

云南西双版纳野生与栽培绞股蓝根内丛枝菌根真菌的分子多样性

周丽思 郭顺星*

(中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要 采用巢式-PCR、DNA克隆测序技术,对西双版纳地区野生与栽培绞股蓝根内丛枝菌根真菌(AMF)进行群落结构多样性研究.试验共获得551个含有丛枝菌根真菌18S rDNA片段的克隆子,经限制性片段长度多态性分析,得到100个RFLP类型,将其划分为20个序列类型,分属于7个科.将20个序列类型的相关序列与GeneBank数据库进行比对,有5个可以鉴定到种,分别为*Glomus viscosum*、*Claroideoglomus etunicatum*、*Racocetra tropicana*、*Acaulospora spinosa*、*Acaulospora mellea*.与MaarjAM数据库中序列进行比对,12个可鉴定为虚拟分类分子种,其中7个未在孢子形态学鉴定方法中获得.西双版纳地区野生与栽培绞股蓝根内丛枝菌根真菌群落组成差异极显著.野生绞股蓝根内Glo-2、Amb-1、Para-1为优势类群,而栽培绞股蓝根内Glo-3、Glo-8、Glo-10、Div-1为优势类群. Claroideoglomeraceae和Ambisporaceae仅在野生样本中出现,而Diversisporaceae仅在栽培样品中出现.

关键词 丛枝菌根真菌 绞股蓝 多样性 RFLP分析 巢式-PCR

文章编号 1001-9332(2013)09-2503-08 **中图分类号** R282.2 **文献标识码** A

Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in wild and cultured *Gynostemma pentaphyllum* roots in Xishuangbanna, Southwest China. ZHOU Li-si, GUO Shun-xing (*Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China*). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2013, 24(9): 2503-2510.

Abstract: By using nested-PCR, DNA cloning, and sequencing techniques, this paper studied the diversity of the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in wild and cultured *Gynostemma pentaphyllum* roots. A total of 551 clones containing 18S rDNA genes of AMF were obtained from the roots. After the analysis of the restriction fragment length polymorphism, 100 different RFLP types were obtained, which were further divided into 20 AMF phylotypes belonging to seven families. The comparison of the sequences of 20 AMF phylotypes with the GenBank database showed that there were 5 AMF phylotypes having high similarity to the sequences of reported AMF species *Glomus viscosum*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Racocetra tropicana*, *Acaulospora spinosa*, and *Acaulospora mellea*, respectively. These sequences were then assessed for the similarities against the MaarjAM database, and 12 phylotypes showed high similarity to the corresponding molecular virtual taxa, of which, 7 phylotypes were not obtained by the morphological identification of soil asexual spores. Statistical analysis indicated that there were significant differences in the AMF community between wild and cultured *G. pentaphyllum* roots. The analysis of relative abundance data indicated that Glo-2, Amb-1, and Para-1 were the dominant phylotypes in wild *G. pentaphyllum* roots, while Glo-3, Glo-8, Glo-10, and Div-1 were the prevalent phylotypes in cultured ones. Claroideoglomeraceae and Ambisporaceae were only detected in wild *G. pentaphyllum* roots, and Diversisporaceae was only identified in cultured ones.

Key words: arbuscular mycorrhiza; *Gynostemma pentaphyllum*; diversity; RFLP; nested-PCR.

绞股蓝(*Gynostemma pentaphyllum*)为葫芦科绞

股蓝属多年生草质藤本植物.其药用价值在明代《救荒本草》中已有记载.现代药理研究表明,绞股蓝皂苷具有调节血糖、降低血脂、保心护肝、抑制肿

* 通讯作者. E-mail: sxguo2006@yahoo.com.cn

2013-01-22 收稿, 2013-06-25 接受.

瘤、镇静止痛及抗溃疡等多种药理作用^[1]. 随着医药工业的发展,对中药材的需求日益增长,有必要对野生药材进行引种栽培. 但栽培过程中往往由于生境改变、植物种类单一、栽培密度增大等,导致产量下降、药用成分含量降低、病虫害的发生增加,以及土壤环境恶化所引起的连作障碍等问题,极大地影响了绞股蓝的成药品质^[2]. 丛枝菌根真菌作为与植物关系最为密切的土壤微生物之一,可与植物形成菌根共生体,不仅促进植物对养分元素的吸收和代谢、改善植物营养状况、影响植物次生代谢产物的积累、提高植物对不良环境和病虫害的抵抗能力,而且对修复退化土壤有良好作用^[3]. 因此,丛枝菌根真菌在药用植物中的研究倍受关注. 贺学礼等^[4]研究了丛枝菌根真菌对黄芪(*Astragalus membranaceus*)生理特性及营养成分的影响;黄京华等^[5]研究发现,接种摩西球囊霉(*Glomus mosseae*)和地表球囊霉(*Glomus versiforme*)有利于提高黄花蒿(*Artemisia annua*)地上部分的挥发油收油率.

目前,我国对药用植物丛枝菌根真菌多样性的研究,因丛枝菌根真菌专性活体营养的特点,往往只能通过鉴定提取自根围土壤中的孢子和显微观察的传统形态学方法. 姜攀等^[6]、马永甫等^[7]、赵婧^[8]等分别对厦门、重庆和河北安国地区部分药用植物根围丛枝菌根真菌资源分布进行了调查. 这种方法可以获得优质的丛枝菌根真菌种质资源,但无法说明这些丛枝菌根真菌种类就是与植物相互作用最为密切的种类.

随着分子生物学技术的日益成熟,获得药用植物根内定殖的丛枝菌根真菌群落组成已成为可能^[9]. 为更真实地反映野生与栽培绞股蓝根系中丛枝菌根真菌的群落组成,找寻更适合绞股蓝栽培应用的丛枝菌根真菌种质资源,本文以野生和栽培生境的绞股蓝为研究对象,通过对绞股蓝根内丛枝菌根真菌 18s rDNA 的 RFLP 分析及构建克隆文库,探讨野生与栽培绞股蓝根系中丛枝菌根真菌群落结构、多样性及其种属间的差异,旨在为解决绞股蓝栽培中的相关问题提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 样品采集及处理

采样地点位于云南省西双版纳傣族自治州(21°08'—22°36' N, 99°56'—101°50' E),系北回归线以南的热带北部边缘,属热带季风气候,年均气温 21.5 °C,年均降雨量 1557 mm,降雨主要集中在 5

月下旬至 10 月下旬,全年干湿季分明^[10-11].

2012 年 1 月,在云南省勐养县国家自然保护区(22°15' N, 100°49' E, 海拔 796 m)采集野生绞股蓝根系样本,在云南省西双版纳南药园(22°00' N, 100°47' E, 海拔 589 m)采集栽培绞股蓝根系样本. 在两个采样地随机选择 3 个采样点,每个采样点随机采集 3 株绞股蓝根样作为一份样品. 在距植株 0~30 cm 处采集 10~20 cm 深的土样和细根样,编号、装入自封袋后置入冰盒带回. 将根系样品清洗干净后,于 -80 °C 冰箱中保存备用. 土样风干保存.

1.2 丛枝菌根相关指标的测定

1.2.1 侵染强度 选取幼嫩根系剪成 1 cm 左右的根段,依次经过 10% KOH 50 min (90 °C 水浴)、水洗、2% 盐酸 5 min、含 0.05% 曲利本蓝的乳酸甘油水溶液(乳酸:甘油:水=1:1:1) 30 min (90 °C 水浴)、水洗、乳酸甘油水溶液过夜脱色,从染色完成的根段中随机挑选 30 个根段制片,在显微镜下测定侵染率. 依据菌根侵染分级标准分成 0、<1%、<10%、<50%、<90%、>90% 6 级;丛枝泡囊丰度分级标准为:无、较少、较多、非常多;根据分级标准对根段进行侵染率级别判断,然后将相应数值输入“MYCO-CALC”软件,计算出侵染强度(M%). M% 是 30 个随机挑选的根段侵染状况的加权平均值,是植物根系中真菌侵染出现的频度和侵染强度的综合反映^[12].

1.2.2 菌丝密度 取已过 1 mm 筛的风干土壤样品 5 g,放入 1 L 烧杯中,加入 800 mL 水充分搅拌,静置至无漩涡,将上清液导入上、下筛分别为 20 和 400 目的双层筛中过滤. 重复该操作 2 次. 使用 250 mL 水将 400 目筛中的菌丝转移进搅拌机,搅拌 10 s,停 5 s,再搅拌 20 s 后,将溶液转移进 300 mL 三角瓶中摇匀,静置 1 min,在距液面 1 cm 处吸取 5 mL 溶液,加在微孔滤膜上进行抽滤,将滤膜转移至载玻片上,滴加 0.05% 曲利本蓝染液两滴. 重复上述步骤 2 次. 待染液干后,滴加甘油并盖上盖玻片. 每张微孔滤膜分别于 200 倍显微镜下选取均匀分布的 25 个样点进行观察^[13]. 菌丝密度($m \cdot g^{-1}$)计算公式:

$$\text{菌丝密度} = \text{菌丝长度} / \text{土样质量}$$

菌丝长度(m) = $11/14 \times \text{总交叉点数} \times \text{网格单元格长度} \times \text{滤膜上样块面积} / \text{网格面积}$

1.2.3 孢子密度 每份土样中取 10 g 风干土,用湿筛倾析-蔗糖离心法分离土壤中丛枝菌根真菌孢子,在体视显微镜下计数. 孢子密度(g^{-1})计算公式:

$$\text{孢子密度} = \text{丛枝菌根真菌的孢子数} / \text{土样质量}$$

1.3 根内丛枝菌根真菌分子多样性的鉴定

1.3.1 DNA 的提取 先将样品根系表面消毒, 步骤如下: 75% 乙醇 30 s, 1% 次氯酸钠 3 min, 无菌水冲洗 3 次, 用无菌滤纸将表面水分吸干。在每个根样中随机选取数条根段 (约 200 mg), 使用 CTAB 法提取植物基因组试剂盒 (艾德莱, 中国) 并按照操作手册进行提取, 提出的 DNA 样品于 -20 °C 保存备用。

1.3.2 巢式-PCR 扩增目的条带 对提取出的根内 DNA 样品进行巢式-PCR 扩增。第 1 次 PCR: 所用引物为丛枝菌根真菌特异引物 AML1/AML2^[14] (表 1)。扩增反应体系为 25 μL, 按照 EasyTaq KIT 说明书 (北京全式金生物技术有限公司) 进行 PCR 反应, 其中引物 (10 μmol · mL⁻¹) 各加入 0.4 μL, 模板为 1 μL, 扩增程序为: 94 °C 5 min, 33 × (94 °C 30 s, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min), 72 °C 10 min。每个样品 3 个重复。第 2 次 PCR: 分别以 3 个重复的第 1 次 PCR 产物按 1 : 1000 用超纯水 (ddH₂O) 稀释后, 作为第 2 次 PCR 的模板; 引物为丛枝菌根真菌特异引物 NS31/AM1^[15-16] (表 1), 反应体系与第 1 次 PCR 相同, 扩增程序为: 94 °C, 5 min 31 × (94 °C 30 s, 60 °C 45 s, 72 °C 1 min), 72 °C 10 min。两次 PCR 产物均用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3 RFLP 分析与构建克隆文库 使用 PCR 产物回收纯化试剂盒将每个样品第 2 次 PCR 产物的 3 个重复合并后纯化。纯化产物连接至 pMD-18T 载体 (TaKaRa, 日本) 并转化 Trans5α 感受态细胞构建克隆文库 (共 6 个文库)。每一克隆文库用灭菌牙签随机挑取 94 个白斑, 至 500 μL 含氨苄西林 LB 液体培养基中 37 °C 12 h。取 1 μL 菌液作为模板进行插入 DNA 片段的重新扩增, 引物为通用引物 M13-47/M13-48, 扩增条件为: 94 °C 5 min, 29 × (94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min), 72 °C 10 min。经上述步骤, 共有 564 个白斑鉴定为阳性转化子。

用 *Hinf*I 进行酶切 (Thermos, 德国) 后, 进行限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析。使用 2% 琼脂糖凝胶电

泳检测酶切产物, 并进行 RFLP 谱型划分。RFLP 谱型只在同一克隆文库内比较。每一 RFLP 谱型随机挑取一个克隆子进行 DNA 序列测定 (上海生工), 若测序结果不好或不能测出的克隆, 则选取相同 RFLP 类型的另一克隆子进行测序, 共测序 110 条。

1.3.4 序列分析与构建系统发育树 所有 DNA 序列编辑后, 利用 BLAST 软件与 GenBank 数据库进行在线比对, 利用 DUTOR 软件将 97% 的 DNA 序列相似水平划分序列类群 (operational taxonomic unit, OTU)。共划分出 23 个序列类群, 每个序列类群中随机选出一条代表性序列。使用 Blast 工具在 GenBank 数据库中获得与 23 条代表性序列 (GenBank 号: KC465757-KC465779) 相关的参考序列。代表序列与参考序列采用 ClusterX 软件处理后, 用 Mega 5.0 软件进行 Neighbor-Joining 系统发育分析。使用 MaarjAM 数据库^[17] (<http://maarjam.botany.ut.ee>) 与本研究获得的 23 个 OTU 的代表序列进行比对, 将相似度 ≥ 97% 鉴定为一个分子虚拟分类种。

Shannon 多样性指数 (H') 和均匀度指数 (Eh) 根据下式计算:

$$H' = - \sum P_i \ln P_i$$

$$Eh = H / \ln S$$

式中: P_i 为第 i 个序列类型的相对多度; S 为每个重复的序列类型数。

覆盖率 (coverage, C) 用来评估构建的文库能否代表环境微生物的多样性, 计算公式为:

$$C = (1 - n/N) \times 100$$

式中: n 为克隆文库中单克隆的序列类型数; N 为用于分析的克隆数。

物种丰度 (species richness) 为每个样品的序列类型数占全部序列类型的百分比。

相对多度 (relative abundance) 为某物种的个体数在群落总物种个体数的比率, 即某种序列类型的总克隆数/样地内所有序列类型所对应的总克隆数 × 100%。

1.4 数据处理

采用 Microsoft Excel 2007 软件对数据进行处理和绘图。使用 SPSS 18.0 统计分析软件 (LSD 法) 对丛枝菌根真菌侵染率、孢子密度、菌丝密度进行数据差异显著性检验, 使用 Fisher 确切概率法对丛枝菌根真菌序列类群对应克隆数及不同科丛枝菌根真菌的差异显著性进行检验^[18-19]。

表 1 巢式-PCR 引物列表

Table 1 List of primers used to nested-PCR

引物名称 Primer pairs	序列 (5'→3') Sequence (5'→3')	扩增片段长度 Fragment size (bp)
AML1	ATCAACTTTCGATGCTAGGATAGA	800
AML2	GAACCCAAACACTTTGGTTTC	
NS31	TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC	550
AM1	GTTTCCCGTAAGCGCCGAA	

2 结果与分析

2.1 绞股蓝根围丛枝菌根真菌的侵染强度、孢子密度和菌丝密度

由表 2 可见,两生境绞股蓝根围丛枝菌根真菌的孢子密度和菌丝密度均差异显著,而侵染强度无显著差异.栽培绞股蓝根围土壤中的孢子密度显著高于野生绞股蓝;而野生绞股蓝根围土壤中的菌丝密度显著高于栽培绞股蓝.

表 2 野生与栽培绞股蓝根围丛枝菌根真菌侵染强度、孢子密度和菌丝密度

Table 2 Colonization, spore density and hyphal length density of AM fungi of wild and cultured *Gynostemma pentaphyllum*

样品 Sample	侵染强度 Colonization (%)	孢子密度 Spore density (g^{-1})	菌丝密度 Hyphal length density ($m \cdot g^{-1}$)
野生 Wild	43.9a	2.90b	2.44a
栽培 Cultured	36.1a	5.80a	1.31b

同列不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$) Different small letters in the same column meant significant difference at 0.05 level among treatments.

2.2 绞股蓝根内丛枝菌根真菌克隆文库的构建及其多样性分析

通过巢式-PCR 成功扩增出所有样品根内丛枝菌根真菌 18S rDNA 序列.对两个采样地点分别建立 18S rDNA 克隆文库(表 3).每个采样点有 3 个样本,每个样本经蓝白斑筛选和菌落 PCR 选出 94 个阳性克隆,两个采样点的总克隆数均为 282 个,测序后舍去非丛枝菌根真菌序列.野生样品克隆文库获得 274 个克隆子,栽培样品获得 277 个克隆子,覆盖度均在 99% 以上,可以较好地代表两个样本中丛枝菌根真菌的多样性.

随后,使用 Hinf I 限制性内切酶进行酶切后,获得 RFLP 条带类型,野生样本有 58 个 RFLP 条带类型,栽培样本有 52 个.使用 DOTUR 软件按 97% 相似度划分操作分类单元(OTU),共划分 23 个 OTU,每个 OTU 中随机选取一条序列为代表序列(GenBank 号:KC465757-KC465779);野生样本划分成 16

个 OTU,栽培样本划分成 15 个 OTU.说明在本研究中,基于 18S rDNA 序列的野生和栽培绞股蓝根内丛枝菌根真菌分子种类较丰富,Shannon 多样性指数分别为 2.24 和 2.25.

2.3 系统发育分析与丛枝菌根真菌的群落组成

对划分出的 23 个 OTU 中的代表序列进行系统发育分析,绞股蓝根内丛枝菌根真菌种类可以划分为 20 个序列类群(phylogroup)(图 1),分别属于 6 个科.其中 12 个属于 Glomeraceae,3 个属于 Acaulosporaceae,其余的分属于 Claroideoglomeraceae、Gigasporaceae、Diversisporaceae、Paraglomeraceae 和 Ambisporaceae.其中 5 个可以鉴定到种(Bootstrap $> 70\%$),分别为 *Glomus viscosum*、*Claroideoglomus etunicatum*、*Racocetra tropicana*、*Acaulospora spinosa*、*Acaulospora mellea*.但是这 5 个序列类群并不是绞股蓝根内的优势类群(表 4).

与在线 MaarjAM 数据库比对后,12 个序列类群可以划分为 12 个虚拟分子分类种(相似度 $> 97\%$,表 4).这些虚拟分子种中包括野外样品中的优势类群 Amb-1(VT00005)和 Glo-2(VT00156),以及栽培样品中的优势类群 Glo-3(VT00166)和 Glo-10(VT00069).

2.4 野生与栽培绞股蓝根内丛枝菌根真菌分布的相对多度

由图 2 可见,所获得的 20 个序列类型在野生和栽培绞股蓝根内的分布差异极显著,而且每个种类所占的相对多度也有很大的差别.在野生绞股蓝根内,Glo-2、Amb-1、Para-1 为优势类群;而在栽培绞股蓝根内,Glo-3、Glo-8、Glo-10、Div-1 为优势类群.两个生境并没有共有优势类群.

2.5 不同科丛枝菌根真菌在野生与栽培绞股蓝根内分布的相对多度

由图 3 可见,所获得的 23 个序列类群分属于 7 个科,不同采样点丛枝菌根真菌的分布有极显著差异.栽培绞股蓝根内的丛枝菌根真菌种类主要集中在 Glomeraceae 和 Diversisporaceae;而野生绞股蓝根内的丛枝菌根真菌种类更加丰富,Claroideoglom-

表 3 野生与栽培绞股蓝根内丛枝菌根真菌 18S rDNA 克隆文库

Table 3 Analyses of AM fungi 18S rDNA library constructed in wild and cultured *Gynostemma pentaphyllum*

样品 Sample	克隆数 No. of clone	RFLP 条带类型数 No. of RFLP types	OTU 数 No. of OTU types	覆盖率 Coverage (%)	Shannon 指数 Shannon index	均匀度 Evenness	丰富度 Richness
野生 Wild	274	58	16	99.2	2.24	0.81	0.70
栽培 Cultured	277	52	15	99.6	2.25	0.83	0.65

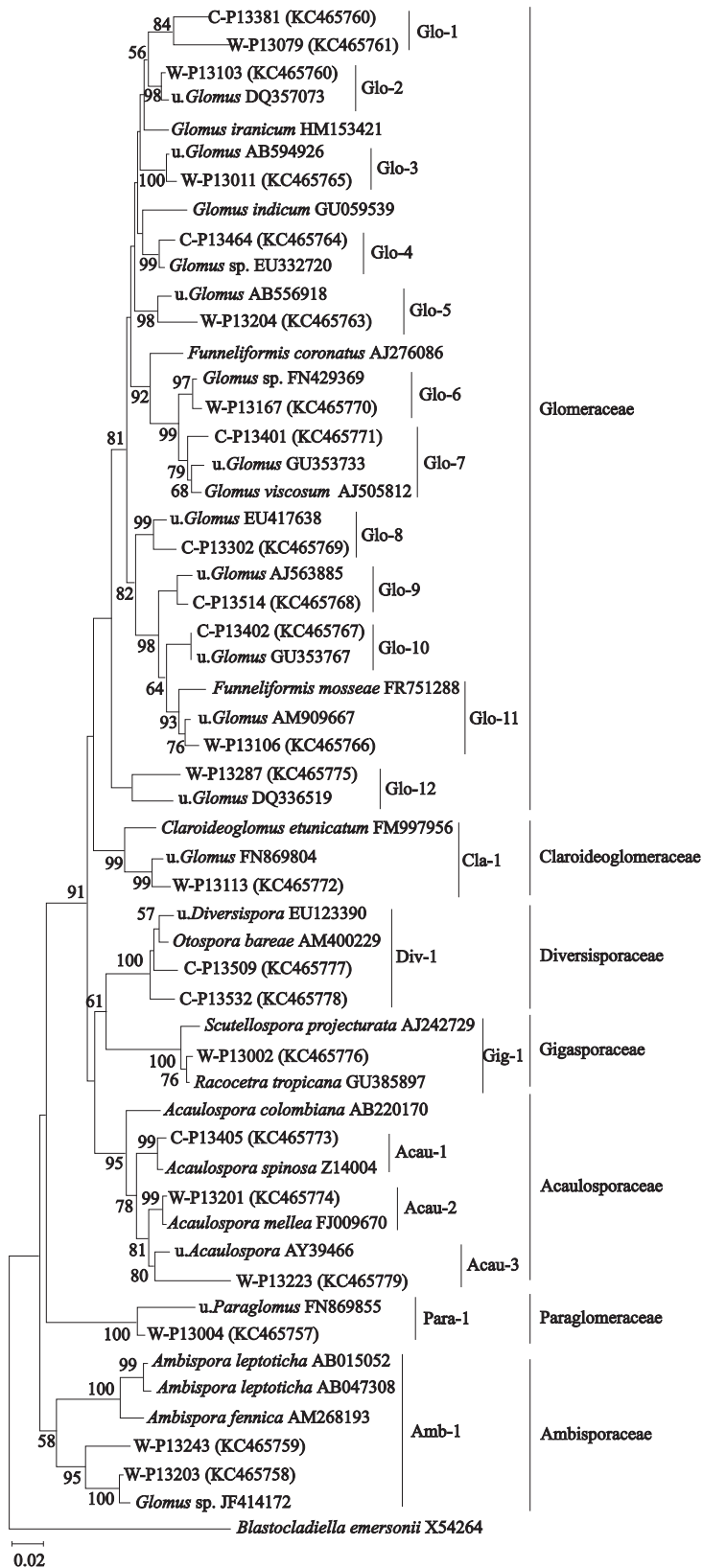


图 1 野生与栽培绞股蓝根中丛枝菌根真菌 18S rDNA 基因代表序列的 Neighbor-joining 系统发育树

Fig. 1 Neighbor-joining phylogenetic tree inferred from representative sequences of AM fungi 18S ribosomal DNA gene identified in wild and cultured *Gynostemma pentaphyllum* roots.

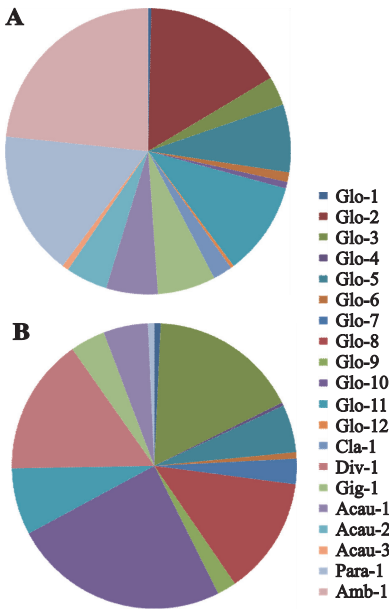


图2 野生(A)与栽培(B)绞股蓝根内丛枝菌根真菌序列类型分布的相对多度

Fig. 2 Relative abundance of AMF phylotypes in wild (A) and cultured (B) *Gynostemma pentaphyllum* roots.

表4 野生与栽培绞股蓝根内丛枝菌根真菌种类

Table 4 Composition of AM fungi communities in wild and cultured *Gynostemma pentaphyllum* roots

类型 Type	野生/栽培的 根内克隆数 Clones in wild/cultured	分子虚拟分类 Molecular virtual taxon	相关种 Related species
Glo-1	1/2	-	-
Glo-2	44/-	VT00156	-
Glo-3	9/47	VT00166	-
Glo-4	-/1	VT00130	-
Glo-5	21/15	-	-
Glo-6	3/2	VT00064	<i>Glomus viscosum</i>
Glo-7	-/8	-	-
Glo-8	-/37	VT00204	-
Glo-9	-/6	VT00072	-
Glo-10	2/68	VT00069	-
Glo-11	29/21	-	-
Glo-12	1/-	-	-
Cla-1	6/-	VT00057	<i>Claroideoglomus etunicatum</i>
Div-1	-/43	-	-
Gig-1	18/11	VT00041	<i>Racocetra tropicana</i>
Acau-1	16/14	VT00044	<i>Acaulospora spinosa</i>
Acau-2	13/-	VT00025	<i>Acaulospora mellea</i>
Acau-3	2/-	-	-
Para-1	45/2	-	-
Amb-1	64/-	VT00005	-
总计 Total	274/277		

eraceae、Gigasporaceae、Acaulosporaceae、Paraglomeraceae 和 Ambisporaceae 分布的相对多度都高于栽培样品。其中, Claroideoglomeraceae 和 Ambisporaceae

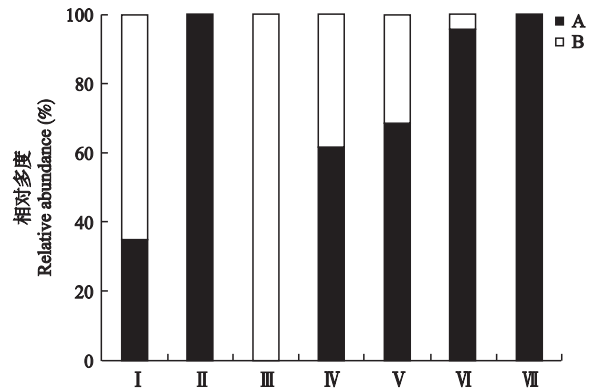


图3 野生(A)与栽培(B)绞股蓝根内各科丛枝菌根真菌分布的相对多度

Fig. 3 Relative abundance of AM fungi families in wild (A) and cultured (B) *Gynostemma pentaphyllum* roots.

I: Glomeraceae; II: Claroideoglomeraceae; III: Diversisporaceae; IV: Gigasporaceae; V: Acaulosporaceae; VI: Paraglomeraceae; VII: Ambisporaceae.

丛枝菌根真菌仅在野生样本中出现, Diversisporaceae 丛枝菌根真菌则仅在栽培样品中出现。Paraglomeraceae 则在野生样本中出现的比率更高。

3 讨论

3.1 绞股蓝根内丛枝菌根真菌的种类

本研究采用巢式-PCR、RFLP 与克隆测序技术相结合,并且两次采用丛枝菌根真菌特异性引物进行扩增,真实地反映了特定时间侵染绞股蓝根系的丛枝菌根真菌群落组成,从中获得了 23 个可操作分类单元,并划分为 20 个序列类型,分属于 7 个科,其中 5 个鉴定到种,12 个虚拟分类分子种。目前,研究我国药用植物丛枝菌根真菌多样性大多采用孢子形态学的方法。本研究所获得的 5 个可鉴定到种的可操作分类单元,有 4 个种已在我国药用植物根围土壤中发现。其中,在细枝岩黄耆 (*Hedysarum scoparium*)^[20]、薄荷 (*Mentha canadensis*)^[21] 等根围土壤中分离出 *Acaulospora mellea*, 在三七 (*Panax notoginseng*)^[22]、三角叶黄连 (*Coptis deltoidea*)^[23] 等根围土壤中获得 *Acaulospora spinosa*, 在翠云草 (*Selaginella uncinata*)、火炭母 (*Polygonum chinense*)、草珊瑚 (*Sarcandra glabra*)、海金沙 (*Lygodium japonicum*) 等根围土壤中发现 *Claroideoglomus etunicatum*, 在薯蓣 (*Dioscorea polystachya*)^[24]、南方红豆杉 (*Taxus walllichiana* var. *mairei*)^[25] 等根围土壤中获得 *Glomus viscosum*。而 *Racocetra tropicana* 未在我国药用植物根围分离获得。这是由于扩增引物的设计大多都是基于孢子形态鉴定数据,并且大部分从野外生态系统中

获得的丛枝菌根真菌物种目前还无法进行纯培养,不能获得更为准确的核酸序列信息,使野外生态系统中很大一部分丛枝菌根真菌的相关序列未能得到有效扩增功能^[26-27]。同时,鉴定到种的 5 个序列类型: Glo-6 (*Glomus viscosum*)、Cla-1 (*Claroideoglomus etunicatum*)、Gig-1 (*Racocetra tropicana*)、Acau-1 (*Acaulospora spinosa*)、Acau-2 (*Acaulospora mellea*) 都是形态学研究中较丰富的种类,但在克隆文库中所对应的克隆数并不占优势,说明它们不是优势类群。然而,本文中一些丛枝菌根真菌优势类群往往无法被鉴定。这说明土壤中分布的丛枝菌根真菌群落与植物根系中分布的群落有很大的差异^[28]。

为了将采用分子生物学技术获得、未能鉴定到种的丛枝菌根真菌序列类型的分布规律进行总结,Öpik 等^[17]设计了一种虚拟的分类方式,基于 SSU rDNA 基因序列将丛枝菌根真菌在全球范围内的分布特点展现出来,使之与生态学功能相联系。本文将获得的 20 个序列类型与该 MaarjAM 数据库进行比对,有 12 个序列类型具有相匹配的虚拟分类分子种 (molecular virtual taxon),其中包括野外样品中的优势类群 Amb-1 (VT00005) 和 Glo-2 (VT00156),栽培样品中的优势类群 Glo-3 (VT00166) 和 Glo-10 (VT00069)。该数据库提供了各个虚拟分类分子种的分布信息,包括采样点的生态系统类型、植被类型、已发表文献等^[29]。在不能确定丛枝菌根真菌物种及无法纯培养的条件下,可以通过以上信息对同一虚拟分类分子种的分布及研究结果进行分析,总结其分布规律、推测其在生态系统中的功能。

3.2 不同生境绞股蓝根内丛枝菌根真菌的种类

研究表明,不同生态系统中丛枝菌根真菌多样性存在很大的差异^[30],丛枝菌根真菌群落的功能也不相同^[31]。van de Heijden 等^[32]归纳了丛枝菌根真菌的 9 种形态学特性和 4 种生理特性作用。程俐陶等^[33]采用形态学鉴定方法对野生和栽培半夏 (*Pinellia ternata*) 根围丛枝菌根真菌群落多样性进行调查,发现了 21 个种,分属于 3 个属;但是不同采样点的孢子种类和优势种不同,野生样品中优势种为 *Glomus mosseae*,栽培样品中优势种为 *Scutellospora castanea*。本研究结果表明,野生与栽培环境下,绞股蓝根内的丛枝菌根真菌群落组成存在很大差异。在 20 个序列类群中,12 个序列类群属于 Glomeraceae,栽培样品中 Glomeraceae 也占了绝对优势,但在野生样品中 Ambisporaceae 和 Paraglomeraceae 更具优势。由此推测,丛枝菌根真菌种类的不同是造成栽

培药用植物成药品质降低的因素之一。

在感染率没有显著差异的情况下,栽培样品的孢子密度几乎是野生样品的一倍,菌丝密度却是野生样品的 1/2。Hart 和 Reader^[34]研究发现,与 Glomeraceae 和 Acaulosporaceae 的丛枝菌根真菌相比, Gigasporaceae 的丛枝菌根真菌能产生更多的根外菌丝,使植物获得更丰富的营养。本试验中 Glomeraceae 根外菌丝并不丰富,可能是在栽培条件下,植物不需要通过与丛枝菌根真菌的共生关系来获得营养,而那些从共生关系中获得营养并产生大量繁殖体的丛枝菌根真菌成为优势种群。推测在野生环境下,植物会选择可以帮助自己吸取营养的丛枝菌根真菌来建立共生关系。因此,野生环境中植物根内的丛枝菌根真菌将有可能成为更加优质的“生物肥料”。

参考文献

- [1] Razmovski-Naumovski V, Huang THW, Tran VT, et al. Chemistry and pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum*. *Phytochemistry Reviews*, 2005, **4**: 197-219
- [2] Guo L-P (郭兰萍), Huang L-Q (黄璐琦), Jiang Y-X (蒋有绪), et al. Soil deterioration during cultivation of medicinal plants and ways to prevent it. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药杂志), 2006, **31** (9): 714-717 (in Chinese)
- [3] Smith SE, Read DJ. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd Ed. London: Elsevier, 2008
- [4] He X-L (贺学礼), Liu T (刘 媿), Zhao L-L (赵丽莉) et al. Effect of inoculating AM fungi on physiological characters and nutritional components of *Astragalus membranaceus* under different N application levels. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2009, **20**(9): 2118-2122 (in Chinese)
- [5] Huang J-H (黄京华), Tan J-F (谭钜发), Jie H-K (揭红科), et al. Effect of inoculating arbuscular mycorrhizal fungi on *Artemisia annua* growth and its official components. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2011, **22**(6): 1443-1449 (in Chinese)
- [6] Jiang P (姜 攀), Wang M-Y (王明元). Colonization rate and diversity of AM fungi in the rhizosphere of seven medicinal plants in Xiamen. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 2012, **32**(13): 4043-4051 (in Chinese)
- [7] Ma Y-F (马永甫), Yang X-H (杨晓红), Li P-M (李品明), et al. Investigation of the diversity of arbuscular mycorrhizal structure of medicinal plants in Chongqing. *Journal of Southwest Agricultural University* (Natural Science) (西南农业大学学报·自然科学版), 2005, **27**(3): 406-409 (in Chinese)
- [8] Zhao J (赵 婧), He X-L (贺学礼). Resource and distribution of AM fungi in the rhizosphere of medicinal plants in Anguo City of Hebei Province. *Journal of Agricultural University of Hebei* (河北农业大学学报), 2010, **33**(1): 39-44 (in Chinese)

- [9] Liu Y-J (刘永俊), Feng H-Y (冯虎元). Systematic classification and community research techniques of arbuscular mycorrhizal fungi; A review. *Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报)*, 2010, **21**(6): 1573–1580 (in Chinese)
- [10] Lu H-Z (卢华正), Sha L-Q (沙丽清), Wang J (王君). Seasonal variation of soil respiration and its components in tropical rain forest and rubber plantation in Xishuangbanna, Yunnan. *Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报)*, 2009, **20**(10): 2315–2322 (in Chinese)
- [11] Ou X-K (欧晓昆), Jin Z-Z (金振洲), Peng M-C (彭明春). Distribution of vegetations in Mengyang Nature Reserve of Xishuangbanna and their ecological characteristics. *Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报)*, 1997, **8**(suppl.): 8–19 (in Chinese)
- [12] Phillips JM, Hayman DS. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transaction of the British Mycological Society*, 1970, **55**: 158–161
- [13] Jakobsen I, Abbott LK, Robosen AD. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 1. Spread of hyphae and phosphorus in flow into roots. *New Phytologist*, 1992, **120**: 371–380
- [14] Lee J, Lee S, Young JPW. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, **65**: 339–349
- [15] Simon L, Lévesque RC, Lalonde M. Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**: 4211–4215
- [16] Helgason T, Daniell TJ, Husband R, et al. Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, 1998, **394**: 431
- [17] Öpik M, Vanatoa A, Vanatoa E, et al. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist*, 2010, **188**: 223–241
- [18] Toljander JF, Santos-González JC, Tehler A, et al. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria in the maize mycorrhizosphere in a long-term fertilization trial. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, **65**: 323–338
- [19] Heuer H, Smalla K. Evaluation of community-level catabolic profiling using BIOLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, **30**: 49–61
- [20] Duan X-Y (段小圆). Study on the Ecology and Diversity of AM Fungi in the Rhizospheres of *Hedysarum scoparium*. Master Thesis. Yangling: Northwest A&F University, 2009 (in Chinese)
- [21] Jiang P (姜攀), Wang M-Y (王明元), Lu J-C (卢静婵). Arbuscular mycorrhizal fungi associated with medicinal plants in Zhangzhou, Fujian. *Mycosystema (菌物学报)*, 2012, **31**(5): 676–689 (in Chinese)
- [22] Ren J-H (任嘉红), Liu R-X (刘瑞祥), Li Y-L (李云玲). Study on arbuscular mycorrhizae of *Panax notoginseng*. *Microbiology China (微生物学通报)*, 2007, **34**(2): 224–227 (in Chinese)
- [23] Huang W-L (黄文丽), Fan X-J (范昕建), Yan Z-Y (严铸云), et al. Diversity study of arbuscular mycorrhizal fungi of *Coptis deltoidea*. *Journal of Chinese Medicinal Materials (中药材)*, 2012, **35**(5): 689–693 (in Chinese)
- [24] Zhao J-L (赵金莉), Cheng X-Q (程学谦), Gu X-Y (顾晓阳), et al. Relationship between AM fungi of new eight medicinal plants and soil factors in Anguo of Hebei. *Journal of Henan Agricultural Sciences (河南农业科学)*, 2012, **41**(6): 87–91 (in Chinese)
- [25] Wang S (王森), Tang M (唐明), Niu Z-C (牛振川), et al. Relationship between AM fungi resources of rare medicinal plants and soil factors in Lishan mountain. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2008, **28**(2): 355–361 (in Chinese)
- [26] Öpik M, Moora M, Zobel M, et al. High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal herb-rich coniferous forest. *New Phytologist*, 2008, **179**: 867–876
- [27] Zhang HQ, Tang M, Chen H, et al. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria in the rhizosphere of *Caragana korshinskii* and *Hippophae rhamnoides* in Zhifangguo watershed. *Plant and Soil*, 2010, **326**: 415–424
- [28] Öpik M, Metsis M, Daniell TJ, et al. Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytologist*, 2009, **184**: 424–437
- [29] Liu YJ, He JX, Shi GX, et al. Diverse communities of arbuscular mycorrhizal fungi inhabit sites with very high altitude in Tibet Plateau. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, **78**: 355–365
- [30] Öpik M, Moora M, Liira J, et al. Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungi communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology*, 2006, **94**: 778–790
- [31] Treseder KK, Cross A. Global distributions of arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecosystems*, 2006, **9**: 305–316
- [32] Van der Heijden MGA, Scheublin TR. Functional traits in mycorrhizal ecology: Their use for predicting the impact of arbuscular mycorrhizal fungal communities on plant growth and ecosystem functioning. *New Phytologist*, 2007, **174**: 244–250
- [33] Cheng L-T (程俐陶), Guo Q-S (郭巧生), Liu Z-Y (刘作易). Arbuscular mycorrhiza of cultivated and wild *Pinellia ternate*. *China Journal of Chinese Materia Medica (中国中药杂志)*, 2010, **35**(4): 405–410 (in Chinese)
- [34] Hart MM, Reader JR. Host plant benefit from association with arbuscular mycorrhizal fungi: Variation due to differences in size of mycelium. *Biology and Fertility of Soils*, 2002, **36**: 357–366

作者简介 周丽思,女,1987年生,硕士.主要从事药用植物菌根生物学研究. E-mail: zls921203@sina.com

责任编辑 李凤琴