

3 种杓兰属植物菌根真菌系统发育和多样性分析

徐玲玲¹, 赵桂仿^{2*}, 孙敬祖³, 张焱¹, 高丽君^{1,4}

(1 西安文理学院 生物与环境工程学院 植物微生物协同研究重点实验室, 西安 710065; 2 西北大学 生命科学学院 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 西安 710069; 3 中国科学院 微生物研究所 真菌学国家重点实验室, 北京 100101; 4 广西大学 农学院 食用菌研究所, 南宁 530005)

摘 要: 兰科植物菌根真菌(Orchid mycorrhizal fungi, OrMF)在兰科植物种子萌发和后续生长发育过程中具有重要作用。该研究采用培养(菌丝团分离)和非培养(克隆文库)2 种方法获得同一栖息地 3 种不同杓兰属植物根中菌根真菌 ITS 序列并划分可操作分类单元(Operational taxonomic units, OTUs), 分析其系统发育关系和多样性。结果表明: (1) 所有根段中都有菌丝团定植, 共分离出菌根真菌 64 株, 其中 63 株为胶膜菌科(Tulasnellaceae)真菌, 1 株为角担菌科(Ceratobasidiaceae)真菌; 可划分为 7 个 OUT, 每个 OTU 代表菌株的菌丝都能形成 OrMF 典型的近球形或椭圆形链状排列的念珠状细胞; 分离出来的菌根真菌均为无性型菌丝且不产生无性孢子。(2) 非培养法得到的 3 种杓兰属植物的根中 OrMF 分别隶属于胶膜菌科(Tulasnellaceae)、腊壳菌科(Sebacinaceae)、角担菌科(Ceratobasidiaceae)和革菌科(Thelephoraceae), 其中胶膜菌科 OTU 在种类和数量上占有绝对优势, 培养和非培养 2 种方法得到的 OrMF OTU 类型和数量均为西藏杓兰(*Cypripedium tibeticum*) > 无苞杓兰(*C. flavum*) > 黄花杓兰(*C. bardolphianum*), 但培养法少于非培养法。(3) 对胶膜菌进行系统发育分析显示, 优势和非优势 OTU 均分布在系统发育树的 3 个不同分支上, 这种与多种亲缘关系较远的 OrMF 共生的现象可能与杓兰属植物对环境的适应性有关, 且不同杓兰的 OrMF 物种丰富度没有显著差异, 但群落结构存在差异。

关键词: 菌丝团; 克隆文库; 系统发育树

中图分类号: Q93-331; Q789

文献标志码: A

Phylogenetic and Diversity Analysis of Mycorrhizal Fungi in Three *Cypripedium* Species

XU Lingling¹, ZHAO Guifang^{2*}, SUN Jingzu³, ZHANG Yan¹, GAO Lijun^{1,4}

(1 Key Laboratory of Plant-microbe Collaboration Research, School of Biological and Environmental Engineering, Xi'an University, Xi'an 710065, China; 2 Key Laboratory of Resources Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, School of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China; 3 State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 4 Institute of Applied Microbiology, Agricultural College of Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: Orchid mycorrhizal fungi (OrMF) play an important role in seed germination and growth of orchids. In this study, the operational taxonomic units (OTUs) of ITS sequences of mycorrhizal fungi in the roots of three *Cypripedium* species in the same habitat were obtained by culture-dependent (peloton isolation) and culture-independent (clone library) method, to study the phylogenetic relationship and diversity

收稿日期: 2019-06-20; 修改稿收到日期: 2019-08-09

基金项目: 国家自然科学基金(31300366); 西安市科技计划项目(CXY1531WL18, 2017CGWL02)

作者简介: 徐玲玲(1981—), 女, 博士, 副教授, 主要从事兰科植物与菌根真菌互作研究。E-mail: missilexll@163.com

* 通信作者: 赵桂仿, 教授, 博士生导师, 主要从事植物系统进化与分子生态研究。E-mail: gzfzhao@nwu.edu.cn

of OrMF. The results showed that: (1) the pelotons distributed in all of the root fragments; 64 OrMF were isolated, including 63 Tulasnellaceae strains and 1 Ceratobasidiaceae strain; 7 OTUs were found, and the representative isolate of every OTU formed typical subglobose or ellipsoid monilioid mycelia in chain arrangement. All of the isolated fungi were asexual hyphae and did not produce asexual spores. (2) OrMF obtained from roots of three *Cypripedium* species by culture-independent method were affiliated to Tulasnellaceae, Sebacinaceae, Ceratobasidiaceae and Thelephoraceae; The OTUs of Tulasnellaceae had an absolute predominance in type and quantity; It was *Cypripedium tibeticum* > *C. flavum* > *C. bardolphianum* in OTU type and quantity of OrMF acquired by both culture-dependent and culture-independent approach; And the types and quantity of mycorrhizal fungal OTUs obtained by the culture-dependent method were less than the culture-independent one. (3) The phylogenetic analysis of OTUs of Tulasnellaceae showed that the dominant and non-dominant OTUs were distributed in three different clades of the phylogenetic tree; This phenomenon that orchids symbiose with many kinds of relatively distant relatives of OrMF may be related to the environmental adaptability of *Cypripedium* species; There was no significant difference in the OrMF species richness of different *Cypripedium* species, but there was a differentiation in the community structure.

Key words: peloton; clone library; phylogenetic tree

杓兰属(*Cypripedium* L.)是兰科植物(Orchidaceae)中比较原始的类群,中国是杓兰属植物的分布中心^[1]。在自然条件下,兰科植物种子萌发和随后生长发育都需要通过与兰科菌根真菌(Orchid mycorrhizal fungi, OrMF)建立共生关系,以获得碳源^[2-3]。目前已经报道的大多数兰科植物的菌根真菌以胶膜菌科(Tulasnellaceae)、腊壳菌科(Sebacinaceae)、*Serendipitaceae* 和角担菌科(Ceratobasidiaceae)为主,其无性型都属于丝核菌样(*Rhizoctonia*-like)真菌^[4],在人工培养基上会形成念珠状(Monilioid)菌丝^[5-6]。另外还有革菌科(Thelephoraceae)、鬼伞科(Psathyrellaceae)和红菇科(Russulaceae)等,也有少量子囊菌类群^[4,7-11]。

杓兰属植物与胶膜菌在科的水平上具有专一性^[12],在科的水平以下则与多种类群的胶膜菌共生^[10]。与哪些类群的胶膜菌共生,由不同杓兰属植物对 OrMF 的偏好性^[12-13]和生长环境决定,环境因素中影响最大的是土壤中 OrMF 的分布^[4,14]。

大多数 OrMF 定殖兰科植物后,在根皮层细胞内以结状或者螺旋状的菌丝团(Peloton)形式存在。以往 OrMF 的分离主要采用表面灭菌后的根段横切切片在低营养培养基中培养获得真菌菌株的组织切片法^[15-17],但因为兰科植物根中除了 OrMF,还有大量其他内生真菌存在,因此该方法分离获得菌根真菌的效率并不高。随着菌根真菌分离技术的改进,直接挑取根细胞内菌丝团进行培养的方法得到了广泛应用^[18-19]。这种方法不需要使用任何化学试剂,且能避免杂菌污染。

直接分离培养 OrMF 方法的优点是可以获得

可培养的 OrMF 菌株,其缺点是对生长缓慢和不可培养的 OrMF 分离效果不好。而这类 OrMF 可能包含 OrMF 群落更多的多样性信息。因此,利用 OrMF ITS 特异性引物从兰科植物根 DNA 中直接扩增获得 OrMF ITS 序列是近年发展起来的新方法^[20-21],已经筛选出有效的特异性引物并广泛用于 OrMF 系统发育研究^[4]。

本研究采集四川黄龙沟西藏杓兰(*Cypripedium tibeticum*),黄花杓兰(*C. flavum*)和无苞杓兰(*C. bardolphianum*)的根,研究(1)直接分离菌丝团培养法和 OrMF 特异性 ITS 引物扩增建立克隆文库的非培养方法得到的 OrMF 区系和系统发育关系,并比较两种方法的效果;(2)同一栖息地 3 种不同杓兰 OrMF 的多样性和群落结构。

1 材料和方法

1.1 样品采集

2015 年 6 月于四川黄龙自然保护区内黄龙沟(103°44' E, 32°39' N)杓兰分布区(海拔 3 170 ~ 3 400 m)设置 20 个样方,分别采集每个样方中西藏杓兰,黄花杓兰和无苞杓兰的根。每个样方采集每种杓兰 5 株植株的根,每个植株采集 3 个根,用苔藓包裹,回到住地后用显微镜观察选取有菌根真菌定殖的根段并分成两部分:一部分用无纺布茶叶袋装好,放进装有硅胶的自封袋中干燥保存;另一部分继续用苔藓包裹,于 4 °C 冰箱中保存,10 d 内带回实验室进行菌根真菌分离。

1.2 菌根真菌的分离、纯化和鉴定

采用菌丝团分离法进行 OrMF 的分离和纯

化^[18]。提取真菌 DNA 并进行 PCR 扩增,引物为 ITS5/ITS4。PCR 扩增的循环步骤为 94 ℃ 预变性 3 min,35 次循环:95 ℃ 40 s,56 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,最后 72 ℃ 延伸 10 min。将 PCR 产物切胶回收后送上海生工生物工程股份有限公司测序,ITS5 和 ITS4 作为测序引物进行双向测序,对于序列不一致的菌株再加测一个反应,以消除测序误差造成的影响。代表性序列提交 NCBI GenBank 数据库获得登录号(表 1)。将 ITS 序列在 NCBI 数据库中进行比对,选取相似性较高的序列用于分子鉴定。

1.3 克隆文库的构建和测序

将采集的干燥的杓兰根剪成长度为 0.5 cm 的小段完全混合均匀后,随机称取 50 mg 根段用于 DNA 提取。OrMF 特异性引物^[4]进行 PCR 扩增。PCR 扩增的循环步骤同 1.2。PCR 产物回收纯化后,用 pGM-T 载体试剂盒(pGM-T Ligation Kit, Tiangen, China)进行亚克隆。随机挑取每个样方每种杓兰至少 40 个阳性克隆,送上海生工生物工程股份有限公司进行测序,用引物 T7 和 SP6 作为测序引物双向测序。代表性序列提交 NCBI GenBank 数据库获得登录号(表 1)。将 ITS 序列在 NCBI 数据库中进行比对,选取相似性较高的序列用于分子鉴定。

1.4 OTU 的划分和系统发育树的构建

以 97% 的一致性用于 OTU 划分^[22-23]。以 *Multiclavula vernalis* 和 *Multiclavula corynoides*^[9, 13]作为外类群分析真菌 ITS 序列系统发育关系。用 Clustal X1.81^[24]进行比对,MrBayes 3.1.

2^[25]构建系统发育树。Modeltest 3.7 进行最佳模型检验,最佳模型为 GTR+I+G,确定系统发育树参数为 Nst = 6, Rates = invgamma。取样代数(sample freq)为 1 000,马尔可夫链运行链数(nchains)为 4,舍弃(burnin)掉前 3 棵树(前 2 000 代)。用软件 Tracer version 1.4 打开 MrBayes 运行结果中的 P 文件来评价各参数是否合理以及结果是否达到稳态。

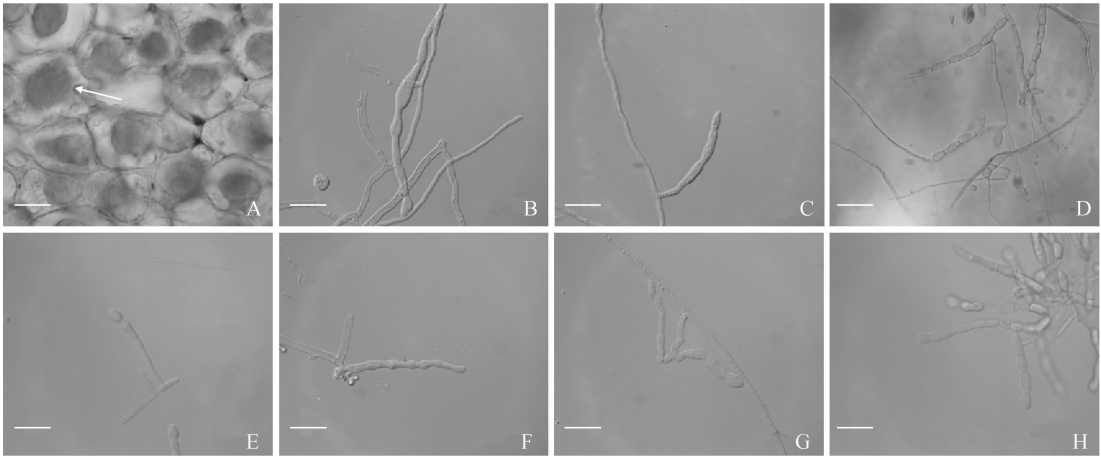
1.5 不同杓兰 OrMF 物种丰富度和群落分化程度

将非培养法得到 OrMF OTU 用 3 个非参数估计量(Non-parametric estimators):Chao1、first-order Jackknife 1 (Jack 1)和 Bootstrap^[26-28]分别对 3 种杓兰物种丰富度(α 多样性)进行估算。用 SPSS 19 软件进行卡方检验(χ^2)比较两两杓兰间 OrMF 群落丰富度差异是否显著。用 Jaccard 和 Sørensen 指数^[29-30]比较两两杓兰间 OrMF 群落分化程度(β 多样性)。2 个指数都是基于 2 个群落共享的 OTU 数量除以每个群落独特 OTU 数量。Jaccard 和 Sørensen 指数值在 0~1 之间,数值越大群落相似度越高,越接近 0 差异越大。

2 结果与分析

2.1 菌根真菌的分离

所有根段中都有菌丝团分布(图 1,A)。共分离出菌根真菌 64 株,其中 63 株为胶膜菌科(Tulasnellaceae)真菌,1 株为角担菌科(Ceratobasidiaceae)真菌(表 1、2),可划分为 7 个 OTU(表 2)。每个 OTU



A. 杓兰根中的菌丝团(箭头所指);B~H 分别为 OTU IT1、IT2、T2、T3、T4、T6 和 C1 代表菌株形成的念珠样菌丝。
标尺表示 A、D、E 和 H = 50 μm;B、C、F 和 G = 20 μm

图 1 菌根真菌的分离

A. Peletons in roots of three *Cypripedium* species (indicated by the arrow); B—H Monilioid mycelia formed by representative isolates of OTU IT1, IT2, T2, T3, T4, T6 and C1, respectively. Bars A, D, E and H = 50 μm; B, C, F and G = 20 μm

Fig.1 Mycorrhizal fungal isolation

表 1 各 OTU 的代表性序列
Table 1 Representative sequences of every operational taxonomic unit (OTU)

可操作 分类单元 OUT	代表性序列 Representative sequence	系统发育关系 Phylogenetic relationship			不同方法检测到的 OTUs Detected OTUs by different methods		
		序列长度 Sequence length	分类关系 Taxonomic affiliation	GenBank 中相似性最高的序列 Closest match in GenBank (accession number)	序列相似性 Sequence identity/%	菌丝团 Peloton	克隆 Clone
T1	KY346521	687	Tulasnellaceae	Uncultured Tulasnellaceae clone CF1312 (GQ241759.1)	93	0	272
T2	KY346522	716	Tulasnellaceae	Uncultured Tulasnellaceae clone T1 (KF871201.1)	96	13	362
T3	KY346523	718	Tulasnellaceae	Uncultured Tulasnellaceae clone T1 (KF871201.1)	97	9	112
T4	KY346524	693	Tulasnellaceae	Uncultured Tulasnellaceae clone HV_D7_2 (JX630726.1)	99	4	289
T5	KY346525	677	Tulasnellaceae	Uncultured Tulasnellaceae clone PA274 (FJ786674.1)	98	0	220
T6	KY346526	656	Tulasnellaceae	Uncultured Tulasnellaceae isolate 285 (DQ925531.1)	98	33	216
T7	KY346527	688	Tulasnellaceae	Uncultured Tulasnellaceae clone CF1312 (GQ241759.1)	99	0	24
T8	KY346528	669	Tulasnellaceae	Uncultured Tulasnellaceae clone PM414 (GQ241786.1)	94	0	24
T9	KY346529	714	Tulasnellaceae	Uncultured Tulasnellaceae clone GC39p (KC243939.1)	99	0	11
T10	KY346530	469	Tulasnellaceae	Uncultured Tulasnellaceae clone CF1312 (GQ241759.1)	94	0	6
T11	KY346531	716	Tulasnellaceae	Uncultured Tulasnellaceae clone WC035 (AB369824.1)	99	0	4
T12	KY346532	719	Tulasnellaceae	Uncultured Tulasnellaceae clone T1 (KF871201.1)	95	0	28
T13	KY346533	693	Tulasnellaceae	Uncultured Tulasnellaceae clone OF2 (JF926474.1)	96	0	2
T14	KY346536	715	Tulasnellaceae	Uncultured Tulasnellaceae clone T1 (KF871201.1)	91	0	3
S15	KY346535	653	Sebacinaceae	Uncultured Sebacina clone LP110043 (JQ318631.1)	98	0	2
S16	KY346537	651	Sebacinaceae	Uncultured Sebacinaceae clone 410 (HQ667856.1)	98	0	2
Th17	KY346538	692	Tomentella	Uncultured Tomentella clone FB_D5_1a (JX630694.1)	99	0	1
Th18	KY346539	650	Thelephoraceae	Uncultured Thelephoraceae clone 4_62M5 (JQ393131.1)	94	0	1
IT1	MH730165	545	Tulasnellaceae	Uncultured Tulasnellaceae isolate 285 (DQ925531.1)	97	3	0
IT2	MH730166	611	Tulasnellaceae	Uncultured Tulasnellaceae isolate P100 (DQ925581.1)	96	1	0
C1	MH730164	613	Ceratobasidiaceae	Uncultured Ceratobasidiaceae clone MP1b06 (JQ972109.1)	93	1	0

表 2 培养法获得 3 种构兰菌根真菌 OTU 种类及菌株数量
Table 2 The OTU types and isolate number of OrMF of three *Cypripedium* species obtained by the culture-dependent method

物种 Species	T6	T3	T2	T4	IT1	IT2	C1	合计 Total
西藏构兰 <i>C. tibeticum</i>	23	9	9	0	3	1	1	46
无苞构兰 <i>C. flavum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
黄花构兰 <i>C. bardolphianum</i>	10	0	4	4	0	0	0	18
合计 Total	33	9	13	4	3	1	1	64

表 3 非培养法获得 3 种构兰菌根真菌 OTU 种类及克隆数
Table 3 The OTU types and clone number of OrMF of three *Cypripedium* species obtained by the culture-independent method

物种 Species	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	S15	S16	Th17	Th18	合计 Total
西藏构兰 <i>C. tibeticum</i>	116	205	43	3	143	148	7	23	11	6	4	28	2	3	0	0	0	1	743
无苞构兰 <i>C. flavum</i>	1	101	60	0	77	0	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	257
黄花构兰 <i>C. bardolphianum</i>	155	56	9	286	0	68	0	1	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	579
合计 Total	272	362	112	289	220	216	24	24	11	6	4	28	2	3	2	2	1	1	1579

代表菌株的菌丝都能形成 OrMF 典型的近球形或椭圆形链状排列的念珠状细胞(图 1, B~H)。分离出来的菌根真菌均为无性型菌丝且不产生无性孢子。

2.2 2 种方法得到杓兰 OrMF 的区系组成和系统发育关系

培养方法分离得到 64 个 OrMF 菌株,划分为 7 个 OTU(表 2)。通过在 NCBI 进行 BLAST 分析,6 个 OTU(T2-T4、T6、IT1 和 IT2)与胶膜菌科(Tulasnellaceae)真菌相似性最高,占绝对优势(98.43%),1 个 OTU C1 与腊壳菌科(Ceratobasidiaceae)真菌相似性最高。OTU T6 的菌株数最多,共 33 株,占比 51.56%;其次是 OTU T2,占比 20.31%。西藏杓兰、黄花杓兰和无苞杓兰的 OTU 类型分别为 6、0 和 3 个(表 2)。黄花杓兰在根中存在大量菌丝团,但没有菌丝团成活。

非培养法共得到 OrMF ITS 序列 1 579 条,可划分为 18 个 OTU(表 1、3)。通过在 NCBI 进行 BLAST 分析,14 个 OTU(T1-T14)与胶膜菌科(Tulasnellaceae)真菌相似性最高,占绝对优势(99.62%),2 个 OTU(S15, S16)与腊壳菌科(Sebacinaceae)真菌相似性最高,2 个 OTU(Th17, Th18)与革菌科(Thele-

phoraceae)真菌相似性最高。西藏杓兰、黄花杓兰和无苞杓兰的 OTU 类型分别为 15、6 和 8 个(表 3)。

所有胶膜菌 OTU 类型在西藏杓兰中都有分布(表 2、3、图 2)。OTU T2-T4 和 T6 用 2 种方法均能获得,且在 2 种方法中其数量都占有优势(表 2、3)。OTU T4 在 2 种方法中其菌株数或 OTU 序列数量在无苞杓兰中较西藏杓兰高(表 2、3),OTU T1 在非培养法得到的序列数量较西藏杓兰高,OTU T3 和 T7 在黄花杓兰较西藏杓兰高。其他胶膜菌 OTU 菌株数或序列数西藏杓兰都较另外 2 种杓兰高。2 种方法得到的 3 种杓兰的 OTU 类型和数量均为西藏杓兰>无苞杓兰>黄花杓兰,非培养法得到的 OTU 类型和数量均多于培养法(表 2、3)。除了胶膜菌,培养法得到一个与腊壳菌科真菌相似性最高 OTU C1,而非培养法得到与角担菌科真菌相似性最高的 OTU 2 个以及与革菌科真菌相似性最高的 OTU 2 个。

胶膜菌在 2 种方法得到的 OrMF 中占绝对优势,构建其 ITS 系统发育树结果显示,所有 OTU 分布在 3 个分支(Clade)上(图 2)。其中,分支 I 包含本研究得到的 5 个 OTU,全部为非培养法获得;聚在分支 II 中 OTU 数量最多,共 7 个,其中有 3 个 OTU



根据 Shefferson(2007)和 Yuan(2010)等的建议采用 *Multiclavula vernalis* 和 *Multiclavula corynoides* 作为外群。

节点处标注的是>50%的后验概率值,比例尺代表替换率为 0.4

图 2 3 种杓兰共生胶膜菌科菌根真菌贝叶斯系统发育树

Multiclavula vernalis and *Multiclavula corynoides* were used as outgroup as suggested by Shefferson *et al.* (2007) and Yuan *et al.* (2010). 50% majority-rule consensus tree with Bayesians probability values are shown above nodes.

The scale bar represents 0.4 substitutions/site

Fig. 2 Bayes tree for Tulasnellaceae associated with three *Cypripedium* species

表 4 不同杓兰根中 OrMF 物种丰富度

Table 4 OrMF richness in roots of different *Cypripedium* species

兰花 Orchid	OTU 数量 No. of fungal OTUs	克隆数 No. of clones	Chao1	Jack1	Bootstrap
西藏杓兰 <i>C. tibeticum</i>	15	743	15.50±1.32	16.00±1.00	15.62±0.68
无苞杓兰 <i>C. flavum</i>	6	239	7.00±2.21	7.99±1.41	6.73±0.68
黄花杓兰 <i>C. bardolphianum</i>	8	667	8.25±0.73	9.00±1.00	8.64±0.68

两种方法都能获得,4 个只有非培养法获得;聚在分支Ⅲ中的 OTU 有 3 个,其中 2 个 OTU 两种方法都能获得,1 个 OTU 只有培养方法获得。用非培养方法得到的克隆数大于 100 的优势的 OTU(T1-T6)(表 3)在 3 个分支上均有分布,分别为分支Ⅰ的 T1 和 T5;分支Ⅱ的 T2 和 T3;分支Ⅲ的 T4 和 T6。分支Ⅰ和Ⅱ的 OTU 在 3 种杓兰中均有分布,而分支Ⅲ中的 OTU 在黄花杓兰中没有分布(图 2)。

2.3 不同杓兰菌根真菌物种丰富度和群落分化程度

Chao1、Jack 1 和 Bootstrap 都显示不同杓兰间的菌根真菌物种丰富度为西藏杓兰> 无苞杓兰> 黄花杓兰(表 4),但两两杓兰之间差异不显著($P<0.05$,表 5)。3 种杓兰两两之间 OrMF 群落差异比较结果表明 Jaccard 和 Sørensen 指数都不高(表 6),其中 Jaccard 指数在 0.27~0.35 之间,Sørensen 指数在 0.43~0.52 之间,说明两两杓兰之间的 OrMF 群落有一定的差异和分化。

3 讨 论

本研究采用培养和非培养两种方法获得四川黄龙沟(同一栖息地)3 种不同杓兰属植物根中兰科植物 OrMF OTU,隶属于胶膜菌科、腊壳菌科、角担菌科和革菌科,都是兰科植物中常见的 OrMF 类群^[24-25,31-32]。其中胶膜菌占有绝对优势,在科的水平上与胶膜菌存在专一性^[10]。2 种方法共得到 16 个胶膜菌 OTU,其中有 6 个 OTU 为优势 OTU,在系统发育树的 3 个分支上均有分布,说明优势 OTU 相互之间亲缘关系较远,其他 10 个非优势胶膜菌 OTU 也在 3 个分支上均有分布。这可能是杓兰属植物的一种生存策略,即通过与多种亲缘关系较远的胶膜菌形成共生关系,当环境发生变化的时候,能够因地制宜地选择共生伙伴^[22],以达到适应环境的目的^[25]。另外,非胶膜菌 OTU 可能与胶膜菌通过协作进一步增加杓兰属植物的适应性^[22]。因此,通过与亲缘关系较远的优势与非优势胶膜菌以及非胶膜菌共生,可能是杓兰属植物能够广泛分布的原因。

从系统发育树中可以看出,已经报道的胶膜菌

表 5 卡方检验比较 OrMF OTU 数量

Table 5 Comparison of numbers of OrMF OTU using chi-square test (χ^2)

两两比较 Pairwise comparison	OTU 数量 No. of OTU			
	N	DF	χ^2	P-value
CT vs. CF	15 vs 6	1	3.857	0.050
CT vs. CB	15 vs 8	1	2.130	0.144
CF vs. CB	6 vs 8	1	0.286	0.593

注:CT 表示西藏杓兰;CF 表示黄花杓兰;CB 表示无苞杓兰。
下同
Note: CT; *C. tibeticum*; CF; *C. flavum*; CB; *C. bardolphianum*. The same as below

表 6 不同杓兰 OrMF 群落相似性指数

Table 6 Indices of similarity among OrMF communities of different *Cypripedium* species

两两比较 Pairwise comparison	共享的 OTU 数量 No. of shared OTU	Jclas	Sclas
CT vs. CF	5	0.31	0.48
CT vs. CB	6	0.35	0.52
CF vs. CB	3	0.27	0.43

ITS 序列主要集中在 cladeⅠ中,cladeⅡ和 cladeⅢ中已经报道的序列较少。目前已经鉴定到种的类群也都集中在 cladeⅠ中,且与本研究 3 种杓兰属植物中得到 OTU 类群又分属于 cladeⅠ中的两个分支。该结果说明从 3 种杓兰中得到的胶膜菌 OTU 类群较已经鉴定到种的类群有较大的差别。这可能与杓兰属植物本身分布在海拔较高的地区,其共生胶膜菌的群落组成与研究较多的低海拔类群有较大的差异。

培养和非培养的方法各有利弊,非培养的方法可以得到不可培养的 OrMF,较培养的方法能够更加全面地了解 OrMF 的多样性和群落结构^[10-11, 22, 33],而分离培养的方法会低估 OrMF 的多样性^[34]。本研究也发现无论是在 OTU 的种类还是数量上,培养法均低于非培养法。但在培养法得到的 7 个 OTU 中,除了 4 个 OTU(T2、T3、T4 和 T6)在非培养方法中也能获得,其他 3 个 OTU(IT1、IT2 和 C1)只有培养方法才能获得。因此,即使是

非培养法也不能覆盖研究对象所有的 OrMF 类群。另外,培养法可以得到可培养的菌根真菌菌株^[19, 35-36],为研究兰科植物与 OrMF 互作及兰科植物的原生地栽培和迁地保护提供了可能性^[11]。值得注意的是,通过菌丝团分离得到 OrMF,是从单个的 OrMF 菌丝团分离而来,具有确切的生物学功能,被认为是“真正的”(True)OrMF^[11, 37],而非培养方法得到的 OrMF 被称为“可能的”(Putative)OrMF^[8, 38]。当然,通过菌丝团分离法得到的真菌是否为“真正的”OrMF,还需要进一步通过共生实验,验证其生物学功能,才能得到更明确的结论^[39]。

尽管用 3 个非参数估计量计算出 3 种杓兰物种丰富度的结果都显示西藏杓兰>无苞杓兰>黄花杓兰,但在 $P<0.05$ 的水平上这种差异不显著。因此,同一栖息地 3 种不同杓兰的物种丰富度没有显著差异,这可能与 3 种杓兰有较多共同优势 OTU 有关。因为在 6 个优势 OTU 中,T1-T3 在 3 个杓兰属植物中都存在,T4-T6 分别在 2 种杓兰中存在。因为不同杓兰属植物都具有比较广泛的共生菌根真

菌谱,不同种的杓兰属植物因为近缘关系较近,所以其真菌谱有较多交叉。土壤中的 OrMF 分布会影响兰科植物中真菌的多样性^[14]。因此,在同一栖息地生存时,不同杓兰属植物会分享一些相同的 OrMF^[13],从而造成其物种丰富度没有显著差异。而两两杓兰间的群落结构存在差异,可能因为虽然 3 种杓兰间分享部分 OrMF,但不同杓兰对不同的 OrMF 类群存在一定的偏好性^[13],这种偏好性可能是造成其 OrMF 群落结构存在差异的原因。

黄花杓兰相对于其他两种杓兰菌根真菌类型和数量都相对较少,尽管其根中存在大量菌丝团,但是培养法没有分离到活的菌株。这可能与黄花杓兰花期较另外两种杓兰短^[40]有关系。植物在开花结果的过程中需要大量营养,花期短意味着短时间内营养需求大,因此对菌丝团的消化能力强,大多数菌丝团刚形成时就被黄花杓兰快速消化吸收而死亡。这可能是黄花杓兰根中存在大量菌丝团但无法培养的原因,还需要进一步研究。

致谢:感谢中科院植物研究所罗毅波研究员,北京林业大学刘红霞教授对样品采集和实验方法的指导,感谢中国科学院西双版纳植物园高江云教授对菌根真菌分离方法的指导,福建农林大学刘仲健教授对研究思路指导。感谢审稿专家提出的修改意见和建议。

参考文献:

[1] 陈心启,吉古和. 中国兰花全书[M]. 北京:中国林业出版社, 1998: 1-282.

[2] DEARNALEY J D W. Further advances in orchid mycorrhizal research[J]. *Mycorrhiza*, 2007, **17**(6): 475-486.

[3] SMITH S E, READ D J. Mycorrhizal symbiosis[M]. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press, 1997. 349-375.

[4] TAYLOR D L, MCCORMICK M K. Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas [J]. *New Phytologist*, 2008, **177**(4): 1 020-1 033.

[5] PEREIRA O L, ROLLEMBERG C L, BORGES A C, *et al.* *Epulorhiza epiphytica* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil[J]. *Mycoscience*, 2003, **44**(2): 153-155.

[6] HUYNH T T, MCLEAN C B, COATES F, *et al.* Effect of developmental stage and peloton morphology on success in isolation of mycorrhizal fungi in *Caladenia formosa* (Orchidaceae)[J]. *Australian Journal of Botany*, 2004, **52**(2): 1 512-1 516.

[7] JACQUEMYN H, MERCKX V, BRYN R, *et al.* Analysis of network architecture reveals phylogenetic constraints on mycorrhizal specificity in the genus *Orchis* (Orchidaceae) [J]. *New Phytologist*, 2011, **192**(2): 518-528.

[8] WAUD M, BUSSCHAERT P, LIEVENS B, *et al.* Specificity and localised distribution of mycorrhizal fungi in the soil may contribute to co-existence of orchid species[J]. *Fungal Ecology*, 2016, **20**: 155-165.

[9] SHEFFERSON R P, TAYLOR D L, WEISS M, *et al.* The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids[J]. *Evolution*, 2007, **61**(6): 1 380-1 390.

[10] SHEFFERSON R P, WEISS M, KULL T, *et al.* High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*[J]. *Molecular Ecology*, 2005, **14**(2): 613-626.

[11] KOHOUT P, TESITELOVA T, ROY M, *et al.* A diverse fungal community associated with *Pseudorchis albida* (Orchidaceae) roots[J]. *Fungal Ecology*, 2013, **6**(1): 50-64.

[12] XU L L, ZHANG Y, XU J. Tulasnellaceae associated with orchids: Taxonomy, diversity, specificity and plasticity[J]. *Mycosystema*, 2019, **38**(3): 291-312.

[13] YUAN L, YANG Z L, LI S Y, *et al.* Mycorrhizal specificity, preference, and plasticity of six slipper orchids from South Western China [J]. *Mycorrhiza*, 2010, **20**(8): 559-568.

[14] TAYLOR D L, BRUNS T D. Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza maculata* and *C-mertensiana*[J]. *Molecu-*

lar Ecology, 1999, **8**(10): 1 719-1 732.

[15] PABLO SUAREZ J, SEBASTIAN EGUIGUREN J, HER-
RERA P, *et al.* Do mycorrhizal fungi drive speciation in
Teagueia (Orchidaceae) in the upper Pastaza watershed of
Ecuador? [J]. *Symbiosis*, 2016, **69**(3): 161-168.

[16] SHIMURA H, KODA Y. Enhanced symbiotic seed germina-
tion of *Cypripedium macranthos* var. *rebutense* following in-
oculation after cold treatment[J]. *Physiologia Plantarum*,
2005, **123**(3): 281-287.

[17] SHIMURA H, SADAMOTO M, MATSUURA M, *et al.*
Characterization of mycorrhizal fungi isolated from the threat-
ened *Cypripedium macranthos* in a northern island of Japan;
two phylogenetically distinct fungi associated with the orchid
[J]. *Mycorrhiza*, 2009, **19**(8): 525-534.

[18] PHILLIPS R D, BARRETT M D, DIXON K W, *et al.* Do
mycorrhizal symbioses cause rarity in orchids? [J]. *Journal
of Ecology*, 2011, **99**(3): 858-869.

[19] DAVIS B J, PHILLIPS R D, WRIGHT M, *et al.* Continent-
wide distribution in mycorrhizal fungi: implications for the bi-
ogeography of specialized orchids [J]. *Annals of Botany*,
2015, **116**(3): 413-421.

[20] DEARNALEY J D W. The fungal endophytes of *Eryth-
rorchis cassythoides*—is this orchid saprophytic or parasitic?
[J]. *Australasian Mycologist*, 2006, **25**: 51-57.

[21] DEARNALEY J D W, BOUGOURE J J. Isotopic and molec-
ular evidence for saprotrophic Marasmiaceae mycobionts in
rhizomes of *Gastrodia sesamoides* [J]. *Fungal Ecol*, 2010, **3**
(4): 288-94.

[22] PANDEY M, SHARMA J, TAYLOR D L, *et al.* A narrow-
ly endemic photosynthetic orchid is non-specific in its mycor-
rhizal associations [J]. *Molecular Ecology*, 2013, **22**(8):
2 341-2 354.

[23] PELLEGRINO G, LUCA A, BELLUSCI F. Relationships
between orchid and fungal biodiversity: Mycorrhizal prefer-
ences in Mediterranean orchids [J]. *Plant Biosystems*, 2016,
150(2): 180-189.

[24] JACQUEMYN H, WAUD M, MERCKX V S F T, *et al.*
Habitat-driven variation in mycorrhizal communities in the
terrestrial orchid genus *Dactylorhiza* [J]. *Scientific Reports*,
2016, **6**: 37 182.

[25] OTERO J T, ACKERMAN J D, BAYMAN P. Differences
in mycorrhizal preferences between two tropical orchids [J].
Molecular Ecology, 2004, **13**(8): 2 393-2 404.

[26] BURNHAM KP, OVERTON WS. Estimation of the size of
a closed population when capture probabilities vary among an-
imals [J]. *Biometrika*, 1978, **65**(3): 625-633.

[27] CHAO A. Nonparametric estimation of the number of classes
in a population [J]. *Scandinavian Journal of Statistics*,
1984, **11**(4): 265-270.

[28] CHAO A. Estimating the population size for capture-recap-
ture data with unequal catchability [J]. *Biometrics*, 1987, **43**
(4): 783-791.

[29] CHAO A, CHAZDON RL, COLWELL RK, *et al.* A new
statistical approach for assessing similarity of species compo-
sition with incidence and abundance data [J]. *Ecological Let-
ters*, 2005, **8**: 148-159.

[30] CHAO A, CHAZDON RL, COLWELL RK, *et al.* Abun-
dance-based similarity indices and their estimation when there
are unseen species in samples [J]. *Plant Journal*, 2010, **62**
(2): 361-371.

[31] BIDARTONDO M I, BURGHARDT B, GEBAUER G, *et
al.* Changing partners in the dark: isotopic and molecular evi-
dence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and
trees [J]. *Proceedings of the Royal Society B-Biological
Sciences*, 2004, **271**(1 550): 1 799-1 806.

[32] OTERO J T, ACKERMAN J D, BAYMAN P. Diversity and
host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from
tropical orchids [J]. *American Journal of Botany*, 2002, **89**
(11): 1 852-1 858.

[33] LIU T, LI C M, HAN Y L, *et al.* Highly diversified fungi
are associated with the achlorophyllous orchid *Gastrodia fla-
vilabella* [J]. *BMC Genomics*, 2015, **16**(1): 185.

[34] PORRAS-ALFARO A, BAYMAN P. Mycorrhizal fungi of
Vanilla: Diversity, specificity and effects on seed germination
and plant growth [J]. *Mycologia*, 2007, **99**(4): 510-525.

[35] NONTACHAIYAPOOM S, SASIRAT S, MANOCH L. I-
solation and identification of *Rhizoctonia*-like fungi from roots
of three orchid genera, *Paphiopedilum*, *Dendrobium*, and
Cymbidium, collected in Chiang Rai and Chiang Mai prov-
inces of Thailand [J]. *Mycorrhiza*, 2010, **20**(7): 459-471.

[36] CHEN J, WANG H, GUO S. Isolation and identification of
endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of
Dendrobium (Orchidaceae) [J]. *Mycorrhiza*, 2012, **22**(4):
297-307.

[37] ZHU G S, YU Z N, GUI Y, *et al.* A novel technique for iso-
lating orchid mycorrhizal fungi [J]. *Fungal Diversity*, 2008,
33: 123-137.

[38] ESPOSITO F, JACQUEMYN H, WAUD M, *et al.* Mycor-
rhizal fungal diversity and community composition in two
closely related *Platanthera* (Orchidaceae) species [J]. *Plos
One*, 2016, **11**(10): e0164108.

[39] 陈心启, 刘仲健, 罗毅波. 中国兰科植物鉴别手册 [M]. 北京:
中国林业出版社, 2009: 1-160.

[40] 柯海丽, 宋希强, 罗毅波, 等. 五唇兰菌根化育苗技术 [J].
园艺学报, 2008, **35**(4): 571-576.

KE H L, SONG X Q, LUO Y B, *et al.* Seedling cultivation
of *Doritis pulcherrima* lindl. with mycorrhizal fungi [J]. *Ac-
ta Horticulturae Sinica*, 2008, **35**(4): 571-576.

(编辑:潘新社)