

# 不同喀斯特小生境中土壤丛枝菌根真菌的遗传多样性

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** 为探明西南喀斯特地区小生境土壤中丛枝菌根真菌(AMF)的遗传多样性特征, 利用巢式PCR和变性梯度凝胶电泳相结合的分子生物学方法, 对茂兰3种植被类型下的小生境(石缝、石沟、土面) AMF遗传多样性进行了研究。结果发现: 各类小生境都含有丰富的AMF遗传多样性, 灌木林土面的多样性指数和物种丰富度最高, 为4.06和68; 次生林石缝的最低, 为3.16和29, 所研究的9个小生境多样性指数和物种丰富度的平均值分别高达3.67和48, 高于同类研究在其他地区的结果, 这可能主要与喀斯特生态系统复杂的结构和较高的植物多样性有关; 聚类分析显示各类小生境间的AMF群落结构差异显著, 相似性指数最高仅为0.45, 说明小生境所带来的空间异质性对AMF的遗传多样性产生了显著影响; 基因测序显示球囊霉属(*Glomus*)极有可能是喀斯特地区AMF的优势菌属, 在以后筛选喀斯特地区的高效生态恢复菌种时可重点考虑球囊霉属的一些菌种。

**关键词** 丛枝菌根真菌, 遗传多样性, 喀斯特, 小生境, 丰富度

## Genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in karst microhabitats of Guizhou Province, China

WEI Yuan<sup>1,2\*</sup>, WANG Shi-Jie<sup>1\*\*</sup>, LIU Xiu-Ming<sup>1</sup>, and HUANG Tian-Zhi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Puding Karst Ecosystem Research Station, State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China; and <sup>2</sup>Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

### Abstract

**Aims** Our objective was to explore the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in karst microhabitat.

**Methods** We used nested polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis to study the genetic characteristics of AMF sampled from microhabitats of three different vegetation types in Maolan National Nature Reserve of Guizhou Province.

**Important findings** The AMF genetic diversities in all three microhabitat types were rich. The highest values of biodiversity index (4.06) and species abundance (68) were found in the shrubland soil surface, and the lowest values (3.16 and 29, respectively) were found in the secondary forest rocky crevice. The average values of biodiversity index and species abundance of the 9 microhabitats studied were 3.67 and 48, respectively. These were much higher than those in some other areas; the possible reasons were the complex karst ecological system structure and high plant species diversity. The AMF genetic diversity of different microhabitat types showed significant differences. The highest similarity index was only 0.45, and this means the spatial heterogeneity of different microhabitat types had significant influence on AMF genetic diversity. *Glomus* was the dominant genus through the karst area and should be a candidate for screening high ecological restoration strains for karst areas.

**Key words** arbuscular mycorrhizal fungi, genetic diversity, karst, microhabitat, richness

我国西南喀斯特地区碳酸盐岩充分发育, 地表破碎度高, 特殊的地质背景奠定了喀斯特生态系统明显的脆弱性和生境多样性。喀斯特地表、地下双

重水文地质结构使地表干旱缺水, 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

收稿日期Received: 2011-05-10 接受日期Accepted: 2011-06-28

\* E-mail: rbq-wy@163.com

\*\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: wangshijie@vip.skleg.cn)

明显的不稳定性(李阳兵等, 2006), 稍有人为干扰便会导致以石漠化为典型代表的生态退化问题, 石漠化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。喀斯特地表基岩出露面积较大, 且起伏多变, 微地貌十分复杂, 具有与常态地貌上明显不同的形态特征和分布特征, 形成了以石面、石缝、石沟、土面等为主的多种小生境, 这些小生境类型及其组合构成了喀斯特生境的多样性(周游游等, 2003)。已有的研究表明, 喀斯特小生境土壤存在明显的空间异质性, 这些异质性不仅改变土壤养分和水分的空间分布, 同时造成植物分布格局与生长过程的变化(刘方等, 2008)。在喀斯特生态恢复研究中, 小生境的地位和作用已引起越来越多学者的关注。

丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)是一类能与绝大部分植物的根系形成互惠共生体的微生物, 是目前发现的与植物生长关系最为密切的微生物之一(Smith & Read, 1997)。研究表明, 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)。以AMF主导的菌根共生系统已作为一种新型生物修复主体被广泛地应用到退化或受损生态系统的恢复和重建当中(王立等, 2010)。值得提出的是, AMF这些生态学作用与喀斯特生态系统的限制因子之间有着良好的耦合关系, 在石漠化治理中表现出很强的潜在利用价值。AMF具有明显的地域性, 喀斯特独特的地理单元特征必定会形成自己特有的AMF多样性。要想科学合理地利用AMF为石漠化治理服务, 就要充分地了解喀斯特地区AMF的多样性和分布特征。目前, 针对喀斯特地区AMF多样性的研究还很薄弱, 小生境微地貌尺度上AMF多样性的特征还未见报道。本文以贵州茂兰国家自然保护区3种植被类型下的主要小生境为研究对象, 利用巢式PCR和变性梯度凝胶电泳(DGGE)相结合的分子生物学方法研究了不同小生境下的AMF遗传多样性, 意在为今后科学合理地利用AMF为喀斯特生态系统的保护和石漠化治理服务奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 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°52'10"–108°05'40" E, 25°09'20"–25°20'50" 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 °C, 年平均降水量1 752 mm, 年平均蒸发量1 343.6 mm, 年平均相对湿度83%, 年日照时数1 272.8 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(周政贤, 1987)。

### 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3个不同植被类型的喀斯特样地: 原生乔木林、次生乔灌混合林、灌木林。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。按照王世杰等(2007)的方法进行小生境类型的调查和划分, 共划分出土面(局部连续的土体表面)、石沟(出露的岩石溶蚀沟或侵蚀沟)、石缝(出露的岩石裂隙或溶蚀裂隙)、石面(出露基岩的岩石表面)四类小生境, 其中石面无土壤因此不作为采样对象。采样时用消毒铲剥去表层杂物, 挖取0–15 cm土壤, 对每一个小生境进行多点取样, 根据面积大小确定每个小生境的取样量, 最后把同类小生境的土壤组成混合样。样品过2 mm筛以保证充分混合均匀, 于–20 °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

本文采用Power Soil™ DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, USA)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 Nested PCR扩增目的片段

以提取的土壤总DNA为模板, 运用Nested PCR技术进行扩增。扩增条件参考龙良鲲等(2005)的方法, 稍加修改。所用引物均由上海生工生物工程技术服务公司合成(表1)。

第一次PCR: 所用引物为AMF 18S rDNA通用引物GeoA2和Geo11, 反应体系25 μL, 其中模板1 μL, Master mix (Promega, M712B) 12.5 μL, 引物各1 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。反应程序为94 °C预变性4 min,

表1 Nested-PCR引物

Table 1 Primers of Nested-PCR

引物 Primer	序列 Sequence	长度 Length	来源 Sources
GeoA2	5'-CCAGTAGTCATATGCTTGTCTC-3'	1.80 kb	Schwarzott & Schüßler, 2001
Geo11	5'-ACCTTGTTACGACTTTTACTTCC-3'		
AM1	5'-GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA-3'	0.55 kb	Helgason <i>et al.</i> , 1998
NS31-GC	5'-TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3'		Simon <i>et al.</i> , 1992
Glo1	5'-GCCTGCTTAAACACTCTA-3'	0.23 kb	Comejo <i>et al.</i> , 2004

NS31-GC的5'端接5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGACAGGGGG-3'序列。

The sequence of 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGACAGGGGG-3' was added at the 5' end of NS31-GC.

94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30个循环。最后72 °C延伸7 min, 4 °C保育。

第二次PCR: 第一次PCR产物1:100稀释后(如电泳不见条带则不稀释)作为模板, 所用引物为NS31-GC和AM1, 反应体系同上。反应程序为94 °C 2 min预变性, 94 °C 45 s, 65 °C 1 min, 72 °C 45 s, 30个循环, 最后72 °C延伸7 min, 4 °C保育。第三次PCR: 第二次PCR产物1:100稀释后作为模板, 所用引物为NS31-GC和Glo1, 反应体系同上。反应程序为94 °C 2 min预变性, 94 °C 45 s, 55 °C 1 min, 72 °C 45 s, 30个循环, 最后72 °C延伸7 min, 4 °C保育。

取每次扩增产物4 μL, 用1.0%的琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像系统(Gel Doc Documentation System, Bio-Rad Company, Philadelphia, USA)中检测结果。

### 1.3.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析遗传多样性

取第三次PCR产物20 μL, 用基因突变检测系统(Bio-Rad Company, Philadelphia, USA)进行DGGE分析。聚丙烯酰胺凝胶浓度为8% (100%的变性剂为7 mol尿素和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染色, 然后用凝胶成像系统分析。

### 1.3.4 DGGE条带测序和序列分析

从DGGE图谱每一个泳道中选取1条丰度较高的条带(图1方框标注)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3 000 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, 3 000 r · min<sup>-1</sup>离心1 min, 50 °C水浴30 min, 最后12 000 r · min<sup>-1</sup>离心1 min, 取10 μL作为模板进

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GenBank数据库进行BLAST在线比对。所测序列已全部提交GenBank数据库, 登录号: JN153040-JN1-53048。

## 1.4 数据处理与统计

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、丰度( $S$ )和均匀度指数( $E_H$ )等指标(Luo *et al.*, 2004)。

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

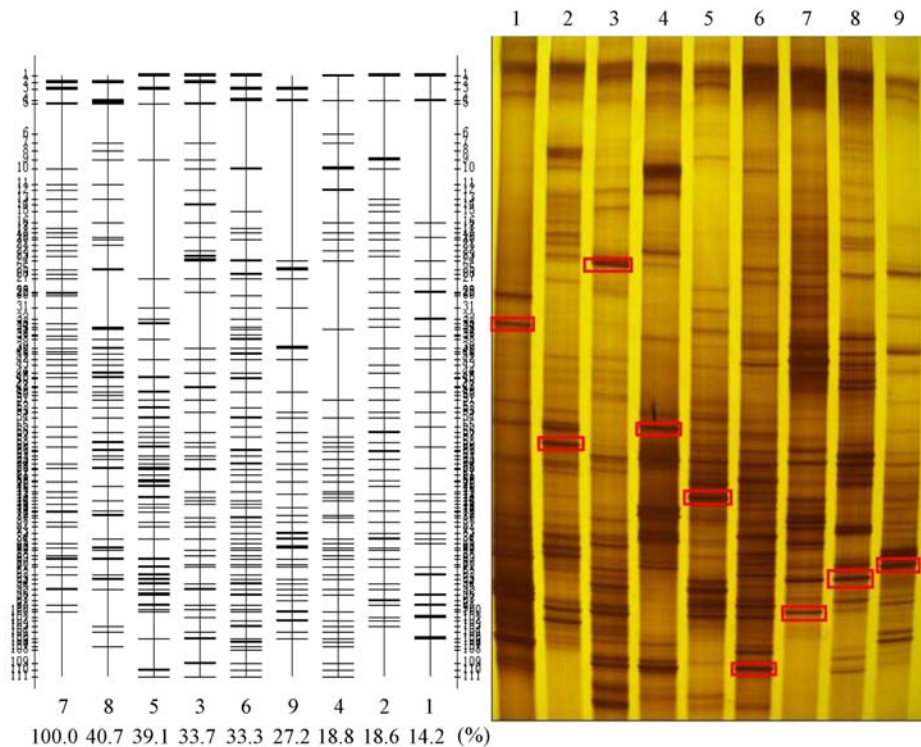
$$E_H = H/H_{\max} = H/\ln S$$

式中:  $H$ 为Shannon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。

## 2 结果和分析

### 2.1 样品DNA的提取与Nested PCR

用琼脂糖凝胶检测DNA提取效果, 条带清晰明亮, 提取效果良好, 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。本研究第一次PCR扩增用的是AMF通用引物, 在第二次PCR中, 以AMF特异性引物AM1将AMF DNA片段锁定为扩增对象, 最后通过第三次PCR获取特异性AM菌的NS31/Glo1区, NS31-GC/Glo1区的片段大小为230 bp, 非常适合做DGGE分析。在靶模板很少的情况下, 通过Nested PCR的放大作用可很好地扩



**图1** 不同样品丛枝菌根真菌的DGGE图谱以及泳道比较图。百分数(%)是其余泳道与第7泳道结构的相似百分比。1, 次生林石缝; 2, 次生林石沟; 3, 次生林土面; 4, 灌木林石缝; 5, 灌木林石沟; 6, 灌木林土面; 7, 原生林石缝; 8, 原生林石沟; 9, 原生林土面。

**Fig. 1** DGGE profile of amplified AMF fragments from different samples and lane compare. % is the structure similarity of other lanes with 7 lane. 1, secondary forest rocky crevice; 2, secondary forest rocky gully; 3, secondary forest soil surface; 4, shrubby rocky crevice; 5, shrubby rocky gully; 6, shrubby soil surface; 7, original forest rocky crevice; 8, original forest rocky gully; 9, original forest soil surface.

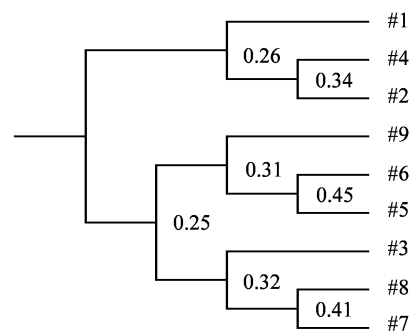
增出目标产物。

## 2.2 DGGE图谱分析

变性梯度凝胶电泳(DGGE)是在非培养条件下研究微生物群落组成与动态变化的有力工具,也是目前在AMF群落研究中用的一种方法(杨如意等, 2005)。由图1分析, DGGE可以很好地分离样品中的AMF。每一个泳道中都含有数量较多的条带,说明所研究的每一个小生境中都含有丰富的AMF种类。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,但更多的是特有条带,每个样品的带谱表现出明显的差异,说明各个小生境的AMF的多样性差异显著。

## 2.3 AMF群落聚类分析

图2是根据UPGMA算法绘出的样品间AMF群落相似性图谱。由图2分析,各小生境间的AMF群落结构相似性指数非常低,灌木林石沟和灌木林土面表现出最高的相似性,但也仅为0.45;其次为原生



**图2** 非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means)分析。1, 次生林石缝; 2, 次生林石沟; 3, 次生林土面; 4, 灌木林石缝; 5, 灌木林石沟; 6, 灌木林土面; 7, 原生林石缝; 8, 原生林石沟; 9, 原生林土面。

**Fig. 2** DGGE cluster analysis (unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA) of 18S rDNA AMF communities in soil samples. 1, secondary forest rocky crevice; 2, secondary forest rocky gully; 3, secondary forest Soil surface; 4, shrubby rocky crevice; 5, shrubby rocky gully; 6, shrubby soil surface; 7, original forest rocky crevice; 8, original forest rocky gully; 9, original forest soil surface.

林石缝和原生林石沟, 相似性指数为0.41; 次生林石沟和灌木林石缝也表现出相对较高的相似性, 指数大小为0.34。相似性指数分析进一步表明, 不同小生境间的AMF多样性差异显著。

#### 2.4 AMF多样性指数和丰富度分析

由表2分析, 各小生境的AMF多样性指数都很高, 最高的小生境是灌木林土面(4.06), 最低的是次生林石缝(3.16), 所有小生境的AMF多样性指数平均值为3.67。同一植被类型下的小生境多样性指数表现出不太相同的变化趋势, 原生林表现为石缝>石沟>土面, 次生林表现为土面>石沟>石缝, 灌木林也表现为土面>石沟>石缝。物种丰富度最高的小生境是灌木林土面(68), 最低的是次生林石缝(29), 所有小生境的物种丰富度平均值为48。同一植被类型下的小生境物种丰富度也表现出不太相同的变化趋势, 原生林表现为石缝>石沟>土面, 次生林表现为土面>石沟>石缝, 灌木林表现为土面>石缝>石沟。各小生境间的物种均匀度没有表现出太大的差别, 基本保持在0.95。

#### 2.5 基因测序结果分析

从每个泳道中挑取一条清晰粗亮的条带进行基因测序, 测序结果如表3所示。除原生林石缝和原生林石沟的最高相似性稍低以外, 其余小生境的最高相似性都在95%左右。所测得9个小生境的条带同源性最高的序列均是未培养的AMF菌种, 但都属于球囊霉属(*Glomus*)。

### 3 讨论

与传统的形态学方法相比, 分子生物学能够更加快速、灵敏地反应AMF的遗传多样性, 但是也存

在成本高、取样量少等缺陷, 如何经济有效地反应样品中目标种群多样性是值得讨论的问题。Renker等(2006)比较了3种不同的方法对AMF多样性的影响, 第一种是对重复样品分别进行DNA提取和PCR, 然后将PCR产物分别进行克隆, 第二种是对重复样品分别进行DNA提取和PCR, 然后将PCR产物进行等量混合后再进行后续的克隆, 第三种是从一开始就将DNA进行混合, 然后再进行PCR与克隆, 结果发现第二种方法不仅得到了与第一种方法同样水平的AMF多样性, 更重要的是可以节约大量的时间和成本, 而第三种方法得到的AMF多样性最少。本研究样地同类小生境的数量非常多, 一般都有数十甚至上百个, 综合考虑后采取了对同类小生境样品混合后进行PCR的方法, 根据Renker等(2006)的研究, 此方法有可能降低了样品中AMF的多样性水平, 所以在以后的研究中应考虑采用对重复样品分别进行DNA提取和PCR, 然后将PCR产物进行等量混合后再进行后续实验的方法, 这样既可以尽量减少DNA提取时取样量相对野外样品采集量较少所带来的弊端, 又可以节约后续实验的时间和成本, 至少可以根据自己的样品实际情况进行尝试和比较。

AMF种质资源丰富, 生态适应性极强, 在不同的生态系统, 尤其是像沙漠、矿山、工业污染区、盐碱土这样的逆境中都有分布, 而且形成了各自不同的群落多样性, 扮演着不可替代的重要角色。本研究利用巢式PCR和DGGE相结合的分子生物学方法发现, 喀斯特地区同样存在着丰富的AMF遗传多样性, 总体而言, 各类小生境中都含有丰富的AMF遗传多样性, Shannon多样性指数和物种丰富度的

表2 不同样品的丛枝菌根真菌多样性指数、丰富度及均匀度

Table 2 AMF Shannon index, richness and evenness of each sample

样品 Sample	Shannon多样性指数 Shannon's diversity index	丰富度 Richness	均匀度 Evenness
原生林石缝 Original forest rocky crevice	3.89	57	0.96
原生林石沟 Original forest rocky gully	3.74	48	0.97
原生林土面 Original forest soil surface	3.33	36	0.93
次生林石缝 Secondary forest rocky crevice	3.16	29	0.94
次生林石沟 Secondary forest rocky gully	3.65	48	0.94
次生林土面 Secondary forest soil surface	3.71	50	0.95
灌木林石缝 Shrubbery rocky crevice	3.68	50	0.94
灌木林石沟 Shrubbery rocky gully	3.77	48	0.97
灌木林土面 Shrubbery soil surface	4.06	68	0.96

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(GenBank登录号) Band source (GenBank accession number)	最近相似种属 Closest genera	相似性 Similarity
原生林石缝 Original forest rocky crevice (JN153048)	用DGGE方法分离的属于未培养的球囊霉属的18S RNA菌种 Uncultured <i>Glomus</i> isolate DGGE gel band 22-1 18S ribosomal RNA gene (HQ874638)	88%
原生林石沟 Original forest rocky gully (JN153041)	用DGGE方法分离的属于未培养的球囊霉属的18S RNA菌种 Uncultured <i>Glomus</i> isolate DGGE gel band 11-2 18S ribosomal RNA gene (HQ874635)	86%
原生林土面 Original forest soil surface (JN153042)	用克隆方法分离的属于未培养的球囊霉属的18S RNA菌种 Uncultured <i>Glomus</i> clone OEF89 18S ribosomal RNA gene (EU340303)	99%
次生林石缝 Secondary forest rocky crevice (JN153043)	用DGGE方法分离的属于未培养的球囊霉属的18S RNA菌种 Uncultured <i>Glomus</i> isolate DGGE gel band 22-2 18S ribosomal RNA gene (HQ874639)	95%
次生林石沟 Secondary forest rocky gully (JN153044)	用克隆方法分离的属于未培养的球囊霉属的18S RNA菌种 Uncultured <i>Glomus</i> clone Ap7 18S ribosomal RNA gene (EU350053)	95%
次生林土面 Secondary forest soil surface (JN153040)	用克隆方法分离的属于未培养的球囊霉属的18S RNA菌种 Uncultured <i>Glomus</i> clone FEA6HBX02GK5NA 18S ribosomal RNA gene (GU198582)	93%
灌木林石缝 Shrubbery rocky crevice (JN153045)	未培养的球囊霉属的18S RNA菌种 Uncultured <i>Glomus</i> gene for 18S ribosomal RNA (AB556933)	97%
灌木林石沟 Shrubbery rocky gully (JN153046)	未培养的球囊霉属的18S RNA菌种, Uncultured <i>Glomus</i> partial 18S rRNA gene (AJ563889)	96%
灌木林土面 Shrubbery soil surface (JN153047)	用DGGE方法分离的属于未培养的球囊霉属的18S RNA菌种 Uncultured <i>Glomus</i> isolate DGGE gel band 22-2 18S ribosomal RNA gene (HQ874639)	91%

平均值分别高达3.67和48, 远高于同类研究在东南沿海、西双版纳、都江堰等地区的结果(张美庆等, 1998; 张英等, 2003; 房辉等, 2006)。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较高(屠玉麟, 1989; 朱守谦, 2003), 一般而言, 这种丰富的植物多样性有利于提高AMF的多样性(Kernaghan, 2005)。而这种小生境本身所带来的微环境的多样性也可能是造成喀斯特地区整体AMF多样性较高的另一原因, 因为地形的多样性是生物多样性的基础。同时, 研究地位于茂兰自然保护区, 受人为干扰影响小, 也有利于AMF多样性的保护和提高。

根据群落聚类结果分析, 小生境间的AMF结构相似性指数很低, 最高仅为0.45, 多样性指数和丰富度也表现出显著差异, 说明小生境所带来的空间异质对AMF的遗传多样性产生了显著影响。造成不同小生境间AMF多样性差异显著的主要原因可

能是: 1)不同小生境在光照条件、热量条件, 水分的接受、贮存、蒸发等方面有较大的差异, 它们对植物分布、生长、发育的制约程度也不同, 使不同的植物种类分别占领与其特性相应的小生境。石缝透光、较干燥, 生长较多喜光早生性植物, 石沟荫蔽、湿润, 生长较多喜阴湿生性植物, 土面面积开放度高, 环境相对中和, 多生长些中性植物。Sykorová等(2007)在根系18S rDNA和ITS序列研究中证实AMF群落组成强烈受到寄主植物种类的影响。所以, 这种植物种类组成上的不同应该是导致不同小生境间AMF结构多样性差异巨大的主要原因。2)受小生境地表微形态和微地貌空间变异的影响, 小生境的成土条件和成土过程出现差异, 形成的土壤在空间上的分布也出现明显的变化。刘方等(2008)对喀斯特小生境土壤的异质性进行了研究, 发现土壤性质的差异主要表现在黏粒、微团聚体、有效养分数量上的变化, 而土壤质地、有机质和营养元素都显著地影响AMF的多样性(张美庆等, 1999)。例如彭思

利等(2010)的研究表明在2–5 mm大团聚体的形成过程中AMF菌丝起到了决定性作用, 而本研究样地中不同小生境间的团聚体组成差异又恰好体现在这一粒级的团聚体上, 说明这种差异可能与小生境间不同的AMF多样性有密切联系。如果能够证实它们之间的这种关系, 那么AMF在提高喀斯特土壤生态系统稳定性和抗侵蚀方面将具有重要的潜在利用价值。再如磷、有机质对AMF的发生和产孢都具有很大影响, 不同小生境间的这些生态因子差异显著, 所以导致了小生境间的AMF多样性指数和物种丰富度差异显著, 但需要注意的是, 不同植被类型下的小生境并没有表现出完全一致的变化趋势, 原生林石缝最高, 次生林和灌木林土面最高, 说明喀斯特地区小生境AMF多样性受多种环境因子的综合影响, 而且这种综合作用的机理具有高度的复杂性和随机性。通过对不同植被类型下的同类小生境间的AMF的多样性指数和丰富度进行比较, 发现石缝和土面随着植被类型的变化发生了显著变化, 而石沟的变化很小, 这可能是因为植被类型的变化对不同小生境的微环境影响程度不同, 同时也说明石沟环境对AMF来说更具有稳定性, 在运用AMF进行喀斯特生态恢复时可以重点考虑对石沟环境的利用。

一般而言, DGGE图谱中清晰粗亮的条带所代表的种在样品中的含量丰富, 是样品中的优势种。从图1分析, 9个小生境中都含有一些清晰粗亮的优势条带, 而且这些条带多是特异性条带, 说明各个小生境中的优势种差异很大。在9个小生境中各选取了1条灰度值高的特异性条带进行基因测序, 将结果与GenBank数据库BLAST在线比对, 同源性最高的序列各不相同, 且都是一些未培养和命名的AMF菌种, 基因测序进一步说明AMF在与小生境的相互选择中形成了各自不同的优势种。值得注意的是, 所测的9条带都属于球囊霉属, 从整体而言, 球囊霉属极有可能是喀斯特地区AMF的优势菌属。球囊霉属生态适应性很强, 是很多逆境生态系统的优势属, 球囊霉属AMF在喀斯特生态系统中可能占据着更重要的生态位, 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。

喀斯特地区小生境含有丰富的AMF多样性, 而且形成了各自不同的多样性结构特征, 这是与喀斯

特生态环境长期协同进化和相互选择的结果, 意味着AMF在提高喀斯特地区植物的抗岩溶干旱、耐土壤贫瘠能力和对石生、富钙环境的适应力等方面可能有重要贡献。需要提出的是, 本文只是利用分子生物学的方法对不同小生境土壤AMF多样性进行了调查, 以后应结合形态学的方法对不同小生境的AMF的孢子种类、数量以及跟植物的侵染共生关系开展更全面深入的研究, 这对保护开发喀斯特地区的AMF种质资源以及从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。

**致谢** 中国科学院战略性先导科技专项重大课题“典型石漠化地区植被恢复和增汇技术的试验示范”(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面上项目(40672112)资助。

## 参考文献

- Comejo P, Azcón-Aguilar C, Barea JM, Ferrel N (2004). Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 241, 265–270.
- Fang H (房辉), Damodaran PN, Cao M (曹敏) (2006). Arbuscular mycorrhizal status of *Glomus* plants in tropical secondary forest of Xishuangbanna, southwest China. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 26, 4179–4185. (in Chinese with English abstract)
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (1998). Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, 394, 431.
- Kernaghan G (2005). Mycorrhizal diversity: cause and effect? *Pedobiologia*, 49, 511–520.
- Li Y (李岩), Jiao H (焦惠), Xu LJ (徐丽娟), Zhao HH (赵洪海), Liu RJ (刘润进) (2010). Advances in the study of community structure and function of arbuscular mycorrhizal fungi. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 30, 1089–1096. (in Chinese with English abstract)
- Li YB (李阳兵), Wang SJ (王世杰), Wei CF (魏朝富), Long J (龙健) (2006). An analysis on the frangibility of karst ecosystem. *Tropical Geography* (热带地理), 26, 303–307. (in Chinese with English abstract)
- Liu F (刘方), Wang SJ (王世杰), Luo HB (罗海波), Liu YS (刘元生), Liu HY (刘鸿雁) (2008). Micro-habitats in karst forest ecosystem and variability of soils. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), 45, 1055–1062. (in Chinese with English abstract)

- Long LK (龙良鲲), Yang SZ (羊宋贞), Yao Q (姚青), Zhu HH (朱红惠) (2005). DNA extraction from arbuscular mycorrhizal fungi and analysis by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Mycosystema* (菌物学报), 24, 564–569. (in Chinese with English abstract)
- Luo HF, Qi HY, Zhang HX (2004). Assessment of the bacterial diversity in fenvalerate-treated soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20, 509–515.
- Peng SL (彭思利), Shen H (申鸿), Guo T (郭涛) (2010). Influence of mycorrhizal inoculation on water stable aggregates traits. *Plant Nutrition and Fertilizer Science* (植物营养与肥料学报), 16, 695–700. (in Chinese with English abstract)
- Renker C, Weißhuhn K, Kellner H, Buscot F (2006). Rationalizing molecular analysis of field-collected roots for assessing diversity of arbuscular mycorrhizal fungi: to pool, or not to pool, that is the question. *Mycorrhiza*, 16, 525–531.
- Schwarzott D, Schüßler A (2001). A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification and cloning from single AM fungal spores. *Mycorrhiza*, 10, 203–207.
- Simon L, Lalonde M, Bruns TD (1992). Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 291–295.
- Smith SE, Read DJ (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London. 1–20.
- Sykorová Z, Wiemken A, Redecker D (2007). Cooccurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two Swiss subalpine meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5426–5434.
- Tu YL (屠玉麟) (1989). Preliminary study on karst forests in Guizhou. *Carsologica Sinica* (中国岩溶), 8, 282–290. (in Chinese with English abstract)
- Wang L (王立), Jia WQ (贾文奇), Ma F (马放), Li SY (李世阳), Zhang SJ (张淑娟) (2010). Perspective of mycorrhizal technology application for environmental remediation. *Ecology and Environment* (生态环境学报), 19, 487–493. (in Chinese with English abstract)
- Wang SJ (王世杰), Lu HM (卢红梅), Zhou YC (周运超), Xie LP (谢丽萍), Xiao DA (肖德安) (2007). Spatial variability of soil organic carbon and representative soil sampling method in maolan karst virgin forest. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), 44, 475–483. (in Chinese with English abstract)
- Yang RY (杨如意), Chen X (陈欣), Tang JJ (唐建军), Chen J (陈静), Jiang QQ (蒋琦清), Hu SJ (2005). Methods employed in species diversity determination of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) colonized in terrestrial ecosystem. *Bulletin of Science and Technology* (科技通报), 21, 668–673. (in Chinese with English abstract)
- Zhang MQ (张美庆), Wang YS (王幼珊), Xing LJ (邢礼军) (1998). The ecological distribution of AM fungi community in south and east coast of China. *Mycosystema* (菌物系统), 17, 274–277. (in Chinese with English abstract)
- Zhang MQ (张美庆), Wang YS (王幼珊), Xing LJ (邢礼军) (1999). The relationship between the distribution of AM fungi and environmental factors. *Mycosystema* (菌物系统), 18, 25–29. (in Chinese with English abstract)
- Zhang Y (张英), Guo LD (郭良栋), Liu RJ (刘润进) (2003). Diversity and ecology of arbuscular mycorrhizal fungi in Dujiangyan. *Acta Phytocologica Sinica* (植物生态学报), 27, 537–544. (in Chinese with English abstract)
- Zhou YY (周游游), Li SS (黎树式), Huang TF (黄天放) (2003). Features of karst forest ecosystem in China and its conservation in utilization—a case study on Maolan, Mulin, Nonggang typical karst forests in Southwest China. *Journal of Guangxi Teachers College (Natural Science Edition)* (广西师范学院学报(自然科学版)), 20(3), 67–72. (in Chinese with English abstract)
- Zhou ZX (周政贤) (1987). *Scientific Investigation Report of Maolan Karst Forest* (茂兰喀斯特森林科学考察集). Guizhou People's Press, Guiyang. 1–23. (in Chinese)
- Zhu SQ (朱守谦) (2003). *Ecological Research on Karst Forest (III)* (喀斯特森林生态研究(III)). Guizhou Science and Technology Press, Guiyang. 52–62. (in Chinese)

责任编辑: 郭柯 责任编辑: 李敏