

## 喀斯特地区丛枝菌根真菌遗传多样性\*

魏源<sup>1,2</sup> 王世杰<sup>1\*\*</sup> 刘秀明<sup>1</sup> 黄天志<sup>1,2</sup><sup>1</sup>中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室, 普定喀斯特生态系统观测研究站, 贵阳 550002;<sup>2</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要** 为探明喀斯特地区丛枝菌根真菌(AMF)的遗传多样性特征,利用巢式PCR和DGGE相结合的分子生物学方法对茂兰喀斯特多个植被类型下的AMF遗传多样性进行了研究。结果表明,喀斯特地区AMF遗传多样性指数和物种丰富度分别平均为3.50和41,远高于非喀斯特对照样地的2.68和17,分析表明,喀斯特地区较高的AMF多样性与此地区丰富的植物多样性以及特殊的生态环境有关,是与喀斯特生态系统长期相互选择的结果。不同植被类型下的AMF多样性差异显著,相似性指数最高为0.34,喀斯特地区AMF的群落结构随着植被类型的改变发生显著变化;基因测序显示,喀斯特地区AMF的优势菌属是生态适应性很强的球囊霉属,在喀斯特石漠化生态恢复中具有较强的利用潜力。

**关键词** 喀斯特; 丛枝菌根真菌; 多样性指数; 物种丰富度

中图分类号 Q938 文献标识码 A 文章编号 1000-4890(2011)10-2220-07

**Genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Karst area.** WEI Yuan<sup>1,2</sup>, WANG Shi-jie<sup>1\*\*</sup>, LIU Xiu-ming<sup>1</sup>, HUANG Tian-zhi<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>*Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Puding Karst Ecosystem Research Station, Guiyang 550002, China;* <sup>2</sup>*Graduate of University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*). *Chinese Journal of Ecology*, 2011, **30**(10): 2220-2226.

**Abstract:** By the methods of nested PCR and DGGE, this paper studied the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) under various vegetation types in Maolan Karst area, aimed to explore the AMF genetic diversity in Karst area. In the study area, the AMF genetic diversity index (3.50) and species abundance (41) were far higher than those (2.68 and 17, respectively) in non-Karst area. The high diversity of AMF in study area was closely related to the rich plant diversity and the special ecological environment, and was the result of long-term mutual choice of the AMF and Karst ecosystem. The AMF diversity under different vegetation types had significant difference, with the highest similarity index only 0.34. The community structure of the AMF changed significantly with vegetation type. Gene sequencing displayed that *Glomus* was the dominant genera, which had strong ecological adaptability and great potential in the ecological restoration of Karst rocky desertification.

**Key words:** Karst; arbuscular mycorrhizal fungi; diversity index; species abundance.

我国西南喀斯特地区处于世界三大喀斯特集中分布片区之一的东亚岩溶中心,它是我国南方、北方两大生态脆弱区(西南岩溶石山区、西北黄土高原干旱区)之一。喀斯特地区碳酸盐岩充分发育,特殊的地质背景奠定了喀斯特生态系统的脆弱性和敏

感性:地表、地下双重水文地质结构使地表干旱缺水,土被不连续,土壤富钙偏碱,缺磷氮等营养元素,这些限制因子造成植被生境严酷,生物量偏小,水、土、植物相互作用过程具有明显的脆弱性,最终表现为易受损和难恢复(李阳兵等,2006)。以石漠化为典型代表的生态退化问题已成为制约我国西南喀斯特地区可持续发展的重大生态环境问题,但由于防治理论和技术体系远远落后于实践需要等矛盾导致石漠化面积快速扩展的总体趋势并没有得到有效遏

\* 中国科学院战略性先导科技专项(XDA05070400)、国家自然科学基金创新群体项目(41021062和40721002)和国家自然科学基金项目(40672112)资助。

\*\* 通讯作者 E-mail: wangshijie@vip.skleg.cn

收稿日期: 2011-03-29 接受日期: 2011-07-07

制。丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)能够提高植物的抗旱性,促进植物对营养元素尤其是磷的吸收,提高植物在逆境中的生长和定殖(李岩等 2010)。AMF已被广泛的应用到退化或受损生态系统的恢复和重建中(王立等,2010)。AMF的生态学功能与喀斯特生态系统的限制因子以及石漠化治理亟待克服的障碍之间都有着良好的耦合关系,在提高喀斯特生态系统稳定性和石漠化治理实践中表现出很强的潜在利用价值。

AMF的分布具有明显的地域性,喀斯特独特的地理单元特征必然会形成自己特有的AMF多样性,要科学合理地利用AMF为喀斯特生态系统保护和石漠化治理服务,就要充分认识这一地区AMF的多样性特点和分布状况,对喀斯特地区的AMF多样性调查工作是开展其他工作的前提和基础。目前,关于我国喀斯特地区AMF种质资源和多样性的研究还很薄弱,利用分子生物学方法进行研究的报道更为少见。为了保证取样的代表性和广泛性,本文在我国西南喀斯特地区的中心地带——贵州选取不同植被类型的样地,利用PCR-DGGE技术研究了AMF遗传多样性,旨在丰富我国AMF菌种资源、筛选适合喀斯特地区的高效菌种,为喀斯特生态系统保护和石漠化治理服务奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究地概况

茂兰国家自然保护区位于贵州省荔波县南部,地理坐标为 $107^{\circ}52'10''\text{E}$ — $108^{\circ}05'40''\text{E}$ , $25^{\circ}09'20''\text{N}$ — $25^{\circ}20'50''\text{N}$ ;地处贵州高原南部向广西丘陵平原过渡的斜坡地带,地势西高东低,平均海拔758.8 m。该区属中亚热带季风性湿润气候。年平均气温 $18.6^{\circ}\text{C}$ ,年平均降水量1752 mm,年平均蒸发量1343.6 mm,年平均相对湿度83%,年日照时数1272.8 h。区内喀斯特地貌十分发育,是原生性强、相对稳定、平衡的喀斯特森林生态系统,土壤主要以黑色石灰土为主,成土母质是纯度较高的石灰岩和白云岩。

### 1.2 样地选择和样品采集

为了保证样品的广泛性和代表性,在保护区内选取具有代表性的4个不同植被类型的喀斯特样地:原生乔木林(原生林)、次生乔灌混交林(次生林)、灌木林、灌丛草坡,同时在保护区附近选择一个非喀斯特森林样地(以下简称非喀)作为对照。

在选择样地时尽量保证立地条件的一致性,根据群落最小表现面积确定样方面积。喀斯特地区土壤分布不连续,土层浅薄,生境破碎,土壤常以石面、土面、石沟、石缝等小生境的形式分布。该地区土壤样品采集最佳的方法通常采用权重采样法(王世杰等 2007),即在划分小生境类型的基础上,按小生境面积权重确定组成样地代表样的各类小生境土壤样品采集量,而各类小生境土样则分别由以面积权重确定的同类小生境样品量混合构成,小生境土样则由多点混合样组成,最后按土壤面积权重考虑各小生境及各类小生境的样品比例,将小生境土样组成混合样,所得的混合样基本上能代表样地。因此,各样地土壤样品均按照以上方法进行采集,采集时用消毒铲剥去表层杂物,挖取0~20 cm土壤装入自封袋,石面因无土壤所以不作为采样对象,各采集样品均为非根际土。样品过2 mm筛以保证充分混合均匀,于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存用于DNA提取。采样时间为2010年5月。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 提取土壤总DNA** 采用Power Soil™ DNA Isolation Kit(MO BIO)的试剂盒提取土壤总DNA。此方法能够保证提取的土壤DNA数量多,杂质少,是一种比较理想的土壤DNA提取方法。具体操作完全按照试剂盒提供的步骤进行。

**1.3.2 巢式PCR扩增目的片段** 以提取的土壤总DNA为模板,运用巢式PCR技术进行扩增。扩增条件参考龙良鲲等(2005)利用的方法。所用引物均由上海生工生物工程技术服务公司合成(表1)。

第1次PCR:所用引物为真菌18S rDNA通用引物GeoA2和Geo11,反应体系 $25\ \mu\text{l}$ ,其中模板 $1\ \mu\text{l}$ , Master mix(promega, M712B) $12.5\ \mu\text{l}$ ,引物各 $1\ \mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O $9.5\ \mu\text{l}$ 。反应程序为 $94^{\circ}\text{C}$ 预变性4 min, $94^{\circ}\text{C}$  1 min, $54^{\circ}\text{C}$  1 min, $72^{\circ}\text{C}$  2 min,30个循环。最后 $72^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min。 $4^{\circ}\text{C}$ 保育。

第2次PCR:第1次PCR产物1:100稀释后(如电泳不见条带则不稀释)作模板,所用引物为NS31-GC和AM1,反应体系同上。反应程序为 $94^{\circ}\text{C}$  2 min预变性, $94^{\circ}\text{C}$  45 s, $65^{\circ}\text{C}$  1 min, $72^{\circ}\text{C}$  45 s,30个循环,最后 $72^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min。 $4^{\circ}\text{C}$ 保育。

第3次PCR:第2次PCR产物1:100稀释后作模板,所用引物为NS31-GC和Glol,反应体系同上。反应程序为 $94^{\circ}\text{C}$  2 min预变性, $94^{\circ}\text{C}$  45 s, $55^{\circ}\text{C}$  1 min, $72^{\circ}\text{C}$  45 s,30个循环,最后 $72^{\circ}\text{C}$ 延伸

表1 巢式 PCR 引物

Table 1 Primers of nested-PCR

引物	序列	长度 (kb)	来源
GeoA2	5'-CCAGTAGTCATATGCTT-GTCTC-3'	1.8	Schwarzott & Schuüßle, 2001
Geo11	5'-ACCTTGTTACGACTTTTACT-TCC-3'	1.8	
AM1	5'-GTTTCCCGTAAGGCCG-CGAA-3'	0.55	Helgason <i>et al.</i> , 1998
NS31-GC	5'-TTGGAGGGCAAGTCTGGT-GCC-3'	0.55	Simon <i>et al.</i> , 1992
Glo1	5'-GCCTGCTTTAAACTCTA-3'	0.23	Cornejo <i>et al.</i> , 2004

NS31-GC 的 5'端接 5'-CGCCCGGGCGCCCGGGCGGG-CGGGGGCACGGGG-3'序列。

7 min。4 °C 保育。

取每次扩增产物 4 μl,用 1.0% 的琼脂糖凝胶在凝胶成像系统中检测结果。

**1.3.3 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析遗传多样性** 取第 3 次 PCR 产物 20 μl 用基因突变检测系统 (Bio-Rad) 进行 DGGE 分析。聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8% (100% 的变性剂为尿素 7 mol 和 40% 的去离子甲酰胺),变性剂梯度范围 20% ~ 55%。电泳条件:缓冲液为 1×TAE 80 V 10 min 进胶,再在 60 °C 下 120 V 电泳 10 h。电泳后采用硝酸银染色法对凝胶进行染色,然后用 Bio-Rad 公司凝胶成像系统 (Gel Doc Documentation System) 进行分析。

**1.3.4 DGGE 条带测序和序列分析** 将 DGGE 图谱中的优势条带和特殊条带进行切胶回收。具体方法:用小刀切下目的条带,转入 0.5 ml 的灭菌离心管中,加入 12 μl ddH<sub>2</sub>O,捣碎后 4 °C 过夜,然后 3000 r·min<sup>-1</sup> 离心 1 min,50 °C 水浴 30 min,再加入 20 μl ddH<sub>2</sub>O,3000 r·min<sup>-1</sup> 离心 1 min,50 °C 水浴 30 min,最后 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心 1 min,取 10 μl 作模板进行 PCR 扩增。扩增引物为 NS31 (不带 GC clamp) 和 Glo1,反应体系 50 μl。PCR 扩增产物送北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。将测序结果与 Gene bank 数据库进行 BLAST 在线比对。所测序列已全部提交 Gene bank 数据库,登录号: HQ874634-HQ874645。

#### 1.4 数据处理

用 Bio-Rad QUANTITY ONE 4.4.0 软件对 DGGE 图谱进行分析,建立各样品 AMF 相似性的系统发育树图谱,该图谱是由系统依据戴斯系数  $C_s$  (Dice coefficient) 按照 UPGMA 算法绘出,  $C_s = 2j / (a + b)$ ;  $j$  是样品 A 和 B 共有的条带,  $a$  和  $b$  分别是样

品 A 和 B 中各自的条带数。在 Excel 2003 中计算多样性指数 ( $H$ )、丰度 ( $S$ ) 和均匀度指数 ( $EH$ ) 等指标 (Luo *et al.*, 2004)。

$$H = \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i$$

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

式中  $H$  为香浓多样性指数,  $S$  为 DGGE 胶中每个样品中条带的数量,  $P_i$  为第  $i$  条带灰度占该样品总灰度的比率,  $EH$  为均匀度指数。

## 2 结果与分析

### 2.1 AMF 的 DGGE 图谱

**2.1.1 样品 DNA 的提取与巢式 PCR** 用琼脂糖凝胶检测 DNA 提取效果,条带清晰明亮,提取效果好,证明本研究中所采用的 DNA 提取方法可以很好地提取出目的样品中的总 DNA。本研究第 1 次 PCR 即扩增出比较清晰的目的条带 (1.8 kb),第 2 次和第 3 次扩增时将产物稀释 100 倍后再做模板,均扩增出了目的条带 (0.55 kb 和 0.23 kb),且效果良好。由此可见,巢式 PCR 可以很好地扩增出目标产物。第 3 次 PCR 获取特异性 AM 菌的 NS31-GC/Glo1 区的片段大小为 230 bp,非常适合做 DGGE 分析。

**2.1.2 DGGE 图谱分析** 应用 DGGE 技术对第 3 次 PCR 产物进行了分离,由图 2 可见,DGGE 可以很好地分离样品中的 AMF。总体而言,喀斯特地区的各个样品中条带数量均较多,而非喀样品中条带数量相对较少。表明,喀斯特地区不仅存在着丰富的 AMF,而且种类较丰富。各样品中条带的强度和迁移率差别很大,有一些共有的条带,但更多的是特有带,充分显示了样品中丰富的 AMF 多样性。

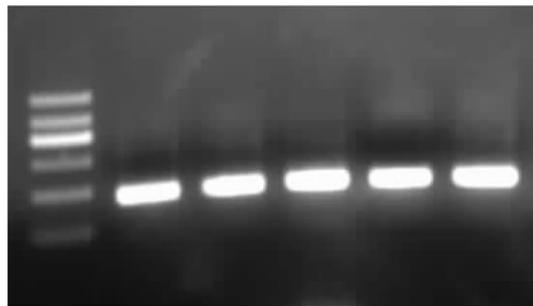


图1 第3次 PCR 效果

Fig. 1 The third amplification by nested PCR 分子标记为 Marker I。

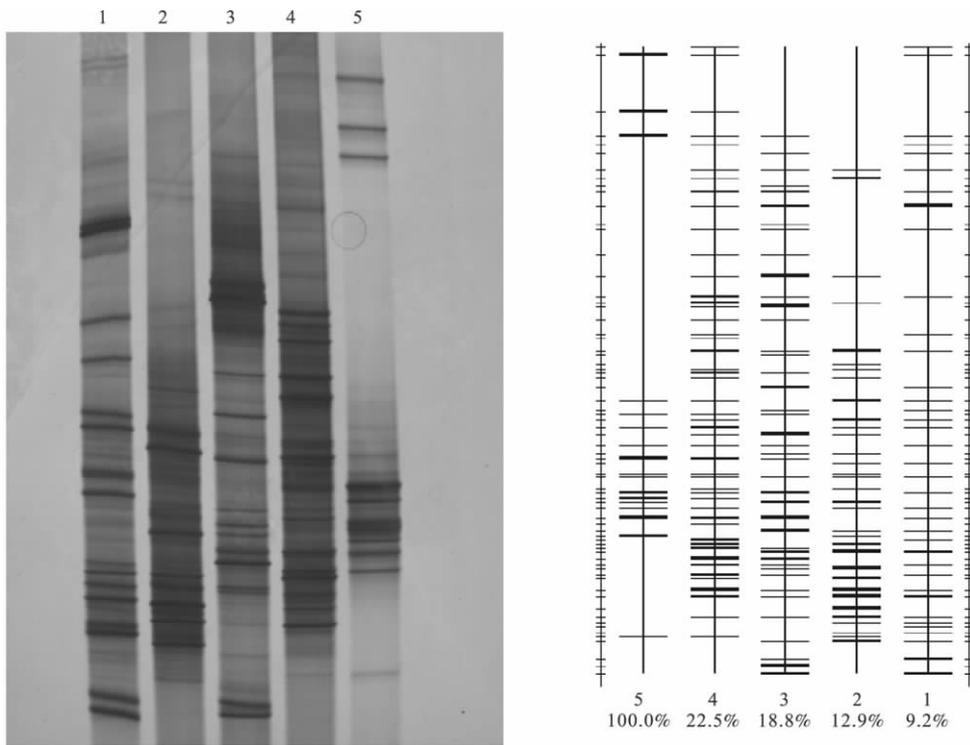


图2 不同样地丛枝菌根真菌的 DGGE 图谱及泳道  
 Fig.2 DGGE profile of amplified AMF fragments from different samples  
 1. 次生林; 2. 灌木林; 3. 原生林; 4. 灌丛草坡; 5. 非喀。

2.2 AMF 群落相似性分析

由图 3 分析, 样品的 AMF 群落结构总体聚为 3 类, 原生林和次生林聚为 1 类, 灌木林和草坡聚为一类, 非喀独自一类。但即使聚为一类的样地, 相似性也较低, 仅为 0.33 和 0.34。说明喀斯特地区不同植被类型间 AMF 群落结构差异显著, 非喀样地的 AMF 群落结构同喀斯特地区相比差异更大。

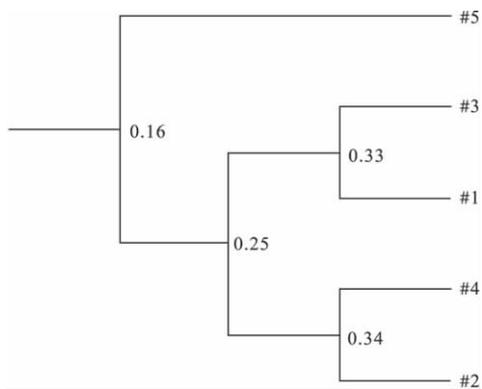


图3 DGGE UPGMA 分析  
 Fig.3 DGGE cluster analysis (UPGMA) of 18S rDNA AMF communities in soil samples  
 1. 次生林; 2. 灌木林; 3. 原生林; 4. 灌丛草坡; 5. 非喀。

2.3 AMF 多样性指数和丰富度分析

由表 2 分析, 喀斯特 4 个样地的多样性指数都保持在 3.3 以上, 平均值为 3.5, 而非喀样地的多样性指数仅 2.68。喀斯特样地的丰富度保持在 33 以上, 平均值为 41, 非喀样地的丰富度仅 17。总体而言, 喀斯特 4 个样地的多样性指数和物种丰富度均比非喀高。喀斯特样地的多样性指数和丰富度基本呈现出随植被退化而降低的趋势, 均匀度未表现出规律性变化。

2.4 基因测序结果分析

一般而言, DGGE 图谱中每一个条带代表一种菌种, 条带的粗亮程度能反映样品中微生物的多少, 清晰粗亮说明这种菌种在样品中含量丰富, 扩增时

表 2 不同地的丛枝菌根真菌多样性指数、丰度及均匀度  
 Table 2 AMF Shannon index (H), evenness (EH) and richness (S) of each sample

样品	多样性指数	丰度	均匀度
原生林	3.56	41	0.96
次生林	3.42	37	0.92
灌木林	3.32	33	0.95
灌丛草坡	3.72	48	0.96
非喀	2.68	17	0.95

表3 DGGE 切胶条带序列比对结果

Table 3 Alignment of DGGE sequenced clone to its most-similar GenBank sequence

条带来源	最近相似种属	相似性 (%)
原生林	uncultured <i>Glomus</i> partial 18S rRNA gene (AM946889)	96
原生林	Uncultured <i>Glomus</i> isolate DGGE band 123 14. c2. 1. 1. 14c2 18S rRNA gene (HQ323622)	98
原生林	Uncultured <i>Glomus</i> partial 18S rRNA gene (FR728582)	96
次生林	Uncultured <i>Glomus</i> clone LES27 #C26 18S rRNA gene (GU353743)	96
次生林	Uncultured <i>Glomus</i> clone HDAYG10 18S rRNA gene (GQ336515)	97
灌木林	Uncultured <i>Glomus</i> clone HDALG14 18S rRNA gene (GQ336527)	96
灌木林	Uncultured <i>Glomus</i> clone FVD-WSEP01EN26M 18S rRNA gene (GU198558)	94
灌木林	Uncultured <i>Glomus</i> clone D1 18S rRNA gene (GU322390)	97
灌丛草坡	Uncultured <i>Glomus</i> gene for 18S rRNA (AB556934)	99
灌丛草坡	Uncultured <i>Glomus</i> clone 121_OE_NF12 18S rRNA gene (FJ831588)	98
非喀	Uncultured glomeromycete partial 18S rRNA gene (AM779208)	98

模板基数高,扩增后条带灰度值高,从而表现的清晰粗亮,通常也认为其是样品中的数量优势种(江云飞和蔡柏岩,2009)。根据各样品的 PCR-DGGE 指纹图谱,从每个泳道中随机选取 2~3 条清晰粗亮的优势条带进行切胶回收测序,共测得 11 条带(表 3)。结果表明,所有喀斯特样地中的条带同源性最高的序列均为未培养的 AMF,且全部属于球囊霉属。非喀斯特样地所测得条带同源性最高的序列也为未培养的 AMF,但只能确定其属于球囊菌纲。

### 3 讨论

本文利用 PCR-DGGE 技术对喀斯特地区的 AMF 遗传多样性进行了初步研究,结果表明,喀斯特地区 AMF 的多样性指数和物种丰富度比非喀斯特对照样地高。虽然本研究中只设置了 1 个非喀对照样地,但在跟其他地区的同类研究结果比较中,如东南沿海、西双版纳热带次生林、西北干旱区、都江堰地区等,喀斯特地区的多样性指数和物种丰富度也相对较高(张美庆等,1998;张英等,2003;房辉等,2006;冀春花等,2007)。AMF 多样性受多种生态因子的影响(王发园和刘润进,2001),导致喀斯特地区如此丰富的 AMF 多样性的原因可能有如下几点:

1) 研究地属于中亚热带季风性湿润气候,生态系统的组成和结构复杂,植物种类多样性和结构多样性丰富(屠玉麟,1989;朱守谦,2003),与同纬度的其他森林类型如中亚热带常绿阔叶林相比,其植物物种多样性水平高(王周平等,2003),一般而言,丰富的植物多样性有利于提高 AM 真菌的多样性(Kernaghan,2005)。2) 相对于非喀地区,喀斯特小生境类型丰富多样,空间异质性强,小生境所带来的微环境的多样性也可能是造成喀斯特地区整体 AM 真菌多样性较高的另一重要原因,因为地形的多样性是生物多样性的基础(Gilbert & Anderson,1998),张文辉等(2004)的研究表明,小生境异质性不仅能增加物种多样性,而且对改善系统功能意义深远。3) AMF 是好气性真菌,其孢子和菌丝都需要一定的通气条件才能生长发育。喀斯特地区的土壤以黑色石灰土为主,土壤粘粒含量低,粉粒和砂粒含量高,土壤颗粒间空隙比较大,通透性能良好,有利于好氧微生物的活动(肖德安,2009)。所以,喀斯特地区的土壤结构更适合 AMF 生存。盖京萍亦发现在砂土、轻壤土中 AMF 孢子密度较大,粘土中较小(盖京萍等,2000)。4) 矿质养分中,磷和 AMF 的关系最为密切。在一定范围内,较低的土壤速效磷会促进 AMF 的生长,相反,土壤速效磷含量过高往往会抑制 AMF 的生长、发育和功能(Tawarayama *et al.*,1994)。研究表明,这可能与高磷时寄主植物根系分泌的成分发生了变化有关(Tawarayama *et al.*,1996)。石灰性土壤中大部分磷与土壤中大量存在的游离钙结合,生成难溶性的磷酸钙盐,能被植物吸收利用的有效磷含量很低。本研究喀斯特样地中土壤速效磷平均含量为  $4.01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,普遍低于  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的缺磷临界值(肖德安,2009),缺磷的环境可能刺激了 AMF 的生长和代谢。综上所述,喀斯特地区较高的 AMF 多样性是与这一地区丰富的植物多样性以及特殊的生态环境特点分不开的,是与喀斯特生态系统长期相互选择的结果。

不同的土壤 pH 值是导致喀斯特地区和非喀斯特对照样地 AMF 种类相似性差异巨大的主要原因之一。pH 值是影响 AMF 多样性的重要因素,本研究中喀斯特样地的土壤 pH 值基本保持在 7.0 以上,属于偏碱性环境,非喀对照样地土壤是酸性土,pH 值在 4.5 左右(肖德安,2009)。pH 不同,AMF 的组成可能不同(张美庆等,1999)。本研究中 4 个不同植被类型的喀斯特样地的 AMF 结构相似性指

数也很低,群落结构表现出显著差异,在土壤类型、气候条件和立地条件基本一致的情况下,地上植物种类组成差别较大应该是造成这种现象的主要原因,因为植物多样性显著影响 AMF 的多样性(Batten *et al.*, 2006), Sykorová 等(2007)在根系 18S rDNA 和 ITS 序列研究中亦证实了 AMF 群落组成强烈受到寄主植物种类的影响。喀斯特地区 AMF 的群落结构会随着植被类型的变化发生显著变化。

通过对目的条带的基因测序显示,所有条带都是未培养和未命名的 AMF 菌种,说明喀斯特地区可能存在着大量未被发现的 AMF 种类,这对于丰富 AMF 种质资源和开发 AMF 生态功能都有重要意义。本研究把喀斯特 4 个植被类型的样地作为整体考虑对象(为了使测序样品更具代表性),从每个植被类型中选取 2~3 条优势条带进行基因测序,并未把是否是差异条带作为考虑因素,这样是为了保证测序样品选择的随机性,目的是了解喀斯特地区 AMF 的优势种。共测序 10 条带,这 10 条带的基因测序结果都属于球囊霉属,说明不同喀斯特植被类型中的数量优势种都是球囊霉属,而 DGGE 本身分析的就已经是微生物群落中数量>1% 的优势种群(Muyzer *et al.*, 1993),这在一定程度上应该可以说球囊霉属就是喀斯特地区的优势菌属。张美庆等(1994)亦发现球囊霉属在碱性土壤中分布更多一些。球囊霉属的生态适应性很强,是很多生态系统的优势属。例如,冀春花等(2007)研究发现,球囊霉属是西北干旱区的优势属,而且 pH 越高球囊霉属所占比例越大。本研究表明,球囊霉属可能也是喀斯特地区的优势属,球囊霉属 AMF 在喀斯特生态系统中可能处于更重要的生态位,这为筛选喀斯特地区的高效菌种提供了指引,在以后培养喀斯特地区高效生态恢复菌种的时候应重点考虑球囊霉属的一些菌种。

喀斯特地区丰富的 AMF 遗传多样性表明其可能存在着丰富的功能多样性(刘延鹏等,2008)。Kuhn(2001)、Corradi 和 Sanders(2006)和 Corradi 等(2007)的研究相继证实 AMF 单孢后代内存在功能基因变异,这种差异被认为在菌根适应环境胁迫方面有潜在重要作用。Koch 等(2006)发现,*G. intraradices* 种群内的遗传变异使其表现型如根外菌丝密度存在明显的差异,造成了寄主植物对 P 素吸收等方面的差异,从而促进或抑制寄主植物生长。何

跃军等(2007)研究了喀斯特适生植物构树接种 AMF 后的生长响应,结果发现接种能够显著促进构树幼苗的生长,而且宿主植物与菌种存在一定的选择性。因此,喀斯特地区丰富的 AMF 遗传多样性是与喀斯特生态环境长期协同进化的结果,对植物适应这一地区石生、干旱、低磷的环境具有重要意义,而且极有可能扮演了关键角色。在石漠化防治技术体系急需产生突破的情况下,AMF 所表现出来的潜在利用价值应该引起重视,加强喀斯特地区 AMF 多样性调查和种质资源保护对从 AMF 这一全新角度系统探讨西南喀斯特地区植物的综合适应性和生态系统退化恢复机理都具有重要意义。

值得提出的是,本研究只是利用了分子生物学方法对喀斯特地区土壤中的 AMF 遗传多样性进行了初步研究,缺乏 AMF 孢子种类、数量以及与植物侵染方面的调查,以后应注意结合形态学的方法开展更全面深入的研究。

#### 参考文献

- 房 辉, Damodaran PN, 曹 敏. 2006. 西双版纳热带次生林中的丛枝菌根调查. 生态学报, 26(12): 4179-4185.
- 盖京苹, 刘润进, 李晓林, 等. 2000. 山东省不同植被区内野生根围 AM 真菌的生态分布. 生态学杂志, 19(4): 18-22.
- 何跃军, 钟章成, 刘济明, 等. 2007. 构树幼苗对接种丛枝菌根真菌的生长响应. 应用生态学报, 18(10): 2209-2213.
- 江云飞, 蔡柏岩. 2009. PCR-DGGE 技术在细菌多样性研究中的条件优化. 生物技术, 19(5): 84-87.
- 冀春花, 张淑彬, 盖京苹, 等. 2007. 西北干旱区 AM 真菌多样性研究. 生物多样性, 15(1): 77-83.
- 李阳兵, 王世杰, 魏朝富, 等. 2006. 岩溶生态系统脆弱性剖析. 热带地理, 26(4): 303-307.
- 李 岩, 焦 惠, 徐丽娟, 等. 2010. AM 真菌群落结构与功能研究进展. 生态学报, 30(4): 1089-1096.
- 龙良鲲, 羊宋贞, 姚 青, 等. 2005. AM 真菌 DNA 的提取与 PCR-DGGE 分析. 菌物学报, 24(4): 564-569.
- 刘延鹏, Sohn B, 王淼焱, 等. 2008. AM 真菌遗传多样性研究进展. 生物多样性, 16(3): 225-228.
- 屠玉麟. 1989. 贵州喀斯特森林的初步研究. 中国岩溶, 8(4): 282-290.
- 王 立, 贾文奇, 马 放, 等. 2010. 菌根技术在环境修复领域中的应用及展望. 生态环境学报, 19(2): 487-493.
- 王世杰, 卢红梅, 周运超, 等. 2007. 茂兰喀斯特原始森林土壤有机碳的空间变异性与代表性土样采集方法. 土壤学报, 44(3): 475-483.
- 王发园, 刘润进. 2001. 环境因子对 AM 真菌多样性的影响. 生物多样性, 9(3): 301-305.

- 王周平,李旭光,石胜友,等. 2003. 缙云山森林林隙与非森林林隙物种多样性比较研究. *应用生态学报*, **14**(1): 7-10.
- 肖德安. 2009. 土壤水与表层岩泉水地球化学特征及其对植被-土壤关联退化的响应研究(博士学位论文). 北京: 中国科学院研究生院.
- 张英,郭良栋,刘润进,等. 2003. 都江堰地区丛枝菌根真菌多样性与生态研究. *植物生态学报*, **27**(4): 537-544.
- 张美庆,王幼珊,邢礼军. 1998. 我国东、南沿海地区 AM 真菌群落生态分布研究. *菌物系统*, **17**(3): 274-277.
- 张美庆,王幼珊,邢礼军,等. 1999. 环境因子和 AM 真菌分布的关系. *菌物系统*, **18**(1): 25-29.
- 张美庆,王幼珊,张驰,等. 1994. 我国北方 VA 菌根真菌某些属和种的生态分布. *真菌学报*, **13**(3): 166-172.
- 张文辉,卢涛,马克明,等. 2004. 岷江上游干旱河谷植物群落分布的环境与空间因素分析. *生态学报*, **24**(3): 552-559.
- 朱守谦. 2003. 喀斯特森林生态研究. 贵阳: 贵州科技出版.
- Batten KM, Scow KM, Davies KF, et al. 2006. Two invasive plants alter soil microbial community composition in serpentine grasslands. *Biological Invasions*, **8**: 217-230.
- Cornejo P, Azcon-Aguilar C, Barea JM, et al. 2004. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*, **241**: 265-270.
- Corradi N, Sanders IR. 2006. Evolution of the P-type II ATPase gene family in the fungi and presence of structural genomic changes among isolates of *Glomus intraradices*. *BMC Evolutionary Biology*, **6**: 21.
- Corradi N, Croll D, Colard A, et al. 2007. Gene copy number polymorphisms in an arbuscular mycorrhizal fungal population. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 366-369.
- Gilbert OL, Anderson P. 1998. *Habitat Creation and Repair*. Oxford: Oxford University Press.
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, et al. 1998. Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, **284**: 431.
- Kuhn G, Hijri M, Sanders IR, et al. 2001. Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, **414**: 745-748.
- Koch AM, Croll D, Sanders IR. 2006. Genetic variability in a population of arbuscular mycorrhizal fungi causes variation in plant growth. *Ecology Letters*, **9**: 103-110.
- Kernaghan G. 2005. Mycorrhizal diversity: Cause and effect? *Pedobiologia*, **49**: 511-520.
- Luo HF, Qi HY, Zhang HX. 2004. Assessment of the bacterial diversity in fenvalerate-treated soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **20**: 509-515.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 695-700.
- Schwarzott D, Schüßler A. 2001. A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification and cloning from single AM fungal spore. *Mycorrhiza*, **10**: 203-207.
- Simon L, Lalonde M, Bruns TD. 1992. Specific amplification of 18S fungi ribosomal genes from vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 291-295.
- Sykorová Z, Wiemken A, Redecker D. 2007. Co-occurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two Swiss upper montane meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungi communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 5426-5434.
- Tawarayama K, Saito M, Morioka M. 1994. Effect of phosphate application to arbuscular mycorrhizal onion on the development and succinate dehydrogenase activity of internal hyphae. *Soil Science and Plant Nutrition*, **40**: 667-673.
- Tawarayama K, Watanabe S, Yoshida E. 1996. Effect of onion (*Allium cepa*) root exudates on the hyphal growth of *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza*, **6**: 57-59.

作者简介 魏源,男,1983年生,博士研究生。主要从事环境地球化学和微生物生态方面的研究。E-mail: rbq-wy@163.com

责任编辑 魏中青