植物营养与肥料学报 2016,22(4):1031 -1038
Journal of Plant Nutrition and Fertilizer
doi: 10.11674/zwyf.15403
http://www.plantnutrifert.org

玉米丛枝菌根真菌根外菌丝表面定殖细菌解磷功能鉴定

柴小粉, 张 林, 田芷源, 王 菲, 冯 固*
(中国农业大学资源与环境学院, 北京 100193)

摘要:【目的】在田间原位条件下研究丛枝菌根(Arbuscular mycorrhizal, AM)真菌根外菌丝表面有无解磷细菌定殖,并对存在的解磷细菌的种类进行鉴定,对其活化有机磷的能力进行检测,从而为更好地认识菌丝际土壤有机磷的周转和磷的生物地球化学循环过程提供依据。**【方法】**利用河北省曲周县中国农业大学实验站的玉米长期定位试验,采用田间埋膜方式从玉米根系周围收集 AM 真菌的根外菌丝,用蒙金娜有机磷固体培养基筛选菌丝表面具有矿化植酸钙能力的细菌,对筛选出的细菌进行分离、培养,然后提取细菌 DNA,通过 16S rDNA 测序分析来确定解磷细菌的种类。分离鉴定的菌株先用蒙金娜有机磷固体培养基通过测定菌落直径(d)及溶磷圈直径(D)初步鉴定其活化植酸钙的能力,再用无菌的蒙金娜有机磷液体培养基确定每株解磷细菌矿化植酸磷的能力,并对溶液的 pH 进行测定,每个菌株重复 3 次。最后采用两室隔网根盒将分离纯化的解磷细菌回接至 AM 真菌根外菌丝,鉴定回接成功率,确定分离出的解磷细菌能否成功定殖于菌丝表面。**【结果】**从 AM 真菌根外菌丝表面分离得到了 29 株具有活化有机磷能力的细菌,分属于芽胞杆菌、假单胞菌、沙雷氏菌、葡萄球菌和肠杆菌 5 个不同的属。通过有机磷液体培养进一步检测这些菌株活化植酸磷的能力,发现它们对植酸磷的矿化率为 1.9%～21.9%。其中假单胞菌属细菌的解磷能力相对较强,对植酸磷的矿化率达 14% 以上,液体培养基的 pH 值下降 2～4 个单位。将分离纯化的细菌回接至两室隔网根盒的菌丝室,培养 30 d 后,从菌丝表面再次检测到除假单胞菌属外的芽胞杆菌属(*Bacillus*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)细菌,另外还检测到贪铜菌属(*Cupriavidus*)细菌。**【结论】**在田间原位条件下,与玉米共生的 AM 真菌的根外菌丝表面有多种解磷细菌定殖,它们活化有机磷能力存在差异,其中以假单胞菌属细菌的解磷能力相对较强。

关键词: 玉米; AM 真菌; 植酸钙; 解磷细菌; 菌丝际
中图分类号: S513.01; S144.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1008-505X(2016)04-1031-08

Identification of phytate mineralizing bacteria colonized on the extraradical hyphal surface of arbuscular mycorrhizal fungi in a maize field

CHAI Xiao-fen, ZHANG Lin, TIAN Zhi-yuan, WANG Fei, FENG Gu*
(College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract:【Objectives】 The objective of this study was to investigate whether phosphate mineralizing bacteria (PMB) could colonize on the hyphal surface of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in maize field and to identify these bacteria and test their abilities in mineralizing organic phosphate. This can help to go to deep into understanding the functions of hyphosphere bacteria in soil phosphorus turnover and biogeochemical cycle. **【Methods】** We collected the extraradical hyphae of AM fungi associated with maize roots from the field at China Agricultural University long-term experimental station in Quzhou, Hebei province. The PMB attached to AM fungal hyphae were selected using the phytate-selective medium contained phytin as the sole phosphorus source. The DNA of selected bacteria was extracted with TIANamp Bacteria DNA Kit according to the manufacturer's instructions. Then the genera of PMB were identified through bacterial 16S rDNA sequencing. The abilities of PMB to utilize organic phosphate were determined in solid phytate-selective medium contained phytin by the diameter of bacterial

收稿日期: 2015-09-28　　**接受日期:** 2015-12-21
基金项目: 国家自然科学基金(31501831,U1403285)和教育部博士点基金(20120008130001)资助。
作者简介: 柴小粉(1990—),女,河南商丘人,硕士研究生,主要从事根际营养与调控研究。E-mail: xf_chai@cau.edu.cn
*通信作者 Tel: 010-62733885, E-mail: fenggu@cau.edu.cn

colony (d) and phosphorus solubilizing halo (D), and by inorganic phosphorus concentration and pH in liquid phytate-selective medium. Each PMB isolated from AM fungal hyphae was analyzed in triplication. PMB strains belonged to different genera were inoculated into the hyphal compartment of a two-compartment microcosm conducted in the greenhouse to test their abilities to re-colonize on the hyphal surface. **【Results】** Twenty-nine strains of PMB were isolated from the surface of AM fungal hyphae and affiliated to *Bacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* and *Enterobacter*, respectively. The abilities of PMB to utilize phytin in the liquid medium showed that the mineralization rates ranged from 1.9% to 21.9%. Among them, the genus of *Pseudomonas* had the highest mineralization rate (more than 14%), meanwhile the pH of liquid medium was reduced by 2 to 4 units. All the identified PMB strains were re-inoculated into the hyphal compartment of a two-compartment microcosm in the greenhouse. After 30 days, we found that four genera of the PMB were isolated and identified successfully from the hyphal surface with the exception of the genus of *Pseudomonas*, interestingly, another PSM strain, *Cupriavidus* was detected. **【Conclusions】** The results demonstrated that PMB could attach to the surface of extraradical hyphae of AM fungi associated with maize in the field and 29 bacterial strains belonged to 5 genera were identified. They had different ability to mineralize phytin and the genus of *Pseudomonas* had the highest mineralization rate.

Key words: maize; arbuscular mycorrhizal fungi; phytin; phytate mineralizing bacteria; hyphosphere

丛枝菌根(arbuscular mycorrhizal, AM)真菌是一类重要的土壤微生物,能够与80%以上的陆生植物形成共生关系[1],产生大量的根外菌丝来增强植物对移动性差的土壤养分(如磷、锌)的吸收[2],提高植物对于旱和重金属等非生物胁迫以及病原微生物等生物胁迫的抗性,促进土壤团聚体的形成[3]。此外,AM真菌的根外菌丝能够分泌质子、糖、有机酸阴离子[4],改变菌丝周围土壤的理化性质,形成"菌丝际(hyphosphere)"[5],为土壤微生物提供定殖场所[6-9]。解磷细菌也是土壤中一类重要的功能微生物,数量可以占到可培养细菌的40%[10-11],通过释放质子、有机酸和磷酸酶等代谢产物来活化土壤难溶解的有机态或无机态的磷酸盐。许多研究已经证明,定殖于作物根际的解磷细菌能够帮助植物吸收难溶性磷,改善植物的磷营养[12]。

AM真菌与解磷细菌的互作一直是生态学和植物营养学的研究热点。大量研究工作表明,在盆栽条件下同时接种AM真菌和解磷细菌能够显著提高植物对磷的吸收,促进植物生长[13-14]。但这些研究都是在根际范围内进行,未排除根系对两种微生物的影响。利用两室分隔的根盒装置,在不受根系影响的菌丝室接种解磷细菌的研究发现AM真菌 *Rhizophagus irregularis*(原名 *Glomus intraradices*)与解磷细菌互作可以提高土壤中磷酸酶的活性、促进土壤中植酸磷的矿化[15-16]。而Tisserant等[17]通过对AM真菌模式菌株 *Rhizophagus irregularis*(DAOM 197198)的转录组分析发现AM真菌不含编码植酸酶蛋白的基因,这就意味着AM真菌不具备直接矿化植酸磷的能力,之前报道的AM真菌促进有机磷矿化是通过AM真菌菌丝刺激解磷细菌的活性实现的[18-19]。然而,AM真菌与解磷细菌互作的研究大多是在室内模拟条件下进行的,在真实的生态系统(如农田生态系统)中的研究尚不多见。

本试验的目的是研究在田间原位条件下AM真菌根外菌丝上是否有活化有机磷的细菌定殖。然后分离纯化出这些解磷细菌,对它们的种类和解磷能力进行鉴定,从而揭示菌丝表面解磷细菌的定殖过程和细菌种类,对于理解菌丝际微域土壤难溶性磷的周转和生物地球化学循环过程提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 菌丝收集

菌丝收集在中国农业大学河北曲周(36°46′N, 114°56′E)实验站的玉米长期定位试验田进行。该定位试验开始于1993年,每年按15 t/hm^{2}的用量施用堆肥(每51 kg堆肥原料中含秸杆30 kg、畜禽粪15 kg、棉仁饼2.5 kg、糠麸2.5 kg、红糖1 kg)。在玉米抽雄期(2011年8月17日),将装有聚碳酸酯膜(半径4.5 cm,孔径0.45 μm,经4.2 g/L植酸钙浸泡1 h)的尼龙膜袋子(孔径30 μm,阻止玉米根系长到聚碳酸酯膜上)埋入玉米行间距地表20 cm的土壤中(图1)。埋膜五周(2011年9月24～25日)后,将含聚碳酸酯膜的尼龙袋从田间取出,迅速放入冰盒内,带回实验室置于4℃冰箱保存,用于后

图 1　田间埋放尼龙袋示意图

Fig. 1　Schematic diagram of burying nylon bags in the field

续解磷细菌的分离筛选。

1.2　菌丝表面可培养解磷细菌的分离与纯化

在超净工作台中将 0.45 μm 孔径的聚碳酸酯膜从尼龙袋中取出,用高压灭菌的 NaCl 溶液(1.7 g/L)清洗三次,除去膜上的土壤颗粒和菌丝表面粘附的细菌。在体式显微镜下观察并找到膜上的菌丝后,用灼烧灭菌的镊子挑出菌丝,放入含有蒙金娜有机磷培养基[1 L 体系: 10 g 葡萄糖(glucose)、0.5 g 硫酸铵($(NH_4)_2SO_4$)、0.3 g 氯化钠(NaCl)、0.3 g 氯化钾(KCl)、0.03 g 硫酸亚铁($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)、0.03 g 硫酸锰($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)、0.3 g 硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)、0.4 g 酵母粉、15 g 琼脂粉、2 g 植酸钙,pH 为 7.0]的平板上,在 37℃恒温箱中培养 4～5 d。将长出菌落并伴有溶磷圈的菌株接种到新的蒙金娜有机磷培养基上进一步确定其解磷能力,37℃恒温培养 5 d 后测定菌落直径(d)和溶磷圈直径(D),并计算比值(D/d)。然后将这些菌株接种到 LB 斜面培养基上[1 L 体系: 10 g 蛋白胨、5 g 酵母抽提物、10 g 氯化钠、15 g 琼脂粉,pH 为 7.0],37℃培养 2 d 后置于 4℃冰箱中保存。

1.3　菌株鉴定

对矿化植酸钙的细菌进行 16S rDNA 测序分析,来确定这些菌株的种类。首先使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN DP302)提取细菌 DNA,方法为在 LB 培养液中活化细菌,吸取菌液进行离心(11500 × g,1 min),取下部沉淀,按试剂盒说明提取细菌 DNA,所得 DNA 用 NanoDrop 2000 检测其浓度及纯度,-20℃保存。其次 PCR 扩增采用细菌 16S rDNA 通用引物(27F: 5′-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3′; 1492R: 5′-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3′; M 为 A 或 C),PCR 反应在 Biomatro T3 扩增仪上进行,反应体系为 50 μL。PCR 原液组成为: 10 × PCR 扩增缓冲液 5 μL, dNTPs 4 μL(dATP、dGTP、dCTP、dTTP 均为 25 mmol/L),正反向引物各 1 μL(6 μmol/L),Taq 聚合酶 1 μL,以及 1 μL DNA 模板,37 μL 超纯水。PCR 反应程序为 94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min, 58℃退火 1 min,72℃延伸 90 s,循环 30 次; 最后 72℃延伸 7 min。然后将 PCR 产物交由华大基因进行测序分析,所得序列提交到 Genbank 中利用 Blast 程序(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)进行相似性比对,确定细菌的种类,最后用 MEGA 软件(版本 4.0)构建系统进化树。

1.4　解磷细菌解磷能力的测定

将上述步骤筛选的各株解磷细菌分别接入 LB 培养液中,37℃培养 16 h 后,用分光光度计调整细菌浓度至 OD 值($\lambda = 600$ nm)为 0.6,然后向无菌的蒙金娜液体有机磷培养基(30 mL)中加入 2 mL 细菌悬液,以不接菌液的处理作为对照,从而确定每株解磷细菌矿化有机磷的能力,每个菌株重复 3 次, 37℃振荡(180 r/min)培养 48 h 后,取 2 mL 培养液进行离心(4℃,12000 r/min,5 min),吸取 1 mL 上清液,采用钼锑抗比色法测定无机磷的浓度[20],并用 pH 计(DENVER, UB-7)测定培养液 pH 值。

1.5　菌丝际解磷细菌回接试验

供试土壤是 2010 年 5 月取自山东省泰安市低磷农田的棕壤,土壤基本理化性状: 速效磷(Olsen-P)3.30 mg/kg、有效钾(NH_4Cl 提取)97.6 mg/kg、有机质 7.27 g/kg、有效氮 7.20 mg/kg、pH 6.40,过 2 mm 筛后,送至北京鸿仪四方辐射技术有限公司(Beijing Hongyisifang Radiation Technology Co, Ltd)进行 γ 射线(辐照强度: 10 kGy ^{60}Co γ-ray)灭菌。供试装置为隔网分室根盒培养装置(图 2),根室种植玉米,设置接种 AM 真菌与不接种 AM 真菌(*Rhizophagus irregularis*)两个处理,每个处理重复三次。播种一个月后,在菌丝室中接入筛选出的解磷细菌的混合菌悬液,继续培养一个月后收获,收集菌丝室的土壤,在体式显微镜下挑取菌丝放入有机磷选择性培养基上进行筛选。后续的分离和鉴定过程同 1.2 和 1.3。

1.6　数据处理

试验数据均采用 Excel 进行整理,利用 SPSS 软件(16.0 版本,SPSS Inc.)进行数据分析。对无机磷浓度数据先进行方差同质性检验(Levene′s 检验),再进行单因素方差分析和 LSD 法多重比较($P <$

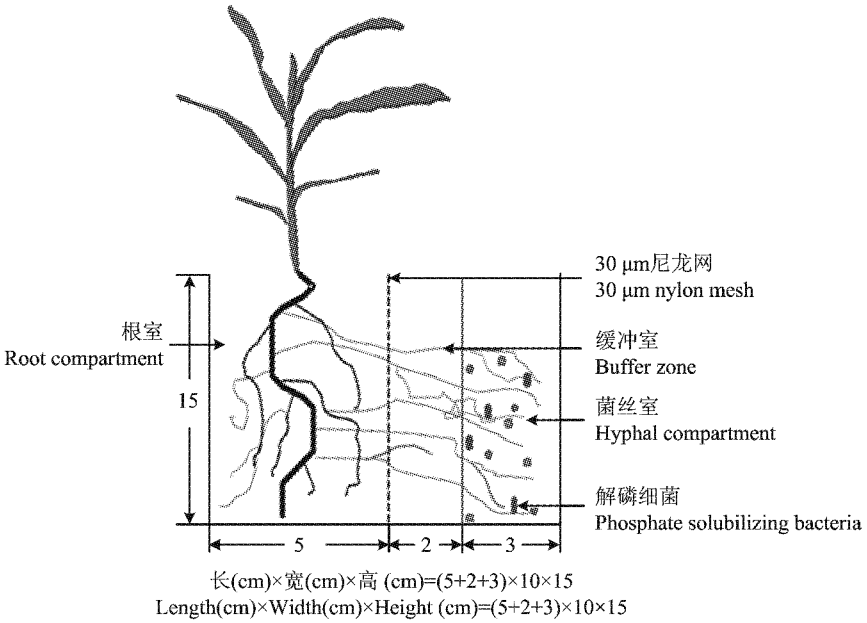

图2 两室培养系统示意图

Fig. 2 Schematic diagram of two compartments cultivation system

0.05)。对无机磷浓度和培养液 pH 数据进行相关性分析。利用 MEGA 软件(版本 4.0)构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 解磷细菌的鉴定

本研究对分离筛选出的 29 株解磷细菌进行了 16S rRNA 基因系统发育树的构建(图 3)。结果表明 29 株解磷细菌分别属于芽胞杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和肠杆菌属(*Enterobacter*),其中,芽胞杆菌属(15 株,53.3%)和假单胞菌属(10 株,33.3%)为优势菌群,其他依次为沙雷氏菌属(2 株,6.7%)、葡萄球菌属(1 株,3.3%)和肠杆菌属(1 株,3.3%)。

2.2 菌丝表面解磷细菌的分离和解磷能力的测定

本试验收集到 AM 真菌菌丝后,从菌丝表面筛选出 30 株具有矿化植酸磷能力的细菌,编号依次为 HM1-30。由于 HM26 菌株后面的活化没有成功,因此该菌株解磷能力未测定。在蒙金娜有机磷培养基上测定细菌菌落直径(d)及其溶磷圈直径(D),解磷细菌溶磷圈直径与菌落直径比值结果如表 1 所示。在蒙金娜液体培养基中加入植酸钙作为唯一磷源,接种细菌 48 h 后通过测定培养基上清液中无机磷浓度来衡量细菌能否活化植酸磷及其活化能力,结果(图 4)表明 29 株细菌均可活化植酸钙并释放出无机磷,液体培养基中的无机磷浓度在 2 ~ 23 mg/L 之间,占有机磷的 1.9% ~ 21.9%。不同属的细菌活化有机磷的能力有明显差异,假单胞菌属的细菌的解磷能力相对较高,矿化出的无机磷浓度均在 15 mg/L 以上,解磷效果非常明显。同属细菌的解磷能力也存在差异,特别是芽胞杆菌属细菌,其活化出的无机磷浓度变化范围为 2 ~ 16 mg/L。细菌接种 48 h 后,培养基 pH 也发生显著性变化。接种细菌使培养基 pH 下降 2 ~ 4 个单位,pH 与解磷细菌培养液中的无机磷浓度之间也存在显著的线性负相关关系(图 5)。

2.3 菌丝际解磷细菌回接分析

利用分室根盒培养系统进行解磷细菌回接试验。从菌丝际的土壤中挑取菌丝,通过选择性培养基筛选后得到 47 株解磷细菌。将这些细菌提取 DNA 进行 16S rDNA 测序分析,所得序列在 NCBI 数据库上进行比对,发现这 47 株解磷细菌分别属于以下 5 个类群:芽胞杆菌属(*Bacillus*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)和贪铜菌属(*Cupriavidus*)。其中,*Bacillus*(76.6%)占优势,其他依次为 *Serratia*(14.9%)、*Enterobacter*(4.3%)、*Staphylococcus*(2.1%)和 *Cupriavidus*(2.1%),表明这些解磷细菌能够在 *Rhizophagus irregularis* 的根外菌丝上定殖。

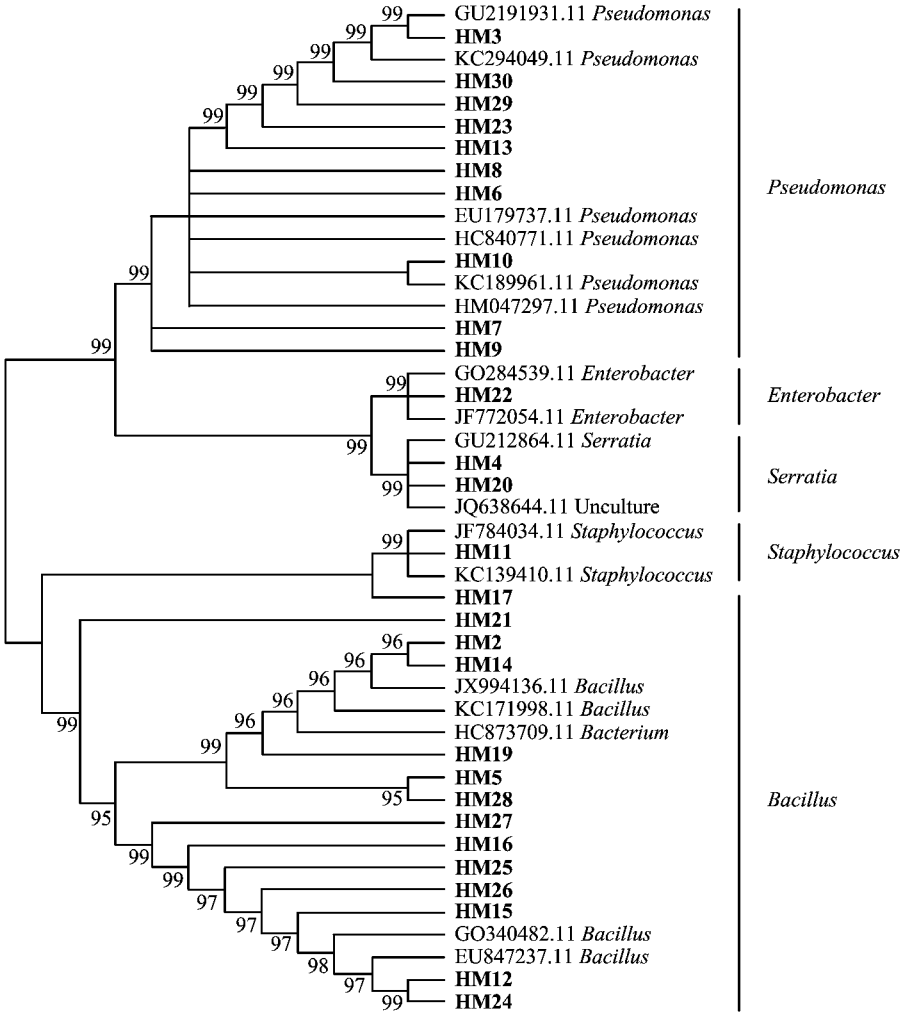

图 3　菌丝际分离筛选出的解磷细菌 16S rRNA 基因系统发育树

Fig. 3　Phylogenetic relationship of bacterial 16S rRNA gene sequences of phytate mineralizing bacteria isolated from AM fungal hyphae in maize field

[注(Note)：粗体标注为本研究中获得的序列 The sequences obtained in this study are shown in bold，HM + 数字为解磷细菌的命名，其中 HM 表示 hyphae associated with maize，HM + number represents the name of phytate mineralizing bacteria.]

3　讨论

AM 真菌菌丝表面细菌的定殖是近十年来菌根研究的一个热点方向[7,9,21-22]。Artursson 等[6]报道过纯培养条件下 *Bacillus cereus* 可以很好的附着在 *Glomus dussii* 菌丝表面；另外菌丝表面还存在可培养的解磷细菌有沙雷氏菌属、葡萄球菌属和肠杆菌属，其中肠杆菌属已经从菌丝际分离出[23]。但这些研究是在室内的菌丝离体培养条件下进行的，在田间原位条件下筛选 AM 真菌菌丝表面定殖的解磷细菌种类目前未见报道。本研究从河北曲周长期施用堆肥处理的玉米根系周围收集 AM 真菌菌丝，筛选得到了定殖于菌丝表面且能够活化植酸磷的解磷细菌，16S rDNA 分析表明这些解磷细菌分属五个属，即芽胞杆菌属（*Bacillus*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、沙雷氏菌属（*Serratia*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）和肠杆菌属（*Enterobacter*），其中芽胞杆菌和假单胞菌属为优势菌。土壤中 99% 以上的微生物目前不能被培养技术分离[24]，且解磷细菌菌株在纯化过程中有近 50% 的解磷菌失去了解磷能力[10]，本研究分离鉴定的解磷细菌只是其中一部分，不能完全反映菌丝表面定殖的解磷细菌群落。

土壤中不同属的解磷细菌拥有不同的解磷能力，如假单胞菌（*Pseudomonas*）、芽胞杆菌（*Bacillus*）和根瘤菌（*Rhizobium*）是解磷能力较强的细菌类群[25]，它们的解磷功能得到了广泛关注和研究。本研究同样发现假单胞菌属的细菌解磷能力相对较强，活化出的有效磷浓度均在 15 mg/L 以上（图 4）。

表1 平板法测量解磷细菌溶磷圈直径与菌落直径比值

Table 1 The diametere ratio of phosphorus solubilizing halo (D) and colony (d) of phytate-mineralizing bacteria

属名 Genus	菌株代码 Strain code	D/d	属名 Genus	菌株代码 Strain code	D/d
芽胞杆菌 *Bacillus*	HM1	5.02 ±0.25	假单胞菌 *Pseudomonas*	HM3	5.02 ±0.25
	HM2	5.14 ±0.14		HM6	5.14 ±0.14
	HM5	6.58 ±0.92		HM7	6.58 ±0.92
	HM12	1.52 ±0.05		HM8	1.52 ±0.05
	HM14	2.51 ±0.23		HM9	2.51 ±0.23
	HM15	1.39 ±0.04		HM10	1.39 ±0.04
	HM16	1.39 ±0.06		HM13	1.39 ±0.06
	HM17	2.25 ±0.14		HM23	2.25 ±0.14
	HM18	1.77 ±0.07		HM29	1.77 ±0.07
	HM19	2.01 ±0.11		HM30	2.01 ±0.11
	HM21	1.27 ±0.07	沙雷氏菌 *Serratia*	HM4	1.27 ±0.07
	HM24	1.81 ±0.05		HM20	1.81 ±0.05
	HM25	2.98 ±0.18	肠杆菌 *Enterobacter*	HM22	2.98 ±0.18
	HM27	2.33 ±0.04	葡萄球菌 *Staphylococcus*	HM11	2.33 ±0.04
	HM28	1.94 ±0.06			

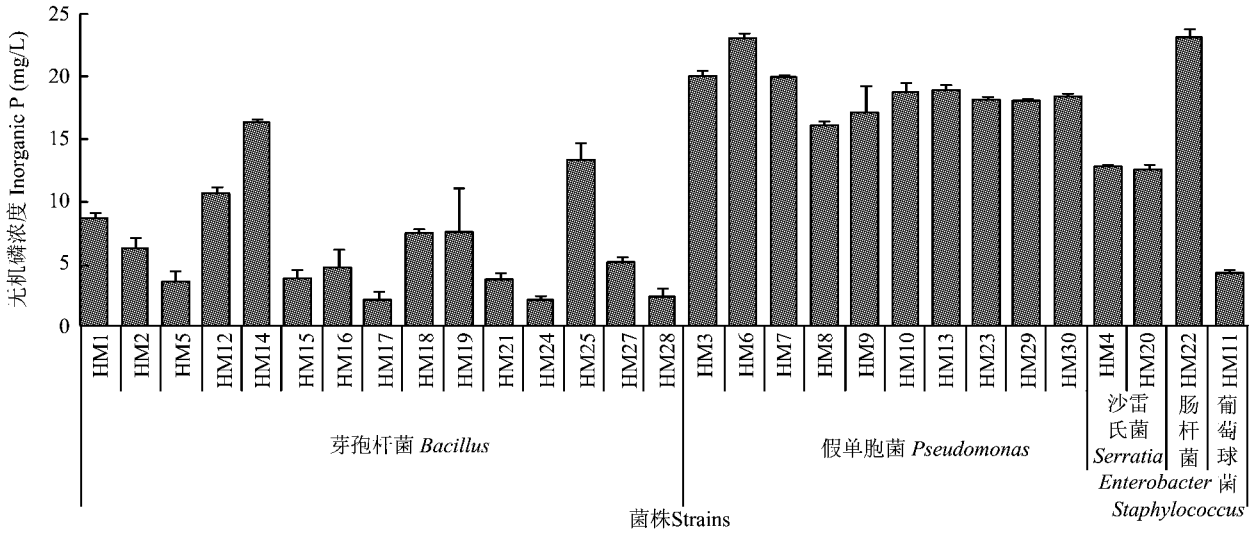

图4 解磷细菌活化出的无机磷浓度

Fig. 4 Concentrations of inorganic phosphorus mineralized by different phytate mineralizing bacteria strains

本研究结果发现有机磷矿化的量与培养基的pH呈显著的负相关性,这说明解磷细菌可通过分泌有机酸等代谢产物提高植酸钙的底物有效性,从而促进其矿化[26]。对于筛选出的可培养解磷细菌的解磷能力的评价是在纯培养条件下进行的,但是在自然生态系统中,植物-AM真菌-细菌三者之间存在着相互作用[27]。研究表明,菌根际中细菌活化土壤养分(尤其是磷)的能力会受到植物根系和AM真菌的影响[4,16]。菌丝际的范围非常微小,很难通过类似根际的取样方法进行研究。Gahan等[22]对菌丝表面、菌丝际及土体土壤中微生物群落进行研究,发现菌丝表面和菌丝际的可培养细菌的丰富度和群落结构均与土体不同,且菌丝际与菌丝表面的细菌群落不存在显著差异,因此可以收集菌丝,通过测定菌丝表面的微生物群落来反映菌丝际的变化,但这种方法缩小了菌丝际的范围,在未来的研究中

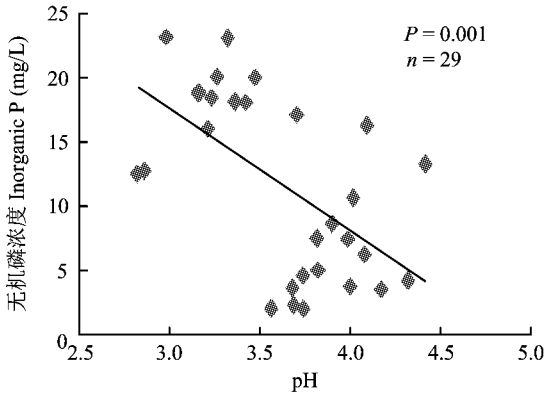

图 5　培养液中无机磷浓度与 pH 相关性

Fig. 5　The correlation between concentrations of inorganic phosphorus mineralized of different phytate mineralizing bacterial strains and pH in culture solution

需要进一步改进。

Rhizophagus irregularis 是一种分布广泛的 AM 真菌,在我国北方农田土壤中普遍存在[28-29]。本研究将从菌丝表面分离出的解磷细菌接种到 *Rhizophagus irregularis* 的菌丝周围,结果发现 80% 经纯化的解磷细菌可以在其表面定殖,另有 20% 的细菌在回接试验中未检测到,其可能原因是本回接试验的条件与田间条件存在差异,例如农田中侵染于玉米根系中的 AM 真菌种类很多[29],而我们的回接定殖试验只接种了 *Rhizophagus irregularis* 一种 AM 真菌,不同的 AM 真菌对不同种类细菌的定殖是具有选择性的[30],上述原因有可能导致只有 80% 解磷细菌在 AM 真菌菌丝表面定殖,本试验尚不能肯定其余的 20% 的解磷细菌是否可以在 AM 真菌根外菌丝表面定殖,这需要更精细的试验进一步的验证。在回接细菌菌株鉴定时发现贪铜菌属(*Cupriavidus*)存在,该试验在温室进行,空气中不可避免地存在各种微生物,另外本试验所用的 *Rhizophagus irregularis* 菌剂也可能是该菌株的来源。这一结果给我们的启示是当所有细菌菌株接种到 AM 真菌菌丝周围时,会表现出不同的定殖能力,因此它们参与菌丝际土壤磷的周转和磷在植物-AM 真菌系统中的利用效率也会表现出不同的作用。

参 考 文 献:

[1] Smith S E, Smith F A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales[J]. Annual Review of Plant Biology, 2011, 62: 227-250.

[2] Smith S E, Read D J. Mycorrhizal symbiosis[M]. San Diego, CA: Academic Press, 2008.

[3] 冯固, 张福锁, 李晓林. 丛枝菌根真菌在农业生产中的作用与调控[J]. 土壤学报, 2010, 47: 995-1004.
Feng G, Zhang F S, Li X L. Functions of arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture and their manipulation[J]. Acta Pedologica Sinica, 2010, 47: 995-1004.

[4] Johansson J F, Paul L R, Finlay R D. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 48: 1-13.

[5] Marschner H. Mineral nutrition of higher plants (2nd Edition)[M]. London: Academic Press, 1995.

[6] Artursson V, Jansson J K. Use of bromodeoxyuridine immunocapture to identify active bacteria associated with arbuscular mycorrhizal hyphae[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 6208-6215.

[7] Toljander J F, Lindahl B D, Paul L R, *et al*. Influence of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 61: 295-304.

[8] Warmink J A, Nazir R, Corten B, van Elsas J D. Hitchhikers on the fungal highway: the helper effect for bacterial migration via fungal hyphae[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2011, 43: 760-765.

[9] Agnolucci M, Battini F, Cristani C, Giovannetti M. Diverse bacterial communities are recruited on spores of different arbuscular mycorrhizal fungal isolates[J]. Biology and Fertility of Soils, 2015, 51: 379-389.

[10] Kucey R. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils[J]. Canadian Journal of Soil Science, 1983, 63: 671-678.

[11] Jorquera M A, Hernandez M T, Rengel Z, *et al*. Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil[J]. Biology and Fertility of Soils, 2008, 44: 1025-1034.

[12] Zhang L, Ding X D, Chen S F, *et al*. Reducing carbon: phosphorus ratio can enhance microbial phytin mineralization and lessen competition with maize for phosphorus[J]. Journal of Plant Interactions, 2014, 9: 850-856.

[13] Vázquez M M, Cesar S, Azcón R, Barea M. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants[J]. Applied Soil Ecology, 2000, 15: 261-272.

[14] Sabannavar S J, Lakshman H C. Effect of rock phosphate solubilization using mycorrhizal fungi and phosphobacteria on two high yielding varieties of *Sesamum indicum* L.[J]. World Journal of Agricultural Sciences, 2009, 5: 470-479.

[15] 张林, 丁效东, 冯固, 等. 菌丝室接种解磷细菌 *Bacillus megaterium* C4 对土壤有机磷矿化和植物吸收的影响[J]. 生态学报, 2012, 32: 4079-4086.
Zhang L. Ding X D. Feng G, *et al*. The effects of inoculation

with phosphate solubilizing bacteria *Bacillus megaterium* C4 in the AM fungal hyphosphere on soil organic phosphorus mineralization and plant uptake [J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32: 4079-4086.

[16] Zhang L, Fan J, Ding X, *et al*. Hyphosphere interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate solubilizing bacterium promote phytate mineralization in soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 74: 177-183.

[17] Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddas P, *et al*. The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont[J]. New Phytologist, 2012, 193: 755-769.

[18] Tarafdar J C, Marschner H. Phosphatase activity in the rhizosphere and hyphosphere of VA mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1994, 26: 387-395.

[19] Feng G, Song Y C, Li X L, Christie P. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to utilization of organic sources of phosphorus by red clover in a calcareous soil[J]. Applied Soil Ecology, 2003, 22: 139-148.

[20] Murphy J, Riley J P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters [J]. Analytica Chimica Acta, 1962, 27:31-36.

[21] Scheublin T, Sanders I R, Keel C, van der Meer J R. Characteriation of microbial communities colonising the hyphal surfaces of arbuscular mycorrhizal fungi [J]. ISME Journal, 2010, 4: 752-763.

[22] Gahan J, Schmalenberger A. Arbuscular mycorrhizal hyphae in grassland select for a diverse and abundant hyphospheric bacterial community involved in sulfonated sulfurization[J]. Applied Soil Ecology, 2015, 89: 113-121.

[23] Chung H, Park M, Madhaiyan M, *et al*. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37: 1970-1974.

[24] Pham V H, Kim J. Cultivation of unculturable soil bacteria[J]. Trends in Biotechnology, 2012, 30: 475-484.

[25] 林启美，赵小蓉，孙焱鑫，姚军. 四种不同生态系统的土壤解磷细菌数量及种群分布[J]. 土壤与环境，2000，9：34-37.
Lin Q M, Zhao X R, Sun Y X, Yao J. Community characters of soil phosphobacteria in four ecosystems [J]. Soil and Environmental Sciences, 2000, 9: 34-37.

[26] Rodrìguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion [J]. Biotechnology Advances, 1999, 17: 319-339.

[27] Reinhardt K, Siva-Jothy M T. Biology of the bed bugs (Cimicidae) [J]. Annual Review of Entomology, 2007, 52: 351-374.

[28] Liu W, Jiang S S, Zhang Y L, *et al*. Spatiotemporal changes in arbuscular mycorrhizal fungal communities under different nitrogen inputs over a 5-year period in intensive agricultural ecosystems on the North China Plain [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 90: 436-453.

[29] Wang X J, Wang X X, Feng G. Optimised nitrogen fertiliser management achieved higher diversity of arbuscular mycorrhiza fungi and high-yielding maize (*Zea mays* L.) [J]. Crop and Pasture Science, 2015, 66: 706-714.

[30] Toljander J, Artursson V, Paul L R, *et al*. Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 254: 34-40.