

内蒙古大青山灌木铁线莲根围丛枝菌根 真菌群落季节动态研究

刘 敏¹, 嵕 嵘², 白淑兰^{1*}, 青 云², 闫 伟³, 贾学文³

(1 内蒙古农业大学 林学院, 呼和浩特 010019; 2 内蒙古师范大学 生命科学与技术学院, 呼和浩特 010022; 3 鄂尔多斯市林业治沙科学研究院, 内蒙古鄂尔多斯 017000)

摘 要: 采用 Illumina MiSeq 测序技术研究了内蒙古大青山干旱阳坡灌木铁线莲(*Clematis fruticosa*)根围丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)群落的季节动态, 并利用冗余分析(redundancy analysis, RDA)和 Mantel test 分析了土壤和植被因子与 AMF 之间的关系, 为进一步探索灌木铁线莲-AMF 共生体对不同季节环境变化的响应提供理论依据。结果表明: (1) 灌木铁线莲根围 AMF 孢子密度不存在显著的季节性差异, 根系感染率和丛枝丰度从春季至秋季呈下降趋势。(2) 3 个季节共检测出 163 个 AMF OTUs(operational taxonomic units), 春季、夏季、秋季分别为 116 OTUs, 76 OTUs 和 70 OTUs。(3) 夏季和秋季的 AMF 丰富度(实测 OTUs 数和 Chao1 指数)以及多样性(Shannon-Wiener 指数和 Invsimpson 指数)显著低于春季, 但夏、秋季间无显著差异。(4) 主成分分析和 PERMANOVA 分析表明, 夏季和秋季的 AMF 群落组成与春季存在显著差异, 而 AMF 群落组成在夏季与秋季间差异不显著。(5) RDA 分析表明, 采样季节、植被盖度、植物多样性、土壤含水量和土壤有机质对 AMF Shannon-Wiener 指数、Invsimpson 指数、Chao1 指数和实测 OTUs 数均产生显著影响; Mantel test 分析发现, 采样季节是影响 AMF 群落组成和菌根感染率的主导因子, 但对孢子密度无显著影响, 而土壤有机质是影响孢子密度的主导因子。

关键词: 灌木铁线莲; 丛枝菌根真菌; 季节动态; Illumina MiSeq 测序

中图分类号: Q939.96; Q938.1 文献标志码: A

Seasonal Dynamics of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Community in the Rhizosphere of *Clematis fruticosa* in the Daqingshan Mountains, Inner Mongolia

LIU Min¹, ZHENG Rong², BAI Shulan^{1*}, QING Yun², YAN Wei³, JIA Xuewen³

(1 College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China; 2 College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Normal University, Hohhot 010022, China; 3 Institute of Forestry and Sand Science of Ordos, Ordos, Inner Mongolia 017000, China)

Abstract: With the method of Illumina MiSeq sequencing, we investigated the seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal community in the rhizosphere of *Clematis fruticosa* in the arid sunny slopes of the Daqingshan Mountains. By the methods of redundancy analysis (RDA) and Mantel test, we also analyzed the relationships between AMF and soil and plant factors. It would provide important scientific basis to

收稿日期: 2016-06-12; 修改稿收到日期: 2016-08-21

基金项目: 国家自然科学基金(31360125)

作者简介: 刘 敏(1989—), 女, 在读博士研究生, 主要从事菌根生物技术研究。E-mail: liumin19890110@yeah.net

* 通信作者: 白淑兰, 博士, 教授, 主要从事菌根生物技术研究。E-mail: baishulan2004@163.com

further discuss the response of *C. fruticosa*-AMF symbioses to climate changes in different seasons. The results indicated that: (1) Spore density of AMF was no significant difference among seasons, but colonization rate and arbuscule abundance of AMF had a decreasing trend from spring to autumn. (2) A total of 163 AMF OTUs (operational taxonomic units) were detected in three seasons, 116 OTUs, 76 OTUs and 70 OTUs were detected in spring, summer and autumn, respectively. (3) AMF richness (Observed OTUs and Chao 1 index) and diversity (Shannon-Wiener index and Invsimpson index) of summer and autumn were significantly lower than that of spring, but there were no significant differences between summer and autumn. (4) Principal coordinate analysis and PERMANOVA analyses indicated that AMF community compositions of summer and autumn were significantly different from that of spring, while the difference was not significant in summer and autumn. (5) RDA analysis showed that sampling season, plant coverage, plant diversity, soil moisture content and soil organic matter significantly influenced Shannon-Wiener index, Invsimpson index, Chao 1 index and Observed OTUs of AMF. Mantel test indicated that sampling season was the driving factor to affect community composition and colonization rate of AMF, but had no significantly influence on spore density, soil organic matter was the driving factor to influence spore density.

Key words: *Clematis fruticosa*; arbuscular mycorrhizal fungi; seasonal dynamics; Illumina MiSeq sequencing

受全球气候变化和人类活动的影响,内蒙古大青山土壤及植被资源遭受到严重破坏,尤其是阳坡,很多地区均成为沟壑纵横、岩石裸露的荒山。灌木铁线莲(*Clematis fruticosa*)作为该生境主要的护土灌木,在水土保持及防治土壤侵蚀等方面发挥着重要作用。丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)可与地球上大多数植物形成共生体,能够提高植物对养分的吸收^[1]、增强植物抗干旱胁迫能力^[2-3]、提高土壤团聚体稳定性^[4],还能影响植物生物量、生长速度和生产力^[5-6]。所以,灌木铁线莲能在内蒙古大青山阳坡干旱和贫瘠环境中生存,必然与 AMF 共生有很大关联。

研究表明,AMF 侵染率、孢子密度、多样性和群落组成均存在季节性变化规律^[7-10],但也有研究认为 AMF 群落组成和多样性无季节性差异^[11]。可见,季节变化对 AMF 群落的影响无固定模式。此外,非生物和生物因素的季节性变化均可能影响 AMF 群落组成。例如,在美国北卡罗来纳州的草原地区,植被群落组成的季节性变化会显著影响 AMF 群落组成^[12];而 Baidnard 等^[7]却发现土壤磷酸盐含量、含水量和宿主植物种类是导致不同季节 AMF 群落变化的主要原因。也有研究表明,AMF 群落季节动态变化与宿主植物物候有关。Senesguerrero 等^[13]发现秘鲁安第斯山脉地区的马铃薯幼苗期、开花期和衰老期的 AMF 群落存在显著差异;Cuenca 等^[14]发现在热带或亚热带的雨季(植物开花期或结果期)AMF 丰富度要低于干季(植物生长期)。因此,AMF 群落季节动态不仅受土壤理

化性质和植物群落季节性变化的影响,还与宿主植物的种类和物候有关。那么,内蒙古大青山灌木铁线莲根系菌根侵染率、孢子密度和 AMF 群落组成是否会出现季节性变化规律,可能会受哪些因素的影响,均为本研究拟探讨的问题。

1 材料和方法

1.1 研究区概况及样品采集

研究区位于内蒙古大青山呼和浩特段,属典型的温带大陆性气候,年平均气温 3 ~ 5 °C,年平均降雨量 320 ~ 450 mm,年平均蒸发量 1 800 ~ 2 300 mm。内蒙古大青山地区灌木铁线莲生长期为 5 月,开花期为 7 ~ 8 月,果期为 9 月^[15]。所以,本研究分别于 2014 年 5 月(春)、7 月(夏)和 9 月(秋)在水磨村(40°58'55"N, 111°51'34"E)、小井沟(40°58'25"N, 111°50'44"E)和白石头沟(40°47'37"N, 111°26'47"E)样地随机设置 3 个 3 m×3 m 样方,调查样方中植被盖度及植物群落组成,每个样方随机选择 3 株灌木铁线莲,在距植株 0 ~ 10 cm 处挖根围土壤,采集 0 ~ 20 cm 深处的细根样和土样(每次采样均取相同植株),相同样方的样本混合均匀,组成一个混合样本。混合样本首先取大约 20 g 左右土壤放入到铝盒中,用于测定土壤含水量。剩余土壤一部分贮存在 -20 °C 冰箱中,用于分子鉴定;另一部分风干,测定孢子密度和土壤理化性质。根样用蒸馏水清洗数次后放在装有 FAA 固定液(5 mL 甲醛,5 mL 醋酸和 90 mL 70%乙醇)的玻璃瓶中,用于 AMF 侵染率测定。

1.2 土壤理化性质测定

土壤含水量、pH、有机质、速效氮和速效磷含量的测定分别使用烘干法、电位法、重铬酸钾氧化法、碱解扩散法和 0.5 mol/L 碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法^[16]。

1.3 丛枝菌根真菌孢子分离和根侵染率测定

取 10 g 风干土样,筛筛倾析-蔗糖离心法^[17]分离 AMF 孢子,置于培养皿内的蒸馏水中,在体视镜下观察,记录 AMF 孢子数目。

将采集的幼嫩根系剪成长度为 1 cm 左右根段,10% KOH 溶液浸泡并在 90 °C 水浴锅加热 1 h,碱性 H₂O₂ 溶液(10 mL 30% H₂O₂, 3 mL NH₄OH, 加蒸馏水至 600 mL)软化 20 min,1% HCl 酸化 3 min,0.05% 曲利苯蓝乳酸甘油溶液(乳酸:甘油=1:1)浸泡并在 90 °C 水浴锅加热 3 h,最后在乳酸甘油溶液中脱色 48 h。将脱色后的根段置于载玻片上在显微镜下观察,利用十字交叉法^[18]测定 AMF 侵染率和丛枝丰度。

1.4 土壤 DNA 提取、PCR 扩增和测序

取 0.2 g 土样,按照 E. Z. N. A. Soil DNA Kit (OMEGA, USA) 的说明提取土壤 DNA。利用琼脂糖凝胶电泳查看 DNA 的完整性,利用 Qubit2.0 DNA Detection Kit (Life Technologies, USA) 精确测定 DNA 浓度,以确定 PCR 反应加入的 DNA 量。利用 Illumina MiSeq 测序技术和 AMV4.5NF(5'-AAGCTCGTAGTT GAATTTCG-3')/AMDGR (3'-CCCAACTATCCCTATTATCAT-5') 引物^[19]评估 AMF 群落组成。为保证 Illumina MiSeq 测序顺利进行和多个样本同时测序,需在引物中添加 Illumina 平台 adapter 和 7 bp-barcode(标签序列)。采用 two-step PCR 进行 PCR 扩增,反应体系为 50 μ L,包括 10 ng DNA 模板(第一次 PCR)或者是 20 ng PCR 产物(第二次 PCR)、5 μ L 10 $\times$ PCR buffer、0.5 μ L dNTP(10 mmol/L each)、0.5 μ L Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)、0.5 μ L 引物(50 μ mol/L,前后引物各 0.5 μ L),最后用 ddH₂O 补充到 50 μ L。反应程序为:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 15 s,55 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 30 s,循环 25 次;最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,按照 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工,中国)操作说明回收 PCR 产物。回收产物用 Qubit2.0 DNA Detection Kit (Life Technologies, USA) 测定浓度,根据浓度,将所有样本按 1:1 比例充分混合,进行 Illumina MiSeq 测序。

1.5 测序结果分析

Illumina MiSeq 测序得到的是双端序列数据,首先根据双端测序 reads 之间的 overlap 关系,将成对 reads 拼接成一条序列,对 reads 质量和拼接效果进行质量控制过滤,根据序列首尾两端的 barcode 和引物序列区分样本得到有效序列,并校正序列方向。质量控制过滤主要是去掉短片段序列、含有错误的 barcode 和引物的序列和融合后 reads 质量控制得分在 20 以下的序列。利用 Flash(1.2.3)^[20]和 Prinseq(0.20.4)^[21]分别进行序列拼接和质量控制过滤。按序列间距离对序列进行归类,利用 CROP 方法^[22]以 97% 相似性分类 OTUs (operational taxonomic units)。使用 Blast 首先在 GenBank 数据库进行比对,排除非球囊菌门(Glomeromycota) OTUs 数。然后在 MaarjAM 数据库^[23]中再次比对 OTUs 序列,进一步确认 AMF OTUs 分类学信息。

1.6 统计处理

统计分析前,对土壤理化性质、植被盖度、孢子密度、菌根侵染率、AMF 丰富度和多样性等数据进行标准化处理。利用 SPSS 软件(20.0)对不同季节数据进行单因素方差分析,LSD 多重比较检验不同季节间的差异显著性。利用 Mothur 软件(1.30.1)对实测 OTUs 数、Chao1 指数、Shannon-Wiener 指数和 Invsimpson 指数进行 rarefaction 分析。为比较不同季节 AMF 群落组成的差异性,利用 PCORD 软件(5.0)进行主成分分析(principal coordinate analysis, PCoA)和 PERMANOVA 分析。利用 Canoco 软件(4.5)的冗余分析(redundancy analysis, RDA)描绘不同季节 AMF 丰富度和多样性指数与采样季节、土壤和植被因子间的关系。Mantel test 进一步检验 AMF 群落组成、孢子密度和菌根侵染率与采样季节、土壤和植被因子间的关系。

2 结果与分析

2.1 样地土壤理化性质及植被因子季节变化特征

由表 1 可以看出,样地春季土壤速效氮、速效磷和有机质含量显著高于夏季和秋季;夏季土壤含水量显著高于春季和秋季;夏季和秋季植被盖度显著高于春季;土壤 pH 值和植物 Shannon-Wiener 多样性指数在 3 个季节间无显著差异。

2.2 丛枝菌根真菌孢子密度和根系侵染率季节变化

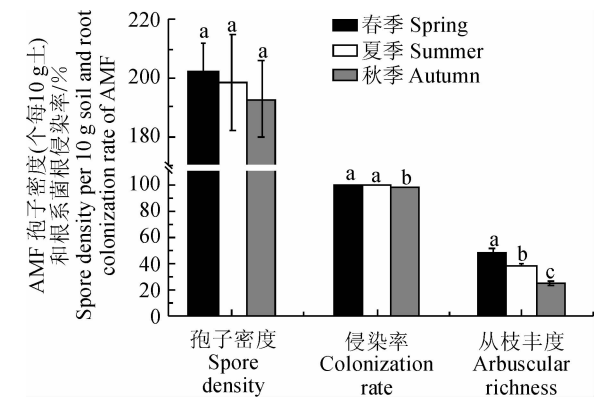
从图 1 可以看出,灌木铁线莲根围土壤 AMF 孢子密度在春季、夏季和秋季不存在显著差异;灌木

表 1 不同季节土壤和植被因子比较

Table 1 The comparison of soil and plant factors in different seasons

因子 Factor	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn
pH	7.50±0.07a	7.55±0.11a	7.62±0.10a
速效氮 Available N/(mg/kg)	167.95±7.97a	180.99±11.47b	179.12±5.25b
速效磷 Available P/(mg/kg)	3.08±0.27a	3.46±0.23b	3.52±0.23b
土壤有机质 Soil organic matter/(g/kg)	33.87±2.31a	27.28±1.41b	27.52±1.60b
土壤含水量 Soil moisture content/%	7.72±0.44b	10.28±0.46a	8.29±0.37b
植物 Shannon-Wiener 多样性指数 Shannon-Wiener index	1.56±0.18a	1.74±0.16a	1.72±0.12a
植被盖度 Plant coverage/%	56.67±2.36b	70.73±3.24a	68.33±1.86a

注:数据为均值±标准误(n=9);同一行数据后不同字母表示在 0.05 水平上差异显著
Note: Data are means±SE. Data with different letters in the same line indicate significant differences at 0.05 level



同一组柱子上不同字母表示在 0.05 水平上差异显著;
误差棒代表标准误。

图 1 不同季节 AMF 孢子密度及侵染率

Columns with different letters at the same group indicate significant differences at 0.05 level; error bars indicate standard errors

Fig. 1 Spore density and colonization of AMF in different seasons

铁线莲根系 AMF 侵染率较高,所有样本(n=27) AMF 侵染率均超过 95%,且春季和夏季根系侵染率显著高于秋季;丛枝丰度在 3 个季节之间均呈显著差异,其中春季最高,秋季最低。相关性分析表明,灌木铁线莲根围土壤 AMF 孢子密度与采样季节无显著相关性,根系侵染率和丛枝丰度与采样季节极显著负相关($r = -0.741, P = 0.000; r = -0.896, P = 0.000$),说明随灌木铁线莲的生长(5 月)、开花(7 月)、结实(9 月),其根系 AMF 侵染率和丛枝丰度呈下降趋势。

2.3 根围土壤丛枝菌根真菌群落组成及其季节变化特征

随测序样本数的不断增加,不同季节 AMF 物种累积曲线基本上达到平缓期(图 2),说明在本研究中每个季节测序样本数量是充足的。Illumina Miseq

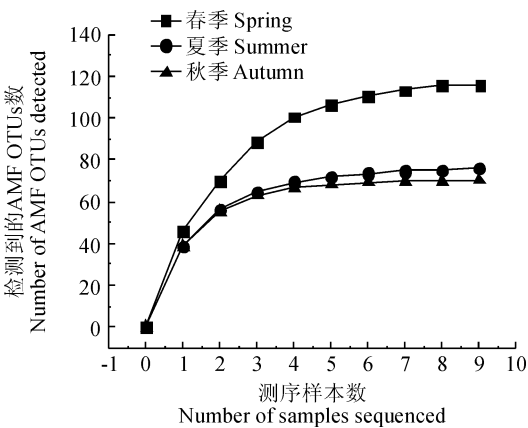


图 2 不同季节 AMF 物种累积曲线

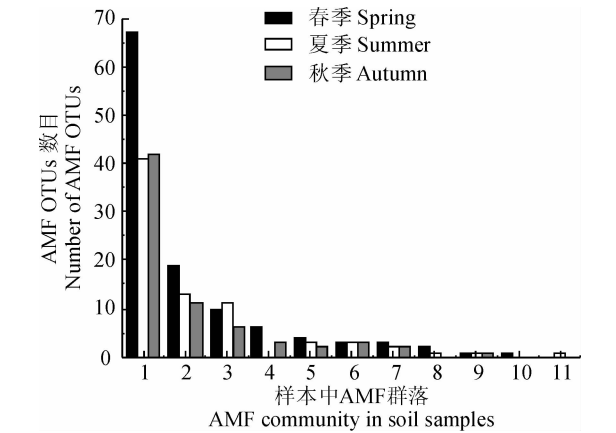
Fig. 2 Species accumulation curves of AMF in different seasons

测序共检测到 300 718 条序列,被归类为 295 OTUs。AMF 序列数目为 204 122,占总数的 67.88%,所有序列被分类为 163 OTUs,属于球囊霉属(*Glomus*)、uncultured-Glomeromycota、多样孢囊霉属(*Diversispora*)、近明球囊霉属(*Claroideoglomus*)、盾巨孢囊霉属(*Scutellospora*)、管柄囊霉属(*Funeliiformis*)、*Rhizophagus*、类球囊霉属(*Paraglomus*)、*Ambispora*、*Septoglomus* 和原囊霉属(*Archaeospora*)。其中球囊霉属序列数和 OTUs 数目最多,其次为 uncultured-Glomeromycota,第三为多样孢囊霉属,其余属数目较少(表 2)。

图 3 为不同季节 AMF 群落组成,3 个季节总共检测到 163 个 AMF OTUs,春季、夏季、秋季分别为 116、76 和 70 OTUs。各季节 AMF 群落的优势属均为球囊霉属。随着季节变化,球囊霉属、uncultured-Glomeromycota、盾巨孢囊霉属、*Rhizophagus* OTUs 数目基本呈下降趋势,而多样孢囊霉属 OTUs 数目夏季最多,管柄囊霉属和 *Ambispora* OTUs 数

表 2 Illumina MiSeq 测序得到的 AMF 序列数和 OTUs 数
Table 2 Number of sequences and OTUs of AMF from all soil samples obtained by Illumina MiSeq sequencing

AMF 群落 AMF community		序列数 Number of sequences	OTUs 数 Number of OTUs
编号 No.	名称 Name		
1	球囊霉属 <i>Glomus</i>	110 217	95
2	uncultured-Glomeromycota	32 628	25
3	多样孢囊霉属 <i>Diversispora</i>	21 481	19
4	近明球囊霉属 <i>Claroideoglomus</i>	8 167	6
5	盾巨孢囊霉属 <i>Scutellospora</i>	8 024	5
6	管柄囊霉属 <i>Funeliiformis</i>	7 239	4
7	<i>Rhizophagus</i>	7 318	4
8	类球囊霉属 <i>Paraglomus</i>	3 023	2
9	<i>Ambispora</i>	2 104	1
10	<i>Septoglomus</i>	1 937	1
11	原囊霉属 <i>Archaeospora</i>	1 984	1



1. 球囊霉属;2. Uncultured-Glomeromycota;3. 多样孢囊霉属;
4. 近明球囊霉属;5. 盾巨孢囊霉属;6. 管柄囊霉属;7. *Rhizophagus*;
8. 类球囊霉属;9. *Ambispora*;10. *Septoglomus*;11. 原囊霉属
图 3 不同季节 AMF 群落组成
1. *Glomus*; 2. Uncultured-Glomeromycota; 3. *Diversispora*;
4. *Claroideoglomus*; 5. *Scutellospora*; 6. *Funeliiformis*;
7. *Rhizophagus*; 8. *Paraglomus*; 9. *Ambispora*;
10. *Septoglomus*; 11. *Archaeospora*

Fig. 3 Community composition of AMF based on number of OTUs in different seasons

目在 3 个季节保持不变。此外,近明球囊霉属只存在于春季和秋季,类球囊霉属只存在于春季和夏季,*Septoglomus* 只存在于春季,原囊霉属只存在于夏季。基于 Bray-Curtis 距离对不同季节 AMF 群落组成进行 PERMANOVA 分析(表 3),结果发现,夏季和秋季 AMF 群落组成与春季存在显著差异,而 AMF 群落组成在夏季和秋季的差异并不显著,这与 PCoA 分析结果是一致的(图 4)。

表 3 不同季节 AMF 群落组成的 PERMANOVA 分析
Table 3 The results of PERMANOVA analysis of AMF community composition in different seasons

季节 Season	F	P
春季 vs 夏季 Spring vs summer	1.836	0.036 *
春季 vs 秋季 Spring vs autumn	1.996	0.023 *
夏季 vs 秋季 Summer vs autumn	1.318	0.169

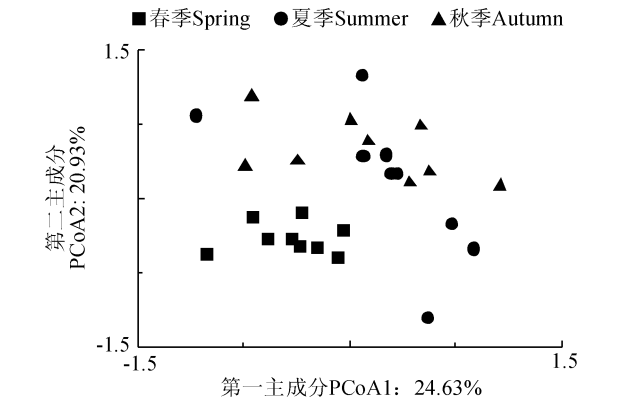


图 4 不同季节 AMF 群落的主成分分析
Fig. 4 Principal coordinate analysis (PCoA) of AMF community from different seasons

2.4 不同季节丛枝菌根真菌丰富度和多样性指数的稀疏曲线分析

利用实测 OTUs 数、Chao1 指数、Shannon-Wiener 指数和 Invsimpson 指数的稀疏曲线评估和比较不同季节 AMF 丰富度和多样性(图 5)。当 AMF 序列数超过 30 000 时,所有曲线均基本上达到平缓期,说明本研究测序得到的 AMF 丰富度和多样性能够很好地描述不同季节的 AMF。此外,春季 AMF 丰富度(实测 OTUs 数和 Chao1 指数)和多样性(Shannon-Wiener 和 Invsimpson 多样性指数)显著高于夏季和秋季(LSD 检验, $P < 0.05$)。实测 OTUs 数和 Chao1 指数值分别从春季的 116、121.96,降低到夏季的 76、77 和秋季的 70、70(图 5, A、B);相应地,Shannon-Wiener 和 Invsimpson 多样性指数值分别从春季的 3.62、20.26,降低到夏季的 3.21、14.78 和秋季的 3.07、12.89(图 5, C、D)。然而,夏季和秋季的 AMF 丰富度和多样性无显著差异(LSD 检验, $P > 0.05$)。

2.5 根围土壤理化性质和植被因子对丛枝菌根真菌的影响

RDA 分析结果表明(图 6),第一轴和第二轴的解釋量分别为 20.52%和 5.28%,采样季节、植被盖度、植被多样性、土壤含水量和土壤有机质显著影响 AMF 多样性指数(Shannon-Wiener 指数和 Invsim-

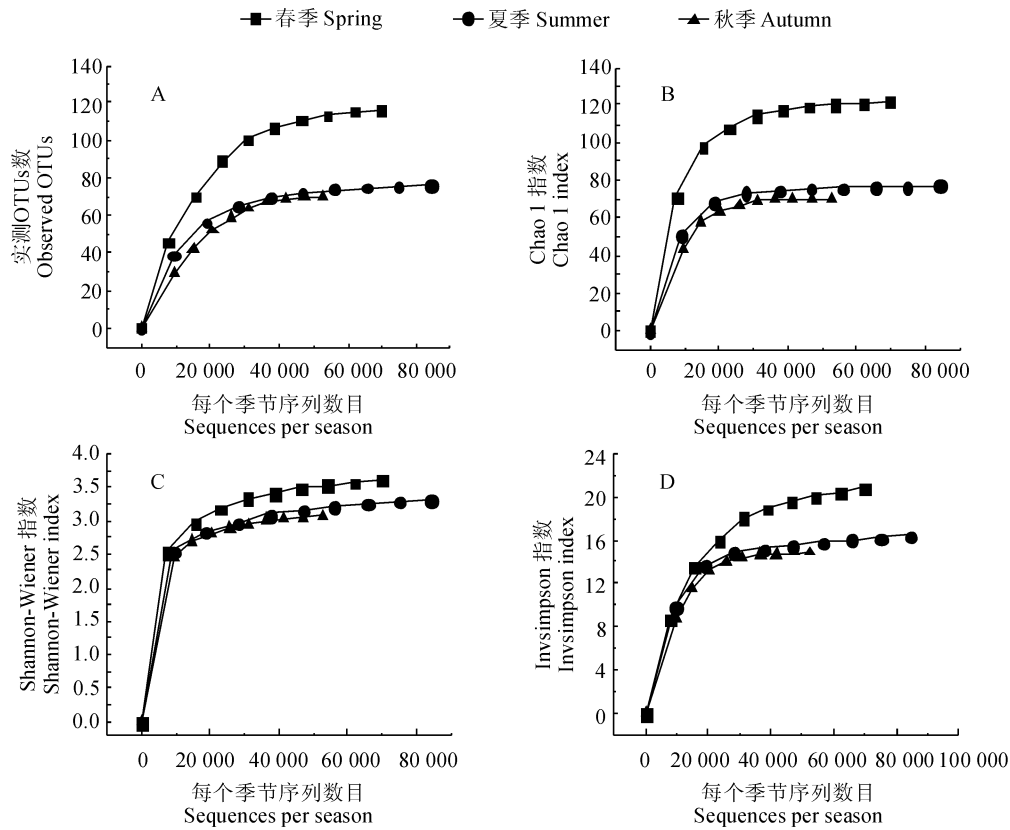
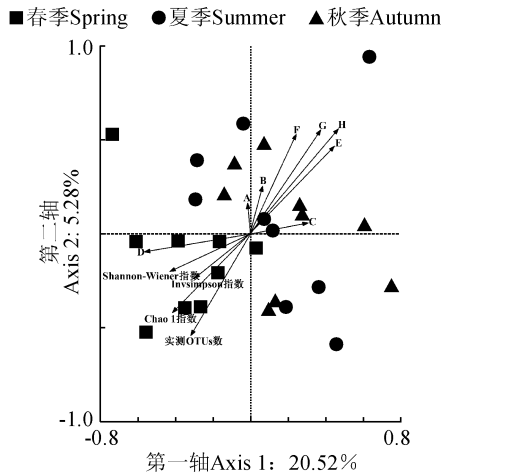


图 5 不同季节 AMF 物种丰富度(A、B)和多样性指数(C、D)的稀疏曲线
Fig. 5 Rarefaction curves of AMF richness (A and B) and diversity (C and D) in different seasons



A. pH; B. 速效氮; C. 速效磷; D. 土壤有机质; E. 土壤含水量;
F. 植物 Shannon-Wiener 多样性指数; G. 植被盖度; H. 采样季节
图 6 AMF 丰富度和多样性与采样季节、土壤和植被

因子 RDA 分析图

A. pH; B. Available N; C. Available P; D. Soil organic matter;
E. Soil moisture content; F. Shannon-Wiener index;
G. Plant coverage; H. Sampling seasons

Fig. 6 RDA ordination plot showed the relationships between AMF richness and diversity, sampling seasons, soil and plant factors

pson 指数) 和丰富度指数 (Chao1 指数和实测 OTUs 数, $P < 0.05$)。AMF 丰富度指数和多样性指数与采样季节、植被盖度、植被多样性和土壤含水量呈显著负相关,与土壤有机质呈显著正相关。

另外,利用 Mantel test 分析 AMF 群落组成、孢子密度和菌根侵染率与采样季节、土壤和植被因子之间的关系(表 4),结果发现:土壤有机质含量显著影响 AMF 群落组成、孢子密度和菌根侵染率;采样季节显著影响 AMF 群落组成和菌根侵染率;土壤含水量、植物多样性和植被盖度显著影响 AMF 群落组成;采样季节是影响 AMF 群落组成和菌根侵染率的主导因子,土壤有机质是影响孢子密度的主导因子。

3 讨论

本研究利用 Illumina MiSeq 测序技术首次探讨了内蒙古大青山干旱阳坡灌木铁线莲根围 AMF 群落季节动态。虽然引物具有特异性,仍检测到一些不属于球囊菌门的序列,但 AMF 实测 OTUs 数、Chao 1 丰富度指数、Shannon-Wiener 多样性指数和 Invsimpson 多样性指数的稀疏曲线均基本上达到平缓期,说明本研究得到的 AMF 丰富度和多样性能

表 4 AMF 群落、孢子密度和菌根侵染率与采样季节、土壤和植被因子之间关系的 Mantel test 分析

Table 4 Relationships of AMF community, spore density and colonization rate with sampling seasons, soil and plant factors by Mantel test

变量 Variable		AMF 群落 AMF community		孢子密度 Spore density		菌根侵染率 Colonization rate	
编号 No.	名称 Name	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
A	pH	0.0471	0.3756	0.1414	0.0653	−0.0085	0.4939
B	速效氮 Available N	0.0673	0.2496	0.0470	0.3869	0.1221	0.1526
C	速效磷 Available P	0.0732	0.2207	0.0718	0.2941	0.0906	0.1782
D	土壤有机质 Soil organic matter	0.2754	0.0001	0.1512	0.0045	0.1722	0.0037
E	土壤含水量 Soil moisture content	0.2873	0.0001	0.0130	0.4797	−0.0316	0.4042
F	植物 Shannon-Wiener 多样性指数 Shannon-Wiener index	0.2693	0.0001	0.0677	0.2599	−0.1009	0.2030
G	植被盖度 Plant coverage	0.3029	0.0001	0.0897	0.1740	−0.0011	0.4537
H	采样季节 Sampling seasons	0.3228	0.0001	0.0948	0.1880	0.6047	0.0001

很好地描述不同季节的 AMF。本研究共检测到 AMF 序列 204 122 条和 163 OTUs,明显高于使用焦磷酸测序和相同引物得到的结果^[24-25],这可能与 Illumina MiSeq 测序具有较高的测序深度和产生较低的错配序列有关,同时也表明灌木铁线莲根围土壤中蕴含着丰富的 AMF 资源。

春季 AMF 丰富度和多样性显著高于夏季和秋季,而夏季和秋季 AMF 丰富度和多样性差异并不显著,这可能与采样时灌木铁线莲所处物候期有关。宿主植物是 AMF 碳水化合物提供者,对于 AMF 具有重要影响。植物不同生长阶段,其对碳水化合物的需求会有所差异,从而间接影响 AMF 群落。春季为灌木铁线莲营养生长阶段(生长期),随着植物叶片的增多,光合作用产物会逐渐超过植物地上部分生长的需求,流动到根部的碳水化合物会增多,从而维持较高的 AMF 丰富度和多样性。随着季节的变化,植物进入生殖生长阶段(开花期和结实期)。研究发现,植物开花期和结实期比生长期需要更多的碳水化合物^[26-28],这时大量的碳水化合物被运送到正在发育的生殖器官,加之根部对碳水化合物的竞争力最弱^[29],导致运送到根部的碳水化合物大大减少,使 AMF 丰富度和多样性降低。此外,与夏季和秋季相比,春季土壤温度较低,而较低的土壤温度会降低植物直接从土壤中吸收养分的速率^[30],土壤温度在 10℃ 时,AMF 能够促进植物对养分的吸收^[31],这也可能是导致春季 AMF 丰富度和多样性较高的原因之一。从春季到秋季,灌木铁线莲根系 AMF 侵染率和丛枝丰度呈下降趋势。据报道,Zangaro 等^[9]发现巴西南部地区的热带雨林植物 AMF 侵染率在春季和夏季高于秋季,刘永俊等^[10]

发现柠条(*Caragana korshinskii*)AMF 侵染率从春季至秋季呈下降趋势,丛枝丰度呈上升趋势;Hazard 等^[32]发现黑麦草(*Lolium perenne*)最低的 AMF 侵染率和丛枝丰度均出现在春季,出现这些结果的原因可能与相关研究的宿主植物种类不同有关。

本研究的 RDA 和 Mantel test 结果表明,影响灌木铁线莲根围 AMF 群落的主导因子是采样季节。在其它地区,Santos-gonzalez 等^[11]发现季节变化不会影响瑞典草原生态系统的夏枯草(*Prunella vulgaris*)和蝶须(*Antennaria dioica*)根系 AMF 群落组成;而在苏格兰的草原生态系统,Vandenkoornhuyse 等^[33]则发现采样季节显著影响丝状剪股颖(*Agrostis capillaris*)和白三叶(*Trifolium repens*)根围 AMF 群落组成;在半干旱生态系统,刘永俊等^[10]指出柠条根系 3 个季节的 AMF 群落组成和多样性指数均有一定的差异。这些不同的研究结果表明,生态系统及宿主植物均可能会影响采样季节与 AMF 丰富度、多样性和群落组成间的关系。本研究中,土壤含水量与 AMF 丰富度和多样性呈显著负相关,可能原因是随着土壤含水量的下降,植物需要依赖更多的 AMF 来增强自身对于干旱环境的适应性,这是植物应对环境恶化的一种有效生态策略;土壤有机质与 AMF 丰富度和多样性呈显著正相关,并且是影响 AMF 孢子密度的主导因素,这与 Yang 等^[34]的研究结果一致。此外,本研究中,植被盖度和植物多样性与 AMF 丰富度和多样性呈显著负相关,这与前人的研究结果则相反,如异叶青兰(*Dracocephalum heterophyllum*)和多枝黄耆(*As-tragalus polycladus*)根系 AMF 丰富度与植被盖度

呈显著正相关^[35],植物多样性与长叶车前(*Plantago lanceolata*)根系 AMF 多样性呈显著正相关^[36]。所以,在季节变化主导下的多种非生物因素和生物因素的综合作用影响着 AMF 群落。

综上所述,本研究利用 Illumina MiSeq 测序技术首次探讨了内蒙古大青山干旱阳坡灌木铁线莲根围 AMF 群落的季节动态,结果发现夏季和秋季 AMF 丰富度、多样性和群落组成无显著差异,但 AMF 丰富度和多样性显著低于春季,群落组成与春季也存在显著差异,可能与灌木铁线莲物候有很

大关联;季节是影响 AMF 群落和根系侵染率的主导因子,而影响孢子密度的主导因子是土壤有机质。研究结果为进一步探索灌木铁线莲-AMF 共生体对不同季节环境变化的响应提供了理论依据。但当前的研究仅关注灌木铁线莲生长季节的 AMF 群落季节动态,那么在温度较低的冬季,其根围 AMF 群落组成是怎样的,AMF 对灌木铁线莲在内蒙古大青山地区寒冷冬季的生存发挥怎样的作用,是未来应当关注的问题。

参考文献:

[1] SMITH S E, SMITH F A. Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth[J]. *Mycologia*, 2012, **104**(1): 1-13.

[2] LI T, LIN G, ZHANG X, *et al.* Relative importance of an arbuscular mycorrhizal fungus (*Rhizophagus intraradices*) and root hairs in plant drought tolerance[J]. *Mycorrhiza*, 2014, **24**(8): 595-602.

[3] RUIZ-LOZANO J M, PORCEL R, AROCA R. Evaluation of the possible participation of drought-induced genes in the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2008: 185-205.

[4] LI X L, ZHANG J L, GAI J P, *et al.* Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi of sedges to soil aggregation along an altitudinal alpine grassland gradient on the Tibetan Plateau [J]. *Environmental Microbiology*, 2015, **17**(8): 2 841-2 857.

[5] HELGASON T, MERRYWEATHER J, DENSON 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.

[6] ZHAO R X, GUO W, BI N, *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi affect the growth, nutrient uptake and water status of maize (*Zea mays* L.) grown in two types of coal mine spoils under drought stress[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, **88**: 41-49.

[7] BAINARD L D, BAINARD J D, Hamel C, *et al.* Spatial and temporal structuring of arbuscular mycorrhizal communities is differentially influenced by abiotic factors and host crop in a semi-arid prairie agroecosystem[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, **88**(2): 333-344.

[8] HEWINS C R, CARRINO-KYKER S R, Burke D J. Seasonal variation in mycorrhizal fungi colonizing roots of *Allium tricoccum* (wild leek) in a mature mixed hardwood forest[J]. *Mycorrhiza*, 2015, **25**(6): 469-483.

[9] ZANGORA W, ROSTIROLA L V, de SOUZA P B, *et al.* Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rain-forest biome in southern Brazil[J]. *Mycorrhiza*, 2013, **23**(3): 221-233.

[10] 刘永俊, 郑 红, 何 雷, 等. 柠条根系中丛枝菌根真菌的季节性变化及影响因素[J]. 应用生态学报, 2009, **20**(5): 1 085-1 091.

LIU Y J, ZHENG H, HE L, *et al.* Seasonal variation and related affecting factors of arbuscularmycorrhizal fungi in *Caragana korshinskii* roots[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, **20**(5): 1 085-1 091.

[11] SANTOS-GONZALEZ J C, FINALAY R D, TEHLER A. Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities in roots in a seminatural grassland[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(17): 5 613-5 623.

[12] PRINGLE A, BEVER J D. Divergent phenologies may facilitate the coexistence of arbuscular mycorrhizal fungi in a North Carolina grassland[J]. *American Journal of Botany*, 2002, **89**(9): 1 439-1 446.

[13] SENES-GUERRERO C, TORRES-CORTE G, PFEIFFER S, *et al.* Potato-associated arbuscular mycorrhizal fungal communities in the Peruvian Andes[J]. *Mycorrhiza*, 2014, **24**(6): 405-417.

[14] CUENCA G, LOVERA M. Seasonal variation and distribution at different soil depths of arbuscular mycorrhizal fungi spores in a tropical sclerophyllous shrubland [J]. *Botany*, 2010, **88**(1): 54-64.

[15] 马毓泉. 内蒙古植物志(第 2 卷)[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1989.

[16] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.

[17] LI X L, GEORGE E, MARSCHNER H. Phosphorus depletion and pH decrease at the root-soil and hyphae-soil interfaces of VA mycorrhizal white clover fertilized with ammonium[J]. *New Phytologist*, 1991, **119**(3): 397-404.

[18] MCGONIGLE T, MILLER M, EVANS D, *et al.* A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi [J]. *New Phytologist*, 1990, **115**(3): 495-501.

[19] SATO K, SUYAMA Y, SAITO M, *et al.* A new primer for discrimination of arbuscular mycorrhizal fungi with polymerase chain reaction-denature gradient gel electrophoresis[J]. *Grassland Science*, 2005, **51**: 179-181.

[20] MAGOC T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 2011, **27**(21): 2 957-2 963.

[21] SCHMIEDER R, EDWARDS R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets[J]. *Bioinformatics*, 2011, **27**(6): 863-864.

[22] HAO X L, JIANG R, CHEN T. Clustering 16S rRNA for OTU prediction: a method of unsupervised Bayesian clustering[J]. *Bioinformatics*, 2011, **27**(5): 611-618.

[23] ÖPIK M, VANATOA A, VANATOA E, *et al.* The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) [J]. *New Phytologist*, 2010, **188**(1): 223-241.

[24] GEEL M, CEUSTERMANS A, HEMELRIJCK W, *et al.* Decrease in diversity and changes in community composition of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of apple trees with increasing orchard management intensity across a regional scale [J]. *Molecular Ecology*, 2015, **24**(4): 941-952.

[25] LIN X G, FENG Y Z, ZHANG H Y, *et al.* Long-term balanced fertilization decreases arbuscular mycorrhizal fungal diversity in an arable soil in North China revealed by 454 pyrosequencing[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, **46**(11): 5 764-5 771.

[26] INGLESE P, BARBERA G, LA MANTIA T. Seasonal reproductive and vegetative growth patterns and resource allocation during cactus pear fruit growth [J]. *HortScience*, 1999, **34**(1): 69-72.

[27] PARSONS A, ROBSON M. Seasonal changes in the physiology of S24 perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) 3. Partition of assimilates between root and shoot during the transition from vegetative to reproductive growth[J]. *Annals of Botany*, 1981, **48**(5): 733-744.

[28] 杨高峰, 贺 晓, 易 津. 华北驼绒藜种子发育期各器官间碳水化合物的再分配[J]. 草业学报, 2013, **22**(4): 327-333.

YANG G F, HE X, YI J. Allocation of carbohydrate during seed development of *Ceratoides arborescens* [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2013, **22**(4): 327-333.

[29] WARDLAW I F. Tansley Review No. 27 The control of carbon partitioning in plants[J]. *New phytologist*, 1990, **116**(3): 341-381.

[30] PREGITZER K, KING J. Effects of soil temperature on nutrient uptake[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2005, 277-310.

[31] BARRETT G, CAMPBEL C, FITTER A, *et al.* The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus hoi* can capture and transfer nitrogen from organic patches to its associated host plant at low temperature[J]. *Applied Soil Ecology*, 2011, **48**(1): 102-105.

[32] HAZARD C, BOOTS B, KEITH AM, *et al.* Temporal variation outweighs effects of biosolids applications in shaping arbuscular mycorrhizal fungi communities on plants grown in pasture and arable soils[J]. *Applied Soil Ecology*, 2014, **82**: 52-60.

[33] VANDENKOOHUYSE P, HUSBAND R, DANIELL T, *et al.* Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem [J]. *Molecular Ecology*, 2002, **11**(8): 1 555-1 564.

[34] YANG H S, YUAN Y G, ZHANG Q, *et al.* Changes in soil organic carbon, total nitrogen, and abundance of arbuscular mycorrhizal fungi along a large-scale aridity gradient[J]. *Catena*, 2011, **87**(1): 70-77.

[35] LIU Y J, HE J X, SHI G X, *et al.* Diverse communities of arbuscular mycorrhizal fungi inhabit sites with very high altitude in Tibet Plateau [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, **78**(2): 355-365.

[36] JOHNSON D, VANDENKOORNHUYSE P J, LEAKE J R, *et al.* Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms [J]. *New Phytologist*, 2004, **161**(2): 503-515.

(编辑:裴阿卫)