



## 两种混合样品策略对揭示杜鹃花根部真菌多样性的影响

黄彩微, 廖映辉, 丁琼\*

海南大学园艺园林学院, 海南 海口 570100

**摘要:** 由于土壤微生物群落物种组成的高度空间异质性, 混合样品(sample pooling)被广泛应用于微生物多样性与群落结构研究。在根部真菌的分子检测中, 样品混合策略以及测序的克隆数或序列数均对揭示真菌群落结构的准确性有影响。【目的】为建立一套能快速准确地反映杜鹃花属植物根部真菌的物种组成与群落结构的分子检测技术平台, 【方法】本研究采集锈红杜鹃和亮鳞杜鹃多份根系样品分别提取DNA, 比较PCR扩增前和扩增后混合策略构建的克隆文库中真菌物种组成的差异。【结果】在2种宿主植物根系中, 多份样品在PCR扩增后混合构建的克隆文库检测到的根部真菌物种丰富度、真菌群落的Shannon-Wiener多样性指数均高于扩增前混合的克隆文库。高频度的根部真菌在2种克隆文库中均检测到, 但低频度的真菌物种组成在2种克隆文库中完全不同。更重要的是, 当采用广泛应用的真菌通用引物ITS1f和ITS4扩增根部真菌ITS序列时, PCR扩增后混合的方法能有效地减轻杜鹃花属植物ITS序列被优先扩增的现象。真菌物种累积曲线显示, 当测序的真菌ITS片段克隆数达到50个左右, 即能较全面地反映2种杜鹃花根部真菌物种组成。【结论】独立扩增多份根系样品DNA, 再将PCR产物混合构建克隆文库的方法能更全面地揭示杜鹃花属植物根部真菌物种丰富度与物种组成。

**关键词:** 杜鹃花, 根部真菌, 样品混合, 分子检测, 物种多样性

杜鹃花科(Ericaceae)植物与土壤真菌形成的根系共生体, 能促进杜鹃花科植物幼苗定居、生长与发育, 进而提高其对恶劣生境的耐受能力<sup>[1-4]</sup>。因此, 研究杜鹃花科植物根部真菌(Root-associated fungi, RAF)的物种组成有助于揭示其环境适应性机制, 对杜鹃花科植物的物种多样性保育与引种栽培有重要意义。以往关于杜鹃花科植物根部真

菌的研究多采用传统的分离培养法, 即通过PDA、MMN、MA等培养基分离培养根部真菌, 然后根据真菌形态学特征鉴定其分类地位<sup>[5-8]</sup>。由于真菌的种类众多、个体多态性明显, 因此传统的分类学指标给真菌的分类鉴定带来了一定的难度; 并且传统的形态分类方法所需时间较长, 依赖真菌繁殖结构的形态特征, 而且常会因为研究者的认

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金(31360107)

\*通信作者。Tel: +86-898-66273591; E-mail: dingqiong@hainu.edu.cn

收稿日期: 2016-08-24; 修回日期: 2016-12-01; 网络出版日期: 2016-12-28

知水平与主观判断差异而影响鉴定的准确性<sup>[9-10]</sup>。此外,有研究表明,大多数 RAF 不能在人工培养基上生长,能培养的 RAF 仅占少数<sup>[11]</sup>。近期应用不依赖于培养的分子生物学技术检测根部真菌发现,担子菌门的部分真菌,如蜡壳耳目真菌能与杜鹃花科植物根系共生,而这类担子菌至今难培养成功<sup>[11-13]</sup>。因此,不依赖于培养的分子检测技术能更快速、准确、且全面地描绘根部真菌群落结构。然而,由于微生物群落结构在空间上的高度异质性,要全面地描述真菌的群落结构需要较大的样本量,这极大地限制了对真菌的生态学特征的研究<sup>[14-15]</sup>。如何从有限的样本量中获得充足的物种组成信息,是真菌群落生态学研究常要面对的问题<sup>[14]</sup>。当前有关微生物群落的研究通常将多个样品混合后(pooled)提取 DNA,再扩增适用于区分物种水平差异 DNA 条形码片段,然后通过构建克隆文库或高通量测序技术来揭示每个混合样品中的物种丰富度、物种组成、群落结构<sup>[16-17]</sup>。因为混合样品减少了 DNA 提取与扩增的数量,这一方法广泛应用于土壤真菌、丛枝菌根真菌、外生菌根真菌、内生真菌的生态学研究<sup>[16,18-20]</sup>。采用混合样品的取样策略是居于如下假设:分子检测技术可以检测到混合样品中的所有真菌;所有真菌在 DNA 提取与扩增环节中机会均等,从而能客观、无偏地反映微生物群落结构。然而,一些研究发现,混合样品的策略将会影响观察到的微生物群落结构<sup>[15,17,21]</sup>。此外,每个样品测序的克隆数或高通量测序的序列数,也是影响真菌群落结构能否被全面反映的重要因素之一<sup>[21]</sup>。我国是世界杜鹃花属植物的分布中心,当前仅有少数研究报道了我国杜鹃花属植物的根部真菌多样性,并且这些研究主要采用传统的分离培养法<sup>[5,7,22]</sup>。建立一套适用于杜鹃花科植物根部真菌多样性研究

的分子检测技术平台,是全面揭示我国杜鹃花属植物根部真菌多样性的基础。本研究以亮鳞杜鹃(*Rhododendron helirolepis*)与锈红杜鹃(*Rhododendron bureavii*)为材料,研究真菌多样性分子检测中样品混合策略、以及测序克隆数对揭示根部真菌多样性的影响,为今后全面开展杜鹃花属植物根部真菌的分子检测提供技术支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集地

样品采集地为我国四川省会理县龙肘山(26° 30'-27° 30' N, 102° 06'-102° 04' E),最高海拔 3580 m,位于四川西南部横断山脉南段,西边邻接金沙江河谷,南边为云贵高原,是几个自然地理区的交界处;此区域还处于中国-日本植物区系与中国-喜马拉雅植物区系的交界线附近,是世界杜鹃花最大的分布中心。山体基本为南北走向,属中亚热带西部半湿润气候区,光热条件丰富,日照时数多(年均日照达 1700 多小时,无霜期达 300 d 左右),蒸发旺盛;雨量集中,干湿季分明(每年的 6-10 月的降雨量可达全年降雨量的 90%左右)。因山体垂直落差大(最大的垂直高差达 2000 m 以上),其气候的垂直变化也很大,山顶气候较为寒冷,冬季常有积雪,年平均气温在 7 °C 左右<sup>[23]</sup>。

### 1.2 根系采集

在杜鹃花群落中,选取亮鳞杜鹃与锈红杜鹃的成年植株,去除地表的枯枝落叶,沿植株的主干追踪到末端发根(hair root)较多的侧根。因为真菌侵染植物根系可能存在空间自相关性,从以主杆为中心点的 8 个不同的方向追踪发根较多的侧根,以最大限度抽检到多样性的 RAF。将从不同

方位追踪到的侧根剪下后抖掉表面附着的土壤, 分别置于装有 75%酒精的 200 mL 离心管常温保存, 带回实验室后置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 直到提取根系 DNA。

### 1.3 真菌分子检测

**1.3.1 DNA 提取:** 将侧根从离心管中取出后, 用流水洗净侧根表面附着的泥土, 最后用无菌水清洗 2 遍。从侧根上不同的方位摘取长约 1 cm 的发根, 共计 20 段, 用去离子水清洗 2 遍, 置于灭过菌滤纸上吸干多余的水分, 转移到 1.5 mL 的离心管中, 每管加入 50  $\mu\text{L}$  CTAB 提取缓冲液(1 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mol/L EDTA pH 8.0, 5 mol/L NaCl, 2% CTAB (*W/V*)), 放置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻 2 h 后取出, 在高通量多样品组织研磨仪(南京先欧仪器制造有限公司, 型号: TS-48)粉碎发根组织, 采用改良的 CTAB 法提取 DNA<sup>[24]</sup>。具体步骤如下: 抽取 650  $\mu\text{L}$  CTAB 提取缓冲液加入装有 DNA 的离心管中,  $65^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h (每 15 min 摇荡 1 次)。取出离心管, 加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1, *V/V*) 后摇匀, 室温下 12000 r/min 离心 8 min, 吸取上清液, 重复操作 1 次, 重取上清。往抽取到的上清液中加入 2 倍体积的冰无水乙醇, 置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中沉淀过夜。将过夜的离心管取出, 室温下 12000 r/min 离心 8 min, 弃上清液, 加 75%乙醇 500  $\mu\text{L}$  润洗 2 次 将沉淀物放入  $60^{\circ}\text{C}$  烘箱烘干, 最后向 DNA 沉淀中加 20  $\mu\text{L}$  的无菌水溶解, 置 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

**1.3.2 ITS 扩增:** 采用 PCR 法扩增真菌的内转录间隔区, 扩增引物为 ITS1f (5'-CTTGGTCATTAG AGGAAGTAA-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT GATATGC-3')。每 25  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系含有: 2.5–25.0 ng 模板 DNA, 1  $\mu\text{L}$  (2.5 mmol/L) dNTPs, 2.5  $\mu\text{L}$  10 $\times$ PCR 缓冲液(TaKaRa, Otsu, Japan),

ITS1f 与 ITS4 引物各 1  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶(TaKaRa, Otsu, Japan)。PCR 反应程序:  $95^{\circ}\text{C}$  5 min;  $94^{\circ}\text{C}$  40 s,  $55^{\circ}\text{C}$  40 s,  $72^{\circ}\text{C}$  55 s; 30 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  10 min。将 ITS-PCR 产物在 0.8%的琼脂糖凝胶上电泳, 用凝胶成像仪观察、拍照。PCR 扩增时采用的 DNA 模板设两种处理: 混合 DNA 与独立 DNA 模板。前者是从提取的 8 份 DNA 中各取 2  $\mu\text{L}$  混合后, 取出 1  $\mu\text{L}$  为模板进行扩增; 后者是从提取的 8 份 DNA 中各取 1  $\mu\text{L}$  分别进行扩增。

**1.3.3 PCR 产物克隆及测序:** 用于构建克隆文库的 PCR 产物有 2 种, 一种是 PCR 扩增前混合 DNA 模板, 另一种是 DNA 模板单独 PCR 扩增后混合 PCR 产物。将 2 种 PCR 产物分别进行电泳后切胶回收, 以回收的 PCR 产物为外源 DNA, 克隆到 pMD19-T Vector (TaKaRa, Otsu, Japan), 在  $16^{\circ}\text{C}$  下连接过夜, 用 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞(TaKaRa, Otsu, Japan)进行转化。从真菌的每个克隆文库中随机挑选 48 个呈白斑的克隆, 用引物 ITS1f 和 ITS4 扩增; PCR 产物在 0.8%的琼脂糖凝胶上电泳检测。电泳检测呈阳性 PCR 产物委托上海生物工程有限公司进行测序。

**1.3.4 生物信息学分析:** 在 Bioedit 软件中对真菌的 ITS1-5.8S-ITS2 全序列进行编辑和比对。ITS 序列一致性(identity) $\geq 97\%$ 的真菌被视为同一个分类单元(Operational Taxonomical Unit, OTU)<sup>[25]</sup>。每个 OTU 的参考序列与 NCBI 数据库中的序列进行比对, 检索与之亲缘关系最近的真菌序列。

### 1.4 数据分析

用软件 Estimate S 9 中提供的 Bootstrap 方法估计宿主植物根部真菌 2 种克隆文库的物种丰富度, 计算 Shannon-weiner 多样性指数, 并用物种累积曲线评估每一种克隆文库中检测的克隆数是

否足以全面地反映克隆文库中的物种丰富度。

## 2 结果和分析

### 2.1 独立与混合 DNA 模板对真菌 ITS-PCR 扩增的影响

锈红杜鹃与亮鳞杜鹃根部真菌 DNA 扩增均得到了长度范围在 600–800 bp 的 ITS 片段。锈红杜鹃毛根的混合 DNA 模板 ITS-PCR 扩增效率较低,电泳检测呈弱阳性,而 8 份独立 DNA 模板中,有 6 份 DNA 模板的 ITS-PCR 扩增效率较高,有 2 份 DNA 模板扩增效率较低,获得的 PCR 产物量浓度较低。在亮鳞杜鹃中,混合与单个 DNA 模板扩增的差异不明显,PCR 产物电泳检测均呈强阳性(图 1)。

### 2.2 两种杜鹃花不同混合克隆文库的阳性克隆比较

亮鳞杜鹃 2 种克隆文库的阳性克隆所占比例都高达 95%左右。锈红杜鹃 PCR 扩增后混合样品克隆文库的阳性克隆比例有 85%,高于 PCR 扩增前混合的克隆文库 69%(表 1)。2 种克隆文库检测

到的 ITS 片段长度均在 600–800 bp 之间,且 2 种杜鹃属植物的根系共生体的 ITS 片段长度多态性在 PCR 扩增后混合的克隆文库中均高于 PCR 扩增前混合样品克隆文库(图 2)。

### 2.3 PCR 扩增前与 PCR 扩增后 2 种混合策略克隆文库的共生真菌多样性比较

从锈红杜鹃与亮鳞杜鹃根系的 ITS 片段的 2 种克隆文库中共挑出 192 个呈白斑的克隆,PCR 检测呈阳性的 169 个,经测序及序列分析,最终划分成 21 个 OTUs,其中有 2 个 OTUs 为宿主植物序列(表 1)。在 19 个真菌 OTUs 中,锈红杜鹃根部真菌的 PCR 扩增前与扩增后 2 种混合克隆文库分别检测到的真菌物种数为 6 和 7 种;香农维纳指数(Shannon-Wiener index)分别为 1.49 和 1.83。而亮鳞杜鹃根系的 PCR 扩增前混合样品的克隆文库中只检测到 2 种真菌,丰富度远远小于扩增后混合样品的克隆文库检测到的 8 种真菌,且 PCR 扩增前混合样品的克隆文库 Shannon-Wiener index 为 2.45,而扩增后混合克隆文库只有 0.23(图 3)。从锈红杜鹃根系中检测到的根部真菌中,频度最高的 2 种真菌在 2 种不同混合策略构建的克

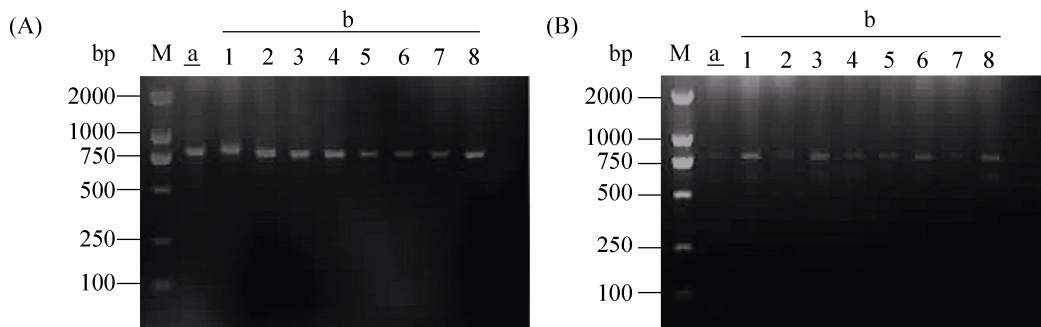


图 1. 杜鹃花根系多份 DNA 混合与不混合的 PCR 扩增真菌 ITS 序列产物的电泳比较

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of ITS-PCR products obtained from amplification of pooled and unpooled multiple DNA extractions of root-associated fungi of *Rhododendron* plants. Capital letters A and B represent *R. helirolepis* and *R. bureavii*, respectively; M: DL2000 DNA marker; a: pooled sample; b, 1–8: unpooled sample.

表 1. 亮鳞杜鹃和锈红杜鹃根部真菌 ITS 序列与 GenBank 数据库最相似的序列, 以及各种真菌在采用 PCR 扩增前与 PCR 扩增后混合策略构建的克隆文库中检测到的序列数

Table 1. Phylogenetic affinity of *Rhododendron* root-associated fungi inferred from closest matches of ITS sequences of GenBank database, and a comparison of the number of sequences of fungi detected in clone libraries constructed by prior to PCR and post PCR pooling of samples

OTU	Name	Closest BLAST match	Identity	GenBank accession No.	No. of clones			
					<i>R. bureavii</i>		<i>R. heliolepis</i>	
					Prior to PCR pooling	Post PCR pooling	Prior to PCR pooling	Post PCR pooling
1	Ascomycota sp1	Ascomycota sp. (HF947897)	393/463 (85%)	KX765310	2	0	0	0
2	Ascomycota sp2	Ascomycota sp. (JQ272357)	484/519 (93%)	KX765311	3	3	0	0
3	Ascomycota sp3	<i>Talaromyces emodensis</i> (NR_137077)	173/188 (92%)	KX765312	0	4	0	0
4	Basidiomycota sp.	Basidiomycota sp. (KF385378)	419/445 (94%)	KX765313	1	0	0	0
5	Dothideomycetes sp.	Dothideomycetes sp. (JQ347004)	478/482 (99%)	KX765314	0	0	0	1
6	Helotiales sp1	Helotiales sp. (FJ827178)	550/553 (99%)	KX765315	0	0	0	3
7	Helotiales sp2	Helotiales sp. (HF947858)	334/379 (88%)	KX765316	0	5	0	0
8	Helotiales sp3	Helotiales sp. (LC131016)	518/527 (98%)	KX765317	5	14	0	0
9	<i>Hyaloscypha daedaleae</i>	<i>Hyaloscypha daedaleae</i> (AY789416)	465/481 (97%)	KX765318	4	0	0	0
10	Hyaloscyphaceae sp.	Hyaloscyphaceae sp. (GU393951)	491/510 (96%)	KX765319	0	1	0	0
11	<i>Lachnum</i> sp.	<i>Lachnum</i> sp. (FJ440910)	501/509 (98%)	KX765320	0	0	0	4
12	Leotiaceae sp.	<i>Pezoloma ericae</i> (JQ272407)	452/476 (95%)	KX765321	0	1	0	0
13	Leotiomyces sp.	Leotiomyces sp. (HM230865)	504/506 (99%)	KX765322	0	0	0	3
14	<i>Mycena alnetorum</i>	<i>Mycena alnetorum</i> (JF908426)	634/647 (98%)	KX765323	0	0	0	2
15	<i>Oidiodendron</i> sp.	<i>Oidiodendron</i> sp. (JQ272359)	505/512 (99%)	KX765324	0	2	0	0
16	<i>Phialocephala fortinii</i>	<i>Phialocephala fortinii</i> (JQ272457)	502/518 (97%)	KX765325	0	0	1	8
17	Sebacinaceae sp.	<i>Sebacina</i> sp. (JQ420967)	584/624 (94%)	KX765326	0	0	0	8
18	Sebacinales sp.	Sebacinales sp. (EF127237)	620/627 (99%)	KX765327	0	0	1	13
19	Xenasmataceae sp.	Xenasmataceae sp. (JQ272394)	552/577 (96%)	KX765328	4	0	0	0
20	<i>Rhododendron bureavii</i>	<i>Rhododendron bureavii</i> (JF978214)	627/627 (100%)	KX765329	14	13	0	0
21	<i>Rhododendron heliolepis</i>	<i>Rhododendron heliolepis</i> (KM605838)	688/688 (100%)	KX765330	0	0	44	5
Total		Positive clones/False positive clones			33/15	43/5	46/2	47/1

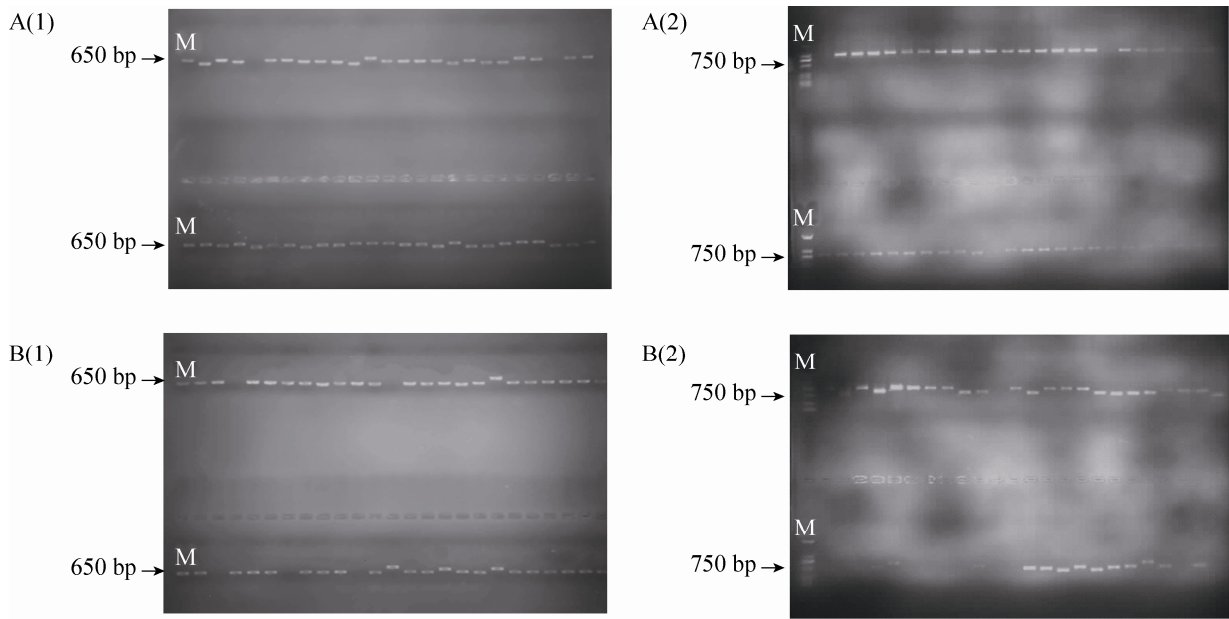


图 2. PCR 扩增前与 PCR 扩增后混合样品构建的克隆文库 ITS 片段长度多态性

Figure 2. Fragment length polymorphism of PCR amplifications of fungal ITS region of clone libraries constructed by post PCR pooling of multiple DNA extractions of replicate root samples and prior to PCR pooling replicates. Capital letters A and B represent *R. heliolepis* and *R. bureavii*, respectively; M: DL2000 DNA marker; 1: post PCR pooling replicates; 2: prior to PCR pooling replicates.

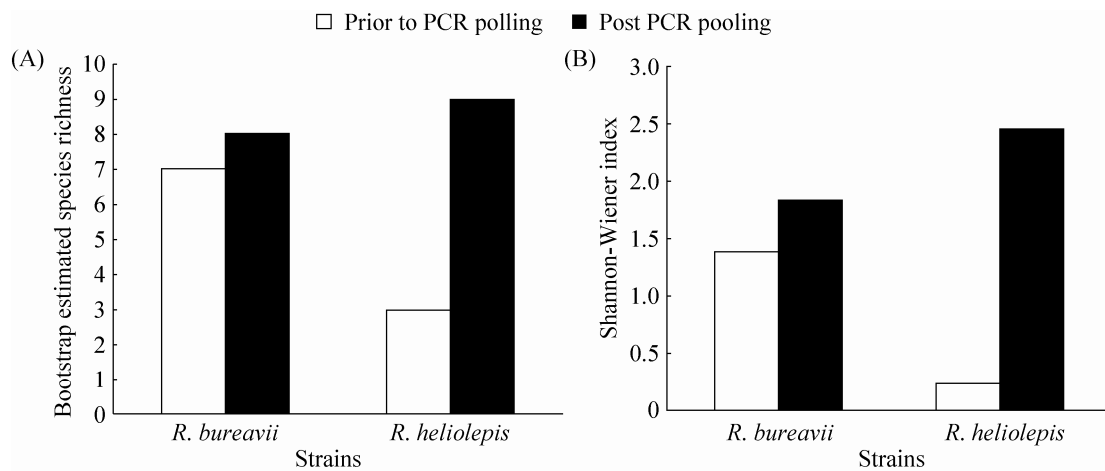


图 3. 采用 PCR 扩增前与 PCR 扩增后混合策略构建的克隆文库检测到的根部真菌物种丰富度与多样性比较

Figure 3. Comparison of the effects of prior to PCR and post PCR pooling strategies in affecting the Bootstrap estimated species richness (A) and diversity (B) of root associated fungal clone libraries of *R. bureavii* and *R. heliolepis*.

隆文库中均被检测到，而频度相对较低的真菌只出现在其中的一个克隆文库中；相似地，亮鳞杜鹃根系共生菌中，被高频检测到的 2 种真菌同时

出现在 2 种混合策略构建的克隆文库，而低频真菌只出现在 PCR 扩增后混合样品的克隆文库中 (表 1)。

### 2.4 PCR 扩增前与 PCR 扩增后混合策略对引物 ITS1f 与 ITS4 扩增 ITS 片段影响

序列分析的结果表明 :当采用根系-真菌共生体提取的总 DNA 为模板时, 真菌特异性引物 ITS1f 与 ITS4 能同时扩增宿主植物与真菌的 ITS 区。然而不同的样品混合策略会影响真菌及植物 ITS 序列与引物的竞争性结合。从 PCR 扩增后混

合样品克隆文库中检测到真菌的 ITS 片段相对于植物的比值(2.30)远高于 PCR 扩增前混合样品的克隆文库(1.36)。对亮鳞杜鹃而言, PCR 扩增后混合策略检测到的真菌 ITS 序列数是植物序列数的 8.4 倍, 而 PCR 扩增前混合策略中真菌的 ITS 序列数远低于植物的序列数, 二者比值仅有 0.05 (图 4)。

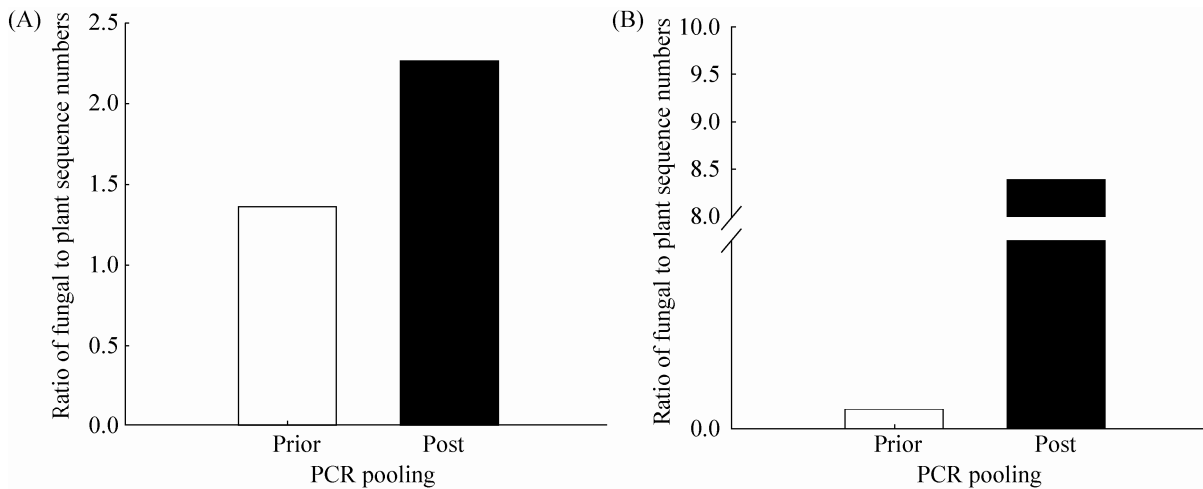


图 4. PCR 扩增前与 PCR 扩增后混合策略对引物 ITS1f 与 ITS4 扩增到的真菌与植物 ITS 序列数比值的影响  
Figure 4. Effect of prior to PCR and post PCR pooling of samples on the ratio of fungal to plant sequence numbers when primers ITS1f and ITS4 were used. A: *R. bureavii*; B: *R. heliopsis*.

### 2.5 根系 ITS 片段的物种累积曲线

2 种杜鹃花根系 DNA 不同混合样品克隆文库的 ITS 片段物种累积曲线显示, 随着检测的 ITS 片段克隆数增加, 被检测到的物种数增加。然而, 在锈红杜鹃的 2 种克隆文库以及亮鳞杜鹃的 PCR 扩增后混合样品的克隆文库中, 当检测的 ITS 片段克隆数达到 30 个以上, 物种数增加的趋势减缓。而亮鳞杜鹃 PCR 扩增前混合样品克隆文库中, 当检测的 ITS 片段克隆数达到 3 个以上, 物种数增加的趋势变平缓。可见, 本研究检测 48 个真菌克隆, 已能够较全面地反映 2 种杜鹃花根系 DNA 不同克隆文库的物种组成(图 5)。

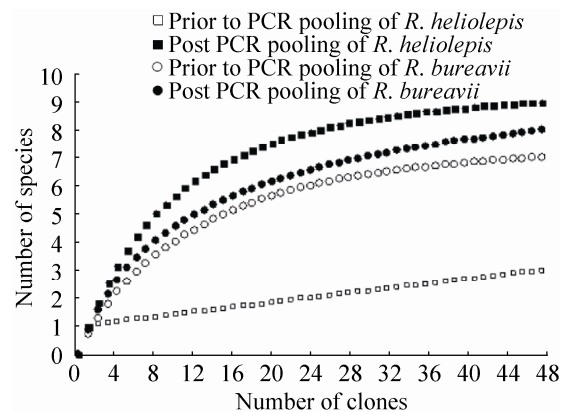


图 5. 两种混合样品策略构建的杜鹃花根部真菌克隆文库的物种累积曲线  
Figure 5. Accumulation curves of *Rhododendron* root-associated fungal species of clone libraries constructed by two pooling strategies.

### 3 讨论

微生物群落生态学研究, 由于微生物在空间分布上的高度异质性, 需要采集大量样品才能全面反映微生物群落的物种丰富度与多样性。为了减少需要处理的样品数, 混合样本的方法被普遍用于微生物如土壤真菌、丛枝与外生菌根真菌、内生真菌多样性检测<sup>[16,18-20]</sup>。然而应用传统与二代测序技术的群落生态学研究结果均表明, 分子生态学研究混合样品法对揭示微生物群落结构存在偏差<sup>[15,17,21]</sup>。目前尚未有关于混合样品是否会影晌杜鹃花属植物根部真菌群落物种组成的报道。本研究以锈红杜鹃与亮鳞杜鹃根系为材料, 比较了 PCR 扩增前与扩增后 2 种混合策略、以及检测的克隆数对揭示根部真菌群落物种组成的影响。结果表明, 对 2 种杜鹃花宿主植物而言, 独立扩增多份根系共生体的 DNA 后再将 PCR 产物混合构建克隆文库的方法检测到的根部真菌物种丰富度、共生真菌群落的 Shannon-Wiener 多样性指数均高于 PCR 扩增前混合样品的克隆文库。Avis 等用已知的真菌构建人工群落来研究样品的不同混合策略对揭示真菌群落物种组成的影响, 发现观察到的真菌物种丰富度、物种组成随样品混合方式不同而存在差异<sup>[15]</sup>。我们的研究结果表明, 在锈红杜鹃与亮鳞杜鹃根系中被高频检测到的真菌种类在 2 种克隆文库中均检测到, 如 *Helotiales* sp3 (OTU8) 和 *Phialocephala fortinii* (OTU16), 但是低频度检测到的真菌物种组成在两种克隆文库中不同, 如 *Helotiales* sp2 (OTU7) 与 *Dothideomycetes* sp. (OTU5) 等 11 种真菌只出现 PCR 扩增后混合样品克隆文库中, 而 *Ascomycota* sp1 (OTU1) 与 *Hyaloscyphaceae* sp. (OTU10) 等 4 种真菌只出现在 PCR 扩增前混合样品的克隆文库中。这一结果可能是因为 PCR 扩增前混合样品的

方法降低了一些真菌(尤其是低频度的真菌)的 DNA 模板浓度, 在 PCR 过程中, 各种真菌的 DNA 模板与引物非对等的竞争性结合, 高浓度的优势真菌更容易与引物相结合而被检测出来, 而 DNA 浓度相对较低的真菌与引物结合处于竞争性弱势而被掩盖, 导致揭示的真菌群落物种丰富度较低。因此, 独立扩增多份根系 DNA 后, 再将 PCR 产物混合构建克隆文库的方法容易检测到更多的偶见种真菌, 更能全面地反映杜鹃花属植物根部真菌物种丰富度与物种组成。此外, 本研究发现, 2 种混合策略的克隆文库均检测到杜鹃花植物的 ITS 序列。真菌通用引物 ITS1f 与 ITS4 常用于环境样品的真菌群落物种多样性、群落结构研究<sup>[24,26]</sup>。虽然对于裸子植物的根系共生体而言, 这对引物能优先扩增真菌的 ITS 序列, 而在被子植物根系共生体中, ITS1f 与 ITS4 引物可能会同时扩增植物与真菌的 ITS 序列<sup>[24]</sup>。本研究结果也表明, 当采用杜鹃花属植物的根系-真菌共生体提取的总 DNA 为模板时, 真菌特异性引物 ITS1f 与 ITS4 能同时扩增宿主植物与真菌的 ITS 区。此外本研究发现, 将多个不同的 DNA 样品混合后, 进行 PCR 再测序的方法会过多地增加植物的扩增子, 而减少真菌的扩增子。这一现象可能是由于 PCR 前混合样品使一些真菌与植物的核酸相对浓度降低, 因而优先扩增植物序列。假设在同一植株的 4 个(本研究是 8 个)不同的位置( $a, b, c, d$ )采集侧根, 在每份侧根提取的总 DNA 中, 假设植物核酸浓度为  $N_p$ , 真菌核酸浓度在 4 份样品中分别为:  $N_{fa}$ 、 $N_{fb}$ 、 $N_{fc}$ 、 $N_{fd}$ , 其中  $N$  代表核酸(Nuclear acid),  $f$  代表真菌(fungi),  $P$  代表植物(Plant)。因此, 在扩增前不混合的样品中, 植物与真菌的核酸浓度可以表达为如下公式:  $N_p+N_{fa}$ , 或  $N_p+N_{fb}$ , 或  $N_p+N_{fc}$ , 或  $N_p+N_{fd}$ , 而当 PCR 扩增前混合 4 份毛根的总 DNA 时, 植物与真菌的核酸浓度可以用如下公式计算:



$(N_p+N_{fa}+N_p+N_{fb}+N_p+N_{fc}+N_p+N_{fd})/4=N_p+N_{fa}/4+N_{fb}/4+N_{fc}/4+N_{fd}/4$ , 可以看出, 在 2 种混合样品策略中, 植物的核酸浓度基本不变, 而在扩增前混合的 PCR 体系中, 每种真菌的浓度只有原浓度的 1/4。由于 PCR 前混合样品使每种真菌与植物的核酸相对浓度降低, 因而优先扩增植物序列。因此, 诸如杜鹃花属之类的被子植物根部真菌研究中, 有必要采用独立扩增多份根系 DNA 模板后再将 PCR 产物进行混合, 可以避免每份样品中特定类群真菌 DNA 的相对浓度降低, 从而提高各类真菌的 DNA 模板与引物结合的概率。

此外, 每个样品测序的克隆数或高通量测序的序列数, 也是影响真菌群落结构能否被全面反映的重要因素之一<sup>[27]</sup>。Avis 等检测了由已知的 2–20 种真菌混合后构建的人工群落, 结果表明测序的真菌克隆数达 92 个时, 能检测到人工群落中的 90%左右的物种, 而当测序 32 个克隆时只能检测到 40%的物种<sup>[15]</sup>。本研究的锈红杜鹃与亮鳞杜鹃根部真菌的物种累积曲线表明, 检测 50 个左右的真菌克隆已能够较全面地反映 2 种杜鹃花属植物根部真菌克隆文库的物种组成。值得注意的是, 本研究中 2 种杜鹃花的根部真菌克隆文库的物种组成相似性极低, 没有共有的真菌。因此, 多样性的宿主植物可能是共生真菌多样性的重要驱动因子之一, 更广泛地开展杜鹃花属植物根部真菌分子检测, 才能全面反映其共生真菌多样性。本研究建立的适用于杜鹃花科植物根部真菌多样性研究的分子检测技术平台, 为全面揭示我国杜鹃花属植物根部真菌多样性奠定基础。

## 致谢

感谢美国佛罗里达国际大学的刘虹教授对本稿的英文摘要作了全面细致的校对与修改。

## 参考文献

- [1] Read DJ. The structure and function of the ericoid mycorrhizal root. *Annals of Botany*, 1996, 77(4): 365–374.
- [2] Pearson V, Read DJ. The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. II. The transport of carbon and phosphorus by the endophyte and the mycorrhiza. *New Phytologist*, 1973, 72(6): 1325–1331.
- [3] Cairney JWG, Meharg AA. Ericoid mycorrhiza: a partnership that exploits harsh edaphic conditions. *European Journal of Soil Science*, 2003, 54(4): 735–740.
- [4] Read DJ, Leake JR, Perez-Moreno J. Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. *Canadian Journal of Botany*, 2004, 82(8): 1243–1263.
- [5] Liu ZH, Li LB, Dong FP, Yao N. Isolation and identification of mycorrhizal fungi from *Rhododendron hippophaeoides* and application of DGGE. *Hunan Forestry Science & Technology*, 2012, 39(4): 16–20. (in Chinese)  
刘振华, 李潞滨, 董方平, 姚娜. 灰背杜鹃菌根真菌的分离与鉴定及 DGGE 的应用. *湖南林业科技*, 2012, 39(4): 16–20.
- [6] Allen TR, Millar T, Berch SM, Berbee ML. Culturing and direct DNA extraction find different fungi from the same ericoid mycorrhizal roots. *New Phytologist*, 2003, 160(1): 255–272.
- [7] Chen Z, Yang B, Zhang CY, Yu SJ, Luo QQ. Molecular analysis and inoculation effect of mycorrhizal fungi isolated from hair roots of *Rhododendron pulchrum*. *Mycosystema*, 2011, 30(5): 729–737. (in Chinese)  
陈真, 杨兵, 张春英, 郁书君, 罗卿权. 锦绣杜鹃菌根真菌 rDNA ITS 序列分析及接种效应研究. *菌物学报*, 2011, 30(5): 729–737.
- [8] Obase K, Matsuda Y. Culturable fungal endophytes in roots of *Enkianthus campanulatus* (Ericaceae). *Mycorrhiza*, 2014, 24(8): 635–644.
- [9] Zhang Y, Guo LD. Progress of fungal DNA barcode. *Mycosystema*, 2012, 31(6): 809–820. (in Chinese)  
张宇, 郭良栋. 真菌 DNA 条形码研究进展. *菌物学报*, 2012, 31(6): 809–820.
- [10] Zhou JL, Zhao RL. Advances on DNA barcoding in fungi. *Microbiology China*, 2013, 40(8): 1468–1477. (in Chinese)  
周均亮, 赵瑞琳. 真菌 DNA 条形码技术研究进展. *微生物学通报*, 2013, 40(8): 1468–1477.
- [11] Bruzone MC, Fontenla SB, Vohnik M. Is the prominent

- ericoid mycorrhizal fungus *Rhizoscyphus ericae* absent in the Southern Hemisphere's Ericaceae? A case study on the diversity of root mycobionts in *Gaultheria* spp. from northwest Patagonia, Argentina. *Mycorrhiza*, 2015, 25(1): 25–40.
- [12] Zheng Y, Gao B, Sun LF, Bing YH, Pei KQ. Diversity of fungi associated with *Rhododendron argyrophyllum* and *R. floribundum* hair roots in Sichuan, China. *Biodiversity Science*, 2010, 18(1): 76–82. (in Chinese)  
郑钰, 高博, 孙立夫, 邴艳红, 裴克全. 银叶杜鹃和繁花杜鹃根部真菌的多样性. *生物多样性*, 2010, 18(1): 76–82.
- [13] Selosse MA, Setaro S, Glatard F, Richard F, Urcelay C, Weiß M. Sebacinaleae are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytologist*, 2007, 174(4): 864–878.
- [14] Burke DJ, Martin KJ, Rygielwicz PT, Topa MA. Ectomycorrhizal fungi identification in single and pooled root samples: terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) and morphotyping compared. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(9): 1683–1694.
- [15] Avis PG, Branco S, Tang Y, Mueller GM. Pooled samples bias fungal community descriptions. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10(1): 135–141.
- [16] Appoloni S, Lekberg Y, Tercek MT, Zabinski CA, Redecker D. Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of geothermal soils in Yellowstone National Park (USA). *Microbial Ecology*, 2008, 56(4): 649–659.
- [17] Engel M, Behnke A, Bauerfeld S, Bauer C, Buschbaum C, Volkenborn N, Stoeck T. Sample pooling obscures diversity patterns in intertidal ciliate community composition and structure. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 79(3): 741–750.
- [18] Waldrop MP, Zak DR, Blackwood CB, Curtis CD, Tilman D. Resource availability controls fungal diversity across a plant diversity gradient. *Ecology Letters*, 2006, 9(10): 1127–1135.
- [19] Smith ME, Douhan GW, Rizzo DM. Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. *New Phytologist*, 2007, 174(4): 847–863.
- [20] Pan JJ, Baumgarten AM, May G. Effects of host plant environment and *Ustilago maydis* infection on the fungal endophyte community of maize (*Zea mays*). *New Phytologist*, 2008, 178(1): 147–156.
- [21] Anderson EC, Skaug HJ, Barshis DJ. Next-generation sequencing for molecular ecology: a caveat regarding pooled samples. *Molecular Ecology*, 2014, 23(3): 502–512.
- [22] Yang B, Zhang CY, Wang X, Yin LJ. Survey on resources of root-associated fungal endophytes in *Rhododendron* cv. and analysis on its diversity. *Journal of Henan Agricultural University*, 2010, 44(3): 290–294. (in Chinese)  
杨兵, 张春英, 王献, 尹丽娟. 杜鹃花根系内生菌资源调查及多样性分析. *河南农业大学学报*, 2010, 44(3): 290–294.
- [23] Tu WG. Floristic and biodiversity studies of vascular plants in the west slope of Mt. Jiuding and Mt. Longzhou, western Sichuan, China. Doctoral Dissertation of Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, 2008. (in Chinese)  
涂卫国. 四川九顶山西坡及龙肘山维管植物区系和植物多样性研究. 中国科学院成都生物研究所博士学位论文, 2008.
- [24] Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 1993, 2(2): 113–118.
- [25] Vincenot L, Tedersoo L, Richard F, Horcine H, Kõljalg U, Selosse MA. Fungal associates of *Pyrola rotundifolia*, a mixotrophic Ericaceae, from two Estonian boreal forests. *Mycorrhiza*, 2008, 19(1): 15–25.
- [26] Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(16): 6241–6246.
- [27] Taylor DL, Herriott IC, Long J, O'Neill K. TOPO TA is A-OK: a test of phylogenetic bias in fungal environmental clone library construction. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(5): 1329–1334.

## Two sample pooling strategies revealed different root-associated fungal diversity of *Rhododendron* species

Caiwei Huang, Yinghui Liao, Qiong Ding\*

College of Horticulture and Landscape Architecture, Hainan University, Haikou 570100, Hainan Province, China

**Abstract:** [Objective] Pooling of multiple samples is widely used in studying general patterns of microbial communities that are heterogeneously structured in space. Pooling strategies and the number of sequence reads generate biases in the description of diversity and community structure of root-associated fungi. Therefore, we developed a molecular toolbox for fast and accurate identification of the root-associated fungal community of *Rhododendron* species. [Methods] Multiple root samples of *R. lutescens* and *R. bureavii* were collected for DNA extraction. Effects of two different pooling strategies, i.e. pooling samples prior to vs. post PCR, on fungal species composition were studied by comparing results within host species. [Results] Species richness and Shannon-Wiener index of fungal communities of clone library constructed by pooling samples after PCR were higher than that of pooling prior to PCR. High frequency fungal species were detected by both pooling strategies, whereas infrequent species detected by the two strategies differed. Notably, the prior to PCR pooling strategy effectively alleviated the unwanted amplification of host plant sequences when fungal specific primer ITS1f and ITS4 were used. Accumulation curves of fungal species suggested that sequencing at least 50 clones can fully reflect species composition of clone library of the two *Rhododendron* root-associated fungal community. [Conclusion] Clone library constructed by post PCR pooling of samples is better in providing accurate views of fungal diversity and community structure of *Rhododendron* species.

**Keywords:** *Rhododendron*, root-associated fungi, sample pooling, molecular identification, species diversity

(本文责编: 李磊)

---

Supported by the Fund for Less Developed Regions of the National Natural Science Foundation of China (31360107)

\*Corresponding author. Tel: +86-898-66273591; E-mail: dingqiong@hainu.edu.cn

Received: 24 August 2016; Revised: 1 December 2016; Published online: 28 December 2016