

## 硫素对大豆根围 AM 真菌菌群结构的影响

李 瑾<sup>1</sup>, 蔡柏岩<sup>1,2</sup>, 刘潇睿<sup>1</sup>, 接伟光<sup>2</sup>

(1. 黑龙江大学 生命科学学院, 黑龙江省普通高等学校微生物重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150080; 2. 黑龙江东方学院, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘 要:**以大豆品种黑农 48 为材料,通过盆栽试验研究了不同硫素水平对结荚期大豆 AM 真菌感染率的影响及其菌群结构的变化。结果表明:不同硫水平对大豆 AM 真菌的感染率和菌群结构均有影响,其中大豆根系和土壤中 AM 真菌的多样性在硫素水平为  $0.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  时较高,当继续增加硫素水平时反而有所降低,不施硫时最低,表明适当施加硫素能够提高 AM 真菌的多样性,高硫水平反而抑制 AM 真菌的多样性。通过对 DGGE 图谱中 G1 等 12 条条带的序列分析表明,12 条条带对应的菌种均为球囊霉属 (*Glomus*) AM 真菌,表明该试验中球囊霉属是大豆根系和根际土壤中的优势 AM 真菌。

**关键词:**大豆;硫素水平;AM 真菌;多样性;DGGE

**中图分类号:**S565.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-9841(2010)06-0990-06

## Effect of Sulfur on Microbial Structure of AM Fungi in Soybean Rhizosphere

LI Jin<sup>1</sup>, CAI Bai-yan<sup>1,2</sup>, LIU Xiao-rui<sup>1</sup>, JIE Wei-guang<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Microbiology, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, Heilongjiang; 2. Heilongjiang East College, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

**Abstract:** A pot experiment was carried out to research the effect of different sulfur levels on microbial structure of AM fungi and its infection rate of HeiNong 48 soybean at podding stage. The results showed that sulfur levels had influences on both microbial structure of AM fungi and its infection rate. When the soil sulfur level was  $0.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , both the soybean roots and AM fungi had a high diversity. However, when the sulfur level rised, they were both decreased. And the diversity was lowest when no sulfur was added to the soil. These results indicate that addition of sulfur appropriately could increase the diversity of AM fungi and when the sulfur level was too high the diversity of AM fungi was decreased. Moreover, the results from analyzing the twelve bands in DGGE map suggest that the twelve bands with the corresponding species are *Glomus* AM fungi, and the *Glomus* were the dominant AM fungi both in soybean roots and rhizosphere.

**Key words:** Soybean; Sulfur; Arbuscular mycorrhizal fungi; Diversity; Denaturing gradient gel electrophoresis

硫是大豆继氮、磷、钾之后的第四大营养元素,在大豆生长发育及代谢过程中具有重要的生理功能<sup>[1]</sup>。近年来由于氮、磷、钾元素的大量投入,有机肥数量不足和施用含硫肥料较少,使我国农田土壤中存在严重的缺硫现象<sup>[2]</sup>,阻碍了大豆产量和品质的进一步提高和改善。丛枝菌根真菌(Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)在自然界分布广泛,能够与80%以上的陆生植物形成共生体<sup>[3]</sup>。AM真菌能够促进大豆对氮、磷、钾、硫等元素的吸收,促进大豆生长,提高大豆抗病抗旱能力,在大豆的生长发育中具有重要的生理功能<sup>[4-5]</sup>。目前,关于大豆AM真菌与氮、磷、钾之间的关系研究较多,表现出大豆AM真菌有利于促进土壤中氮、磷、钾的吸收,并且土壤中氮、磷、钾含量也影响AM真菌对大豆根系的侵染<sup>[6-8]</sup>。而关于大豆AM真菌与硫素之间关系的

研究还鲜见报道,前人大都将硫素与大豆AM真菌分开来研究,或者是仅研究硫素对大豆产量质量的影响,或者是仅研究AM真菌对大豆生长的影响<sup>[9-10]</sup>。该试验以不同硫素处理下的大豆菌根和根际土壤为材料,利用PCR-DGGE技术分析硫素对大豆AM真菌菌群结构的影响,为揭示硫素如何影响大豆与AM真菌建立高效共生体提供理论依据,同时也为提高和改善大豆产量和品质寻找新的突破口。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

大豆品种黑农 48(高蛋白型)。

#### 1.2 试验设计

试验于2009年在哈尔滨工业大学糖业研究所试验站进行。土壤主要农化指标为:有机质

收稿日期:2010-08-09

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(C200918);黑龙江省博士后科研启动基金项目(LBH-Q09022)。

第一作者简介:李瑾(1986-),女,在读硕士,主要研究方向为生理及分子生态学。E-mail: liuxingyu0190@163.com。

通讯作者:蔡柏岩,副教授。E-mail: caibaian@126.com。

25.57 g · kg<sup>-1</sup>, 全 N 1.73 g · kg<sup>-1</sup>、全 P 5.6 g · kg<sup>-1</sup>、全 K 23.2 g · kg<sup>-1</sup>、碱解 N 140.1 mg · kg<sup>-1</sup>、速效 P 13.44 mg · kg<sup>-1</sup>、速效 K 201 mg · kg<sup>-1</sup>, pH 6.9。

采用盆栽试验,每盆装风干土 12.5 kg。以尿素、磷酸二铵和氯化钾为基肥,折合施 N、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>、K<sub>2</sub>O 量均为 0.033 g · kg<sup>-1</sup> 土壤。设置 0、0.02、0.04、0.06 g · kg<sup>-1</sup> 土壤 4 个硫处理,分别记为 S1, S2, S3, S4。硫肥由单质硫提供,3 次重复。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 样品处理** 大豆结荚期用打孔器在近根系表土随机打孔取样,将同种处理的大豆根系和土壤分别混匀组成 1 个混合样品,分别记为 RS1, RS2, RS3, RS4 和 SS1, SS2, SS3, SS4。RS1 ~ RS4 代表不同处理的 4 个土壤样品,SS1 ~ SS4 代表不同处理的 4 个根样。根样用蒸馏水洗净后立即放入 FAA 固定液中,以备根染色使用。根段染色采用碱解离-酸性品红染色法<sup>[11]</sup>。土样风干后放于阴凉处保存备用。

**1.3.2 菌根形态观察与侵染率分析** 根段染色后,每个样品随机选 100 条根段,制片,镜检,观察菌根形态并计算菌根侵染率。根据每段根系菌根结构的多少,按 0, 10%, 20%, 30% …… 100% 的侵染数量计算出每条根段的侵染率,最后再统计菌根侵染率  $M(\%)$ 。

$$M(\%) = (0 \times \text{根段数} + 10\% \times \text{根段数} + 20\% \times \text{根段数} + \dots + 100\% \times \text{根段数}) / \text{总根段数}$$

**1.3.3 DNA 的提取** 根样 DNA 的提取参照王雪<sup>[11]</sup>的方法;土样 DNA 采用修改后的 Bead-Beating 法提取<sup>[12]</sup>。

**1.3.4 Nested-PCR** Nested-PCR 反应程序及反应体系均参照接伟光<sup>[13]</sup>的方法。

**1.3.5 DGGE** 取根样和土样的第 3 次 PCR 产物各 2.5 μL 进行 DGGE 分析<sup>[13]</sup>。采用浓度为 8% 的丙稀酰胺(丙稀酰胺:双丙稀酰胺 = 37.5:1),变性剂范围为 40% ~ 70% (100% 的变性剂为 40% 甲酰胺, 7 mol · L<sup>-1</sup> 尿素)。电泳温度为 60℃, 50 V 电压预电泳 30 min, 上样后 130 V 电泳 9 h。银染 20 min。

**1.3.6 DGGE 条带的克隆、测序及序列分析** 用无菌手术刀片将 DGGE 凝胶上选定条带进行割胶回收,以回收液作为模板,按照 Nested-PCR 的第 3 次 PCR 反应体系和反应程序对 AM 真菌 18S rDNA NS31-G101 区进行扩增。将胶回收扩增 PCR 产物连接到载体上,然后转化进 *E. coli* DH5α 感受态细胞中,筛选阳性克隆,将符合要求的阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序。测序结果提交至 GenBank 数据库,并进行 BLAST 比对,得出相关种属的序列信息。利用 BLASTN 程序对测序结果进

行同源性分析,从数据库中得到相关种属的序列信息,再通过 DNAMAN (Version 5.1) 软件进行系统发育分析。

### 1.4 DGGE 图谱分析

利用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件对 DGGE 图谱的丰度、优势度和多样性指数 3 个指标进行分析,反映 AM 真菌在不同硫素水平下的菌群结构。

丰度:用 DGGE 图谱中条带的个数来表示。

优势度:用某一特定条带的峰面积占样品总体峰面积的百分数来表示。

多样性指数 (Shannon-Weiner 指数):能够对物种丰富度和物种均匀性进行综合测度,其值用  $H$  表示。种数越多或各个种的个体数分配越均匀,多样性就越大。 $H$  值越大,表示该系统中生物多样性越高。

$$H = - \sum_{i=1}^s (P_i) (\log_2 P_i)$$

其中  $S$  为样本中 DGGE 指纹图谱的条带数目,  $P_i$  为第  $i$  个条带的优势度值。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌根形态观察及侵染率测定

根段经碱解离-酸性品红染色法处理后镜检,得到大豆丛枝菌根图片(图 1),并统计其侵染率(图 2)。

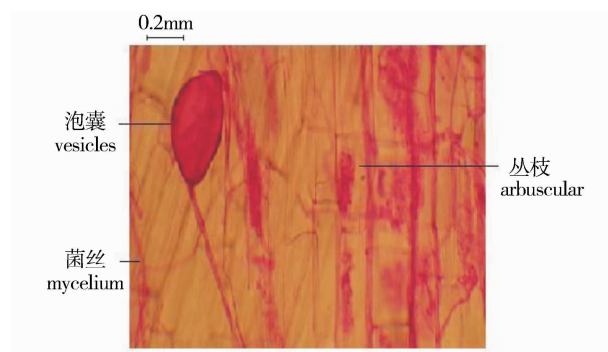


图 1 大豆丛枝菌根 (10 × 40)

Fig. 1 Arbuscular mycorrhiza of soybean (10 × 40)

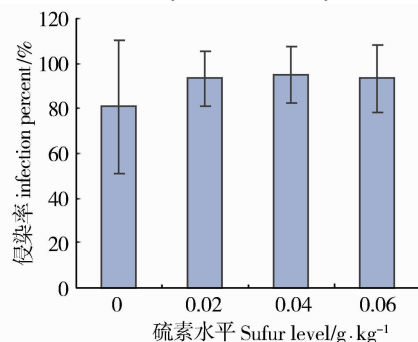


图 2 不同硫素水平 AM 真菌对黑农 48 侵染率的影响

Fig. 2 The infection percent of AM fungi against Heinong 48 under different sulfur levels

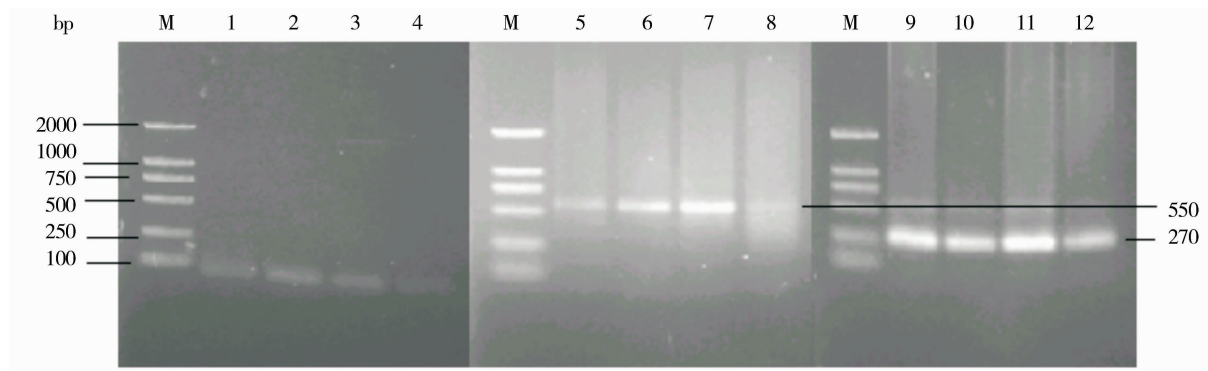
由图1可以看出,AM真菌侵染大豆根系形成丛枝、泡囊和菌丝。

由图2可以看出不同,菌根侵染率随施硫量的增加呈先升高后降低的变化趋势,其中硫素水平为S3时侵染率最高,表明适当施硫能够促进AM真菌的侵染,高硫则抑制AM真菌的侵染。经方差分析显示,侵染率变化差异极显著( $P < 0.01$ )。

## 2.2 样品DNA的提取与Nested-PCR

由于根样和土样中DNA含量均较低,电泳检测不到。需要通过Nested-PCR扩增进而来验证提取物中是否含有所需要的目的DNA。

以根样和土样的DNA为模板,Nested-PCR后经琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图3和图4。

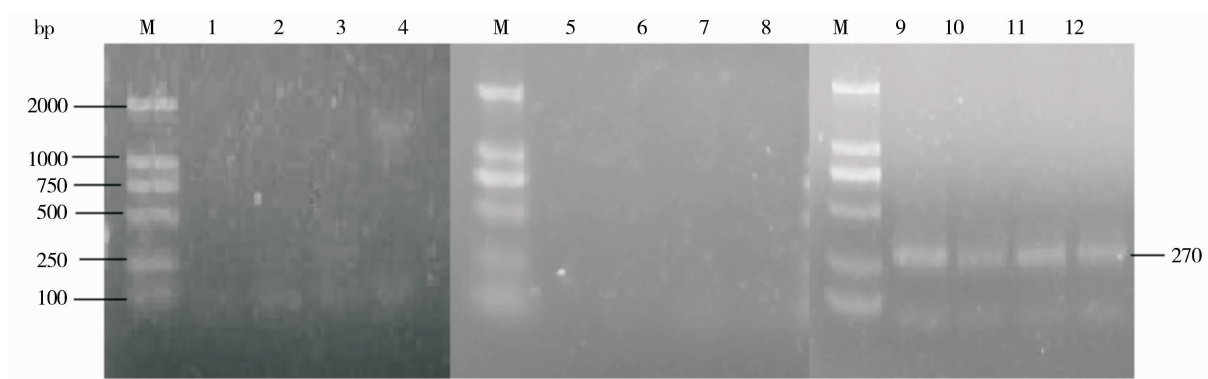


M: DL2000 Marker; 1-4: 4个根样第1次PCR; 5-8: 4个根样第2次PCR; 9-12: 4个根样第3次PCR.

M: DL2000 Marker; lane1-4: The first PCR results of four mycorrhizas; lane5-8: The second PCR results of four mycorrhizas; lane9-12: The third PCR results of four mycorrhizas.

图3 根样Nested-PCR扩增结果

Fig. 3 The Nested-PCR results of mycorrhiza



M: DL2000 Marker; 1-4: 4个土样第1次PCR; 5-8: 4个土样第2次PCR; 9-12: 4个土样第3次PCR

M: DL2000 Marker, lane1-4: The first PCR results of four soil samples; lane5-8: The second PCR results of four soil samples; lane9-12: The third PCR results of four soil samples.

图4 土样Nested-PCR扩增结果

Fig. 4 The Nested-PCR results of soil sample

由图3和图4可知,不论是根样DNA还是土样DNA,在第1次PCR扩增后,真菌DNA的拷贝数均较低,难以在琼脂糖凝胶上观察到目的条带(1.8 kb)。经第2次PCR扩增,4个根样均获得了大量的拷贝(约550 bp),而4个土样的AM真菌的拷贝数仍较低,未能在琼脂糖凝胶上观察到。第3次PCR扩增后各样品均得到大量的目的产物(约270 bp)。

## 2.3 DGGE图谱分析

各样品经DGGE后,银染(如图5)。

2.3.1 DGGE图谱的丰度 由图5和图6可知,在硫水平为S4时,侵染大豆根系的AM真菌种群数量最多,其次是硫水平为S2时。在硫水平为S2时,大豆根际土壤中的AM真菌种群数量最多。相比之下,硫水平为S2时,不论是根样还是土样中,AM真菌种群数量都较多。

根据DGGE图谱中条带的共有性和特异性选取G1等12条条带进行分析,表2为G1等12条条带在各样品中的强度。

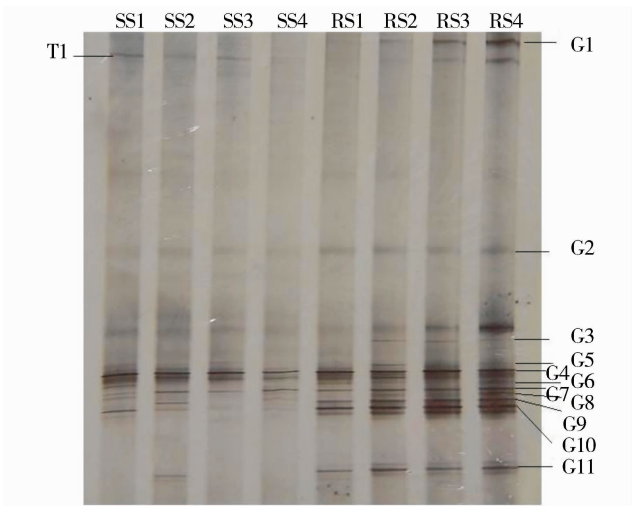


图 5 根系和根际土壤样品 DGGE 图谱  
Fig.5 The DGGE map of root samples and rhizospheric soil

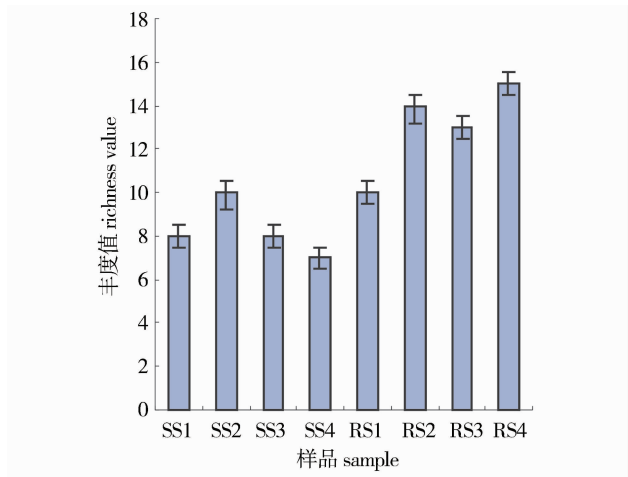


图 6 根际土壤和根系各样品的丰度值  
Fig.6 The richness values of rhizospheric soil and root samples

表 1 各样品的 DGGE 图谱中 12 条条带的强度  
Table 1 The intensity of twelve bands in DGGE map of different samples

样品	G1	T1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11
SS1	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
SS2	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
SS3	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
SS4	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
RS1	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
RS2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RS3	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
RS4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+, +, + 和 - 分别表示条带强、有条带和没有条带。  
+, +, + and - indicated strong, band and no band, respectively.

由表 1 可知,不同硫处理对大豆根系和根际土壤内 AM 真菌的菌群结构产生较大影响。以土壤样品为例,当土壤施硫为 S1 时,土壤样品中有 T1、G2、G4、G6、G7、G8 和 G10 这 7 条条带,T1、G2、G4 和 G10 条带亮度较强;硫水平为 S2 时,土壤样品中也

有 7 条条带,与硫水平为 S1 时相比,增加了 G11 条带,少了 G6 条带,G2、G4 和 G7 条带亮度较强;硫水平为 S3 时,土壤样品中只有 T1、G2、G4、G7 和 G10 这 5 条条带,G2 和 G7 条带亮度减弱;硫水平为 S4 时,土壤样品中仅有 G2、G4、G7 和 G10 这 4 条条带,G4 和 G7 条带亮度较强。同理,不同硫水平时,根系样品中菌群结构也有较大变化。综合根系及根际土壤样品来看,当硫水平为 S2 时,菌群结构相对丰富。表明土壤中硫素含量对大豆根系及根际土壤中 AM 真菌的菌群结构有影响。

2.3.2 DGGE 条带的测序分析 将 G1 等 12 条 DGGE 条带经连接转化后测序,测序结果使用 BLAST 程序,将 12 条序列与 GenBank 中的序列进行比对,获得各序列的同源性信息(表 2)。

表 2 12 条序列的 BLAST 结果  
Table 2 BLAST results of the twelve sequences

克隆编号 Clone number	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)	相似性 Similarity
G1	235	<i>Glomus</i> sp. (AJ852534)	233/235 (99%)
T1	235	<i>Uncultured Glomus</i> (AM746149)	223/236 (94%)
G2	234	<i>Uncultured Glomus</i> (AM746131)	230/234 (98%)
G3	236	<i>Uncultured Glomus</i> (FM875888)	234/236 (99%)
G4	232	<i>Uncultured Glomus</i> (FM875888)	232/232 (100%)
G5	235	<i>Glomus</i> sp. (EU332711)	234/235 (99%)
G6	235	<i>Glomus</i> sp. (EU332711)	234/235 (99%)
G7	235	<i>Glomus</i> sp. (EU332711)	232/235 (98%)
G8	235	<i>Uncultured Glomus</i> (FN429383)	235/235 (100%)
G9	234	<i>Uncultured Glomus</i> (AM746149)	231/234 (98%)
G10	235	<i>Glomus</i> sp. (EU332711)	233/235 (99%)
G11	234	<i>Uncultured Glomus</i> (AM746135)	223/234 (95%)

DGGE 条带测序结果显示,序列测出的片段长度大都在 234 bp 左右,且测序结果与 GenBank 数据库中的已知菌种均具有较高的相似性,都在 94% 以上,可以初步确定优势菌种的属。大豆根系和土壤样品 DGGE 条带比对结果显示,这 12 个条带所代表的菌群均属于球囊霉属 AM 真菌,表明该属的 AM 真菌是大豆根系和根际土壤中的优势种群。

为显示以上测序所得出的序列与已知 AM 真菌

的亲缘关系,利用 GenBank 数据库中的已知菌种与测序所得出的序列构建系统发育树(图 7)。

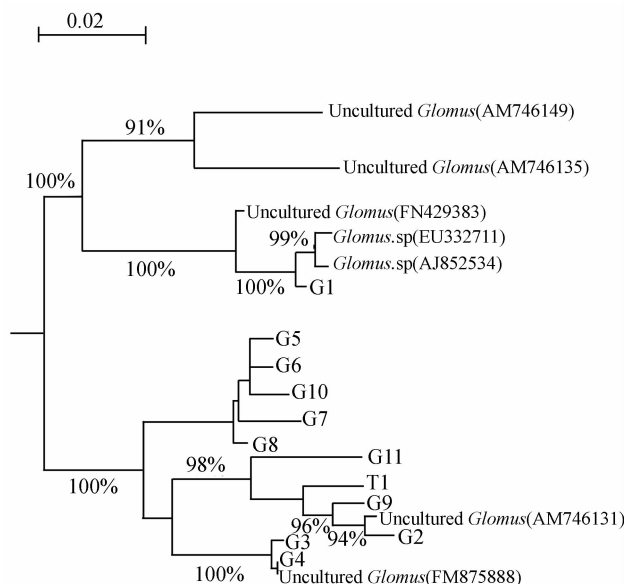


图 7 12 条 DGGE 序列与其近缘物种的系统发育树

Fig. 7 The evolutionary tree of twelve DGGE sequences and some relative species

由图 7 可以看出,这 12 条条带均属于 *Glomus* 菌群,相似性达 100%。其中 G1 与数据库中 *Glomus. sp*(AJ852534) 有很近的亲缘关系,相似性达 100%;G2、G9、T1、G11 与数据库中 *Uncultured Glomus*(AM746131) 有很近的亲缘关系,其中 G2 与其最近,相似性达 94%;G3、G4 与数据库中 *Uncultured Glomus*(FM875888) 有很近的亲缘关系,其中 G4 与其最近;G5、G6、G7、G8、G10 之间也有较近的亲缘关系,其中 G5、G6 和 G10 亲缘关系最近。

**2.3.3 DGGE 图谱的优势度** 优势度代表某一特定位置处条带的量占该样品中总体条带量的百分数,与条带的明暗程度和条带的峰面积成正比,能够反映各物种种群数量的变化情况。优势度越大,表明该种群的优势地位越突出。图 8 为 G1 等 12 条条带在不同硫素水平下的优势度,以此来表明各样品中的优势种群。

由图 8 可以看出,在同一样品中不同条带的优势度具有不同程度的变化。以 SS1 样品为例,SS1 样品中 G4 条带的优势度最高,为 16.93%,G8 条带的优势度最低,为 7.89%,由此可知 SS1 样品中 G4 为优势种群。同理,SS3、SS4 和 RS1 样品中,G2 为优势种群,其次为 G4;SS2 样品中 G2 也为优势种群,其次为 G7;RS2 样品中 G11 为优势种群;RS3 样品中 G10 为优势种群,其次为 G4;RS4 样品中 G10 为优势种群,其次为 G1 和 G4。这表明在不同硫素水平下,大豆根际土壤和根系中的优势种群不同。

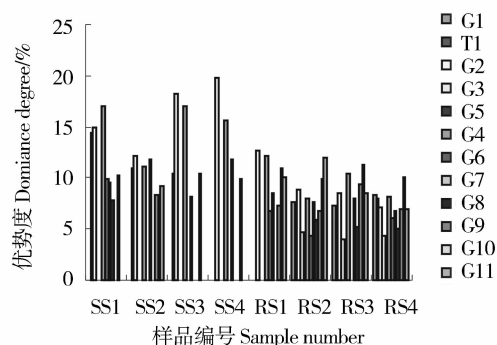


图 8 各样品中 12 条条带的优势度柱状图

Fig. 8 Histogram of the dominance degree of twelve bands in different samples

**2.3.4 DGGE 图谱的多样性指数** 由表 4 可知,土样品中 SS2 的  $H$  值最大,SS4 的  $H$  值最小;根样品中 RS4 的  $H$  值最大,其次为 RS2,RS1 的  $H$  值最小。综合土样和根样的  $H$  值来看,在硫素水平为 S2 时,AM 真菌的多样性较好;硫素水平为 S1 时,AM 真菌的多样性最差,表明适当施硫能够提高 AM 真菌的多样性,然而过高硫水平反而会抑制 AM 真菌的多样性。

表 4 各样品的多样性指数 ( $H$ )

Table 4 The diversity index ( $H$ ) of different samples

样品编号 Sample number	SS1	SS2	SS3	SS4	RS1	RS2	RS3	RS4
$H$ value	2.94	3.28	2.94	2.74	3.28	3.73	3.65	3.86

### 3 讨论

菌根是自然界的一种普遍现象,其研究越来越受到重视。而 AM 真菌不能离体培养,给遗传学及生态学的研究带来了许多困难。近年来,人们试图克服 AM 真菌纯培养的难题,但并未能从根本上解决<sup>[14]</sup>。采用 PCR-DGGE 技术从分子生物学角度对 AM 真菌进行研究,避开了纯培养的难题,通过 DGGE 图谱可以直接再现群落结构,具有快速、准确等优点<sup>[15]</sup>。

AM 真菌对植物的侵染受许多生态条件的限制,如土壤、宿主植物、营养因素、pH 等。因此,不同的硫素水平 AM 真菌对大豆的侵染可能会有差别,而研究证实了这一点,适当施硫能够促进 AM 真菌的侵染,高硫水平则抑制 AM 真菌的侵染。出现这种现象的原因可能是:在适当硫素水平下,大豆根系膜透性好,AM 真菌生长所需要的氨基酸、还原性等糖代谢产物的外渗量增加<sup>[16]</sup>,能够促进 AM 真菌菌丝的生长,提高侵染率;当土壤中硫素水平过低时,硫素不能满足植物的生长需要,植株生长差,光合作用减弱,根内可溶性糖浓度太低,外渗量小,



影响 AM 真菌生长, 因此侵染率低; 而高硫水平下, 大豆通过根系直接获得足够的硫营养, AM 真菌对大豆硫营养的贡献减少, 因而侵染率降低。

AM 真菌在土壤中存在后才能侵染大豆根系, 因此理论上讲, 根样中出现的条带在土样中都应该有, 但研究中土样中条带相对较少, 可能的原因是由于土样中 AM 真菌的孢子量较少。AM 真菌在土壤中能够生成外生菌丝和产生孢子, AM 真菌的外生菌丝在土壤中只能存活几天, 而孢子存活的时间相对较长<sup>[17]</sup>。土壤中 AM 真菌 DNA 的提取来源于这 2 个方面, 如果某些 AM 真菌产生的孢子较少, 那么在提取土壤 DNA 的时候就很难将其提出来, 因此就可能导致本试验中土样的条带较少的现象。另外, 对 12 条条带的测序显示, 这 12 条条带代表的菌种均属于球囊霉属, 表明球囊霉属是大豆根际和根际土壤中的优势菌属, 这与蔡柏岩等<sup>[18]</sup>对大豆根围丛枝菌根真菌鉴定结果相符。至于大豆根际土壤中是否还存在其它种属的 AM 真菌, 仍需进一步研究。

## 参考文献

- [1] 李金凤, 张玉龙, 汪景宽. 硫对大豆生长发育及生理效应影响的研究[J]. 土壤通报, 2004, 35(5): 612-616. (Li J F, Zhang Y L, Wang J L. Study on the effect of sulfur on the growth and physiology of soybean[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2004, 35(5): 612-616.)
- [2] 迟凤琴, 魏丹, 申惠波, 等. 黑龙江省主要耕地土壤硫素现状研究[J]. 土壤通报, 2003, 34(3): 209-211. (Chi F Q, Wei D, Shen H B. Study on the sulfur status in cultivated soils of Heilongjiang Province[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2003, 34(3): 209-211.)
- [3] Hijiri M, Niculita H, Sanders I R. Molecular characterization of chromosome termini of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (*Glomeromycota*)[J]. Fungal Genetics and Biology, 2007, 44: 1380-1386.
- [4] Karandashov V, Bucher M. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas[J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(1): 22-29.
- [5] 李海燕, 刘润进, 李艳杰, 等. AM 真菌和胞囊线虫对大豆根内酶活性的影响[J]. 菌物学报, 2003, 22(4): 613-619. (Li H Y, Liu R J, Li Y J. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and *Heterodera glycines* on enzyme activity in soybean roots[J]. Mycosystema, 2003, 22(4): 613-619.)
- [6] 刘灵, 廖红, 王秀荣, 等. 磷有效性对大豆菌根侵染的调控及其与根构型、磷效率的关系[J]. 应用生态学报, 2008, 19(3): 564-568. (Liu L, Liao H, Wang X R, et al. Regulation effect of soil P availability on mycorrhizal infection in relation to root architecture and P efficiency of *Glycine max* [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2008, 19(3): 564-568.)
- [7] 雍太文. “麦/玉/豆”套作体系的氮素吸收利用特性及根际微生态效应研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2009: 66. (Yong T W. Analysis of the Nitrogen Uptake and Utilization, Rhizosphere Micro-Ecology in the “Wheat/Maize/Soybean” Relay-Cropping System[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2009: 66.)
- [8] 张旭红, 朱永官, 王幼珊, 等. 不同施肥处理对丛枝菌根真菌生态分布的影响[J]. 生态学报, 2006, 26(9): 3081-3087. (Zhang X H, Zhu Y G, Wang Y S, et al. Effect of long-term fertilization on the diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in Northeast China[J]. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(9): 3081-3087.)
- [9] Mozafar S, Mahlagha G, Hassan E. Improved growth of salinity-stressed soybean after inoculation with salt pre-treated mycorrhizal fungi[J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164(9): 1144-1151.
- [10] Jeff R P, Rachel G C, Kari E D, et al. Effect of glyphosate on the tripartite symbiosis formed by *Glomus intraradices*, *Bradyrhizobium japonicum*, and genetically modified soybean [J]. Applied Soil Ecology, 2009, 41(1): 128-136.
- [11] 王雪. 利用 PCR-DGGE 技术分析不同生境黄槩 AM 真菌多样性[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2009: 23. (Wang X. Using PCR-DGGE technique to analyse the diversity of different habitats Huangbo AM fungal [D]. Harbin: Heilongjiang University, 2009: 23.)
- [12] Yeates C, Gilling M R. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification[J]. Biological Procedures Online, 1998, 1: 40-47.
- [13] 接伟光. 黄槩 (*Phellodendron amurense*) 丛枝菌根真菌鉴定及菌群结构分析[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2008. (Jie W G. Identification of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria structural analysis in Huangbo (*Phellodendron amurense*) [D]. Harbin: Heilongjiang University, 2008: 35-37.)
- [14] 杨晓红, 孙中海, 邵菊芳, 等. 丛枝菌根真菌培养方法研究进展[J]. 菌物学报, 2004, 23(3): 444-456. (Yang X H, Sun I H, Shao J F, et al. Advance of cultural methods for arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Mycosystema, 2004, 23(3): 444-456.)
- [15] 接伟光, 蔡柏岩, 葛菁萍, 等. 黄槩丛枝菌根 (AM) 真菌 PCR-DGGE 条件研究[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2008, 25(4): 534-538. (Jie W G, Cai B Y, Ge J P, et al. Studies on PCR-denaturing gradient gel electrophoresis conditions of arbuscular mycorrhizal fungi of *Phellodendron amurense* Rupr [J]. Journal of Natural Science of Heilongjiang University, 2008, 25(4): 534-538.)
- [16] 贺学礼, 李生秀. 泡囊-丛枝菌根生态学研究进展[J]. 干旱地区农业研究, 1996, 14(1): 35-42. (He X L, Li S X. Advance in vesicular-arbuscular mycorrhizal ecological research[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 1996, 14(1): 35-42.)
- [17] 龙良鲲, 羊宋贞, 姚青, 等. AM 真菌 DNA 的提取与 PCR-DGGE 分析[J]. 菌物学报, 2005, 24(4): 564-569. (Long L K, Yang S Z, Yao Q, et al. DNA extraction from arbuscular mycorrhizal fungi and analysis by PCR-DGGE [J]. Mycosystema, 2005, 24(4): 564-569.)
- [18] 蔡柏岩, 接伟光. 大豆根围丛枝菌根真菌鉴定[J]. 大豆科学, 2009, 28(3): 483-486. (Cai B Y, Jie W G. Detection of the arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of soybean [J]. Soybean Science, 2009, 28(3): 483-486.)