

# AM 真菌多样性和生物学功能研究进展

马 媛, 吕 杰, 刘 晓 颖

(新疆大学 资源与环境科学学院, 绿洲生态教育部省部共建重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830046)

**摘 要:**丛枝菌根真菌是土壤共生真菌中分布最广泛的一类真菌, 可以与绝大多数的地上植物进行共生。丛枝菌根真菌可以帮助植物进行营养吸收和水分提升, 促进植物的生长, 具有重要的生态学意义。该文综述了 AM 真菌的鉴定方法和 AM 真菌群落结构与功能, 并对其研究领域加以阐述与展望。

**关键词:**丛枝菌根真菌; 研究方法; 生物学功能; 分子生态学

**中图分类号:**Q 939.96 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)14-0203-04

丛枝菌根真菌 (*Arbuscular mycorrhizal Fungi*, AMF) 属于球囊菌门 (*Glomeromycota*)、球囊菌纲, 目前已分离鉴定了 200 余种, 它是土壤共生真菌中分布最广泛的一类真菌, 可以与绝大多数的地上植物进行共生<sup>[1]</sup>。1885 年, 德国植物生理学家 Frank 首创“菌根”这一术语。菌根是土壤中 AM 真菌菌丝与高等植物根系形成的一种联合体, 几乎存在于所有的陆地生态系统中, 是

自然界中一种普遍存在的微生物-植物共生现象<sup>[2]</sup>。共生真菌从植物体获取碳源物质及其它营养, 而植物也从真菌中获得无机离子及水分等物质。通过菌根及根外菌丝, 可以帮助植物进行无机离子吸收和水分提升, 从而提高植物抵御不良环境的能力, 促进植物的生长。植物在长期的生存过程中, 与菌根真菌共同进化, AM 真菌在非共生状态下孢子不能萌发, 而 AM 真菌依赖型植物缺乏菌根也无法生存。AM 真菌能在植物根细胞内产生“泡囊”和“丛枝”2 种典型结构, 故名为泡囊-丛枝菌根 (*vesicular-arbuscular mycorrhiza*, VAM)<sup>[3]</sup>, 但由于部分真菌只形成丛植结构, 所以简称丛枝菌根。

自然条件下, AM 真菌以其独特的群落结构特征和功能, 直接或间接发挥着各种生理、生化和生态作用。目前人工分离培养的 AM 真菌已在植物健康、园艺培养

**第一作者简介:**马媛(1977-), 女, 新疆人, 副教授, 现主要从事干旱区生态学及分子生态学和极端环境微生物等研究工作。E-mail: xjmayuan@sina.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31060086); 绿洲生态教育部(省部共建)重点实验室开放课题资助项目(XJDX0206-2011-03)。

**收稿日期:**2014-03-25

[34] Bazabakana R, Baucher M, Diallo B, et al. Effect of jasmonic acid on development morphology during *in vitro* tuberization of *Dioscorea alata* (L.) [J]. *Plant Growth Regulation*, 2003, 40: 229-237.

[35] 郭小丁, 刘亚菊, 张允刚, 等. 水山药试管苗诱导微型块茎的培养基 [P]. 中国: CN200410014628. 3, 2005. 10. 12.

[36] 陈凤清, 付杨, 孙冬雪, 等. 穿龙薯蓣的微型块茎离体诱导及再生植

株的建立[J]. 东北师大学报(自然科学版), 2005, 37(4): 90-93.

[37] 任春林, 尹静, 潘亚婕, 等. 水杨酸对白桦悬浮细胞中齐墩果酸积累及防御酶活性的影响[J]. 中草药, 2012, 43(5): 972-977.

[38] 彭艳华, 刘成运. 脱落酸与胚胎发育的关系及作用方式的研究进展 [J]. 武汉植物学研究, 1991, 9(3): 289.

## The Effect of Plant Growth Substances on the Induction of Microtubers of *Dioscorea opposita* Thunb.

LI Shu-jie<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-li<sup>1,2</sup>, LI Jun-hua<sup>1,2</sup>, GUO Xiao-bo<sup>1</sup>, WANG Yun-ying<sup>1</sup>, LI Ming-jun<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxing, Henan 453007; 2. Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs, University of Henan Province, Xinxiang, Henan 453007)

**Abstract:** Microtuber is a modified organ which is formed form *in vitro* single nodal segments in *Dioscorea opposita*. The concentration and composition of plant growth regulators have a great influence on the induction of microtubers. The role of several plant growth regulators, e. g. NAA, 2, 4-D, GA<sub>3</sub>, KT, 6-BA, B<sub>9</sub>, PP<sub>333</sub>, coumarin, SA and JA in the induction of microtuberin *D. opposita* were reviewed in this article.

**Key words:** plant growth substance; *Disocorea opposita* Thunb; microtuber; induction

及农业生产等方面发挥着重要的作用<sup>[4]</sup>。但由于 AM 真菌作为土壤习居菌必须与植物共生才能进行无性繁殖的独特生存方式,导致了其生物学及生态学功能还不能被完全揭示。基于此,该文综述了 AM 真菌的鉴定方法和 AM 真菌群落结构与功能研究领域,旨在为进一步利用分子生物学方法鉴定 AM 真菌,并在此基础上研究其群落结构所具有的生态学功能提供依据。

## 1 AM 真菌的鉴定方法

### 1.1 孢子鉴定法

AM 真菌孢子由于必须与植物共生才能进行萌发、侵染和产孢,因此离体后很难获得纯培养菌株,所以很多研究多是根据孢子形态、菌丝侵染和产孢方式等特征对 AM 真菌进行分类鉴定<sup>[5-6]</sup>。AM 真菌孢子鉴定常用湿筛倾析-蔗糖离心法分离孢子,记录孢子数和孢子分类特征<sup>[7]</sup>。在解剖镜下用吸管吸取 AM 真菌单孢子置于载玻片上,加浮载剂压片观察,并使用 Melzer's 试剂观察孢子壁及内含物特异性反应。最后根据单孢子压片结果对照国际 AM 真菌保藏中心(INVAM)的最新分类描述及图片(<http://invam.caf.wvu.edu>)并参阅有关鉴定材料和近年来发表的新种描述等进行种属鉴定。

杨静等<sup>[5]</sup>通过该法研究内蒙古荒漠 3 个不同样地沙柳 AM 真菌物种多样性,根据单孢子分离压片的结果共获得 4 属 37 种 AM 真菌,其中球囊霉属(*Glomus*) 23 种,无梗囊霉属(*Acaulospora*) 10 种,这 2 个属是 3 个样地共同优势 AM 真菌属,最后根据多样性指数计算获得不同样地的 AM 真菌群落结构特点。

### 1.2 分子鉴定法

传统的孢子分离鉴定法在研究中虽然取得了很多研究成果,但仍存在一定的缺陷,其原因可能是由于同一种 AM 真菌的孢子形态会因环境条件(地理差异、宿主植物)的不同,而有较大的差别。所以根据孢子压片及 AM 真菌保藏中心图片分类结果会与实际结果有所出入,如同一个 AM 真菌会产生不同形态的单孢子;同时相同形态的孢子可能为不同的 AM 真菌,造成菌种鉴定工作困难及分类混乱<sup>[8]</sup>。随着分子生物学技术的发展,多种分子技术已被应用到 AM 真菌物种的鉴定工作中,国外已有研究报道<sup>[9-11]</sup>,国内开展得则很少。

1.2.1 核酸杂交技术 Trouvelot 等<sup>[12]</sup>利用荧光原位杂交技术(FISH)进行 AM 真菌的鉴定,将由巢式 PCR 获得 25S rDNA 探针进行地高辛标记,与 4 种 AM 真菌孢子分裂间期 rDNA 进行杂交,探针与不同 AM 真菌核糖体杂交位点不同,发现其核糖体基因彼此间存在差异。核酸分子杂交技术可以定性定量的分析 AM 真菌群落的特征、分布及其种群变化。

1.2.2 基因指纹图谱方法 目前 AM 真菌基因指纹图谱检测方法常用 DNA 长度多态性技术(Amplified Ribo-

somal DNA Restriction Analysis, ARDRA; Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP),检测位点主要集中在 28S rDNA、18S rDNA 和 ITS(internal transcribed spacer)区域。Vallino 等<sup>[13]</sup>利用 AM 真菌特异性引物扩增意大利北部污染土壤环境中植物根部基因组 DNA,扩增 18S rDNA 序列并进行 RFLP 分析,经过比对后确定球囊霉属为污染土壤中 AM 真菌的主要属。Schechter 等<sup>[14]</sup>利用 AM 真菌特异性引物扩增植物根部基因组 18S rDNA 序列,经过 RFLP 分析及测序构建系统发育树,结果表明极端环境中 AM 真菌种群与植物抗逆性之间存在着明显的相关性。Geue 等<sup>[15]</sup>利用 AM 真菌特异性引物,通过巢式 PCR 扩增 28S rDNA 5'端区域,经过测序比对研究 2 种草地类型和 3 种不同植物根部所含 AM 真菌多样性及分布情况。Pivato 等<sup>[16]</sup>通过对 28S rDNA 5'端序列分析并结合实时定量技术研究 4 种不同苜蓿对 AM 真菌遗传多样性的影响,研究发现苜蓿根系中球囊菌纲 AM 真菌丰度明显高于土壤,并且 AM 真菌有些种类菌株出现频率因苜蓿种类的不同表现出显著的差异。Renker 等<sup>[17]</sup>以 1 对 AM 特异性引物扩增 AM 真菌 ITS 区域,扩增产物进行 RFLP 分析,用以研究 5 种不同生境球囊霉目种群结构差异。以上试验实例都证明了 28S rDNA、18S rDNA 和 ITS 的序列信息均可以将 AM 真菌信息与背景信息得以区分,但是单独利用这些序列信息区分 AM 真菌存在缺陷。如采用 ITS 序列信息,由于序列过短所含信息有限,采用特异性引物扩增时有时很难将 AM 真菌 ITS 序列信息与背景真菌序列信息加以区分,增加了后期测序及比对的工作量,而且一些相近的 AM 真菌也难以区分,构建的系统发育树所含信息要少于实际。此外单独采用 28S rDNA 信息设计 AM 真菌特异性引物,进行 PCR 扩增后,一些特别的 AM 真菌种类不能被扩增出来<sup>[18]</sup>,除此外  $\beta$ -tubulin 基因<sup>[19]</sup>和 RNA 聚合酶 II<sup>[20]</sup>也被作为目标基因进行 AM 真菌的分类研究,但这些序列信息只能分辨较少种类的 AM 真菌。虽然 28S rDNA、18S rDNA 和 ITS 都可以用于 AM 真菌的研究,也取得了很多的研究成果,但使用单一的信息却无法分离一些亲缘关系近的 AM 真菌。因此近年来常使用这些信息的组合对 AM 真菌进行研究,该序列包含核糖体小亚基基因(the small subunit, SSU)250 bp,完整的 ITS 区域(475~520 bp)和核糖体小亚基基因(large subunit, LSU)800 bp 的序列信息<sup>[21]</sup>。Krüger 等<sup>[21]</sup>根据数据库中已发表的 AM 真菌核糖体基因(大于 1 000 条 AM 真菌核糖体序列信息)设计 2 组巢式 PCR 引物,经过验证有较好的试验结果。

## 2 AM 真菌群落生态学功能

### 2.1 AM 真菌对植物群落生产力的影响

AM 真菌侵染宿主植物根部后形成泡囊和根内菌

丝外,还将菌丝延伸到土壤当中,根外菌丝可将不同的植物联系在一起形成地下菌丝网络。地下养分资源通过 AM 真菌菌丝网络在不同植物中获得转移及重新分配,从而使宿主的生产力增加,并提高宿主的抗逆性<sup>[22]</sup>。AM 真菌具有提高宿主品质的能力,但目前 AM 菌剂的生产和应用在其纯培养未能突破。通常研究者利用各种人工培养的接种 AM 真菌的植物根或含有大量孢子的土壤去接种作物,可以获得较好的增产和提高品质的效果。在严酷的荒漠生境中,植物也常通过与 AM 真菌共生来提高其对逆境的耐受性。AM 真菌侵染植物后,在植物根围形成庞大的菌丝网络系统,菌丝网络扩大了植物根系吸收面积和能力,帮助宿主吸收磷、钾、硫、钙、锌、铁、铜等营养元素及水分提升。菌丝分泌的有机酸、多糖等物质可以固化沙丘,并提供给根围微生物营养物质及生存必须的水分,加速了植物凋落物分解的速度,改善了植物根下土壤的理化性质,对于恶劣生境植物生长和生态系统重建具有重要的意义<sup>[23]</sup>。

## 2.2 AM 真菌对植物群落组成和多样性的影响

地球陆地上 80% 以上的植物都能与 AM 真菌形成菌根,AM 真菌与宿主植物在长期的生存过程中,与宿主植物共同进化。因此,植物群落与 AM 真菌群落结构相互影响,宿主植物的多样性在一定程度上决定了 AM 真菌的多样性,而相反 AM 真菌群落结构也影响了植物群落结构的形成<sup>[24]</sup>。植物与 AM 真菌的共生关系虽然广泛存在,但是不同植物种间、甚至同种植物不同生态型对 AM 真菌的依赖程度存在很大差异<sup>[25]</sup>。不同的植物对菌根的依赖性不同,这种植物对菌根依赖性的差异意味着 AM 真菌将会影响植物群落构成及群落结构。Hartnett 等<sup>[26]</sup>研究了 AM 真菌对北美大草原植物群落组成和变化的影响。试验采用苯菌灵抑制土壤当中 AM 真菌活性,以观察草原植物群落结果变化情况。施用抑菌剂后,植物群落发生了明显的改变,群落中占主导地位的暖性草丰度下降,而菌根非依赖性植物丰度相应增加。乔红权<sup>[27]</sup>调查发现新疆北部地区 AM 真菌多样性较低,而且土壤中 AM 真菌孢子含量较少,这与新疆地区植物多样性较低有关。以上研究结果均表明,AM 真菌对自然生态系统中 AM 真菌依赖植物群落物种组成和结构具有重要的决定作用,还可以显著改变植物群落的物种多样性。Urcelay 等<sup>[28]</sup>研究指出,AM 真菌对植物群落结构组成的作用结果既取决于优势种的菌根依赖性,同时也取决于处于从属地位植物的菌根依赖性。

## 2.3 AM 真菌对生态系统养分资源的分配调节

磷元素是植物生长必需的大量元素之一,土壤中磷的形态主要包括无机磷和有机磷两大类,其中无机磷又分为水溶态、吸附态和矿物态;有机磷包括植素类、核酸类和磷脂类。磷在土壤中移动性较差,大量的磷以难溶

的无机盐化合物固定在土壤颗粒中,植物很难利用,而土壤中的有机磷也必须经过矿化水解之后才能被植物吸收利用。因而磷成为陆地生态系统生产力的重要限制因素。此外,土壤中的磷除了具有丰富的形态多样性之外,还存在空间异质性,可以显著影响地上植物群落组成和物种多样性。

AM 真菌与植物根系共生之后,可以提高植物群落对磷资源的吸收利用。AM 真菌可以显著提高宿主植物对磷的利用效率,除此之外,AM 真菌的存在也可以显著降低土壤中磷的流失,当有 AM 真菌存在时土壤中速效磷的淋洗显著低于没有 AM 真菌存在的土壤<sup>[29]</sup>。可见 AM 真菌不但可以显著提高植物对磷的吸收利用,提高生态系统磷的利用效率,还可以降低磷在土壤中的流失。

AM 真菌除可以提高宿主植物对磷元素的利用效率外,还可以通过根外菌丝形成的网络改变磷养分在物种间的分配和影响植物群落组成。Van 等<sup>[29]</sup>研究表明 AM 真菌可以通过菌丝网络改变磷在不同宿主植物间的分配率,以这种方式影响了不同物种在群落内的竞争能力,并且还发现不同 AM 真菌对磷在 2 个物种间的分配存在显著的差异。还有研究表明,AM 真菌可以将植物群落内豆科植物根瘤固定的氮通过 AM 真菌菌丝转移分配给禾本科植物,提高禾本科植物和豆科植物协同互助作用<sup>[30]</sup>。但是以上研究结果均来自人工盆栽模拟试验,试验物种丰富度远远低于自然状态下的物种丰富度,所以模拟试验并不能完全真实的反映自然状态下 AM 真菌对植物群落养分资源分配和植物群落组成变化间的关系。

## 3 结语

AM 真菌群落结构与功能研究是菌根学领域热点问题之一,但目前由于 AM 真菌纯培养菌株分离困难,多采用孢子分离鉴定的方法对其进行相关研究,因此无法真实反应出其群落结构特点。近年来研究人员统一了 AM 真菌分子鉴定的区域,发展并完善了特异性与通用性引物的设计,为今后以非培养的方式研究 AM 真菌提供了基础。非培养技术比可培养技术可以更加全面的揭示环境中微生物的信息,但目前在缺少纯培养菌株的状态下,研究 AM 真菌生物学功能及群落功能还存在困难。因此,研究人员应该清楚的认识今后的研究应该是多方法相互结合,一方面在利用分子生态学方法获取 AM 群落结构信息同时,另一方面要结合可培养的方法揭示 AM 真菌的生物学功能。

## 参考文献

- [1] Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution[J]. Mycological Research, 2001, 105:1413-1421.



- [2] Smith S E, Read D J. Mycorrhizal symbiosis [M]. Amsterdam, the Netherlands and Boston, MA, USA: Academic Press, 2008.
- [3] Remy W, Taylor T N, Hass H, et al. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizaep [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 11841-11843.
- [4] 李岩, 焦惠, 徐丽娟, 等. AM 真菌群落结构与功能研究进展 [J]. 生态学报, 2010, 30(4): 1089-1096.
- [5] 杨静, 贺学礼, 赵丽莉. 内蒙古荒漠沙柳 AM 真菌物种多样性 [J]. 生物多样性, 2011, 19(3): 377-385.
- [6] 贺学礼, 陈燕, 郭辉娟, 等. 荒漠柠条锦鸡儿 AM 真菌多样性 [J]. 生态学报, 2012, 32(10): 3041-3049.
- [7] Ianson D C, Allen M F. The effects of soil texture on extraction of vesicular arbuscular mycorrhizal spores from arid soils [J]. Mycologia, 1986, 78: 164-168.
- [8] 刘润进, 李晓林. 丛枝菌根及其应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 1-198.
- [9] Oba H, Tawarayama K, Saito M, et al. Semi-quantitative analysis of arbuscular mycorrhizal colonization of onion roots inoculated with single or mixed species based upon PCR-RFLP [J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2002, 48(1): 51-56.
- [10] Redecker D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi with inoculated roots [J]. Mycorrhiza, 2000, 10: 73-80.
- [11] Yokoyama K, Tateishi T, Marumoto T, et al. A molecular marker diagnostic of a specific isolate of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* [J]. FEMS microbiology letters, 2002, 212: 171-175.
- [12] Trouvelot S, Van Tuinen D, Hijri M, et al. Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization [J]. Mycorrhiza, 1999(8): 203-206.
- [13] Vallino M, Massa N, Lumini E, et al. Assessment of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in roots of *Solidago gigantea* growing in a polluted soil in Northern Italy [J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(6): 971-983.
- [14] Schechter S P, Bruns T D. Serpentine and non-serpentine ecotypes of *Collinsia sparsiflora* associate with distinct arbuscular mycorrhizal fungal assemblages [J]. Molecular Ecology, 2008, 17(13): 3198-3210.
- [15] Geue H, Hock B. Determination of *Acaulospora longula* and *Glomus subgroup* in plant roots from grassland using new primers against the large subunit ribosomal DNA [J]. Mycological Research, 2004, 108(Pt1): 76-83.
- [16] Pivato B, Mazurier S, Lemanceau P, et al. Medicago species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots [J]. New Phytologist, 2007, 176(1): 197-210.
- [17] Renker C, Heinrichs J, Kaldorf M, et al. Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field [J]. Mycorrhiza, 2003, 13(4): 191-198.
- [18] Krüger M, Stockinger H, Krüger C, et al. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi [J]. New Phytologist, 2009, 183: 212-223.
- [19] Msiska Z, Morton J. Phylogenetic analysis of the Glomeromycota by partial  $\beta$ -tubulin gene sequences [J]. Mycorrhiza, 2009, 19: 247-254.
- [20] James T Y, Kauff F, Schoch C, et al. Reconstructing the early evolution of the Fungi using a six-gene phylogeny [J]. Nature, 2006, 443: 818-822.
- [21] Krüger M, Krüger C, Walker C, et al. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level [J]. New Phytologist, 2012, 193: 970-984.
- [22] Hart M M, Reader R J, Klironomos J N. Plant coexistence mediated by arbuscular mycorrhizal fungi [J]. Trends in Ecology and Evolution, 2003, 18: 418-423.
- [23] Sally E S, Evelina F, Suzanne P, et al. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas [J]. Plant and Soil, 2009(3): 3-20.
- [24] Liu R J, Wang F Y. Selection of appropriate host plants used in trap culture of arbuscular mycorrhizal fungi [J]. Mycorrhiza, 2003, 13(3): 123-127.
- [25] Klironomos J N. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi [J]. Ecology, 2003, 84: 2292-2301.
- [26] Hartnett D C, Wilson G W T. Mycorrhizae influence plant community structure and diversity in tallgrass prairie [J]. Ecology, 1999, 80: 1187-1195.
- [27] 乔红权. 新疆北部地区丛枝菌根真菌多样性研究 [J]. 山西农业大学学报, 2007, 26(3): 279-283.
- [28] Urcelay C, Diaz S. The mycorrhizal dependence of subordinates determines the effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plant diversity [J]. Ecology Letters, 2003, 6(5): 388-391.
- [29] Van der Heijden, Marcel G A. Mycorrhizal fungi reduce nutrient loss from model grassland ecosystems [J]. Ecology, 2010, 91: 1163-1171.
- [30] Li Y F, Ran W, Zhang R, et al. Facilitated legume nodulation, phosphate uptake and nitrogen transfer by arbuscular inoculation in an upland rice and mung bean intercropping system [J]. Plant and Soil, 2009, 315: 285-296.

## Progress of Diversity and Biological Function of Arbuscular Mycorrhizal Fungi

MA Yuan, LV Jie, LIU Xiao-ying

(Xinjiang Key Laboratory of Oasis Ecology, Ministry of Education, College of Resource and Environment Sciences, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046)

**Abstract:** Arbuscular mycorrhizal fungi is a kind of widely distributed symbiosis fungi in soil, which can be associated with most land plants. AM fungi has the important ecological significance, can promote plant growth by nutrients absorption and water uptake. Molecular methods for AM fungal community structure investigating were introduced. Research trends and future prospects in this field were also discussed in this review.

**Key words:** Arbuscular mycorrhizal fungi; research methods; biological function; molecular ecology