

‘兰引3号’结缕草足球场丛枝菌根真菌多样性及菌群结构分析

张楚婷, 彭雪, 宋玉, 辛国荣

(有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东省热带亚热带植物资源重点实验室, 中山大学农学院, 广东 广州 510275)

摘要:为筛选合适的AMF菌剂,以解决华南地区常见的‘兰引3号’结缕草(*Zoysia japonica* ‘Lanyin No. 3’)足球场草坪养护管理过程中存在的水肥浪费和潜在的环境问题。本研究运用扩增子技术对4个以‘兰引3号’结缕草建植的足球场草坪AMF进行群落结构和物种鉴定。结果表明,4个足球场的‘兰引3号’结缕草均与AMF形成了共生结构,侵染形式以菌丝侵染为主。通过多样性分析发现,在管理强度较低的英东体育场(YD)中,‘兰引3号’结缕草根际土壤和根内AMF多样性均高于其他管理强度较高的场地。草坪中的AMF大部分属于球囊霉属(*Glomus*),其次为盾巨孢囊霉属(*Scutellospora*)以及无梗囊霉属(*Acaulospora*);可见,球囊霉属真菌是组成高效AMF菌剂的重要菌种资源,能为‘兰引3号’结缕草足球场草坪保水、保肥等菌根技术的发展提供保障。

关键词:‘兰引3号’结缕草;AMF菌剂;扩增子测序;群落结构;足球场草坪

中图分类号: S688.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1009-5500(2022)03-0027-08

DOI: 10.13817/j.cnki.cyycp.2022.03.004



2016年5月国家发改委在《全国足球场地设施建设规划(2016—2020年)》^[1]中明确提出了建设目标:到2020年,全国足球场地数量超过7万块,平均每万人拥有足球场地达到0.5块以上,有条件的地区达到0.7块以上。如果按照标准足球场长105 m、宽68 m来计算,在2020年国内足球场面积应达到4 998.00万m²。足球场是全民健身活动场地的重要组成部分,良好的足球场草坪能优化城市景观、减少运动伤害,从而提高公众的生活质量。

‘兰引3号’结缕草(*Zoysia japonica* ‘Lanyin No. 3’)是一种优良的运动型草坪草,具有生长快速、耐践踏、抗性强、成坪时间短和易于管理等优良性状^[2],在

我国南方地区被广泛用以建植足球场草坪。为了保证‘兰引3号’结缕草草坪良好的景观效果以及使用体验,管理人员需要采取高频率的管理措施,如浇水、施肥、刈割和喷洒农药等。在密集的管理措施下,‘兰引3号’结缕草虽然维持了良好的景观效果和优质使用体验,但高额的经济投入、资源的浪费以及在管理中所潜在的环境问题日益凸显。而合理地施用丛枝菌根真菌(Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)生物菌剂将会为‘兰引3号’结缕草足球场草坪管理提供新思路,但与‘兰引3号’结缕草的AMF侵染特征有关的研究却较少。现有的研究基础较为薄弱,并不利于‘兰引3号’结缕草草坪丛枝菌根真菌生物菌剂的筛选与未来的生产应用。

菌根(Mycorrhiza)是土壤中一定种类真菌与植物根系所建立的互惠共生体,而丛枝菌根真菌是其中生物量最大、最重要的成员之一。AMF能够与大部分的植物形成共生关系,菌丝网的形成不仅扩大了根部的吸收范围,让植物通过菌丝吸收利用原本吸收不到的养分,促进植物对矿质养分(特别是磷)的吸收,提

收稿日期: 2022-06-15; **修回日期:** 2022-06-25

基金项目: 国家自然科学基金(31071357)

作者简介: 张楚婷(1997-),女,广东佛山人,硕士研究生。

E-mail: zhangcht6@mail2.sysu.edu.cn

辛国荣为通信作者。

E-mail: lssxgr@mail.sysu.edu.cn

高植物的抗病能力以及植物在逆境中的生存能力,还能够加强邻株植物之间营养元素的传递,故菌丝网对植物个体间营养平衡和物种多样性维持等具有重要的生态功能^[3]。菌丝网和菌根真菌分泌的球囊霉素相关土壤蛋白也能够促进土壤团聚体的形成^[4],改善土壤的物理结构。由于AMF具有重要的生理生态功能,应用前景广阔,AMF应用技术的研究与开发已成为值得重点关注的领域。

合理施用AMF生物菌剂有助于改善足球场草坪草养护,以缓解管理过程中过多消耗水肥资源的问题。以广州市4个采用‘兰引3号’结缕草建植的足球场为研究对象,通过扩增子测序手段,对‘兰引3号’结缕草足球场草坪草根际AMF侵染特征、AMF群落结构及多样性进行基础调研,为筛选适用于‘兰引3号’结缕草足球场草坪的AMF菌剂提供基础研究资料。

1 材料和方法

1.1 采样情况

研究选取广州市4个足球场作为采样样地,4个足球场的草坪草均为‘兰引3号’结缕草。

样地1:天河体育中心(天河区,简写TH),位于天河区天河路,竣工于1987年,总占地面积51万m²,是广州目前最大的体育场地;

样地2:广东奥林匹克体育中心(天河区,简写OT),位于天河区东圃镇黄村,总占地面积14.56万m²,2001年9月31日竣工;

样地3:大学城体育中心体育场(番禺区,简写DXC),位于大学城中心区,于2007年启用,总占地面积9.7万m²,是广州第3大体育场;

样地4:中山大学英东体育场(海珠区,简写YD),

位于海珠区新港西路中山大学校内,建于1988年,由霍英东先生出资修建。

天河体育中心、广东奥林匹克体育中心、大学城体育中心体育场是广州市主要的大型体育场,使用频次高,养护状况良好;而英东体育场建坪年限最久,使用频次高,养护状况较差。4个足球场基本能够代表广州市‘兰引3号’结缕草足球场的基本情况。

于2016年7月29日对4个足球场进行采样。当日天气晴朗,温度27~36℃(广州天气网)。分别于距足球场草皮边缘约2.5m的四角处(即每个足球场取4个重复),取长×宽×深为5cm×5cm×7cm的立方样块,每个样点按照三点取样法进行取样,将取到的植株的根系和地上部全部保存于密封袋,将取到的结缕草根际附着的土壤抖落于密封袋中,做好标记。置于含有冰袋的泡沫保温箱中,带回实验室后尽快处理。

1.2 扩增子测序

将采集的植物根样用冰水洗净附着的泥土,放于一20℃冰箱保存,7d内将根部样品同土壤样品送美吉生物有限公司(上海)进行DNA抽提扩增与测序。本次测序样品共送32个,植物地下部及对应根际土壤的样品各16个,每组4个重复。抽提后的DNA用1%琼脂糖凝胶电泳检测。采用巢式PCR(ABI GeneAmp® 9700型)对抽提后的DNA进行扩增。巢式PCR扩增引物采用Van Geel M等^[5]研究结果中的引物序列(表1),其在核糖体RNA(rRNA)小亚基(SSU)上的位置如图1。PCR完成后取4μL样品进行2%琼脂糖凝胶电泳,用于检测PCR产物。对PCR产物进行荧光定量和均一化后,进行Illumina平台文库构建,用磁珠纯化后利用PCR扩增进行文库模板的富集,最后采用Miseq PE300对序列进行测序。

表1 巢式PCR扩增引物序列表

Table 1 The sequence of amplification primers for nested PCR

测序类型	轮次	引物对	序列(5'→3')	片段长度
丛枝菌根真菌	第一轮引物	AML1 (F)	5'-ATCAACTTTCGATGGTAGGATAGA-3'	800 bp
		AML2 (R)	5'-GAACCCAAACACTTTGGTTTCC-3'	
	第二轮引物	AMV4.5NF (F)	5'-AAGCTCGTAGTTGAATTTTCG-3'	300 bp
		AMDGR (R)	5'-CCCAACTATCCCTATTAATCAT-3'	

1.3 孢子密度与AMF侵染程度的计算

取出保存于一20℃冰箱中剩余的土壤和根系样品,

采用湿筛倾析法^[6]处理其中的部分土壤,在体视显微镜下观察并统计5g土壤样品中的孢子数量,计算孢子密

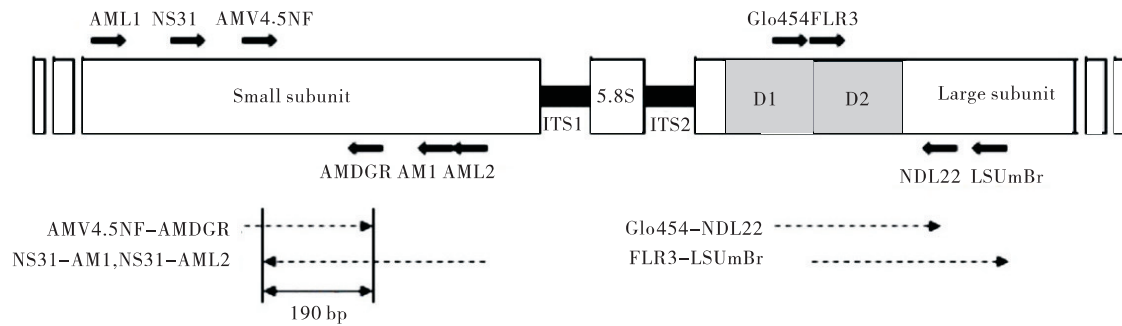


图 1 目标扩增片段与引物在 SSU rRNA 基因上的示意图

Fig. 1 Schematic map indicating the target region of SSU rRNA gene and primer locations

度;将根系样品用台盼蓝染色法^[7]对根段进行染色,后用放大交叉法^[8]进行镜检,确定 AMF 的侵染程度。

1.4 测序结果处理与分析

对原始 reads 进行质控与过滤 (Trimmomatic^[9]), 根据 PE reads 之间的 overlap 关系,将成对的 reads 拼接成 Tags (FLASH^[10])。在 97% 的相似水平下对 Tags 进行聚类,得到多个 OTU (Operational taxonomic units) (Usearch V7.1^[11])。对聚类后的代表 OTU 进行注释和分类。在 70% 相似水平下比对 Unite^[12] (Release 7.0 <http://unite.ut.ee/index.php>) 数据库进行物种分类学分析,并统计各个分类水平 (domain, kingdom, phylum, class, order, family, genus, species) 的群落组成。

根据测序结果,抽取部分序列进行分析。利用 mothur^[13]进行 rarefaction 分析,利用 R 语言工具绘制物种稀释曲线图;利用 mothur^[13]计算 Chao、Ace、Simpson 及 Shannon 指数,用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析 (One-way ANOVA) 并进行显著性检验;用 R 语言工具进行 Venn 图、群落结构图和相对丰度热图的绘图。

2 结果与分析

2.1 足球场草坪草 AMF 侵染特征与土壤孢子密度

对 4 个足球场‘兰引 3 号’结缕草根际丛枝菌根真菌侵染率调查后发现,4 个足球场丛枝菌根真菌的侵染形式以菌丝侵染为主 (图 2), 泡囊侵染次之, 少有或鲜有丛枝结构。YD 草坪草根际 AMF 的菌丝侵染率达 44%, TH 与 OT 草坪草根际菌丝侵染率次之, 分别为 37% 和 33%, DXC 草坪草的菌丝侵染率仅达 28%; 泡囊侵染率 YD 为 12%, 远高于 OT (3%), 且差异显著 ($P < 0.05$), 而 TH 与 DXC 分别达到 9% 和 6%。总

侵染率变化与菌丝侵染率变化趋势相似 (图 3)。

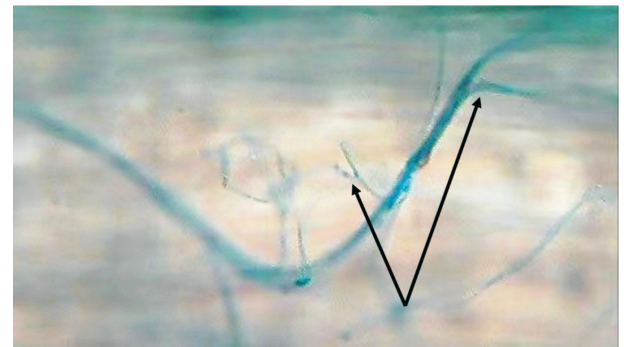


图 2 ‘兰引 3 号’结缕草根际 AMF 菌丝结构

Fig. 2 Microscopic observation of AMF hypha in roots of *Zoysia japonica* ‘Lanyin No. 3’

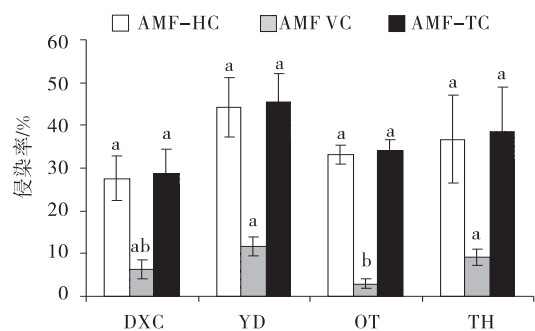


图 3 4 个体育场‘兰引 3 号’结缕草根际 AMF 侵染率

Fig. 3 AMF colonization rate of *Zoysia japonica* ‘Lanyin No. 3’ root in four studied sport fields

注: 图中结果表示为平均值, 误差线代表标准误。AMF-HC 指丛枝菌根真菌菌丝侵染率; AMF-VC 指丛枝菌根真菌泡囊侵染率; AMF-TC 指丛枝菌根真菌总侵染率; 不同小写字母代表不同球场在同一侵染率指标下差异显著 ($P < 0.05$)

对根际土壤的孢子密度进行调查可知 (图 4), YD 以 66 个/g 土壤的孢子数显著高于其他 3 个体育场, 而 OT、DXC 和 TH 的土壤的孢子分别为 37、28 和 15 个/g。

2.2 AMF 群落特征

原始测序进行质控后共测有效序列 484 810 条,

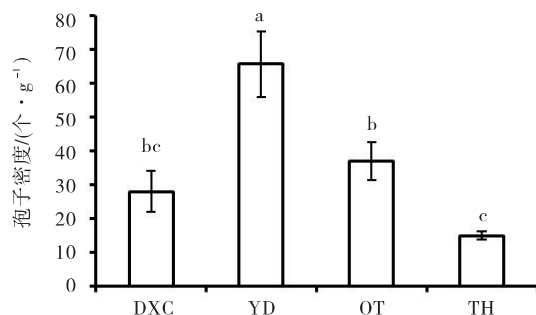


图4 4个体育场坪床基质内处理AMF孢子密度

Fig. 4 AMF spore density in the substrate of turf-bed in four studied sport fields

平均每个样品测序条数为15 150条。根据物种稀释曲线(图5)可知,序列数—物种数曲线在序列数大于9 000后趋于平缓。可以确定在试验条件下,样本的测序数据量合理,可以覆盖大部分的物种。为保证每个样本的测序量相同,每个样本随机选取9 870对测序片段进行后续生物信息学分析。

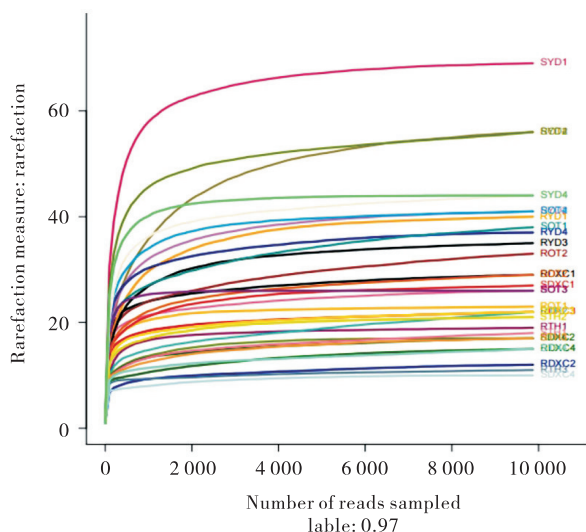


图5 物种稀释曲线

Fig. 5 Species rarefaction curves

注:R开头代表是球场草坪草根际(Root),S开头代表是球场草坪草土壤(Soil)。下同

对4个足球场草坪草根内和根际土壤中OTU数量与种类进行分析(图6-A,6-B),四个体育场草坪草根际土壤中OTU种类有12个(图6-A),根内共有OTU种类为11个(图6-B)。进一步对共有OTU进行注释后发现,其中4类OTU是根内所独有,其中2类是属于球囊霉目(Glomales)球囊霉科(Glomeraceae)球囊霉属(*Glomus*)的真菌,剩下的2类则分别属于类球囊霉科(Paraglomeraceae)类球囊霉属(*Paraglomus*)和多孢囊霉目(Diversisporales)无梗囊霉科(Acau-

losporaceae)无梗囊霉属(*Acaulospora*);同样,在土壤中也也有3类OTU是根内所不具有的,注释后发现其中2类是来自球囊霉科球囊霉属的真菌,而另一类是来自多孢囊霉目无梗囊霉科无梗囊霉属的*Acaulospora-Acau8-VTX00047*。此外,各个足球场之间AMF群落的构成差异较大,同一足球场草坪草根内与根际土壤的物种相对丰度存在一定差异(图6-C,6-D)。

总体上,四个足球场草坪草根内以及根际土壤中主要是球囊霉属(*Glomus*)的真菌占了整个群落结构的大部分,其次就是盾巨孢囊霉属(*Scutellospora*)以及无梗囊霉属(*Acaulospora*),类球囊霉属(*Paraglomus*)最少,而巨孢囊霉属(*Gigaspora*)与多孢囊霉属(*Diversispora*)则在部分足球场中出现。

4个足球场间结缕草根内真菌相对丰度具有较大差异。其中DXC与OT结缕草根内真菌类别最多,均有5属,除了球囊霉属真菌以外,还有无梗囊霉属、盾巨孢囊霉属、类球囊霉属、巨孢囊霉属真菌。但是DXC草坪草根内有一部分真菌未被鉴定出。另外,从OT草坪草根内鉴定出多孢囊霉属真菌。TH草坪草根内真菌已鉴定出的属仅有2类,其中球囊霉属真菌占比达到了82.2%,是OT草坪草根内的2.3倍(35.3%),另一种是类球囊霉属,占4.4%,其余的均未鉴定出属。

4个足球场根际土壤中的真菌(属水平)除了在相对丰度上与根内有一些差别外,土壤中的真菌组成与根内真菌组成基本一致,但在TH的根际土壤中检测出了无梗囊霉属真菌。根际土壤中的真菌同样主要以球囊霉属真菌为优势属,其中在YD和TH的占比分别为76.2%、69.2%,高于DXC(54.8%)以及OT(46.6%)。值得注意的是,只在DXC与OT鉴定出了盾巨孢囊霉属真菌。

在种水平上对4个足球场草坪草根内以及根际土壤中AMF群落结构作进一步分析(图6-D),共从6个属中鉴定出39个种。草坪草根内与根际土壤中丰度较高的是*Glomus-Glo3b-VTX00069*以及球囊霉属中大部分未被鉴定种的真菌。可以看出盾巨孢囊霉属中未鉴定的种(*Scutellospora_unclassified*)主要存在于OT与DXC,少量存在于其他两个足球场。

2.3 AMF多样性指数

对所有样品的 α 多样性指数进行计算(表2),在4

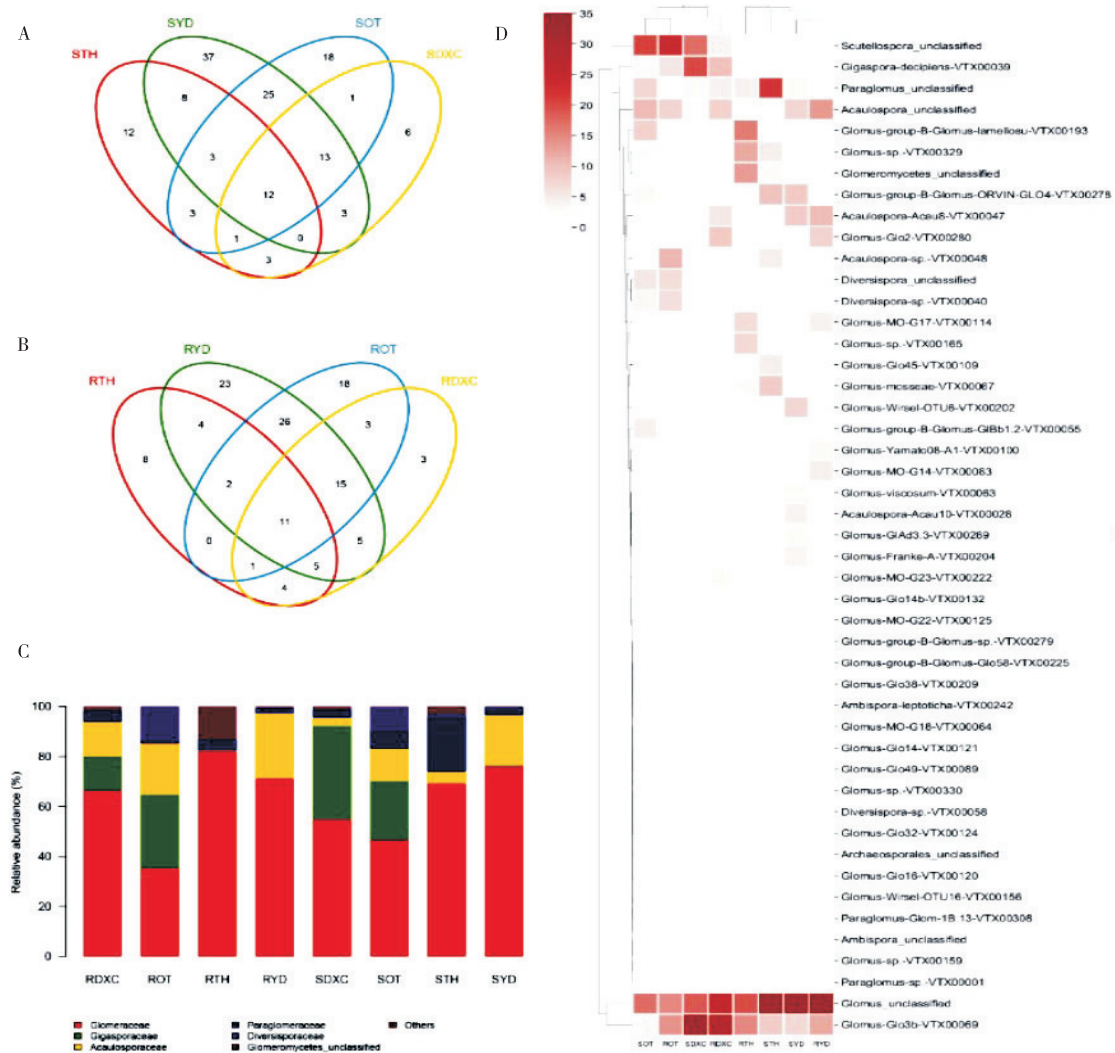


图 6 样品 OTU 分布以及物种分布

Fig. 6 OTU distribution and species distribution

注: A 4 个体育场草坪草根内 OTU 分布状况; B 4 个体育场草坪草根际土壤 OTU 分布状况; C 4 个足球场草坪草根内与根际土壤内微生物群落结构组分图(属水平); D 4 个足球场草坪草根内与根际土壤内微生物物种(种)相对丰度

个足球场中,除了 YD 以外,同一足球场草坪草根内与土壤中的 AMF 多样性指数没有显著差异;4 个足球场的土壤 AMF 多样性具有一定差异,且草坪草根内 AMF 多样性也有显著性差异。

从 OTU 分类数量来看,YD 的‘兰引 3 号’结缕草根内与土壤中的 OTU 数量都高于其他足球场,OT 次之,DXC 与 TH 分列第 3 与第 4。值得注意的是,以结缕草根内检测出的 OTU 数量进行比较,YD 与 OT 显著高于 DXC 与 TH,YD 与 OT 间并无显著差异,而 4 个足球场的土壤 AMF 多样性也出现了相同的显著性变化趋势,但是 YD 的土壤 AMF 多样性显著高于 OT。

Ace 指数和 Chao 指数是衡量物种丰富度(物种数目)的指标。表 2 结果表明,DXC、OT 以及 TH 结缕草根内 AMF 的物种数目与根际土壤中的数目相当,YD 的根内 AMF 的物种数目显著低于根际土壤中的数目($P_{Ace}=0.043, P_{Chao}=0.050$)。从 Ace 指数分析可知,在 4 个足球场,根内 AMF 多样性没有显著差别;在根际土壤 AMF 的多样性上,YD 显著高于其他 3 个足球场,OT 根际土壤中 AMF 的多样性也显著高于 TH 与 DXC。从 Chao 指数来看,4 个体育场的根内 AMF 多样性状况为:YD 与 OT 显著高于 TH 以及 DXC。

Shannon 指数与 Simpson 指数作为衡量物种多样性的常用指标,不仅体现了物种丰富度,还体现了物

种分布的均匀度。Shannon 指数越高、Simpson 指数越低,物种多样性就越高。表 2 结果表明:YD 草坪草根内 AMF 的 Shannon 指数显著高于 DXC、OT 以及 TH 草坪草根内的 Shannon 指数,而且 YD 土壤中 AMF 的 Shannon 指数也显著高于 DXC、OT 以及 TH 土壤中的

Shannon 指数;而 Simpson 指数与 Shannon 指数的变化趋势不同,YD 草坪草根内 AMF 的 Simpson 指数显著小于其他 3 个体育场根内的 Simpson 指数,且 YD 土壤中 AMF 的 Simpson 指数也显著小于其他 3 个体育场土壤中的 Simpson 指数。

表 2 4 个体育场‘兰引 3 号’结缕草根内与土壤中 AMF 多样性指数
Table 2 AMF community diversity indices of root and soil from four sport fields

部位	OTU	Ace	Chao	Shannon	Simpson
RDXC	19.50±3.80 ^B	20.50±7.94 ^A	19.75±7.72 ^B	2.04±0.44 ^{AB}	0.18±0.07 ^A
ROT	34.50±7.47 ^A	36.50±15.37 ^A	35.50±15.37 ^A	2.20±0.13 ^{AB}	0.18±0.04 ^A
RTH	17.25±2.32 ^B	35.75±38.97 ^A	19.25±7.93 ^B	1.81±0.29 ^B	0.24±0.13 ^A
RYD	38.25±1.38 ^{A*}	39.25±2.75 ^{A*}	38.75±3.30 ^{A*}	2.39±0.36 ^A	0.15±0.06 ^A
SDXC	19.00±3.63 ^C	19.75±7.68 ^C	19.50±7.77 ^C	1.99±0.30 ^b	0.19±0.05 ^a
SOT	33.50±3.57 ^b	36.25±9.32 ^b	34.50±7.72 ^b	2.37±0.19 ^b	0.16±0.03 ^a
STH	17.75±1.25 ^C	21.00±2.16 ^C	19.50±1.73 ^C	2.07±0.16 ^b	0.15±0.03 ^a
SYD	53.25±5.96 ^a	55.00±12.03 ^a	57.25±14.75 ^a	2.99±0.33 ^a	0.08±0.04 ^b

注:结果表示为平均值±标准误。不同的大写字母代表不同的体育场内‘兰引 3 号’结缕草根内微生物丰度或多样性指标具有显著差异($P<0.05$);不同的小写字母代表不同的体育场内‘兰引 3 号’根际土壤内微生物丰度或多样性指标具有显著差异($P<0.05$);“*”代表同一体育场内植物根内与根际土壤微生物丰度或多样性指标具有显著差异。R 开头代表是球场草坪草根际(Root),S 开头代表是球场草坪草土壤(Soil)。TH 代表天河体育中心;OT 代表广东奥林匹克体育中心;DXC 代表大学城体育中心体育场;YD 代表中山大学英东体育场

3 讨论

3.1 ‘兰引 3 号’结缕草足球场草坪的 AMF 侵染情况
调研结果发现,4 个足球场的‘兰引 3 号’结缕草均与 AMF 形成了共生结构,在根内主要以菌丝侵染为主,泡囊结构次之,少有或罕有丛枝结构。4 个足球场结缕草的 AMF 侵染特征与 Han 等^[14]对细叶结缕草 AMF 侵染状况的调查结果、李军帅^[15]对禾本科内 11 个种根内 AMF 侵染状况的调查结果基本一致。

4 个足球场结缕草根际的 AMF 侵染率均达到了 25% 以上,其中英东体育场(YD)结缕草根际 AMF 菌丝侵染率达到 44%,且其孢子数达到 66 个/g 土壤,显著高于其他 3 个体育场。之所以造成这一现象,除了因为天河体育场(TH)、奥体中心体育场(OT)分别于 2015 年、2016 年重新换坪之外,更可能是因为 YD 自 2002 年换坪以后,只进行日常的养护管理,因此各方面的养护水平均不及其他 3 个足球场。而 AMF 形成的菌丝网能增加植物根系与土壤的接触面积,增强宿主在恶劣环境中的耐性^[16]并且辅助宿主对水分和养分^[17]的吸收,李侠等^[18]也发现 AMF 的根外菌丝密度与宿主植物的地上部生物量、菌根对磷和锌的吸收效

应之间有显著的正相关关系。因而 YD 的‘兰引 3 号’结缕草能够通过发达的菌丝网获取土壤中的水分和养分,维持自身正常的生长发育。

本研究发现,同一足球场‘兰引 3 号’结缕草根内与根际土壤中 AMF 群落组成(属水平)无显著区别,只是在丰度上有些许差别;而 4 个足球场之间,AMF 群落组成(属水平)和相对丰度都存在较大差异。有一部分真菌未被鉴定出属或种,这可能是由于对小亚基(SSU)rRNA 上的部分片段进行 PCR 扩增后再进行对比的方法仍然不够完善^[19],片段的长度范围内提供的序列信息不足以对群落中的所有 AMF 进行种属的准确鉴定。为进一步了解与研究 AMF,也应该重视对 AMF 种属的分子鉴定工作,完善 AMF 数据库,为后续科学试验奠定分子基础,同时为 AMF 菌剂能早日在生产上投用打下坚实的理论基础。

3.2 影响 AMF 菌剂的因素

土壤作为一个复杂的生态环境,包含真菌、细菌、原生动物、病毒等多种生物。其中 AMF 作为真菌中重要的一部分,其与植株形成的菌丝网为植物和土壤架起了另一条水肥通道。菌根真菌一旦侵染植物根系,就会从根系放射出菌丝形成浓密的菌丝网,这种

菌丝网能够吸收大量的营养和水分,并将这些原料转运回植物根系。许多研究表明,AMF 促进了草坪草对养分(尤其是磷)的吸收,能够提高草坪草对养分的利用效率。彭雪等^[20]发现在草坪建植过程中选取适当的基质辅以 AMF 菌剂,能够减少基质中水分、硝酸根离子、磷酸根离子和钾离子的流失;AMF 还能够通过增加基质中有效磷的含量并减少渗沥液中的磷,在一定程度上抑制磷元素的流失^[21]。此外,AMF 的外延菌丝还可通过侵入点再度侵染邻株植物根系,在多株相同或不同植物之间形成庞大的地下公共菌丝网(Common mycorrhizal networks, CMN),CMN 的形成对植物间的资源再分配有重要作用^[22]。从 AMF 菌剂添加到土壤的效应来看,菌根在改善草坪草质量、完善草坪管理中起到举足轻重的作用。

AMF 虽然广泛分布于地球上很多不同的生态系统中,但 AMF 的群落组成一般会受到土壤因子和宿主植物种类的影响^[23],土壤 pH 和土壤碳、氮含量等理化因子都会强烈影响 AMF 的群落组成^[24-25]。而且,不同的土壤类型以及土地使用强度也能够显著影响 AMF 孢子的群落结构及多样性水平^[26]。因此在考虑 AMF 菌肥的菌种组成时,需要具体考虑 AMF 种类对于土壤理化因子的适应能力。而且,土著 AMF 对于植物的促生作用比商业菌剂更加显著^[27],可能就是由于土著 AMF 更加适应土壤的各项理化性质^[28]。而在不同生态系统中,球囊霉属 *Glomus* 在 AMF 群落结构中都较有优势,说明球囊霉属真菌对不同的环境都具有良好的适应性。

在实际情况中,球场草坪草根内与周围土壤中的 AMF 种类多样,通常以球囊霉属真菌为主,并伴有无梗囊霉属、类孢囊霉属、巨孢囊霉属、盾巨孢囊霉属和多孢囊霉属等。而在本研究涉及的 4 个球场“生境”中,均是以球囊霉属真菌作为 AMF 群落的优势属,部分足球场以无梗囊霉属或盾巨孢囊霉属为次优势属。考虑到土著 AMF 在对植物的促生作用方面的优越性,选用由草坪原有的优势 AMF 为主构成的菌剂应当能获得更好的效果。

比起单一菌种,使用由不同种的 AMF 构成的混合菌剂有可能获得更高的菌根侵染率,与宿主植物之间形成更为稳定的共生关系,并对草坪的快速建植和

抗逆性能等起到促进作用^[29]。综合多方研究结果,为使 AMF 菌肥发挥出最佳效果,建议以球囊霉属真菌、无梗囊霉属和盾巨孢囊霉属作为主要的菌种组成,以达到更高的侵染率,从而辅助水肥营养的保持,增强‘兰引 3 号’结缕草草坪的抗性,减少养护投入。但球囊霉属不同种的混合真菌菌剂的坪床水肥保持效应仍是一个有待研究的课题。需要在进行 AMF 分子测序的基础上,通过识别出草坪中具体的 AMF 优势种并进行扩繁,进一步探究不同菌种的组合对于草坪的水肥保持效应,指导草坪 AMF 菌剂的实际生产。

4 结论

草坪养护管理强度影响‘兰引 3 号’结缕草根际土壤和根内 AMF 的多样性,管理强度较低时,根际土壤和根内 AMF 的多样性都较高,帮助‘兰引 3 号’结缕草维持自身的生长发育。而球囊霉属真菌可以作为‘兰引 3 号’结缕草草坪 AMF 菌剂的主要菌种资源,由球囊霉属真菌为主构成的混合真菌菌剂有望成为一种安全、有效且经济的草坪养护材料,为‘兰引 3 号’结缕草足球场草坪保水、保肥等技术的发展提供保障。

参考文献:

- [1] 国家发展改革委,教育部,体育总局,等. 全国足球场设施规划建设规划(2016—2020 年)[EB/OL]. [2016-05-09]. http://www.moe.gov.cn/srcsite/A17/s7059/201605/t20160510_242680.html.
- [2] 赵鸣. 兰引 3 号结缕草草坪用性状及适应性研究[J]. 草原与草坪,2000(3): 34—36.
- [3] Weremijewi J, Sternberg LDLO, Janos D P. Arbuscular common mycorrhizal networks mediate intra- and inter-specific interactions of two prairie grass[J]. Mycorrhiza, 2018,28(1): 71—83.
- [4] Bedini S, Pellegrino E, Avio L, et al. Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*[J]. Soil biology & biochemistry, 2009,41(7): 1491—1496.
- [5] Van Geel M, Busschaert P, Honnay O, et al. Evaluation of six primer pairs targeting the nuclear rRNA operon for characterization of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities using 454 pyrosequencing[J]. Journal of microbiological methods, 2014, 106: 93—100.

- [6] An Z Q, Hendrix J W, Hershman D E, *et al.* Evaluation of the "most probable number" (MPN) and wet-sieving methods for determining soil-borne populations of endogoneous mycorrhizal fungi [J]. *Mycologia*, 1990, 82 (5): 576—581.
- [7] 董昌金, 赵斌. 类黄酮物质 apigenin 和 daidzein 诱导 AM 真菌感染十字花科植物芥菜 [J]. *科学通报*, 2004, 49 (10): 953—960.
- [8] McGonigle T P, Miller M H, Evans D G, *et al.* A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi [J]. *The new phytologist*, 1990, 115(3): 495—501.
- [9] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114—2120.
- [10] Magoc T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957—2963.
- [11] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26 (19): 2460—2461.
- [12] Abarenkov K, Nilsson R H, Larsson K, *et al.* The UNITE database for molecular identification of fungi: recent updates and future perspectives [J]. *New phytologist*, 2010, 186(2): 281—285.
- [13] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, *et al.* Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537—7541.
- [14] Han X G, Xu C C, Wang Y T, *et al.* Dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to root colonization, spore density, and soil properties among different spreading stages of the exotic plant threeflower beggarweed (*Desmodium triflorum*) in a *Zoysia tenuifolia* lawn [J]. *Weed Science*, 2019, 67(6): 689—701.
- [15] 李军帅. 丛枝菌根真菌菌丝侵染特性与植物系统性关系的研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2016.
- [16] 李晓芸, 伊力塔, 李彦, 等. 丛枝菌根真菌提高植物非生物胁迫耐受性研究进展 [J]. *浙江林业科技*, 2022, 42 (1): 101—110.
- [17] 田蜜, 陈应龙, 李敏, 等. 丛枝菌根结构与功能研究进展 [J]. *应用生态学报*, 2013, 24(8): 2369—2376.
- [18] 李侠, 叶诚诚, 张俊伶, 等. 丛枝菌根真菌侵染指标与植物促生效应相关性分析 [J]. *中国农业大学学报*, 2021, 26(10): 41—53.
- [19] 李晓然. 基于核糖体 RNA 高通量测序分析微生物群落结构 [D]. 上海: 复旦大学, 2011.
- [20] 雷垚, 伍松林, 郝志鹏, 等. 丛枝菌根根外菌丝网络形成过程中的时间效应及植物介导作用 [J]. *西北植物学报*, 2013, 33(1): 154—161.
- [21] 彭雪, 何宏斌, 程俊康, 等. AMF 和坪床基质对草坪草水肥流失影响 [J]. *菌物研究*, 2017, 15(1): 21—26+32.
- [22] 彭雪, 程俊康, 辛国荣. AMF 与坪床基质对‘兰引 3 号’结缕草草坪 P 元素有效性及其流失的影响 [J]. *草地学报*, 2019, 27(3): 553—559.
- [23] Van der Gast C J, Gosling P, Tiwari B, *et al.* Spatial scaling of arbuscular mycorrhizal fungal diversity is affected by farming practice [J]. *Environmental microbiology*, 2011, 13(1): 241—249.
- [24] De Beenhouwer M, Muleta D, Peeters B, *et al.* DNA pyrosequencing evidence for large diversity differences between natural and managed coffee mycorrhizal fungal communities [J]. *Agronomy for sustainable development*, 2015, 35(1): 241—249.
- [25] Rodriguez-Echeverria S, Teixeira H, Correia M, *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi communities from tropical Africa reveal strong ecological structure [J]. *New phytologist*, 2017, 213(1): 380—390.
- [26] Oehl F, Laczko E, Bogenrieder A, *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.
- [27] Labidi S, Ben Jeddi F, Tisserant B, *et al.* Field application of mycorrhizal bio-inoculants affects the mineral uptake of a forage legume (*Hedysarum coronarium* L.) on a highly calcareous soil [J]. *Mycorrhiza*, 2015, 25 (4): 297—309.
- [28] Oliveira R S, Vosatka M, Dodd J C, *et al.* Studies on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and the efficacy of two native isolates in a highly alkaline anthropogenic sediment [J]. *Mycorrhiza*, 2005, 16(1): 23—31.
- [29] 刘贵祥. AMF 对冷季型草坪草功能及抗寒性能的促进 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013.

(下转 44 页)