

刁海欣,黄清俊,苗利媛,等. 土壤含水量对白芨与菌根真菌共生关系的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(22):122-130.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.22.023

# 土壤含水量对白芨与菌根真菌共生关系的影响

刁海欣<sup>1,2</sup>, 黄清俊<sup>2</sup>, 苗利媛<sup>1</sup>, 曾歆花<sup>1</sup>, 黄卫昌<sup>1</sup>

(1. 上海辰山植物园中国科学院上海辰山植物科学研究中心, 上海 201602; 2. 上海应用技术大学生态技术与工程学院, 上海 201418)

**摘要:**采用石蜡切片技术、DNA 分子鉴定技术和稳定同位素技术相结合的手段,研究不同土壤碳氮含量对白芨菌根真菌多样性、菌根结构特征及碳氮稳定同位素特征和光合特性的影响。结果表明,不同土壤含水量条件下,白芨菌根真菌共鉴定出 305 个 OTU,8 门 99 属。菌根真菌总物种数和  $\alpha$  多样性指数随着土壤含水量的减少而增加(土壤含水量为 15% 的真菌总数比土壤含水量为 45% 时多了 18 个 OTU);同时随着土壤含水量的降低,优势菌根真菌逐渐转变为伞菌纲 *Agaricomycetes*、*Serendipita* 和肉座菌目 *Hypocreales* 真菌;基于门水平,子囊菌门 *Ascomycota* 真菌丰度随着土壤含水量减少而明显减少,而担子菌门 *Basidiomycota* 真菌丰度波动不大;菌根真菌侵入方式不受土壤含水量影响,均是通过通道细胞进入皮层组织,但菌丝团数量和侵染率随着土壤含水量的减少而降低;此外,白芨叶片的碳氮同位素丰度随着土壤含水量的减少而逐渐增加,净光合速率却随之明显下降,土壤含水量为 45% 时是白芨与菌根共生的最佳水平。研究结果明确了白芨与菌根真菌共生关系对土壤含水量变化的响应以及对土壤含水量的耐受范围,为白芨属植物野生种群恢复提供参考。

**关键词:**白芨;菌根真菌多样性;高通量测序;显微结构;碳氮稳定同位素;土壤含水量

**中图分类号:** S682.310.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)22-0122-09

大多数兰科植物都与菌根真菌形成密切的共生关系<sup>[1]</sup>。近年来大部分兰科植物的野生物种和生境生态都遭到严重破坏,已被列为濒危物种<sup>[2]</sup>。研究表明,土壤水分含量是影响兰科植物与菌根真菌共生关系的关键因素<sup>[3-5]</sup>。魏明等研究发现,在干旱胁迫下菌根真菌可以提高石斛的相对含水量和体内抗氧化酶活性,增强植株对干旱的耐受性<sup>[6]</sup>。Diez 指出,兰科植物的种子萌发需要适宜的共生真菌,并且受土壤湿度、有机物和酸碱度的影响<sup>[7]</sup>。McCormick 等研究发现,兰科植物与胶膜菌属真菌在正常环境条件下形成互惠共生体,但在干旱条件下,共生真菌会由胶膜菌属真菌转换为其他

真菌物种<sup>[8]</sup>。DNA 分子鉴定技术是当前研究菌根真菌多样性的有效手段,可以明确菌根真菌物种组成及丰度变化等情况,进而了解二者共生关系对干旱的响应机制,为兰科植物保育工作提供参考。

白芨(*Bletilla striata*)是地生兰,其药用和观赏价值很高<sup>[9]</sup>。当前菌根生态学逐步得到重视,但土壤因子对白芨与菌根真菌共生关系的影响研究不足。本研究对白芨进行分子鉴定、显微切片观察及碳氮稳定同位素和光合参数测定,比较不同土壤含水量条件下白芨菌根真菌多样性、真菌侵染过程和生态适应性的差异,探讨白芨与菌根真菌共生关系对土壤含水量变化的响应机制,明确适宜干旱逆境的优势菌根真菌及量化最佳的土壤湿度条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

白芨采自上海辰山植物园竹林的 2 年生人工栽培种,种源地为江西崇义。于 2019 年 4 月挖取 60 株无病虫害、长势较好且规格一致的幼苗,同时修剪干枯、有虫害的营养根。

火山泥与黄沙(体积比 1.5:1)混合基质,使用前在 121 ℃ 的高压灭菌锅内灭菌 30 min,风干 2 d 后备用。

收稿日期:2020-05-02

基金项目:国家自然科学基金(编号:31902108);上海市绿化和市容管理局科学技术项目(编号:G192420);上海市现代农业产业技术体系项目(编号:201908);上海应用技术大学协同创新基金(编号:XTCX2018-3)。

作者简介:刁海欣(1994—),女,河南商丘人,硕士研究生,主要从事兰科植物菌根生态学研究。E-mail:dhxtx1216@163.com。

通信作者:曾歆花,博士,助理研究员,主要从事兰科植物与菌根真菌共生关系研究,E-mail:zengxinhuaxi@163.com;黄卫昌,博士,教授级高级工程师,主要从事兰科植物保育研究,E-mail:hwc\_zx@126.com。

## 1.2 方法

1.2.1 试验设计 设置4个土壤含水量水平,分别为15% (W1)、25% (W2)、35% (W3)、45% (W4),以W4(土壤最适含水量)为控制对照组,每个水平10个重复。每盆(口径 高度为10.2 0.95 cm)加入相同的混合基质505 g,每盆种植1株幼苗。将所有盆栽放置于室外,并定期浇充足的雨水,保证幼苗健壮生长。白芨种植1个月后,水分胁迫处理3个月,每隔1 d浇1次水。土壤含水量通过称质量法(HJ 613—2011《土壤 干物质和水分的测定 重量法》)计算获得:首先在铝盒中放入20 g风干土样并称质量,然后105 ℃烘干6 h,直至恒质量,计算出土壤含水量,进而换算出每个土壤含水量水平下每盆需要的浇水量。

1.2.2 DNA分子技术 2019年7月采集白芨营养根,每个土壤含水量水平选择6个植株,2株为1个重复,共3个重复。每个植株取3~5个长势良好的营养根,将其放入已编号的塑封袋中,并立即装入冷藏保温袋中带回实验室处理。首先用流水冲洗根表面泥沙等杂质,然后依次按下面步骤消毒灭菌:无菌水30 s,70%乙醇2 min,2.5%次氯酸钠溶液5 min,70%乙醇30 s,无菌水冲洗3次。一部分根放入无菌塑封袋中于-80 ℃保存用于后续分子生物学鉴定;另一部分放入FAA固定液中(1 d < t < 7 d)用于石蜡切片制作。

利用FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, 美国)提取菌根真菌总DNA,并用1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量,DNA浓度和纯度测定采用NanoDrop 2000法。对白芨菌根真菌ITS序列进行PCR扩增(特异引物为ITS1F:5'-CTTGTCATTTA GAGGAAGTAA-3'和ITS4R:5'-TCCTCCGCTTATT GATATGC-3'),扩增流程:95 ℃预变性3 min;95 ℃变性30 s,55 ℃退30 s,72 ℃延伸45 s,37个循环;72 ℃稳定延伸10 min,最终10 ℃保存。其中PCR反应体系(20 μL)为:5 × TransStart FastPfu 缓冲液4 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL,5 μmol/L上游引物0.8 μL,5 μmol/L下游引物0.8 μL,TransStart FastPfu DNA聚合酶0.4 μL,BSA 0.2 μL,模板DNA 10 ng,补足ddH<sub>2</sub>O。每个样本3个重复。在Illumina公司的Miseq PE300平台上测序(上海美吉生物医药科技有限公司),并将原始数据上传至NCBI SRA数据库(Sequence Read Archive,http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra)(序列号:

SRP256191)。

使用上海美吉生物医药科技有限公司云平台进行交互式生物信息云分析(http://www.i-sanger.com)。其中原始序列使用Trimmomatic软件进行质控,使用FLASH软件拼接序列,使用UPARSE软件(version 7.1 http://drive5.com/uparse/) OTU聚类分析序列(相似度:97%),利用RDP classifier(http://rdp.cme.msu.edu/)以及比对Unite(Release 6.0 http://unite.ut.ee/index.php)真菌数据库(比对阈值:70%)注释序列;使用mothur(version v. 1.30.1 http://www.mothur.org/wiki/Schloss\_SO P#Alpha\_diversity)分析菌根真菌多样性指数,包括丰度(S)、香农指数(H)、辛普森指数(D)和覆盖率(C),同时可操作分类单元(OTU)相似水平为97%。计算公式如下:

$$H = - \sum_{i=1}^S \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N};$$

$$D = \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)};$$

$$C = 1 - \frac{n_1}{N}。$$

式中:S为实际OTU数量,个; $n_i$ 为含*i*条序列的OTU数量,条;N为序列总数,条; $n_1$ 为仅有1条序列的OTU数量,个。

1.2.3 石蜡切片技术 用无菌刀片把营养根切成2~3 mm的根段。常规石蜡切片制作,即脱水、透明、浸蜡(石蜡熔点:56~60 ℃)、包埋、切片(厚度:8 μm)粘片、脱蜡、染色(番红固绿对染)、封片(中性树脂)。随机选取不同土壤含水量水平的切片于光学显微镜下观察。菌丝条条清晰、明显疏松的菌丝团是丝状菌丝团,而菌丝结构难辨的致密菌丝团是团块状菌丝团<sup>[3]</sup>。

参照Biermann等提出的根段侵染率加权法<sup>[10]</sup>计算真菌侵染率:每个水平随机选择300个视野,并将根段侵染程度划分为4个等级,即C<sub>0</sub>、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>和C<sub>3</sub>,其中C<sub>0</sub>表示皮层细胞中无菌丝团,C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>和C<sub>3</sub>分别表示1%~30%、31%~60%和>60%的皮层细胞中有菌丝团。计算公式如下:

$$\text{平均侵染率} = (15\% \times NC_1 + 45\% \times NC_2 + 80\% \times NC_3) / \text{总视野数} \times 100\%。$$

式中:NC<sub>1</sub>、NC<sub>2</sub>和NC<sub>3</sub>分别表示处于C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>和C<sub>3</sub>级别的视野数,个。

1.2.4 稳定同位素技术 于2019年7月底采集白

芨新鲜叶片,每个土壤含水量水平选择 6 株健壮植株,2 株为 1 个重复,共 3 个重复。每株取 3 张长势良好的叶片。同时采集自养非兰科植物作为对照的叶片,即花叶滇苦菜、龙葵、小飞蓬、莲子草,每个物种 3 次重复,每次 6 张叶片。流水冲洗干净叶片,置于烘箱 120 ℃ 杀青 20 min,65 ℃ 烘干 48 h 至恒质量,最后粉碎烘干的叶片。用锡箔杯包裹 2~4 mg 叶样后,在元素分析仪内燃烧并被还原为纯净的 CO<sub>2</sub> 和 N<sub>2</sub> 气体,CO<sub>2</sub> 稀释后进入稳定同位素质谱仪检测。用相对丰度( $\delta$  值)表示稳定同位素的自然丰度变化,公式如下:

$$\delta = [(R_{sp}/R_{st}) - 1] \times 1000.$$

式中: $R_{sp}$  和  $R_{st}$  分别为样品的同位素比值和标准品的同位素比值。

### 1.2.5 叶绿素含量测量和光合参数测定

1.2.5.1 叶绿素含量测定 于 2019 年 7 月底采用丙酮-乙醇(体积比 1:1)混合液法测量白芨叶片的叶绿素含量<sup>[11]</sup>。每个水平选择 6 株健壮植株,2 株 1 个重复,共 3 个重复。用孔径  $R=6$  mm 的打孔器在相同位置(避开主脉)的新鲜叶片上打孔 4 片,约 1.13 cm<sup>2</sup>;切成细丝放入 5 mL 丙酮-乙醇混合液中,并用锡纸包裹试管,浸提 24 h,期间摇晃 3~4 次,使绿色尽可能褪完全;吸取 1.5 mL 浸提液于比色皿中,用紫外可见分光光度计分别测量波长 645 nm 和 663 nm 处的吸光度。计算公式如下:

$$C_a (\mu\text{g/mL}) = 12.7D_{663\text{ nm}} - 2.69D_{645\text{ nm}};$$

$$C_b (\mu\text{g/mL}) = 22.9D_{645\text{ nm}} - 4.68D_{663\text{ nm}};$$

$$C_t (\text{mg/dm}^2) = \frac{(C_a + C_b) \times 10^{-3}}{S \times 10^{-2}} \times 5.$$

式中: $C_a$  为叶绿素 a 的含量; $C_b$  为叶绿素 b 的含量;

$C_t$  为叶绿素的总量。

1.2.5.2 光合参数测定 于 2019 年 7 月底,09:00—11:00(晴朗天气),使用 Li-600 XT 光合仪测定白芨叶片的净光合速率、气孔导度、胞间 CO<sub>2</sub> 浓度和蒸腾速率。每个水平选择 6 株长势良好的植株,2 株为 1 个重复,共 3 个重复。测量上部完全开展的第 1、第 2 张功能叶(从上往下数第 2、第 3 张)的中部,同时光合仪设置为:LED 2×3 光源,光照度为 500  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,CO<sub>2</sub> 浓度与环境浓度相近,流速设置为 500  $\mu\text{mol}/\text{s}$ 。

### 1.3 数据处理

利用 Excel 2010 和 SPSS 25.0 软件进行数据分析,其中使用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较白芨在不同土壤含水量条件下菌根真菌多样性指数、菌丝团数量、碳氮稳定同位素丰度值和净光合速率的差异,并用 Duncan's 多重比较分析显著性( $P < 0.05$ );白芨叶片碳氮稳定同位素丰度与光合参数的相关分析采用 Pearson 相关性分析;利用 Origin Pro 9.1 软件作柱形图。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤含水量对菌根真菌多样性的影响

2.1.1 白芨菌根真菌 Alpha 多样性分析 由表 1 可知,基于 OTU 水平,土壤含水量对白芨菌根真菌多样性产生一定的影响。白芨菌根真菌群落丰度随着土壤含水量的减少而增加,其中土壤含水量为 15% 时达到顶峰,为 79;土壤含水量为 25% 时次之,为 77;土壤含水量为 45% 和 35% 的真菌丰度较低,分别为 45 和 41。不同土壤含水量水平的菌根真菌香农指数、辛普森指数和覆盖率无显著差异。

表 1 土壤含水量对白芨菌根真菌 Alpha 多样性的影响

土壤含水量 (%)	丰度	香农指数	辛普森指数	覆盖率
15	79 ± 7a	2.93 ± 0.52a	0.13 ± 0.10a	0.999 0 ± 0.000 4a
25	77 ± 17a	2.93 ± 0.59a	0.11 ± 0.07a	0.998 8 ± 0.000 4a
35	41 ± 9b	2.19 ± 0.72a	0.21 ± 0.15a	0.999 5 ± 0.000 1a
45	45 ± 17b	2.13 ± 0.38a	0.22 ± 0.10a	0.999 2 ± 0.000 1a

注:数据为平均值 ± 标准偏差。同列数据后不同小写字母表示不同土壤含水量水平下存在显著差异( $P < 0.05$ )。表 2 同。

2.1.2 白芨菌根真菌的 Venn 图分析 分别在 OTU 水平和属水平对白芨不同土壤含水量水平的菌根真菌多样性进行比较。由图 1-A 可知,4 个土壤含水量水平的菌根真菌总物种数为 305 个 OTU。在不同土壤含水量条件下,菌根真菌总数存在差

异。土壤含水量为 15% 时最高(143 个),其次是土壤含水量 25% (140 个)、土壤含水量 45% (125 个)、土壤含水量 35% (91 个)。白芨特有菌根真菌数随着土壤含水量的减少而发生一定变化,土壤含水量 45% (62 个)明显高于土壤含水量 15% (54

个)、25% (43 个) 和 35% (20 个)。此外,各土壤含水量水平之间都有数量不一的重叠真菌,其中 4 个水平的共有真菌有 14 个 OTU。

图 1-B 呈现出在土壤含水量条件下菌根真菌共 99 属。白芨菌根真菌总属数在不同土壤含水量水平下存在差异,其中土壤含水量 45% 和 15% 的属

总数较高,分别是 55 属和 47 属;土壤含水量 35% 次之,为 39 属;土壤含水量 25% 最少 (36 属)。在不同土壤含水量条件下,特有菌属数目情况与属总数有一定类似,土壤含水量 45% (24 属) > 15% (15 属) > 25% (9 属) > 35% (7 属)。除此之外,不同土壤含水量之间存在不同数量的重叠菌属。

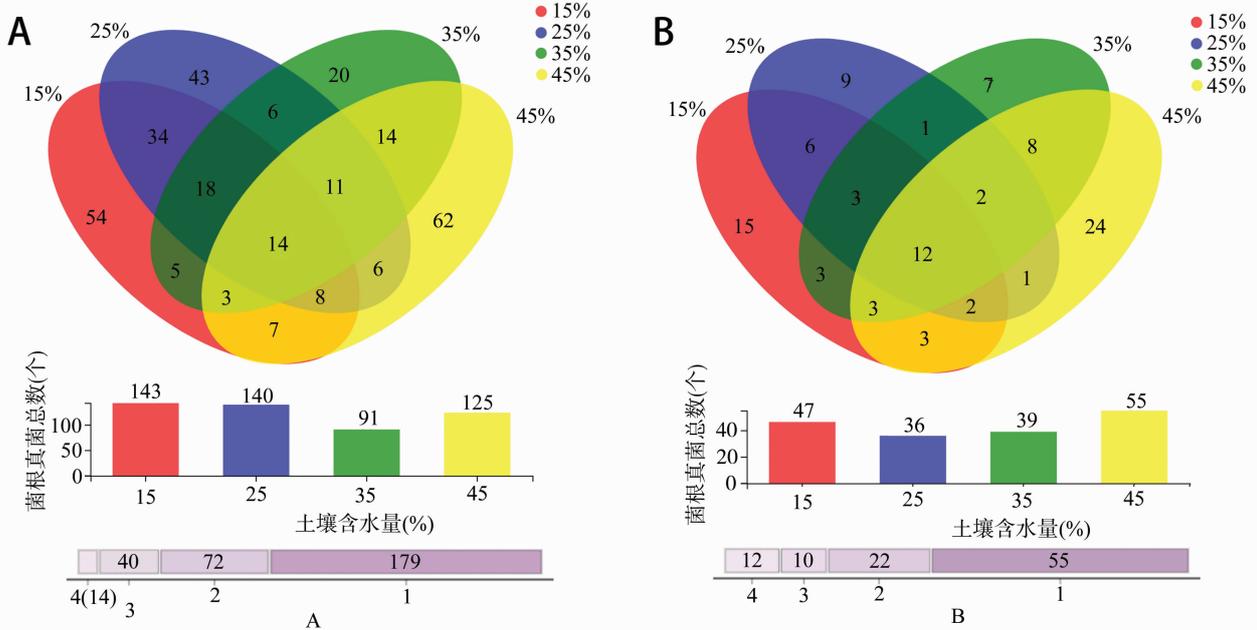


图1 土壤含水量的白芨菌根真菌 OUT 水平(A)和属水平(B)的 Venn 图

2.1.3 白芨菌根真菌群落组成 在不同土壤含水量条件下,白芨菌根真菌物种组成存在显著差异。从图 2 可以看出,子囊菌门丰度随着土壤含水量的减少而降低,土壤含水量为 45% 时最高 (74.91%),土壤含水量为 15% 时仅为 16.83%;而担子菌门丰度在不同土壤含水量水平下波动不大。此外,鉴定出壶菌门 Chytridiomycota 分布于土壤含水量 15% (2.76%) 和 25% (10.10%) 中,少量的被孢霉门 Mortierellomycota 真菌出现在土壤含水量 15% 和 35% 中。

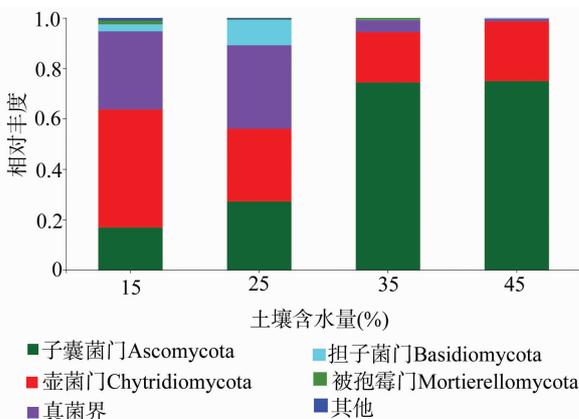


图2 不同土壤含水量的白芨菌根真菌门水平的群落柱形图

在属水平上,不同土壤含水量水平下的菌根真菌群落组成也存在一定差异 (图 3)。本研究将某一真菌占菌群总物种数的百分比  $\geq 10\%$  判断为优势真菌,1% ~ 10% 的为常见真菌,  $\leq 1\%$  的为稀有真菌<sup>[12]</sup>。随着土壤含水量的减少,白芨的优势菌根菌种类发生改变。其中土壤含水量为 45% (W4) 中的双足囊菌属 *Dipodascus* (OTU83、OTU832、OTU107 等 5 个 OTUs)、篮状菌属 *Talaromyces* (OTU877、OTU103、OTU80 等 5 个 OTUs) 和 *Cutaneotrichosporon* (OTU73、OTU71) 占优势地位;土壤含水量为 35% (W3) 时,新赤壳属 *Neocosmospora* (OTU878、OTU874、OTU697)、篮状菌属 (OTU877、OTU103、OTU554) 和镰孢属 *Fusarium* (OTU79、OTU727) 占主导地位;土壤含水量为 25% (W2) 时菌根真菌中以伞菌纲 (OTU360、OTU198、OTU783 等 9 个 OTUs) 和肉座菌目 (OTU801) 为优势菌属;土壤含水量为 15% (W1) 中竞争力较高的菌根真菌是伞菌纲 (OTU398、OTU287 和 OTU246) 和 *Serendipita* (OTU289、OTU356、OTU203 等 6 个 OTUs) 真菌。受土壤含水量影响,共有真菌的丰度在含水量较少的处理中明显下降,如青

霉属 *Penicillium*(从 W4 中的 5.71% 下降到 W1 中的 0.52%, 转变为稀有真菌)。常见真菌数量随着土壤含水量的减少显著下降, 种类也会存在差异。如土壤含水量为 45% 的常见菌根真菌有单胞菌属

*Kazachstania*(7.29%)、新赤壳属(6.99%)、青霉属(5.71%)等 13 属, 而土壤含水量为 15% 时只鉴定出 *Cutaneotrichosporon*(5.46%)、短梗霉属 *Aureobasidium*(4.95%)、丝核菌属 *Rhizoctonia*(2.63%) 等 10 属。

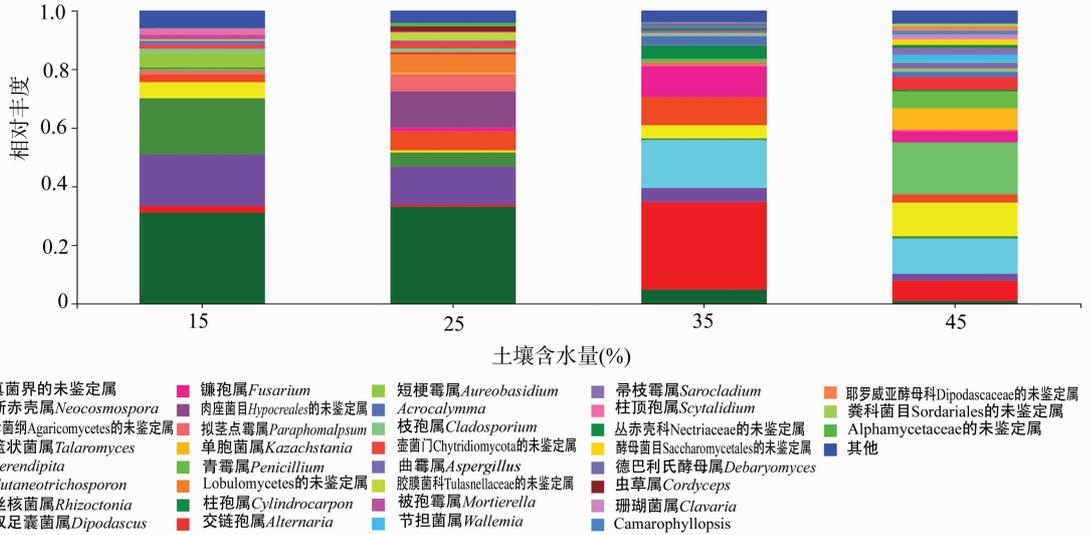


图 3 不同土壤含水量的白芨菌根真菌属水平的群落柱形图

2.1.4 白芨菌根真菌 Lefse 多级物种差异判别分析

由图 4 - A 可见, 土壤含水量为 15% 和 45% 时存在有显著差异的真菌。其中土壤含水量为 15% 时存在 1 组有显著丰度差异的真菌类群, 为散囊菌纲 Eurotiomycetes(从纲到目); 土壤含水量 45% 有 2 组显著丰度差异的真菌, 即子囊菌门(从纲到属)和被孢霉属 *Mortierella*(从门到属)。此外, 土壤含水量 15% 和 45% 中占主要优势的真菌分别是散囊菌纲 Eurotiomycetes 和被孢霉科 Mortierellaceae(图 4 - B)。

2.1.5 白芨菌根真菌 Beta 多样性分析

通过 Beta 多样性分析不同土壤含水量水平之间菌根真菌多样性的差异。由图 5 可知, 白芨菌根真菌在不同土壤含水量条件下存在差异, 同时造成该差异的最大主成分(PC1)可解释其中 23.87% 的差异。

2.2 土壤含水量对菌根真菌侵染过程的影响

2.2.1 白芨根部结构 在不同土壤含水量条件下, 白芨根部结构一致, 从外至内可分为表皮(根被)、皮层、中柱 3 部分(图 6)。但根径、根被厚度和中皮层细胞层数等随着土壤含水量减少无显著差异。在光学显微镜下可观察到根最外围的是若干层扁平砖状表皮细胞(即根被), 且土壤含水量为 15% 时, 根被最厚(56.5 μm)。根被向内是皮层组织, 在根中占最大的比例, 又分为外皮层、中皮层和内皮层。外皮层是紧挨着根被的 1 层长短表皮细胞间隔

排列的多角形细胞, 其中短的表皮细胞体积较小、近方形且细胞核膨大, 又称通道细胞。外皮层向内为中皮层, 细胞体积较大, 近似等径球形, 排列疏松, 土壤含水量为 15% 时细胞层数最多, 为(7 ± 1)层。部分皮层细胞中出现针状结晶。中皮层向内是由单层细胞组成的内皮层, 细胞体积较小, 排列紧密整齐。内皮层向内是由中柱鞘、维管束和髓组成的中柱, 经番红固绿对染后, 木质部被染成红色, 韧皮部被染成蓝色; 当土壤含水量为 45% 时维管束数量最多(11 个)。

2.2.2 白芨在不同土壤含水量下的菌根真菌侵染方式和菌丝形态特征

由图 6 可知, 在不同土壤含水量条件下, 白芨菌根真菌侵染方式无差异, 均通过通道细胞进入根的皮层细胞, 菌丝穿过细胞壁后继续向邻近细胞扩展并集中分布于皮层细胞的某一区域; 染菌细胞的细胞核常膨大, 同时可观察到形状不一、呈蓝绿色的菌丝或菌丝团, 且菌丝常向细胞核靠近。

由表 2 可知, 白芨的真菌侵染率和菌丝团数量等菌丝特征受土壤含水量的影响存在一定差异。当土壤含水量为 45% 时的真菌侵染率最高, 为 25%, 共有 63 个菌丝团; 皮层细胞中存在 2 种不同的菌丝形态, 即丝状菌丝团和团块状菌丝团, 且丝状菌丝团居多; 邻近染菌细胞的未侵染细胞的细胞

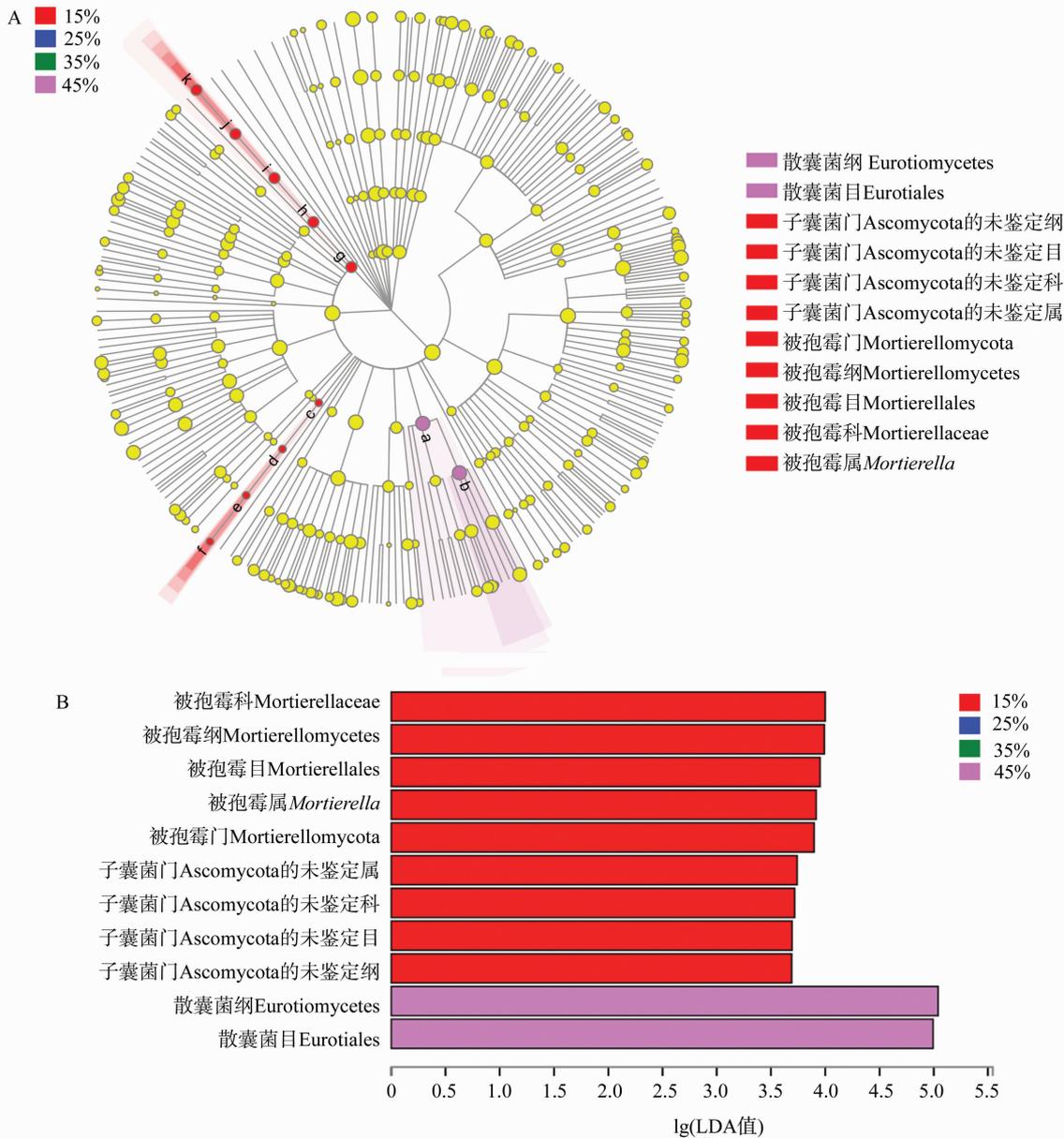


图4 不同土壤含水量的菌根真菌 Lefse 多级物种树图(A)和 LDA 值分布柱图(B)

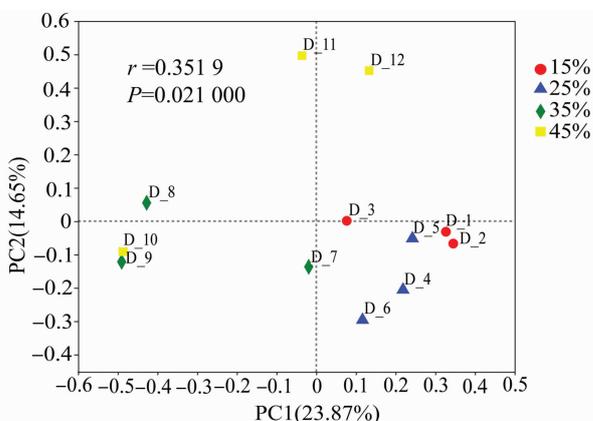


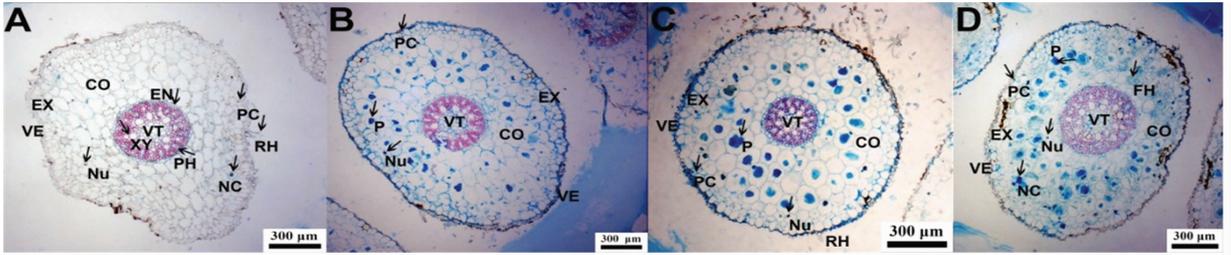
图5 不同土壤含水量的白芨菌根真菌 OTUs 的 PCoA 距离分析结果

核膨大, 番红固绿对染后呈红色。当土壤含水量为 25% 和 35% 时, 真菌侵染率均下降为 15%, 并以团块状菌丝团为主, 但菌丝团数量存在差异, 土壤含水量 25% (37 个) 高于土壤含水量 35% (32 个)。当土壤含水量为 15% 时菌根真菌侵染率最低 (5%), 仅存在少量菌丝残结。

### 2.3 土壤含水量对白芨碳氮同位素特征和光合特性的影响

#### 2.3.1 土壤含水量对白芨碳氮同位素特征的影响

在不同土壤含水量水平下, 白芨叶片的  $\delta^{13}C$  值均明显高于对照植物, 不同土壤含水量水平之间白芨  $\delta^{13}C$  值变化很小,  $\delta^{13}C$  值介于  $-26.99\text{‰} \sim$



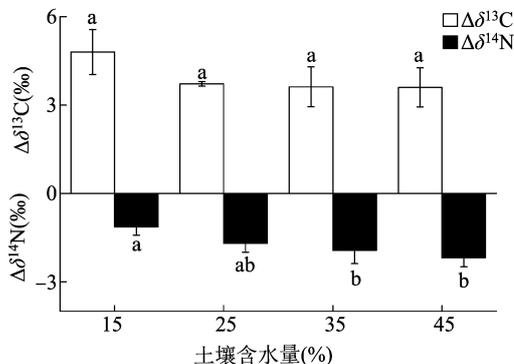
A. W1; B. W2; C. W3; D. W4. CO—皮层; EN—内皮层; EX—外皮层; FH—菌丝; NC—针状结晶; Nu—细胞核; P—菌丝团; PC—通道细胞; PH—韧皮部; PR—中柱鞘; PT—髓; RH—根毛; VE—根被; VT—维管组织; XY—木质部; \*示菌丝穿越细胞

图6 不同土壤含水量下白芨菌根的横切面结构

表2 土壤含水量对白芨菌丝形态特征的影响(平均值±标准偏差)

土壤含水量 (%)	菌丝团数量 (个)	菌丝形态	侵染率 (%)
15%	1 ± 2b	团块状菌丝团	5 ± 9b
25%	37 ± 20ab	团块状菌丝团	15 ± 0ab
35%	32 ± 23ab	团块状菌丝团	15 ± 0ab
45%	63 ± 48a	团块状菌丝团和丝状菌丝团	25 ± 17a

-28.19‰ 之间, 变幅为 1.2‰。由图 7 可知, 不同土壤含水量水平之间  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  值无差异。白芨叶片的  $\delta^{15}\text{N}$  在不同土壤含水量水平下低于对照植物,  $\delta^{15}\text{N}$  值范围为 1.29‰ ~ 2.32‰。同时  $\Delta\delta^{15}\text{N}$  随着土壤含水量的减少而增加, 其中当土壤含水量为 15% 时  $\Delta\delta^{15}\text{N}$  值最高, 为 -1.14‰; 土壤含水量为 25% 和 35% 次之; 土壤含水量为 45% 时  $\Delta\delta^{15}\text{N}$  值最低, -2.18‰ (图 7)。对白芨叶片  $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$  和土壤含水量进行相关分析, 发现  $\delta^{13}\text{C}$  与土壤含水量呈极强负相关 (相关系数为 -0.824),  $\delta^{15}\text{N}$  与土壤含水量呈显著负相关 (相关系数为 -0.974,  $P < 0.05$ ), 同时  $\delta^{13}\text{C}$  与  $\delta^{15}\text{N}$  呈极强正相关 (相关系数为 0.933) (表 3)。



纵坐标数值为不同土壤含水量条件下的碳氮稳定同位素丰度值与对照植物的差值; 同一稳定素中的不同字母表示不同土壤含水量之间存在显著差异 ( $P < 0.05$ )

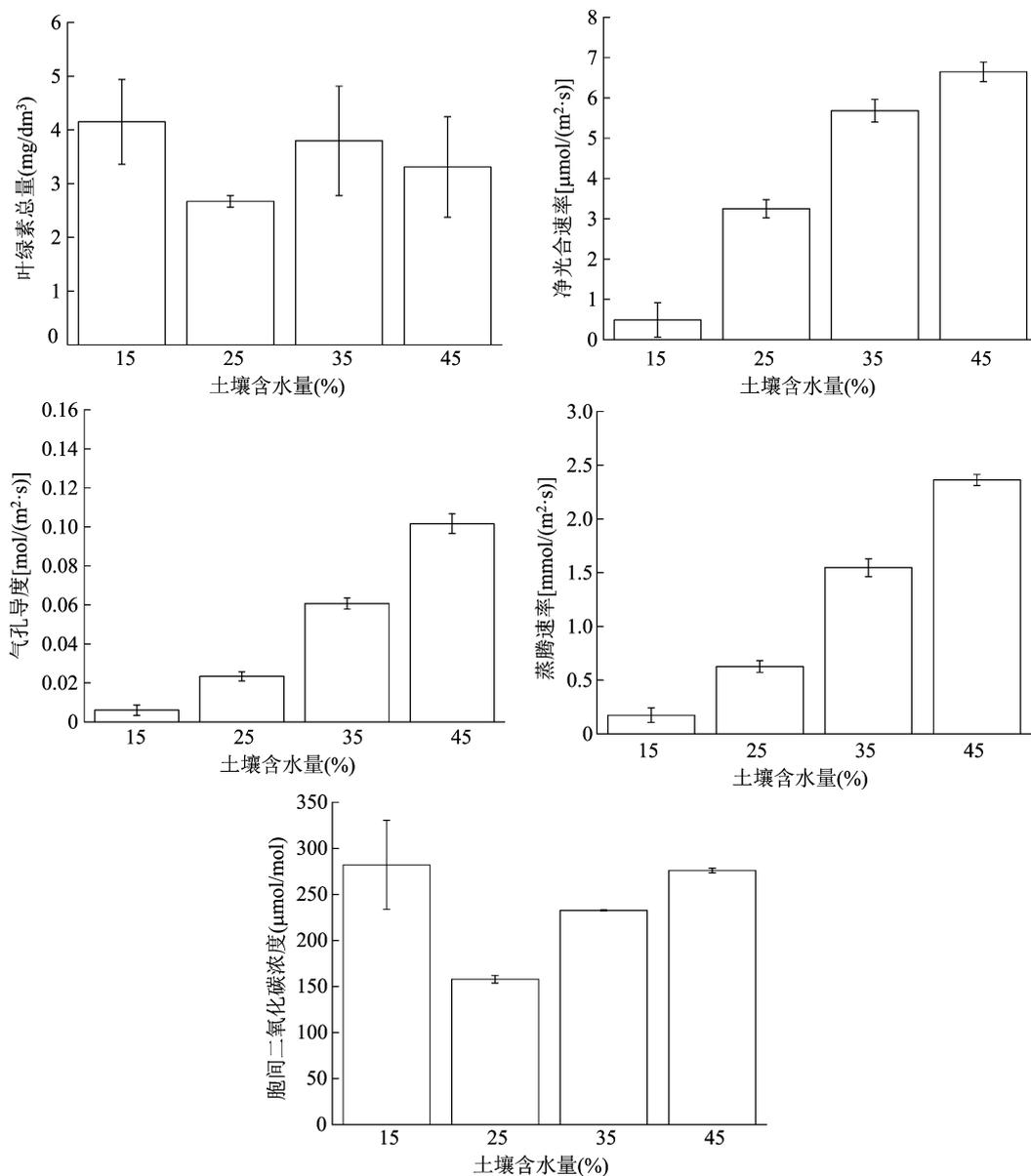
图7 土壤含水量对白芨 $^{13}\text{C}$ 和 $^{15}\text{N}$ 丰富度的影响

2.3.2 土壤含水量对白芨光合特性的影响 不同土壤含水量条件下, 菌根真菌对白芨光合特性产生影响。白芨叶片的叶绿素总量在不同土壤含水量条件下无差异, 但叶片净光合速率、气孔导度、蒸腾速率和胞间  $\text{CO}_2$  浓度存在显著差异 (图 8)。净光合速率、气孔导度和蒸腾速率随土壤含水量的减少而明显降低。当土壤含水量为 45% (W4) 时, 叶片净光合速率  $6.65 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  明显高于其余 3 个土壤含水量水平; W4 的气孔导度  $0.10 \text{ mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  也是明显高于其余 3 个土壤含水量水平; 同时蒸腾速率随土壤含水量的减少而逐渐降低, 即 W4 [ $2.36 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ] > W3 [ $1.55 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ] > W2 [ $0.63 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ] > W1 [ $0.17 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ]。随土壤含水量的减少, 胞间  $\text{CO}_2$  浓度在土壤含水量为 15% (W1) 时达到顶峰 ( $282.02 \mu\text{mol}/\text{mol}$ ), 而土壤含水量 25% (W2) 最低 ( $157.93 \mu\text{mol}/\text{mol}$ )。此外,  $\delta^{13}\text{C}$  与净光合速率呈极强负相关, 与气孔导度呈强负相关;  $\delta^{15}\text{N}$  与净光合速率呈极强负相关 ( $P < 0.05$ ), 与气孔导度呈极强负相关 (表 3)。

### 3 讨论与结论

本研究从细胞水平与分子水平、形态及生理等方面研究土壤含水量对白芨与菌根真菌共生关系的影响。结果表明, 土壤含水量为 45% 时是白芨与菌根共生的最佳水平; 干旱胁迫条件下, 菌根真菌会通过增加物种多样性和改变菌根真菌群落组成来增加对兰科植物的养分供给, 从而弥补干旱对植物所造成的生理伤害。

对于地生兰植物来讲, 影响植株生长的土壤因子和影响兰科植物分布的因子是不可分割的<sup>[8]</sup>。土壤因子对兰科植物的重要性以及它是如何改变兰科植物与菌根真菌共生关系是生态学的一个重要领域, 而这方面的知识在很大程度上仍知之甚



同一参数不同小写字母表示不同土壤含水量之间存在显著差异( $P < 0.05$ )

图8 土壤含水量对白苕光合参数的影响

表3 不同土壤含水量条件下白苕  $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$  与光合参数的相关性分析

项目	相关系数							
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	叶绿素总量	净光合速率	气孔导度	蒸腾速率	胞间 $\text{CO}_2$ 浓度	土壤含水量
$\delta^{13}\text{C}$	1	0.933	0.638	-0.898	-0.718	-0.746	0.446	-0.824
$\delta^{15}\text{N}$	0.933	1	0.451	-0.988*	-0.920	-0.934	0.105	-0.974*

注: $\delta^{13}\text{C}$  为  $^{13}\text{C}$  的丰富度, $\delta^{15}\text{N}$  为  $^{15}\text{N}$  的丰富度;\* 表示 0.05 水平上显著相关。

少。干旱常被证明是造成地生兰植物种群分布的重要因素<sup>[13]</sup>,同时土壤湿度和透气性会直接影响菌根真菌的生长发育和菌根共生体的形成<sup>[1]</sup>。我们观察到白苕菌根真菌总数和优势菌属数随土壤含水量的减少而增加,最有可能的解释是土壤含水量

缺乏时,菌根真菌的多样性增加是为了提高白苕的抗旱性,缓解干旱胁迫<sup>[14]</sup>。本研究发现随着土壤含水量的减少,白苕优势菌属最终被伞菌纲(OTU398、OTU287、OTU246)和蜡壳耳目(OTU289、OTU356、OTU764)真菌所替代,可见这些真菌更适宜在干旱

环境中生存并促进白芨菌根共生体的形成,对白芨应对干旱胁迫有重要的意义。这也进一步验证了McCormick等的研究结果:干旱条件会抑制斑叶兰接触菌根真菌,迫使植物转换共生真菌<sup>[8]</sup>。水分胁迫会抑制光合作用,降低蒸腾速率,阻碍植物生长<sup>[15]</sup>。本研究结果与以往研究结果一致,即白芨叶片的净光合速率、气孔导度和蒸腾速率均随着土壤含水量的减少而下降。结合菌根真菌的种类随着土壤含水量减少有所增加的结果,可以推测干旱对白芨所造成的生理伤害更严重,而菌根真菌只能缓解干旱胁迫程度,并无法完全弥补这一伤害。鉴于土壤含水量、菌根真菌和白芨三者之间的相互关系,未来在白芨等其他兰科植物的栽培管理上一定要注意保证土壤水分充足,同时筛选出抗旱菌根真菌,针对性制备菌剂,为兰科植物保育提供参考依据。

白芨菌根真菌的侵入方式不受土壤含水量的影响,均是通过通道细胞进入皮层细胞,且菌丝穿过细胞壁侵染邻近细胞继续扩展,最终在皮层细胞中定殖。这与郭顺星的研究结果<sup>[16]</sup>类似,指出白芨菌根真菌是通过根毛和通道细胞侵入菌根内。白芨菌根真菌的侵染率和菌丝团数量随土壤含水量的减少而下降,但白芨菌根真菌总数随土壤含水量的减少而增加,可见菌根真菌侵染率和菌丝团数量只能作为不同土壤含水量条件下菌根差异比较的指标,但不可作为判断真菌多样性的标准。有研究表明菌丝团形态代表某一菌根真菌种类的一种表现形态<sup>[17]</sup>。本研究发现当土壤含水量为45%时存在2种形态的菌丝团(丝状和团块状),而土壤含水量减少后仅存在团块状菌丝团。由此推测,这是白芨在不同土壤含水量条件下需要依赖不同的菌根真菌造成的。

总之,白芨与菌根真菌共生关系对土壤含水量缺乏的响应是由土壤水分缺乏程度、白芨、菌根真菌等多种因素影响的复杂反应过程,有待于进一步深入研究二者共生关系响应干旱胁迫的分子机制。

#### 参考文献:

- [1] 刘润进,陈应龙. 菌根学[M]. 北京:科学出版社,2007:35-36, 221-222.
- [2] 梁宇,郭良栋,马克平. 菌根真菌在生态系统中的作用[J]. 植物生态学报,2002,26(6):739-745.
- [3] McCormick M K, Whigham D F, O'Neill J P, et al. Abundance and distribution of *Corallorhiza odontorhiza* reflect variations in climate and ectomycorrhizae [J]. *Ecological Monographs*, 2009, 79(4): 619-635.
- [4] Gale S W, Yamazai J, Hutchings M J, et al. Constraints on establishment in an endangered terrestrial orchid: a comparative study of *in vitro* and *in situ* seed germinability and seedling development in *Nervilia nipponica* [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2010, 163(2): 166-180.
- [5] Phillips R D, Brown A P, Dixon K W, et al. Orchid biogeography and factors associated with rarity in a biodiversity hotspot, the Southwest Australian Floristic Region [J]. *Journal of Biogeography*, 2011, 38(3): 487-501.
- [6] 魏明,童秦怡,柴瑞娟,等. 兰科菌根真菌对于干旱胁迫下铁皮石斛生长和抗氧化能力及相关基因表达的影响[J]. 西北植物学报,2018,38(10):1905-1912.
- [7] Diez J M. Hierarchical patterns of symbiotic orchid germination linked to adult proximity and environmental gradients [J]. *Journal of Ecology*, 2007, 95(1): 159-170.
- [8] McCormick M K, Whigham D F, Sloan D, et al. Orchid-fungus fidelity: a marriage meant to last? [J]. *Ecology*, 2006, 87(4): 903-911.
- [9] Qian C D, Jiang F S, Yu H S, et al. Antibacterial biphenanthrenes from the fibrous roots of *Bletilla striata* [J]. *Journal of Natural Products*, 2015, 78(4): 939-943.
- [10] Biermann B, Linderman R G. Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizas: a proposed method towards standardization [J]. *New Phytologist*, 1981, 87(1): 63-67.
- [11] 舒展,张晓素,陈娟,等. 叶绿素含量测定的简化[J]. 植物生理学通讯,2010,46(4):399-402.
- [12] 庞雄飞,尤民生. 昆虫群落生态学[M]. 北京:农业出版社,1996:77-103.
- [13] Reddoch J M. Population dynamics and flowering synchrony of *Goodyera pubescens* (Orchidaceae) in southwestern Quebec, Canada [J]. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 2007, 134(3): 379-388.
- [14] McCormick M K, Whigham D F, O'Neill J P. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids [J]. *New Phytologist*, 2004, 163(2): 425-438.
- [15] 向丹,徐天乐,李欢,等. 丛枝菌根真菌的生态分布及其影响因素研究进展[J]. 生态学报,2017,37(11):3597-3606.
- [16] 郭顺星. 药用植物内生真菌生物学[M]. 北京:科学出版社,2016:632.
- [17] Kristiansen K A, Taylor D L, Køller R, et al. Identification of mycorrhizal fungi from single pelotons of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) using single-strand conformation polymorphism and mitochondrial ribosomal large subunit DNA sequences [J]. *Molecular Ecology*, 2001, 10(8): 2089-2093.