剂在田间条件下均能很好地侵染玉米。

无论是移栽前还是移栽后, 4 种接种处理之间植物的真菌感染率无明显差异; 而处理组与对照之间的差异则随时间而变化, 三次取样相比较, 处理组的感染率与对照间差距逐步缩小。真菌侵染的形态学观察显示, 第一次和第二次取样处理组很容易观察到丛枝和泡囊, 而对照组却很难观察到; 但第三次取样时情况恰恰相反。这表明, 人工接种的真菌侵染植物的能力在早期优于对照, 随着时间的推移, 土著真菌的竞争能力逐步加强, 表现在丛枝和泡囊数量的增加、感染率的增加以及土著真菌感染率与接种处理感染率的趋近。

表 3 不同时期田间玉米根样曲利苯蓝染色的真菌感染率

Table 3 Infection rates (%) of AM fungi within maize roots staining by trypan blue at different growing stage of the crop

处理 Treatment	真菌感染率 Infection rate (%)		
	移栽前 Transplanting	移栽后 1 个月 1 month after transplanting	移栽后 2 个月 2 month after transplanting
对照 Control	17.6 b	29.6 b	37.0 a
接种剂 A Inoculum A	36.7 a	46.6 a	47.8 a
接种剂 B Inoculum B	32.6 a	50.0 a	53.0 a
接种剂 C Inoculum C	37.0 a	45.0 a	47.6 a
接种剂 D Inoculum D	31.2 a	42.4 a	46.4 a

注: 同一列中不同小写英文字母表示差异达到 5% 的显著水平 Note: Data in the same column followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

本试验 4 种接种剂中, 从感染情况(表 3)和籽粒的干重(表 4)来看, 盆栽条件下 3 种真菌混合的接种剂 C 对玉米地上部分生物量的增加效果最好, 但在田间条件下与单种真菌的接种剂增产效果相当。表明混合接种剂不同真菌之间存在复杂的相互作用, 在田间条件下表现得更为复杂, 这是 AM 真菌应用于田间尚未解决但又非常重要的问题。本试验利用 AM 真菌的分子检测技术对此进行了初步研究(见 2.4)。

2.3 玉米的籽粒产量、淀粉含量和磷含量

4 种接种剂处理的玉米收获的籽粒干重均高于对照, 其中接种剂 A、C 和 D 处理组与对照组比较差

异显著($p < 0.05$), 增产幅度在 9.09% ~ 10.84% 之间, 但接种剂 B(*G. etunicatum*) 的增产率较小, 与对照间无显著差异($p < 0.05$)(表 4)。4 种接种剂盆栽试验中所表现的对地上部分生物量的增加(图 1)与田间试验的籽粒产量增产幅度总体趋势一致, 有较好的相关性。

玉米籽粒的淀粉含量和磷含量(由农业部食品质量检验测试中心检测, 见表 4)与对照相比, 接种真菌的各处理组淀粉含量增加 1.41% ~ 4.23%; 磷含量增加 3.70% ~ 14.81%。但不同接种剂对二者的影响不一致。

表 4 玉米籽粒的干重、淀粉含量和磷含量
Table 4 Dry weight, starch content and phosphorus content of maize grain

处理 Treatment	籽粒 Grain		淀粉 Starch		磷 Phosphorus	
	干重 Dry weight (kg plot ⁻¹)	增加率 Increase rate (%)	含量 Content (g kg ⁻¹)	增加率 Increase rate (%)	含量 Content (g kg ⁻¹)	增加率 Increase rate (%)
对照 Control	5.72 b	—	572.7 c	—	2.7 b	—
接种剂 A Inoculum A	6.33 a	10.84	597.2 a	4.23	3.0 a	11.11
接种剂 B Inoculum B	6.01 ab	5.06	593.0 ab	3.54	2.8 b	3.70
接种剂 C Inoculum C	6.24 a	9.09	580.8 bc	1.41	2.8 b	3.70
接种剂 D Inoculum D	6.34 a	10.84	584.2 bc	2.01	3.1 a	14.81

注: 同一列中不同小写英文字母表示差异达到 5% 的显著水平 Note: Data in the same column followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

综上分析, 本研究施用 AM 真菌接种剂后, 无论是玉米籽粒的产量, 还是籽粒的淀粉或磷的含量都有增加, 但籽粒干重、淀粉含量和磷含量的增加在不同接种剂处理情况下表现不一致。另外, 施用 AM 真菌接种剂后增产的同时, 减少了化肥的使用, 对环境的污染程度降低, 有益于农业的可持续发展。因此, 进一步加强 AM 真菌的研究和应用十分必要。

2.4 nested-PCR 技术对田间玉米根样中 AM 真菌的特异性检测

由于 AM 真菌不能被纯培养的特性, 不能像根瘤菌一样建立遗传转化系统以标记根内共生菌, 而且根据根内菌丝的形态学指标进行分类鉴定也相当困难^[4], 因此深入研究真菌在根内的定殖动态和相互作用就显得非常重要。本研究利用 nested-PCR 操作方法特异性检测到田间条件下植物根内的 AM 真菌, 使研究根内 AM 真菌的存活力和竞争侵染变为现实。

以曲利苯蓝染色法对接种剂 D (*G. intraradices*) 和接种剂 C (*G. mosseae* 和 *G. intraradices*) 接种处理的玉米根样进行染色, 挑取感染程度高的根段进行 nested-PCR 反应, 经第一次 PCR 以 LR1+NDL22 扩增后, AM 真菌 DNA 的拷贝数较低, 难以在琼脂糖凝胶上观察到 750bp 的 AM 真菌的 DNA 带型; 但随后以稀释的第一次 PCR 产物作为模板 DNA, 以种特异性引物 8.22 与 LR1 或 5.25 与 NDL22 进行第二次 PCR 反应, 观察到清晰且带型一致的玉米根内 AM 真菌 DNA 和孢子 DNA (图 2, 图 3)。这说明经过第二次 PCR 反应后, *G. intraradices* 和 *G. mosseae* 的 DNA 特有序列被特异性地扩增出来, 片段大小分别为

455 bp (图 2 泳道 1~7) 和 372 bp (图 3 泳道 1~15)。



图 2 接种剂 D 和 C 接种处理的玉米根样 nested-PCR 电泳图 (引物配对为 LR1-8.22, 泳道 1 为孢子 (阳性对照), 泳道 2~7 为玉米根样)

Fig 2 Nested-PCR electrophoretogram of corn root inoculated with inoculum D and C with primers LR1-8.22 (Lane 1: Spore of *G. intraradices*; Lane 2~7: Roots)

通过 nested-PCR 反应, 从接种剂 D (含单种真菌 *G. intraradices*) 和接种剂 C (含 *G. mosseae* 和 *G. intraradices*) 接种处理的根样中均检测到 *G. intraradices* 的特异性 DNA 序列; 而且更为重要的是, 从接种剂 C 接种处理的部分根段中同时检测到 *G. mosseae* 和 *G. intraradices* 的特异性 DNA 序列, 为研究多种真菌在植物根内的竞争侵染奠定了基础, 也将使研究人工接种真菌与土著 AM 真菌的竞争关系成为可能, 从而为 AM 真菌更好地应用于农业生产服务。

3 讨论

3.1 菌根效应与 AM 真菌感染率

自然土壤中的各种生物因素和非生物因素都非常复杂, 田间试验前必须了解土壤的一些基本情况。

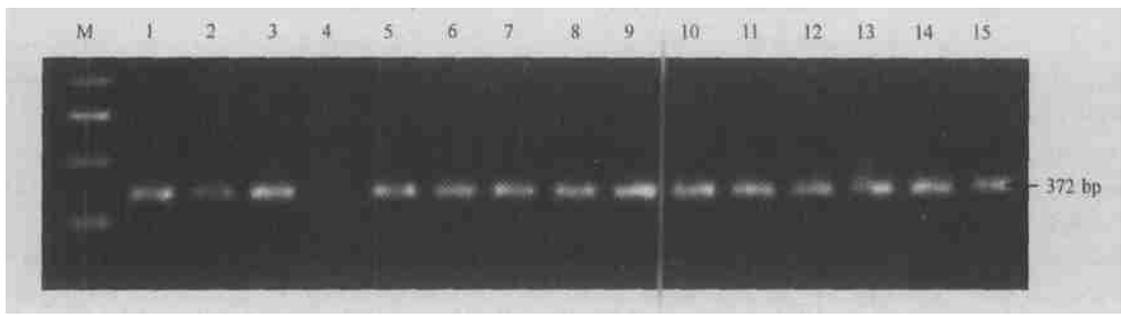


图3 接种剂 C 接种处理的玉米根样 nest-ed-PCR 电泳图

(引物配对为 5. 25-NDL22, 泳道 1 为孢子(阳性对照), 泳道 2~ 15 为玉米根样)

Fig 3 Nest-ed-PCR electrophoretogram of corn root inoculated with inoculum C with primers 5. 25-NDL22 (Lane 1: Spore of *G. mosseae*; Lane 2~ 15: Roots)

对 AM 真菌的应用而言, 土壤中可溶性磷的含量、土著 AM 真菌的数量以及土壤酸碱度等, 都会影响 AM 真菌效益的发挥^[15]。

对本试验中三次取样所检测的真菌感染率(表 3) 进行比较, 第二次较之第一次取样, 4 种接种处理的真菌感染率增幅均较大, 但第三次较之第二次取样, 4 种接种处理的真菌感染率增幅都很小。与 Wilson 等^[16] 的研究结果类似, 当田间土壤中存在一定数量 AM 真菌时, 植物根感染率先以指数级增长, 而后迅速趋于平稳。但也可能存在另外一个原因, 即在第二次到第三次取样期间, 玉米快速生长的发达的气生根系从距离营养钵较远的四周进入土壤, 根系增长的速度远大于被 AM 真菌感染的速度, 从而导致感染率的增幅变小。这也暗示了利用营养钵技术接种 AM 真菌用于玉米的生产需要进一步改进, 以便发挥接种真菌的最大效应。玉米根系发达, 何种程度的感染率促进植物生长的效果最好, 有待进一步研究。

本试验中 4 种接种剂在田间所表现的感染率与控制条件下 MPN 试验结果很不一致。田间接种的不同真菌表现的感染率差别较小, 而 MPN 试验测试的繁殖体数却差别很大, 说明田间土壤中影响 AM 真菌侵染的因素更多更复杂, 其中土著 AM 真菌与接种 AM 真菌的竞争侵染能力可能是决定菌根效应的关键因素。

另外, 当前茬作物为非菌根依赖性的作物或者长时间无杂草的休耕, 土壤中的 AM 真菌繁殖体数就会降低^[17]。本试验前茬作物为小麦, 虽然每克土中 AM 真菌的繁殖体数较少, 但在玉米生长后期其感染能力却并不低, 表明土著真菌具有很强的竞争感染能力。这也是菌根应用研究中非常重要的问题。

3.2 不同生态条件下的 AM 真菌的分子检测

运用 nest-ed-PCR 技术检测复杂生态环境如土壤

中的不同微生物区系是目前的研究热点之一, 对菌根研究而言, 已报道的研究工作基本上局限于控制条件下的分子检测^[6-8]。由于检测田间来源的根样内的 AM 真菌涉及到原核生物、植物、原生动物以及 AM 真菌以外的其他真菌, 是一个非常复杂的生态环境, 技术要求很高。本试验在反复摸索 nest-ed-PCR 反应条件的基础上, 成功实现了田间条件下的根样内的 AM 真菌的特异性检测, 为从分子水平评价高效 AM 真菌的应用潜力、研究 AM 真菌的竞争侵染以及 AM 真菌与其他微生物之间的相互关系奠定了基础。

nest-ed-PCR 成功运用的另一个要素就是 AM 真菌特异性引物的设计与验证, 而且 AM 真菌生长的环境越复杂, 引物验证工作就越重要。

参考文献

- [1] Smith S E, Read D J. Mycorrhizal Symbiosis. 2nd Ed. London: Academic Press, 1997. 1~ 605
- [2] van der Heijden M G A, Klironomos J N, Ursic M, *et al.* Mycorrhizal fungi diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 1998, 396: 69~ 72
- [3] Sylvia D M, Jansfer A G. Production of inoculum and inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. In: Robson A D, Abbott L K, Malajczuk N. eds. Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. 231~ 238
- [4] Abbott L K. Comparative anatomy of vesicular-arbuscular mycorrhizas formed on subterranean clover. *Australian Journal of Botany*, 1982, 30: 485~ 499
- [5] Simon L, Labude M, Bruns T. Specific application of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58: 291~ 295
- [6] van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, *et al.* Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology*, 1998, 7: 879~ 887

- [7] Clapp J P, Rodriguez A, Dodd J C. Inter- and intra-isolate rRNA large subunit variation in *Glomus coronatum* spores. *New Phytologist*, 2001, 149: 539~ 554
- [8] Jaquot E, van Tuinen D, Gianinazzi S, *et al.* Monitoring species of arbuscular mycorrhizal fungi in planta and in soil by nested PCR: Application to the study of the impact of sewage sludge. *Plant and Soil*, 2000, 226: 179~ 188
- [9] Porter W M. The "most probable number" method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Aust. J. Soil Res.*, 1979, 17: 515~ 519
- [10] Phillips J M, Hayman D S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 1970, 55: 158~ 161
- [11] 赵仁 等主编. 田间试验方法. 北京: 农业出版社, 1979. 40~ 63. Zhao R R, *et al.* eds. *Experimental Methods in Field* (In Chinese). Beijing: Agriculture Press, 1979. 40~ 63
- [12] van Tuinen D, Zhao B, Gianinazzi-Pearson V. PCR in studies of AM fungi: From primers to application. *In: Vama A. ed. Mycorrhiza Manual*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1998. 387~ 401
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. eds. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [14] Abbott L K, Robson A D. Infectivity and effectiveness of five endomycorrhizal fungi: Competition with indigenous fungi in field soils. *Aust. J. Agric. Res.*, 1981, 32: 621~ 630
- [15] 李晓林, 冯固. 丛枝菌根生态生理. 北京: 华文出版社, 2001. 1~ 358. Li X L, Feng G. eds. *Ecology and Physiology of Arbuscular Mycorrhiza* (In Chinese). Beijing: Huawen Press, 2001. 1~ 358
- [16] Wilson J M, Tommerup I C. Interactions between fungal symbionts: VA mycorrhizae. *In: Allen M F. ed. Mycorrhizal Functioning: An Integrative Plant-fungal Process*. New York: Chapman and Hall, 1992. 199~ 248
- [17] Johnson N C, Pfeleger F L. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultural stresses. *In: Bethlenfalvay G B, Linderman R G. eds. Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. Madison, Wis.: American Society of Agronomy, 1992. 1~ 27

MOLECULAR DETECTION OF FOUR ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGAL INOCULA IN FIELD TRIALS

Zheng Shixue Dong Xiuli Yu Ziniu Zhao Bin

(College of Life Science & Technology, Huazhong Agricultural University;
State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China)

Abstract Four arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inocula were produced in the sterilized soil under glasshouse conditions. Effectiveness and infectivity of the inocula were tested in pot culture with the most probable number (MPN) test method. The results indicated that biomass of inoculated plants was significantly higher than that of non-inoculated control plants ($p < 0.01$), and the number of propagules was in the range of 95~1 400 per gram inocula. The field trials were carried out by means of producing pre-inoculated seedlings prior to transplanting. The infection rate of maize roots increased rapidly at early stage of the plant growth and then leveled off. The yield of the maize inoculated with inoculum A (*Glomus constrictum*), C (three *Glomus* species) or D (*G. intraradices*) was significantly enhanced ($p < 0.05$), and so was the content of starch and phosphorus in grains of the maize.

Two *Glomus* species of arbuscular mycorrhizal fungi, *G. intraradices* and *G. mosseae* were successfully detected in the plant roots with species-specific probes and molecular approach—nested PCR. This study has made it possible to assess potential ability of introduced efficient species of AM fungi at molecular level and understand the interactions between AM fungi and other microorganisms in fields.

Key words AM fungal inoculum; MPN test; Field trials; Maize; nested PCR