

刘 燕,曾维军,杨秀忠. 威宁短柱油茶根围丛枝菌根真菌多样性调查[J]. 江苏农业科学,2024,52(17):268–276.  
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2024.17.036

# 威宁短柱油茶根围丛枝菌根真菌多样性调查

刘 燕<sup>1</sup>, 曾维军<sup>1</sup>, 杨秀忠<sup>2</sup>

(1. 贵州省生物研究所, 贵州贵阳 550009; 2. 威宁自治县山地特色农业科学研究所, 贵州威宁 553100)

**摘要:**为了揭示高寒山区野生油茶(威宁短柱油茶)根围土壤丛枝菌根真菌(AMF)的结构与组成,解析土壤因子对 AMF 群落组成及其多样性的影响,为高寒山区抗逆性 AMF 资源的发掘及物种多样性研究提供理论依据,以贵州省高寒山区分布的威宁短柱油茶 7 个样地根围土壤为材料,采用高通量测序结合形态学鉴定的方法,研究威宁短柱油茶 AMF 的侵染情况、群落结构、遗传多样性、AMF 种类,并进行土壤因子与 AMF 相关性分析。结果显示,威宁短柱油茶 AMF 侵染率在不同样地中存在差异。7 个样地的 AMF 菌丝侵染率、丛枝侵染率、泡囊侵染率、总侵染率、侵染强度的平均值分别为 59.52%、13.49%、51.59%、65.87%、61.11%。通过高通量测序,7 个样地共鉴定到 5 属 46 种 AMF,其中球囊霉属(*Glomus*)的相对丰度最高,为优势类群;VTX00223 为优势虚拟种。7 个样地的 AMF 群落组成和相对丰度差异较大,但  $\alpha$  多样性无显著差异。RDA 分析表明,全磷、速效钾、碱解氮含量对无梗囊霉属(*Acaulospora*)的基因丰度有正向影响,盾巨孢囊霉属(*Scutellospora*)、类球囊霉属(*Paraglomus*)的基因丰度与全磷含量相关,而全钾含量影响球囊霉属的基因丰度。此外,通过形态学,鉴定到 4 属 13 种 AMF;其中球囊霉属 6 种,无梗囊霉属 5 种,盾巨孢囊霉属、原囊霉属各 1 种;*G. sp1* 出现频率最高,为 7 个样地共有。贵州高寒山区野生油茶根围土壤中的 AMF 资源丰富,土壤因子是影响 AMF 侵染的一个重要因素,AMF 种类对土壤因子有一定选择性。

**关键词:**威宁短柱油茶;丛枝菌根真菌;高通量测序;土壤因子;多样性;形态学鉴定

**中图分类号:**S718.81;S794.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2024)17–0268–09

油茶(*Camellia* spp.)属山茶科(Theaceae)山茶属植物,广泛分布于我国南方亚热带地区,少量分布于东南亚北部<sup>[1]</sup>。油茶是集食用、药用、化工为一体的优良树种,油茶籽油的不饱和脂肪酸达 90% 以上,茶壳、茶枯可应用于日用化工、肥料、生物制药、生物农药等领域<sup>[2–3]</sup>。威宁短柱油茶(*C. weiningensis* Y. K. Li. sp. nov)是一种野生油茶种类,主要分布于贵州省威宁县,是怒江红山茶(*C. saluenensis* Stapf ex Bean)威宁种源的统称<sup>[4–5]</sup>。它与普通油茶相比,垂直分布高(海拔 1 800 ~ 2 700 m),成熟早,果皮、种壳薄,出油率高,油质好,同时抗寒、抗旱、耐瘠薄土壤等抗逆性也较强<sup>[6–7]</sup>,是贵州省高寒山地经济林业发展的主推树种<sup>[8]</sup>。目前,威宁短柱油茶在其资源调查与利用<sup>[6–8]</sup>、种子油脂含量及成分分析<sup>[9]</sup>、扦插繁育<sup>[4–5]</sup>、苗木质量分

级<sup>[10]</sup>等方面已逐步受到关注,但其与土壤微生物之间的相关研究还鲜见报道。近年来,国内外学者证实菌根真菌是一种有益于植物生长和生存的土壤真菌,油茶的菌根真菌主要是丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhiza fungi, AMF)<sup>[11]</sup>。AMF 定殖普通油茶根部后,对其生长、品质改良、水肥吸收、耐逆性均有促进作用<sup>[12–14]</sup>。可见,AMF 在油茶种植生产中有着巨大的应用潜能。油茶根围 AMF 多样性调查和功能菌株的筛选是将 AMF 应用到油茶栽培种植的前提。关于低海拔地区油茶种类(普通油茶)及其品种间 AMF 物种多样性及群落结构已有相关报道<sup>[15–18]</sup>,但高寒山区野生油茶的 AMF 多样性研究仍鲜见。大量研究表明,地理分布差异会导致 AMF 的多样性和群落结构不同<sup>[19–22]</sup>,不同的 AMF 群落结构通常具有不同的功能特征<sup>[23–24]</sup>。因此,探明高寒山区野生油茶 AMF 的物种多样性和群落组成,对高寒山区野生油茶优良性状的形成尤为重要。为了了解高寒山区野生油茶根围土壤 AMF 的群落结构和特征,本研究以威宁短柱油茶 7 个林地的根围土壤为材料,通过 Illumina MiSeq 平台进行高通量测序,研究 AMF 物种多样性及与土壤肥力因子的相关

收稿日期:2024–07–20

基金项目:贵州省林业科研项目(编号:黔林科合[2022]05 号);贵州科学院博士基金(编号:黔科院 R 字[2021]2 号);贵州省科技计划(编号:黔科合支撑[2022]重点 017 号)。

作者简介:刘 燕(1981—),女,贵州贵阳人,博士,副研究员,主要从事植物种苗繁育及菌根真菌研究。E-mail:472395057@qq.com。

性。同时采用高通量和孢子形态学鉴定相结合的方法,探究根围土壤中的 AMF 种类,以期为后续高寒山区油茶功能性 AMF 的筛选及应用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 土样 供试样品采自威宁县境内威宁短柱油茶分布较广的 7 个林地<sup>[25]</sup>,具体采集地点见表 1。

1.2 试验方法

1.2.1 样品采集 试验开展于 2022 年 8 月。每个

采样地选取长势相似的野生油茶(树龄约为 30 年)各 5 株,去掉枯枝落叶层后,分别在距离植株主干 0~5 cm 范围内,采集 0~20 cm 土层深度的根系和土壤<sup>[26]</sup>。根系洗净泥土后用 FAA 固定液(70%乙醇)保存,用于观测 AMF 侵染情况。土壤样品用冰盒运回实验室后,一部分放入无菌袋中,保存于-80℃冰箱,用于 AMF 的 DNA 提取及高通量测序;一部分土样在实验室自然风干,用于土壤理化性质和 AMF 孢子分离及密度测定。

表 1 采样地点概况

样地编号	采集地点	经纬度	海拔(m)
XUESHAN	雪山镇大发村	27.240 050°N,104.130 591°E	2 001
DAJIE	大街乡高华村	27.029 088°N,104.248 046°E	2 158
TUJIE	兔街镇新光村	27.202 778°N,104.137 222°E	2 180
YUNGUI	云贵乡高发村	27.240 050°N,104.130 597°E	2 210
CAOHAI	草海镇大山村	26.755 160°N,104.340 620°E	2 352
MAZA	麻乍镇吊水村	26.681 131°N,104.080 366°E	2 421
HEISHI	黑石镇陆坪村	26.677 883°N,104.083 009°E	2 475

1.2.2 指标测定

1.2.2.1 土壤理化性 土壤 pH 值及全磷(TP)、全钾(TK)、全氮(TN)、有效磷(AP)、速效钾(AK)、碱解氮(AN)、有机质含量测定参照秦维等的方法<sup>[25]</sup>。

1.2.2.2 AMF 侵染率及孢子数量 采用碱解离-台盼蓝染色法<sup>[27]</sup>处理根样。各样本随机选取 30 个长 1 cm 的根样,在显微镜下观察 AMF 的侵染结构,并测定侵染率、侵染强度<sup>[28]</sup>,重复 3 次。采用湿筛倾析-蔗糖离心法<sup>[29]</sup>分离土壤中的 AMF 孢子,每份土样中取 10 g 风干土检测,重复 3 次,在体视显微镜下计算孢子密度(个/10 g 干土)。

1.2.2.3 AMF 的分子多样性 根据 E. Z. N. A.® soil DNA kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U. S.) 的使用说明,进行总 DNA 的提取。使用 NanoDrop 2 000(美国 Thermo Scientific 公司)检测 DNA 的浓度和纯度。用特异性引物 AML1/AML2(5'-ATCAA CTTTCGATGGTAGGATAGA-3';5'-GAACCCAAA CACTTTGGTTTCC-3')和 AMV4-5NF/AMDGR (5'-AGCTCGTAGTTGAATTTTCG-3';5'-CCCAAC TATCCCTATTAATCAT-3')进行巢式 PCR 扩增<sup>[30]</sup>。产物回收定量后,使用 NEXTFLEX® Rapid DNA-Seq 试剂盒对纯化 PCR 产物建库,利用 Illumina 公

司的 Miseq PE300 平台进行测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。

1.2.2.4 AMF 的分离与鉴定 用湿筛倾斜-蔗糖梯度离心法分离获得 AMF 孢子,采用尚昆等的方法<sup>[21]</sup>挑选和观察孢子形态,参照 <http://www.amf-phylogeny.com/>、<http://invamwvu.edu/home>、<http://www.zor.zut.edu.pl/>、<http://mycobank.org/>等网站上的种类描述,进行种属鉴定。

1.3 数据分析

利用 Uparse 7.0.1090 在 Silva 数据库(<http://www.arb-silva.de/>)进行 OTU 分析,采用 mothur v. 1.30.2(<http://www.mothur.org/wiki/Calculators>)计算 α 多样性指数 Chao 1、Shannon 指数等,并采用 Wilcoxon 秩和检验进行 α 多样性的组间差异分析;用 LEfSe 分析(Linear discriminant analysis Effect Size)(<http://huttenhower.sph.harvard.edu/LEfSe>)( $LDA>2, P<0.05$ )确定不同组间从门到属水平的丰度显著差异性。使用基于距离的冗余分析(distance-based redundancy analysis, db-RDA)来调查土壤因子对 AMF 群落的影响。采用 Origin Pro 8.5(<http://www.originlab.com/>)进行 AMF 侵染率和孢子密度绘图。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质

由表 2 可知,7 个样地均为酸性土壤(平均 pH 值为 4.54),样地 MAZA 的 pH 值最高,XUESHAN、CAOHAI、HEISHI 的 pH 值较低(3 个样地无显著性差异)。全磷含量最高的为样地 HEISHI,较低的是 TUJIE、XUESHAN(2 个样地间无显著差异);7 个样地的平均全磷含量为 1.38 g/kg。全氮含量较高的是样地 XUESHAN、YUNGUI、CAOHAI(3 个样地间无显著性差异),含量较低的是 DAJIE、MAZA、HEISHI(3 个样地间无显著差异);7 个样地的平均全氮含量为 2.15 g/kg。全钾含量最高的是样地 HEISHI,含量最低的是 CAOHAI,除样地 DAJIE 外,2 个样地与其他 4 个样地之间差异显著( $P<0.05$ );

7 个样地的平均全钾含量为 10.81 g/kg。有效磷含量最高的是样地 YUNGUI,最低的是 MAZA,2 个样地与其他 5 个样地之间差异显著( $P<0.05$ );7 个样地的平均有效磷含量为 1.43 mg/kg。碱解氮含量最高的是样地 TUJIE,最低的是 HEISHI,2 个样地与其他 5 个样地之间差异显著( $P<0.05$ );7 个样地的平均碱解氮含量为 74.72 mg/kg。速效钾含量最高的是样地 TUJIE,较低的是 DAJIE、CAOHAI、HEISHI(3 个样地之间无显著性差异);7 个样地的平均速效钾含量为 114.95 mg/kg。有机质含量最高的是样地 YUNGUI,较低的是 DAJIE、MAZA、HEISHI(3 个样地之间无显著性差异);7 个样地的平均有机质含量为 43.12 g/kg。由上可知,7 个样地间的土壤养分差异较大,存在空间异质性。

表 2 7 个样地的土壤理化性质

样地编号	pH 值	全磷含量 (g/kg)	全氮含量 (g/kg)	全钾含量 (g/kg)	有效磷含量 (mg/kg)	碱解氮含量 (mg/kg)	速效钾含量 (mg/kg)	有机质含量 (g/kg)
XUESHAN	3.96 ± 0.00d	0.49 ± 0.03d	3.57 ± 0.03a	10.17 ± 0.04c	1.07 ± 0.00c	124.39 ± 0.35b	111.00 ± 1.00b	56.32 ± 0.52b
DAJIE	5.16 ± 0.01b	1.78 ± 0.01b	0.74 ± 0.01c	4.27 ± 0.02e	1.65 ± 0.02b	32.92 ± 0.35d	78.00 ± 1.00c	22.31 ± 0.04e
TUJIE	4.45 ± 0.01c	0.44 ± 0.02d	2.49 ± 0.01b	10.36 ± 0.20c	1.21 ± 0.01c	162.16 ± 0.70a	222.00 ± 2.00a	41.26 ± 0.10d
YUNGUI	4.28 ± 0.01cd	1.80 ± 0.01b	3.48 ± 0.01a	17.85 ± 0.16b	2.39 ± 0.01a	31.83 ± 0.07d	130.33 ± 0.50b	85.99 ± 0.02a
CAOHAI	4.18 ± 0.01d	1.63 ± 0.01b	3.21 ± 0.01a	3.48 ± 0.06e	1.88 ± 0.03b	107.65 ± 2.06c	64.83 ± 1.50c	52.62 ± 3.54c
MAZA	5.58 ± 0.00a	1.24 ± 0.00c	0.69 ± 0.00c	7.61 ± 0.06d	0.45 ± 0.02d	38.12 ± 0.05d	120.00 ± 1.00b	20.96 ± 0.15e
HEISHI	4.17 ± 0.01d	2.25 ± 0.01a	0.87 ± 0.01c	21.93 ± 0.45a	1.33 ± 0.01c	25.99 ± 0.35e	78.50 ± 0.50c	22.35 ± 0.05e

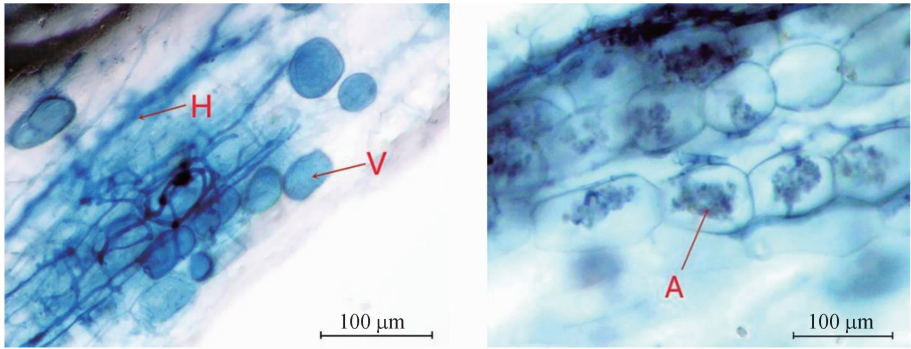
注:同列数据后不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

2.2 AMF 侵染率及孢子含量

威宁短柱油茶根系被 AMF 侵染后主要形成根外菌丝、根内菌丝、泡囊、丛枝等结构(图 1)。AMF 菌丝在根外形成菌丝网络,在根内沿纵轴延伸;菌丝末端膨大形成泡囊,大小不一,主要呈圆形、椭圆形;菌丝末端二分叉式生长,形成丛枝,主要以 Arum

型(疆南星型)丛枝为主。

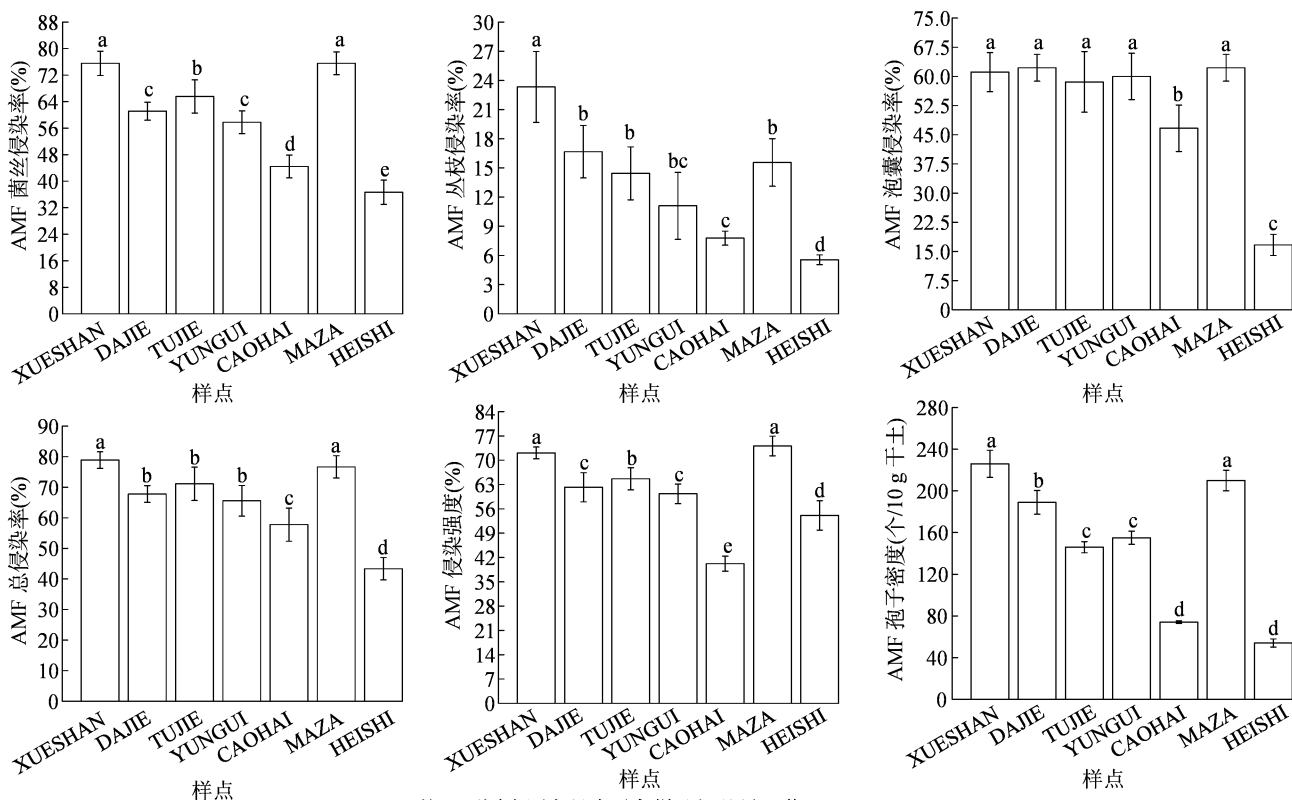
威宁短柱油茶 AMF 各结构侵染率在不同样地中存在差异(图 2)。AMF 菌丝侵染率最高的样地为 XUESHAN、MAZA,最低的是 HEISHI。AMF 丛枝侵染率最高的是样地 XUESHAN,其次为 DAJIE、TUJIE、MAZA、YUNGUI(4 个样地间无显著性差异),



H—菌丝; V—泡囊; A—丛枝  
图1 AMF 在威宁短柱油茶根系中的侵染结构

最低的是 HEISHI。AMF 孢囊侵染率最高的样地有 5 个, 分别是 XUESHAN、DAJIE、TUJIE、YUNGUI、MAZA; 最低的是 HESH。AMF 总侵染率最高的样地是 XUESHAN、MAZA, 其次为 DAJIE、TUJIE、YUNGUI, 样地 HEISHI 的总侵染率最低。可见, 不同样地间, AMF 总侵染率、菌丝侵染率变化趋势一致。AMF 侵染强度最高的是 XUESHAN、MAZA, 其

次为 TUJIE, 最低的是 CAOHAH。AMF 孢子密度最高的样地是 XUESHAN、MAZA, 其次为 DAJIE, 最低的是 HEISHI。7 个样地的菌丝侵染率、丛枝侵染率、孢囊侵染率、总侵染率、侵染强度的平均值分别为 59.52%、13.49%、51.59%、65.87%、61.11%, 平均孢子密度为 151 个/10 g 干土。



柱上不同小写字母表示各样地间差异显著( $P < 0.05$ )

图2 7个样地威宁短柱油茶 AMF 各结构侵染率及孢子密度

### 2.3 测序质量分析

7 个样地检测到 447 639 条原始序列, 归为 424 个 OTU。其中样地 XUESHAN 有 78 417 条有效序列, 53 个 OTU; DAJIE 有 58 566 条有效序列, 103 个 OTU; TUJIE 有 53 871 条有效序列, 68 个 OTU; YUNGUI 有 69 969 条有效序列, 50 个 OTU; CAOHAH 有 69 963 条有效序列, 34 个 OTU; MAZA 有 59 742 条有效序列, 73 个 OTU; HEISHI 有 57 111 条有效序列, 43 个 OTU。7 个样地共有的 OTU 较少, 仅 3 个。对序列按 97% 相似度进行归并和 OTU 划分, 利用 mothur 计算不同随机抽样下的  $\alpha$  多样性指数, 利用 R 语言工具制作稀释曲线。由图 3 可知, 7 个样地的稀释曲线均趋于平坦, 表明测序深度基本覆盖了样品中的所有物种, 测得的数据能反映威宁短柱

油茶根围 AMF 群落的真实情况, 可进行数据分析。

### 2.4 AMF 群落系统分类

除 3.91% 未注释到 OTU 外, 其余 OTU 经序列比对归为 1 门[球囊菌门 (Glomeromycota)], 1 纲[球囊菌纲 (Glomeromycetes)], 4 目[球囊霉目 (Glomerales)、多样孢囊霉目 (Diversisporales)、类球囊霉目 (Paraglomerales)、原囊霉目 (Archaeosporales)], 5 科[球囊霉科 (Glomeraceae)、巨孢囊霉科 (Gigasporaceae)、无梗囊霉科 (Acaulosporaceae)、类球囊霉科 (Paraglomeraceae)、原囊霉科 (Archaeosporaceae)] (表 2)。其中球囊霉科的相对丰度较高, 占 82.49%, 巨孢囊霉科、无梗囊霉科、类球囊霉科、原囊霉科的相对丰度较低, 分别为 5.61%、5.52%、1.54%、0.91%。

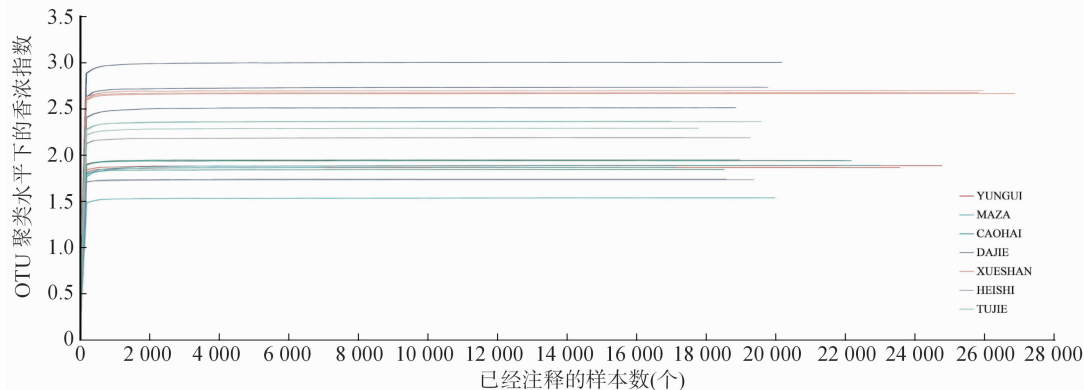


图3 威宁短柱油茶根围土壤 Shannon 指数稀释曲线

表 2 威宁短柱油茶根围土壤 AMF 群落系统分类

目	比例 (%)	科	比例 (%)
球囊霉目	82.38	球囊霉科	82.49
多样孢囊霉目	11.27	巨孢囊霉科	5.61
		无梗囊霉科	5.52
球囊霉目	1.54	类球囊霉科	1.54
原囊霉目	0.90	原囊霉科	0.91
		其他	3.07

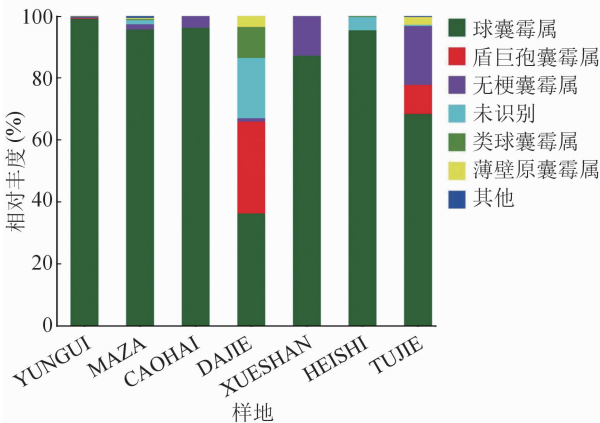


图4 威宁短柱油茶不同样地根围土壤 AMF 属水平分类单位组成及丰度

2.5 AMF 在属水平上的相对丰度变化

7 个样地 OTU 经序列比对划分为 5 个属,即球囊霉属 (*Glomus*)、盾巨孢囊霉属 (*Scutellospora*)、无梗囊霉属 (*Acaulospora*)、类球囊霉属 (*Paraglomus*)、原囊霉属 (*Archaeospora*) (图 4)。样地 YUNGUI、DAJIE、TUJIE 均检测到以上 5 个属的 AMF;5 个属的相对丰度,在样地 YUNGUI 分别为 99.01%、0.05%、0.02%、0.01%、0.01%,在 DUIJIE 分别为 36.21%、34.26%、1.86%、9.25%、3.67%,在 TUJIE 分别为 65.36%、7.86%、19.98%、2.32%、3.24%。样地 MAZA 仅检测到 4 个属,即球囊霉属、无梗囊霉属、类球囊霉属、原囊霉,其相对丰度分别为 95.06%、1.83%、1.66%、0.58%。样地 CAOHA、XUESHAN 检测到 2 个属的 AMF,即球囊霉属、无梗囊霉属,其相对丰度在 CAOHA 分别为 96.54%、3.46%,在 XUESHAN 分别为 90.36%、9.64%。样地 HEISHI 除了检测出球囊霉属的 AMF 外,还检测到类球囊霉属,其相对丰度分别为 95.32%、0.05%。可见,球囊霉属、无梗囊霉属为 6 个样地共有(样地 HEISHI 无无梗囊霉属)。此外,除样地 DAJIE、TUJIE 外,其余 5 个样地中球囊霉属的相对丰度均在 90% 以上,远高于其他属,为威宁短柱油茶根围 AMF 的优势属。

2.6 AMF 在种水平的物种丰度

从种水平上看,7 个样地共检测到 46 个 AMF 虚拟种,将丰度小于 1% 的虚拟种进行合并,得到丰度较高的 14 个虚拟种,其中 10 个被注释,4 个未被注释。由图 5 可以看出,丰度较高的虚拟种依次为 VTX00223、VTX00084、VTX00224、VTX00291,均为球囊霉属真菌。盾巨孢囊霉属、无梗囊霉属、类球囊霉属、原囊霉属虽有检出,但丰度较低。

2.7 AMF 群落的  $\alpha$  多样性指数

威宁短柱油茶 AMF 的  $\alpha$  多样性分析结果(表 3)显示,AMF 的辛普森(Simpson)指数最高的为样地 MAZA(35.64),最低的为 YUNGUI(10.09),7 个样地土壤中 AMF 的辛普森指数由高到低排序为 MAZA > CAOHA > HEISHI > XUESHAN > TUJIE > DAJIE > YUNGUI。Chao 1 指数最高的为样地 TUJIE(38.92),最低的为样地 CAOHA(22.50),7 个样地 Chao 1 指数由高到低依次为 TUJIE > YUNGUI > MAZA > XUESHAN > DAJIE > HEISHI > CAOHA。ACE 指数最高的为样地 YUNGUI(47.39),最低的为

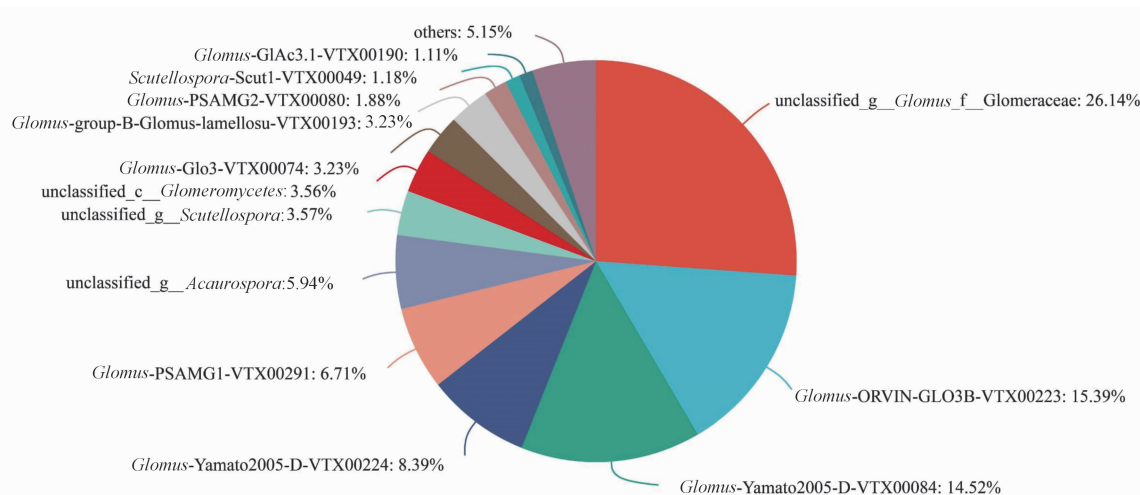


图5 威宁短柱油茶 7 个样地根围土壤AMF种水平丰度

CAOHAI(22.20), 7 个样地 ACE 指数由高到低依次为 YUNGUI>TUIJIE>XUESHAN>MAZA>DAJIE>HEISHI>CAOHAI。香农指数(Shannon)最高的为样地 YUNGUI(2.66),最低的为 MAZA(1.70),香农指数由高到低排序为 YUNGUI>DAJIE>TUIJIE>

CAOHAI>XUESHAN>HEISHI>MAZA。可见,7 个样地中 AMF 的 4 个多样性指数间变化趋势不一致。辛普森指数、Chao 1 指数、ACE 指数、香农指数的分析结果均未达到显著差异( $P>0.05$ ),表明地理分布对威宁短柱油茶 AMF 多样性影响不大。

表 3 威宁短柱油茶不同采样地根围土壤 AMF α 多样性指数

样地编号	辛普森指数	Chao1 指数	ACE 指数	香农指数
XUESHAN	19.88 ± 1.23	35.33 ± 9.07	38.59 ± 9.20	1.88 ± 0.04
MAZA	35.64 ± 6.01	36.28 ± 6.02	36.50 ± 5.56	1.70 ± 0.17
CAOHAI	20.36 ± 1.02	22.50 ± 3.91	22.20 ± 2.76	1.90 ± 0.06
DAJIE	13.93 ± 5.57	34.33 ± 3.06	34.54 ± 3.34	2.49 ± 0.28
YUNGUI	10.09 ± 0.35	38.67 ± 7.52	47.39 ± 10.79	2.66 ± 0.02
HEISHI	20.23 ± 2.89	22.67 ± 2.52	24.07 ± 5.30	1.84 ± 0.21
TUIJIE	14.29 ± 0.79	38.92 ± 5.79	39.55 ± 5.62	2.32 ± 0.03
F 值	0.17 <sup>NS</sup>	0.08 <sup>NS</sup>	0.13 <sup>NS</sup>	0.09 <sup>NS</sup>

注:NS 表示同一指数不同采样地间无显著差异( $P>0.05$ )。

2.8 AMF 的群落结构相似性及与土壤因子的关系

威宁短柱油茶根围 AMF 的群落结构相似性分析(图 6)显示,样地 MAZA、CAOHAI、HEISHI、YUNGUI 分布较集中,而 DAJIE、XUESHAN、TUIJIE 分布较分散,表明 MAZA、CAOHAI、HEISHI、YUNGUI 群落组成差异较小,而 DAJIE、XUESHAN、TUIJIE 群落组成差异较大。从图 6 中  $P$  值( $P=0.001$ )可以看出,威宁短柱油茶不同样地间的 AMF 属水平上的群落结构存在极显著差异。

由图 7 RDA 结果显示,第 1 排序轴解释群落变化的 90.25%,第 2 排序轴解释群落变化的 2.96%,则土壤因子对威宁短柱油茶 AMF 群落变异的解释量为 93.21%。威宁短柱油茶根围土壤中的碱解氮、

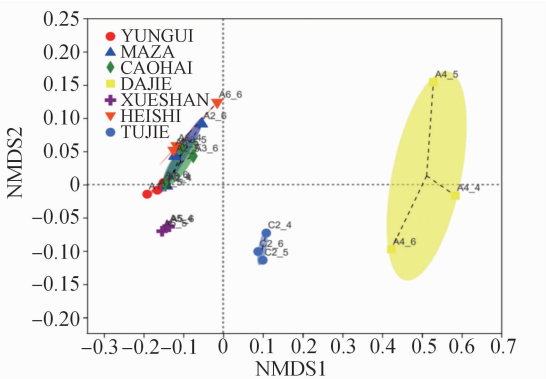


图6 威宁短柱油茶根围 AMF 的群落结构 NMDS 结果

全磷、全钾含量对 XUESHAN、DAJIE、YUNGUI 这 3 个样地的油茶根围土壤AMF群落分布有显著影响



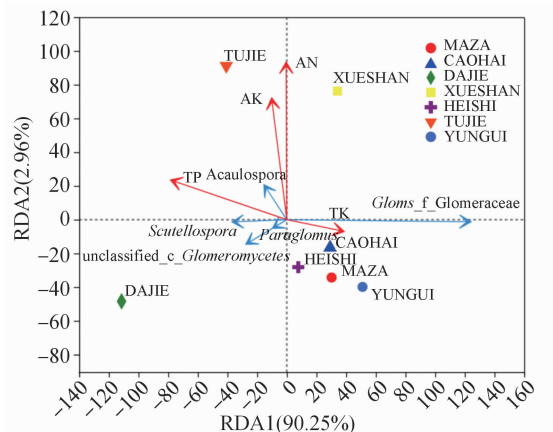


图7 威宁短柱油茶不同样地根围土壤 AMF 与土壤因子的 RDA 结果

( $P < 0.05$ )。土壤中全磷、速效钾、碱解氮含量对无梗囊霉属的基因丰度均有正向影响,其中对碱解氮含量的影响最大( $P < 0.05$ );全磷含量对盾巨孢囊霉属、类球囊霉属、某一种类球囊霉纲中不能识别物种 *unclassified\_c\_Glomeromycetes* 的基因丰度有正

向影响,其中对盾巨孢囊霉属的影响显著( $P < 0.05$ )。球囊霉属的微生物基因丰度仅受全钾含量的显著影响( $P < 0.05$ )。

2.9 AMF 孢子的形态学鉴定

对 7 个样地土壤 AMF 孢子进行分离和形态学鉴定,共鉴定出 4 属 13 种 AMF(表 4)。其中球囊霉属有 6 种(黄孢球囊霉 *G. flavisporum*、凹坑球囊霉 *G. Multiforum*、大果球囊霉 *G. macrocarpum*、*G. sp1*、*G. sp2*、*G. sp3*)、盾巨孢囊霉属有 1 种(美丽盾巨孢囊霉 *S. calospora*)、无梗囊霉属 *Acaulospora* 有 5 种(蜜色无梗囊霉 *A. mellea*、细凹无梗囊霉 *A. excavate*、科氏无梗囊霉 *A. koskei*、*A. sp1*、*A. sp1*)、原囊霉属有 1 种(波状原囊霉 *Ar. Undulata*)。每种 AMF 在 7 个样地中出现的频率存在差异。*G. sp1* 出现的频率最高,在 7 个样地中均有出现,*G. sp3*(出现在 5 个样地)、美丽盾巨孢囊霉(出现在 4 个样地)出现的频率次之,科氏无梗囊霉出现的频率最低,仅在 YUNGUI 样地中出现。

表 4 威宁短柱油茶不同样地 AMF 种类

AMF	MAZA	CAOHAI	DAJIE	XUESHAN	HEISHI	TUJIE	YUNGUI
蜜色无梗囊酶	+	-	+	-	-	-	-
细凹无梗囊霉	+	-	-	-	-	-	+
科氏无梗囊霉	-	-	-	-	-	-	+
<i>A. sp1</i>	+	+	+	-	+	-	-
<i>A. sp2</i>	-	-	-	+	-	+	+
美丽盾巨孢囊霉	-	+	-	+	-	+	+
波状原囊霉	+	-	-	-	-	+	+
黄孢球囊霉	-	-	-	-	-	+	-
凹坑球囊霉	+	+	-	+	-	+	-
大果球囊霉	-	+	-	-	-	-	-
<i>G. sp1</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>G. sp2</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>G. sp3</i>	+	+	-	+	+	-	+

注:“+”表示有,“-”表示无。

3 讨论

AMF 是根围微生物中的一个重要微生物,它能与陆地上 80% 的维管植物形成共生关系,具有促进寄主生长、抵抗多种胁迫环境等重要的生理和生态功能<sup>[31-32]</sup>。侵染率是反映真菌与寄主共生紧密度的一个指标。侵染率越高,表明真菌与寄主的共生越好,其对寄主发挥的作用越强<sup>[33]</sup>。本研究中,7 个样地威宁短柱油茶根系平均总侵染率为 65.87%,平

均侵染强度为 61.11%,表明 AMF 与威宁短柱油茶根系形成了良好的共生关系。从 AMF 侵染率和土壤孢子密度(平均孢子密度 151 个/10 g 干土)来看,威宁短柱油茶菌根化率较高,是菌根依赖性植物。一般来说,中性至微酸性土壤有利于 AMF 菌根的发育<sup>[20]</sup>。威宁短柱油茶主要生长在山地黄棕壤,其 pH 值平均为 4.54,可能是导致其侵染率高、菌根依赖性强的原因。此外,AMF 的孢子含量、根内菌丝侵染率、丛枝侵染率、泡囊侵染率、总侵染率等在

7 个样地间均存在差异,表明地理分布格局是影响 AMF 侵染的一个重要因素,这与曹敏等研究茅苍术根围丛枝菌根真菌多样性时得到的结论<sup>[20]</sup>一致。

本研究通过高通量测序发现,球囊霉属在所有检测出的种属中相对丰度最高,是所有样地的优势属,这与 Liu 等<sup>[15]</sup>、邓小军等<sup>[16]</sup>、周光荣等<sup>[17]</sup>的研究结果一致,表明球囊霉属是油茶林中 AMF 分布范围最广的属。球囊霉属是大多数植物根围的优势属<sup>[34-39]</sup>,这可能与球囊霉属真菌能够通过菌丝片段和菌根根段繁殖,具有较强的产孢能力和侵染能力有关<sup>[40]</sup>。周光荣等在研究普通油茶野生林 AMF 的多样性时发现,野生油茶根围的 AMF 有 6 个属<sup>[17]</sup>。本研究由高通量测序得到 5 个属的 AMF,孢子形态学鉴定得到 4 个属的 AMF,相较于普通油茶,威宁短柱油茶根围土壤中缺少了近明囊霉属 (*Claroideoglossum*)、多孢囊霉属 (*Diversispora*) 的 AMF,但比普通油茶多了盾巨孢囊霉属。这样的种属差异可能与 AMF 对寄主植物有一定的选择性、不同种类植物与菌根真菌的亲合性存在差异有关。普通油茶为我国分布最广且栽培最多的油茶种类,一般生长在海拔 1 200 m 以下的南方丘陵地区<sup>[3]</sup>。威宁短柱油茶则生长在海拔 1 800 ~ 2 700 m 的高海拔山地。AMF 与油茶种类的亲和性差异原因是否由海拔梯度造成,还有待进一步探讨。

土壤因子是影响 AMF 群落结构特征的重要因素<sup>[40]</sup>。大量研究显示,土壤 pH 值对 AMF 多样性影响显著<sup>[37-40]</sup>,可能是由于其影响了孢子萌发和菌丝生长<sup>[11]</sup>。本研究中,pH 值与威宁短柱油茶根围 AMF 群落组成无相关性,这或许与威宁短柱油茶林地 pH 值空间变异性较低(变异系数为 13.16%)有关。此外,RDA 结果表明,碱解氮含量对无梗囊霉属的基因相对丰度有显著影响( $P < 0.05$ );全磷含量对盾巨孢囊霉属、类球囊霉属的基因相对丰度有显著影响( $P < 0.05$ ),而全钾含量则显著影响了球囊霉属的基因相对丰度( $P < 0.05$ )。可见,不同种类的 AMF 对土壤养分存在一定的选择性。本研究只是进行了一次抽样,并没有在随后的几年中进行重复试验,故得出的威宁短柱油茶根围 AMF 时空多样性还不够全面,后续将采取多个和连续样本来分析威宁短柱油茶 AMF 的时空多样性。

本研究采用高通量测序技术在威宁短柱油茶根围检测到 5 科、5 属、46 种 AMF,其中球囊霉属、无梗囊霉属在 6 个样地中共有,表明 2 个属的真菌

分布较广泛。通过孢子形态学鉴定,7 个样地共鉴定到 4 科 4 属 13 种 AMF 真菌,其中球囊霉属种类最多,其次是无梗囊霉属,2 种方法检测出来的优势种属结果相一致,但高通量测序获得的检测结果更多,更能反映威宁短柱油茶根围 AMF 多样性的真实情况。虽然高通量测序技术能更真实地反映植物根围 AMF 结构和种类,但却无法分离 AMF。想要保存和利用 AMF 资源,孢子形态学鉴定方法必不可少。通过形态学和分子鉴定相结合的方法获取 AMF 种类,可为优质 AMF 资源的发掘提供理论依据。

## 4 结论

本研究通过高通量测序分析 7 个样地威宁短柱油茶的 AMF 群落结构及其多样性,结果表明,威宁短柱油茶根系 AMF 平均总侵染率为 65.87%,每 10 g 干土中含孢子 151 个,具有较高的菌根依赖性;其 AMF 群落组成和相对丰度差异较大,但多样性无显著差异;通过高通量测序,7 个样地共鉴定到 5 属 46 种 AMF,其中球囊霉属的相对丰度最高,为优势类群,VTX00223 为优势虚拟种。通过孢子形态学,鉴定到 4 属 13 种 AMF。其中球囊霉属 6 种,无梗囊霉属 5 种,盾巨孢囊霉属、原囊霉属各 1 种,*G. sp1* 出现频率最高,为 7 个样地共有。2 种方法检测出来的优势种属结果相一致;土壤因子是影响 AMF 侵染的一个重要因素,其中碱解氮、全磷、全钾含量是影响威宁短柱油茶根围 AMF 群落结构和组成的主要土壤因子。威宁短柱油茶根围 AMF 资源丰富,可为以后开发油茶抗逆性专用 AMF 菌肥提供丰富的菌种资源。

## 参考文献:

- [1] 陈永忠. 油茶优良种质资源[M]. 北京:中国林业出版社, 2008:15.
- [2] 李 宁,贺均林,王 敏. 山茶油的药理活性及专利应用[J]. 广州化工,2013,41(10):30-33.
- [3] 庄瑞林. 中国油茶[M]. 2 版. 北京:中国林业出版社,2012:3-4.
- [4] 刘 燕. 威宁短柱油茶插穗生根发育及生理特性研究[J]. 西部林业科学,2022,51(2):13-19.
- [5] 曾维军,秦 维,安常蓉,等. 威宁短柱油茶扦插育苗技术研究[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版),2022,40(3):27-32.
- [6] 李永康,王道植,梁纬祥,等. 威宁短柱油茶的初步研究[J]. 林业科学,1980,16(3):198-202.
- [7] 王道植,梁纬祥,黄鹤先,等. 贵州高寒山区发现野生的威宁短柱



- 油茶[J]. 林业科技通讯,1979(9):16-17.
- [8]耿继斌,许杰,王进,等. 威宁短柱油茶资源现状调查及利用[J]. 安徽农业科学,2019,47(18):128-131.
- [9]严梅和,李和. 威宁短柱油茶种子油中的脂肪酸、甾醇和三萜醇的研究[J]. 高等学校化学学报,1984,5(3):355-360.
- [10]李芳,宁选争,王进,等. 威宁短柱油茶苗木质量分级研究[J]. 种子,2022,41(5):133-138.
- [11]Liu R C, Xiao Z Y, Hashem A, et al. Unraveling the interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Camellia* plants[J]. Horticulturae,2021,7(9):322.
- [12]王东雪,陈国臣,江泽鹏. 丛枝菌根对油茶幼苗生长和氮磷吸收的影响[J]. 林业科技开发,2010,24(1):23-26.
- [13]林宇岚,王琳,楼玫娟,等. AM 真菌与有机磷施肥对油茶光合特性的影响[J]. 江西农业大学学报,2021,43(1):136-143.
- [14]林宇岚,李正昀,张林平,等. 有机磷和 AM 真菌对油茶生长、根系形态和光合作用的影响[J]. 经济林研究,2021,39(1):121-128,210.
- [15]Liu R C, Xiao Z Y, Hashem A, et al. Mycorrhizal fungal diversity and its relationship with soil properties in *Camellia oleifera* [J]. Agriculture,2021,11(6):470.
- [16]邓小军,周国英,刘君昂,等. 湖南油茶林丛枝菌根真菌多样性及其群落结构特征[J]. 中南林业科技大学学报,2011,31(10):38-42.
- [17]周光荣,尚昆,江龙. 野生油茶根围土壤的 AM 真菌多样性调查[J]. 贵州大学学报(自然科学版),2019,36(6):26-31.
- [18]林宇岚,李正昀,吴斐,等. 不同品种油茶根际丛枝菌根真菌群落结构特征[J]. 林业科学研究,2020,33(5):163-169.
- [20]曹敏,胡开治,刘燕琴,等. 高通量测序分析重庆地区茅苍术根际丛枝菌根真菌多样性[J]. 微生物学通报,2020,47(9):2877-2886.
- [21]尚昆,石磊,李海波,等. 梵净山不同海拔丛枝菌根真菌多样性[J]. 东北林业大学学报,2020,48(2):76-80.
- [22]张之为,田永伟,杨剑峰,等. 内蒙古中部地区马铃薯根际和根系丛枝菌根真菌类群的多样性[J]. 微生物学通报,2020,47(3):738-748.
- [23]Jiang S J, Liu Y J, Luo J J, et al. Dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal community structure and functioning along a nitrogen enrichment gradient in an alpine meadow ecosystem[J]. New Phytologist,2018,220(4):1222-1235.
- [24]Helgason T, Merryweather J W, Denison J, et al. Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland[J]. Journal of Ecology,2002,90(2):371-384.
- [25]秦维,曾维军,罗文敏,等. 威宁短柱油茶林地土壤肥力及对果实产量和含油率的影响[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版),2023,45(5):114-120.
- [26]Zhang F, Wang P, Zou Y N, et al. Effects of mycorrhizal fungi on root-hair growth and hormone levels of taproot and lateral roots in trifoliate orange under drought stress[J]. Archives of Agronomy and Soil Science,2018,65(9):1316-1330.
- [27]Phillips J M, Hayman D S. Improved procedures for cleaning and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection[J]. Transactions of the British Mycological Society,1970,55:158-161.
- [28]Biermann B, Linderman R G. Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae: a proposed method towards standardization[J]. New Phytologist,1981,87(1):63-67.
- [29]Ianson D C, Allen M F. The effects of soil texture on extraction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores from arid sites[J]. Mycologia,1986,78(2):164-168.
- [30]van Geel M, Busschaert P, Honnay O, et al. Evaluation of six primer pairs targeting the nuclear rRNA operon for characterization of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities using 454 pyrosequencing[J]. Journal of Microbiological Methods,2014,106:93-100.
- [31]Solís-Rodríguez U R J, Ramos-Zapata J A, Hernández-Cuevas L, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi diversity and distribution in tropical low flooding forest in Mexico[J]. Mycological Progress, 2020,19(3):195-204.
- [32]刘宇乐,姜宛彤,苏文欣,等. 丛枝菌根真菌调控植物耐盐碱机制研究进展[J]. 江苏农业科学,2022,50(19):9-17.
- [33]Yan L, Wei X L. Dark septate endophyte improves drought tolerance of *Ormosia hosiei* hemsley & E. H. Wilson by modulating root morphology, ultrastructure, and the ratio of root hormones[J]. Forests,2019,10(10):830.
- [34]Daniell T J, Husband R, Fitter A H, et al. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops[J]. FEMS Microbiology Ecology,2001,36(2/3):203-209.
- [35]Wu Q, Sun P, Srivastava A K. AMF diversity in citrus rhizosphere[J]. Indian Journal of Agricultural Sciences,2017,87(5):653-656.
- [36]Tabti S, Bendimered-Mouri F Z. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of *Plantago coronopus* in Northwestern Algerian coast[J]. Journal of Degraded and Mining Lands Management,2022,9(2):3397-3404.
- [37]宋娟,任嘉红,陈凤毛,等. 枫香根围丛枝菌根真菌多样性[J]. 林业科学,2021,57(9):98-109.
- [38]石兆勇,王发园,陈应龙. 五指山常见热带树种的丛枝菌根真菌多样性[J]. 生态学报,2007,27(7):2896-2903.
- [39]Rodrigues K M, Rodrigues B F. Glomus [M]//Amarasu N, Murugesan S, Annapurna K, et al. Beneficial microbes in agro-ecology: bacteria and fungi. London: Academic Press, 2020: 561-569.
- [40]王化秋,程巍,郝俊,等. 贵州煤矸石山香根草根系及根际土丛枝菌根真菌(AMF)群落季节动态研究[J]. 菌物学报, 2021,40(3):514-530.