



華夏英才基金學術文庫

唐明 著

菌根真菌提高植物 耐重金屬機制



科學出版社

华夏英才基金学术文库

菌根真菌提高植物 耐重金属机制

唐 明 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书通过综合分析和科学研究的有机融合,将科学性和创新性融为一体,总结了国家自然科学基金重点项目、面上项目和国家林业行业科研专项以及西北农林科技大学“黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室”创新工程项目的部分研究成果,吸取了国内外相关研究的最新进展,系统介绍了菌根真菌提高植物耐重金属的机制,是一本内容丰富、学术和应用参考价值较高的专著。本专著的出版将对我国菌根的研究和应用,尤其是对我国生态环境建设和土壤重金属污染治理有重要的指导意义。

本书可作为高等院校和科研院所森林保护学、植物保护学、森林生态学、林学、微生物学 and 环境保护学等学科研究生、本科生的教材和参考用书,也可供综合性大学生物学专业师生及农林业、生物学、微生物学等教学与科研工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

菌根真菌提高植物耐重金属机制 / 唐明著. —北京: 科学出版社, 2015.2

(华夏英才基金学术文库)

ISBN 978-7-03-043320-6

I. ①菌… II. ①唐… III. ①菌根—作用—植物—土壤污染: 重金属污染—抗污染作用—研究 IV. ①Q949.32 ②X53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 027822 号

责任编辑: 李秀伟 / 责任校对: 鲁 素

责任印制: 张 倩 / 封面设计: 陈 敬

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

三河市骏杰印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015 年 2 月第 一 版 开本: 720 × 1000 1/16

2015 年 2 月第一次印刷 印张: 15 4/3 插页: 2

字数: 300 000

定价: 98.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

重金属污染状况日益严重,危害人类健康、破坏自然环境、影响生态平衡。特别是采矿活动产生的废石堆和尾矿区造成大面积的重金属污染,对土壤、水体及农业生态系统产生了极其不利的影响,更对人类的身体健康构成了极大的威胁。环境保护部和国土资源部 2014 年 4 月 17 日联合发布的《全国土壤污染状况调查公报》显示,全国土壤环境状况总体不容乐观,部分地区土壤污染较重,土壤无机污染物超标点位数占全部超标点位的 82.8%,主要无机污染物包括镉、汞、砷、铜、铅、铬、锌、镍等重金属,采矿区是主要污染源^①。西北地区尤其是秦岭山麓存在许多矿产资源,陕西省凤县境内已探明铅锌储量 360 万 t,约占全省总储量的 80%,是全国四大铅锌基地之一^②。1985 年开始小规模开采,1996 年形成大规模开采,至今仍在开采,采矿区内矿山环境污染主要为地表水污染、地下水污染和土壤污染,其污染源主要为矿坑废水、选矿废水和尾矿砂^③。高强度、长时间的采矿活动导致重金属元素的大面积释放,使矿区及其周边环境质量极度恶化,并引起一系列环境负效应问题。冶炼过程产生的废水不断排放到周围环境中,造成矿山及周边土壤、水体中重金属污染严重,而且也直接导致土壤污染、大气污染、地表水及地下水污染以及生态环境破坏。因此,矿产资源开发引起的环境污染和生态破坏越来越受到人们的重视。

单一的植物或者微生物修复存在着自身的缺陷。植物—微生物联合修复是防治重金属污染土壤的重要生物手段,受到越来越多的关注。菌根是真菌和植物根系形成的共生体,菌根的形成增加了植物根系吸收面积,增强了植物吸收水分和矿物质的能力,菌根真菌同时也是一个过滤屏障,这种机制包括固定重金属化合物、减少重金属的吸收、在土壤中形成多磷酸盐颗粒的沉淀、通过真菌细胞壁几丁质的吸附,以及真菌内部重金属的螯合,防止重金属在植物中向地上部分转移。重金属污染土壤中分离出的菌根真菌比非污染土壤中具有更强的重金属耐受性,并且这些菌株在重金属胁迫环境中的植物根系中具有良好的定殖能力^④。因而在重金属污染地区筛选出土著的且具有重金属耐受性的菌根真菌,使得菌根

① <http://www.ehs.cn/article-17456-1.html>。

② 宝鸡年鉴编纂委员会, 2004。

③ 侯恩科等, 2003。

④ 何新华等, 2012。

真菌与植物形成的共生体作为一种经济高效的方法联合修复土壤重金属污染。

与菌根真菌功能类似的植物内生真菌——深色有隔内生真菌(*dark septate endophytes*, DSE), 具有很高的重金属耐受性, 对宿主植物抵抗重金属胁迫发挥重要功能, 很多学者认为 DSE 能够像菌根真菌一样广泛应用于土壤修复。但与菌根真菌不同, DSE 是可纯培养的植物内生真菌, 因此, 可以将 DSE 从矿区优势植物根内分离出来, 进而研究其对重金属胁迫的响应和耐性机制。目前, 对于 DSE 与菌根真菌的关系、DSE 在纯培养条件下的耐重金属机制尚不明确。西北重金属污染地区菌根真菌和 DSE 的分布调查一直没有开展, 尤其是 DSE 在西北地区分布状况的调查尚属空白。本专著对陕西省秦岭凤县铅硐山铅锌矿区植物丛枝菌根真菌和 DSE 提高植物耐重金属的机制进行了研究。

本专著是国家林业行业科研专项(201404217)、国家自然科学基金项目(31270639, 31170567)以及西北农林科技大学“黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室”创新工程项目部分研究内容, 研究生班宜辉、徐舟影、张海涵、牛振川、许加参加了研究工作, 王亚军、赵晓锋协助样品采集, 陈婕、胡文涛、李朕协助校对文稿。西北农林科技大学陈辉教授、薛泉宏教授、王春燕副教授在研究期间提供了诸多帮助, 在此深表感谢!

由于作者知识水平有限, 难免有疏漏与不妥之处, 敬请读者指正。

著 者

2014年10月6日

目 录

前言

第一章 概述.....	1
第一节 土壤重金属污染现状及修复技术.....	1
一、土壤重金属污染的现状.....	1
二、土壤重金属污染的修复技术.....	2
第二节 丛枝菌根真菌的研究进展.....	4
一、丛枝菌根真菌分布及多样性.....	4
二、影响 AM 真菌多样性的主要因素.....	9
三、AM 真菌提高植物耐重金属的机制.....	12
第三节 深色有隔内生真菌 (DSE) 的研究进展.....	16
一、DSE 的形态特征与分布.....	16
二、DSE 的生态学功能.....	20
三、DSE 提高植物抗重金属能力的作用.....	22
四、真菌对重金属的耐性机制.....	23
第二章 丛枝菌根真菌和深色有隔内生真菌侵染特征和群落分析.....	26
第一节 材料与方法.....	27
一、研究地概况.....	27
二、研究方法.....	27
第二节 结果与分析.....	34
一、不同样地重金属污染程度评价.....	34
二、不同铅锌污染区 AM 真菌和 DSE 侵染特征.....	34
三、土壤铅锌污染对 AM 真菌和 DSE 侵染的影响.....	38
四、AM 真菌巢式 PCR 产物的检测.....	40
五、DGGE 分析.....	40
六、系统发育分析.....	43
第三节 结论与讨论.....	44
一、AM 真菌、DSE 的资源调查.....	44
二、AM 真菌在重金属矿区的分布.....	45
三、DSE 在重金属矿区的分布.....	46

第三章 AM 真菌、DSE 与土壤理化性质的关系	48
第一节 材料与方法	49
一、样品采集.....	49
二、试验方法.....	50
三、数据处理.....	51
第二节 结果与分析	51
一、土壤理化性质及 Pb、Zn 在土壤、植物体内的分布.....	51
二、AM 真菌和 DSE 侵染率与球囊霉素含量分析.....	52
三、土壤因子与植物根际和根内 AM 真菌群落组成的相关性分析.....	53
四、RDA 与 CCA 分析.....	54
第三节 结论与讨论	55
一、环境因素对 AM 真菌的影响.....	55
二、AM 真菌产生球囊霉素与土壤重金属的分析.....	56
三、土壤理化性质对 AM 真菌和 DSE 分布的影响.....	57
第四章 铅锌矿区林木根际 AM 真菌多样性	59
第一节 不同林木 AM 真菌多样性	59
一、材料与方法.....	59
二、结果与分析.....	61
三、结论与讨论.....	65
第二节 相同林木 AM 真菌多样性	66
一、样品采集.....	66
二、试验方法.....	67
三、结果与分析.....	68
四、结论与讨论.....	73
第五章 林木根际 AM 真菌和球囊霉素与土壤因子的相关性	74
第一节 不同林木根际 AM 真菌和球囊霉素与土壤因子的相关性	74
一、试验方法.....	74
二、结果与分析.....	75
三、结论与讨论.....	79
第二节 相同林木根际 AM 真菌和球囊霉素与土壤因子的相关性	80
一、材料与方法.....	80
二、结果与分析.....	81
三、结论与讨论.....	83
第六章 狼牙刺根际 AM 真菌群落结构及球囊霉素整合重金属含量的研究	87
第一节 材料与方法	88

一、样地选择和供试植物	88
二、土壤化学性质测定	89
三、AM 真菌侵染率的测定	89
四、AM 真菌的巢氏 PCR	89
五、AM 真菌 DGGE 电泳	91
六、AM 真菌条带回收、克隆测序和系统发育树的建立	92
七、球囊霉素的提取、定量及螯合重金属含量的测定	93
八、数据处理	94
第二节 结果与分析	95
一、土壤化学性质和菌根侵染率	95
二、AM 真菌的群落结构和多样性指数分析	96
三、AM 真菌 DGGE 图谱与环境因子的冗余分析	98
四、优势 AM 真菌的分子鉴定和系统发育分析	99
五、球囊霉素的含量和球囊霉素螯合重金属的含量	100
第三节 结论与讨论	101
一、AM 真菌侵染率	101
二、微生物群落结构及优势 AM 真菌	101
三、AM 真菌多样性的评估	102
四、球囊霉素及其螯合重金属的含量	102
第七章 AM 真菌对狼牙刺生长与吸收 Pb 的影响及 Pb 在菌根超微结构中的 定位	105
第一节 材料与方法	105
一、试验设计	105
二、试验方法	106
第二节 结果与分析	109
一、Pb 胁迫下接种 AM 真菌对狼牙刺生长指标的影响	109
二、Pb 胁迫下接种 AM 真菌对狼牙刺根系特征的影响	109
三、接种 AM 真菌对狼牙刺地上部和地下部 Pb 分布的影响	111
四、菌根超微结构中 Pb 定位	113
第三节 结论与讨论	116
一、接种 AM 真菌对狼牙刺生长与吸收 Pb 的影响	116
二、菌根对 Pb 胁迫时狼牙刺根系结构的影响	117
三、狼牙刺菌根结构的 Pb 定位	118
第八章 狼牙刺植物络合素合酶基因的克隆	120
第一节 材料与方法	120

一、RNA 的提取及反转录	120
二、克隆 <i>SvPCSI</i> 和 <i>SvActin</i> 的全长序列	123
三、数据处理	125
第二节 结果与分析	126
一、克隆基因过程中所得到的产物	126
二、 <i>SvPCSI</i> 全长序列分析	126
三、 <i>SvActin</i> 全长序列分析	127
第三节 结论与讨论	130
第九章 Pb 胁迫下接种 AM 真菌对狼牙刺植物络合素合酶基因表达的影响	132
第一节 材料与方法	133
一、试验设计	133
二、试验材料	133
三、叶绿素荧光参数测定	134
四、数据处理	136
第二节 结果与分析	136
一、Pb 胁迫之前 AM 真菌侵染状况及其对狼牙刺生长参数的影响	136
二、Pb 胁迫 1 天时狼牙刺叶绿素荧光参数	137
三、PCs 的含量	139
第三节 结论与讨论	143
第十章 DSE 的分离、鉴定及重金属耐性菌株的筛选	146
第一节 材料与方法	147
一、试验材料	147
二、试验方法	148
第二节 结果与分析	151
一、DSE 的菌落和形态特征	151
二、DSE 的分子鉴定和系统发育分析	152
三、DSE 的回接和再分离	154
四、重金属耐性 DSE 菌株的筛选	155
第三节 结论与讨论	157
一、DSE 的分离和鉴定	157
二、DSE 的筛选	158
第十一章 柱孢顶囊壳的培养和对 Pb 胁迫的响应	159
第一节 材料与方法	160
一、试验材料	160
二、试验方法	161

三、数据处理.....	166
第二节 结果与分析.....	166
一、Pb胁迫对 <i>G. cylindrosporus</i> 菌落形态和菌丝形态的影响.....	166
二、Pb胁迫对 <i>G. cylindrosporus</i> 黑色素、可溶性蛋白和 GSH 含量的影响.....	167
三、Pb胁迫对 <i>G. cylindrosporus</i> 菌丝 SOD 和 CAT 活性的影响.....	170
四、Pb胁迫对 DSE 发酵液中有机酸含量和菌丝中植物激素含量的影响.....	172
五、 <i>G. cylindrosporus</i> 培养条件优化.....	174
第三节 结论与讨论.....	179
一、Pb胁迫对 <i>G. cylindrosporus</i> 菌落形态和菌丝形态的影响.....	179
二、Pb胁迫对 <i>G. cylindrosporus</i> 菌丝黑色素含量的影响.....	180
三、Pb胁迫对 <i>G. cylindrosporus</i> 菌丝酶活性的影响.....	181
四、Pb胁迫对 <i>G. cylindrosporus</i> 菌丝 GSH、有机酸的影响.....	181
五、 <i>G. cylindrosporus</i> 的培养条件.....	182
第十二章 柱孢顶囊壳吸附 Pb 的环境条件和对玉米的 Pb 吸收效应.....	184
第一节 柱孢顶囊壳吸附 Pb 的环境条件.....	184
一、试验方法.....	185
二、数据处理.....	186
三、结果与分析.....	186
四、结论与讨论.....	191
第二节 柱孢顶囊壳对玉米的 Pb 吸收效应.....	194
一、试验材料.....	195
二、试验方法.....	196
三、结果与分析.....	198
四、结论与讨论.....	206
参考文献.....	209
彩图	

第一章 概述

第一节 土壤重金属污染现状及修复技术

一、土壤重金属污染的现状

土壤重金属污染是指重金属在土壤中的积累量显著高于土壤环境背景值或土壤环境质量标准,导致土壤环境质量下降的现象(王燕等 2009)。土壤中高浓度的重金属对农业生态系统产生了极其不利的影响,如镉(Cd)、铅(Pb)、汞(Hg)以及砷(As)等重金属,直接影响土壤质量、土壤结构和土壤肥力,并通过活性氧引起氧化应激反应,破坏植物细胞的结构从而导致对植物直接的毒性,同时会抑制细胞质中大量的生物酶活性,损伤植物的光合作用,影响营养元素的运输和吸收以及氮元素的固定,并诱导氧化性胁迫,从而阻碍植物的生长甚至导致植物死亡(Garg and Bhandari 2013)。

重金属污染不仅能够影响土壤微生物和植物的生长发育,更重要的是重金属在土壤—植物系统中的高流动性,使其极易通过农产品或受污染的水进入食物链(Dal Corso et al. 2010),通过食物链传递等途径危及人类身体健康和生命安全(Bhuiyan et al. 2010)。目前,由于各种人为活动和自然活动,越来越多的重金属污染已经严重威胁到生态系统的质量和功能,如日益增长的商业肥料和杀虫剂的使用,在土壤中的污水污泥、猪粪、煤炭和木灰等含重金属的废料积累,大气中重金属离子的沉积,生活垃圾的焚烧、汽车尾气的排放以及冶炼行业的排放(Liu et al. 1997),使重金属污染不仅主要发生在陆地和水生生态系统中,而且重金属可以被排放到大气系统中,成为主要的环境污染物,过多的重金属积累严重危害到人类、动物和植物的生存(Panda 2008)。

在我国,由于重金属过度使用和不规范排放,近几年重金属污染危害事件越来越多。2009~2011年,中国发生重金属污染事件超过30起(刘瑞 2011)。截至2009年,我国重金属污染的土壤面积已达上千万公顷,污染的耕地达0.1亿 hm^2 ,全国每年受重金属污染的粮食多达1200万t,因重金属污染而导致的粮食减产高达1000余万t,合计经济损失至少为200亿元(王海慧等 2009)。据国家农业部进行的全国污水灌溉区域调查,我国污水灌溉区域面积约140万 hm^2 ,其中重金属污染面积占64.8%,以Cd和Hg的污染面积最大(林文雄等 2012)。2010年2月

国家环境保护部、农业部和统计局联合发布了《第一次全国污染源普查公报》，调查显示全国重金属污染物的排放总量达到 0.09 万 t（薛高尚等 2012）。

重金属污染防治已刻不容缓，我国对重金属污染的防治十分重视。2011 年 2 月，我国首个“十二五”专项规划——《重金属污染综合防治“十二五”规划》（简称《规则》）获得国务院批复，正式把重金属污染的防治列入国家规划中。《规划》要求对重金属 Pb、铬（Cr）、Cd、Hg 和类金属 As 进行重点治理，目标是到 2015 年使重点区域 Pb、Cr、Cd、Hg 和类金属 As 等重金属排放量比 2007 年的排放量削减 15%，非重点区域重金属污染排放量不超过 2007 年的排放量水平。

二、土壤重金属污染的修复技术

重金属污染土壤的修复方法一般分为两类：一是固化作用（immobilization），即增加土壤对重金属的固持能力，减少土壤中重金属的迁移率，从而降低重金属的毒性；二是活化作用（mobilization），即把重金属从土壤中转移出去，以降低土壤重金属的含量（彭亢晋等 2009）。修复土壤重金属污染的主要方法包括：物理化学修复、植物修复、微生物修复和植物—微生物联合修复。传统的物理化学处理方法产生的富含金属的残留物需要进一步处理或填埋，另外，清除污染物的同时也去除了污染地土壤中的生物活性物质。因此，对于重金属污染地区的治理需要开发生物手段的可持续定点修复技术，目前采用最多的是植物修复、微生物修复以及植物—微生物的联合修复。

1. 植物修复

植物修复（phytoremediation）是利用植物的代谢活动、植物对重金属污染物特殊的耐性或积累能力、植物根系对重金属吸收和转化污染物的能力，使污染物转化为无污染的状态或降解为危害小的成分，以达到降低污染物浓度或清除污染的目的（Marques et al. 2009）。根据作用过程和机制的不同，重金属污染土壤的植物修复技术可归为植物提取（phytoextraction）、植物挥发（phytovolatilization）和植物稳定（phytostabilization）3 种类型。

植物提取是指利用重金属积累植物或超积累植物对重金属敏感性低、吸附能力强的特性，将土壤中的重金属转移到植物根部可收割部分和植物地上部位，从而将土壤中的重金属提取出来（Amna et al. 2011, Rascio and Navari-Izzo 2011）。植物挥发是利用某些重金属元素易挥发的特性，通过植物对土壤重金属的吸收和挥发作用而降低土壤中挥发性重金属含量，即植物吸收重金属后将其转化为气态并释放到大气中，从而降低土壤重金属含量（Saraswat and Rai 2011a），目前，这方面研究最多的是挥发性重金属元素汞和易形成挥发性、生物低毒性有机物的元

素硒。植物稳定是利用耐重金属植物或超积累植物对重金属特殊的耐受性和积累能力来降低土壤中重金属的移动性,从而减少重金属被淋滤到地下水或通过空气扩散的可能性 (Dominguez et al. 2009)。在这一过程中,土壤中重金属含量并不会减少,只是形态发生了改变,因此并没有根本性地解决重金属污染问题。而植物修复技术本身也存在着一些缺陷,如超积累植物常常因为个体矮小、生长缓慢、根系扩张深度有限等问题而难以达到理想的修复效果 (Wang et al. 2013)。

2. 微生物修复

微生物主要通过生物吸附和生物转化两种方式对土壤中的重金属进行吸附、积累、氧化和还原,把重金属离子转化为低毒产物,从而降低土壤中重金属的毒性 (Sepehri et al. 2013)。微生物吸附作用是指利用微生物自身的化学成分和结构吸附土壤中的重金属离子。微生物转化作用是指通过区域化作用将重金属转移至代谢不活跃的区域,或将其与热稳定蛋白相结合,改变其存在形态,从而降低其毒性 (Burd et al. 2000)。研究发现,土壤中有些微生物可以通过分泌有机酸降低土壤的 pH,从而提高土壤重金属的生物有效性 (Chen et al. 2005c)。

然而,微生物修复技术也存在一定的局限性。首先,微生物存在遗传稳定性差、容易发生变异的特点,因而使修复过程不够稳定;其次,微生物对重金属的吸附和积累量有限,一般很难将重金属污染物全部去除,并且必须与土著微生物展开营养和空间的竞争,最终有可能因难以适应环境而被淘汰 (张艳等 2012)。

3. 植物—微生物联合修复

将微生物修复与植物修复相结合对重金属污染土壤进行治理的方法,已受到越来越多的关注。微生物与植物的相互作用不仅可以促进植物生长、提高植物水分和养分的吸收能力、增加植物的生物量,而且可以提高植物对重金属的耐性,增强植物吸收重金属的能力,从而提高植物修复能力 (李安明等 2011)。同时,植物也为微生物生长代谢活动提供了更好的条件,如根际微生物往往能够直接利用根系分泌物中的糖类、蛋白质、氨基酸等物质,植物根内的共生微生物与植物之间存在着更广泛的营养和能量交换 (Rajkumar et al. 2012)。植物和微生物本身都具有修复土壤重金属污染的能力,因此,这种植物—微生物相结合的修复方式在提高植物对土壤重金属的吸收和转化效率方面具有巨大的应用潜力。

菌根真菌与植物根系共生形成菌根,能够促进宿主植物对营养养分的吸收,并提高宿主植物对重金属的耐受力 (Göhre and Paszkowski 2006)。Giasson 等 (2008) 提出丛枝菌根 (arbuscular mycorrhiza, AM) 真菌可以通过以下机制中的一个或几个组合来提高植物耐受或者对抗重金属对植物的毒性:①真菌的基因表达;②重金属吸附和沉淀;③产生金属硫蛋白 (金属结合蛋白);④对金属回避 (减少

摄取或增加外排,形成细胞外的复合物,释放有机酸、铁载体等);⑤细胞内的螯合(如合成聚磷酸盐和金属硫蛋白的配位体);⑥在空泡中区域化;⑦干燥或寒冷的季节叶片掉落损失;⑧磷与植物生长(通过增加宿主植物磷元素的吸收)之间的相互作用;⑨通过球囊霉素进行生物吸附;⑩挥发。AM 真菌通过螯合作用将重金属积累在菌丝内,抑制了重金属的移动性,阻止过量的重金属进入植物体内,从而减轻重金属对植物的毒害(王发园和林先贵 2007)。AM 真菌对重金属的间接作用主要是通过影响宿主植物来实现的,通过加强宿主植物对养分的吸收和利用以提高宿主植物对重金属的抗性。研究发现,AM 真菌对重金属胁迫下生长的植物在形态上和生理上的作用可以显著地改善植物的磷营养状况(Zaeferian et al. 2013)。目前需要大量的试验来探索土壤—植物系统中,重金属和 AM 真菌互相影响的机制。在重金属污染土壤中接种微生物而引起植物生长的增加以及重金属运输的减弱,在重金属污染土壤的治理方面可以作为一个非常有前景的策略。

第二节 丛枝菌根真菌的研究进展

一、丛枝菌根真菌分布及多样性

AM 真菌在自然界分布极为广泛,能与 70%~90%的陆地植物形成丛枝菌根(Smith and Read 2008)。保守估计,土壤中 AM 真菌的生物量占土壤微生物总量的 5%~10%(Fitter et al. 2011)。大约 20%的陆地植物的光合产物(每年约为 50 亿 t 碳)进入 AM 真菌体内(Bago et al. 2000)。AM 真菌形成菌根后对宿主植物有多种积极效应,早期发现 AM 真菌能够提高土壤磷的降解作用,在缺磷条件下,AM 真菌可增加植物磷的吸收,促进植物生长(Faramarzi et al. 2012)。后来研究发现,AM 真菌还能够显著提高宿主植物对逆境环境的抵抗力,如抵抗干旱、盐碱、重金属毒害和有机物污染等生态学功能,因而受到植物学家、微生物学家和生态学家的重视(Simth and Read 2008)。AM 真菌物种多样性的研究也因此显得更加重要(何新华等 2012)。

1. AM 真菌的分类

目前,以形态特征为依据的鉴定方法依然是 AM 真菌种类鉴定所采用的主要方法(刘永俊和冯虎元 2010)。首先使用湿筛倾析法将 AM 真菌的孢子从土壤中分离出来,再利用显微镜观察孢子的形状、颜色、大小、表面纹饰、内含物、孢壁层数和结构以及连孢菌丝的形状等特征来确定 AM 真菌的种类(Schenck and Pérez 1990)。通过参照《丛枝菌根真菌鉴定手册》(*Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi*)(Schenck and Pérez 1990)以及国际丛枝菌根真菌保藏中心

(INVAM) 在互联网 (<http://invam.caf.wvu.edu/>) 上提供的形态特征描述及图片进行丛枝菌根真菌的鉴定。AM 真菌的最新分类可以参照网站 (<http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/>) 的内容进行查找。

Morton 和 Benny (1990) 依据对 27 类 AM 真菌结构特征的综合分析, 将全部 AM 真菌归入新设立的球囊霉目 (Glomerales, 属接合菌纲)。随后 Schüßler 等 (2001) 以 SSU rRNA 基因序列研究为基础, 将球囊霉目提升到球囊霉门 (Glomeromycota), 其中包括 1 个纲 (Glomeromycetes) 4 个目 (Glomerales、Diversisporales、Paraglomerales 和 Archaeosporales) 7 个科 (Glomeraceae、Gigasporaceae、Acaulosporaceae、Diversisporaceae、Paraglomeraceae、Archaeosporaceae 和 Geosiphonaceae) 和 9 个属 (*Glomus*、*Gigaspora*、*Scutellospora*、*Acaulospora*、*Entrophospora*、*Diversispora*、*Paraglomus*、*Archaeospora* 和 *Geosiphon*)。Schüßler 和 Walker (2010) 在此基础上又新增了 4 个科和 9 个属, 使 AM 真菌 (球囊霉门) 分类系统包含 1 个纲 4 个目 11 个科 18 个属。Oehl 等 (2011) 根据 AM 真菌的 DNA 序列以及形态学特征的综合分析, 进一步对分类系统进行了调整, 形成了包含 3 纲 5 目 14 科 29 属的最新 AM 真菌分类系统 (表 1-1) (http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/amphylo_species.html)。Börstler 等 (2006) 估计, 全球范围内 AM 真菌的种类至少应有 1250 种, 目前报道的 AM 真菌有 250 余种。

表 1-1 丛枝菌根真菌分类系统

纲	目	科	属
Glomeromycetes	Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i> , <i>Funnelformis</i> , <i>Septoglomus</i> , <i>Simiglomus</i>
		Entrophosporaceae	<i>Claroideoglomus</i> , <i>Albahypha</i> , <i>Viscospora</i> , <i>Entrophospora</i>
	Diversisporales	Diversisporaceae	<i>Diversispora</i> , <i>Redeckera</i> , <i>Otospora</i> , <i>Tricispora</i>
		Sacculosporaceae	<i>Sacculospora</i>
		Pacisporaceae	<i>Pacispora</i>
		Acaulosporaceae	<i>Kuklospora</i> , <i>Acaulospora</i>
	Gigasporales	Scutellosporaceae	<i>Orbispora</i> , <i>Scutellospora</i>
		Dentiscutataceae	<i>Fuscutata</i> , <i>Dentiscutata</i> , <i>Quatunica</i>
		Racocetraceae	<i>Cetraspora</i> , <i>Racocetra</i>
		Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i>
Archaeosporomycetes	Archaeosporales	Ambisporaceae	<i>Ambispora</i> ,
		Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i> , <i>Intraspora</i>
		Geosiphonaceae	<i>Geosiphon</i>
Paraglomeromycetes	Paraglomerales	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>

资料来源: Oehl 等, 2011。

由于现代分子生物学和生物化学技术的广泛应用，人们正在传统分类法的基础上积极探索生理和生物化学、分子生物学技术和计算机技术相结合的方法，以便更快速、更准确地进行此类真菌的鉴定（刘润进和陈应龙 2007）。

2. AM 真菌多样性研究方法进展

通常情况下，研究人员都是利用显微镜来观察 AM 真菌的结构，检测 AM 真菌的丰度和鉴定物种。由于 AM 真菌有很强的遗传变异性，表现在形态学上，多样性却受到限制，在不看孢子结构的情况下，菌丝结构最多只能鉴定到属的水平（Merryweather and Fitter 1998）。随着分子生物学的发展，分子生物学技术已经成为研究 AM 真菌多样性必不可少的方法。球囊菌门（Glomeromycota）的第一条特异性引物是由 Simon 等（1992）根据 AM 真菌 18S rRNA 小亚基的序列设计的。之后，基于 DNA 的分子鉴定技术迅速发展起来，研究人员针对 18S rRNA 上不同区域设计了很多不同的 AM 真菌引物（表 1-2）（Gorzela et al. 2012）。

表 1-2 AM真菌多样性研究中使用的引物

参考文献	引物方向	引物名称	序列信息	片段大小
van Tuinen 等（1998）	正向	LR1	GCA TAT CAA TAA GCG GAG GA	750 bp
	反向	NDL22	TGG TCC GTG TTT CAA GAC G	
Trouvelot 等（1999）	正向	LR1		约 300 bp
	反向	FLR2	GTC GTT TAA AGC CAT TAC GTC	
Simon（1992）	正向	VANS1	GTC TAG TAT AAT CGT TAT ACA GG	550 bp
	反向（通用）	NS21	AAT ATA CGC TAT TGG AGC TGG	
Gollotte（2004）	正向	FLR3	TTG AAA GGG AAA CGA TGG AAG T	400 bp
	反向	FLR4	TAC GTC AAC ATC CTT AAC GAA	
Lee 等（2008）	正向	AML1	ATC AAC TTT CGA TGG TAG GAT AGA	800 bp
	反向	AML2	GAA CCC AAA CAC TTT GGT TTC	
Simon（1992）	正向	NS31	TTG GAG GGC AAG TCT GGT GCC	550 bp
Helgason 等（1998）	反向	AM1	GTT TCC CGT AAG GCG CCG AA	
Sato 等（2005）	正向	AMV4.5NF	AAG CTC GTA GTT GAA TTT CG	300 bp
	反向	AMDGR	CCC AAC TAT CCC TAT TAA TCA T	
Krüger（2009）	正向	SSUmCf	详见参考文献	1500 bp
	反向	LSUmBr		
Krüger（2009）	正向	SSUmAf	详见参考文献	1800 bp
	反向	LSUmAr		

（1）图谱技术

图谱技术是根据碱基对的差异在不同序列之间产生构象差异，从而进行基因指纹分析（Lekberg et al. 2012）。序列之间的差异是通过变性剂梯度或者温度梯度（如

DGGE、TGGE 或者是单链构象多态性 SSCP) 或者是序列长度差异 (如限制性片段长度多态性 T-RFLP) 或者是核糖体基因间隔区 (ARISA) 分析来鉴定并区分开来。

变性技术。DGGE/TGGE 技术是在聚丙烯酰胺凝胶的基础上, 加入了变性剂梯度或者温度梯度, 从而把长度相同但碱基序列不同的 DNA 片段区分开来。DNA 片段由特有的序列组成, 而其序列组成又决定了其解链区域和解链行为。几百个碱基对长的 DNA 片段一般有数个由连续碱基对组成的解链区域。当变性剂浓度/温度逐渐升高达到其最低的解链区域变性剂浓度/温度时, 该解链区发生解链。当变性剂浓度/温度依次升高到其他各解链区域温度时, 这些解链区也依次发生解链, 最后双链 DNA 完全解链。不同双链 DNA 的解链区域及各解链区域的解链浓度/温度是不一样的, 部分解链的 DNA 片段在胶中的迁移速率会急剧降低, 因此, 长度相同但序列不同的 DNA 片段在胶中不同位置达到各自最低解链区域的解链浓度/温度, 它们会在胶的不同位置发生部分解链导致迁移速率大大下降, 从而在胶中被区分开来。DGGE/TGGE 技术的优点是单独的片段可以从胶中回收、扩增, 并测序进行种类鉴定, 缺点之一是只能分离较小的片段, 使用于系统发育分析比较和探针设计的序列信息量受到限制, 不容易鉴定微生物到种的水平 (上海易扩仪器有限公司 DGGE 产品说明)。

长度多态性技术。许多关于 AM 真菌群落研究的高水平文章都采用了 T-RFLP 技术。这种技术的核心是荧光标记的 PCR 产物经一种或多种限制性酶切后产生不同长度的片段。外生菌根真菌的 T-RFLP (Pickles et al. 2012) 和细菌的 T-RFLP (Rosch and Bothe 2005) 数据库已经建成, 但是 AM 真菌的 T-RFLP 数据库还没有, 目前不清楚是不是因为 AM 真菌的种与种之间亲缘关系太近导致这种方法不适用于 AM 真菌研究。T-RFLP 假设产生的每个片段即是一个单独的微生物种类, 研究者认为 T-RFLP 可能高估了微生物物种的丰富度。同时, 试验证明在某些情况下, 不同的微生物种类会产生相同的条带图谱, 因此又会低估微生物的丰富度 (Dickie and FitzJohn 2007)。

(2) 高通量测序方法

与经典的 Sanger 测序相比, 高通量测序得到的序列信息量是前者的指数倍数。由于它的超大信息量, 454 焦磷酸测序已经成为微生物多样性研究的首要选择。利用 454 高通量测序方法研究真菌群落的文章日渐增多。起初, 这种方法被用来研究土壤真菌 (Lim et al. 2010) 和外生菌根真菌群落 (Lekberg et al., 2012), 最近也开始采用这种方法研究 AM 真菌群落。454 测序法的基础是焦磷酸测序技术, 它是将 PCR 扩增的单链与引物杂交, 并与 DNA 聚合酶、ATP 硫酸化酶、萤光素酶、三磷酸腺苷双磷酸酶、底物萤光素酶和 5' 磷酸硫腺苷共同孵育, 然后将脱氧核糖核苷三磷酸 (deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP) 按照碱基配对的原则依次连接到引物上。在每一轮测序反应中, 只加入一种 dNTP, 若该 dNTP 与待测模板配