

无距虾脊兰根际土壤真菌与根系内生真菌多样性

何水莲^{1,2}, 黄蓓¹, 李田园¹, 田敏¹

(1. 中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 杭州 311400; 2. 南京林业大学 林学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 【目的】研究野生无距虾脊兰 *Calanthe tsoongiana* 在萌芽期、花期、果期、衰亡期根际土壤真菌和根系内生真菌多样性差异, 旨在明确不同生长发育时期真菌多样性特征, 为无距虾脊兰种群扩繁提供理论依据。【方法】采用内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 测序技术, 分析野生无距虾脊兰 4 个时期根际土壤真菌与根系内生真菌群落的物种组成及相对丰度变化, 找出各时期优势真菌。【结果】4 个时期共获得 307 288 条优化序列, 平均序列长度为 643 bp, 隶属 16 门 68 纲 176 目 413 属。萌芽期根际土壤真菌和根系内生优势真菌为分别被孢霉属 *Mortierella* 和红菇属 *Russula*, 花期优势真菌分别为青霉属 *Penicillium* 和粗糙孔菌属 *Trechispora*, 果期分别为 *Paraboeremia* 和蜡壳耳属 *Sebacina*, 衰亡期分别为 *Paraboeremia* 和镰孢属 *Fusarium*。Alpha 多样性指数显示: 根系内生真菌多样性和相对丰度从萌芽期到果期依次递增, 在果期达到顶峰, 衰亡期又急剧下降。根际土壤真菌中花期多样性最高, 其余 3 个时期变化相对平稳。【结论】无距虾脊兰根际土壤真菌和根系内生真菌多样性和丰富度在整个生长发育时期存在较大差异, 花期和果期真菌多样性高于衰亡期和萌芽期。图 5 表 2 参 34

关键词: 无距虾脊兰; 内生真菌; 多样性; 不同时期

中图分类号: S718.81 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2023)06-1158-09

Diversity of rhizosphere soil fungi and root endophytic fungi of *Calanthe tsoongiana*

HE Shuilian^{1,2}, HUANG Bei¹, LI Tianyuan¹, TIAN Min¹

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Hangzhou 311400, Zhejiang, China;
2. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: [Objective] This study, with an investigation into the diversity differences of rhizosphere soil fungi and root endophytic fungi in the wild population of *Calanthe tsoongiana*, is aimed to clarify the diversity characteristics of fungi in different growth and development stages so as to provide theoretical basis for population propagation. [Method] Internal transcribed spacer (ITS) sequencing technology was used to analyze the species composition and abundance changes of endophytic fungi communities in the rhizosphere soil and roots at the four stages of *C. tsoongiana* with the dominant fungi at each stage investigated. [Result] A total of 307 288 optimized sequences were obtained from the four periods, with an average length of 643 bp, belonging to 16 phyla, 68 classes, 176 orders, and 413 genera. At the germination stage, the dominant fungi in rhizosphere soil and root were *Mortierella* and *Russula*, respectively; *Penicillium* and *Trechispora* were the dominant fungi at the flowering stage; at the fruiting stage, the dominant fungi were *Paraboeremia* and *Sebacina* while *Paraboeremia* and *Fusarium* were the dominant fungi at the decay stage. The results of Alpha diversity index

收稿日期: 2023-02-28; 修回日期: 2023-05-26

基金项目: 浙江省农业 (花卉) 新品种选育重大科技专项 (2021C02071-5); 浙江省重点研发计划项目 (2019C02036)

作者简介: 何水莲 (ORCID: 0009-0007-2172-1279), 从事兰科植物保育研究。E-mail: 990455348@qq.com。通信作者: 田敏 (ORCID: 0009-0009-7189-2767), 副研究员, 博士, 从事花卉育种研究。E-mail: tmin115@163.com

showed that the diversity and relative abundance of endophytic fungi increased from the germination stage to the fruiting stage, reaching the peak at the fruiting stage, and decreasing sharply at the declining stage. The diversity of rhizosphere soil fungi was the highest at the flowering stage, and the changes in the other three stages were relatively stable. [Conclusion] The diversity and richness of rhizosphere soil fungi and root endophytic fungi were significantly different during the whole growth and development period whereas flowering and fruiting fungal diversity was higher than in budding and dying. This study has provided an important reference for artificial breeding and conservation of wild resources in *C. tsoongiana*. [Ch, 5 fig. 2 tab. 34 ref.]

Key words: *Calanthe tsoongiana*; endophytic fungi; diversity; different periods

无距虾脊兰 *Calanthe tsoongiana* 为兰科 Orchidaceae 虾脊兰属 *Calanthe* 地生草本，花朵娇艳，造型独特，受到人们的喜爱。近些年来，由于人为破坏，以及自身繁殖困难，导致野生无距虾脊兰种群数量锐减，现已被列为极度濒危等级^[1]。

植物和真菌之间的互惠共生是自然界中普遍存在的现象^[2]。兰科菌根真菌是一类与兰科植物形成共生关系并生成菌丝团的真菌，隶属于根系内生真菌，对兰科植物生长起促进作用^[3]。研究表明：兰科植物的整个生命活动都需要菌根真菌的参与，菌根真菌不仅可以帮助兰花种子萌发^[4-5]，也在其生长发育过程中扮演着重要的角色。它可以吸收土壤中的矿质元素、有机物等，在侵染兰科植物后被宿主细胞分解并向其传输营养物质^[6-7]，若缺乏菌根真菌，兰科植物将无法长期存活。除了菌根真菌，兰科植物中非菌根真菌的数量也十分庞大，远远超过了菌根真菌。镰孢属 *Fusarium*、木霉属 *Trichoderma* 和青霉属 *Penicillium* 是兰科植物中常见的内生真菌，在适当的条件下不仅能促进兰科植物种子的萌发和生长发育，还可以有效抑制病原菌的生长^[8-10]。由此可见，非菌根真菌的作用也不容忽视。兰科菌根真菌不仅广泛存在于根系内，也存在于植株周围土壤中，且距离植株越远，其相对丰度越低^[11-12]，但也有研究表明：菌根真菌少量或者不存在于土壤中^[13-14]。蒋玉玲等^[15]研究表明：通过对周围土壤中真菌类群的分析，可推断兰科植物能否长期在此生存。因此，研究根际土壤真菌类群对兰科植物保育十分重要。

目前，虾脊兰属植物的研究集中在分类鉴别、育种和繁殖等方面，具体有资源调查、遗传多样性研究、化学与药用价值研究、快速繁育以及引种驯化等等^[16-17]。国内外对虾脊兰属根系内生真菌多样性研究较少，尚处于初步阶段，未得到系统且全面的数据，尤其是无距虾脊兰还未见相关报道。鉴于此，本研究以浙江省天目山野生无距虾脊兰为材料，通过分析无距虾脊兰不同时期根际土壤真菌与根系内生真菌多样性，明确其优势真菌和共有真菌类群，以期为无距虾脊兰资源有效保护提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 研究地点与样品采集

所用材料采自浙江天目山国家级自然保护区内无距虾脊兰野生居群(海拔 550 m, 30°21'47"N, 119°25'30"E)。该研究区属亚热带季风气候，雨水充沛，年降水量达 1 870 mm，相对湿度较大，自然条件优越。

无距虾脊兰生长在海拔 450~1 450 m 的阔叶混交林下，生长周期可分为萌芽期、花期、果期和衰亡期^[18]。选择未遭到破坏、分布集中且长势一致的植株，分别于 2、5、7 和 11 月进行根段采集。每次选取 9 株植株，每株取 3~4 个长约 4~5 cm 的根段，用根围土包裹装入采样袋，做好标记并放入 4 ℃ 冰箱保存。

1.2 研究方法

1.2.1 样品处理 取出根系并用流水冲洗干净，无菌水冲泡，用体积分数为 70% 的乙醇洗涤 2 min，质量分数为 2.5% 的次氯酸钠浸泡 5 min，体积分数为 70% 的乙醇洗涤 30 s，再经无菌水冲洗 2~3 次，用无菌滤纸吸去多余水分后转入液氮中紧急速冻。初步处理完成，置于 -80 ℃ 超低温冰箱保存。

1.2.2 根际土提取 在超净台上抖掉根围土，保留附着在根系 1 mm 左右的根际土。用无菌镊子将根系转移至装有磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 的离心管中，全温摇床下震荡 20 min，挑出根系，将剩余悬浮液

6 000 r·min⁻¹ 高速离心 20 min, 弃上清液得到根际土。做好标签记录, 将离心管放入液氮, 待其彻底急速冷冻后, 放入-80 °C 超低温冰箱保存。

1.2.3 DNA 提取及 PCR 扩增 使用 DNA 提取试剂盒提取无距虾脊兰根系与根际土壤 DNA, 提取后利用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度, 引物合成和测序由上海美吉生物医药科技有限公司进行。

PCR 仪采用 ABI Gene Amp® 9700 型, 每个样本 3 个重复, 20.0 μL PCR 反应体系为 10.0 μL 2× ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix, 0.8 μL 上游引物, 0.8 μL 下游引物, 0.4 μL 50 × ROX Reference Dye 1, 2.0 μL DNA 模板, ddH₂O 补至 20.0 μL。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 1 min, 4 °C 保存。同一样本的 PCR 产物混合后用质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN 公司) 切胶回收 PCR 产物, 纯化后的 PCR 产物使用 Illumina MiSeq 平台进行测序。

1.2.4 序列分析与处理 首先根据 overlap 关系利用 FLASH (v1.2.11) 软件对 Illumina 测序得到的原始数据进行拼接, 并通过 FASTP (v.0.19.6) 软件对序列质量进行质控、过滤和优化。区分样本后, 在 97% 相似度水平下使用 UPARSE (v11.0) 软件对优化序列进行分类操作单元 (OTU) 聚类分析。为了得到每个 OTU 对应的物种分类信息, 基于 97% 相似水平下采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 OTU 代表序列与 UNITE (v.8.0) 数据库进行分类学比对。

基于 OTU 聚类分析结果, 通过 Mothur (v1.30.2) 软件进行多样性指数分析, 从而得到所有样本群落中物种的丰富度、覆盖度和多样性等信息。根据分类学分析结果, 通过 Qiime (v1.9.1) 软件生成各分类学水平丰度表, 进行 Beta 多样性距离计算, 找出各样本在某一分类学水平上的优势物种、样本中各优势物种的相对丰度以及不同样本中物种的组成相似性, 并利用 R 语言 (version 3.3.1) 工具统计和作图, 将差异和距离通过二维坐标图呈现出来, 从总体上反映各组样本之间的差异和组内样本之间的变异度大小。基于 Kruskal-Wallis 秩和检验 (Kruskal-Wallis H test), 通过 R (version 3.3.1) 的 stats 包和 python 的 scipy 包运用 DP 的方法计算影响大小 (effect size), 从而找出多组样本的物种进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 无距虾脊兰根系内生真菌多样性分析

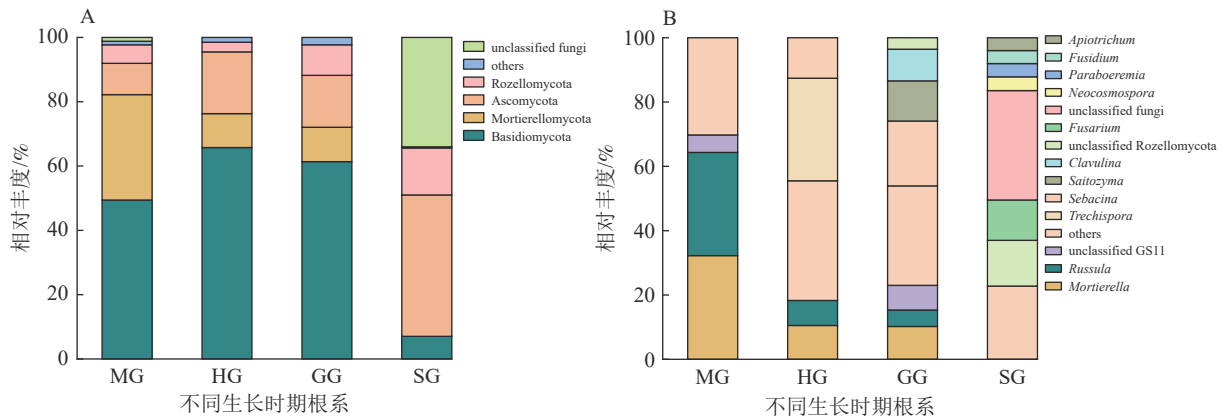
无距虾脊兰萌芽期根系测序共获得 31 987 条优化序列。由图 1 可知: 在门水平上担子菌门 Basidiomycota 和被孢霉门 Mortierellomycota 占比较大, 属于萌芽期根系内生真菌优势门; 在属水平上, 被孢霉属 *Mortierella* 和红菇属 *Russula* 真菌序列占比相差不大, 共同作为该时期优势内生真菌。花期根系测序共获得 51 913 条优化序列。其中, 担子菌门为最大优势菌门; 在属水平上, 粗糙孔菌属 *Trechispora* 为该时期优势内生真菌。相较于萌芽期, 花期真菌类群中担子菌门和子囊菌门 Ascomycota 相对丰度分别为萌芽期的 1.33 和 1.97 倍, 被孢霉门、被孢霉属和红菇属的相对丰度呈现下降趋势, 分别减少了 67.82%、67.39% 和 75.70%。

果期根系测序共获得 43 793 条优化序列。其中担子菌门真菌在数量上占绝对优势; 在属水平上, 蜡壳耳属 *Sebacina* 为该时期优势内生真菌。相较于花期, 担子菌门、子囊菌门、被孢霉门和红菇属相对丰度变化不大, 但 *Saitozyma*、锁瑚菌属 *Clavulina* 相对丰度有所增加, 由原来占比不足 3.00% 增长到 13.09% 和 10.29%, 蜡壳耳属增加了 67.30%。衰亡期根系测序共获得 30 000 条优化序列。该时期, 子囊菌门属于优势菌门, 镰孢属为优势内生真菌, 相较于其他 3 个时期, 衰亡期根系内生真菌多样性整体出现骤降现象。

2.2 无距虾脊兰根际土壤真菌多样性分析

在萌芽期, 无距虾脊兰根际土壤测序共获得 31 673 条优化序列。由图 2 可知: 萌芽期根际土壤与根系在门水平上真菌类群一致, 但相对丰度稍有变化; 在属水平上, 红菇属相对丰度明显下降, 占比仅为 3.55%, 其余真菌相对丰度较小, 被孢霉属为该时期根际土壤优势真菌。

在花期, 根际土壤测序共获得 41 062 条优化序列。与同时期根系内生真菌相比, 担子菌门相对丰度减少, 子囊菌门相对丰度增加。在属水平上, 根际土壤和根系真菌类群相对丰度明显不同, 其中青霉属



MG. 萌芽期根系; HG. 花期根系; GG. 果期根系; SG. 衰亡期根系。unclassified fungi. 未分类真菌; others. 其他; 罗兹菌门 Rozellomycota; 子囊菌门 Ascomycota; 被孢霉门 Mortierellomycota; 担子菌门 Basidiomycota; 梭孢霉属 *Fusidium*; 新赤壳属 *Neocosmospora*; 镰孢属 *Fusarium*; 罗兹菌门未分类真菌 unclassified Rozellomycota; 锁瑚菌属 *Clavulina*; 蜡壳耳属 *Sebacina*; 粗糙孔菌属 *Trechispora*; 未分类真菌 GS11: unclassified GS11; 红菇属 *Russula*; 被孢霉属 *Mortierella*。

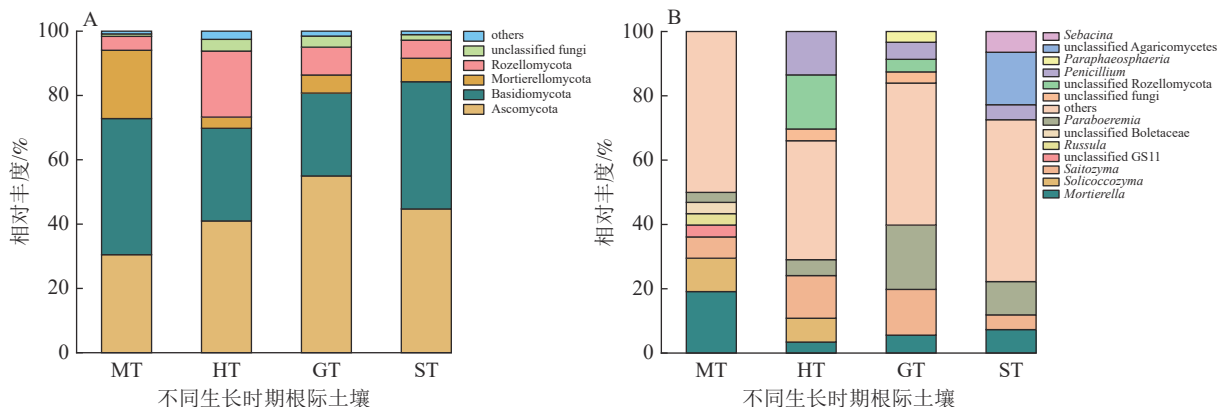
图 1 不同时期无距虾脊兰根系内生真菌在门 (A) 和属 (B) 水平上的群落组成

Figure 1 Community composition of root endophytic fungi in different periods of *C. tsoongiana* at phylum (A) and genus (B) level

Penicillium 为该时期根际土壤优势真菌。相较于萌芽期根际土壤真菌，花期子囊菌门和罗兹菌门 *Rozellomycota* 相对丰度分别为萌芽期的 1.34 和 4.74 倍，担子菌门、被孢霉门真菌相对丰度分别减少了 31.93% 和 67.82%。

在果期，根际土壤测序共获得 47 863 条优化序列。与根系内生真菌相比，门水平上子囊菌门和担子菌门变化最大，在属水平上，*Paraboeremia* 仅存在于根际土壤真菌中，且占比较大，为该时期根际土壤优势真菌。相较于花期根际土壤真菌，果期子囊菌门、被孢霉门、*Paraboeremia* 和 *Saitozyma* 相对丰度分别为花期的 1.34、1.61、4.03 和 1.07 倍，担子菌门和罗兹菌门相对丰度分别降低到花期的 89.45% 和 42.21%。

在衰亡期，根际土壤测序共获得 28 997 条优化序列。在门水平上，担子菌门为根系内生真菌的 5.61 倍，根系内生真菌无被孢霉门，而在根际土壤中其真菌序列占 7.29%。在属水平上，各真菌相对丰度差别较大，其中 *Paraboeremia* 为该时期根际土壤优势真菌。相较于果期根际土壤真菌，蜡壳耳属仅存在于衰亡期根际土壤中，担子菌门和被孢霉属真菌相对丰度分别为果期的 1.53 和 1.31 倍，*Saitozyma* 相对丰度降低到果期的 32.32%。



MT. 萌芽期根际土壤; HT. 花期根际土壤; GT. 果期根际土壤; ST. 衰亡期根际土壤; others. 其他; unclassified fungi. 未分类真菌; 罗兹菌门 *Rozellomycota*; 被孢霉门 *Mortierellomycota*; 担子菌门 *Basidiomycota*; 子囊菌门 *Ascomycota*; 蜡壳耳属 *Sebacina*; 青霉菌属 *Penicillium*; 罗兹菌门未分类真菌 unclassified *Rozellomycota*; 牛肝菌科未分类真菌 unclassified *Boletaceae*; 红菇属 *Russula*; GS11 未分类真菌 unclassified GS11; 被孢霉属 *Mortierella*。

图 2 不同时期无距虾脊兰根际土壤真菌在门 (A) 和属 (B) 水平上的群落组成

Figure 2 Community composition of rhizosphere soil fungi in different periods of *C. tsoongiana* at phylum (A) and genus (B) level

2.3 不同时期真菌群落差异性分析

通过对无距虾脊兰根际土壤与根系测序分析，发现不同生长发育时期物种注释结果存在较大差别，

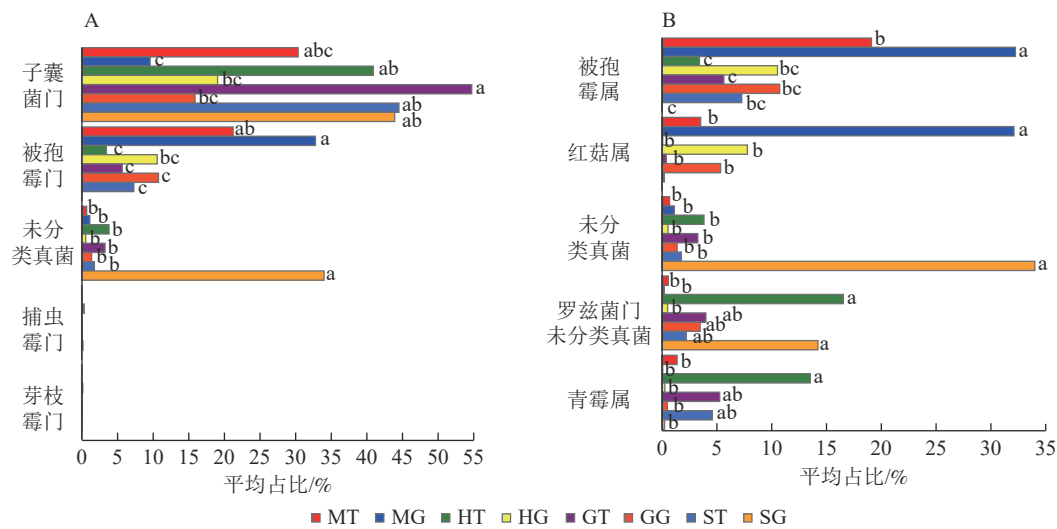
具体差异见表1。其中萌芽期根际土壤和根系优势真菌分别为被孢霉属和红菇属，花期优势真菌分别为青霉属和粗糙孔菌属，果期优势真菌分别为 *Paraboeremia* 和蜡壳耳属，衰亡期优势真菌分别为 *Paraboeremia* 和镰孢属，不同生长发育时期优势真菌不同。

在门水平上，子囊菌门真菌在萌芽期、花期和果期的根际土壤与根系中存在显著差异；而被孢霉

门真菌则在萌芽期与衰亡期的根际土壤和根系中存在显著差异(图3A, $P < 0.05$)。在属水平上，被孢霉属、红菇属、罗兹菌门未分类属以及青霉属在萌芽期的根际土壤与根系真菌上差异较为明显。由图4可知：有虫草菌属 *Cordyceps* 等321个属为4个时期共有真菌；裸盖菇属 *Psilocybe* 等29个属为萌芽期和花期共有真菌，复膜孢酵母属 *Saccharomycopsis* 等43个属为花期和果期共有真菌，*Melanopsamma* 等36个属为果期和衰亡期共有真菌，*Stenella* 等23个属为衰亡期和萌芽期共有真菌。

表1 物种注释结果统计

生长时期	优化序列/条	门/个	纲/个	目/个	科/个	属/个
萌芽期	63 660	11	41	91	193	359
花期	92 975	13	46	101	217	367
果期	91 656	12	48	108	224	377
衰亡期	58 997	8	33	75	162	264



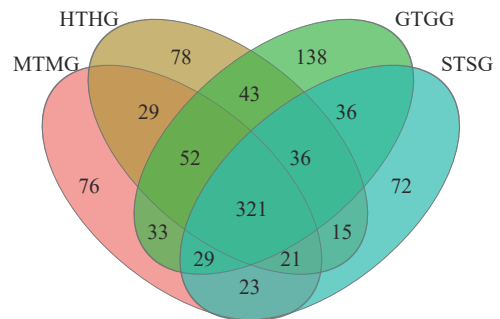
MT. 萌芽期根际土壤; MG. 萌芽期根系; HT. 花期根际土壤; HG. 花期根系; GT. 果期根际土壤; GG. 果期根系; ST. 衰亡期根际土壤; SG. 衰亡期根系。不同字母表示同门或同属不同土壤间差异显著 ($P < 0.05$)。

图3 根际土壤真菌与根系内生真菌在门(A)、属(B)水平下差异显著的类群

Figure 3 The endophytic fungi in rhizosphere soil and root were different at phylum (A) and genus (B) level

从表2可见：果期根系内生真菌的 ACE 指数、Chao 指数、Shannon 指数和 Sobs 指数最高，其次是花期，然后是萌芽期，衰亡期 Alpha 指数最低。意味着果期根系内生真菌多样性和丰富度最高，衰亡期根系内生真菌多样性和丰富度最低。在无距虾脊兰根际土壤真菌中，花期 Alpha 多样性指数高于其他3个时期，果期 ACE 指数、Chao 指数和 Sobs 指数高于萌芽期和衰亡期，萌芽期和衰亡期 Alpha 多样性指数相对一致。综合来讲，花期的根际土壤真菌多样性和丰富度最高，果期次之。

在同一时期中，萌芽期、花期和衰亡期根际土壤真菌的 Alpha 多样性指数均高于根系内生真菌，说明在该时期根际土壤真菌多样性和丰富度高于根



MTMG. 萌芽期根际土壤与根系, HTHG. 花期根际土壤与根系, GTGG. 果期根际土壤与根系, STSG. 衰亡期根际土壤与根系。

图4 属水平不同时期根际土壤真菌与根系内生真菌分布韦恩图

Figure 4 Venn diagram of endophytic fungi distribution in rhizosphere soil and root at genus level at different periods

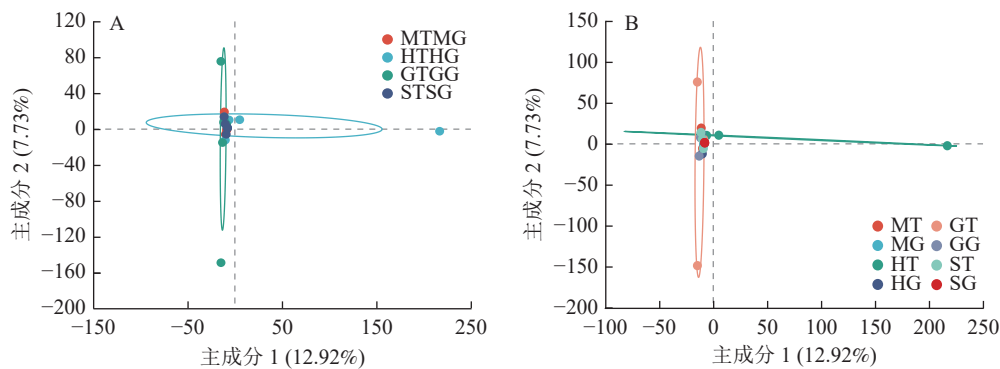
表 2 Alpha 多样性指数

样本	Alpha多样性指数				
	ACE指数	Chao指数	Shannon指数	Sobs指数	Coverage指数
MG	1 983±26 c	1 379±81 ab	3.734±0.522 b	680±104 cd	0.964±0.004 a
HG	4 078±3 043 bc	2 337±50 ab	3.724±1.606 b	987±423 bcd	0.968±0.009 a
GG	8 681±439 ab	4 499±351 ab	4.221±0.501 b	1 342±161 abc	0.926±0.006 b
SG	817±292 c	630±308 b	3.298±0.788 b	210±31 d	0.990±0.005 a
MT	4 642±3 043 bc	3 057±1 539 a	5.042±0.191 a	1 243±322 abc	0.926±0.017 b
HT	12 860±9 858 a	7 178±4 937 a	5.423±0.221 b	1 926±847 a	0.891±0.027 c
GT	6 559±1 695 abc	4 109±826 ab	4.713±1.078 b	1 580±398 ab	0.931±0.017 b
ST	5 182±642 abc	3 323±465 ab	4.713±0.684 b	1 198±229 abc	0.908±0.014 bc

说明：数据均为平均值±标准差。同列不同字母表示同一指数在不同样本间差异显著 ($P<0.05$)。MG. 萌芽期根系；HG. 花期根系；GG. 果期根系；SG. 衰亡期根系；MT. 萌芽期根际土壤；HT. 花期根际土壤；GT. 果期根际土壤；ST. 衰亡期根际土壤。

系内生真菌。果期根系内生真菌 ACE 指数、Chao 指数高于根际土壤真菌，但是根际土壤真菌 Shannon 指数和 Sobs 指数高于根系内生真菌。

为了进一步明确无距虾脊兰不同时期根际土壤真菌和根系内生真菌群落结构的差异，本研究采用主成分分析 (PCA) 分析其真菌群落的相似性和差异性。PCA 结果显示：无距虾脊兰在花期、果期、萌芽期、衰亡期有明显的聚类区分 (图 5A)，主成分 1 解释了差异的 12.92%，主成分 2 解释了差异的 7.73%。其中在主成分 1 轴上花期区分较为明显，主成分 2 轴上果期区分较为明显，萌芽期和衰亡期距离较近，意味着衰亡期和萌芽期根际土壤真菌、根系内生真菌类群相似度高，进一步说明无距虾脊兰根际土壤真菌和根系内生真菌群落在整个生长发育时期存在阶段性差异。由图 5B 可知：4 个时期根系内生真菌相较于根际土壤真菌，距离较近，意味着根际土壤真菌彼此间真菌类群差异较大，其中花期和果期尤为明显。另外，在每个时期中根际土壤与根系之间彼此分开较远，相较于各自内部样品之间两者真菌类群差别较为明显，其中根系样品之间内生真菌类群差别小于根际土壤。



A. 不同时期；B. 不同样本。MGMT. 萌芽期根际土壤与根系；HGHT. 花期根际土壤与根系；GGGT. 果期根际土壤与根系；SGST. 衰亡期根际土壤与根系。MG. 萌芽期根系；HG. 花期根系；GG. 果期根系；SG. 衰亡期根系；MT. 萌芽期根际土壤；HT. 花期根际土壤；GT. 果期根际土壤；ST. 衰亡期根际土壤。

图 5 根际土壤真菌与根系内生真菌群落主成分分析

Figure 5 Principal component analysis of rhizosphere soil fungi and root endophytic fungi

3 讨论

本研究表明：无距虾脊兰根际土壤真菌和根系内生真菌优势菌门均为担子菌门和子囊菌门。根际土壤真菌类群与根系内生真菌类群相互重叠存在一定相似性，说明有一部分根系内生真菌来自根际土壤真菌。推测由于根系与根际土壤长期互相接触，彼此真菌类群相互影响^[19]，且根系对根际土壤真菌具有一定的选择性等原因造成的^[20]。从另一方面来讲，彼此之间也相互独立具有一定差异性，根际土壤真菌群落的丰富度、均匀度以及多样性均高于根系内生真菌。在根际处根系经常与其他根系、土壤微生物互

作,从而导致了根际土壤真菌多样性高于根内真菌。

在根系内生真菌中,真菌多样性和丰富度从萌芽期到果期依次递增,并在果期达到顶峰,衰亡期又急剧下降。而根际土壤真菌类群变化情况却与之相差较大,从萌芽期到花期逐渐增加,在花期达到顶峰后逐渐下降,衰亡期与萌芽期真菌多样性和丰富度变化相对平稳。这与吕立新等^[21]的观点相吻合,夏季真菌多样性高于春季和秋季,随着季节变化,温度、土壤含水量等环境因子相继发生变化,真菌群落结构也随之发生变化。YOKOYA等^[22]在研究兰花时也发现了在雨季分离出的真菌,在旱季不一定出现,而同一类真菌的相对丰度也不尽相同。花期为无距虾脊兰生长初期,此时温度适宜、光线充足,周围伴生植物数量增加,土壤和根际土壤真菌丰富度也相应增加。无距虾脊兰果期为每年的7—9月,此时温度高,周围植物数量相较于花期会有所减少,所以果期根际土壤真菌丰富度少于花期。而根系内生真菌出现上述差异情况可能是从萌芽期到果期,无距虾脊兰生长发育需要大量营养物质持续输入,且夏季温度高,需要增加自身抗逆性,因此根系内生真菌种类和丰富度显著增加并在果期达到顶峰。随着冬季的到来,周围植物逐渐进入休眠期,植被凋落物、土壤微生物的分解等都会使土壤有机质增加,从而促进微生物的生长,造成衰亡期真菌群落丰富度的降低^[23]。

兰科植物在自然状态下无法自主萌发,内生真菌通过向兰科植物传输营养物质,从而促进种子萌发和原球茎的分化^[24]。李孟凯等^[25]用镰孢属菌液处理过的铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 种子胚膨大,种皮有被假根冲破的迹象。内生真菌对兰科植物的促生作用在生长期也有体现。王亚妮^[26]研究发现:接种了内生真菌的铁皮石斛,其鲜质量、移栽成活率相比对照均有所增加;此外,张霞^[27]研究表明:接种内生真菌的铁皮石斛,其抗旱性明显增强。由此可见,内生真菌在兰科植物生长发育过程中的作用不可忽视。本研究显示:无距虾脊兰不同时期优势真菌及相对丰度不同,推测兰科植物在相应生长期会选择对自己生长益处最大的真菌共生。有研究表明:在碳的需求方面,果期需求是花期的2倍^[28],而花期的优势真菌不能满足果期对生长素等方面的需求,所以不同时期优势真菌的相对丰度会随之发生变化,也进一步证实了内生真菌极易受周围环境和生长阶段影响^[29]。

镰孢属和青霉属是兰科植物中常见的内生真菌,在适当的条件下不仅能促进兰科植物种子的萌发和生长发育,还可以有效抑制病原菌的生长。这2种真菌类群在花期和衰亡期属于优势真菌,由此可以推测:镰孢属和青霉属在无距虾脊兰中同样可以促进其生长,并提高其抗病性。庄鑫等^[30]研究不同地点朝鲜淫羊藿 *Epimedium brevicornu* 生长时期内生真菌表明:蜡壳耳属真菌与淫羊藿中黄酮类化学成分含量成正比,证明蜡壳耳属真菌可以促进植物对磷元素的吸收,促进植物生长,同时增强植株抗灰霉病的能力。被孢霉属真菌被证实在生物分解以及土壤养分转化的过程中发挥重要作用^[31]。红菇属曾被认定为菌根真菌,并与多种兰科植物存在共生关系^[32]。上述几类真菌均为无距虾脊兰不同时期的优势真菌,但是这几类优势真菌是否与无距虾脊兰菌根真菌存在共生关系,是否对无距虾脊兰生长发育过程中起促进作用,还需采用石蜡切片观察是否在根细胞中形成菌丝结,并结合共生培养视植株的生长状况而定。然而,另外一些公认的菌根真菌,如胶膜菌科 Tulasnellaceae 在本研究中尚未见到,有研究表明可能与DNA测序区域有关^[33],在后续实验进行高通量测序时可以采取不同的引物。除此之外,可能与植物种类有关,有些真菌广泛存在于多种植物体内,而有些真菌却只与某种特定植物产生共生关系^[34]。

4 结论

研究表明:在不同生长发育时期,无距虾脊兰真菌群落多样性和丰富度存在较大差异。根际土壤真菌多样性高于根系内生真菌,花期根际土壤真菌多样性最高,果期根系内生真菌最丰富。不同时期优势真菌差别较大,萌芽期根际土壤和根系内生优势真菌分别为被孢霉属、红菇属,花期优势真菌分别为青霉属、粗糙孔菌属,果期分别为 *Paraboeremia*、蜡壳耳属,衰亡期分别为 *Paraboeremia*、镰孢属。

5 参考文献

- [1] 蒋雅婷. 无距虾脊兰种子萌发的生理及分子基础研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2019.
JIANG Yating. *Physiological and Molecular Basis of Seed Germination in Calanthe tsoongiana* [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2019.

- [2] VALADARES R B S, PEROTTO S, SANTOS E C, *et al.* Proteome changes in *Oncidium sphacelatum* (Orchidaceae) at different trophic stages of symbiotic germination [J]. *Mycorrhiza*, 2014, **24**(5): 349 – 360.
- [3] 代晓宇. 兰属植物根部内生真菌及其对种子萌发苗木生长的效应[D]. 北京: 北京林业大学, 2011.
DAI Xiaoyu. *The Endophytic Fungi from Wild Cymbidium Plants and Effects on Seed Germination and Seeding Growth* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2011.
- [4] ERCOLE E, ADAMO M, RODDA M, *et al.* Temporal variation in mycorrhizal diversity and carbon and nitrogen stable isotope abundance in the wintergreen meadow orchid *Anacamptis morio* [J]. *New Phytologist*, 2015, **205**(3): 1308 – 1319.
- [5] 唐燕静. 药用石斛种子与菌根真菌共生萌发专一性及其作用机制初探[D]. 北京: 北京协和医学院, 2021.
TANG Yanjing. *Preliminary Study on the Specificity and Mechanism of Symbiotic Germination between Medicinal Dendrobium Seeds and Mycorrhizal Fungi* [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2021.
- [6] 袁仁文, 刘琳, 张蕊, 等. 植物根际分泌物与土壤微生物互作关系的机制研究进展[J]. 中国农学通报, 2020, **36**(2): 26 – 35.
YUAN Renwen, LIU Lin, ZHANG Rui, *et al.* The interaction mechanism between plant rhizosphere secretion and soil microbe: a review [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2020, **36**(2): 26 – 35.
- [7] MENG Yuanyuan, FAN Xuli, ZHOU Lürong, *et al.* Symbiotic fungi undergo a taxonomic and functional bottleneck during orchid seeds germination: a case study on *Dendrobium moniliforme* [J]. *Symbiosis*, 2019, **79**(3): 205 – 212.
- [8] 杨鑫凤, 周雅琴, 谭小明, 等. 青天葵叶斑病原菌的分离鉴定及其生物防治[J]. 北方园艺, 2021(24): 115 – 121.
YANG Xinfeng, ZHOU Yaqin, TAN Xiaoming, *et al.* Isolation and identification of pathogen causing leaf spot disease in *Nervilia fordii* (Hance) Schltr. and its biocontrol [J]. *Northern Horticulture*, 2021(24): 115 – 121.
- [9] EZZI M I, LYNCH J M. Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma* spp. [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, **31**(7): 1042 – 1047.
- [10] 王晓国, 闫海霞, 李秀玲, 等. 带叶兜兰菌根真菌的鉴定及其促生作用[J]. 西南农业学报, 2021, **34**(1): 119 – 125.
WANG Xiaoguo, YAN Haixia, LI Xiuling, *et al.* Identification and growth promoting analysis of mycorrhizal fungi from *Paphiopedilum hirsutissimum* (Orchidaceae) [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2021, **34**(1): 119 – 125.
- [11] WAUD M, WIEGAND T, BRYS R, *et al.* Nonrandom seedling establishment corresponds with distance-dependent decline in mycorrhizal abundance in two terrestrial orchids [J]. *New Phytologist*, 2016, **211**(1): 255 – 264.
- [12] MCCORMICK M K, TAYLOR D L, WHIGHAM D F, *et al.* Germination patterns in three terrestrial orchids relate to abundance of mycorrhizal fungi [J]. *Journal of Ecology*, 2016, **104**(3): 744 – 754.
- [13] VOYRON S, ERCOLE E, GHIGNONE S, *et al.* Fine-scale spatial distribution of orchid mycorrhizal fungi in the soil of host-rich grasslands [J]. *New Phytologist*, 2017, **213**(3): 1428 – 1439.
- [14] JANE O, JOHANNA V, MOHAMMAD B, *et al.* Local-scale spatial structure and community composition of orchid mycorrhizal fungi in semi-natural grasslands [J]. *Mycorrhiza*, 2017, **27**(4): 355 – 367.
- [15] 蒋玉玲, 陈旭辉, 苗青, 等. 辽宁省9种兰科植物根内与根际土壤中真菌群落结构的差异[J]. 植物生态学报, 2019, **43**(12): 1079 – 1090.
JIANG Yuling, CHEN Xuhui, MIAO Qing, *et al.* Difference in fungal communities between in roots and in root-associated soil of nine orchids in Liaoning, China [J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2019, **43**(12): 1079 – 1090.
- [16] 杨霁琴, 满自红. 甘肃省兰科植物虾脊兰属的1种新分布记录种[J]. 甘肃农业大学学报, 2022, **57**(5): 188 – 193.
YANG Jiqin, MAN Zihong. A newly recorded species of *Calanthe* (Orchidaceae) from Gansu Province [J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2022, **57**(5): 188 – 193.
- [17] SUETSUGU K, NAKAHAMA N, ITO A, *et al.* Time-lapse photography reveals the occurrence of unexpected bee-pollination in *Calanthe izuinsularis*, an endangered orchid endemic to the Izu Archipelago [J]. *Journal of Natural History*, 2017, **51**(13/14): 783 – 792.
- [18] 连静静, 钱鑫, 王彩霞, 等. 中国特有植物无距虾脊兰生物学特性及花部形态观察[J]. 植物资源与环境学报, 2013, **22**(3): 100 – 106.
LIAN Jingjing, QIAN Xin, WANG Caixia, *et al.* Observation of biological characteristics and floral morphology of Chinese endemic species *Calanthe tsoongiana* Tang et Wang [J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2013, **22**(3): 100 – 106.
- [19] REN Fei, DONG Wei, YAN Donghui. Organs, cultivars, soil, and fruit properties affect structure of endophytic mycobiota of Pinggu peach trees [J/OL]. *Microorganisms*, 2019, **7**(9): 322 [2023-02-20]. doi: 10.3390/microorganisms7090322.
- [20] 周婕, 苗一方, 方楷, 等. 紫茎泽兰内生真菌及其根际土壤真菌的多样性研究[J]. 生态科学, 2019, **38**(5): 1 – 7.

- ZHOU Jie, MIAO Yifang, FANG Kai, *et al.* Diversity of the endophytic and rhizosphere soil fungi of *Ageratina adenophora* [J]. *Ecological Sciences*, 2019, **38**(5): 1 – 7.
- [21] 吕立新, 王宏伟, 梁雪飞, 等. 不同化学型和季节变化对茅苍术内生真菌群落多样性的影响[J]. *生态学报*, 2014, **34**(24): 7300 – 7310.
- LÜ Lixin, WANG Hongwei, LIANG Xuefei, *et al.* Effects of different chemotypes and seasonal dynamic variation on the species diversity of endophytic fungal communities harbored in *Atractylodes lancea* [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, **34**(24): 7300 – 7310.
- [22] YOKOYA K, ZETTLER L W, BELL J. The diverse assemblage of fungal endophytes from orchids in madagascar linked to abiotic factors and seasonality [J/OL]. *Diversity*, 2021, **13**(2): 96 [2023-02-20]. doi: 10.3390/d13020096.
- [23] 朱琳, 黄建, 陈天阳, 等. 文冠果人工林根际土壤真菌和根系内生真菌群落多样性[J]. *东北林业大学学报*, 2015, **43**(5): 105 – 111.
- ZHU Lin, HUANG Jian, CHEN Tianyang, *et al.* Root-associated and endophytic fungal community diversity in *Xanthoceras sorbifolia* Bunge plantation [J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2015, **43**(5): 105 – 111.
- [24] 罗阳兰. 蕙兰内生真菌多样性及其促生能力的研究[D]. 西安: 陕西理工大学, 2019.
- LUO Yanglan. *Diversity and Growth-Promoting Ability of Endophytic Fungi in Cymbidium faberi* [D]. Xi'an: Shaanxi University of Technology, 2019.
- [25] 李孟凯, 牛昱龙, 杨文娟, 等. 西藏野生兰科植物内生真菌多样性与共生萌发研究[J]. *高原农业*, 2020, **4**(6): 580 – 584.
- LI Mengkai, NIU Yulong, YANG Wenjuan, *et al.* Study on diversity of endophytic fungi in wild Orchidaceae and symbiotic germination in Tibet [J]. *Journal of Plateau Agriculture*, 2020, **4**(6): 580 – 584.
- [26] 王亚妮. 兰科石斛属植物根部内生真菌多样性研究及应用[D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
- WANG Ya' ni. *Diversity and Application of Endophytic Fungi from Roots of Dendrobium (Orchideace)* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2013.
- [27] 张霞. 兰花内生菌对铁皮石斛抗逆性的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2011.
- ZHANG Xia. *Studied on the Resistance of Endophytic Rhizoconia spp. to Dendrobium caudidum* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2011.
- [28] 黄敏, 江标, 高大中, 等. 大黄花虾脊兰内生真菌及土壤真菌的群落特征研究[J]. *生态科学*, 2022, **41**(4): 111 – 119.
- HUANG Min, JIANG Biao, GAO Dazhong, *et al.* Community characteristics of endophytic fungi and soil fungi in the *Calanthe sieboldii* [J]. *Ecological Sciences*, 2022, **41**(4): 111 – 119.
- [29] 周炯, 李勃, 马瑜. 太白山野生桃儿七内生真菌群落组成及多样性[J]. *生物技术*, 2023, **33**(1): 14 – 18.
- ZHOU E, LI Bo, MA Yu. Community composition and diversity characteristics of endophytic fungi isolated from wild *Sinopodophyllum hexandrum* in Taibai Mountain [J]. *Biotechnology*, 2023, **33**(1): 14 – 18.
- [30] 庄鑫, 吴媛, 陈佳雯, 等. 不同地点朝鲜淫羊藿生长时期内生真菌的多样性[J/OL]. *分子植物育种*, 2023-02-06 [2023-02-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230203.1637.002.html>.
- ZHUANG Xin, WU Yuan, CHEN Jiawen, *et al.* Diversity analysis of endophytic fungi during the growth period of *Epimedium korea* in different locations [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2023-02-06 [2023-02-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230203.1637.002.html>.
- [31] 宁琪, 陈林, 李芳, 等. 被孢霉对土壤养分有效性和秸秆降解的影响[J]. *土壤学报*, 2022, **59**(1): 206 – 217.
- NING Qi, CHEN Lin, LI Fang, *et al.* Effects of *Mortierella* on nutrient availability and straw decomposition in soil [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2022, **59**(1): 206 – 217.
- [32] SELOSSE M A, BAUER R, MOYERSOEN B. Basal hymenomycetes belonging to the Sebacinaceae are ectomycorrhizal on temperate deciduous trees [J]. *New Phytologist*, 2002, **155**(1): 183 – 195.
- [33] 蒋胜亮, 石国玺, 毛琳, 等. 不同PCR引物在根系丛枝菌根真菌群落研究中的应用比较[J]. *微生物学报*, 2015, **55**(7): 916 – 925.
- JIANG Shengjing, SHI Guoxi, MAO Lin, *et al.* Comparison of different PCR primers on detecting arbuscular mycorrhizal communities inside plant roots [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, **55**(7): 916 – 925.
- [34] 徐超, 席刚俊, 范克胜, 等. 不同氮源对铁皮石斛菌根真菌生长的影响[J]. *江苏农业科学*, 2013, **41**(4): 236 – 238.
- XU Chao, XI Gangjun, FAN Kesheng, *et al.* Effects of different nitrogen sources on the growth of *Dendrobium officinale* mycorrhizal fungi [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2013, **41**(4): 236 – 238.