

四种除草剂对根瘤菌、AMF 等土壤微生物的影响

杨会青¹ 孔祥清¹ 王智慧¹ 崔战利^{2*}

(1. 黑龙江八一农垦大学农学院 黑龙江 大庆 163319)

(2. 黑龙江八一农垦大学生命科技学院 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 本文采用盆栽试验, 研究 4 种除草剂在大田常规剂量下, 对根际土壤微生物和土著根瘤菌、AMF 与苗期大豆共生的影响。结果表明, 除草剂对 V2 期大豆根际土壤中真菌数量和 V3 期细菌数量的抑制作用显著, 对 V2 和 V3 期 AMF 的侵染率、V3 期根瘤数量影响显著。除草剂对土壤中真菌数量的负面影响可能是抑制菌根形成的重要因素, 对菌根形成产生的抑制可能会进一步导致根瘤形成受到抑制。

关键词: 除草剂, 根瘤菌, AM 真菌, 根际土壤微生物

The Effect of Four Herbicides on Rhizobium, AMF and Other Soil Microbe

YANG Hui-Qing¹ KONG Xiang-Qing¹ WANG Zhi-Hui¹ CUI Zhan-Li^{2*}

(1. College of Agriculture, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

(2. College of Life Science and Technology, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

Abstract: In pot experiment, we studied the influence of four kinds of herbicides under the field conventional dose on rhizosphere soil microbe and two symbioses of soybean with indigenous rhizobium and arbuscular mycorrhizas fungi at seeding stage. The result indicated that the herbicides influenced remarkably on AMF colonization of V2 and V3 period, nodule number of the V3 period, and restrained significantly on fungi number of V2 period and bacteria number of V3 period in soybean rhizosphere soil. That herbicides had a negative impact on fungi number may be an important factor in inhibiting the formation of mycorrhizae, then the inhibition on formation of mycorrhiza may lead to inhibit the formation of nodule further.

Keywords: Herbicides, Rhizobium, Arbuscular mycorrhizas fungi, Rhizosphere soil microbe

大豆除可以与根瘤菌进行共生固氮外, 还可以与丛枝菌根真菌(Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)共生。据估计, 共生固氮提供了大豆需氮量的 50% 左右^[1], 只有在根瘤菌与大豆共生体得到良好发育

下, 才有可能满足大豆对氮素营养的要求, 而获得高产。AMF 可与 80% 以上陆生显花植物共生形成丛枝菌根(AM)^[2], 促进植物对矿质营养元素(尤其是 P 素)和水分的吸收, 增强植株的抗性等^[3,4]。近年来,

基金项目: 黑龙江省农垦总局“十一五”重点科技攻关项目(No. HNKXIV-02-046); 教育部科技攻关项目(No. 地方 03043); 国家科技支撑计划(No. 2006BAK02A25)

* 通讯作者: Tel: 86-459-6819298; 邮箱: zhanli@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-10-19; 接受日期: 2009-02-06

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

AMF、根瘤菌与豆科植物间的共生关系越来越受到重视,其相互作用的机制及双接种对宿主植物的影响也逐渐成为国内外学者研究的热点^[5]。除草剂的广泛使用,对土壤微生物、寄主植物及土壤微生物和寄主植物之间的关系造成了一些影响,它打乱了大豆与根瘤菌、大豆与AMF原来的共生关系。然而针对除草剂对土著根瘤菌、AMF与大豆共生的影响研究目前还未见报道。

除草剂施用时间越长,被挥发和光解的程度越大,药剂损失越严重,药效也越不稳定^[6],针对这种现象,本试验采用盆栽研究了几种土施除草剂在大田常规剂量下,对大豆V2(V2表示第一复叶展开期)^[7]和V3(V3表示第二复叶展开期)^[7]2个时期根际土壤微生物数量的影响,以及对根瘤菌、AMF与大豆共生系统的影响。

1 材料和方法

1.1 供试除草剂

25%氟磺胺草醚(虎威)、70%可湿性粉剂赛克、50%乙草胺、2,4-D丁酯分别由佛山市盈辉作物科学有限公司、江苏七州农药厂、内蒙古宏裕农药有限公司和山东绿野化学有限公司提供。

1.2 盆栽试验

本试验采用单因素盆栽试验,试验设、
、
、
5个处理,分别是不施除草剂的对照、50%乙草胺 200 mL/667 m²、70%赛克可湿性粉剂 40 g/667 m²、25%氟磺胺草醚 100 mL/667 m²、72% 2,4-D丁酯乳油 40 mL/667 m²,每个处理设6次重

复。每盆装风干土:蛭石按4:1比例混合的基质1.5 kg, N P₂O₅ K₂O按7 kg/hm²:12.9 kg/hm²:7 kg/hm²施肥量拌入土壤,均匀点种8粒大豆种子,再覆盖3 cm厚的表土,然后缓慢加入200 mL水,再按除草剂的用量和盆的表面积计算除草剂实际施用量,将除草剂先拌入一定量的土壤中,每盆按等量表土(土厚0.5 cm左右)撒在盆表面,对照施等量加同样量水的土壤。在玻璃温室中自然光照、温度下培养。以后每2 d~3 d每盆浇入等量的清水。出苗后每盆保留长势相同的幼苗6株。分别在大豆V2和V3期测定根际土壤中AMF孢子、细菌、放线菌、真菌数量,根瘤数量,大豆根段AMF侵染率。

1.3 测定方法

根际土壤中细菌、放线菌、真菌数量测定采用平板菌落计数法,AMF孢子数的测定采用湿筛倾析法^[8];结瘤数采用计数法测定;大豆根段AMF侵染率采用Trouvelot等(1986)描述的Trypan blue染色法染色,采用网格交叉法测定^[9]。

1.4 统计方法

用DPS 3.0统计软件对每个处理取3次重复的平均值进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异有极显著性。

2 结果与分析

2.1 除草剂对根瘤菌和AMF的影响

由表1可见,在大豆V2期,4种除草剂处理的根瘤数均比对照高,氟磺胺草醚处理显著高于对照和其它处理;在V3期,4种除草剂处理的根瘤数均

表1 除草剂对根瘤菌、AMF的影响
Table 1 Effects of herbicides on Rhizobium, AMF

处理* Tr.	V2			V3		
	根瘤数(个/株) Nodule number	侵染率(%) Colonization	孢子数(个/g) Spore number	根瘤数(个/株) Nodule number	侵染率(%) Colonization	孢子数(个/g) Spore number
	2.6±0.5 b B	30.13±3.60 a A	121.7±15.0 a A	5.0±0.6 a A	20.83±8.04 a A	126.0±33.0 ab AB
	2.7±1.5 b B	12.28±4.43 b B	121.0±20.8 a A	2.3±0.9 b AB	9.44±2.68 bc AB	146.7±25.5 a A
	2.7±0.7 b B	11.11±6.79 b B	60.3±9.1 b B	1.7±0.6 b B	5.28±0.96 c B	64.7±20.4 c B
	6.8±1.1 a A	12.22±2.41 b B	66.7±10.5 b B	3.7±1.8 ab AB	7.22±1.73 bc AB	127.3±30.1 ab AB
	3.3±1.2 b B	25.83±5.77 a A	109.7±20.2 a A	2.8±0.5 b AB	14.72±5.55 ab B	85.7±11.5 bc AB

注:同一列中小写字母表示在Duncan's多重比较中5%水平下差异显著性,大写字母为1%水平下差异显著性,无字母表示差异不显著,下表同;*: I、II、III、IV、V处理分别代表对照、乙草胺、赛克、氟磺胺草醚、2,4-D丁酯,下表同。

Note: Different small letters and capital letters in each column followed means significant difference by the Duncan's method at $P < 0.05$ level and at $P < 0.01$ level, respectively, no letter means no significant difference. The same as below. *: , , , and represent five treatments of control, acetochlor, metribuzin, fomesafen, 2,4-D butylate, respectively. The same below.

比对照低, 乙草胺、赛克、2,4-D丁酯处理均显著低于对照和氟磺胺草醚处理, 各处理与V2期相比都有所下降, 4种除草剂中以氟磺胺草醚对大豆根瘤数影响最小。由此可见, 在本试验条件下, 4种除草剂虽然对V2期大豆结瘤没有抑制作用甚至有一定的促进作用, 但对V3期大豆结瘤有抑制作用。Zawoznik和Tomaro(2005)也已报道除草剂对大豆根瘤形成的不利影响^[10]。在大豆V2、V3期4种除草剂处理的大豆根段AMF侵染率均比对照低, 乙草胺、赛克、氟磺胺草醚处理的大豆根段AMF侵染率极显著低于对照和2,4-D丁酯处理, V3期它们显著低于对照和2,4-D丁酯处理, V3期各处理与V2时期相比也均有所下降, 其中以2,4-D丁酯影响最小。这说明4种除草剂对V3期大豆菌根形成的抑制没有解除反而增强, Vieira等(2007)也发现除草剂明显抑制丛枝菌根真菌侵染大豆^[11]。在V2期, 4种除草剂处理的大豆根际土壤中, AMF孢子数均比对照低, 赛克、氟磺胺草醚处理的AMF孢子数极显著低于对照、乙草胺和2,4-D丁酯处理; V3与V2期的大豆根际AMF孢子数相比, 除2,4-D丁酯处理下降外, 其它处理均有所提高, 其中氟磺胺草醚处理提高90.9%, 这可能是除草剂对土壤中AMF孢子形成的抑制V3比V2期有所降低, 也可能是由于除草剂造成的不利环境, 使AMF在土壤中提早形成孢子。

试验分析表明, 大豆菌根形成受除草剂影响比根瘤形成所受影响发生更早、程度更大、持续时间更长, 证明菌根是根瘤菌、AMF与大豆共生系统对除草剂较为敏感的一方, 这一结论与Vieira等(2007)的结论是一致的^[11]。

2.2 除草剂对大豆根际土壤微生物数量的影响
由表2可见, 在大豆V2、V3期, 除2,4-D丁酯处理细菌数量显著低于对照外, 其它除草剂处理均比对照低, 但差异不显著, V3比V2期略有下降, 由此可见除草剂对细菌数量有一定的抑制作用, 且持续时间较长。这与Ratcliff等人(2006)的研究结果一致^[12]。在V2、V3期, 除草剂处理的放线菌数量与对照差异均不显著, V2期均高于对照, 而V3期除乙草胺外, 其它处理均低于对照, 说明除草剂处理对放线菌的繁殖为先促进后抑制。V2期土壤真菌数量除2,4-D丁酯处理显著低于对照外, 其它处理均极显著低于对照, V3期除乙草胺处理真菌数量显著高于其它处理, 也大大高于V2期外, 其它处理差异均不显著, 均比对照略高, 这说明除草剂在V3期对土壤中真菌的抑制作用已消失, 还表现了不同程度的促进作用。陈立杰等(1999)研究也发现, 乙草胺在施用10 d左右时间内, 能够明显地抑制土壤中一些真菌的相对数量发生, 施用后期, 抑制作用渐渐消失, 有的甚至表现出刺激作用^[13]。

表2 除草剂对大豆根际土壤微生物数量的影响 (单位: CFU/g DW)						
Table 2 Effects of herbicides on microbe number in the soybean rhizosphere (Unit: CFU/g DW)						
处理 Treatment	V2			V3		
	细菌($\times 10^7$) Bacteria number	真菌($\times 10^4$) Fungi number	放线菌($\times 10^6$) Actinomyces number	细菌($\times 10^7$) Bacteria number	真菌($\times 10^4$) Fungi number	放线菌($\times 10^6$) Actinomyces number
	3.45 \pm 0.27 a	10.14 \pm 0.47 a A	2.07 \pm 0.53	2.56 \pm 1.08 a	4.30 \pm 0.30 b	1.95 \pm 0.73
	2.16 \pm 0.25 ab	3.18 \pm 1.21 c B	2.22 \pm 0.35	2.42 \pm 0.59 a	12.09 \pm 5.61 a	1.98 \pm 0.16
	3.34 \pm 0.99 a	3.20 \pm 0.99 c B	2.91 \pm 0.65	1.94 \pm 0.37 ab	5.56 \pm 2.02 b	1.59 \pm 0.76
	2.12 \pm 0.95 ab	3.11 \pm 0.46 c B	2.35 \pm 0.33	1.95 \pm 0.02 ab	5.77 \pm 2.40 b	1.34 \pm 0.96
	1.70 \pm 0.87 b	6.69 \pm 3.39 b AB	2.17 \pm 0.15	1.14 \pm 0.36 b	4.98 \pm 3.10 b	1.35 \pm 0.92

3 讨论

根瘤菌的存活以及根瘤的形成对土壤微生态环境十分敏感^[14]。Eberbach等(1989)认为除草剂可能是通过影响土壤中的细菌数量来影响共生固氮系统, 也就是说除草剂的使用可能促使土壤中细菌数量减少, 进一步影响根瘤菌结瘤数的下降^[15]。但我们的试验结果与这一结论并不完全一致。比较V2与V3

两个时期大豆的根瘤数和土壤中细菌数量, 发现赛克处理V3期土壤中细菌数比V2期减少了41.9%, 其根瘤数也降低了37.0%, 这与Eberbach等的分析一致, 但V2期4种除草剂处理的土壤细菌数量均低于对照, 但此时结瘤数却有所增加, 乙草胺处理V3期土壤中细菌数比V2期增加了12.0%, 而其根瘤数却降低了14.8%。这说明根瘤数量对受除草剂影响的土壤细菌数量的响应, 因除草剂不同和大豆发育

时期不同而存在差异。

比较V2 时期大豆的AMF侵染率和土壤中真菌数量,发现乙草胺、赛克、氟磺胺草醚处理极显著降低真菌数量,也显著降低AMF侵染率,而赛克、氟磺胺草醚处理V2 期还显著降低了AMF孢子数,董昌金等(2004)研究还表明施用大豆除草剂会显著降低土壤中真菌菌丝的总量^[16],说明除草剂对土壤中的真菌数量负面影响可能是抑制AMF与大豆形成共生体的重要因素,除草剂通过影响土壤真菌数量而抑制菌根形成的可能原因有2个:1)这两种除草剂对孢子的萌发没有抑制作用或有促进作用,而对孢子萌发形成的菌丝的延伸和菌丝对大豆根系的侵染有抑制作用;2)除草剂对AMF菌丝形成孢子有抑制作用。

Hirsch等(1998)从分子细胞生物学的角度比较了AMF与豆科植物共生和根瘤菌与豆科植物共生之间信号传导途径的异同,推断菌根形成与根瘤形成和固氮在信号传导途径上有着密切的联系^[17]。根瘤菌可以感知由AM 真菌所分泌的信号分子的存在,且接种 AM真菌的植株根瘤数要多于不接种 AM真菌处理^[18]。本研究发现大豆菌根形成在V2、V3期均受除草剂严重抑制,在V3期除草剂对土壤真菌的促生作用并未改善AMF与大豆的共生关系,根瘤数在V3期也普遍显著下降,由此可推测,除草剂导致大豆根瘤数量下降除了可能由其降低土壤细菌数量引起外,还可能与其降低土壤真菌的数量而导致侵染率下降有关,也就是说除草剂通过影响土壤真菌数量而对菌根形成产生的抑制可能会进一步导致根瘤形成受到抑制。

除草剂杀草机理不同,对根瘤菌、AMF与大豆共生系统的影响程度不同,影响机制也可能不同,这种影响常常是多方面的,除由土壤微生物被抑制造成外,根系发育、植株干物质积累(将另文发表)甚至AMF共生与根瘤菌共生之间信号传导等被抑制也会使得根瘤菌、AMF与大豆共生系统受到影响,它们之间还可能还存在交互作用。本试验结果仅是在盆栽和除草剂采用常规用量条件下,研究苗期大豆得到的,土壤微生物和大豆根瘤和菌根形成受除草剂影响的进一步发展趋势还需要更深入的研究。

参 考 文 献

[1] 陈昌斌,戴小密,俞冠翘,等. 组成型 *nifA* 对大豆根瘤菌(*Rhizobium fredii*)HN01*lux* 结瘤固氮效率的促进作用.

科学通报, 1999, 44(5): 529-533.

- [2] Brundrett MC. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol*, 2002, 154: 275-304.
- [3] 赵之伟. 菌根真菌在陆地生态系统中的作用. 生物多样性, 1999, 7(3): 240-244.
- [4] Augé RM. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, 2001, 11: 3-42.
- [5] Jia YS, Gray VM, Straker CJ. The influence of rhizobium and arbuscular mycorrhizal fungi on nitrogen and phosphorus accumulation by *Vicia faba*. *Annals of botany*, 2004, 94: 251-258.
- [6] 都首民,刘胜波,刘绍艳. 大豆田化学除草土壤封闭技术. 大豆通报, 2004, 4: 8.
- [7] 于立河,李金峰,郑桂萍. 粮食作物栽培学. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2001, p.284.
- [8] Daniels BA, Skipper HD. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. St. Paul: The American Phytopathology Society Press, 1982, pp.29-35.
- [9] Phillip JM, Hayman DS. Improved procedures for cleaning and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 1970, 55: 158-161.
- [10] Zawoznik MS, Tomaro ML. Effect of chlorimuron-ethyl on *Bradyrhizobium japonicum* and its symbiosis with soybean. *Pest Manag Sci*, 2005, 61: 1003-1008.
- [11] Vieira RF, Silva MS, Silveira APD. Soil microbial biomass C and symbiotic processes associated with soybean after sulfentrazone herbicide application. *Plant Soil*, 2007, 300: 95-103.
- [12] Ratcliff AW, Busse MD, Shestak CJ. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology*, 2006, 34: 114-124.
- [13] 陈立杰,刘惕若,李海燕,等. 除草剂对大豆幼苗根腐病及其土壤微生物的影响. 大豆科学, 1999, 18(2): 115-119.
- [14] 张学贤,农 广,张忠明,等. 根瘤菌与豆科植物之间的“分子对话”. 生物技术通报, 1995, 3: 7-9.
- [15] Eberbach PC, Douglas LA. Herbicide effects on the growth and nodulation potential of *Rhizobium trifolii* with *Trifolium subterraneum* L. *Plant and Soil*, 1989, 119: 15-23.
- [16] 董昌金,赵 斌. 大豆除草剂对2种丛枝菌根的影响. 植物病理学报, 2004, 34(6): 518-524.
- [17] Hirsch AM, Kapulnik Y. Signal transduction pathways in mycorrhizal associations: Comparisons with the Rhizobium-legume symbiosis. *Fungal Genetics and Biology*, 1998, 23(3): 205-212.
- [18] Oldroyd GED. Nodules and Hormones. *Plant science*, 2007, 315: 52-53.