

DOI: 10.5846/stxb201409171842

苏春沧, 王宏伟, 谢星光, 张伟, 李孝刚, 王兴祥, 戴传超. 内生真菌与苍术粉对连作花生根际微生物区系和微量元素的影响. 生态学报, 2016, 36(7): - .

Su C L, Wang H W, Xie X G, Zhang W, Li X G, Wang X X, Dai C C. Effects of endophytic fungi and *Atractylodes lancea* powder on rhizosphere microflora and trace elements during continuous peanut cropping. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(7): - .

## 内生真菌与苍术粉对连作花生根际微生物区系和微量元素的影响

苏春沧<sup>1</sup>, 王宏伟<sup>1</sup>, 谢星光<sup>1</sup>, 张伟<sup>1</sup>, 李孝刚<sup>2,3</sup>, 王兴祥<sup>2,3</sup>, 戴传超<sup>1,\*</sup>

1 南京师范大学生命科学学院, 江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心, 江苏省微生物与功能基因组学重点实验室, 南京 210023

2 中国科学院土壤环境与修复重点实验室(南京土壤研究所), 南京 210008

3 中国科学院红壤生态实验站, 江西省红壤生态研究重点实验室, 鹰潭 335211

**摘要:**通过盆栽试验,研究了内生真菌拟茎点霉 B3(*Phomopsis liquidambari*)及苍术(*Atractylodes lancea*)粉联合施用对连作花生根际土壤微生物区系、酶活性及有效态微量元素(Mo、B、DTPA-Fe、Zn、Cu、Mn)含量的影响。结果表明:内生真菌 B3 和苍术粉复合处理比内生真菌 B3 处理的荚果和秸秆产量分别增加 10.28% 和 14.11%,内生真菌 B3 处理与正常施肥相比显著提高了根瘤数量、荚果和秸秆产重,各处理组与正常施肥对照相比分枝数和根长无显著差异。B3 处理与对照相比显著提高了种子期、结荚期和成熟期根际土壤可培养细菌和放线菌数量,B3 和苍术粉复合处理与对照相比显著提高种子期、花期和成熟期可培养真菌和放线菌数量;细菌 DGGE 指纹图谱聚类分析表明,B3 和苍术粉复合处理相对于正常施肥处理,显著改变种子期、苗期、花期和成熟期花生根际土壤细菌群落结构,同时苗期、花期和结荚期的细菌条带数和香农指数也有所提高,真菌 DGGE 指纹图谱聚类分析表明,B3 和苍术粉复合处理对真菌群落影响较大,除种子期以外的生育期真菌条带数和香农指数都有明显提高,花期真菌群落结构变化最大,相似度仅为 49.6%。花生关键生育期(花期和结荚期)根际土壤脲酶和蔗糖酶活性 B3 处理和复合处理都显著高于正常施肥对照,促进了连作花生生态系统的物质循环和能量流动。B3 和苍术粉复合处理促进了花生生长发育必需微量元素 Mo、B、Fe、Zn、Mn 的活化,花生叶片和籽粒中微量元素 Mo、B、Fe 的积累显著增加。本研究结果表明,内生真菌和苍术粉联合施用能有效改善连作花生根际微生物区系,提高土壤酶活性,促进微量元素的活化和吸收,对缓解花生连作障碍具有重要意义。

**关键词:**花生;苍术;内生真菌;微生物区系;PCR-DGGE;微量元素

## Effects of endophytic fungi and *Atractylodes lancea* powder on rhizosphere microflora and trace elements during continuous peanut cropping

SU Chunlun<sup>1</sup>, WANG Hongwei<sup>1</sup>, XIE Xingguang<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>, LI Xiaogang<sup>2,3</sup>, WANG Xingxiang<sup>2,3</sup>, DAI Chuanchao<sup>1,\*</sup>

1 Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomics, Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Industrialization of Microbial Resources, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China

2 Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

3 Jiangxi Key Laboratory of Ecological Research of Red Soil, Experimental Station of Red Soil, Chinese Academy of Sciences, Yingtan 335211, China

**Abstract:** A pot experiment was conducted to study the effects of the endophytic fungi *Phomopsis liquidambari* strain B3 and *Atractylodes lancea* powder on rhizosphere soil microflora, enzyme activity, and available trace elements under continuous

基金项目:国家自然科学基金(41371290, 31370507)

收稿日期:2014-09-17; 网络出版日期:2015- -

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: daichuanchao@njnu.edu.cn

peanut cropping. The results showed that strain B3 and *A. lancea* powder significantly increased peanut straw and pod yield by 14.11% and 10.28%, respectively, relative to B3 treatment alone. B3 treatment significantly increased peanut root nodules as well as straw and pod yield relative to the control, which was grown under conventional fertilizer treatment.

There were no significant differences in peanut root length and branch numbers between the treatments and the control. In addition, the B3 treatment resulted in significantly more culturable bacteria and actinomycetes in peanut rhizosphere soil at seed, podding, and mature growth stages than did the control. The B3 and *A. lancea* powder treatment resulted in a significantly larger population of culturable fungi and actinomycetes at seed, flowering, and mature growth stages than the control. 16S rDNA PCR-DGGE analysis showed that the B3 and *A. lancea* powder treatment significantly changed the soil bacteria community structure at seed, seedling, flowering, and mature growth stages and increased bacterial diversity during the seedling, flowering, and podding growth periods compared with the control, as estimated by the Shannon and band number indices. The B3 and *A. lancea* powder and B3 treatments markedly increased the activities of soil urease and sucrase during the flowering and podding growth periods, which promote material cycle and energy flow in the monoculture peanut ecosystem.

It is worth noting that B3 and *A. lancea* powder activated essential trace elements (Mo, B, Fe, Zn, and Mn) in peanut rhizosphere soil at various growth stages and dramatically promoted absorption of Mo, B, and Fe in peanut leaves and kernels, particularly Mo and Fe. The results of this study suggested that the combined application of endophytic fungi and *A. lancea* powder could effectively improve the continuous peanut cropping soil microflora, promote enzyme activity, and increase the absorption of important trace minerals. These effects are important for minimizing or even eliminating obstacles associated with continuous peanut cropping.

**Key Words:** *Archis hypogaea*; *Atractylodes lancea*; endophytic fungi; microflora; PCR-DGGE; trace element

花生是中国重要的油料作物,占中国油料市场份额的三分之一左右,作为中国南方低丘红壤区的主要经济作物和油料作物,近 20 年来种植面积约占夏季旱作面积的 60%–85%。但是,连作障碍严重制约了我国花生种植及相关产业的可持续发展,长期连作导致花生总生物量、荚果产量和品质显著降低<sup>[1-3]</sup>。微生物区系失衡是导致花生连作障碍的重要原因之一,有学者认为连作障碍的根本原因是根际土壤微生物结构失衡和恶化<sup>[4]</sup>。王小兵等研究发现红壤旱地长期连作花生导致根际微生物区系结构趋于单一,主要以鞘氨醇单胞菌属为主,花生病原青枯菌数量增加,群落多样性丰富度指数及香农-威纳指数降低,土壤微生物区系变劣<sup>[5]</sup>,Chen 等人利用克隆文库分析了连作花生土壤细菌群落变化发现,土壤有益微生物如伯克氏菌目 (*Burkholderiales*)、假单胞菌目 (*Pseudomonadales*) 等种群简单化是导致花生连作减产的主要因素<sup>[6]</sup>。连作花生往往导致土壤酶活性降低,土壤中有效养分减少,最终导致花生连作障碍。黄玉茜等发现北方花生主产区连作 6 年与正茬相比显著降低了脲酶、蔗糖酶等的活性,分别下降 20.42% 和 63.09%,土壤环境恶化,连作障碍严重<sup>[7]</sup>。

Fe、Mn、Cu、Zn、B 和 Mo 是豆科植物生长发育过程中必需元素,它们参与氮、磷和碳代谢以及许多酶系统活动,缺乏时严重影响作物的产量和品质<sup>[8]</sup>。土壤微量元素比例失调

与连作障碍的产生有直接密切的关系,大豆根际土壤中锌、铜和硼含量随连作年限增长而下降,连作 12 年铜、硼含量比正茬分别下降了 54.84% 和 22.92%<sup>[9]</sup>。番茄连作 4 年根际和非根际土壤有效态铜含量分别减少 43.0% 和 34.8%,连作 10 年有效态锌、锰和铁含量严重缺乏,连作年限越长,土壤质量下降越显著<sup>[10]</sup>。目前解决微量元素不足的主要措施是叶面喷施或者基施微肥<sup>[11-13]</sup>,虽然在一定程度上促进花生增产,但是这些措施无疑增加了生产成本和劳动量。

本课题组前期研究发现,连作花生土壤中施加内生真菌拟茎点霉 (*Phomopsis liquidambari*) B3 可以显著提高花生荚果产量,花生根瘤数量增加 30%,同时改善了连作花生土壤环境,在一定程度上缓解花生连作障

碍<sup>[14]</sup>。袁志林等人对内生真菌 B3 促生机理研究发现,B3 菌株能分泌 IAA、ABA 和 VB1,同时富含亚油酸和多种游离氨基酸<sup>[15]</sup>,B3 菌株还能与水稻建立共生关系促进其氮素吸收与积累<sup>[16-17]</sup>。药材苍术与花生间作作为一种新颖的缓解花生连作障碍的套种模式,在江西花生产区取得了一定成效,间作降低了连作土壤中酚酸物质的含量,提高了土壤脲酶和转化酶活性,PLFA 分析发现花生根际土壤中革兰氏阴性细菌种群增加了 31.2—79.9%,花生产量和土壤微生态环境都得到显著改善<sup>[18-19]</sup>。此外,苍术间作花生同时接种内生真菌 B3 能够显著减少土壤霉菌数量、增加土壤细菌数量和土壤蔗糖酶活性,增加花生超氧化物歧化酶活性,同时花生产量进一步提高,比单独接种 B3 处理高 28%<sup>[20]</sup>。但是,苍术与花生的生长时期不同,江西花生主产区 3-6 月降水较多,不利于苍术生长,而且随着机械化生产的普及,苍术间作花生在生产操作中遇到一定困难,因为苍术为多年生草本植物,商品化一般以三年生根茎为佳<sup>[21]</sup>,而花生播种之前都要进行机械化翻地,未收获的苍术影响了机械化生产。此外,苍术根茎富含茅术醇、 $\beta$ -桉油醇、苍术酮等倍半萜类化合物,而萜类化合物对枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f.)等病原菌具有抗菌和抑制孢子萌发的作用<sup>[22]</sup>。因此,本研究的目的:探讨苍术粉是否可以代替苍术活体植株发挥作用,内生真菌 B3 和苍术粉是否可以发挥协同作用缓解连作花生障碍,内生真菌 B3 和苍术粉复合处理对连作花生土壤微环境特别是微量矿质营养和微生物区系的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

花生盆栽土壤取自江西鹰潭市中国科学院红壤生态实验站(北纬 28°13',东经 116°55')周边一分场示范基地,为第四纪红黏土发育的红壤,连作花生 10 年,土壤基本理化性质:有机质 13.35g/kg,全氮 0.75 g/kg,碱解氮 17.50mg/kg,速效磷 62.67 mg/kg,速效钾 260.64 mg/kg,pH5.6(1:5 水)。

供试植物内生真菌 B3 菌株(*Phomopsis liquidambari*)分离自大戟科重阳木(*Bischofia polycarpa*)茎内皮,属于拟茎点霉属,保藏于南京师范大学江苏省微生物与功能基因组学重点实验室。将保藏的 B3 菌株转接至新鲜马铃薯固体培养基上 25℃ 活化 5d,用接种针刮起少量菌丝转移至 100ml 液体马铃薯葡萄糖培养基中,180 r/min 25℃ 培养 5d,滤纸过滤后获得湿菌丝,使用去离子水清洗 3 次,抽滤后用于花生盆栽试验。

苍术粉:取适量苍术(*Atractylodes lancea*)干燥根茎机械粉碎至粉末。花生(*Arachis hypogaea*)为江西省鹰潭市常规品种“赣花 5 号”。

### 1.2 试验设计

花生盆栽试验布置于南京师范大学植物园(北纬 31°14',东经 118°22'),试验共 4 个处理,每个处理 10 次重复,处理分别为:正常施肥(CK)、正常施肥和施加内生真菌 B3(A)、正常施肥和施加苍术粉(B)、正常施肥和施加内生真菌 B3、苍术粉(C)。正常施肥包括尿素 1.5g、钙镁磷肥 4g、氯化钾肥 1.5g、硼砂 0.1g、有机肥 50g。苍术粉 2g/盆、内生真菌 B3 菌丝约 2.5g/盆。试验盆钵高 23cm,直径 25cm,每盆装连作红壤 8kg,花盆埋入土壤中,距地面 5cm,随机区组排列。按照试验设计将肥料、苍术粉、内生真菌 B3 菌丝与土壤拌匀后,于 2013 年 5 月 13 播种花生,每盆 4 粒种子,花生出苗后每盆留 2 株幼苗,正常田间管理。

分别在播种前 1d(5.12)、种子期(5.18)取盆栽土壤,在苗期(6.11)、花期(7.2)、结荚期(8.15)和成熟期(9.18)取花生根际土壤用于微生物数量、多样性,土壤酶活和有效态微量元素分析,根际土壤按照张超等人<sup>[23]</sup>的方法进行采集,即先取出具有花生完整根系的土体,轻轻抖落大块土壤,然后用力将附着在根系的土壤抖落并收集到塑料自封袋中。成熟期花生植株用于籽粒和叶片微量元素分析及农艺性状测定。根际土壤立即带回实验室,使用 UltraClean™ Soil DNA Isolation 试剂盒(Mo BIO Laboratories)提取土壤总 DNA,然后用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测。剩余土样于 4℃ 保存,用于微生物数量、土壤酶活和有效态微量元素分析。

### 1.3 测定项目与方法

#### 1.3.1 土壤可培养微生物数量

采用稀释平板法分离根际土壤中的细菌、真菌和放线菌,细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基分离,真菌采用孟

加拉红培养基分离,放线菌采用高氏一号培养基分离。

### 1.3.2 土壤细菌、真菌 PCR-DGGE

使用 UltraClean™ Soil DNA Isolation 试剂盒( Mo BIO Laboratories) 提取土壤总 DNA,用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测。PCR-DGGE 引物和扩增条件见表 1<sup>[24]</sup>,反应体系为 50μL: 2× Taq PCR MasterMix (Taq DNA polymerase 0.05units/μL,MgCl 4mM,dNTPs 0.4mM,Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.) 25μL,上下游引物各 1μL,DNA 模板 2μL,ddH<sub>2</sub>O 21μL,PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶检测。

表 1 PCR-DGGE 引物和扩增条件  
Table 1 PCR-DGGE primers and conditions

| 模板<br>Target   | 引物<br>Primer                                                                          | PCR 扩增条件<br>PCR conditions                                              |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 细菌<br>Bacteria | 518R(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')<br>GC <sup>a</sup> -338F(5'-GACTCCTACGGGAGGAGCAGCAG-3') | 94℃, 5 min; 30 cycles, 94℃, 45 s, 60℃, 30 s, 72℃, 45 s;<br>72℃, 10 min  |
| 真菌<br>Fungi    | NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')<br>GC <sup>b</sup> -Fung(5'-ATCCCCGTTACCCGTTG-3')      | 94℃, 4 min; 35 cycles, 94℃, 30 s, 55℃, 30 s, 72℃, 1 min;<br>72℃, 10 min |

a(CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGG GCG GGG GCA CGG GGG G)

b(CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCG GCC CGC CGC CCC CGC CCC)

变性梯度凝胶电泳(DGGE)使用 CBS-DGGE 电泳系统(CBS Scientific Co.)进行。细菌使用 8%聚丙烯酰胺凝胶,变性梯度 35%—65%,真菌使用 6%聚丙烯酰胺凝胶,变性梯度 20%—50%,电泳缓冲液为 1×TAE(40 mmol/L Tris,40 mmol/L 冰乙酸,1.0 mmol/L EDTA pH 8.0),PCR 产物上样量 20μL,60℃100 V 电泳 12 h,电泳结束后 EB 染色 20 min,UVP 凝胶影像分析系统拍照。

DGGE 指纹图谱使用 Gelcompar II 软件分析<sup>[25]</sup>,聚类分析使用 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages) 方法。用于计算群落生物多样性的指标有:1) Shannon 指数  $H = - \sum (n_i/N) \ln(n_i/N)$ ,式中:  $n_i$  为单一条带的峰面积;N 为所有峰的总面积。2) 条带数量 S,为所在泳道的条带总数目<sup>[26]</sup>。

### 1.3.3 土壤酶活性

土壤脲酶采用苯酚钠比色法,其活性以 37℃条件下 24h 后 1g 风干土中 NH<sub>3</sub>-N 的毫克数表示;土壤蔗糖酶采用 3,5-二硝基水杨酸比色法,其活性以 37℃条件下 24 h 后 1 g 风干土中葡萄糖的毫克数表示。

### 1.3.4 土壤有效态微量元素含量

花生根际土壤有效态 Fe、Zn、Cu、Mn 采用 DTPA (pH7.30)浸提法<sup>[27]</sup>,土液比 1:5,用原子吸收分光光度计测定(AA-6300C 日本岛津 SHIMADZU JAPAN);土壤有效钼采用 pH3.3 草酸铵-草酸溶液超声波溶样、APDC-MIBK 萃取,石墨炉原子吸收法测定<sup>[28]</sup>(GFA-EX7i 日本岛津 SHIMADZU JAPAN);土壤有效硼采用沸水浸提姜黄素比色法测定<sup>[29]</sup>。

### 1.3.5 花生叶片及籽粒微量元素含量

花生叶片和籽粒机械粉碎过 100 目筛,准确称取 1.0000g 样品于瓷坩埚中,预灰化至无烟后转移至高温马弗炉,缓慢加热至 500℃,干灰化保持 4h。灰化后降至室温后加 5ml 浓硝酸使样品完全溶解,最后定容至 50ml,摇匀待测。同时做好空白对照。全 Fe、Zn、Cu、Mn 使用原子吸收分光光度计测定<sup>[30]</sup>(AA-6300C 日本岛津 SHIMADZU JAPAN),全钼采用石墨炉原子吸收法测定(GFA-EX7i 日本岛津 SHIMADZU JAPAN)<sup>[31]</sup>,全硼采用甲亚胺比色法测定<sup>[32]</sup>。

### 1.3.6 花生农艺性状

花生结荚期和成熟期取样,测定花生的株高、主根长、分枝数、根瘤数、荚果数、荚果干重和秸秆干重。

## 1.4 数据处理

使用 Office EXCEL 软件分析各组数据的平均值和标准差,绘制图形。应用 SPSS 13.0 软件进行方差分析

(One-Way ANOVA), 不同数据组间显著性差异采用 Duncan 法检验 ( $P = 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生真菌 B3、苍术粉处理对花生农艺性状的影响

从表 2 可知, 施加内生真菌 B3 处理的花生主要农艺指标都高于正常施肥处理 (CK), 根瘤数、荚果数量、荚果干重和秸秆干重达到显著水平, 分别提高 65.45%、83.67%、47.33% 和 40.49%。施加苍术粉处理与正常施肥处理相比并没有显著提高根瘤和荚果数量, 但显著提高了荚果和秸秆干重, 施加内生真菌 B3 和苍术粉复合处理比施加内生真菌 B3 处理增产效果更显著, 荚果干重和秸秆干重分别提高 10.28% 和 14.11%, 说明苍术粉可以协助内生真菌 B3 发挥作用缓解花生连作障碍, 促进花生产量的提高。根瘤的生物固氮作用是花生氮素的主要来源之一, 施加内生真菌 B3 处理与正常施肥处理相比显著提高了花生根瘤数量, 值得注意的是, 内生真菌 B3 和苍术粉复合处理在一定程度上减少了根瘤数量, 但是花生产量未受到影响, 这可能与花生与根瘤菌定殖之间对营养的供需平衡有关, 适量的根瘤在消耗较少能量的同时为花生提供生长发育所需的氮源。

表 2 内生真菌拟茎点霉 B3 和苍术粉对成熟期花生农艺性状的影响

Table 2 Effects of endophytic fungi B3 and *Atractylodes lancea* powder on agronomic traits of peanut at maturity stage

| 处理<br>Treatment | 株高<br>Height/cm | 根长<br>Root length/cm | 分枝数<br>Tillers | 根瘤数量<br>Root nodules | 荚果数量<br>Pod numbers | 荚果干重<br>Pod dry weight/g | 秸秆干重<br>Straw dry weight/g |
|-----------------|-----------------|----------------------|----------------|----------------------|---------------------|--------------------------|----------------------------|
| CK              | 41.75±2.06a     | 13.00±1.03a          | 6.00±1.83a     | 55.00±7.57a          | 12.25±1.71a         | 11.03 ±0.85a             | 10.67±0.44a                |
| A               | 47.15±3.56bc    | 15.75±1.50a          | 7.00±1.41a     | 91.00±6.59b          | 22.50±4.80b         | 16.25 ±0.42c             | 14.99±0.67c                |
| B               | 43.25±1.15ab    | 14.25±2.87a          | 5.75±0.96a     | 51.50±7.23a          | 13.25±2.36a         | 13.19 ±0.41b             | 12.33±0.33b                |
| C               | 49.06±3.65c     | 15.75±1.89a          | 7.50±1.00a     | 69.75±6.62ab         | 17.00±2.45a         | 17.92 ±0.65d             | 16.73±0.30d                |

CK: 正常施肥 conventional fertilizer treatment;

A: 正常施肥和施加内生真菌 B3 endophytic fungi B3 and conventional fertilizer treatment;

B: 正常施肥和施加苍术粉 *Atractylodes lancea* powder and conventional fertilizer treatment;

C: 正常施肥、施加内生真菌 B3 和苍术粉 endophytic fungi B3, *Atractylodes lancea* powder and conventional fertilizer treatment

同一列不同字母表示处理间显著差异 ( $P < 0.05$ , Duncan 多范围检验) Values in the same column followed by different letters are significantly different ( $P < 0.05$ , Duncan's multiple range test) 下同 The same below

### 2.2 内生真菌 B3、苍术粉处理对连作花生根际土壤可培养微生物数量的影响

总的来看, 苗期和结荚期花生根际土壤细菌数量处于相对较高水平, 种子期、花期和成熟期细菌数量处于相对较低水平 (表 3)。内生真菌 B3 处理与对照 (CK) 相比显著提高种子期、结荚期和成熟期细菌数量, 分别提高了 16.02%、40.86% 和 23.53%。内生真菌 B3 和苍术粉联合施用与施加苍术粉处理相比, 除苗期外的其他生育期都显著提高细菌数量, 结荚期达到最高值  $8.60 \pm 0.56 \times 10^7$  CFU.g<sup>-1</sup> 干土, 提高了 52.75%。内生真菌 B3 和苍术粉联合施用与施加内生真菌 B3 处理相比效果基本一致, 种子期和苗期细菌数量无显著差异, 花期和成熟期细菌数量前者高于后者, 结荚期细菌数量后者高于前者。

从表 3 可知, 种子期、苗期和成熟期花生根际土壤放线菌数量处于较低水平, 花期和结荚期放线菌数量处于较高水平。内生真菌 B3 处理与对照 (CK) 相比显著提高种子期、结荚期和成熟期放线菌数量, 分别提高了 10.69%、42.15% 和 32.87%, 苗期和花期放线菌数量无显著差异。苍术粉处理对根际土壤放线菌数量无显著影响, 内生真菌 B3 和苍术粉联合施用与正常施肥相比, 在种子期、花期和成熟期显著提高放线菌数量, 分别提高了 15.72%、50.56% 和 76.92%。

从表 3 可知, 苗期花生根际土壤真菌数量达到最高水平, 随着花生的生长真菌数量逐渐降低减少, 成熟期显著降低。内生真菌 B3 处理与正常施肥对照 (CK) 相比显著提高苗期、结荚期和成熟期真菌数量, 分别提高了 61.17%、95.63% 和 35.77%, 种子期和花期差异不显著。内生真菌 B3 和苍术粉联合施用与苍术粉处理相比显著提高了种子期、花期、结荚期和成熟期真菌数量, 分别提高了 24.29%、60.11%、130.77% 和 45.30%。内生真菌 B3 和苍术粉联合施用与施加内生真菌 B3 处理相比, 在花期前者真菌数量高于后者, 在结荚期后者高于

前者,成熟期无显著差异。

表 3 内生真菌拟茎点霉 B3 和苍术粉对花生根际可培养细菌、放线菌、真菌数量的影响

Table 3 Effects of endophytic fungi B3 and *Atractylodes lancea* powder on culturable bacteria, actinomycetes and fungi in peanut rhizosphere soil

| 项目<br>Items                                           | 处理<br>Treatment | 种子期<br>Seed | 苗期<br>Seedling | 花期<br>Flowering | 结荚期<br>Podding | 成熟期<br>Maturity |
|-------------------------------------------------------|-----------------|-------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| 细菌 Bacteria/<br>(10 <sup>7</sup> CFU/g Dry Soil)      | CK              | 2.06±0.05b  | 4.30±0.95a     | 1.50±0.56ab     | 7.93±0.49b     | 1.70±0.20a      |
|                                                       | A               | 2.39±0.32c  | 4.57±0.31a     | 1.30±0.20a      | 11.17±0.47c    | 2.10±0.10b      |
|                                                       | B               | 1.70±0.06a  | 3.67±0.57a     | 1.30±0.10a      | 5.63±0.74a     | 1.57±0.21a      |
|                                                       | C               | 2.17±0.15bc | 4.30±0.78a     | 2.03±0.31b      | 8.60±0.56b     | 2.63±0.25c      |
| 放线菌 Actinomycetes/<br>(10 <sup>5</sup> CFU/gDry Soil) | CK              | 1.59±0.04a  | 1.77±0.41a     | 5.40±0.96a      | 2.23±0.25ab    | 1.43±0.15a      |
|                                                       | A               | 1.76±0.08b  | 1.80±0.13a     | 5.90±0.53a      | 3.17±0.47c     | 1.90±0.17b      |
|                                                       | B               | 1.52±0.06a  | 1.80±0.34a     | 4.98±0.52a      | 1.93±0.15a     | 1.63±0.21ab     |
|                                                       | C               | 1.84±0.06b  | 1.78±0.35a     | 8.13±1.44b      | 2.70±0.17bc    | 2.53±0.25c      |
| 真菌 Fungi/<br>(10 <sup>5</sup> CFU/gDry Soil)          | CK              | 0.69±0.08a  | 2.73±0.71a     | 1.87±0.40a      | 1.60±0.35a     | 1.23±0.06a      |
|                                                       | A               | 0.76±0.10ab | 4.40±0.21b     | 1.93±0.40a      | 3.13±0.38b     | 1.67±0.12b      |
|                                                       | B               | 0.70±0.12ab | 2.73±0.23a     | 1.83±0.31a      | 1.17±0.35a     | 1.17±0.06a      |
|                                                       | C               | 0.87±0.04b  | 3.83±0.21ab    | 2.93±0.32b      | 2.70±0.56b     | 1.70±0.17b      |

2.3 内生真菌 B3、苍术粉处理对连作土壤微生物区系的影响

(1)细菌的 DGGE 指纹图谱聚类分析(图 1)表明,内生真菌 B3 处理与正常施肥相比细菌群落结构在种子期、苗期和结荚期发生了显著变化,花期和成熟期 CK 和 A 处理聚为一类,相似度分别为 80.4%和 80.7%。内生真菌 B3 和苍术粉联合施用相对于正常施肥处理,显著改变了种子期、苗期、花期和成熟期花生根际土壤

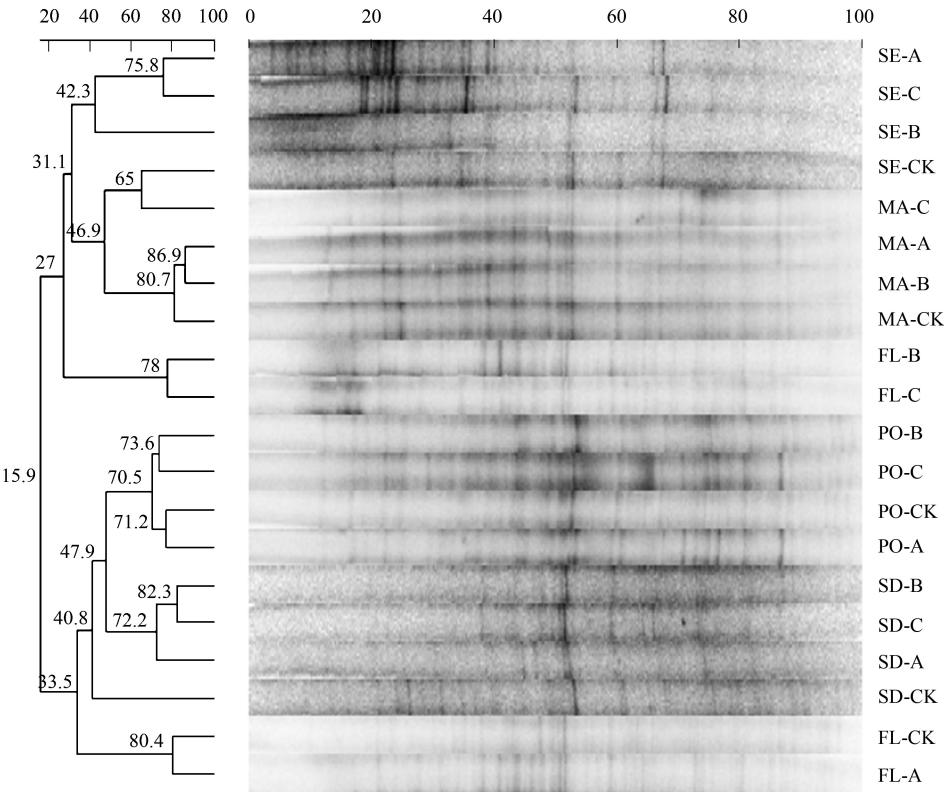


图 1 花生根际土壤细菌群落 DGGE 指纹图谱聚类分析

Fig. 1 DGGE cluster analysis (unweighted pair group method with arithmetic means) of 16S rRNA profile of peanut rhizosphere soil microbial communities

SE: 种子期 Seed, SD: 苗期 seedling, FL: 花期 Flowering, PO: 结荚期 Podding, MA: 成熟期 Maturity

细菌群落结构。由图 1 可知,种子期 A 和 C 处理聚为一类,种子期、花期和结荚期 B 和 C 处理聚为一类,说明苍术粉处理与内生真菌 B3 和苍术粉联合处理对根际土壤细菌微生物群落结构的影响较为相似,苍术粉协同内生真菌 B3 改善了花生植株根际微生态环境。

从表 4 可知,花生根际土壤细菌群落多样性分析表明,内生真菌 B3 处理与正常施肥处理相比条带数和香农指数都有所提高,花期和结荚期细菌香农指数达到最高,分别为 3.63 和 3.71,比正常施肥处理提高 23.47% 和 20.45%。内生真菌 B3 和苍术粉联合施用与内生真菌 B3 处理相比条带数更多,在花生关键生长期花期和结荚期分别提高 6.25% 和 9.09%,香农指数在种子期、苗期和结荚期略有提高。

表 4 花生根际土壤细菌、真菌群落多样性  
Table 4 Peanut rhizosphere soil bacteria and fungi community diversity by DGGE analysis

| 项目<br>Items    | 处理<br>Treatment | 种子期<br>Seed |      | 苗期<br>Seedling |      | 花期<br>Flowering |      | 结荚期<br>Podding |      | 成熟期<br>Maturity |      |
|----------------|-----------------|-------------|------|----------------|------|-----------------|------|----------------|------|-----------------|------|
|                |                 | S           | H    | S              | H    | S               | H    | S              | H    | S               | H    |
| 细菌<br>Bacteria | CK              | 18          | 2.72 | 22             | 2.90 | 28              | 2.94 | 29             | 3.08 | 19              | 2.71 |
|                | A               | 25          | 2.90 | 27             | 3.19 | 32              | 3.63 | 33             | 3.71 | 22              | 2.84 |
|                | B               | 19          | 2.68 | 18             | 2.62 | 27              | 2.90 | 29             | 2.96 | 19              | 2.62 |
|                | C               | 26          | 3.00 | 29             | 3.28 | 34              | 3.53 | 36             | 3.93 | 20              | 2.76 |
| 真菌<br>Fungi    | CK              | 14          | 2.40 | 20             | 2.62 | 21              | 2.80 | 15             | 1.93 | 21              | 2.42 |
|                | A               | 12          | 2.26 | 25             | 2.99 | 31              | 3.17 | 16             | 2.23 | 24              | 2.80 |
|                | B               | 12          | 2.15 | 16             | 2.32 | 18              | 2.21 | 18             | 2.33 | 23              | 2.98 |
|                | C               | 20          | 2.52 | 27             | 3.09 | 29              | 3.22 | 20             | 2.45 | 25              | 3.09 |

S-条带数 Band number ,H-香农指数 Shannon index

(2)真菌 DGGE 指纹图谱聚类分析(图 2)表明,种子期和苗期内生真菌 B3 处理与正常施肥处理花生根

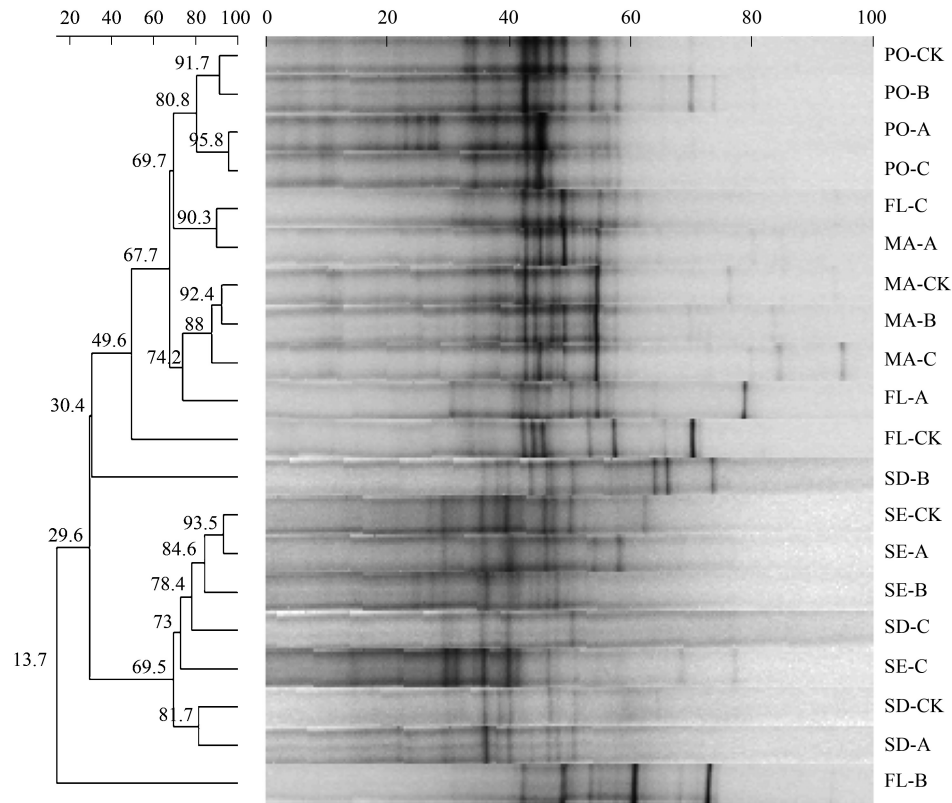


图 2 花生根际土壤真菌群落 DGGE 指纹图谱聚类分析

Fig. 2 DGGE cluster analysis (unweighted pair group method with arithmetic means) of 18S rRNA profile of peanut rhizosphere soil microbial communities

际土壤真菌群落聚为一类,相似度分别为 93.5%和 81.7%,结荚期和成熟期苍术粉处理和正常施肥处理的真菌群落结构较相似,相似度分别为 92.4%和 91.7%。内生真菌 B3 和苍术粉联合施用与正常施肥处理相比,花期真菌群落相似度仅为 49.6%,说明真菌的群落结构发生了强烈的变化。

由表 4 可知,内生真菌 B3 和苍术粉联合施用处理与内生真菌 B3 处理相比,种子期、结荚期和花期的香农指数分别提高 11.50%、9.87%和 10.36%,真菌群落多样性略有改善。内生真菌 B3 和苍术粉联合施用处理与苍术粉处理相比也提高了种子期、苗期和花期真菌群落多样性,香农指数分别提高 17.21%、33.19%和 45.70%。成熟期真菌群落多样性较高,这与土壤中凋落物增加有关,多种多样的真菌可以有效降解凋落物,促进养分循环。

## 2.4 内生真菌 B3、苍术粉处理对连作土壤酶活性的影响

### 2.4.1 脲酶

从图 3a 可知,播种前及种子期花生盆栽土壤脲酶活性处于较低水平,随着花生生长至苗期,脲酶活性逐渐升高,花期脲酶活性达到最高值,结荚期至成熟期又逐渐降低。内生真菌 B3 处理显著提高了花期、结荚期和成熟期脲酶活性,与正常施肥(CK)相比分别提高 15.58%、18.86%和 15.99%。内生真菌 B3 和苍术粉复合处理与苍术粉处理(B)相比显著提高了脲酶活性,同时效果优于单独施加内生真菌 B3 处理,与施加内生真菌 B3 相比花期、结荚期和成熟期脲酶活性分别提高 5.83%、3.07%和 4.45%。

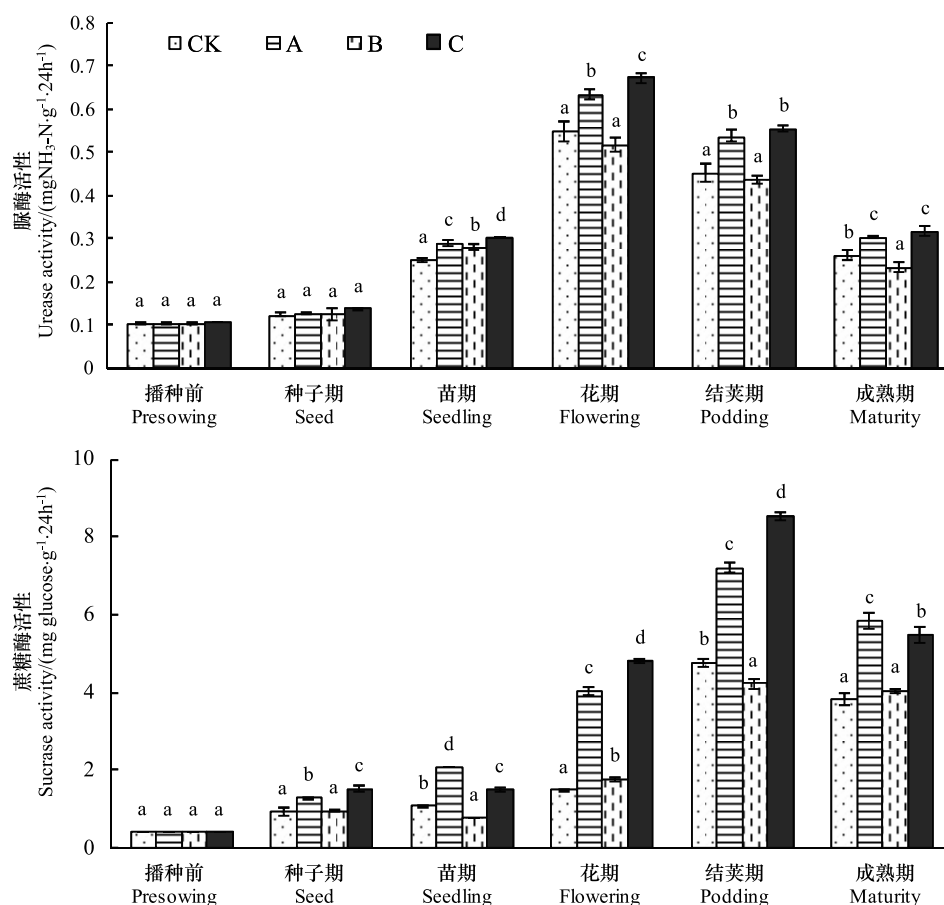


图 3 内生真菌拟茎点霉 B3 和苍术粉对花生根际土壤脲酶和蔗糖酶活性影响

Fig. 3 Effects of endophytic fungi B3 and *Atractylodes lancea* powder on urease and sucrase activities in peanut rhizosphere soil

不同字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ ) Different letters meant significant difference among treatments at 0.05 level 下同 The same below

### 2.4.2 蔗糖酶

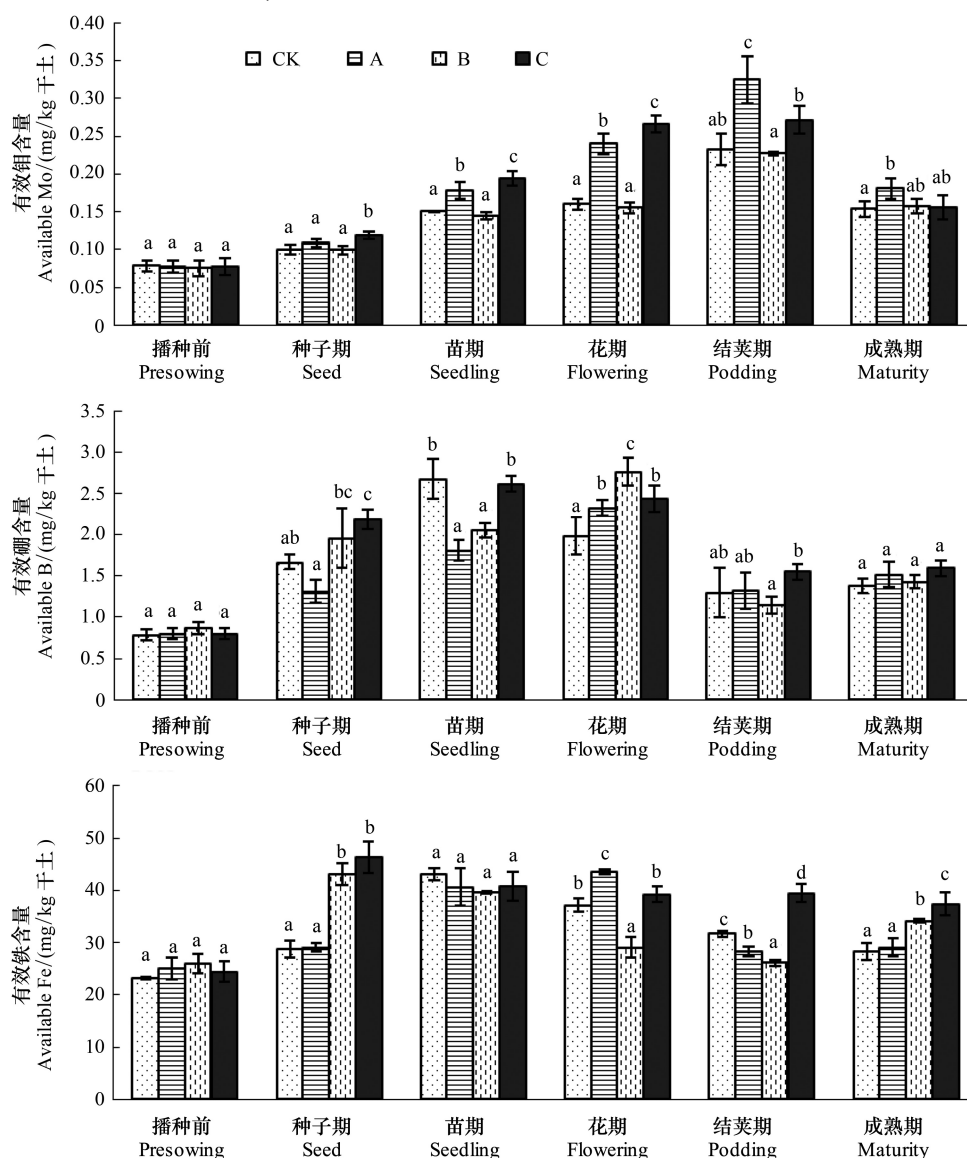
从图 3b 可知,花生盆栽土壤蔗糖酶活性从种子期开始升高,苗期、开花期至结荚期都保持较高活性,结荚

期蔗糖酶活性达到最高值,成熟期活性有所下降,但依然保持较高水平。内生真菌 B3 处理显著提高花生从种子萌发至成熟收获整个生育期的蔗糖酶活性,分别提高了 37.99%、93.60%、174.83%、51.27%和 53.37%。内生真菌 B3 和苍术粉复合处理苗期和成熟期蔗糖酶活性低于单独内生真菌 B3 处理,但是在花生生长关键期花期和结荚期显著提高了蔗糖酶活性,分别提高了 19.00%和 18.49%。内生真菌 B3 和苍术粉复合处理与苍术粉处理(B)相比显著提高蔗糖酶活性。

## 2.5 连作花生根际土壤有效态微量元素的动态变化

由图 4a 可知,内生真菌 B3 处理在花生苗期、花期和结荚期显著提高了土壤中有效钼含量,结荚期有效钼的含量最高,达到  $0.32 \pm 0.03 \text{ mg/kg}$  风干土。花期和结荚期内生真菌 B3 处理比对照(CK)提高了 49.87%和 39.85%,成熟期除了 CK 外各处理之间无显著差异,有效钼含量在  $0.15 \sim 0.18 \text{ mg/kg}$  风干土之间。内生真菌 B3 和苍术粉复合处理与苍术粉处理相比显著促进苗期和花期土壤中钼的活化,苗期和花期有效钼含量分别提高 72.25%和 34.39%,与内生真菌 B3 处理相比无显著差异。

由图 4b 可知,花生根际土壤有效硼的变化趋势较复杂,纵观花生整个生育期,内生真菌 B3 处理对土壤中硼的活化影响较小,甚至在种子期和苗期低于对照组。内生真菌 B3 和苍术粉复合处理与苍术粉处理相比显著增加苗期和结荚期有效硼含量,分别提高 34.39%和 19.85%。在花生生长前期,施加内生真菌 B3 的基础上添加苍术粉更有利于土壤硼的活化,为花生后期生长发育提供充足的硼营养。



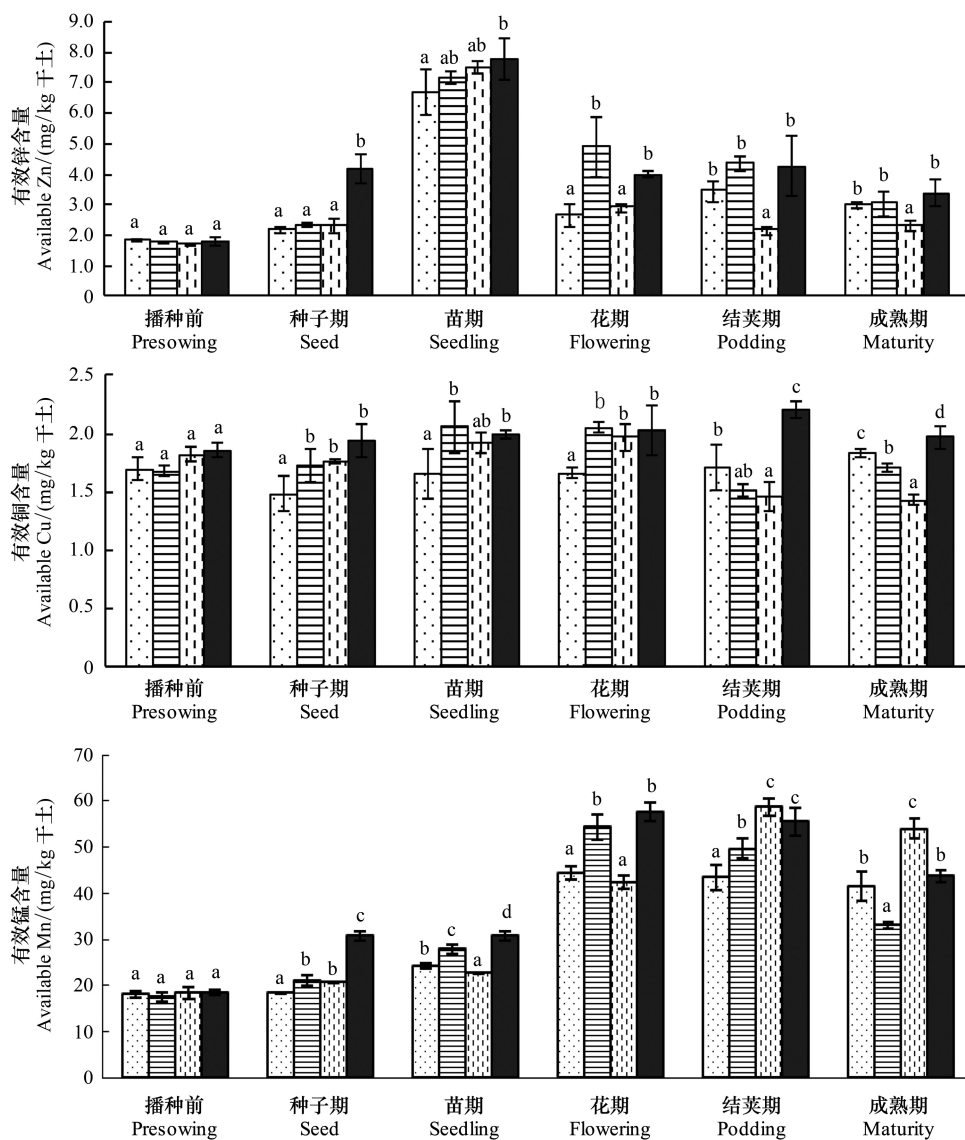


图 4 内生真菌拟茎点霉 B3 和苍术粉对花生根际土壤有效态微量元素的影响

Fig. 4 Effects of endophytic fungi B3 and *Atractylodes lancea* powder on the content of available trace elements in peanut rhizosphere soil

由图 4c 可知,连作花生土壤有效铁含量较高,播种前有效铁含量在 23.27—25.83mg/kg 风干土。处理后至苗期有效铁有一定程度增加,含量在 39.67—43.13mg/kg 风干土。内生真菌 B3 处理与对照(CK)相比显著提高了花期土壤有效铁的含量,从苗期到花期一直维持在较高水平,为花生光合作用提高了充足铁营养。内生真菌 B3 和苍术粉复合处理与苍术粉处理相比显著提高了花期和结荚期土壤有效铁的含量,分别提高了 35.07% 和 45.53%,苍术粉协同内生真菌 B3 活化土壤中的铁,在结荚期为花生提供了源源不断的铁营养。

由图 4d 可知,内生真菌 B3 处理与对照(CK)相比在花期显著提高了土壤有效锌的含量,对锌的活化影响不大。内生真菌 B3 和苍术粉复合处理在花生种子期迅速显著地提高了有效锌含量,与苍术粉处理相比显著提高了花期和结荚期有效锌含量,分别提高了 38.33% 和 98.14%。

由图 4e 可知,连作花生土壤中有有效铜的含量在整个生育期变化不大,基本与播种前水平一致。内生真菌 B3 处理对有效铜基本无影响,内生真菌 B3 和苍术粉复合处理在结荚期和成熟期与苍术粉处理相比显著提高了有效铜含量,分别提高 50.68% 和 37.26%。

由图 4f 可知,花生根际土壤有效锰含量在花期和结荚期升高,内生真菌 B3 处理与对照(CK)相比显著提高了苗期和花期土壤有效锰含量,分别提高了 14.76% 和 22.60%。内生真菌 B3 和苍术粉复合处理与苍术粉

处理显著提高了苗期和花期有效锰含量,与内生真菌 B3 处理相比显著提高苗期和结荚期有效锰含量。

## 2.6 花生叶片和籽粒中微量元素的含量

由表 5 可知,苍术粉处理与正常施肥对照(CK)相比促进了叶片中 Fe 和 Zn 的积累,内生真菌 B3 处理对花生叶片微量元素 Mo、B、Fe、Zn、Mn 的积累具有显著促进作用,同样,内生真菌 B3 和苍术粉联合施用与正常施肥处理相比显著促进了叶片中必需微量元素 Mo、B、Fe、Zn、Mn 的积累,与对照相比分别增加了 48.78%、38.22%、24.75%、187.11%、75.37%,为花生的光合作用提供了较充足的矿质营养来源,微量元素的积累与花生荚果和秸秆产量增加结果相一致。

花生籽粒具有较高的营养价值,富含蛋白质、不饱和脂肪酸、维生素和微量元素等。由表 5 可知,苍术粉处理与正常施肥对照相比对籽粒中微量元素积累没有显著影响,内生真菌 B3 和苍术粉联合施用与对照相比显著促进了花生籽粒中 Mo、Fe、B 和 Zn 的积累,尤其是 Mo 和 Fe,分别增加 41.18% 和 76.66%。总体上看,内生真菌 B3 和苍术粉联合施用促进了花生叶片和籽粒中微量元素(Mo、Fe、B 等)的积累,为花生的生长发育提供了必需的微量矿质营养。

表 5 内生真菌拟茎点霉 B3 和苍术粉对花生叶片和籽粒微量元素含量的影响

Table 5 Effects of endophytic fungi B3 and *Atractylodes lancea* powder on the content of trace elements in peanut leaves and seeds

| 组织<br>Organ     | 处理<br>Treatment | 钼 Mo       | 铁 Fe         | 硼 B          | 锌 Zn         | 铜 Cu        | 锰 Mn         |
|-----------------|-----------------|------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| mg/kgdry weight |                 |            |              |              |              |             |              |
| 叶片<br>Leaf      | CK              | 0.41±0.01a | 354.03±7.70a | 75.95±1.15a  | 31.27±0.97a  | 5.66±0.25a  | 101.44±4.56a |
|                 | A               | 0.67±0.01c | 503.11±1.83d | 113.65±2.47c | 86.06±0.20c  | 5.55±0.27a  | 208.17±2.98c |
|                 | B               | 0.41±0.01a | 381.14±1.75b | 78.63±2.07a  | 41.85±0.78b  | 5.77±0.24a  | 102.49±2.07a |
|                 | C               | 0.61±0.01b | 441.67±1.59c | 104.98±1.42b | 89.78±1.78d  | 5.44±0.21a  | 177.90±2.56b |
| 籽粒<br>Seed      | CK              | 0.68±0.01a | 36.08±2.48a  | 13.98±1.47a  | 36.95±0.37a  | 9.84±0.39ab | 27.87±1.04b  |
|                 | A               | 0.90±0.02b | 67.58±3.17b  | 15.92±0.55b  | 42.09±1.33c  | 9.18±0.54a  | 31.35±0.24c  |
|                 | B               | 0.67±0.01a | 31.41±1.83a  | 14.93±0.61ab | 41.16±1.42bc | 9.84±0.42ab | 25.23±0.97a  |
|                 | C               | 0.96±0.02c | 63.74±3.24b  | 18.13±0.17c  | 39.96±0.47b  | 10.29±0.46b | 29.37±2.13b  |

## 3 讨论

### 3.1 内生真菌和苍术粉联合施用对连作花生根际土壤微生物数量和多样性的影响

土壤微生物是土壤质量和植物健康的生物指示物,是土壤生态系统健康可持续发展和植物健康生长的关键因子<sup>[33]</sup>。目前对连作花生障碍的研究普遍认为土壤真菌化是导致连作花生减产的主要原因,连作改变了微生物群落结构,使土壤由细菌型向真菌型转变<sup>[5,34-36]</sup>。王小兵等对连作花生不同生育期的微生物区系变化研究发现,有机肥和有效菌剂处理可以显著提高细菌和放线菌数量<sup>[5]</sup>,本研究同样发现内生真菌 B3 和苍术粉复合处理的放线菌数量在种子期、花期和成熟期显著高于对照,内生真菌 B3 和苍术粉能协同促进土壤中细菌和放线菌的增加,有利于土壤环境的改善。黄玉茜<sup>[34]</sup>等人发现随着连作年限的增加,根际和非根际土壤中细菌、放线菌数量明显减少,真菌数量明显增加,本研究发现内生真菌 B3 和苍术粉复合处理增加了真菌数量,在花生生长关键时期(花期、结荚期)达到显著水平,这与前人的研究不同,可能是因为内生真菌 B3 对土壤中真菌群落结构产生刺激作用,前人发现内生真菌 B3 处理导致酵母菌<sup>[20]</sup>、木霉和被孢霉<sup>[19,37]</sup>等有益真菌大量繁殖,这种刺激机制有待于进一步的研究。PCR-DGGE 方法能够在分子水平上对微生物多样性进行分析<sup>[38-40]</sup>,目前在研究土壤微生物种群的多样性和对种群动态监测应用较广泛,因此,本研究采用 PCR-DGGE 对花生根际土壤微生物区系进行研究。王宏伟等对花生开花期土壤细菌与真菌进行 DGGE 分析发现,内生真菌 B3 显著提高了细菌和真菌的条带数和香农指数,土壤微生物群落结构得到显著改善<sup>[14]</sup>,本研究发现内生真菌 B3 和苍术粉复合处理的条带数和香农指数高于对照,细菌的群落结构在种子期、苗期、花期和成熟期发生显著性改变,真菌的群落结构在花期发生显著性改变,这可能与土壤环境以及不同种类微生物的繁殖能力

相关。总的来说,本研究复合处理有效地提高了土壤中微生物的多样性(香农指数和条带数),改善了微生物群落结构,在一定程度上改善了连作花生土壤微环境。

### 3.2 内生真菌和苍术粉联合施用对土壤酶活的影响

土壤酶是土壤有机体的代谢动力,在土壤生态系统的物质循环和能量流动方面扮演重要的角色<sup>[41]</sup>。土壤蔗糖酶能够增加土壤中小分子糖类的含量,与土壤中有机质的转化和呼吸强度密切相关,其活性强弱能反映土壤的熟化程度和肥力水平。土壤脲酶能够将尿素转化为氨供植物利用,其活性能够在一定程度上反映土壤的供氮能力。本研究发现内生真菌苍术粉复合处理提高了花期、结荚期和成熟期脲酶活性以及种子期、花期和结荚期蔗糖酶活性,改善了连作花生土壤的肥力,为花生生长发育提供了必需的碳氮源。尹淑丽等人对黄瓜根际土壤酶活的研究也发现微生物菌剂能够提高脲酶和蔗糖酶的活性<sup>[42-43]</sup>,这与本研究发现相同。本课题组谢慧<sup>[20]</sup>等人发现苍术间作花生同时接种内生真菌 B3 处理土壤蔗糖酶和脲酶活性最高,本研究也发现类似结果,复合处理在花期和结荚期两种酶活性也达到最高值,说明苍术粉可以代替活体苍术植株提高土壤酶活性,改善连作土壤环境。究其原因,土壤酶活性的提高与土壤微生物数量的增加,微生物群落结构的改善有关,内生真菌对花生根系分泌物的刺激可能也是土壤酶活性提高的原因。

### 3.3 内生真菌和苍术粉联合施用对花生根际土壤和花生叶片籽粒微量元素的影响

微量元素(Fe、Mn、Cu、Zn、B、Mo)涉及到植物细胞几乎全部新陈代谢过程,例如能量代谢,初级和次级代谢等,细胞的自我保护、基因调节、激素感知和信号传导都需要微量元素的参与<sup>[44-45]</sup>。前人的研究发现植物内生菌能促进宿主植物对微量元素的吸收,Labidi 等人发现碳酸钙胁迫下丛枝菌根真菌促进根部对铁、锌和铜的吸收<sup>[46]</sup>,王艺等人也发现外生菌根真菌能促进宿主马尾松对微量元素铁、锰、铜和锌的吸收,进而促进苗木生长,提高苗木抗旱性<sup>[47]</sup>。本研究对花生全生育期土壤中钼、硼、铁、锌、铜和锰的动态变化进行监测,在花生成熟期对叶片和籽粒中微量营养含量进行定量分析,结果表明,复合处理可以显著促进连作土壤中有效态微量元素的活化,促进钼铁在花生叶片和籽粒中的积累,提高花生产量的同时对其品质有显著的改善作用。本研究发现内生真菌促进豆科植物花生对微量元素钼铁的吸收与积累,改善了花生的生理代谢水平,最终促进花生的产量和品质的提高。

## 3 结论

内生真菌 B3 和苍术粉联合施用促进了根际微生物数量的增加,特别是在放线菌和真菌的数量,PCR-DGGE 聚类分析显示联合施用有效地提高了土壤中微生物的多样性,改善了微生物群落结构。同样,联合施用显著促进了花期和结荚期脲酶和蔗糖酶活性,加速了物质循环过程,除此之外,联合施用还促进根际土壤微量元素的活化,促进钼铁在花生叶片和籽粒中的积累,提高花生产量的同时对其品质有显著的改善作用。本研究的结果显示,内生真菌和苍术粉联合施用对改善连作花生土壤环境及缓解花生连作障碍具有重要意义。

### 参考文献(References):

- [1] 郑亚萍,王才斌,黄顺之,吴正锋.花生连作障碍及其缓解措施研究进展.中国油料作物学报,2008,30(3):384-388.
- [2] 王兴祥,张桃林,戴传超.连作花生土壤障碍原因及消除技术研究进展.土壤,2010,42(4):505-512.
- [3] 王明珠,陈学南.低丘红壤区花生持续高产的障碍及对策.花生学报,2005,34(2):17-22.
- [4] Zhang W, Long X Q, Huo X D, Chen Y F, Lou K. 16S rRNA-based PCR-DGGE analysis of actinomycete communities in fields with continuous cotton cropping in Xinjiang, China. Microbial Ecology, 2013, 66(2):385-393.
- [5] 王小兵,骆永明,刘五星,李振高.红壤连作花生不同生育期根际微生物区系变化研究.扬州大学学报:农业与生命科学版,2011,32(4):23-27.
- [6] Chen M N, Li X, Yang Q L, Chi X Y, Pan L J, Chen N, Yang Z, Wang T, Wang M, Yu S L. Dynamic succession of soil bacterial community during continuous cropping of peanut (*Arachis hypogaea* L.). PLoS One, 2014, 9(7):e101355.
- [7] 黄玉茜,韩立思,韩梅,肖亦农,杨劲峰,韩晓日.花生连作对土壤酶活性的影响.中国油料作物学报,2012,34(1):96-100.
- [8] 陈利云,居永霞,周志宇.豆科植物根际微量元素含量特征.土壤通报,2013,44(3):641-646.

- [9] 孙磊. 不同连作年限对大豆根际土壤养分的影响. 中国农学通报, 2008, 24(12): 266-269.
- [10] 闵红, 陈磊, 呼世斌, 郭文姬, 景岳龙. 大棚果蔬连作土壤肥力限制性因子研究. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 38(8): 160-166.
- [11] 郑亚萍, 成强, 吴兰荣, 孙奎香, 吴正锋, 王才斌. 硼钼肥对旱地花生生长发育及产量的影响. 作物杂志, 2011, 27(5): 68-72.
- [12] 肖艳, 李燕婷, 曹一平. 不同铁制剂与施用方法对矫正花生缺铁黄化症的效果. 土壤肥料, 2003, 32(5): 21-25.
- [13] 丛惠芳, 孙治军, 张梅, 张志芬, 于岩, 陈兆平, 高明芳, 车广玉. 不同量 B、Zn 肥对花生生长和产量的影响. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2008, 39(2): 171-174.
- [14] 王宏伟, 王兴祥, 吕立新, 肖逸, 戴传超. 施加内生真菌对连作花生土壤微生物和酶活性的影响. 应用生态学报, 2012, 23(10): 2693-2700.
- [15] 袁志林, 戴传超, 史央, 王安琪, 张德珍. 内生真菌 B3 促进水稻生长的机理研究. 江苏农业科学, 2004, 32(2): 10-13.
- [16] Yang B, Ma H Y, Wang X M, Jia Y, Hu J, Li X, Dai C C. Improvement of nitrogen accumulation and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.) by the endophyte *Phomopsis liquidambari*. Plant Physiology and Biochemistry, 2014, 82: 172-182.
- [17] Yang B, Wang X M, Ma H Y, Jia Y, Li X, Dai C C. Effects of the fungal endophyte *Phomopsis liquidambari* on nitrogen uptake and metabolism in rice. Plant Growth Regulation, 2014, 73(2): 165-179.
- [18] Dai C C, Chen Y, Wang X X, Li P D. Effects of intercropping of peanut with the medicinal plant *Atractylodes lancea* on soil microecology and peanut yield in subtropical China. Agroforestry Systems, 2013, 87(2): 417-426.
- [19] Li X G, Wang X X, Dai C C, Zhang T L, Xie X G, Ding C F, Wang H W. Effects of intercropping with *Atractylodes lancea* and application of bio-organic fertiliser on soil invertebrates, disease control and peanut productivity in continuous peanut cropping field in subtropical China. Agroforestry Systems, 2014, 88(1): 41-52.
- [20] 戴传超, 谢慧, 王兴祥, 李培栋, 李奕林, 张桃林. 间作药材与接种内生真菌对连作花生土壤微生物区系及产量的影响. 生态学报, 2010, 30(8): 2105-2111.
- [21] 朴锦, 王坤. 关苍术生长发育规律的研究. 中国农学通报, 2014, 30(19): 210-214.
- [22] Cole D J. Detoxification and activation of agrochemicals in plants. Pesticide Science, 1994, 42(3): 209-222.
- [23] 张超, 刘国彬, 薛莲, 宋籽霖, 张昌胜. 黄土丘陵区不同植被类型根际土壤微团聚体及颗粒分形特征. 中国农业科学, 2011, 44(3): 507-515.
- [24] Du W, Zhou J, Jiang P, Yang T, Bu Y Q, Liu C H, Dai C C. Effects of *Beauveria bassiana* and acephate on enzyme activities and microbial diversity in paddy soil. Plant Soil and Environment, 2013, 59(12): 562-567.
- [25] Brons J K, van Elsas J D. Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(9): 2717-2727.
- [26] Sigler W V, Zeyer J. Microbial diversity and activity along the forefields of two receding glaciers. Microbial Ecology, 2002, 43(4): 397-407.
- [27] Lindsay W L, Norvell W A. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. Soil Science Society of America Journal, 1978, 42(3): 421-428.
- [28] 秦樊鑫, 傅文军, 张松. 超声波溶样、APDC-MIBK 萃取石墨炉原子吸收法测定土壤中有效钼的研究. 土壤通报, 2006, 37(2): 343-345.
- [29] Adeboye M K A. Status of total and available boron and zinc in the soils of the Gongola river basin of Nigeria. Savannah Journal of Agriculture, 2011, 6(1): 47-57.
- [30] 刘立云, 王萍, 冯美利, 董志国, 李杰. 火焰原子吸收法测定海南槟榔叶片中金属元素的研究. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(12): 2989-2992.
- [31] 刘鹏, 吴建之, 杨玉爱. 土壤和植物中钼硼测定方法的比较. 农业环境保护, 2001, 20(3): 183-185.
- [32] Lohse G. Microanalytical azomethine-H method for boron determination in plant tissue. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 1982, 13(2): 127-134.
- [33] Chen M N, Li X, Yang Q L, Chi X Y, Pan L J, Chen N, Yang Z, Tong W, Wang M, Yu S L. Soil eukaryotic microorganism succession as affected by continuous cropping of peanut - pathogenic and beneficial fungi were selected. PLoS One, 2012, 7(7): e40659.
- [34] 黄玉茜, 韩晓日, 杨劲峰, 刘宁, 刘小虎. 花生连作土壤微生物区系变化研究. 土壤通报, 2011, 42(3): 552-556.
- [35] 徐瑞富, 王小龙. 花生连作田土壤微生物群落动态与土壤养分关系研究. 花生学报, 2003, 32(3): 19-24.
- [36] He J Z, Zheng Y, Chen C R, He Y Q, Zhang L M. Microbial composition and diversity of an upland red soil under long-term fertilization treatments as revealed by culture-dependent and culture-independent approaches. Journal of Soils and Sediments, 2008, 8(5): 349-358.
- [37] Li X G, Ding C F, Zhang T L, Wang X X. Fungal pathogen accumulation at the expense of plant-beneficial fungi as a consequence of consecutive peanut monoculturing. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 72: 11-18.
- [38] Niemi R M, Heiskanen I, Wallenius K, Lindström K. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of

- bacterial consortia. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 45(3): 155-165.
- [39] Muyzer G, Waal E C D, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [40] Gong M L, Ren N Q, Xing D F. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis in microbial molecular ecology. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(6): 845-848.
- [41] 刘善江, 夏雪, 陈桂梅, 卯丹, 车升国, 李亚星. 土壤酶的研究进展. *中国农学通报*, 2011, 27(21): 1-7.
- [42] 尹淑丽, 麻耀华, 张丽萍, 张根伟, 黄亚丽, 梁然, 周竞, 崔冠慧, 段普凡. 不同生防菌对黄瓜根际土壤微生物数量及土壤酶活性的影响. *北方园艺*, 2012, (1): 10-14.
- [43] 尹淑丽, 张丽萍, 张根伟, 黄亚丽, 崔冠慧, 梁然, 段普凡, 程辉彩, 麻耀华. 复合微生态菌剂对黄瓜根际土壤微生物数量及酶活的影响. *微生物学杂志*, 2012, 32(1): 23-27.
- [44] Hänsch R, Mendel R R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, 12(3): 259-266.
- [45] White P J, Broadley M R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets-iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 2009, 182(1): 49-84.
- [46] Labidi S, Ben Jeddi F, Tisserant B, Debiane D, Rezgui S, Grandmougin-Ferjani A, Sahraoui A L H. Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in root mineral uptake under  $\text{CaCO}_3$  stress. *Mycorrhiza*, 2012, 22(5): 337-345.
- [47] 王艺, 丁贵杰. 干旱胁迫下外生菌根真菌对马尾松幼苗生长和微量元素吸收的影响. *浙江农林大学学报*, 2012, 29(6): 822-828.