

DOI: 10.5846/stxb201609051806

胡从从, 成斌, 王坤, 赵丽莉, 贺学礼. 蒙古沙冬青及其伴生植物 AM 真菌物种多样性. 生态学报, 2017, 37(23): 7972-7982.

Hu C C, Cheng B, Wang K, Zhao L L, He X L. Species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizospheres of *Ammopiptanthus mongolicus*-associated plants. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(23): 7972-7982.

蒙古沙冬青及其伴生植物 AM 真菌物种多样性

胡从从, 成斌, 王坤, 赵丽莉, 贺学礼*

河北大学生命科学学院, 保定 071002

摘要:于 2015 年 7 月在内蒙古乌海、磴口 2 个样地选取蒙古沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)及其伴生植物为研究对象, 分别采集 0—20 cm 和 20—40 cm 土层根围土样, 利用高通量测序方法分析了不同植物 AM 真菌群落结构和物种多样性, 发掘新物种, 为补充和完善 AM 真菌分类体系提供依据。试验共分离鉴定 3 纲 5 目 6 科 9 属 89 个 AM 真菌 OTU, 属包括 *Glomus*, *Funneliformis*, *Diversispora*, *Claroideoglossum*, *Rhizophagus*, *Septoglossum*, *Scutellospora*, *Ambispora* 和 *Paraglossum*。与形态学研究结果相比, 高通量鉴定结果在属水平上更丰富。同一土层不同样地, 蒙古沙冬青 AM 真菌丰度和多样性指数高于伴生植物; 同一土层不同植物, AM 真菌丰度和多样性指数表现为磴口高于乌海; 同一植物不同样地, AM 真菌 ACE 指数和 Chao1 指数 20—40 cm 土层高于 0—20 cm 土层, Simpson 指数和 Shannon 指数 0—20 cm 土层高于 20—40 cm 土层。RDA 分析表明, AM 真菌 ACE 指数和 Chao1 指数与土壤碱解 N 显著正相关, 与酸性磷酸酶显著负相关; Simpson 指数和 Shannon 指数与碱性磷酸酶显著正相关, 与 pH 显著负相关。结果表明, 蒙古沙冬青 AM 真菌物种多样性高于伴生植物, 同一样地, 寄主植物与土壤深度共同作用对 AM 真菌群落组成有显著影响。

关键词:蒙古沙冬青; 伴生植物; AM 真菌; 高通量测序; 群落组成

Species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizospheres of *Ammopiptanthus mongolicus*-associated plants

HU Congcong, CHENG Bin, WANG Kun, ZHAO Lili, HE Xueli*

College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China

Abstract: *Ammopiptanthus mongolicus* is an endangered broadleaf leguminous plant found in the desert ecosystem of northwest China, and it is also an excellent sand fixation plant. *Zygophyllum xanthoxylum*, *Tetraena mongolica*, *Nitraria tangutorum* and *Artemisia desertorum* are plants that associated with *A. mongolicus*. These plants undergo competition inhibition and cooperative evolution, and are ideal for improving desert areas and preventing desertification. Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi can form symbioses with most terrestrial plant roots, and play an important role in improving plant growth and maintaining ecosystem stability. In order to discover new species and complement and improve the classification system of AM fungi, we used high-throughput sequencing to study species composition and the ecological distribution of AM fungi in the rhizosphere of *Ammopiptanthus mongolicus* and associated plants. Eighty-nine operational taxonomic units of AM fungi belonging to 5 classes, 3 orders, 6 families, and 9 genera including *Glomus*, *Funneliformis*, *Diversispora*, *Claroideoglossum*, *Rhizophagus*, *Septoglossum*, *Scutellospora*, *Ambispora*, and *Paraglossum* were identified. With regard to quantification at the genus level, high throughput sequencing was more sensitive than morphological evaluation. *Ammopiptanthus mongolicus* had a greater richness and diversity index than other associated plants. The ACE and Chao1

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31170488, 31270460)

收稿日期: 2016-09-05; 修订日期: 2017-03-13

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xlh3615@126.com

indices of AM fungi were higher in the 20—40 cm soil layer than in the 0—20 cm layer. However, the Simpson and Shannon indices were higher in the 0—20 cm layer. AM fungal abundance and diversity index were higher in Dengkou site than in Wuhai site. Redundancy analysis showed that the ACE and Chao1 indices of AM fungi were significantly positively correlated with soil-available N, but negatively correlated with acid phosphatase. Simpson and Shannon indices were significantly positively correlated with alkaline phosphatase, and significantly negatively correlated with pH. Together, these data show that the species diversity of AM fungi was higher in *Ammopiptanthus mongolicus* than in its associated plants. Furthermore, they reveal that interactions of host plant and soil depth had a significant effect on the community composition of AM fungi.

Key Words: *Ammopiptanthus mongolicus*; associated plants; arbuscular mycorrhizal fungi; high-throughput sequencing; community composition

蒙古沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)隶属豆科沙冬青属,是西北荒漠生境中唯一常绿阔叶灌木,耐干旱、抗逆性强,在保持水土和防治荒漠化方面作用显著^[1]。与蒙古沙冬青相伴而生的霸王(*Zygophyllum xanthoxylum*)、四合木(*Tetraena mongolica*)、白刺(*Nitraria tangutorum*)、沙蒿(*Artemisia destororum*)等,同蒙古沙冬青既存在竞争抑制,又协同进化,均为优良固沙植物^[2]。

荒漠生境中植物与微生物的生长、分布及其相互作用对生态系统改善和稳定有重要影响。AM (arbuscular mycorrhiza) 真菌是一类在自然界广泛分布的土壤真菌,能与绝大多数高等植物根系形成互利共生体,通过根外菌丝形成的网络增强植物根系对土壤养分资源的吸收利用,提高植物生产力^[3]。研究发现,AM 真菌能够提高植物在干旱、重金属污染、病虫害等逆境下的抗性^[4-5]。因此,探明 AM 真菌群落组成和生物多样性以及荒漠植物共生理,对促进植物适应极端干旱环境,稳定和改善荒漠生态系统有重要意义。

迄今为止,荒漠环境中共发现 9 属 107 种 AM 真菌,并不断有新种报道和已知种类分类地位的重新认识^[6-7]。目前,主要依据孢子形态特征进行 AM 真菌分类鉴定,研究结果存在偶然性、局限性和不一致性^[8-9]。由于广域的地理环境和生态差异,不仅导致 AM 真菌种群强烈分化,也导致了种间和种内的形态多态性与环境胁迫作用下的性状变异难以区分,要解决这一问题,对 AM 真菌分子特征、微形态特征等方面的工作将会起到重要作用。Luke 等^[10]利用 T-RFLP 技术分析表明,种植模式对土壤 AM 真菌多样性有明显影响。Öpik 等^[11-12]利用 DNA 条形码技术对 96 种植物根际 AM 真菌进行鉴定,在分子水平上至少发现了 204 种,远超出形态学鉴定的 156 种 AM 真菌。近年来,新一代高通量测序技术因其测序量大、通量高,不仅可检测到极微量 AM 真菌序列,而且研究结果更接近微生物真实的群落结构,被广泛应用于 AM 真菌群落结构和物种组成分析^[13-14]。

本试验在前期基于形态学特征对蒙古沙冬青及其伴生植物 AM 真菌分类鉴定的基础上^[15],利用高通量测序技术进一步分析检测土壤 AM 真菌种属结构和生态分布,发掘新的物种和信息,补充完善 AM 真菌群落组成和物种多样性,为阐明蒙古沙冬青适应极端荒漠环境机理,利用 AM 真菌资源促进荒漠植物生长和植被恢复提供依据。

1 材料与方法

1.1 样地概况及样品处理

2015 年 7 月于内蒙古乌海、磴口各选取以蒙古沙冬青为建群种的 3 个样地,每个样地随机选取长势相似的蒙古沙冬青和两种伴生植物各 4 株,其中乌海样地伴生植物为霸王(*Zygophyllum xanthoxylum*)、四合木(*Tetraena mongolica*),磴口样地为沙蒿(*Artemisia destororum*)、白刺(*Nitraria tangutorum*)。去除土壤表面枯枝落叶层,在距植株主干 0—30 cm 范围内挖取土壤剖面,分别采集 0—20 cm 和 20—40 cm 土层新鲜土壤各 500 g,将同一样地 4 株植物按土层混合均匀,3 个样地作为重复,共计 36 个土壤样品,分别标记为 SWL (沙冬青

乌海 0—20 cm), SWD (沙冬青乌海 20—40 cm), BWL (霸王乌海 0—20 cm), BWD (霸王乌海 20—40 cm), HWL (四合木乌海 0—20 cm), HWD (四合木乌海 20—40 cm), SDL (沙冬青磴口 0—20 cm), SDD (沙冬青磴口 20—40 cm), BDL (白刺磴口 0—20 cm), BDD (白刺磴口 20—40 cm), HDL (沙蒿磴口 0—20 cm), HDD (沙蒿磴口 20—40 cm), 将土样编号装入自封袋运回实验室后, 用于土壤总 DNA 提取的土样在 -20℃ 保存, 其余土样自然风干后过 2 mm 筛, 用于土壤理化性质测定。样地具体情况见表 1。

表 1 内蒙古荒漠带各采样点概况

Table 1 Sampling sites in Inner Mongolia desert zone

样地 Sample site	经纬度 Longitude/Latitude	海拔 Elevation/m	样地 Sample site	经纬度 Longitude/Latitude	海拔 Elevation/m
乌海 Site1	39°83' N106°83'E	1129.45 m	磴口 Site1	40°39' N106°74'E	1002.99 m
Site2	39°73' N 106°87'E	1109.85 m	Site2	40°47' N 106°43'E	1006.47 m
Site3	39°73' N106°81'E	1141.35 m	Site3	40°48' N 106°38'E	1002.18 m

1.2 土壤理化性质测定

土壤有机碳用马弗炉烘干法; 土壤 pH 用电位法; 土壤速效 P 用钼锑抗比色法; 碱解 N 采用碱解法利用全自动化学分析仪 Smartchem200 测定; 酸性磷酸酶 (ACP) 和碱性磷酸酶 (ALP) 用改进的 Brimner 和 Tabatabai 方法^[16]测定。球囊霉素分易提取球囊霉素 (Easy-extracted glomalin, EEG) 和总球囊霉素 (Total extractable glomalin, TEG), 分别按 Wright 和 Vpadhyaya^[17] 及 Janos 等^[18] 的方法测定, 称取 1.0 g 风干土于试管中, 加入柠檬酸钠浸提剂, 通过高压浸提、再提取上清液离心、用考马斯亮蓝显色, 绘制标准曲线, 求出球囊霉素含量。所得数据由 Excel 2003 统计整理, 利用 CANOCO 4.5 软件进行 RDA 分析。

1.3 土壤总 DNA 提取、PCR 扩增及产物回收

采用已修改的 Bead-Beating 法^[19] 提取土壤总 DNA, 用 TE 缓冲液溶解提取的 DNA, 置于 -20℃ 冰箱待用。

基于 HiSeq 测序对基因片段的限制 (300 bp 以内) 以及真实客观反应 AM 真菌群落结构和丰富多样性的要求, 第一轮扩增以土壤总 DNA 为扩增模板, 引物为 GeoA2 (5'-CCA GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3') 和 AML2 (5'-GAA CCC AAA CAC TTT GGT TTC C-3'), 扩增片段为 1000 bp 左右。以第一轮扩增产物为模板, 使用带 Barcode 的特异引物 NS31 (5'-TTG GAG GGC AAG TCT GGT GCC-3') 和 AMDGR (5'-CCC AAC TAT CCC TAT TAA TCA T-3') 进行第二轮 PCR, 扩增片段为 280—300 bp。根据 PCR 产物浓度进行等量混样, 利用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 切割目的条带, 使用凝胶回收试剂盒回收目标产物。

1.4 构建文库与测序

使用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建, 构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量, 文库合格后, 使用 HiSeq2500 PE250 进行上机测序, 每个样品至少测 3 万条序列^[20]。

1.5 数据处理与多样性指数测定

根据 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列拆分出各样品数据, 截去 Barcode 和引物序列后使用 FLASH 对每个样品的 reads 进行拼接得到原始 Tags 数据 (Raw Tags), 再经过滤处理得到高质量 Tags 数据 (Clean Tags)。参照 Qiime 的 Tags 质量控制流程, 将 Raw Tags 从连续低质量值 (默认质量阈值为 ≤19) 碱基数达到设定长度 (默认长度值为 3) 的第一个低质量碱基位点截断; 得到 Tags 数据集, 进一步过滤掉其中连续高质量碱基长度小于 Tags 长度 75% 的 Tags。

利用 Uparse 软件对全部 Effective Tags 进行聚类, 默认以 97% 的一致性 (Identity) 将序列聚类成 OTUs, 同时依据其算法原则, 筛选 OTUs 中出现频数最高的序列作为 OTUs 的代表序列。应用 RDP Classifier 方法和 GenBank 数据库对序列进行物种注释分析 (设定阈值为 0.6—1), 并在属水平统计各样品群落组成。使用 MUSCLE 软件进行快速多序列比对, 得到所有 OTUs 代表序列的系统发生关系。最后对各样品数据进行均一化处理, 以样品中数据量最少的为标准进行均一化处理, 用 Qiime 软件计算 Chao1, ACE 指数, Shannon 和

Simpson, 用 SPSS 19.0 进行相关性分析, 用 R 软件 (vegan package) 绘制稀释曲线, 进行 Alpha 多样性指数组间差异分析与 PERMANOVA 分析。用 R 软件 (vegan package) 绘制 NMDS 图, 进行 Beta 多样性指数组间差异分析。Chao1 指数^[21-22] (S), ACE 指数 (EH), Shannon 指数 (H) 和 Simpson 指数 (D) 公式计算:

$$S_{\text{chao1}} = S_{\text{obs}} + N_1(N_1 - 1) / 2(N_2 + 1)$$

其中 S_{chao1} 为估计的 OTU 数, S_{obs} 为观测到的 OTU 数, N_1 为 singletons 序列的 OTU 数, N_2 为 doubletons 序列的 OTU 数。

$$EH = H / H_{\text{max}} = H / \ln S$$

$$H = \ln P_i$$

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2$$

式中, $P_i = N_i / N$ 即表示第 i 种 AM 真菌的优势度。

2 结果

2.1 土壤理化性质

由图 1 可知, 乌海样地, 蒙古沙冬青根围土壤 pH、有机质、EEG 和 ACP 含量在 0—20 cm 土层较高, 速效 P、TEG、ALP 和碱解 N 在 20—40 cm 土层含量较高; 霸王各项土壤因子除有机质外都在 0—20 cm 土层有最大值; 四合木各土壤因子除 pH 和有机质外都在 0—20 cm 土层有最大值。同一土层, 蒙古沙冬青 pH、有机质和碱解 N 均高于伴生植物, 而速效 P、ACP 和 ALP 含量低于伴生植物。

磴口样地, 蒙古沙冬青根围土壤 pH、EEG 和 TEG 最大值在 0—20 cm 土层, 有机质、速效 P、ACP、ALP 和碱解 N 在 20—40 cm 土层含量较高; 白刺各土壤因子除 pH 和 TEG 外, 均在 0—20 cm 土层有最大值; 沙蒿除 pH 外各因子均在 0—20 cm 土层含量较高。同一土层, 蒙古沙冬青有机质、速效 P、EEG 和 ALP 含量均高于伴生植物, 而 pH、ACP 和碱解 N 低于伴生植物。同一植物不同样地, 蒙古沙冬青有机质、EEG、ACP 和碱解 N 在乌海高于磴口, pH、速效 P、TEG 和 ALP 在磴口高于乌海; 伴生植物除 pH 和 TEG 外各土壤因子均在乌海含量较高。

2.2 序列统计分析

所有样品经 PCR 检测合格后, 构建文库并测序。由表 2 可知, 本试验共获得 1885864 条原始序列, 去

表 2 不同土壤样品序列特征

Table 2 Sequence characteristics of different soil samples

样品编号 Sample No.	平均序列长度 Average length (bp)	碱基对数 Bases (bp)	优化序列数 Trimed sequences	优化序列百分比/% The percentage of trimed sequences	样品编号 Sample No.	平均序列长度 Average length (bp)	碱基对数 Bases (bp)	优化序列数 Trimed sequences	优化序列百分比/% The percentage of trimed sequences
SWL	292	13916364	47599	95.11	SDL	292	13514479	46233	94.85
SWD	292	17864379	61107	95.06	SDD	292	16306370	55781	95.07
BWL	292	13491625	46157	95.07	BDL	292	11902378	40708	94.74
BWD	292	16386567	56063	95.14	BDD	292	15453572	52857	94.73
HWL	292	13702314	46890	94.91	HDL	292	10926711	37377	94.58
HWD	292	15026701	51409	95.19	HDD	292	16000055	54724	94.88

SWL: 沙冬青乌海 0—20cm, *Ammopiptanthus mongolicus* in the Wuhai 0—20 cm soil layer; SWD: 沙冬青乌海 20—40cm, *Ammopiptanthus mongolicus* in the Wuhai 20—40 cm soil layer; BWL: 霸王乌海 0—20cm, *Zygophyllum xanthoxylum* in the Wuhai 0—20 cm soil layer; BWD: 霸王乌海 20—40cm, *Zygophyllum xanthoxylum* in the Wuhai 20—40 cm soil layer; HWL: 四合木乌海 0—20cm, *Tetraena mongolica* in the Wuhai 0—20 cm soil layer; HWD: 四合木乌海 20—40cm, *Tetraena mongolica* in the Wuhai 20—40 cm soil layer; SDL: 沙冬青磴口 0—20cm, *Ammopiptanthus mongolicus* in the Dengkou 0—20 cm soil layer; SDD: 沙冬青磴口 20—40cm, *Ammopiptanthus mongolicus* in the Dengkou 20—40 cm soil layer; BDL: 白刺磴口 0—20cm, *Nitraria tangutorum* in the Dengkou 0—20 cm soil layer; BDD: 白刺磴口 20—40cm, *Nitraria tangutorum* in the Dengkou 20—40 cm soil layer; HDL: 沙蒿磴口 0—20cm, *Artemisia destierorum* in the Dengkou 0—20 cm soil layer; HDD: 沙蒿磴口 20—40cm, *Artemisia destierorum* in the Dengkou 20—40 cm soil layer

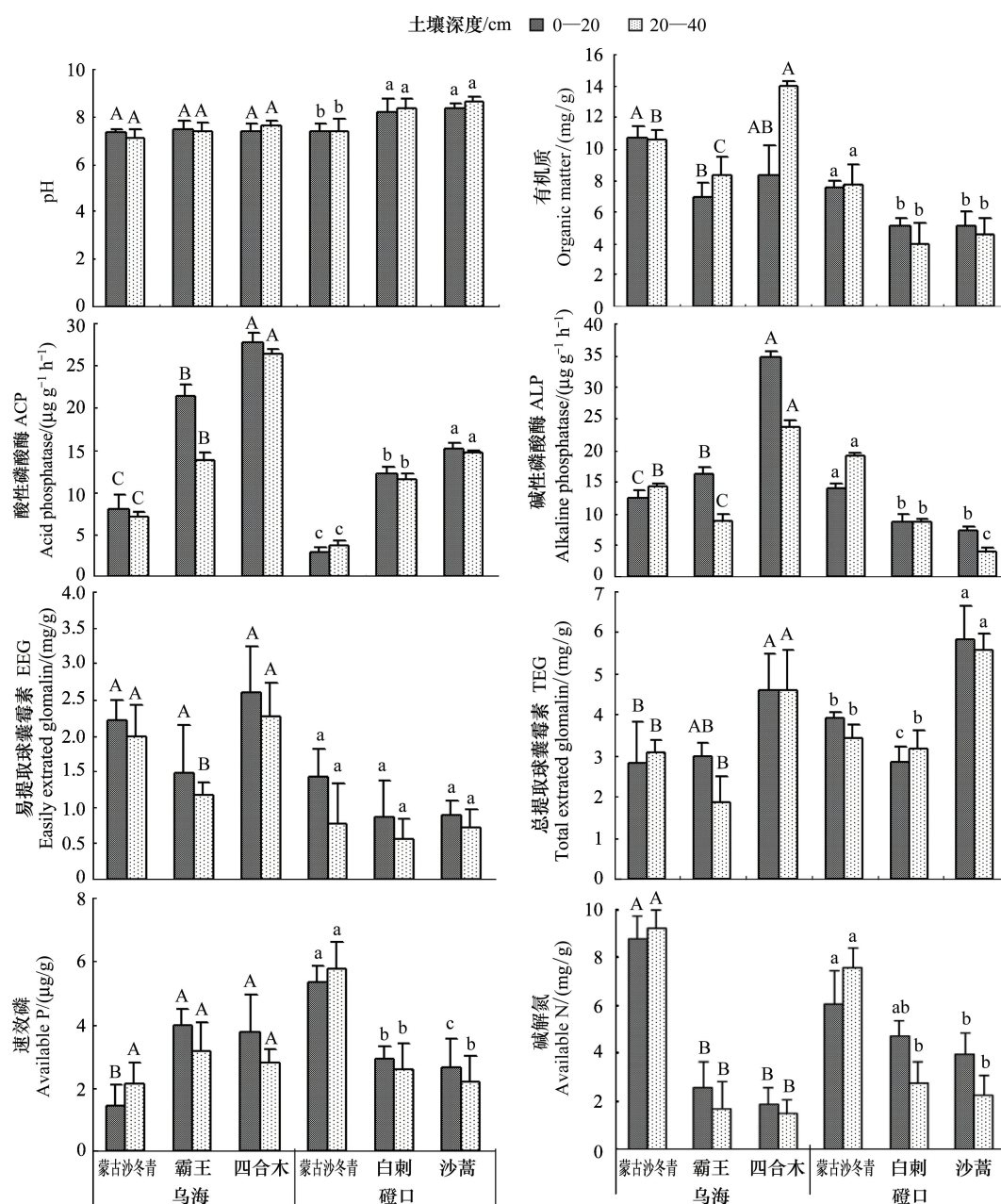


图1 蒙古沙冬青和伴生植物土壤因子空间分布

Fig.1 Spatial distribution of soil factor in *A. mongolicus* and associated plants

不同大写字母表示乌海样地同一土层3种植物差异显著 ($P < 0.05$); 不同小写字母表示磴口样地同一土层3种植物差异显著 ($P < 0.05$); ALP: 碱性磷酸酶, alkaline phosphatase; ACP: 酸性磷酸酶, acid phosphatase; EEG: 易提取球囊霉素 Easily extrated glomalin; TEG: 总提取球囊霉素, Total extrated glomalin.

掉低质量的 Reads 后得到 1790731 条高质量序列, 平均每个样品测得 49742 条优化序列, 每个样品的优化序列百分比均在 94% 以上, 所有样品读长平均为 292 bp。不同样品优化序列数差异明显。同一土层, 蒙古沙冬青土样中高质量序列多于伴生植物; 同一植物, 20—40 cm 土层样品高质量序列多于 0—20 cm 土层。

2.3 稀释曲线分析

稀释曲线能检测测序数据量的合理性, 并反映样品物种丰富度。水平方向上, 曲线的宽度反映了物种的丰富度; 垂直方向上, 曲线的平滑程度体现了样品物种的均匀度。从图 2 可见, 供试样品的稀释曲线均趋于平缓, 说明测序量趋于饱和, 测得数据可反映土壤 AM 真菌群落真实情况。在水平方向曲线较宽, 垂直方向平滑

程度较小,说明 AM 真菌的丰度大,但物种的均匀度低。

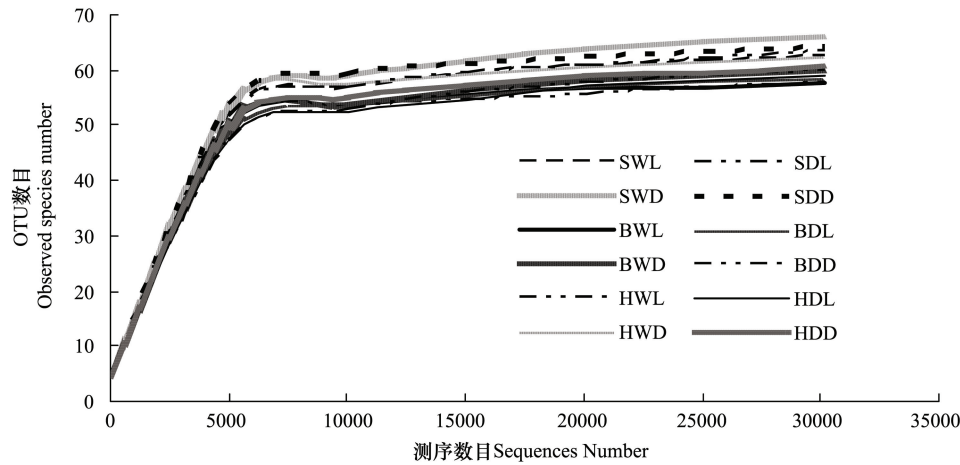


图 2 AM 真菌稀释性曲线

Fig.2 Rarefaction curves of AM fungi in soil samples

SWL: 沙冬青乌海 0—20cm, *Ammopiptanthus mongolicus* in the Wuhai 0—20 cm soil layer; SWD: 沙冬青乌海 20—40cm, *Ammopiptanthus mongolicus* in the Wuhai 20—40 cm soil layer; BWL: 霸王乌海 0—20cm, *Zygophyllum xanthoxylum* in the Wuhai 0—20 cm soil layer; BWD: 霸王乌海 20—40cm, *Zygophyllum xanthoxylum* in the Wuhai 20—40 cm soil layer; HWL: 四合木乌海 0—20cm, *Tetraena mongolica* in the Wuhai 0—20 cm soil layer; HWD: 四合木乌海 20—40cm, *Tetraena mongolica* in the Wuhai 20—40 cm soil layer; SDL: 沙冬青磴口 0—20cm, *Ammopiptanthus mongolicus* in the Dengkou 0—20 cm soil layer; SDD: 沙冬青磴口 20—40cm, *Ammopiptanthus mongolicus* in the Dengkou 20—40 cm soil layer; BDL: 白刺磴口 0—20cm, *Nitraria tangutorum* in the Dengkou 0—20 cm soil layer; BDD: 白刺磴口 20—40cm, *Nitraria tangutorum* in the Dengkou 20—40 cm soil layer; HDL: 沙蒿磴口 0—20cm, *Artemisia desteurorum* in the Dengkou 0—20 cm soil layer; HDD: 沙蒿磴口 20—40cm, *Artemisia desteurorum* in the Dengkou 20—40 cm soil layer

2.4 OTU 聚类及物种注释分析

从两个样地 36 个土样中共获得 89 个 AM 真菌 OTUs,经序列比对,89 个真菌 OTUs 归为 3 纲 5 目 6 科 9 属(表 3)。其中 36 个 OTUs 属于 *Glomus*, 16 个属于 *Funneliformis*, 16 个属于 *Diversispora*, 最低的为

表 3 AM 真菌属种组成统计
Table 3 Statistics of AM fungi

纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	OTU 数 The number of OTUs
球囊霉纲 Glomeromycetes	球囊霉目 Glomerales	球囊霉目 Glomeraceae	球囊霉属 <i>Glomus</i>	36
			管柄囊霉属 <i>Funneliformis</i>	16
			根内囊霉属 <i>Rhizophagus</i>	3
			有隔囊霉属 <i>Septoglomus</i>	1
			近明球囊霉属 <i>Claroideoglomus</i>	3
			多孢囊霉属 <i>Diversispora</i>	16
			盾巨孢囊霉属 <i>Scutellospora</i>	1
原囊霉纲 Archaeosporomycetes	类球囊霉目 Archaeosporales	多孢囊霉目 Diversisporales	盾巨孢囊霉科 Scutellosporaceae	1
			类球囊霉科 Ambisporaceae	1
类球囊霉纲 Paraglomeromycetes	类球囊霉目 Paraglomerales	类球囊霉科 Paraglomeraceae	类球囊霉属 <i>Paraglomus</i>	4

Septoglomus, *Scutellospora* 和 *Ambispora*, 各有 1 个 OTU。图 3 展示了样品中相对丰度排名前 10 的 AM 真菌所对应 OTUs 的系统发生关系, 说明 AM 真菌主要分布在 *Glomus*, *Funneliformis*, *Diversispora*, *Rhizophagus*, *Septoglomus*, *Scutellospora* 和 *Paraglomus* 7 个属。将已比对序列按属分类水平进行统计分析(图 4)可知, 供试样品中 AM 真菌种属组成相似, 但每个样品中各属相对丰度差异显著。*Diversispora* 相对丰度最高, 是所有样品的优势属, 其次是 *Glomus* 和 *Funneliformis*, 3 属之和在所有土样中均占到 AM 真菌总量 90% 以上。*Claroidoglomus*, *Rhizophagus*, *Septoglomus* 和 *Paraglomus* 在每个土样中均有分布, *Ambispora* 仅在蒙古沙冬青、四合木和沙蒿深土层有发现, 而 *Scutellospora* 未在沙蒿根围土样中检测到。

2.5 α—多样性分析

α—多样性可用于 AM 真菌群落丰富度分析, 多样性指标包括均匀度指数 ACE、丰度指数 Chao1、多样性指数 Simpson 和 Shannon。由表 4 可知, 同一土层, 除乌海样地 20—40 cm 土层白刺较蒙古沙冬青 AM 真菌丰度高外, 蒙古沙冬青 AM 真菌 ACE 指数和 Chao1 指数均显著高于伴生植物; 乌海样地蒙古沙冬青 AM 真菌 Simpson 指数和 Shannon 指数均低于伴生植物, 磴口样地蒙古沙冬青 AM 真菌 Simpson 指数和 Shannon 指数均显著高于伴生植物。同一植物, 深土层 ACE 指数和 Chao1 较浅土层高, Simpson 指数和 Shannon 指数浅土层高于深土层; 样地间总体呈现磴口>乌海。

2.6 多样品比较分析

PERMANOVA 分析可得, AM 真菌群落组成(Bray-Curtis 距离) 在样地及寄主植物与土壤深度共同作用下差异显著(表 5)。基于 OTU 水平的无度量多维标定法(NMDS, Non-Metric Multi-Dimensional Scaling) 统计分析结果(图 5), 四合木浅土层、沙蒿深土层和磴口样地蒙古沙冬青浅土层样品组内和组间差异显著; 其他土壤样品相似度较高, 无明显差异。

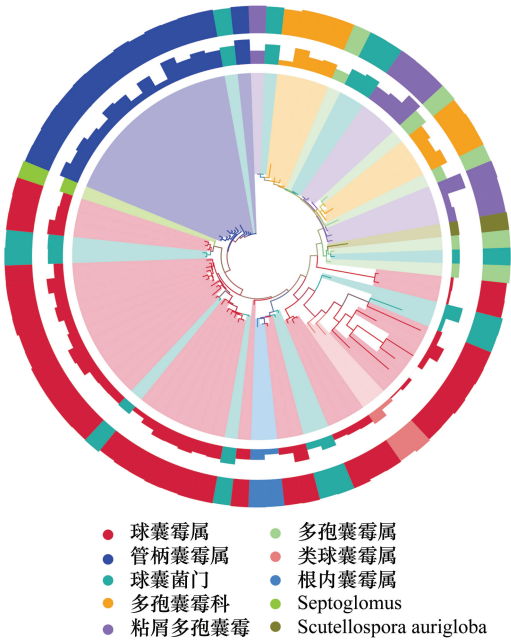


图 3 OTUs 的系统发育关系及其物种注释

Fig.3 Phylogenetic relationship and species annotation of OTUs

表 4 AM 真菌多样性分析
Table 4 Diversity analysis of AM fungi

样品编号 Samples	物种丰度和多样性指数 Species richness and diversity index			
	ACE 指数 ACE Index	Chao 1 指数 Chao 1 Index	Simpson 指数 Simpson Index	Shannon 指数 Shannon Index
SWL	65.192A	65.125A	0.690A	2.657A
BWL	59.211B	58.167C	0.692A	2.671A
HWL	61.459B	61.417B	0.708A	2.793A
SWD	68.554A	67.369B	0.685A	2.608A
BWD	63.555B	70.222A	0.686A	2.627A
HWD	63.565B	62.876C	0.693A	2.685A
SDL	69.716a	75.444a	0.699a	2.734a
BDL	60.946b	60.417c	0.675a	2.555a
HDL	62.566b	64.233b	0.688a	2.644a
SDD	66.922a	67.667a	0.689a	2.651a
BDD	62.786b	61.548b	0.668b	2.498b
HDD	63.230b	62.500b	0.685a	2.608a

不同大写字母表示乌海样地同一土层 3 种植物差异显著 ($P < 0.05$); 不同小写字母表示磴口样地同一土层 3 种植物差异显著 ($P < 0.05$)

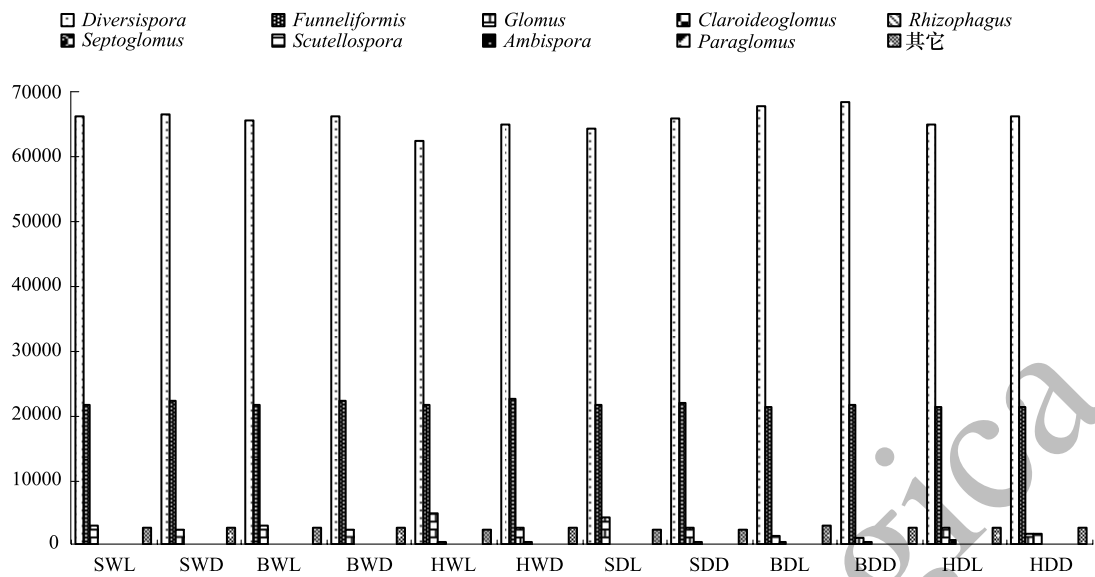


图 4 AM 真菌各属相对丰度

Fig.4 Relative abundance of AM fungi at genera levels

Diversispora 多孢囊霉属, Funneliformis 管柄囊霉属, Claroideoglomus 近明球囊霉属, Rhizophagus 根内囊霉属, Septoglomus 有隔囊霉属, Scutellospora 盾巨孢囊霉属, Paraglomus 类球囊霉属, others 其它

表 5 基于 Bray-Curtis 距离的 AM 真菌群落 PERMANOVA 分析

Table 5 PERMANOVA analysis of AM fungal community based on Bray-Curtis distance

因子 Factor	<i>F</i>	<i>R</i> ²	<i>P</i>	因子 Factor	<i>F</i>	<i>R</i> ²	<i>P</i>
植物 Plant	1.4086	0.0635	0.202	植物×土壤深度 Plant×Depth	3.6607	0.1651	0.003 **
样地 Site	3.2067	0.0723	0.033 *	样地×土壤深度 Site×Depth	1.8226	0.0411	0.117
土壤深度 Depth	1.709	0.0385	0.172	植物×样地×土壤深度 Plant×Site×Depth	0.8021	0.0364	0.555
植物×样地 Plant×Site	0.9307	0.042	0.455				

* ;表示 $P<0.05$; * * ;表示 $P<0.01$

2.7 AM 真菌与土壤因子相关性分析

Pearson 相关性分析可知(表 6),AM 真菌 ACE 指数和 Chao1 指数与土壤碱解 N 显著正相关,与 ACP 显著负相关;Simpson 指数和 Shannon 指数与土壤速效 P、ALP 显著正相关,与 pH 显著负相关。综上可知,pH、速效 P、磷酸酶和碱解 N 对 AM 真菌多样性有显著影响。CANOCO 4.5 生物统计软件进行 RDA 分析(图 6)可知,两轴累积解释信息量达 94.7%,可反映采样点、土壤因子与 AM 真菌多样性的关系。AM 真菌丰度、均匀度和多样性指数沿第一轴从左至右依次增加,两样地蒙古沙冬青丰度和多样性指数均高于伴生植物,其中,磴口蒙古沙冬青 0—20 cm 土层 AM 真菌多样性最丰富。

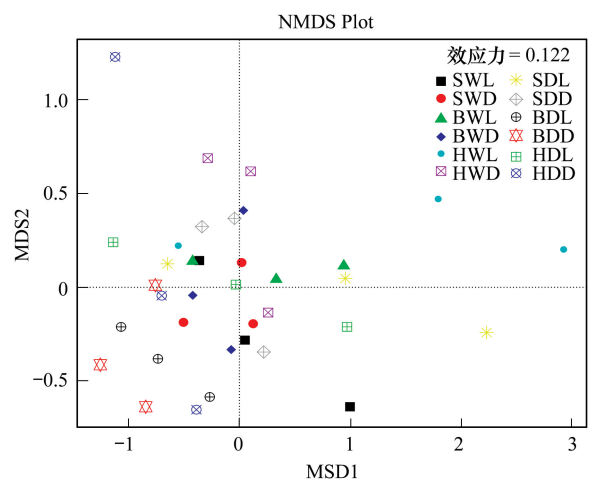


图 5 AM 真菌群落 NMDS 分布图

Fig.5 NMDS plot of AM fungal community composition

3 讨论

3.1 AM 真菌群落组成和物种多样性

本试验利用高通量测序技术在乌海、磴口两个样地共分离鉴定 AM 真菌 5 目 6 科 9 属,有 7 个 OTU 鉴定到种,即 *Glomus perpusillum*, *Funnelformis mosseae*, *F. coronatum*, *Rhizophagus intraradices*, *Diversispora spurca*, *Scutellospora aurigloba*, *Ambispora leptoticha*, 尚有 *Glomus* sp. 和 *Diversispora* sp. 未确定,其中 *Rhizophagus*, *Ambispora* 和 *Paraglomus* 3 个属利用孢子形态特征进行分类鉴定时没有发现^[15]。另外, *Diversispora* 共有 16 个 OTU,在所测样品中优势度最大,为两样地共有优势属, *Diversispora spurca* 为优势种。 *Glomus* 共检测出 36 个 OTU,虽然相对丰度最大,但相对多度低于 *Diversispora*。一方面是由于 AM 真菌分类系统的不断更新,使得部分 AM 真菌种类分类地位发生了变化^[6];另一方面由于形态学鉴定以及一些传统分子手段存在缺陷,研究结果会出现不稳定性 and 局限性,不能真实反映环境中 AM 真菌群落结构和多样性^[23]。而采样高通量测序方法能够检测到孢子数量和 DNA 含量少、生态地理变异大、利用孢子形态特征难以分类鉴定的 AM 真菌种属,丰富了 AM 真菌种属组成,说明分子生物学对 AM 真菌形态学分类有重要补充意义^[7]。

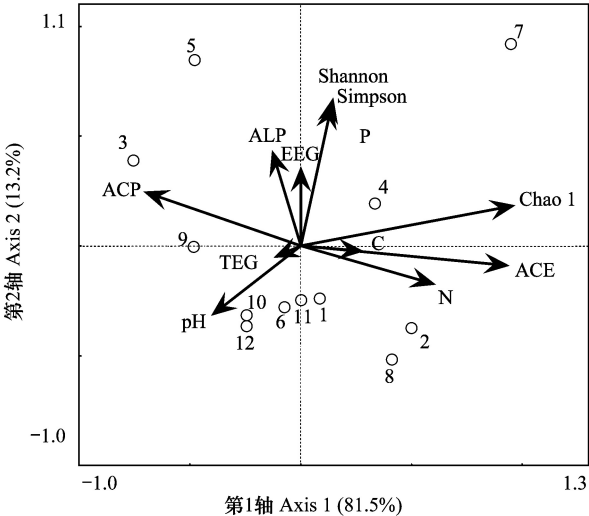


图 6 AM 真菌多样性与土壤因子的 RDA 分析
Fig.6 Results of redundancy analysis of AM fungal diversity index and soil factors
图中 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 分别代表 SWL, SWD, BWL, BWD, HWL, HWD, SDL, SDD, BDL, BDD, HDL, HDD 样品; C: 有机质, organic matter; N: 碱解氮, Available N; P: 速效磷 Available P; ALP: 碱性磷酸酶, alkaline phosphatase; ACP: 酸性磷酸酶, acid phosphatase; EEG: 易提取球囊霉素, Easily extrated glomalin; TEG: 总提取球囊霉素, Total extrated glomalin.

表 6 AM 真菌物种多样性与土壤因子的 pearson 相关性分析

Table 6 Pearson analysis between AM fungal diversity and soil factors					
土壤因子 Soil factor	菌群多样性指数 ACE Index	Chao1 多样性指数 Chao1 Index	辛普森指数 Simpson Index	香农-威纳指数 Shannon Index	OTU 数量 The number of OTUs
pH	-0.433	-0.414	-0.559 *	-0.553 *	-0.083
有机碳 Organic carbon	0.330	0.212	0.460	0.453	0.269
有效磷 Available P	0.251	0.386	0.398	0.432	-0.086
碱解氮 Available N	0.755 **	0.499 *	0.165	0.142	0.497
易提取球囊霉素 Easily extractable glomalin	0.088	-0.009	0.686	0.677	-0.203
总球囊霉素 Total extractable glomalin	-0.084	-0.168	0.306	0.292	0.018
酸性磷酸酶 Acid phosphatase	-0.728 **	-0.644 *	0.343	0.343	-0.543
碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase	-0.039	-0.110	0.725 **	0.737 **	-0.31

3.2 寄主植物与 AM 真菌物种多样性的关系

两样地中,乌海蒙古沙冬青 AM 真菌 Simpson 指数和 Shannon 指数较伴生植物四合木低,磴口蒙古沙冬青 AM 真菌 Simpson 指数和 Shannon 指数均高于伴生植物。说明蒙古沙冬青 AM 真菌物种多样性高于伴生植物,大多数 AM 真菌能与其形成密切的共生关系。研究证实,AM 真菌对寄主植物没有严格专一性,但 AM 真菌与不同寄主植物间的亲和力存在差异^[21]。Kiers 等^[24]报道了 AM 真菌与寄主植物存在“相互奖励”机制,即寄主植物分配碳源给为其提供更多磷素的菌根真菌。Tawaraya 等^[25]研究发现,不同寄主植物对同种 AM 真菌的依赖性差异明显。由于 AM 真菌具有功能多样性,在长期进化过程中,寄主植物可选择性促进或抑制

某些 AM 真菌孢子生长发育,从而保留具有特定功能的 AM 真菌与之共生^[24-25]。蒙古沙冬青与 AM 真菌都具有古老的生长史和发展史,它们在长期协同进化过程中,相互选择形成良好共生关系,这对蒙古沙冬青适应生态环境有重要意义。四合木也具有古老进化史,形态结构与蒙古沙冬青相似,其根围土壤 AM 真菌多样性高于其他伴生植物,这与 AM 真菌协同进化有着密切联系。王同智等^[26]关于 AM 真菌对四合木抗旱性的研究也证实,AM 真菌能显著提高幼苗成活率和酶活性,增加生物量适应干旱胁迫。

3.3 环境异质性与 AM 真菌物种多样性的关系

很多研究发现,土壤理化性质和环境条件对 AM 真菌群落的影响比寄主植物更大^[26-27]。本试验中,同一植物,深土层比浅土层 AM 真菌 ACE 指数高,Simpson 指数和 Shannon 指数在浅土层高于深土层,说明土壤深度影响着 AM 真菌的生态分布。AM 真菌为好氧性真菌,土壤通气性是影响其群落分布的重要因素。相关性分析表明,AM 真菌 ACE 指数和 Chao1 指数与土壤碱解 N 显著正相关,与酸性磷酸酶显著负相关;Simpson 指数和 Shannon 指数与速效 P 和碱性磷酸酶显著正相关,与 pH 显著负相关,说明土壤理化性质对 AM 真菌群落结构和多样性有显著影响。研究表明,低 pH 可直接抑制外生菌丝和根系生长,从而抑制 AM 真菌生长和功能发挥^[9]。研究发现,AM 真菌分泌磷酸酶可将土壤有机磷转化成无机磷,增加植物根系对磷素的吸收^[28]。贺超等^[29]研究发现,不同水肥因子对 AM 真菌促生效应和营养吸收能力有显著影响。

另外,海拔、温度、土壤含水量、土壤质地等都会影响 AM 真菌群落结构和种群分布^[30-31]。磴口样地 AM 真菌多样性明显高于乌海样地,这可能与经纬度和海拔高度不同有关。不同海拔会造成温度、降水等环境条件的差异,进而影响 AM 真菌群落结构与物种组成^[32-33]。

综合表明,AM 真菌群落组成和物种多样性与寄主植物和生态环境密切相关,蒙古沙冬青 AM 真菌物种多样性较伴生植物更为丰富,具有更强的生态适应性。同时,形态学特征与分子特征有机结合,才能科学客观地阐明 AM 真菌群落组成和物种多样性特征。

参考文献 (References):

- [1] 傅立国. 中国植物红皮书. 北京: 科学出版社, 1992: 368-371.
- [2] 孙茜, 贺超, 贺学礼, 赵丽莉. 沙冬青与伴生植物深色有隔内生真菌定殖规律及其与土壤因子的相关性. 植物生态学报, 2015, 39(9): 878-889.
- [3] Wang B, Qiu Y L. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. Mycorrhiza, 2006, 16(5): 299-363.
- [4] Gianinazzi S, Gollotte A, Binet M N, Van Tuinen D, Redecker D, Wipf D. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. Mycorrhiza, 2010, 20(8): 519-530.
- [5] Muthukumar T, Bagyaaj D J. Use of arbuscular mycorrhizal in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 2010, 80(12): 103-121.
- [6] Redecker D, Schüßler A, Stöckinger H, Stürmer S L, Morton J B, Walker C. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). Mycorrhiza, 2013, 23(7): 515-531.
- [7] Błaszowski J, Chwat G, Góralaska A, Bobrowska-Chwat A. *Glomus tetrastratosum*, a new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). Mycoscience, 2015, 56(3): 280-286.
- [8] 王晓乾, 贺学礼, 程春泉, 陈严严, 姜桥. 蒙古沙冬青 AM 真菌物种多样性空间异质性. 河北大学学报: 自然科学版, 2014, 34(6): 643-649.
- [9] Li L F, Li T, Zhang Y, Zhao Z W. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their distribution patterns related to host-plants and habitats in a hot and arid ecosystem, southwest China. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 71(3): 418-427.
- [10] Bainard L D, Koch A M, Gordon A M, Newmaster S G, Thevathasan N V, Klironomos J N. Influence of trees on the spatial structure of arbuscular mycorrhizal communities in a temperate tree-based intercropping system. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2011, 144(1): 13-20.
- [11] Öpik M, Zobel M, Cantero J J, Davison J, Facelli J M, Hiiesalu I, Jairus T, Kalwij J M, Koorem K, Leal M E, Liira J, Metsis M, Neshataeva V, Paal J, Phosri C, Põlme S, Reier Ü, Saks Ü, Schimann H, Thiéry O, Vasar M, Moora M. Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza, 2013, 23(5): 411-430.
- [12] Richard F, Roy M, Shahin O, Sthultz C, Duchemin M, Joffre R, Selosse M A. Ectomycorrhizal communities in a Mediterranean forest ecosystem dominated by *Quercus ilex*: Seasonal dynamics and response to drought in the surface organic horizon. Annals of Forest Science, 2011, 68(1):

57-68.

- [13] Redecker D. Arbuscular mycorrhizal fungal communities and *Rhizophagus irregularis* populations shift in response to short-term ploughing and fertilisation in a buffer strip. *Mycorrhiza*, 2016, 26(1): 33-46.
- [14] Wang Y T, Li Y W, Bao X Z, BjÖrn L O, Li S S, Olsson P A. Response differences of arbuscular mycorrhizal fungi communities in the roots of an aquatic and a semiaquatic species to various flooding regimes. *Plant and Soil*, 2016, 403(1-2): 361-373.
- [15] 郭清华, 胡从从, 贺学礼, 王晓乾, 常辉, 陈严严. 蒙古沙冬青伴生植物 AM 真菌的空间分布. *生态学报*, 2016, 36(18): 5809-5819.
- [16] 宋勇春, 李晓林, 冯固. 菌根真菌磷酸酶活性对红三叶草生境中土壤有机磷亏缺的影响. *生态学报*, 2001, 21(7): 1130-1135.
- [17] Wright S F, Upadhyaya A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 1996, 198(1): 97-107.
- [18] Janos D P, Garamszegi S, Beltran B. Glomalin extraction and measurement. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(3): 728-739.
- [19] Yeates C, Gilling M R, Davison A D, Altavilla N, Veal D A. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological Procedures Online*, 1998, 1(1): 40-47.
- [20] Lundberg D S, Yourstone S, Mieczkowski P, Jones C D, Dangl J L. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 999-1002.
- [21] Chao A N. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 1984, 11(4): 265-270.
- [22] Chao A, Wang W H, Chen Y C, Kuo C Y. Estimating the number of shared species in two communities. *Statistica Sinica*, 2000, 10(1): 227-246.
- [23] 程春泉, 贺学礼, 赵金莉, 张玉洁, 赵丽莉. 蒙古沙冬青根围土壤 AM 真菌 PCR-DGGE 分析. *西北农业学报*, 2014, 23(12): 175-183.
- [24] Kiers E T, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah J A, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum C R, Kowalchuk G A, Hart M M, Bago A, Palmer T M, West S A, Vandenkoomhuysen P, Jansa J, Bücking H. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science*, 2011, 333(6044): 880-882.
- [25] Tawaray K, Tokairin K, Wagatsuma T. Dependence of *Allium fistulosum* cultivars on the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus fasciculatum*. *Applied Soil Ecology*, 2001, 17(2): 119-124.
- [26] 王同智, 包玉英. AM 真菌对濒危物种四合木及近缘种霸王抗旱性的影响. *华北农学报*, 2014, 29(3): 170-175.
- [27] 杨海水, 王琪, 郭伊, 熊艳琴, 许明敏, 戴亚军. 丛枝菌根真菌群落与植物系统发育的相关性分析. *植物生态学报*, 2015, 39(4): 383-387.
- [28] Oehl F, Iaczo E, Bogenrieder A, Stahr K, Bösch R, Van Der Heijden M, Sieverding E. Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(5): 724-738.
- [29] 贺超, 陈伟燕, 贺学礼, 姜桥, 赵丽莉. 不同水肥因子与 AM 真菌对黄芩生长和营养成分的交互效应. *生态学报*, 2016, 36(10): 2798-2806.
- [30] Vandenkoomhuysen P, Ridgway K P, Watson I J, Fitter A H, Young J P W. Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology*, 2003, 12(11): 3085-3095.
- [31] Bai C M, He X L, Tang H L, Shan B Q, Zhao L L. Spatial distribution of arbuscular mycorrhizal fungi, glomalin and soil enzymes under the canopy of *Astragalus adsurgens* Pall. in the Mu Us sandland, China. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(5): 941-947.
- [32] Taniguchi T, Usuki H, Kikuchi J, Hirobe M, Miki N, Fukuda K, Zhang G S, Wang L H, Yoshikawa K, Yamanaka N. Colonization and community structure of root-associated microorganisms of *Sabina vulgaris* with soil depth in a semiarid desert ecosystem with shallow groundwater. *Mycorrhiza*, 2012, 22(6): 419-428.
- [33] 吴则焰, 林文雄, 陈志芳, 方长甸, 张志兴, 吴林坤, 周明明, 陈婷. 中亚热带森林土壤微生物群落多样性随海拔梯度的变化. *植物生态学报*, 2013, 37(5): 397-406.