

高磷土壤中丛枝菌根真菌的分离鉴定

周小勤¹, 黄心钊¹, 何俊良¹, 谢鸿运¹, 李将永², 陈辉¹, 唐明^{*1}, 谢贤安^{*1}

1 华南农业大学林学与风景园林学院 岭南现代农业科学与技术广东省实验室, 广东 广州 510642

2 暨南大学环境与气候研究院, 广东 广州 511443

周小勤, 黄心钊, 何俊良, 谢鸿运, 李将永, 陈辉, 唐明, 谢贤安. 高磷土壤中丛枝菌根真菌的分离鉴定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4659-4673

Zhou Xiaojin, Huang Xinru, He Junliang, Xie Hongyun, Li Jiangyong, Chen Hui, Tang Ming, Xie Xian'an. Isolation and identification of arbuscular mycorrhizal fungi from high phosphate soils[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4659-4673

摘要:【背景】丛枝菌根(arbuscular mycorrhiza, AM)真菌具有广泛的寄主范围、环境适应性和优良的植物促生能力。然而, 土壤的高磷水平严重抑制了 AM 真菌生长及 AM 形成。【目的】分离鉴定出耐较高有效磷含量的华南土著 AM 真菌菌株, 为菌根学研究工作提供新颖材料。【方法】采用经典形态学和分子系统学方法鉴定高磷土壤中 AM 真菌。【结果】从有效磷含量为 53–131 (平均值±标准差为 88.2±17.6) mg/kg 的根区土壤中鉴定出 7 属 25 种 AM 真菌, 包括无梗囊霉属(*Acaulospora*) 12 种、球囊霉属(*Glomus*) 7 种、隔球囊霉属(*Septoglomus*) 2 种、近明球囊霉属(*Claroideoglomus*) 1 种、根孢囊霉属(*Rhizophagus*) 1 种、硬囊霉属(*Sclerocystis*) 1 种和类球囊霉属(*Paraglomus*) 1 种, 其中幼套近明球囊霉(*Claroideoglomus etunicatum*)和蜜色无梗囊霉(*Acaulospora mellea*)是优势种。在(87.7±8.0) mg/kg 的高磷水平下, AM 真菌仍能形成丛枝和泡囊。但当有效磷含量达到(99.7±1.2) mg/kg 时, 菌根感染率和丛枝丰度显著下降, 但仍能够形成泡囊。【结论】从广州市南沙区有效磷含量为(88.2±17.6) mg/kg 的耕地植物根区土壤中, 鉴定出具有耐高磷潜力的 7 属 25 种 AM 真菌, 幼套近明球囊霉和蜜色无梗囊霉等分离株可作为后续高磷抑制机制解析及耐高磷 AM 真菌菌剂研发工作的试验菌株。

关键词: 丛枝菌根真菌; 耐高磷; 高磷抑制; 分离鉴定

基金项目: 广州市科技计划重大项目(201904020022); 国家自然科学基金(32170116, 32071639, 31800092); 岭南现代农业实验室科研项目(NZ2021025); 广东省基础与应用基础研究基金(2022A1515012013); 华南农业大学高层次人才计划(4400-221144)

Supported by: Key Project of Guangzhou of Science and Technology Plan (201904020022); National Natural Science Foundation of China (32170116, 32071639, 31800092); Laboratory of Lingnan Modern Agriculture Project (NZ2021025); Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2022A1515012013); High-Level Talent Start Funding Project of South China Agricultural University (4400-221144)

*Corresponding authors: E-mail: TANG Ming: tangming@scau.edu.cn; XIE Xian'an: xiexianan8834203@126.com

Received: 2022-04-01; Accepted: 2022-06-01; Published online: 2022-07-15

Isolation and identification of arbuscular mycorrhizal fungi from high phosphate soils

ZHOU Xiaoqin¹, HUANG Xinru¹, HE Junliang¹, XIE Hongyun¹, LI Jiangyong², CHEN Hui¹, TANG Ming^{*1}, XIE Xian'an^{*1}

¹ Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture Science and Technology, College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

² Institute for Environmental and Climate Research, Jinan University, Guangzhou 511443, Guangdong, China

Abstract: [Background] Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi have a wide range of host species, environmental adaptation and remarkable plant growth-promoting capability. However, high phosphate level in soils has seriously inhibited the growth of AM fungi and the AM formation. [Objective] This study aimed to isolate and identify indigenous AM fungal strains resistant to high phosphate in south China, and to provide novel materials for mycorrhiza research. [Methods] The AM fungi from high phosphate soils were identified by classical morphology and molecular systematics. [Results] Twenty-five AM fungi species belonging to 7 genera were identified from root-zone soils with the available phosphorus concentration of 53–131 (88.2±17.6 as average±SD) mg/kg, including 12 species in *Acaulospora*, 7 in *Glomus*, 2 in *Septoglomus*, 1 in *Claroideoglomus*, 1 in *Rhizophagus*, 1 in *Sclerocystis* and 1 in *Paraglomus*, among which *Claroideoglomus etunicatum* and *Acaulospora mellea* were dominant. At the high phosphate level of (87.7±8.0) mg/kg, AM fungi still formed arbuscules and vesicles. However, when the phosphate level reached (99.7±1.2) mg/kg, total colonization frequency and arbuscular abundance were significantly decreased in mycorrhizal roots, but vesicles were still be formed. [Conclusion] In this study, 25 AM fungi belonging to 7 genera that might be resistant to high phosphate concentration were identified from root-zone soils containing (88.2±17.6) mg/kg phosphate in cultivated land in Nansha district of Guangzhou city. The isolated strains such as *C. etunicatum* and *A. mellea* could be used as experimental strains in further studies on the high phosphate inhibition and the production of high-quality AM fungal inocula resistant to high phosphate.

Keywords: arbuscular mycorrhizal fungi; high phosphate tolerance; high phosphate inhibition; isolation and identification

丛枝菌根(arbuscular mycorrhiza, AM)真菌能与 70%以上的陆生植物形成丛枝菌根共生体^[1-2], 具有广泛的寄主范围、环境适应性和优良的植物促生功能, 能够显著促进寄主植物对磷、氮、硫、铜和锌等多种营养元素及水分的吸收, 提高植物对病虫害、干旱、盐碱和重金属等各种生物与非生物胁迫的抗性, 在农林业可持续生产、化肥减量化、荒漠植被恢复、矿区生物修复和生态重建等方面发挥重要的积

极作用^[3-7]。

磷肥的施用、土壤理化因子和植物的营养状态均能影响 AM 共生体的形成, 土壤有效磷水平显著影响寄主植物对 AM 真菌的依赖性^[8-11]。通常情况下, 当土壤速效磷含量达到(40–50) mg/kg 以上时, AM 真菌的菌丝生长、附着胞形成、侵染定殖、丛枝发育、孢囊形成和产孢等过程会受到显著抑制——该现象被称为高磷抑制^[10-16]。我国部分耕地因长期施用大量磷肥, 导致土壤有

效磷含量过高, 不但造成环境污染和生态破坏, 还阻碍菌根共生体的形成与稳定, 不利于 AM 真菌菌剂的推广应用。寄主植物响应高磷从而抑制丛枝菌根形成的机制已逐步被揭示^[8,10,12,17-26], 然而, AM 真菌如何响应高磷并调控自身生长发育和丛枝菌根形成的机制仍不完全清楚^[10,27]。另外, 当前研究和生产应用中常用的 AM 真菌主要是耐低磷的菌种, 在高磷土壤中, 其生长和繁殖受到抑制, 接种于磷肥用量较大的耕地、林地后难以稳定保持良好的植物促生效应。因此, 亟需分离筛选耐高磷的 AM 真菌菌种。

本研究进行耐高磷土著 AM 真菌的分离鉴定, 不仅能为 AM 真菌高磷抑制机制研究等方面的基础研究提供新颖的研究材料, 还能为优质菌剂的研发生产和菌根化苗的推广应用等方面提供耐高磷的 AM 真菌菌株, 有利于丰富 AM 真菌功能菌种的种质资源库, 从而为 AM 真菌应用于农林业生产和生态环境保护等方面的基础研究与技术应用奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂和仪器

Green *Taq* Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 胶回收试剂盒, Bio-Tek 公司; T 载体 pClone007, 北京擎科生物科技有限公司。土壤磷速测仪, 济南科宇信息技术有限公司; 光学体视显微镜, 尼康株式会社; PCR 仪和凝胶成像系统, Bio-Rad 公司。

1.2 高磷根区土壤的采集

为了分离具有耐高磷特性的土著 AM 真菌, 在 2021 年 9 月和 10 月, 选定广州市南沙区农业生产潜力较高的区域^[28]作为采样地(以酸性红壤为主的耕地)。在采样地内使用土壤磷速测仪测定植物根区土壤有效磷含量。

通常情况下, 有效磷含量达到(40–50) mg/kg 以上会抑制 AM 真菌的生长和 AM 的形成^[16]。本研究经过调研发现, 由于采样地主要为农户种植甘蔗、香蕉和蔬菜等农作物的耕地, 水肥管理差异较大, 根区土有效磷含量一般为 (10–50) mg/kg, 而高磷位点通常分布在易发生磷淋溶和积累的低洼处(在该处生长的主要为草本植物)。在不同采样点分布的寄主植物的种类和数量均有差异, 本研究选取了共 11 个高磷(有效磷含量>50 mg/kg)的植物根区土壤采样点, 每个采样点的有效磷含量和潜在的寄主植物详见表 1。

去除根区土壤表面约 3 cm 的腐殖土及杂质, 剪去植物地上部分, 采集距地表 3–20 cm 处土层的 500 g (含植物根系)根区土壤^[29], 每个高磷土壤位点采集 3 份根区土壤样品。待土样自然风干后, 称取每份样品 200 g 干土, 采用湿筛倾析-蔗糖离心法筛取 AM 真菌孢子^[4], 在体式显微镜下检测每克土中 AM 孢子的个数, 计算每 100 g 根区土中的孢子密度, 并挑取 AM 真菌孢子进行经典形态学和分子系统学鉴定。

1.3 AM 真菌侵染率检测

将根样置于离心管内, 加入 10% 的 KOH, 于 90 °C 水浴消化 1 h, 采用 2% HCl 浸泡 5 min, 清洗 3 次, 加入 0.05% 的台盼蓝染液, 于 60 °C 水浴 30 min, 洗去浮色后, 将根段整齐排列(4 行×5 列)在载玻片上, 于光学体视显微镜下统计菌根侵染率^[30]。

1.4 AM 真菌的形态学鉴定

于显微镜下对 AM 真菌孢子的颜色、大小、形状、连孢菌丝形态, 以及压破后孢子壁层数、厚度和内含物等特征进行详细观察, 参考亚热带 AM 真菌资源保藏中心资源库(<http://www.amf-cmcc.com/Home/am>)、国际球囊霉资

表 1 高磷根区土壤采样信息

Table 1 Sampling information of the root-zone soils containing moderately high phosphate concentration

采样点 Sampling point	经纬度 Longitude and latitude	潜在的寄主植物* Potential host plants*	有效磷含量 Phosphate content (mg/kg)		孢子密度 Spore density
			平行样 Duplicates	平均值±SD Mean±SD	
			1	22°52'10.31"N 113°25'16.57"E	
2	22°48'10.70"N 113°25'33.37"E	蕹菜、水苏、狗尾草 <i>Ipomoea aquatica</i> Forsk, <i>Stachys japonica</i> Miq. and <i>Setaria viridis</i> (L.) Beauv.	56 87 96	79.7±21.0b	470±71bc
3	22°52'14.10"N 113°25'14.54"E	细辛 <i>Asarum sieboldii</i> Miq.	73 75 94	80.7±11.6b	175±25a
4	22°52'12.42"N 113°25'16.33"E	泥花草、莲子草 <i>Lindernia antipoda</i> and <i>Alternanthera sessilis</i> (L.) DC.	67 82 94	81.0±13.5b	236±30a
5	22°48'22.10"N 113°25'33.16"E	蕹菜、青绿蕹草 <i>Ipomoea aquatica</i> Forsk and <i>Carex breviculmis</i> R. Br.	73 84 89	82.0±8.2b	247±43a
6	22°48'10.50"N 113°25'33.19"E	狗尾草、水苏、马齿苋 <i>Setaria viridis</i> (L.) Beauv., <i>Stachys japonica</i> Miq. and <i>Portulaca oleracea</i> L.	80 87 96	87.7±8.0bc	233±30a
7	22°52'12.42"N 113°25'16.33"E	水苏、狗尾草、马齿苋、稗 <i>Stachys japonica</i> Miq., <i>Setaria viridis</i> (L.) Beauv., <i>Portulaca oleracea</i> L. and <i>Echinochloa crusgalli</i> (L.) Beauv.	80 87 99	88.7±9.6bc	242±22a
8	22°52'22.90"N 113°25'26.09"E	地锦草、鸭跖草、狗尾草 <i>Euphorbia humifusa</i> , <i>Commelina communis</i> L. and <i>Setaria viridis</i> (L.) Beauv.	82 96 109	95.7±13.5bcd	239±13a
9	22°48'11.20"N 113°25'33.16"E	马齿苋、莲子草、鸭跖草、丁香蓼、地锦草 <i>Portulaca oleracea</i> L., <i>Alternanthera sessilis</i> (L.) DC., <i>Commelina communis</i> L., <i>Ludwigia</i> <i>prostrata</i> Roxb. and <i>Euphorbia humifusa</i>	99 99 101	99.7±1.2bcd	217±22a
10	22°52'10.31"N 113°25'16.23"E	细辛、萝藦、莲子草、狗尾草、鸭跖草 <i>Asarum sieboldii</i> Miq., <i>Metaplexis japonica</i> (Thunb.) Makino, <i>Alternanthera sessilis</i> (L.) DC., <i>Setaria viridis</i> (L.) Beauv. and <i>Commelina communis</i> L.	99 109 109	105.7±5.8cd	261±27a
11	22°48'10.45"N 113°25'33.25"E	马齿苋、莲子草、地锦草、水苏、狗尾草 <i>Portulaca oleracea</i> L., <i>Alternanthera sessilis</i> (L.) DC., <i>Euphorbia humifusa</i> , <i>Stachys</i> <i>japonica</i> Miq. and <i>Setaria viridis</i> (L.) Beauv.	99 109 131	113.0±16.4d	486±77c

注：*：由于该土样采自该植物的根区，因此该植物可能是该土样中分离出的 AM 真菌的寄主植物。孢子密度单位为个/100 g 土，以平均值±SD 表示，不同小写字母表示显著性差异($n=3$, $P<0.05$, Duncan's test)

Note: *: The plants may be the host plants of the AM fungi isolated from this soil sample, as the soil sample was collected from the root-zone of these plants. The unit of spore densities are in per 100 g soil, which were showed as the mean±SD, and the different lowercase letters indicate the significant differences ($n=3$, $P<0.05$, Duncan's test).

源库(International Bank for the Glomeromycota: BEG, <http://www.i-beg.eu/>)、AM 真菌分类专业网站(<http://www.amf-phylogeny.com/>)、AM 真菌国际资源库(International Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi: INVAM, <http://invam.wvu.edu/>)、球囊霉体外培养资源库(Glomeromycota *in vitro* Collection: GINCO, <https://www.mycorrhiza.be/ginco-bel/>)和 Coleção internacional de cultura de glomeromycota: CICG (<http://www.furb.br/cicg/index.php?lang=EN>)等数据库, 以及《菌根学》^[4]等已发表的书籍和文献[29,31-32]进行 AM 真菌属(种)鉴定。

1.5 AM 真菌的分子系统学鉴定

在体视显微镜下挑取单孢子置于载玻片上并压碎, 吸取孢子破碎液加到 PCR 管中, 以破碎液中的 DNA 作为模板, 采用 Green *Taq* Mix 和引物(表 2)进行巢式扩增。第一轮 PCR 采用 GeoA2/Geo11 引物对, PCR 反应体系: Green *Taq* Mix 5.0 μ L, GeoA2 (10 μ mol/L)和 Geo11 (10 μ mol/L)各 0.4 μ L, 孢子破碎液 1.0 μ L, 无菌水 3.2 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 40 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 次循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

以稀释 100 倍的第一轮扩增产物作为模板, 采用 AML1/AML2 引物对进行第二轮 PCR, PCR 反应体系: Green *Taq* Mix 5.0 μ L, AML1 (10 μ mol/L)和 AML2 (10 μ mol/L)各 0.4 μ L, 第一轮 PCR 产物(稀释 100 倍) 1.0 μ L, 无菌水 3.2 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C

1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

取第二次 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 切取约 800 bp 的目的条带, 通过胶回收试剂盒进行回收, 采用 T 载体 pClone007 进行 T/A 克隆, 并转化入 *Escherichia coli* DH5 α 感受态中, 涂布于含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基并倒置培养过夜。次日挑取阳性转化子送至广州生工生物科技有限公司测序。将测序序列提交至 NCBI 官网的 BLASTn 页面进行同源搜索, 采用 MEGA X 和邻接法(neighbor-joining method)构建 AM 真菌 18S rRNA 基因序列系统发育树, 采用 ClustalW 进行多序列比对。

2 结果与分析

2.1 采样点有效磷含量和孢子密度

如表 1 所示, 1 号点的根区土有效磷含量最低, 平均值为(57.0 \pm 4.6) mg/kg, 采自 2 种植物即丁香蓼和海金沙根区, 孢子密度为(395 \pm 71) 个/100 g 土。4 号点和 5 号点根区土的有效磷平均含量分别为(81.0 \pm 13.5) mg/kg 和(82.0 \pm 8.2) mg/kg ($P>0.05$), 潜在的寄主植物均有 2 种, 分别为泥花草、莲子草, 以及蕹菜、青绿藎草, 孢子密度分别为(236 \pm 30)个/100 g 土和(247 \pm 43)个/100 g 土($P>0.05$)。11 号点的根区土有效磷含量最高, 平均值为(113.0 \pm 16.4) mg/kg, 寄主植物有 5 种, 即马齿苋、莲子草、狗尾草、地锦草和水苏, 孢子密度为(486 \pm 77)个/100 g 土

表 2 AM 真菌鉴定所需的 PCR 引物

Table 2 The PCR primers required for identification of AM fungi

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)	参考文献 References
GeoA2	CCAGTAGTCATATGCTTGTCTC	1 800	[33]
Geo11	ACCTTGTTACGACTTTTACTTCC		
AML1	ATCAACTTTCGATGGTAGGATAGA	800	[34]
AML2	GAACCCAAACACTTTGGTTTCC		

(最高)。3号点根区土的孢子密度最小,为(175±25)个/100g土,有效磷平均含量为(80.7±11.6)mg/kg,寄主植物仅有细辛一种。由此可见,孢子密度与植物数量和根区土壤有效磷含量有关,寄主植物数量越多、土壤有效磷含量越低,孢子密度越大。

2.2 耐高磷 AM 真菌的分子系统学鉴定

从有效磷含量为(57.0±4.6)mg/kg的1号点土样中挑取出的一种单孢子的测序结果显示,该序列与隐类球囊霉(*Paraglomus occultum*)的

18S rRNA 基因序列相似性高达 99.60%且被聚类为同一分支(图 1),表明该 AM 真菌为 *P. occultum*。核酸序列信息已提交至国家微生物科学数据中心(NMDC, 序列编号为 NMDCN00010KN)和 GenBank (序列登录号为 ON911286)。

从有效磷含量为(87.7±8.0)mg/kg的6号点土样中挑取的2种单孢子,其中一种单孢子的18S rRNA 基因序列与蜜色无梗囊霉(*Acaulospora mellea*)的相似性高达 98.35%并被聚类为同一分支(图 1),表明该 AM 真菌为蜜色无梗囊霉(核

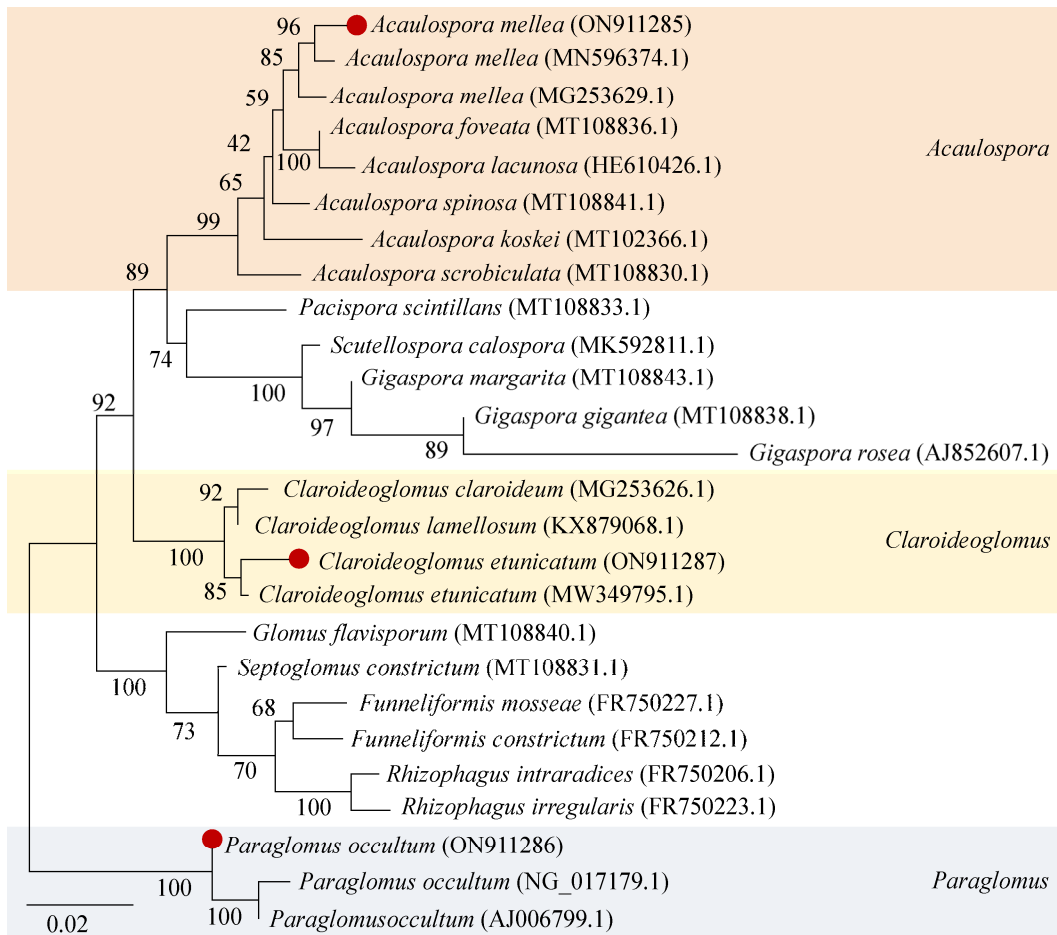


图 1 基于 18S rRNA 基因序列构建的 AM 真菌系统发育树 利用 MEGA X 软件的邻接法构建系统发育树, 树枝名称由真菌名称及其 18S rRNA 基因序列登录号构成; 标尺代表进化距离

Figure 1 Phylogenetic tree of AM fungi based on 18S rRNA gene sequences. The branch names consist of the names of the AM fungi and the accession numbers of the 18S rRNA gene sequences; Scale represents the evolutionary distance.

酸序列 NMDC 编号为 NMDCN0001005, GenBank 登录号为 ON911285); 另一种单孢的 18S rRNA 基因序列与幼套近明球囊霉(*Claroideoglossum etunicatum*)的相似性高达 99.35%且聚类为同一分支(图 1), 表明该 AM 真菌为幼套近明球囊霉(核酸序列 NMDC 编号为 NMDCN0001004, GenBank 登录号为 ON911287)。此外, 从有效磷含量为 (105.7±5.8) mg/kg 的 10 号点和 (79.7±21.0) mg/kg 的 2 号点等地的根区土中也分离出了幼套近明球囊霉。

以上结果表明, 分离自有效磷含量为 (57.0±4.6) mg/kg 根区土的类型球囊霉属(*Paraglossum*) AM 真菌隐类球囊霉、分离自有效磷含量为 (87.7±8.0) mg/kg 根区土的非梗囊霉属(*Acaulospora*)蜜色无梗囊霉, 以及分离自有效磷含量为 (91±16.4) mg/kg 根区土的近明球囊霉属(*Claroideoglossum*)幼套近明球囊霉, 可能具有耐高磷的特性。

2.3 AM 真菌孢子的形态学特征

由于 AM 真菌分子鉴定所用引物和 PCR 反应的偏好性^[34], 并不能通过分子鉴定方法鉴定出所有种类的 AM 真菌。因此, 本研究除了进行分子鉴定, 还进行了形态学鉴定。参考已有资料中 AM 真菌孢子形态特征的描述, 从高磷根区土中鉴定出 7 属 25 种 AM 真菌(图 2, 表 3), 包括球囊霉目(*Glomerales*)球囊霉科(*Glomeraceae*)球囊霉属(*Glomus*) 7 种、隔球囊霉属(*Septoglossum*) 2 种、硬囊霉属(*Sclerocystis*) 1 种、根孢囊霉属(*Rhizophagus*) 1 种, 近明球囊霉科(*Claroideoglossaceae*)近明球囊霉属(*Claroideoglossum*) 1 种; 多样孢囊霉目(*Diversisporales*)无梗囊霉科(*Acaulosporaceae*)无梗囊霉属(*Acaulospora*) 12 种; 类型球囊霉目(*Paraglossomerales*)类型球囊霉科(*Paraglossomeraeae*)类型球囊霉属(*Paraglossum*) 1 种。统计结果显

示, 多种 AM 真菌在不同有效磷水平下均有分布, 幼套近明球囊霉和蜜色无梗囊霉是本研究鉴定出的优势种(表 3)。

2.4 高磷根区土壤中 AM 真菌的侵染水平

菌根侵染状况观察结果显示, AM 真菌 (87.7±8.0) mg/kg 的较高磷水平下仍能较好地形成丛枝、根内菌丝和孢囊等根内结构(图 3A), 总侵染率(F%)、侵染强度(M%)和丛枝丰度(A%)与中磷水平(57.0±4.6) mg/kg 下的结果相当(图 3B), 表明 AM 真菌在该磷水平下仍能完成其从侵染到孢囊的完整的生活史并具备耐高磷的特性。然而, 当有效磷水平达到(99.7±1.2) mg/kg 时, 仍可观察到根内菌丝和孢囊(图 3A), 但丛枝丰度显著下降, 丛枝数量极少(图 3B), 因此, AM 真菌在该磷水平下是否仍能促进植物的磷吸收且发挥促生作用值得深入研究。

3 讨论

截至 2020 年 2 月 17 日, 已有球囊霉亚门(*Glomeromycotina*)球囊菌纲(*Glomeromycetes*)球囊霉目(*Glomerales*)、多样孢囊霉目(*Diversisporales*)、类型球囊霉目(*Paraglossomerales*)和原囊霉目(*Archaeosporales*)中的 12 科 36 属共 334 个 AM 真菌菌种被分离和鉴定(<http://www.amf-phylogeny.com/>)。实际研究和生产应用中常用的仅有根内根孢囊霉、摩西斗管囊霉、异形根孢囊霉、珠状巨孢囊霉和幼套近明球囊霉等少数几种。

本研究通过形态学和分子系统学鉴定方法, 从广州市南沙区有效磷含量为(88.2±17.6) mg/kg 的植物根区土壤中分离鉴定出可能具有耐高磷特性的 AM 真菌(图 2, 表 3), 有利于丰富 AM 真菌功能菌种的种质资源库, 其中幼套近明球囊霉、蜜色无梗囊霉等菌株可作为后续高磷抑制机制解析和优质菌剂研发相关工作的试验材料。



图 2 从高磷根区土中分离鉴定出的 AM 真菌孢子 比例尺为 50 μm

Figure 2 AM fungal spores isolated and identified from the root-zone soils containing moderately high phosphate concentrations. Scale bar: 50 μm .

表 3 AM 真菌在不同磷含量根区土壤采样点中的物种分布

Table 3 Species distribution of AM fungi in the root-zone soil sampling sites containing different phosphate contents

种	1 a	2 b	3 b	4 b	5 b	6 bc	7 bc	8 bcd	9 bcd	10 cd	11 d
Species	57.0±4.6	79.7±21.0	80.7±11.6	81.0±13.5	82.0±8.2	87.7±8.0	88.7±9.6	95.7±13.5	99.7±1.2	105.7±5.8	113.0±16.4
层状球囊霉	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Glomus lamellosum</i>											
凹坑球囊霉	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Glomus multiforum</i>											
网状球囊霉			+						+		+
<i>Glomus reticulatum</i>											
团集球囊霉	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Glomus glomerulatum</i>											
大果球囊霉	+		+	+					+		+
<i>Glomus macrocarpum</i>											
球囊霉属	+	+	++	++	+	++	+	+	+	++	+
<i>Glomus</i> sp. 1											
球囊霉属	+		+						+		
<i>Glomus</i> sp. 2											
缩隔球囊霉	+	+	+	+	+	+	+	+	++		+
<i>Septoglomus constrictum</i>											
沙荒隔球囊霉	+		+	+	+	+	+		+	+	+
<i>Septoglomus deserticola</i>											
悬钩子硬囊霉		+								+	
<i>Sclerocystis rubiformis</i>											
根孢囊霉属	+					+			+		
<i>Rhizophagus</i> sp. 1											
幼套近明球囊霉	++++	+++	++	++	++	++	+++	++	+++	+++	+++
<i>Claroideoglomus etunicatum</i>											
隐类球囊霉	+	+	+	+	+			+	+		
<i>Paraglomus occultum</i>											
凹坑无梗囊霉	++	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+
<i>Acaulospora excavata</i>											

(待续)

(续表 3)

蜜色无梗囊霉	++	+	+	+	+	+	+++	+	++	+	+	++	+	++
<i>Acaulospora mellea</i>														
双网无梗囊霉		+					+							+
<i>Acaulospora bireticulata</i>														
詹氏无梗囊霉	+					+								
<i>Acaulospora gerdemannii</i>														
细齿无梗囊霉	+		+											+
<i>Acaulospora denticulata</i>														
皱襞无梗囊霉	+		+				+							
<i>Acaulospora rugosa</i>														
疣状无梗囊霉	+													
<i>Acaulospora tuberculata</i>														
无梗囊霉属	+		+				+		+					++
<i>Acaulospora</i> sp. 1														+
无梗囊霉属														
<i>Acaulospora</i> sp. 2														++
无梗囊霉属														
<i>Acaulospora</i> sp. 3														++
无梗囊霉属	+													
<i>Acaulospora</i> sp. 4														+
无梗囊霉属														
<i>Acaulospora</i> sp. 5														+

注: +; 每 100 g 土中已鉴定的 AM 真菌孢子数量。+: 小于 5 个; ++: 5-10 个; +++: 11-20 个; ++++: 21 个以上。表头内为每个采样点根区土壤的有效磷含量(mg/kg), 字母表示有效磷含量的显著性差异($n=3$, $P<0.05$, Duncan's test)

Note: +: The number of identified AM fungal spores per 100 g of soil. +: Less than 5; ++: 5-10; +++: 11-20; ++++: More than 21. In the header is the phosphate content in root-zone soil sample (mg/kg). The letter indicates significant differences ($n=3$, $P<0.05$, Duncan's test).

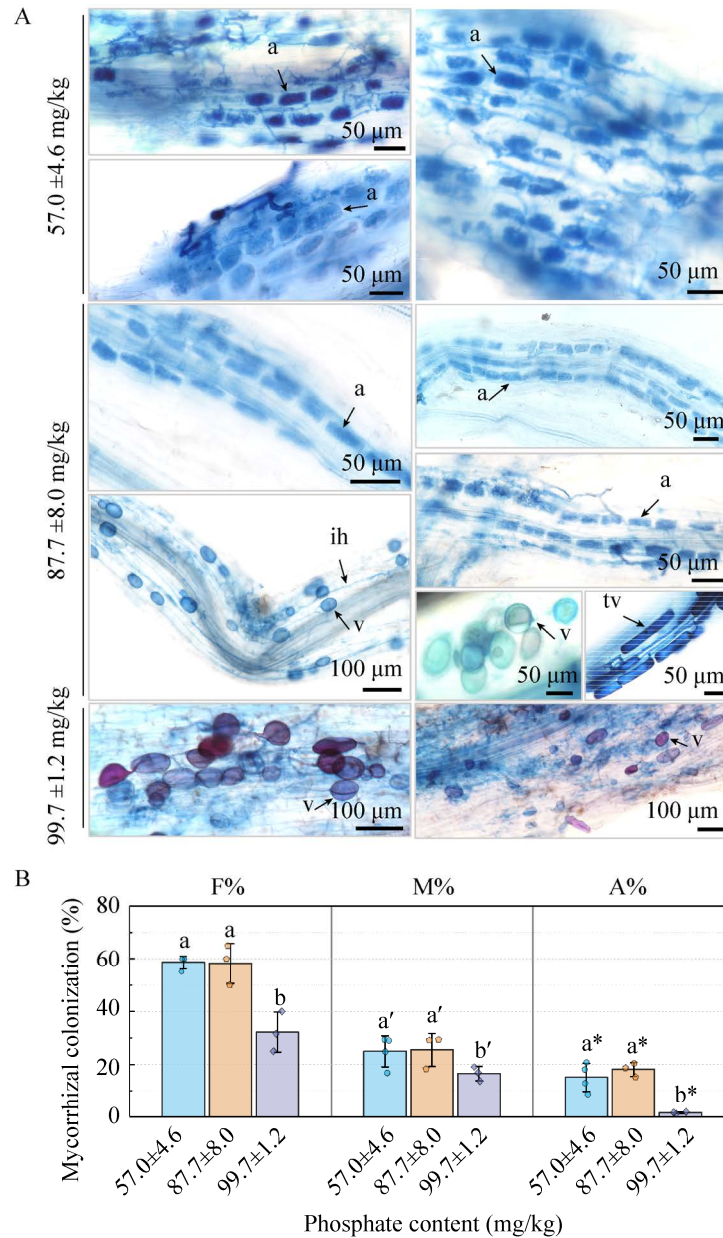


图3 不同磷含量根区土壤中AM真菌的菌根侵染水平 A: AM侵染结构。a: 丛枝; ih: 根内菌丝; v: 泡囊; tv: 管状泡囊。B: 菌根侵染水平。F%: 菌根总侵染率; M%: 侵染强度; A%: 丛枝丰度。柱状图中不同小写字母表示显著性差异($n \geq 3$, $P < 0.05$, Duncan's test)。有效磷含量为(57.0±4.6) mg/kg、(87.7±8.0) mg/kg和(99.7±1.2) mg/kg的根区土壤分别产自第1、6和9号采样点, 对应的宿主植物详见表1

Figure 3 Mycorrhizal colonization level of the AM fungi in root-zone soils containing different phosphate contents. A: Arbuscular mycorrhizal colonization structure. a: Arbuscule; ih: Intraradical hyphae; v: Vesicle; tv: Tubular vesicle. B: Mycorrhizal colonization level. F%: Total frequency of colonization; M%: Mycorrhizal intensity; A%: Arbuscule abundance. Different lowercase letters in the histogram indicate significant differences ($n \geq 3$, $P < 0.05$, Duncan's test). Root-zone soils with phosphate contents of (57.0±4.6) mg/kg, (87.7±8.0) mg/kg and (99.7±1.2) mg/kg were collected from sampling sites No.1, No.6 and No.9, respectively. See Table 1 for the corresponding host plants.

国际上有 4 个较知名的 AM 真菌种质资源保藏机构(BEG、INVAM、CICG 和 GINCO), 而国内专门从事 AM 真菌的种质资源保藏等工作的机构仅有北京市农林科学院植物营养与资源研究所建立的丛枝菌根真菌种质资源库(Bank of *Glomeromycota* in China, BGC)^[29]以及广西农业科学院微生物研究所等建立的亚热带 AM 真菌资源保藏中心资源库(<http://www.amf-cmcc.com/Home/am>)。无论是国际上还是国内的保藏机构, 所保藏的菌种数量有限, 且其开放的官方网站上提供的菌种特征的描述十分有限。

除了上述有限的数据库资源, 目前相关的科技工作者在菌种分离鉴定的工作中还参考了《菌根学》^[4]等书籍和文献[29,31-32]中关于菌株形态特征和性状信息的文字性描述。通过形态学方法辨别菌种的准确性受鉴定人员的知识、经验水平影响较大, 而分子生物学鉴定方法受 PCR 引物偏好性的限制, 暂未能鉴别出所有的 AM 真菌菌种。该现状导致诸多弊端, 甚至出现了在已公开的不同资料中对同一菌种特征描述不一致、图片差异极大及与菌株实际特征不符的现象, 表明至今国内还无统一的鉴定标准。另外, 对于从野外分离鉴定出的特定菌株, 由于获取的孢子数量有限, 且菌株扩繁需时较长, 难以在短期内获得足量的 AM 真菌孢子或菌剂。

以上现状均不利于 AM 真菌的基础研究与生产应用。因此, 亟需加强国内外学术、技术交流, 建立更完善、更丰富的 AM 真菌种质资源信息库, 通过彩图、视频等多媒体方式增强 AM 真菌不同阶段形态特征的可视化和辨识度, 通过数字化媒体加强信息共享, 提高 AM 真菌鉴定的准确性, 同时提高 AM 真菌的扩繁

效率和保藏质量, 以便于实现 AM 真菌生物学研究与农业推广应用等方面的长足进步。

由于可参考的菌种鉴定资料有限, 本研究通过形态学方法鉴定(尤其是未鉴定到种水平)的部分 AM 真菌仍需通过分子鉴定方法进一步确认, 有可能存在新的菌种, 例如具有内凹管道的无梗囊霉属 AM 真菌 *Acaulospora* sp.1 的形态特征未见有权威文献报道。此外, 由于从野外分离的部分耐高磷 AM 真菌的孢子数量有限, 需要进一步改进常规的菌种扩繁和培养方法以获得足量的菌剂用于后续高磷抑制相关机制解析和优质菌剂研发生产工作。

本研究中, AM 真菌在(87.7±8.0) mg/kg 的较高磷水平下仍能形成丛枝(营养交换的主要场所^[35])和泡囊(储存子代孢子形成所需的脂肪酸等能源物质的主要场所^[36]), 所分离的菌株可能具备耐高磷的特性(图 3)。然而, 大部分土著 AM 真菌在(99.7±1.2) mg/kg 的高磷水平下难以与寄主植物之间保持正常的共生关系(图 3), 表明该磷水平可能破坏了大部分土著 AM 真菌与寄主植物之间的磷-碳交易平衡, 但具体机制仍需进一步研究。

寄主植物响应高磷从而抑制丛枝菌根形成的机制已逐步揭示^[8,10,12,17-26], 但 AM 真菌如何响应高磷并调控自身生长发育和丛枝菌根形成的机制仍不清楚, 高磷抑制 AM 真菌生长发育和丛枝菌根形成的作用机制亟待揭示^[10,27]。低氮等营养缺乏条件^[9,37]和重金属等逆境胁迫^[38-40]能够缓解高磷抑制作用, 其缓解机制可能是氮-磷协同互作及磷-重金属(通常是微量元素如锌、铁等)对抗互作^[41-42]。碳-磷-氮互作^[9,21-22,38]可能影响高磷抑制作用, AM 真菌中可能存在参与调控碳、磷、氮营养吸收与稳态的信号转导与代谢通路^[43]。

4 结论

本研究分离鉴定了可能具有耐高磷特性的7属25种AM真菌, 其中部分AM真菌仅鉴定到属。因此, 亟须改进鉴定方法, 并进一步分离鉴定不同生境条件下根区土壤和植物根系中的AM真菌, 建立更为丰富的AM真菌功能菌种种质资源信息库。此外, 部分菌株(例如幼套近明球囊霉和蜜色无梗囊霉)目前正在进行扩繁培养, 将被用作试验菌株用于后续高磷抑制AM真菌生长发育和丛枝菌根形成的相关机制研究, 从而有利于进行AM真菌优质菌剂的研发工作。

优质的耐高磷AM真菌菌剂不但能与其他微生物菌肥协同作用, 还能和化肥一同配合施用, 不仅能促进植物对营养元素的吸收利用, 高效地促进植物生长, 还能够增强苗木对植物病虫害、干旱等胁迫的抗性, 改善植物健康, 既保证了高产、稳产, 还能维护土壤健康和生态生产力, 从而为农林业生产和环境保护等方面的基础研究与技术应用奠定基础。

REFERENCES

- [1] Rich MK, Vigneron N, Libourel C, Keller J, Xue L, Hajheidari M, Radhakrishnan GV, Le Ru A, Diop SI, Potente G, et al. Lipid exchanges drove the evolution of mutualism during plant terrestrialization[J]. *Science*, 2021, 372(6544): 864-868
- [2] Genre A, Lanfranco L, Perotto S, Bonfante P. Unique and common traits in mycorrhizal symbioses[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(11): 649-660
- [3] Begum N, Qin C, Ahanger MA, Raza S, Khan MI, Ashraf M, Ahmed N, Zhang LX. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: implications in abiotic stress tolerance[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1068
- [4] 刘润进, 陈应龙. 菌根学[M]. 北京: 科学出版社, 2007
Liu RJ, Chen YL. *Mycorrhizology*[M]. Beijing: Science Press, 2007 (in Chinese)
- [5] Li T, Hu YJ, Hao ZP, Li H, Wang YS, Chen BD. First cloning and characterization of two functional aquaporin genes from an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*[J]. *The New Phytologist*, 2013, 197(2): 617-630
- [6] Wang WX, Shi JC, Xie QJ, Jiang YN, Yu N, Wang ET. Nutrient exchange and regulation in arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(9): 1147-1158
- [7] 陈保冬, 于萌, 郝志鹏, 谢伟, 张莘. 丛枝菌根真菌应用技术研究进展[J]. *应用生态学报*, 2019, 30(3): 1035-1046
Chen BD, Yu M, Hao ZP, Xie W, Zhang X. Research progress in arbuscular mycorrhizal technology[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2019, 30(3): 1035-1046 (in Chinese)
- [8] Branscheid A, Sieh D, Pant BD, May P, Devers EA, Elkrog A, Schauser L, Scheible WR, Krajinski F. Expression pattern suggests a role of MiR399 in the regulation of the cellular response to local Pi increase during arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 2010, 23(7): 915-926
- [9] Breuillin-Sessoms F, Floss DS, Gomez SK, Pumplun N, Ding Y, Levesque-Tremblay V, Noar RD, Daniels DA, Bravo A, Eaglesham JB, et al. Suppression of arbuscule degeneration in *Medicago truncatula* phosphate transporter 4 mutants is dependent on the ammonium transporter 2 family protein AMT2; 3[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(4): 1352-1366
- [10] Breuillin F, Schramm J, Hajirezaei M, Ahkami A, Favre P, Druege U, Hause B, Bucher M, Kretschmar T, Bossolini E, et al. Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2010, 64(6): 1002-1017
- [11] Essahibi A, Benhiba L, Fouad MO, Babram MA, Ghoulam C, Qaddoury A. Responsiveness of carob (*Ceratonia siliqua* L.) plants to arbuscular mycorrhizal symbiosis under different phosphate fertilization levels[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2019, 38(4): 1243-1254
- [12] Balzergue C, Puech-Pagès V, Bécard G, Rochange SF. The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 62(3): 1049-1060
- [13] Bakshi M, Vahabi K, Bhattacharya S, Sherameti I,

- Varma A, Yeh KW, Baldwin I, Johri AK, Oelmüller R. WRKY₆ restricts *Piriformospora indica*-stimulated and phosphate-induced root development in *Arabidopsis*[J]. BMC Plant Biology, 2015, 15: 305
- [14] Hayman DS, Johnson AM, Ruddlesdin I. The influence of phosphate and crop species on endogone spores and vesicular-arbuscular mycorrhiza under field conditions[J]. Plant and Soil, 1975, 43(1/2/3): 489-495
- [15] Kobae Y, Ohmori Y, Saito C, Yano K, Ohtomo R, Fujiwara T. Phosphate treatment strongly inhibits new arbuscule development but not the maintenance of arbuscule in mycorrhizal rice roots[J]. Plant Physiology, 2016, 171(1): 566-579
- [16] 王幼珊, 陈宁, 张美庆, 李晓林, 邢礼军, 倪小会, 冯固, 张旭红. 一种高效抗旱、耐高磷营养丛枝菌根真菌及其生产方法: 中国, CN1245502C[P]. 2006-03-15
Wang YS, Chen N, Zhang MQ. Efficient drought-resisting and high phosphate-tolerant nutritious bush mycorrhizal fungus and its production process: China, CN1245502C[P]. 2006-03-15 (in Chinese)
- [17] Hiruma K, Gerlach N, Sacristán S, Nakano RT, Hacquard S, Kracher B, Neumann U, Ramírez D, Bucher M, O'Connell RJ, et al. Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent[J]. Cell, 2016, 165(2): 464-474
- [18] Bedini A, Mercy L, Schneider C, Franken P, Lucic-Mercy E. Unraveling the initial plant hormone signaling, metabolic mechanisms and plant defense triggering the endomycorrhizal symbiosis behavior[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1800
- [19] Nagy R, Drissner D, Amrhein N, Jakobsen I, Bucher M. Mycorrhizal phosphate uptake pathway in tomato is phosphorus-repressible and transcriptionally regulated[J]. The New Phytologist, 2009, 181(4): 950-959
- [20] Russo G, Spinella S, Sciacca E, Bonfante P, Genre A. Automated analysis of calcium spiking profiles with CaSA software: two case studies from root-microbe symbioses[J]. BMC Plant Biology, 2013, 13: 224
- [21] Shi JC, Zhao BY, Zheng S, Zhang XW, Wang XL, Dong WT, Xie QJ, Wang G, Xiao YP, Chen F, et al. A phosphate starvation response-centered network regulates mycorrhizal symbiosis[J]. Cell, 2021, 184(22): 5527-5540.e18
- [22] Olsson PA, Hansson MC, Burleigh SH. Effect of P availability on temporal dynamics of carbon allocation and glomus intraradices high-affinity P transporter gene induction in arbuscular mycorrhiza[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(6): 4115-4120
- [23] Hofferek V, Mendrinna A, Gaude N, Krajinski F, Devers EA. MiR171h restricts root symbioses and shows like its target NSP2 a complex transcriptional regulation in *Medicago truncatula*[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 199
- [24] Laressergues D, Delaux PM, Formey D, Lelandais-Brière C, Fort S, Cottaz S, Bécard G, Niebel A, Roux C, Combier JP. The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting NSP2[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2012, 72(3): 512-522
- [25] Javot H, Pumplin N, Harrison MJ. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles[J]. Plant, Cell & Environment, 2007, 30(3): 310-322
- [26] Maeda D, Ashida K, Iguchi K, Chechetka SA, Hijikata A, Okusako Y, Deguchi Y, Izui K, Hata S. Knockdown of an arbuscular mycorrhiza-inducible phosphate transporter gene of *Lotus japonicus* suppresses mutualistic symbiosis[J]. Plant and Cell Physiology, 2006, 47(7): 807-817
- [27] Chiu CH, Paszkowski U. Mechanisms and impact of symbiotic phosphate acquisition[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2019, 11(6): a034603
- [28] 徐新良, 刘洛. 中国农田生产潜力数据集. 资源环境科学数据注册与出版系统(<http://www.resdc.cn/DOI>), 2017. DOI:10.12078/2017122301
Xu XL, Liu L. China farmland productivity potential data set. Resource and Environmental Science data Registration and Publishing system (<http://www.resdc.cn/DOI>), 2017. DOI:10.12078/2017122301 (in Chinese)
- [29] 王幼珊, 张淑彬, 殷晓芳, 刘建斌, 武凤霞. 中国大陆地区丛枝菌根真菌菌种资源的分离鉴定与形态学特征[J]. 微生物学通报, 2016, 43(10): 2154-2165
Wang YS, Zhang SB, Yin XF, Liu JB, Wu FX. Isolation and identification of arbuscular mycorrhizal fungi from China's mainland[J]. Microbiology China, 2016, 43(10): 2154-2165 (in Chinese)
- [30] Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V. Mesure Du Taux De Mycorrhization VA D'un Système Radiculaire[M]. Paris: FranceINRA Press, 1986
- [31] 尚昆, 石磊, 李海波, 姚莉梅, 周光荣, 江龙. 梵净山不同海拔丛枝菌根真菌多样性[J]. 东北林业大学学报, 2020, 48(2): 76-80
Shang K, Shi L, Li HB, Yao LM, Zhou GR, Jiang L. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in different

- heights of Fanjingshan Mountain[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2020, 48(2): 76-80 (in Chinese)
- [32] 王幼珊, 刘润进. 球囊菌门丛枝菌根真菌最新分类系统菌种名录[J]. 菌物学报, 2017, 36(7): 820-850
- Wang YS, Liu RJ. A checklist of arbuscular mycorrhizal fungi in the recent taxonomic system of *Glomeromycota*[J]. Mycosystema, 2017, 36(7): 820-850 (in Chinese)
- [33] Schwarzott D, Schüßler A. A simple and reliable method for *SSU* rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores[J]. Mycorrhiza, 2001, 10(4): 203-207
- [34] Lee J, Lee SS, Young JPW. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 65(2): 339-349
- [35] Parniske M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(10): 763-775
- [36] Choi J, Summers W, Paszkowski U. Mechanisms underlying establishment of arbuscular mycorrhizal symbioses[J]. Annual Review of Phytopathology, 2018, 56: 135-160
- [37] Bonneau L, Hugué S, Wipf D, Pauly N, Truong HN. Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome favorable for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*[J]. The New Phytologist, 2013, 199(1): 188-202
- [38] Chen BD, Xiao XY, Zhu YG, Smith FA, Xie ZM, Smith SE. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* gives contradictory effects on phosphorus and arsenic acquisition by *Medicago sativa* Linn[J]. Science of the Total Environment, 2007, 379(2/3): 226-234
- [39] Strawn DG. Review of interactions between phosphorus and arsenic in soils from four case studies[J]. Geochemical Transactions, 2018, 19(1): 10
- [40] Zhang X, Chen BD, Ohtomo R. Mycorrhizal effects on growth, P uptake and Cd tolerance of the host plant vary among different AM fungal species[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2015, 61(2): 359-368
- [41] Fan XN, Zhou XQ, Chen H, Tang M, Xie XA. Cross-talks between macro- and micronutrient uptake and signaling in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 663477
- [42] Xie XA, Hu WT, Fan XN, Chen H, Tang M. Interactions between phosphorus, zinc, and iron homeostasis in nonmycorrhizal and mycorrhizal plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1172
- [43] Zhou XQ, Li JY, Tang NW, Xie HY, Fan XN, Chen H, Tang M, Xie XA. Genome-wide analysis of nutrient signaling pathways conserved in arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Microorganisms, 2021, 9(8): 1557