# 基于根际土壤真菌和代谢物的 广东梧桐山金线兰垂直分布驱动因子分析

李文华<sup>1</sup>,李 健<sup>2a,2b</sup>,罗 菁<sup>1</sup>,李素珍<sup>2a,2b</sup>,叶丽敏<sup>1</sup>,曾振平<sup>1</sup>,陈建兵<sup>2a,2b</sup>,王美娜<sup>2a,2b,①</sup>

[1. 深圳市梧桐山风景区管理处,广东 深圳 518004; 2. 深圳市兰科植物保护研究中心(全国兰科植物种质资源保护中心):

a. 深圳市濒危兰科植物保护与利用重点实验室, b. 兰科植物保护与利用国家林业和草原局重点实验室, 广东 深圳 518114]

摘要:采用高通量测序和非靶向代谢组学技术,对广东梧桐山金线兰[Anoectochilus roxburghii (Wall.) Lindl.]核心 分布区根际土壤和非分布区土壤中真菌和代谢物进行研究。结果显示:海拔 875 m 的金线兰核心分布区根际土壤 中注释到 15 门 401 科 905 属真菌,海拔 775 m 金线兰非分布区土壤中注释到 13 门 385 科 860 属真菌,海拔 675 m 金线兰非分布区土壤中注释到 15 门 407 科 890 属真菌。金线兰核心分布区根际土壤与非分布区土壤真菌群落的 物种丰富度和均匀度无显著差异,但群落结构与物种组成差异显著。除未知菌属外,金线兰核心分布区根际土壤 中绿僵菌属(Metarhizium Sorokīn)、隔指孢属(Dactylella Grove)、被孢霉属(Mortierella Coem.)、酵母属(Saccharomyces Meyen ex E. C. Hansen)、树粉孢属(Oidiodendron Robak)、粗糙孔菌属(Trechispora P. Karst.)和 Pseudophacidium P. Karst.的相对丰度高于金线兰非分布区土壤。共发生网络分析结果显示:绿僵菌属、青霉属(Penicillium Link)和弯 颈霉属(Tolypocladium W. Gams)对维持金线兰核心分布区根际土壤真菌群落的结构和功能可能具有重要作用。金 线兰核心分布区根际土壤和非分布区土壤中得到1886种代谢物,正离子模式鉴定到1089种代谢物,其中561种 代谢物得到注释;负离子模式鉴定到935种代谢物,其中528种代谢物得到注释。金线兰核心分布区根际土壤中显 著上调的差异代谢物主要有 N6,N6,N6-三甲基-L-赖氨酸、茯苓酸、14,15-脱氢萜烯酸、3-异丙基苹果酸、4-胆甾 烯-3-酮、乙酸香茅酯和正癸酸,这些差异代谢物富集的代谢通路主要与氨基酸和脂质代谢有关,可为金线兰及其 菌根真菌提供碳源和氮源。相关性分析结果显示:金线兰核心分布区根际土壤显著差异代谢物含量与主要菌属相 对丰度存在密切的正相关作用。综上表明:金线兰根际土壤中非菌根真菌与菌根真菌间存在密切的相互作用,并 通过碳源、氮源的营养流动影响金线兰的生长发育,进而驱动其垂直分布。

关键词: 金线兰; 土壤真菌; 土壤代谢物; 相关性分析

中图分类号: Q949.71<sup>+</sup>8.43; S154.36 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2024)05-0045-17 DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2024.05.05

Analysis on driving factors for the vertical distribution of *Anoectochilus roxburghii* in Wutong Mountain of Guangdong Province based on fungi and metabolites in rhizosphere soil LI Wenhua<sup>1</sup>, LI Jian<sup>2a,2b</sup>, LUO Jing<sup>1</sup>, LI Suzhen<sup>2a,2b</sup>, YE Limin<sup>1</sup>, ZENG Zhenping<sup>1</sup>, CHEN Jianbing<sup>2a,2b</sup>, WANG Meina<sup>2a,2b,①</sup> (1. Administrative Office of Wutong Mountain National Scenic Area, Shenzhen 518004, China; 2. The Orchid Conservation & Research Center of Shenzhen and the National Orchid Conservation Center of China: a. Shenzhen Key Laboratory for Orchid Conservation and Utilization, b. Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration for Orchid Conservation and Utilization, Shenzhen 518114, China), *J. Plant Resour.* & Environ., 2024, 33(5): 45-61

Abstract: The fungi and metabolites between rhizosphere soil of core distribution area and soil of non-

收稿日期: 2023-04-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(32001245); 深圳市科技计划项目-可持续发展科技专项(KCXFZ20211020164200001)

作者简介:李文华(1970—),男,广东惠阳人,本科,高级工程师,主要从事森林抚育、资源管理和园林绿化等工作。

<sup>&</sup>lt;sup>①</sup>通信作者 E-mail: snow-wmn2005@163.com

**引用格式:**李文华,李 健,罗 菁,等.基于根际土壤真菌和代谢物的广东梧桐山金线兰垂直分布驱动因子分析[J].植物资源与环境学报,2024,33(5):45-61.

distribution area of Anoectochilus roxburghii (Wall.) Lindl. in Wutong Mountain of Guangdong Province were studied by the high-throughput sequencing and non-targeted metabolomics technologies. The results show that 905 genera of fungi in 401 families of 15 phyla are annotated from rhizosphere soil of core distribution area of A. roxburghii at an altitude of 875 m, 860 genera of fungi in 385 families of 13 phyla are annotated from soil of non-distribution area of A. roxburghii at an altitude of 775 m, and 890 genera of fungi in 407 families of 15 phyla are annotated from soil of non-distribution area of A. roxburghii at an altitude of 675 m. There are no significant differences in species richness and evenness of fungal communities between rhizosphere soil of core distribution area and soil of non-distribution area of A. roxburghii, but there are significant differences in community structure and species composition. Except for unknown fungal genera, the relative abundances of Metarhizium Sorokīn, Dactylella Grove, Mortierella Coem., Saccharomyces Meyen ex E. C. Hansen, Oidiodendron Robak, Trechispora P. Karst., and Pseudophacidium P. Karst. in rhizosphere soil of core distribution area of A. roxburghii are higher than those in soil of non-distribution area of A. roxburghii. The co-occurrence network analysis result shows that Metarhizium, Penicillium Link, and Tolypocladium W. Gams may play important roles in maintaining the structure and function of the fungal community in rhizosphere soil of core distribution area of A. roxburghii. A total of 1 886 metabolites are obtained from rhizosphere soil of core distribution area and soil of non-distribution area of A. roxburghii, and 1 089 metabolites are identified by positive ion mode, among which 561 metabolites are annotated; 935 metabolites are identified by negative ion mode, among which 528 metabolites are annotated. The significantly up-regulated differential metabolites in rhizosphere soil of core distribution area of A. roxburghii mainly include N6, N6, N6-trimethyl-L-lysine, pachymic acid, 14,15-dehydrocrepenynic acid, 3-isopropylmalic acid, cholest-4-en-3-one, citronellyl acetate, and decanoic acid, and the metabolic pathways enriched by these differential metabolites are mainly related with amino acid and lipid metabolism, which can provide carbon and nitrogen sources for A. roxburghii and its mycorrhizal fungi. The correlation analysis result shows that there is a closely positive correlation between contents of significantly differential metabolites and relative abundances of major fungal genera in rhizosphere soil of core distribution area of A. roxburghii. In summary, there is a close interaction between non-mycorrhizal fungi and mycorrhizal fungi in rhizosphere soil of A. roxburghii, which affects the growth and development of A. roxburghii through the nutritional flow of carbon and nitrogen sources, thereby driving its vertical distribution.

Key words: Anoectochilus roxburghii (Wall.) Lindl.; soil fungus; soil metabolite; correlation analysis

金线兰[Anoectochilus roxburghii (Wall.) Lindl.] 隶属于兰科 (Orchidaceae) 开唇兰属 (Anoectochilus Blume),花白色,唇瓣性状奇特,叶片具金红色带有绢丝光泽的网脉,具有很高的观赏性。金线兰中的活性成分具有抗氧化、降血糖、保肝、抗肿瘤、抗衰老和免疫调节等药理作用[1-4]。由于具有较高的观赏价值和药用价值,金线兰野生资源被大量采挖,生境遭到了严重破坏,野生资源急剧减少。金线兰被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)附录 II,在《世界自然保护联盟濒危物种红色名录》(IUCN Red List of Threatened Species)被评为濒危(EN)等级,在《国家重点保护野生植物名录》(https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2021-09/09/content\_5636409.htm)中被列为国家二级重点保护野生植物。

兰科植物的种子非常小,不含胚乳,自然状态下 离开真菌为其提供的营养无法萌发,从种子到幼苗期 间对真菌有着绝对的依赖性<sup>[5-6]</sup>,且一些成年的兰科 植物仍需真菌提供生长所需的糖类和有机质<sup>[7]</sup>。相关研究结果<sup>[8-9]</sup>显示:菌根真菌的组成、丰度和均匀度的变化可能会对兰科植物的适应性产生很大影响,进而影响兰科植物的分布和群落组成。土壤代谢物参与多条碳代谢途径,为土壤微生物(包括土壤真菌)提供营养,影响土壤微生物的组成和丰度等特征<sup>[10]</sup>,进而影响植物的生长与分布。内生真菌可以通过刺激兰科植物产生多糖类和黄酮类等化合物改变兰科植物的代谢物,多种内生真菌对金线兰生长、次生代谢物合成和积累具有促进作用<sup>[11-12]</sup>。目前,兰科植物分布的影响因子研究受到越来越多的关注,而根际土壤代谢物与根际土壤真菌的关系及其对兰科植物分布的影响还有待进一步研究。

鉴于此,本研究通过高通量测序和非靶向代谢组 学技术对广东梧桐山金线兰核心分布区根际土壤和 非分布区土壤中的真菌组成和多样性以及土壤代谢 物组成进行了比较,挖掘了金线兰核心分布区根际土 壤和非分布区土壤主要真菌和差异代谢物及其关联机制,探讨了土壤真菌、代谢物及其相互作用对金线 兰分布的影响,以期为根际土壤真菌及物质驱动兰科植物的分布提供研究案例,同时为金线兰的迁地保育和人工栽培奠定基础,也为其他珍稀濒危植物的研究提供借鉴。

## 1 研究地概况和方法

### 1.1 研究地概况

研究地位于广东省深圳市梧桐山国家级风景名胜区(简称梧桐山,下同),地理坐标为东经113°17′~114°18′、北纬22°23′~22°43′,主峰海拔943.7 m,占地面积31.82 km²。梧桐山植物资源丰富,植被类型多样,拥有多种珍稀濒危兰科植物[¹³-¹⁴]。基于对梧桐山的充分踏查,发现某区域内金线兰分布的生境集中在海拔800~900 m,海拔800 m以下几乎没有金线兰分布。该区域植被为亚热带常绿阔叶林,主要植物种类有浙江润楠(Machilus chekiangensis S. Lee)和亮叶冬青(Ilex nitidissima C. J. Tseng)等,土壤以赤红壤、山地黄壤为主[¹5]。

### 1.2 方法

1.2.1 样地设置和土壤取样 于 2021 年 8 月 19 日,选取坡向一致、植物群落组成相似、土壤条件一致的金线兰核心分布区(海拔 875 m)和 2 个金线兰非分布区(海拔分别为 775 和 675 m)分别设为样地 1、样地 2 和样地 3。在样地 1 中用灭菌的勺子和镊子采集金线兰根际 2 mm 范围内的土壤,每份约 2 g,装入已灭菌的 2 mL 冻存管,立即放入液氮瓶,设为 Anorl组。在样地 2 和样地 3 中分别随机选取林下土壤分布点,佩戴无菌手套去除土壤表面枯枝落叶,然后用灭菌的勺子和镊子采集 0~5 cm 土层土壤,每份约 2 g,装入已灭菌的2 mL 冻存管,立即放入液氮瓶,分别设为 Anor2 和 Anor3 组。每组分别采集 6 个土壤真菌组和 6 个代谢组样品,即为 6 个生物学重复,带回实验室后保存于-80 ℃冰箱,用于后续微生物组学和代谢组学检测。

1.2.2 土壤真菌 DNA 提取及文库构建 使用 DNeasy PowerLyzer PowerSoil 试剂盒(美国 Mo Bio Laboratories 公司)提取土壤真菌 DNA。以检测合格的 DNA 为模板,使用带 Barcode 的特异引物(ITS3-2024F:5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3';ITS4-

2409R: 5′ - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3′)、 Phusion® High - Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和高效高保真酶(美国 New England Biolabs 公司)进行 PCR 反应。扩增程序:98 ℃ 预变性 1 min; 98 ℃变性 10 s、55 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 30 s,循环 30 次;72 ℃延伸 5 min。采用质量体积分数 2%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物;使用胶回收试剂盒(德国 Qiagen 公司)回收目的条带。根据 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒(美国 Illumina 公司)进行文库构建,经过 Qubit 2.0 荧光定量仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)检测定量,文库合格后使用 NovaSeq6000 平台(美国 Illumina 公司)测序。

### 1.2.3 代谢物制备及检测

1.2.3.1 代谢物制备 取 1.00 g 土壤样品,置于 EP 管中,加入 1 000  $\mu$ L 体积分数 80%甲醇,涡旋振荡 10 s,冰浴静置 5 min;12 560  $\mathbf{r} \cdot \mathbf{min}^{-1}$ 、4  $\mathbf{C}$  离心 15 min,取上清液;12 560  $\mathbf{r} \cdot \mathbf{min}^{-1}$ 、4  $\mathbf{C}$  离心 20 min,收集上清液;使用 Scan Speed 40 真空旋转浓缩仪(丹麦 Labogene 公司)浓缩(1 500  $\mathbf{r} \cdot \mathbf{min}^{-1}$ ,35  $\mathbf{C}$ )后,用 200  $\mu$ L 体积分数 10%甲醇复溶,作为待测样本。从每个样本中取 50  $\mu$ L 样本混合作为质控(quality control,QC)样本,空白(blank)样本为体积分数 53%甲醇,前处理过程同上[16]。

1.2.3.2 代谢物检测 使用美国 Thermo Fisher 公司的 Q Exactive™ HF 质谱仪和 Vanquish UHPLC 色谱仪对获得的代谢物进行检测。

色谱条件: Hypesil Goldcolumn 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.9  $\mu$ m);柱温 40 °C;流速 0.2 mL·min<sup>-1</sup>;正离子模式:流动相 A 为体积分数 0.1%甲酸,流动相 B 为甲醇;负离子模式:流动相 A 为 5 mmol·L<sup>-1</sup>乙酸 铵(pH 9.0),流动相 B 为甲醇。

质谱条件:质量扫描范围 m/z 100~1 500; ESI 离子源设置参数为喷雾电压 3.5 kV, 鞘气压力 241.325 kPa,辅助气流速 10 L·min<sup>-1</sup>, 离子传输管温度为 320 °C,离子导入射频电平 60%, 辅助气加热器温度为 350 °C,MS/MS 二级扫描为数据依赖性扫描。

### 1.3 数据处理和分析

1.3.1 土壤真菌数据处理和分析 根据 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列从下机数据中分出各样本数据,截去 Barcode 和引物序列,使用 FLASH(V1.2.7)

软件对每个样本的 reads 进行拼接,得到原始数据,设置阈值为 5,过滤碱基长度小于 tags 长度 50%的低质量 tags;参照 QIIME(V1.9.1)软件的 tags 质量控制流程和去除嵌合体处理后,得到最终的有效数据<sup>[17-19]</sup>。基于有效数据以一致性 97%将序列聚类成操作分类单元(operational taxonomic units,OTUs),选取频数最高的序列作为 OTUs 的代表序列,进行土壤真菌物种分析和功能注释<sup>[19-20]</sup>。

以数据量最少的样本为标准进行均一化处理。 使用 QIIME (V1.9.1) 软件计算  $\alpha$  多样性指数 (包括 Shannon 指数、Simpson 指数和 Chao1 指数),其中, Shannon 指数越大,群落多样性越高,物种分布越均 匀;Simpson 指数越大,物种均匀度越好;Chaol 指数 越大,物种数量越多。使用 R(Version 2.15.3) 软件分 析 α 多样性指数组间差异,并进行 Wilcox 差异显著 性检验[21]。从样本中随机抽取一定测序量的数据, 统计这些数据代表的物种数(即 OTUs 数),以抽取的 测序数据量与对应的物种数构建稀释曲线,并使用 R(Version 2.15.3) 软件绘制。使用 QIIME(V1.9.1) 软件计算 Unweighted Unifrac 距离,基于 Unweighted Unifrac 距离构建 UPGMA 聚类树。使用 R (Version 2.15.3) 软件,基于 Unweighted Unifrac 距离分析 β 多 样性指数组间差异,并进行 Wilcox 差异显著性检 验[21]。使用 R (Version 2.15.3) 软件 vegan 包的 anosim 函数进行 Anosim 分析,其中, Anosim 检验的 统计量即不同分组差异程度结果 R 值介于(-1,1)之 间,R>0表示组间差异大于组内差异,R<0表示组内 差异大于组间差异,p<0.05 表示差异显著。

为进一步挖掘组间的显著差异真菌类群,使用R(Version 2.15.3)软件进行 MetaStat 分析,进行组间的置换检验,得到 p 值,并对 p 值进行修正,得到 q 值<sup>[22]</sup>,对组间物种组成和群落结构进行差异显著性检验。各个样本的测序量均一化后得到绝对丰度,并根据公式"相对丰度=不同分类水平的某真菌类群绝对丰度/总绝对丰度"计算相对丰度,物种相对丰度经过标准化处理后得到 Z 值,计算公式为 Z 值=(某一样本在某个分类上的相对丰度—所有样本在该分类上的平均相对丰度)/所有样本在该分类上的标准差。基于物种相对丰度计算各菌属之间的 Spearman相关系数,得到相关系数矩阵,筛选 p<0.05、相关性阈值 lrl>0.6、相对丰度前 50 的真菌类群进行共发生网络分析,使用 graphviz-2.38.0 软件绘制网络图。

1.3.2 代谢物数据分析 将下机数据导入 CD 3.1 搜库软件进行处理,对每个代谢物的保留时间和质荷比进行筛选,设置保留时间偏差 0.2 min、质量偏差 5×10<sup>-6</sup>、信号强度偏差 30%、信噪比 3、最小信号强度 100 000,搜库设置选择加和离子信息进行峰提取。对峰面积进行定量,通过分子离子峰和碎片离子进行分子式的预测,并与 mzCloud(https://www.mzcloud.org/)以及mzVault 和 Masslist 数据库(诺禾致源生物科技有限公司自有数据库)进行比对,用空白样本去除背景离子,并对定量结果进行归一化,得到数据的鉴定和相对定量结果。基于代谢物的相对定量值计算 QC 样本之间的 Pearson 相关系数,用于判断代谢组结果的稳定性和准确性,本实验的 QC 样本相关性接近于 1,说明整个检测过程稳定性好,数据质量高。

数据质控后,对代谢物进行主成分分析(PCA)、 偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)以及 KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes), HMDB (human metabolome database) 和 LMSD (lipid maps structure database)数据库注释[23]。变量投影重要度(VIP)表 示代谢物对分组的贡献,差异倍数(FC)为每个代谢 物含量与比较组中所有生物重复均值的比值;根据 VIP>1.0,FC>1.20 或 FC<0.83 且 p<0.05 筛选差异代 谢物[23-25]。获得的差异代谢物用受试者工作特征曲 线(ROC)评判潜在的生物标记物,进一步揭示组间 差异<sup>[26]</sup>。ROC 曲线下方的面积(AUC)可用于评估 生物标志物对预测事件发生的灵敏度和特异性,0.5< AUC≤0.7 表示预测准确性较低,0.7<AUC≤0.9 表示 有一定预测准确性,0.9<AUC≤1.0 表示预测准确性 较高。基于 KEGG 数据库注释结果进行通路富集分 析,进一步探索差异代谢物参与的生化代谢和信号转 导途径及其对土壤微生物功能的潜在影响。

1.3.3 土壤代谢物与真菌相关性分析 使用 Python 3.7.10 软件将土壤显著(包括显著和极显著)差异代谢物含量与主要真菌属相对丰度进行 Pearson 相关性分析。

# 2 结果和分析

# 2.1 金线兰核心分布区根际土壤和非分布区土壤真 菌群落物种组成和多样性分析

测序数据经过拼接和过滤后,18个样本共得到

1722 615 条有效数据,各样本的有效数据为90 848~99 583 条,平均每个样本有 95 701 条有效数据,稀释曲线趋向平坦说明测序数据量合理。OTUs 聚类分析共得到 6 068 个代表性 OTUs,共注释到 18 门 458 科 1 085 属真菌。海拔 875 m 的金线兰核心分布区根际土壤(Anor1)组聚类到 4 175 个 OTUs,注释到 15 门 401 科 905 属真菌;海拔 775 m 的金线兰非分布区土壤(Anor2)组聚类到 3 921 个 OTUs,注释到 13 门 385 科 860 属真菌;海拔 675 m 的金线兰非分布区土壤(Anor3)组聚类到 4 355 个 OTUs,注释到 15 门 407 科 890 属真菌。原始数据已提交至国家微生物科学数据中心(NMDC,http://nmdc.cn),项目编号为NMDC10017981。

土壤真菌群落组成分析 结果(表1)显示: 2.1.1 Anor1 组鉴定到的优势菌属(相对丰度大于 0.9%)有 原隐球菌属(Saitozyma X. Z. Liu, F. Y. Bai, M. Groenew. et Boekhout)、木霉属(Trichoderma Pers.)、 古根菌属(Archaeorhizomyces Rosling et T. Y. James)、 绿僵菌属 (Metarhizium Sorokīn)、树粉孢属 (Oidiodendron Robak)、酵母属(Saccharomyces Meyen ex E. C. Hansen)、青霉属(Penicillium Link)、 Pseudophacidium P. Karst.、被孢霉属(Mortierella Coem.)、弯颈霉属(Tolypocladium W. Gams)、隔指孢 属(Dactylella Grove)和粗糙孔菌属(Trechispora P. Karst.),相对丰度分别为 10.76%、3.39%、3.02%、 2.88% \, 2.60% \, 2.17% \, 1.97% \, 1.77% \, 1.62% \, 1.10% \, 0.95%和 0.94%,主要隶属于子囊菌门(Ascomycota)、 担子菌门(Basidiomycota)和被孢霉门 (Mortierellomycota); Anor2 组鉴定到的优势菌属有原 隐球菌属、青霉属、木霉属、弯颈霉属、古根菌属、 Lauriomyces R. F. Castañeda, Cadophora Lagerb. et Melin, Pseudophacidium, Cladophialophora Borelli, Phialocephala W. B. Kendr.和绿僵菌属,相对丰度分 别为 14.88%、5.05%、3.21%、2.92%、2.69%、1.77%、 1.34%、1.30%、1.27%、0.94%和0.92%,主要隶属于子 囊菌门、担子菌门和罗兹菌门(Rozellomycota); Anor3 组鉴定到的优势菌属有原隐球菌属、古根菌属、木霉 属、青霉属、Serendipita P. Roberts、盾壳霉属 (Coniothyrium Corda)、拟锁瑚菌属(Clavulinopsis Overeem)、Paraconiothyrium Verkley、绿僵菌属、 Phaeoacremonium W. Gams, Crous et M. J. Wingf. 霉属(Aspergillus P. Micheli ex Haller)、弯颈霉属和

表 1 广东梧桐山金线兰核心分布区根际土壤和非分布区土壤中鉴定 到的主要菌属及其相对丰度

Table 1 Major fungal genera identified from rhizosphere soil of core distribution area and soil of non-distribution area of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. in Wutong Mountain of Guangdong Province and their relative abundances

属 Genus	相对丰度/% <sup>1)</sup> Relative abundance <sup>1)</sup>				
,, ·	Anor1	Anor2	Anor3		
原隐球菌属 Saitozyma	10.76	14.88	9.46		
木霉属 Trichoderma	3.39	3.21	5.25		
古根菌属 Archaeorhizomyces	3.02	2.69	7.91		
绿僵菌属 Metarhizium	2.88	0.92	1.56		
树粉孢属 Oidiodendron	2.60	0.24	0.29		
酵母属 Saccharomyces	2.17	0.01	0.01		
青霉属 Penicillium	1.97	5.05	5.09		
Pseudophacidium	1.77	1.30	0.15		
被孢霉属 Mortierella	1.62	0.17	0.44		
弯颈霉属 Tolypocladium	1.10	2.92	1.14		
隔指孢属 Dactylella	0.95	0.28	0.43		
粗糙孔菌属 Trechispora	0.94	0.35	0.03		
${\it Cladophialophora}$	0.62	1.27	0.97		
盾壳霉属 Coniothyrium	0.53	0.86	2.40		
Paraconiothyrium	0.49	0.22	1.76		
曲霉属 Aspergillus	0.49	0.83	1.21		
Phialocephala	0.48	0.94	0.59		
Cadophora	0.34	1.34	0.64		
Phaeoacremonium	0.29	0.23	1.38		
Lauriomyces	0.20	1.77	0.18		
拟锁瑚菌属 Clavulinopsis	0.17	0.12	2.34		
Serendipita	0.09	0.12	3.05		
Meliniomyces	0.08	0.78	0.08		
威克汉姆酵母属 Wickerhamomyces	0.02	0.02	0.75		

<sup>1)</sup> Anor1: 海拔 875 m 的金线兰核心分布区根际土壤 Rhizosphere soil of core distribution area of Anoectochilus roxburghii (Wall.) Lindl. at an altitude of 875 m; Anor2: 海拔 775 m 的金线兰非分布区土壤 Soil of non-distribution area of A. roxburghii at an altitude of 775 m; Anor3: 海拔 675 m 的金线兰非分布区土壤 Soil of non-distribution area of A. roxburghii at an altitude of 675 m.

Cladophialophora, 相对丰度分别为 9.46%、7.91%、5.25%、5.09%、3.05%、2.40%、2.34%、1.76%、1.56%、1.38%、1.21%、1.14%和 0.97%, 主要隶属于子囊菌门、担子菌门和毛霉门(Mucoromycota)。

2.1.2 土壤真菌群落  $\alpha$  多样性和  $\beta$  多样性分析  $\alpha$  多样性分析结果(表 2)和 Wilcox 差异显著性检验结果显示: Anor1、Anor2 和 Anor3 组真菌群落  $\alpha$  多样性指数(Shannon 指数、Simpson 指数和 Chao1 指数)变幅均较小,且在 3 组间均不存在显著差异,即 3 组样本的真菌群落物种的丰富度和均匀度相似。

β多样性分析结果(表3)显示: Anor1 组与 Anor2 组、Anor1 组与 Anor3 组以及 Anor2 组与 Anor3 组间

的 Unweighted Unifrac 距离分别为 0.39、0.44 和 0.45,p 值分别为 0.003 9、0.000 2 和 0.000 0,表明 3 组间的 真菌群落结构具有极显著差异。

Anosim 分析结果(表 3)显示: Anor1 组与 Anor2 组、Anor1 组与 Anor3 组以及 Anor2 组与 Anor3 组间的 R 值分别为 0.295 4、0.538 9 和 0.409 3, p 值分别为 0.031、0.004 和 0.002,说明 3 组间的组间差异均显著大于组内差异。

总体上看,金线兰核心分布区根际土壤与非分布 区土壤真菌群落的物种丰富度和均匀度虽然较为相似,但群落结构和物种组成有显著不同。

2.1.3 土壤真菌群落的比较 为了进一步研究金线 兰核心分布区根际土壤与非分布区土壤真菌群落间

表 2 广东梧桐山金线兰核心分布区根际土壤和非分布区土壤真菌群落的  $\alpha$  多样性分析

Table 2  $\alpha$  diversity analysis on fungal communities in rhizosphere soil of core distribution area and soil of non-distribution area of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. in Wutong Mountain of Guangdong Province

Art I.)	α多样性指数 α diversity index					
Group	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	Chao1 指数 Chao1 index			
Anor1	6.543	0.954	2 101.529			
Anor2	6.420	0.945	2 082.533			
Anor3	6.625	0.942	2 227.964			

<sup>1)</sup> Anor1: 海拔 875 m 的金线兰核心分布区根际土壤 Rhizosphere soil of core distribution area of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. at an altitude of 875 m; Anor2: 海拔 775 m 的金线兰非分布区土壤 Soil of non-distribution area of *A. roxburghii* at an altitude of 775 m; Anor3: 海拔 675 m 的金线兰非分布区土壤 Soil of non-distribution area of *A. roxburghii* at an altitude of 675 m.

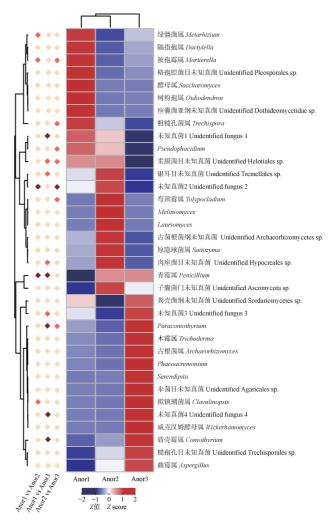
表 3 广东梧桐山金线兰核心分布区根际土壤与非分布区土壤真菌群落的  $\beta$  多样性及 Anosim 分析

Table 3  $\beta$  diversity and Anosim analyses on fungal communities between rhizosphere soil of core distribution area and soil of non-distribution area of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. in Wutong Mountain of Guangdong Province

组 <sup>1)</sup>	β多样性分析 β diversity analysis	Anosim 分析 Anosim analysis		
Group <sup>1)</sup>	Unweighted Unifrac 距离 Unweighted Unifrac distance	1		1 .
Anor1 vs Anor2	0.39	0.003 9	0.295 4	0.031
Anor1 vs Anor3	0.44	0.000 2	0.538 9	0.004
Anor2 vs Anor3	0.45	0.0000	0.409 3	0.002

<sup>1)</sup> Anorl: 海拔 875 m 的金线兰核心分布区根际土壤 Rhizosphere soil of core distribution area of Anoectochilus roxburghii (Wall.) Lindl. at an altitude of 875 m; Anor2: 海拔 775 m 的金线兰非分布区土壤 Soil of non-distribution area of A. roxburghii at an altitude of 775 m; Anor3: 海拔 675 m 的金线兰非分布区土壤 Soil of non-distribution area of A. roxburghii at an altitude of 675 m.

的显著差异菌属,利用 MetaStat 分析进行显著差异菌属的筛选,结果见图 1。结果显示:除未知菌属外,Anorl 组中相对丰度高于 Anor2 和 Anor3 组的差异菌属有绿僵菌属、隔指孢属、被孢霉属、酵母属、树粉孢属、粗糙孔菌属和 Pseudophacidium,其中,绿僵菌属和被孢霉属在 Anor1 组与 Anor2 组间差异显著;Anor2 组中相对丰度高于 Anor1 和 Anor3 组的差异菌属有



 $\bullet$ : p<0.01;  $\bullet$ : p<0.05;  $\bullet$ : p>0.05.

Anor1: 海拔 875 m 的金线兰核心分布区根际土壤 Rhizosphere soil of core distribution area of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. at an altitude of 875 m; Anor2: 海拔 775 m 的金线兰非分布区土壤 Soil of non-distribution area of *A. roxburghii* at an altitude of 775 m; Anor3: 海拔 675 m 的金线兰非分布区土壤 Soil of non-distribution area of *A. roxburghii* at an altitude of 675 m.

#### 图 1 广东梧桐山金线兰核心分布区根际土壤与非分布区土壤真菌差 异属热图

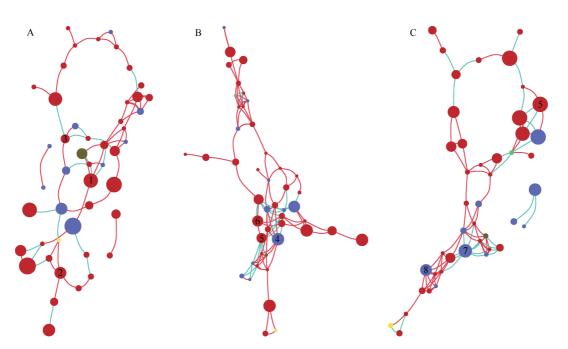
Fig. 1 Heatmap of differential genera of fungi between rhizosphere soil of core distribution area and soil of non-distribution area of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. in Wutong Mountain of Guangdong Province

弯颈霉属、Meliniomyces Hambl. et Sigler、Lauriomyces 和原隐球菌属; Anor3 组中相对丰度高于 Anor1 和 Anor2 组的差异菌属有青霉属、Paraconiothyrium、木霉属、古根菌属、Phaeoacremonium、Serendipita、拟锁瑚菌属、威克汉姆酵母属(Wickerhamomyces Kurtzman,Robnett et Bas.-Powers)、盾壳霉属和曲霉属;其中,青霉属在 Anor1 组与 Anor2 组间送异极显著,Paraconiothyrium 在 Anor1 组与 Anor3 组间差异极显著,拟锁瑚菌属在 Anor1 组与 Anor2 组间差异显著,盾壳霉属在 Anor1 组与 Anor3 组间差异极显著。

此外,烟管菌属(Bjerkandera P. Karst.)、枝孢属(Cladosporium Link)、毛壳菌属(Chaetomium Kunze)、炭疽菌属(Colletotrichum Corda)、角担菌属(Ceratobasidium D. P. Rogers)、镰刀菌属(Fusarium Link)、粘帚霉属(Gliocladium Corda)、小菇属[Mycena

(Pers.) Roussel]、胶膜菌属(Tulasnella J. Schröt.)、炭垫菌属(Nemania Gray)、无柄盘菌属(Pezicula Tul. et C. Tul.)、柄孢壳菌属(Podospora Ces.)和硬孔菌属(Rigidoporus Murrill)等在金线兰核心分布区根际土壤和非分布区土壤中也被检测到,但相对丰度在金线兰核心分布区根际土壤与非分布区土壤间无显著差异。

2.1.4 土壤真菌群落共发生网络分析 结果(图 2)显示: Anor1、Anor2 和 Anor3 组真菌群落共发生网络中分别有 151、162 和 151 个连接数,3 组真菌群落共发生网络的真菌主要分布在子囊菌门和担子菌门,少数分布在被孢霉门和罗兹菌门, Anor2 和 Anor3 组真菌群落共发生网络的真菌还有部分菌属于毛霉门。Anor1 组中与其他菌属互作紧密且占互作主导地位的优势菌属主要有绿僵菌属、青霉属和弯颈霉属; Anor2 组中与其他菌属互作紧密且占互作主导地位



●: 毛霉门 Mucoromycota; ●: 被孢霉门 Mortierellomycota; ●: 子囊菌门 Ascomycota; ●: 罗兹菌门 Rozellomycota; ●: 担子菌门 Basidiomycota.

1-8. 优势菌属 Dominant fungal genus: 1. 绿僵菌属 Metarhizium Sorokin; 2. 青霉属 Penicillium Link Meyen ex E. C. Hansen; 3. 弯颈霉属 Tolypocladium W. Gams; 4. 原隐球菌属 Saitozyma X. Z. Liu, F. Y. Bai, M. Groenew. et Boekhout; 5. 古根菌属 Archaeorhizomyces Rosling et T. Y. James; 6. 木霉属 Trichoderma Pers.; 7. Serendipita P. Roberts; 8. 拟锁瑚菌属 Clavulinopsis Overeem. 不同节点代表不同菌属,节点越大则该菌属的平均相对丰度越高 Different nodes represent different fungal genera, and the larger the node, the higher the average relative abundance of the fungal genus. 节点间红色线表示正相关,蓝色线表示负相关 The red lines between nodes indicate positive correlation, and the blue lines between nodes indicate negative correlation.

A: 海拔 875 m 的金线兰核心分布区根际土壤 Rhizosphere soil of core distribution area of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. at an altitude of 875 m; B: 海拔 775 m 的金线兰非分布区土壤 Soil of non-distribution area of *A. roxburghii* at an altitude of 775 m; C: 海拔 675 m 的金线兰非分布区土壤 Soil of non-distribution area of *A. roxburghii* at an altitude of 675 m.

图 2 广东梧桐山金线兰核心分布区根际土壤和非分布区土壤真菌群落共发生网络图

Fig. 2 Co-occurrence network diagram of fungal communities in rhizosphere soil of core distribution area and soil of non-distribution area of Anoectochilus roxburghii (Wall.) Lindl. in Wutong Mountain of Guangdong Province

的优势菌属主要有原隐球菌属、古根菌属和木霉属; Anor3 组中与其他菌属互作紧密且占互作主导地位 的优势菌属主要有 Serendipita、拟锁瑚菌属和古根菌 属。表明绿僵菌属、青霉属和弯颈霉属对维持金线兰 核心分布区根际土壤真菌群落的结构和功能可能具 有重要作用。与金线兰核心分布区根际土壤相比,金 线兰非分布区土壤真菌群落中占互作主导地位的优 势类群及其密切作用的真菌类群和丰度都有明显 不同。

## 2.2 金线兰核心分布区根际土壤和非分布区土壤代 谢物分析

经 mzCloud、mzVault、Masslist 数据库比对,从海 拔 875 m 的金线兰核心分布区根际土壤(Anor1)组、 海拔 775 m 的金线兰非分布区土壤(Anor2)组以及海 拔 675 m 的金线兰非分布区土壤(Anor3)组中共得到 1886种代谢物,正离子模式鉴定到1089种代谢物, 其中561种代谢物得到注释,KEGG、HMDB和LMSD 数据库分别注释到354、428和113种;负离子模式鉴 定到935种代谢物,其中528种代谢物得到注释, KEGG、HMDB 和 LMSD 数据库分别注释到 188、420 和131种。注释到的1089种代谢物含脂质和类脂 质化合物 319 种,苯丙烷和聚酮化合物 175 种,有机 酸及其衍生物 146 种,有机杂环化合物 131 种,苯类 化合物 99 种,糖类及其结合物 50 种,核苷、核苷酸及 其类似物 47 种,生物碱及其衍生物 40 种,有机氧化 合物 27 种,木脂素、新木脂素及相关化合物 9 种,胺 类化合物 7 种,其他化合物 39 种。

2.2.1 土壤代谢物组成分析 差异代谢物筛选结果表明:与 Anor2 组相比, Anor1 组代谢物有 136 种上调、31 种下调,共 167 种,其中,注释到的差异代谢物主要为脂质和类脂质化合物(25 种,10 种上调、15 种下调)、苯丙烷和聚酮化合物(18 种,2 种上调、16 种下调)、有机酸及其衍生物(11 种,3 种上调、8 种下调)和苯类化合物(11 种,1 种上调、10 种下调)。Anor1 组与 Anor2 组间变量投影重要度(VIP)排名前10 的差异代谢物为香草醇和蕨素 B 2 种苯类化合物,甜菜碱、L-谷氨酸和 N-乙酰-L-缬氨酸、S-腺苷-L-高半胱氨酸 4 种有机酸及其衍生物,以及山莴苣苦素、虎杖苷、奎诺二甲基丙烯酸酯和槟榔碱;仅香草醇在 Anor1 组中极显著上调,其他 9 种代谢物均极显著下调。与 Anor3 组相比, Anor1 组代谢物有 103 种上调、96 种下调,共 199 种,其中,注释到的差异代谢

物主要为脂质和类脂质化合物(38种,22种上调、16种下调)、有机酸及其衍生物(22种,17种上调、5种下调)、有机杂环化合物(12种,5种上调、7种下调)、苯丙烷和聚酮化合物(12种,4种上调、8种下调)。Anor1组与Anor3组间VIP值排名前10的差异代谢物为3-异丙基苹果酸、4-胆甾烯-3-酮、乙酸香茅酯、正癸酸和14,15-脱氢萜烯酸5种脂质和类脂质化合物,D-葡萄糖二酸和咖啡因2种糖类及其结合物,东莨菪内酯和查尔酮2种苯丙烷和聚酮化合物,以及尼泊金丁酯;除尼泊金丁酯、东莨菪内酯和查尔酮在Anor1组中极显著下调外,其他7种代谢物均极显著上调。

选择 Anor1 组与 Anor2 组间以及 Anor1 组与 Anor3 组间 VIP 值排名前 10 的显著差异代谢物,同 时查找 Anor1 组与 Anor2 组间以及 Anor1 组与 Anor3 组间共同存在的显著差异代谢物,经分析比对去除无 效质量数据,最终得到26种显著差异代谢物,结果见 表 4。结果显示:牛磺鹅去氧胆酸、茯苓酸和 14,15-脱氢萜烯酸3种脂质和类脂质化合物,以及香草醇和 N6,N6,N6-三甲基-L-赖氨酸同为 Anor1 组与 Anor2 组间以及 Anor1 组与 Anor3 组间的显著或极显著差 异代谢物,且均在 Anor1 组中显著上调;二氢辣椒素、 甜菜碱、宝藿苷Ⅱ和葫芦巴碱同为 Anor1 组与 Anor2 组间以及 Anor1 组与 Anor3 组间显著或极显著差异 代谢物,且均在 Anor1 组中显著下调。3-异丙基苹果 酸、4-胆甾烯-3-酮、乙酸香茅酯和正癸酸4种脂质 和类脂质化合物虽然也为 Anorl 组与 Anor2 组间以 及 Anor1 组与 Anor3 组间的显著或极显著差异代谢 物,在 Anor1 组中均显著上调,但这 4 种化合物在 Anor2 组与 Anor3 组间也存在显著差异。

结果(表 4)还显示: Anor1 组与 Anor2 组间的 167 种差异代谢物中,有 35 种代谢物的受试者工作特征曲线(ROC)下方的面积(AUC)为 1.00,具有极高的预测准确性,其中茯苓酸、香草醇和牛磺鹅去氧胆酸在二者间差异倍数(FC)较大,均在 Anor1 组中显著或极显著上调。Anor1 组与 Anor3 组间的 199 种差异代谢物中,有 32 种代谢物的 ROC 曲线的 AUC值为 1.00,具有极高的预测准确性,其中茯苓酸、D-葡萄糖二酸和牛磺鹅去氧胆酸在二者间差异倍数较大,均在 Anor1 组中显著或极显著上调。分析表明:茯苓酸、香草醇、牛磺鹅去氧胆酸和 D-葡萄糖二酸可作为区分金线兰核心分布区根际土壤与非分布区土

表 4 广东梧桐山金线兰核心分布区根际土壤与非分布区土壤主要显著差异代谢物信息<sup>1)</sup>
Table 4 Information of major significant differential metabolites between rhizosphere soil of core distribution area and soil of non-distribution area of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. in Wutong Mountain of Guangdong Province<sup>1)</sup>

	p 值	p value	V	IP	F	FC	U/D		A	AUC	
代谢物 Metabolite	Anor1	Anor1	Anor1	Anor1	Anor1	Anor1	Anor1	Anor1	Anor1	Anor1	
	vs Anor2	vs Anor3	vs Anor2	vs Anor3	vs Anor2	vs Anor3	vs Anor2	vs Anor3	vs Anor2	vs Anor3	
苯类 Benzenoids											
香草醇 Vanillyl alcohol	**	*	2.99	1.68	16.00	7.12	U	U	1.00	0.92	
尼泊金丁酯 Butylparaben		**	0.29	2.38	1.27	0.18		D	0.64	1.00	
蕨素 B Pterosin B	**		2.89	0.44	0.13	0.67	D		1.00	0.69	
二氢辣椒素 Dihydrocapsaicin	*	**	1.55	2.19	0.52	0.33	D	D	0.92	1.00	
脂质和类脂质化合物 Lipids and lip	oid-like mo	lecules									
3-异丙基苹果酸 3-isopropylmalic acid	*	**	1.06	2.57	1.32	2.25	U	U	0.86	1.00	
4-胆甾烯-3-酮 Cholest-4-en-3-one	*	**	1.43	2.37	1.45	2.07	U	U	0.83	0.97	
乙酸香茅酯 Citronellyl acetate	**	**	1.73	2.57	2.36	4.68	U	U	0.92	1.00	
正癸酸 Decanoic acid	*	**	2.13	2.35	14.14	3.15	U	U	0.89	0.94	
14,15-脱氢萜烯酸 14,15-dehydrocrepenynic acid	**	**	1.98	2.34	2.15	2.67	U	U	1.00	0.97	
牛磺鹅去氧胆酸 Taurochenodeoxycholic acid	*	*	2.44	2.12	8.23	9.20	U	U	1.00	1.00	
茯苓酸 Pachymic acid	*	*	2.23	2.15	366.20	590.06	U	U	1.00	1.00	
山莴苣苦素 Lactucopicrin	**		2.70	0.73	0.21	0.59	D		0.97	0.72	
糖类及其结合物 Carbohydrates and	carbohydra	ate conjugates									
D−葡萄糖二酸 D-saccharic acid		**	0.96	2.32	2.49	11.12		U	0.69	1.00	
有机杂环化合物 Organoheterocyclic	compound	s									
咖啡因 Caffeine		**	0.96	2.49	1.35	2.60		U	0.86	0.97	
奎诺二甲基丙烯酸酯 Trolox	**		2.65	0.96	0.32	0.58	D		1.00	0.69	
有机酸及其衍生物 Organic acids an	nd derivativ	res									
N6,N6,N6-三甲基-L-赖氨酸 N6,N6,N6-trimethyl- <i>L</i> -lysine	*	**	1.74	2.03	2.13	3.09	U	U	0.83	0.97	
甜菜碱 Betaine	**	*	2.62	1.55	0.39	0.50	D	D	1.00	0.86	
L-谷氨酸 L-glutamic acid	**		2.60	0.21	0.30	0.93	D		1.00	0.58	
N−乙酰−L−缬氨酸 N-acetyl-L-valine	**		2.59	0.10	0.13	1.18	D		0.97	0.58	
S-腺苷-L-高半胱氨酸 S-adenosyl-L-homocysteine	**		2.49	0.41	0.18	0.73	D		1.00	0.61	
苯丙烷和聚酮化合物 Phenylpropan	oids and po	olyketides									
虎杖苷 Polydatin	**		2.69	0.49	0.22	0.69	D		1.00	0.69	
东莨菪内酯 Scopoletin		**	0.75	2.36	0.84	0.49		D	0.78	1.00	
查尔酮 Chalcone		**	0.15	2.20	0.96	0.19		D	0.64	1.00	
宝藿苷Ⅱ Baohuoside Ⅱ	*	*	1.85	1.82	0.52	0.44	D	D	0.89	0.86	
生物碱及其衍生物 Alkaloids and d	erivatives										
槟榔碱 Arecoline	**		2.65	0.07	0.18	1.00	D		1.00	0.56	
葫芦巴碱 Trigonelline	*	*	2.09	1.60	0.60	0.63	D	D	0.89	0.89	

<sup>1)</sup> VIP: 变量投影重要度 Variable importance in the projection; FC: 差异倍数 Fold change; U: 上调 Up regulation; D: 下调 Down regulation; AUC: 受试者工作特征曲线下方的面积 The area below the receiver operating characteristic curve. Anor1: 海拔 875 m 的金线兰核心分布区根际土壤 Rhizosphere soil of core distribution area of Anoectochilus roxburghii (Wall.) Lindl. at an altitude of 875 m; Anor2: 海拔 775 m 的金线兰非分布区土壤 Soil of non-distribution area of A. roxburghii at an altitude of 775 m; Anor3: 海拔 675 m 的金线兰非分布区土壤 Soil of non-distribution area of A. roxburghii at an altitude of 675 m. \*: p<0.05; \*\*: p<0.01.

壤的生物标记物。

综上所述,26 种显著差异代谢物中,Anorl 组与Anor2 组间显著差异代谢物 21 种,分别为香草醇、牛磺鹅去氧胆酸、茯苓酸、正癸酸、14,15-脱氢萜烯酸、N6,N6,N6-三甲基-L-赖氨酸、乙酸香茅酯、4-胆甾烯-3-酮、3-异丙基苹果酸、蕨素 B、山莴苣苦素、虎杖苷、奎诺二甲基丙烯酸酯、槟榔碱、甜菜碱、L-谷氨酸、N-乙酰-L-缬氨酸、S-腺苷-L-高半胱氨酸、葫芦巴碱、宝藿苷Ⅱ和二氢辣椒素;Anorl 组与 Anor3 组间显著差异代谢物 18 种,分别为 3-异丙基苹果酸、乙酸香茅酯、咖啡因、4-胆甾烯-3-酮、正癸酸、14,15-

脱氢萜烯酸、D-葡萄糖二酸、茯苓酸、牛磺鹅去氧胆酸、N6,N6,N6-三甲基-L-赖氨酸、香草醇、尼泊金丁酯、东茛菪内酯、查尔酮、二氢辣椒素、宝藿苷 II、葫芦巴碱和甜菜碱。

2.2.2 土壤主要显著差异代谢物的代谢通路分析结果(表 5)显示: Anor1 组与 Anor2 组间主要显著差异代谢物在正离子模式下共富集到 22 条代谢通路,其中,N6,N6,N6-三甲基-L-赖氨酸参与的赖氨酸降解途径被显著富集;4-胆甾烯-3-酮参与的类固醇降解,S-腺苷-L-高半胱氨酸参与的半胱氨酸和甲硫氨酸代谢及氨基酸的生物合成,甜菜碱参与的甘氨酸、

表 5 广东梧桐山金线兰核心分布区根际土壤与非分布区土壤主要显著差异代谢物的代谢通路<sup>1)</sup>
Table 5 Metabolic pathways of major significant differential metabolites between rhizosphere soil of core distribution area and soil of non-distribution area of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. in Wutong Mountain of Guangdong Province<sup>1)</sup>

代谢物 Metabolite	代谢通路 ID Metabolic pathway ID	) 代谢通路 Metabolic pathway	
Anor1 vs Anor2			
正离子模式 Positive ion mode			
N6,N6,N6-三甲基-L-赖氨酸 N6,N6,N6-trimethyl-L-lysine	map00310	赖氨酸降解 Lysine degradation	0.011
4-胆甾烯-3-酮 Cholest-4-en-3-one	map00984	类固醇降解 Steroid degradation	0.124
S-腺苷-L-高半胱氨酸	map00270	半胱氨酸和甲硫氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism	0.124
S-adenosyl- $L$ -homocysteine	map01230	氨基酸的生物合成 Biosynthesis of amino acid	0.375
甜菜碱 Betaine	map00260	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism	0.180
	map02010	ABC 转运体 ABC transporter	0.455
葫芦巴碱 Trigonelline	map00760	烟酸和烟酰胺代谢 Nicotinate and nicotinamide metabolism	0.284
负离子模式 Negative ion mode			
香草醇 Vanillyl alcohol	map00627	氨基苯甲酸降解 Aminobenzoate degradation	0.027
	map01120	不同环境中的微生物代谢 Microbial metabolism in diverse environments	0.721
Anor1 vs Anor3			
正离子模式 Positive ion mode			
4-胆甾烯-3-酮 Cholest-4-en-3-one	map00984	类固醇降解 Steroid degradation	0.023
	map01120	不同环境中的微生物代谢 Microbial metabolism in diverse environments	0.405
东莨菪内酯 Scopoletin	map00940	苯丙烷生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	0.232
甜菜碱 Betaine	map00260	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism	0.400
	map02010	ABC 转运体 ABC transporter	0.631
N6,N6,N6-三甲基-L-赖氨酸 N6,N6,N6-trimethyl-L-lysine	map00310	赖氨酸降解 Lysine degradation	0.400
葫芦巴碱 Trigonelline	map00760	烟酸和烟酰胺代谢 Nicotinate and nicotinamide metabolism	0.405
负离子模式 Negative ion mode			
咖啡因 Caffeine	map01065	由组氨酸和嘌呤衍生的生物碱的生物合成 Biosynthesis of alkaloids derived from histidine and purine	0.001
	map01060	植物次生代谢物的生物合成 Biosynthesis of plant secondary metabolites	0.027
	map01120	不同环境中的微生物代谢 Microbial metabolism in diverse environments	0.466
D-葡萄糖二酸 D-saccharic acid	map00053	抗坏血酸和醛酸代谢 Ascorbate and aldarate metabolism	0.020
正癸酸 Decanoic acid	map00061	脂肪酸生物合成 Fatty acid biosynthesis	0.380
香草醇 Vanillyl alcohol	map01120	不同环境中的微生物代谢 Microbial metabolism in diverse environments	0.466

<sup>1)</sup> Anor1: 海拔 875 m 的金线兰核心分布区根际土壤 Rhizosphere soil of core distribution area of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. at an altitude of 875 m; Anor2: 海拔 775 m 的金线兰非分布区土壤 Soil of non-distribution area of *A. roxburghii* at an altitude of 775 m; Anor3: 海拔 675 m 的金线兰非分布区土壤 Soil of non-distribution area of *A. roxburghii* at an altitude of 675 m.

丝氨酸和苏氨酸代谢及 ABC 转运体, 葫芦巴碱参与的烟酸和烟酰胺代谢途径也被富集。负离子模式下共富集到 40 条代谢通路, 其中, 香草醇参与的氨基苯甲酸降解途径被显著富集, 参与的不同环境中的微生物代谢途径也被富集。

Anor1 组与 Anor3 组间主要显著差异代谢物在正离子模式下共富集到 39 条代谢通路,其中,4-胆甾烯-3-酮参与的类固醇降解途径被显著富集,参与的不同环境中的微生物代谢也被富集;东莨菪内酯参与的苯丙烷生物合成,甜菜碱参与的甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢及 ABC 转运体,N6,N6,N6-三甲基-L-赖氨酸参与的赖氨酸降解,葫芦巴碱参与的烟酸和烟酰胺代谢途径也被富集。负离子模式下共富集到 66 条代谢通路,其中,咖啡因参与的由组氨酸和嘌呤衍生的生物碱的生物合成及植物次生代谢物的生物合成,D-葡萄糖二酸参与的抗坏血酸和醛酸代谢途径被显著或极显著富集;正癸酸参与的脂肪酸生物合成,香草醇参与的不同环境中的微生物代谢途径也被富集。

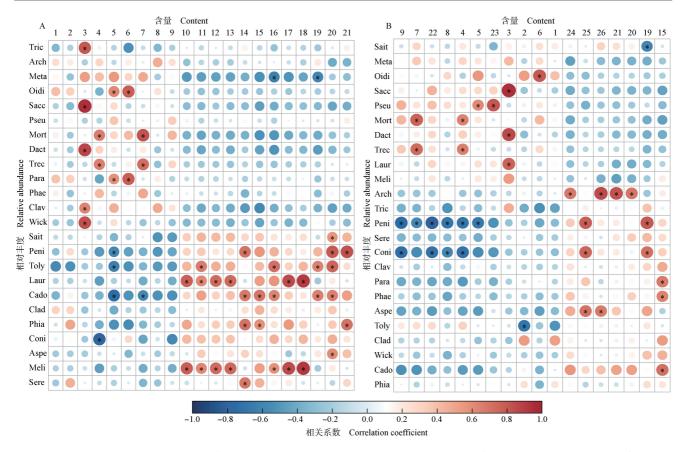
# 2.3 金线兰核心分布区根际土壤与非分布区土壤间显著差异代谢物与主要菌属的相关性分析

海拔 875 m 的金线兰核心分布区根际土壤 (Anor1)组与海拔 775 m 的金线兰非分布区土壤 (Anor2)组间以及 Anor1 组与海拔 675 m 的金线兰非分布区土壤 (Anor3)组间显著差异代谢物含量与主要菌属相对丰度的相关性分析见图 3。

Anorl 组与 Anor2 组间显著差异代谢物含量与主 要菌属相对丰度的相关性分析结果(图 3-A)显示: 茯苓酸含量与木霉属、酵母属、隔指孢属、拟锁瑚菌 属、威克汉姆酵母属的相对丰度呈显著正相关;正癸 酸和乙酸香茅酯的含量与被孢霉属和粗糙孔菌属的 相对丰度呈显著正相关;14,15-脱氢萜烯酸和 N6, N6,N6-三甲基-L-赖氨酸的含量与树粉孢属和 Paraconiothyrium 的相对丰度呈显著正相关; 蕨素 B、 山莴苣苦素、虎杖苷、奎诺二甲基丙烯酸酯、N-乙酰-L-缬氨酸和 S-腺苷-L-高半胱氨酸的含量与 Lauriomyces 和 Meliniomyces 的相对丰度呈显著正相 关,山莴苣苦素含量还与弯颈霉属相对丰度呈显著正 相关:槟榔碱含量与青霉属、Cadophora、Phialocephala 和 Serendipita 的相对丰度呈显著正相关;甜菜碱含量 与 Cadophora 和 Phialocephala 的相对丰度呈显著正 相关; L-谷氨酸含量与弯颈霉属、Cadophora和 Meliniomyces 的相对丰度呈显著正相关; 葫芦巴碱含量与弯颈霉属和 Cadophora 的相对丰度呈显著正相关; 宝藿苷 Ⅱ含量与原隐球菌属、青霉属、弯颈霉属、Cadophora 和曲霉属的相对丰度呈显著正相关; 二氢辣椒素含量与青霉属和 Phialocephala 的相对丰度呈显著正相关。正癸酸含量与盾壳霉属相对丰度呈显著负相关;14,15-脱氢萜烯酸含量与青霉属、弯颈霉属和 Cadophora 的相对丰度呈显著负相关; 乙酸香茅酯含量与 Cadophora 相对丰度呈显著负相关; L-谷氨酸和葫芦巴碱的含量与绿僵菌属相对丰度呈显著负相关。

Anorl 组和 Anor3 组间显著差异代谢物含量与主 要菌属相对丰度的相关性分析结果(图 3-B)显示: 乙酸香茅酯和正癸酸的含量与被孢霉属和粗糙孔菌 属的相对丰度呈显著正相关:14,15-脱氢萜烯酸和 D-葡萄糖二酸的含量与 Pseudophacidium 相对丰度呈 显著正相关: 茯苓酸含量与酵母属、隔指孢属、 Lauriomyces 的相对丰度呈显著正相关; N6, N6, N6-三甲基-L-赖氨酸含量与树粉孢属相对丰度呈显著 正相关;尼泊金丁酯、二氢辣椒素和宝藿苷Ⅱ的含量 与古根菌属相对丰度呈显著正相关;东莨菪内酯含量 与青霉属、盾壳霉属和曲霉属的相对丰度呈显著正相 关:查尔酮含量与古根菌属和曲霉属的相对丰度呈显 著正相关;葫芦巴碱含量与青霉属和盾壳霉属的相对 丰度呈显著正相关;甜菜碱含量与 Paraconiothyrium、 Phaeoacremonium 和 Cadophora 的相对丰度呈显著正 相关。3-异丙基苹果酸、咖啡因、4-胆甾烯-3-酮和 正癸酸的含量与青霉属和盾壳霉属的相对丰度呈显 著负相关;乙酸香茅酯和14,15-脱氢萜烯酸的含量 与青霉属相对丰度呈显著负相关;牛磺鹅去氧胆酸含 量与弯颈霉属相对丰度呈显著负相关;葫芦巴碱含量 与原隐球菌属相对丰度呈显著负相关。

总体上看,金线兰核心分布区根际土壤中含量较高的显著差异代谢物与金线兰核心分布区根际土壤中相对丰度较高的菌属多呈正相关,金线兰核心分布区根际土壤中含量较低的显著差异代谢物与金线兰核心分布区根际土壤中相对丰度较低的菌属多呈正相关;金线兰核心分布区根际土壤中含量较高的显著差异代谢物与金线兰非分布区土壤中相对丰度较高的菌属多呈负相关,金线兰核心分布区根际土壤中含量较低的显著差异代谢物与金线兰非分布区土壤中相对丰度较低的菌属多呈负相关。



Tric:木霉属 Trichoderma Pers.; Arch: 古根菌属 Archaeorhizomyces Rosling et T. Y. James; Meta:绿僵菌属 Metarhizium Sorokīn; Oidi:树粉孢属 Oidiodendron Robak; Sacc:酵母属 Saccharomyces Meyen ex E. C. Hansen; Pseu: Pseudophacidium P. Karst.; Mort:被孢霉属 Mortierella Coem.; Dact:隔指孢属 Dactylella Grove; Trec:粗糙孔菌属 Trechispora P. Karst.; Para: Paraconiothyrium Verkley; Phae: Phaeoacremonium W. Gams, Crous et M. J. Wingf.; Clav: 拟锁瑚菌属 Clavulinopsis Overeem; Wick: 威克汉姆酵母属 Wickerhamomyces Kurtzman, Robnett et Bas.-Powers; Sait: 原隐球菌属 Saitozyma X. Z. Liu, F. Y. Bai, M. Groenew. et Boekhout; Peni: 青霉属 Penicillium Link; Toly: 弯颈霉属 Tolypocladium W. Gams; Laur: Lauriomyces R. F. Castañeda; Cado: Cadophora Lagerb. et Melin; Clad: Cladophialophora Borelli; Phia: Phialocephala W. B. Kendr.; Coni: 盾壳霉属 Coniothyrium Corda; Aspe: 曲霉属 Aspergillus P. Micheli ex Haller; Meli: Meliniomyces Hambl. et Sigler; Sere: Serendipita P. Roberts. 1: 香草醇 Vanillyl alcohol; 2: 牛磺鹅去每胆酸 Taurochenodeoxycholic acid; 3: 茯苓酸 Pachymic acid; 4: 正癸酸 Decanoic acid; 5: 14,15-脱氢萜烯酸 14,15-dehydrocrepenynic acid; 6: N6,N6,N6—三甲基—L—赖氨酸 N6,N6,N6-trimethyl-L-lysine; 7: 乙酸香茅酯 Citronellyl acetate; 8: 4-胆甾烯—3-酮 Cholest-4-en-3-one; 9: 3-异丙基苹果酸 3-isopropylmalic acid; 10: 蕨素 B Pterosin B; 11: 山莴苣苦素 Lactucopicrin; 12: 虎杖苷 Polydatin; 13: 奎诺二甲基丙烯酸酯 Trolox; 14: 槟榔碱 Arecoline; 15: 甜菜碱 Betaine; 16: L-谷氨酸 L-glutamic acid; 17: N-乙酰—L—缬氨酸 N-acetyl-L-valine; 18: S-腺苷—L-高半胱氨酸 S-adenosyl-L-homocysteine; 19: 葫芦巴碱 Trigonelline; 20: 宝藿苷 II Baohuoside II; 21: 二氢辣椒素 Dihydrocapsaicin; 22: 咖啡因 Caffeine; 23: D-葡萄糖二酸 D-saccharic acid; 24: 尼泊金丁酯 Butylparaben; 25: 东莨菪内酯 Scopoletin; 26: 查尔酮 Chalcone. 红色圆点表示正相关,蓝色圆点表示负相关 Red dots indicate positive correlation, and blue dots indicate negative correlation. \*: p<0.05.

A: Anorl vs Anor2; B: Anorl vs Anor3. Anor1: 海拔 875 m 的金线兰核心分布区根际土壤 Rhizosphere soil of core distribution area of Anoectochilus roxburghii (Wall.) Lindl. at an altitude of 875 m; Anor2: 海拔 775 m 的金线兰非分布区土壤 Soil of non-distribution area of A. roxburghii at an altitude of 775 m; Anor3: 海拔 675 m 的金线兰非分布区土壤 Soil of non-distribution area of A. roxburghii at an altitude of 675 m.

# 图 3 广东梧桐山金线兰核心分布区根际土壤与非分布区土壤显著差异代谢物含量与主要菌属相对丰度的相关性分析 g. 3 Correlation analysis on the contents of significantly differential metabolites and the relative abundances of major fungal genera between rhizosphere soil of core distribution area and soil of non-distribution area of Anoectochilus roxburghii (Wall.) Lindl. in

**Wutong Mountain of Guangdong Province** 

## 3 讨 论

### 3.1 土壤真菌对金线兰垂直分布的影响

本研究中,广东梧桐山金线兰核心分布区根际土 壤与非分布区土壤真菌群落的 α 多样性无显著差异, 而β多样性在金线兰核心分布区根际土壤与非分布 区土壤间存在显著差异。

供试3组土壤真菌群落均存在差异真菌类群:海拔875m的金线兰核心分布区根际土壤中绿僵菌属、隔指孢属、被孢霉属、酵母属、树粉孢属、粗糙孔菌属和 Pseudophacidium 的相对丰度高于金线兰非分布区

土壤;海拔775 m 的金线兰非分布区土壤中弯颈霉 属、Meliniomyces、Lauriomyces 和原隐球菌属以及海拔 675 m 的 金 线 兰 非 分 布 区 土 壤 中 青 霉 属、 Paraconiothyrium、木霉属、古根菌属、 Phaeoacremonium、Serendipita、拟锁瑚菌属、威克汉姆 酵母属、盾壳霉属和曲霉属的相对丰度高于金线兰核 心分布区根际土壤。说明土壤真菌群落在一定程度 上影响了金线兰的垂直分布。绿僵菌属真菌是常见 的昆虫病原真菌[27],隔指孢属真菌是捕食线虫真 菌[28], 暂未见其与植物形成菌根结构的报道, 也未见 酵母属和粗糙孔菌属的相关报道。树粉孢属真菌可 能是兰科植物的菌根真菌,天麻(Gastrodia elata Bl.) 根状茎中分离得到树粉孢属真菌 GeR6,其粗提物中 有 39.2 μg·g<sup>-1</sup>的天麻素<sup>[29]</sup>; 杓兰属 (Cypripedium Linn.)植物根内也分离到树粉孢属真菌<sup>[30]</sup>。被孢霉 属真菌被认为是潜在的兰科植物菌根真菌,蕙兰 (Cymbidium faberi Rolfe)根内分离出的被孢霉属真菌 FC5 对春兰[Cypripedium goeringii (Rchb. f.) Rchb. f.]组培苗生长有显著促进作用[31];被孢霉属真菌为 大花杓兰(Cypripedium macranthos Swartz)根际土壤真 菌的优势类群<sup>[32]</sup>;在白及[Bletilla striata (Thunb. ex Murray) Rchb. f.]、铁皮石斛(Dendrobium officinale Kimura et Migo)和扇脉杓兰(Cypripedium japonicum Thunb.)等兰科植物中也鉴定或分离到被孢霉属真 菌[33-35]。以上研究表明树粉孢属和被孢霉属真菌可 能与兰科植物共生,是金线兰潜在的菌根真菌。金线 兰核心分布区根际土壤中的差异菌属绿僵菌属、隔指 孢属、被孢霉属、酵母属、树粉孢属、粗糙孔菌属和 Pseudophacidium 在很大程度上影响着梧桐山金线兰 的垂直分布,这些菌属可能是影响金线兰垂直分布的 驱动因子之一;这其中有金线兰潜在的菌根真菌,也 有非菌根真菌,表明土壤中关键的菌根真菌可能影响 金线兰的垂直分布,而根际土壤中的部分非菌根真菌 可能也是影响金线兰垂直分布的重要因子。共发生 网络分析发现,菌根真菌与非菌根真菌之间存在密切 的相互作用,二者可能共同影响金线兰的垂直分布。

已有研究结果<sup>[36-39]</sup>表明:金线兰共生真菌主要有烟管菌属、枝孢属、毛壳菌属、炭疽菌属、角担菌属、镰刀菌属、粘帚霉属、小菇属、胶膜菌属、炭垫菌属和瘤菌根菌属(*Epulorhiza* R. T. Moore)等。还有很多真菌从金线兰中分离或检测到,如无柄盘菌属、柄孢壳菌属、硬孔菌属和裂褶菌属(*Schizophyllum* Fr.)<sup>[40]</sup>。

除瘤菌根菌属和裂褶菌属外,以上菌属在本研究中的 金线兰核心分布区根际土壤和非分布区土壤中均检 测到,且相对丰度在二者间不存在显著差异。说明并 不是所有的菌根真菌都对金线兰的垂直分布起决定 性作用。

## 3.2 土壤代谢物对金线兰垂直分布的影响

代谢物可能是维持根际土壤微生物群落结构的重要因子,代谢物可以决定微生物的食物网,调节土壤理化性质,改变土壤真菌群落结构,影响微生物的基因表达,甚至作为信息化学物质介导微生物间的相互作用<sup>[41-45]</sup>。有研究发现,土壤特性对土壤真菌群落总变异的贡献度高达 89.1%<sup>[46]</sup>。

本研究中,金线兰核心分布区根际土壤和非分布区土壤中显著差异的代谢物主要为脂质和类脂质化合物、有机酸及其衍生物,主要显著差异代谢物在KEGG数据库中富集到的代谢通路主要与氨基酸和脂质代谢有关。

有机酸是土壤中主要的水溶性物质,可进入根细 胞影响植物生长发育[47-48]。本研究中,金线兰核心 分布区根际土壤和非分布区土壤中显著差异的有机 酸多为氨基酸类化合物,在金线兰核心分布区根际土 壤中显著上调的差异氨基酸类化合物为 N6,N6,N6-三甲基-L-赖氨酸,而在金线兰非分布区土壤中显著 上调的差异氨基酸类化合物为甜菜碱、S-腺苷-L-高 半胱氨酸。N6,N6,N6-三甲基-L-赖氨酸是组蛋白 的组成部分、肉碱的前体和脂肪酸氧化的辅酶[49],参 与赖氨酸降解。甜菜碱又称 N,N,N-三甲基甘氨酸, 参与甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢。S-腺苷-L-高半 胱氨酸由 S-腺苷-L-甲硫氨酸去甲基化形成 $^{[50]}$ ,参 与半胱氨酸和甲硫氨酸代谢,氨基酸的生物合成。氨 基酸属于可溶性有机氮,是能被植物和微生物有效利 用的氮源,研究发现土壤氨基酸组成随着海拔和地理 位置而变化[51-52],不同植物对不同种类氨基酸的吸 收能力差异较大[53]。表明金线兰及其根际真菌利用 的氨基酸可能主要为赖氨酸,对甘氨酸、丝氨酸和苏 氨酸等的利用有限。因而,土壤中 N6,N6,N6-三甲 基-L-赖氨酸可能会从氮源供应上影响金线兰的垂 直分布。

脂质是普遍存在的化合物,具有许多关键的生物 学功能,可以储存能量、参与信号转导,是细胞膜、皮 下脂肪和角质蜡的关键成分<sup>[54-55]</sup>,是土壤微生物的 主要碳源<sup>[56]</sup>。在金线兰核心分布区根际土壤中显著 上调的差异脂质和类脂质化合物有 3-异丙基苹果酸、4-胆甾烯-3-酮、乙酸香茅酯、正癸酸、14,15-脱氢萜烯酸、牛磺鹅去氧胆酸和茯苓酸。4-胆甾烯-3-酮是固醇脂类化合物,其参与的类固醇降解及不同环境中的微生物代谢途径均被富集。正癸酸是脂肪酸类化合物,其参与的脂肪酸生物合成途径被富集。14,15-脱氢萜烯酸和 3-异丙基苹果酸是脂肪酸类化合物,茯苓酸和乙酸香茅酯是孕烯醇酮脂类化合物,这4个化合物可能作为不同结构的脂质参与脂肪酸和萜烯等脂质的代谢过程,还可能通过参与其他生命活动影响地上植物生长,如 3-异丙基苹果酸作为缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成的中间体可以参与氨基酸代谢<sup>[57]</sup>。上述显著差异脂质和类脂质化合物可能通过碳源营养途径影响金线兰的垂直分布。

差异代谢物分析结果表明:对于海拔 875 m 的金线兰核心分布区根际土壤与海拔 775 m 的金线兰非分布区土壤间以及海拔 875 m 的金线兰核心分布区根际土壤与海拔 675 m 的金线兰非分布区土壤间的代谢物差异,糖类及其结合物的贡献度较小。推测,相对于糖类及其结合物,金线兰及其根际真菌更倾向于利用脂质和类脂质化合物作为碳源。

## 3.3 土壤差异真菌群落和代谢物关联作用对金线兰 垂直分布的影响

土壤中根系分泌物等成分可以招募或抑制某些 真菌在根际形成特定的真菌组合,某些成分可以驱动 根际真菌群落的聚集[58]。同时,根际真菌群落也会 影响土壤代谢物,二者共同影响植物在野外的真菌招 募能力,最终影响植物的分布[59-60]。本研究结果显 示:总体上看,在金线兰核心分布区根际土壤中,显著 上调的正癸酸和乙酸香茅酯的含量与相对丰度较高 的被孢霉属和粗糙孔菌属呈显著正相关;显著上调的 茯苓酸含量与相对丰度较高的酵母属和隔指孢属呈 显著正相关;显著上调的 N6,N6,N6-三甲基-L-赖氨 酸含量与相对丰度较高的树粉孢属呈显著正相关。 在金线兰非分布区土壤中,显著上调的甜菜碱含量与 相对丰度较高的 Cadophora 呈显著正相关。金线兰 核心分布区根际土壤中显著上调的正癸酸含量与金 线兰非分布区根际土壤中相对丰度较高的盾壳霉属 呈显著负相关,金线兰核心分布区根际土壤中显著上 调的14,15-脱氢萜烯酸含量与金线兰非分布区土壤 中相对丰度较高的青霉属呈显著负相关。综上所述, 金线兰核心分布区根际土壤中含量较高的显著差异 代谢物与金线兰核心分布区根际土壤中相对丰度较高的菌属多呈显著正相关,金线兰核心分布区根际土壤中含量较低的显著差异代谢物与金线兰核心分布区根际土壤中含量较低的菌属多呈显著正相关;金线兰核心分布区根际土壤中含量较高的显著差异代谢物与金线兰非分布区土壤中相对丰度较高的菌属多呈显著负相关,金线兰核心分布区根际土壤中含量较低的显著差异代谢物与金线兰非分布区土壤中相对丰度较低的菌属多呈显著负相关。金线兰核心分布区根际土壤和非分布区土壤中显著差异代谢物与主要菌属关联密切。

N6.N6,N6-三甲基-L-赖氨酸是赖氨酸的甲基 化衍生物。本研究中,N6,N6,N6-三甲基-L-赖氨酸 含量与金线兰核心分布区根际土壤中相对丰度较高 的树粉孢属呈显著正相关。氨基酸除了参与氨基酸 代谢,还常与糖类协同调节许多涉及微生物群落活动 的途径和循环,如糖酵解和柠檬酸循环[48,61]。14, 15-脱氢萜烯酸含量与金线兰非分布区土壤中相对 丰度较高的青霉属呈显著负相关。14,15-脱氢萜烯 酸是一种不饱和脂肪酸,与土壤真菌密切相关,有研 究表明脂肪酸作为植物来源的碳源,可以促进丛枝菌 根真菌的生长及定植[56,62]。丛枝菌根真菌是最古老 的内生真菌,与兰科菌根真菌共享一类菌根真菌与植 物的共生基因[63]。基于丛枝菌根真菌和兰科菌根真 菌相似的共生机制[64],脂肪酸在兰科植物与菌根真 菌相互作用机制中也可能具有相似的功能。推测 N6,N6,N6-三甲基-L-赖氨酸可能是金线兰菌根真 菌重要的氮源,能够招募树粉孢属或影响其定植,进 而促进金线兰的生长发育,影响金线兰的垂直分布。

Huang 等<sup>[65]</sup> 研究发现,拟南芥〔Arabidopsis thaliana(Linn.) Heynh.〕根中合成的三萜类化合物 拟南芥素、拟南芥酰脂肪酸酯和阿拉伯素为特殊脂质化合物,可以调节其根际微生物群落的分布。Ghirardo等<sup>[66]</sup>的研究结果表明:在菌根真菌和兰科植物的共生原球茎附近生长的外部真菌菌丝体中的脂质化合物含量显著升高。本研究中,部分显著差异的脂质化合物含量与金线兰核心分布区根际土壤中主要菌属相对丰度具有显著相关关系。例如:在金线兰核心分布区根际土壤中,显著上调的乙酸香茅酯和正癸酸的含量与相对丰度较高的被孢霉属和粗糙孔菌属呈显著正相关。乙酸香茅酯是孕烯醇酮脂类化合物,正癸酸作为饱和脂肪酸可参与脂肪酸合成途

径<sup>[67]</sup>。在金线兰核心分布区根际土壤中,显著上调的茯苓酸含量与相对丰度较高的酵母属和隔指孢属呈显著正相关。茯苓酸常为多孔菌科(Polyporaceae)真菌茯苓[Wolfiporia cocos (Schwein.) Ryvarden et Gilb.]的代谢产物,是一种三萜类化合物,可增强脂肪细胞对葡萄糖的摄取能力。说明脂质化合物乙酸香茅酯、正癸酸和茯苓酸与金线兰菌根真菌被孢霉属、粗糙孔菌属、酵母属和隔指孢属间存在密切的代谢活动,通过碳源的营养流动影响金线兰的生长发育,进而驱动其分布。

以上研究表明:金线兰核心分布区根际土壤与非分布区土壤中存在相互作用模式不同的真菌群落和代谢物,进一步说明金线兰根际土壤中重要的碳源和氮源与菌根真菌间的相互作用可影响金线兰的垂直分布。

## 4 结 论

金线兰核心分布区根际土壤与非分布区土壤真 菌物种组成分区明显,金线兰非分布区土壤真菌群落 与金线兰核心分布区根际土壤真菌群落虽然有较为 相当的物种丰富度和均匀度,但群落结构、物种组成、 互作网络关系存在显著不同。土壤中关键的菌根真 菌可能是影响金线兰垂直分布的重要因子,但并非所 有的菌根真菌都会影响金线兰的垂直分布。金线兰 核心分布区根际土壤代谢物与非分布区土壤代谢物 组成明显不同,金线兰根际土壤中显著上调的代谢物 参与的氨基酸和脂质等代谢过程大多被显著富集,可 能作为金线兰及其菌根真菌重要的碳源和氮源而影 响金线兰的垂直分布。同时,金线兰核心分布区根际 土壤中相对丰度较高的菌属与显著差异代谢物间多 为显著的正相关关系,真菌与代谢物的相互作用模式 同金线兰非分布区土壤存在明显差异。金线兰根际 土壤中差异真菌有些是金线兰潜在的菌根真菌,有些 是非菌根真菌,推测金线兰根际土壤中非菌根真菌与 菌根真菌间存在密切的相互作用,通过碳源、氮源的 营养流动影响金线兰的生长发育,进而驱动其垂直 分布。

#### 参考文献:

[1] YE S Y, SHAO Q S, ZHANG A L. Anoectochilus roxburghii: a review of its phytochemistry, pharmacology, and clinical applications [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 209:

- 184-202
- [2] HO Y, CHEN Y F, WANG L H, et al. Inhibitory effect of Anoectochilus formosanus extract on hyperglycemia-related PD-L1 expression and cancer proliferation [J]. Frontiers in Pharmacology, 2018, 9: 807.
- [3] LIU Y T, TANG T T, DUAN S Q, et al. The purification, structural characterization and antidiabetic activity of a polysaccharide from Anoectochilus roxburghii [J]. Food and Function, 2020, 11 (4): 3730-3740.
- [4] GAO H S, DING L L, LIU R, et al. Characterization of Anoectochilus roxburghii polysaccharide and its therapeutic effect on type 2 diabetic mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 179; 259-269.
- [5] RASMUSSEN H N, DIXON K W, JERSÁKOVÁ J, et al. Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements[J]. Annals of Botany, 2015, 116; 391-402.
- [6] RASMUSSEN H N, RASMUSSEN F N. Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style [J]. Oikos, 2009, 118: 334-345
- [7] GEBAUER G, MEYER M. <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association [ J ]. New Phytologist, 2003, 160: 209-223.
- [8] MCCORMINCK M K, WHIGHAM D F, CANCHANI-VIRUET A. Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics [J]. New Phytologist, 2018, 219: 1207-1215.
- [9] LI T Q, WU S M, YANG W K, et al. How mycorrhizal associations influence orchid distribution and population dynamics [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 647114.
- [10] 王 佩, 孟广云, 毛如志, 等. 不同环境栽培对天麻土壤理化性质、微生物、代谢物的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(14): 164-174.
- [11] 于雪梅. 金线莲与内生真菌相互作用机理研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2000: 36-40.
- [12] YE B Z, WU Y B, ZHAI X, et al. Beneficial effects of endophytic fungi from the *Anoectochilus* and *Ludisia* species on the growth and secondary metabolism of *Anoectochilus roxburghii*[J]. ACS Omega, 2020, 5: 3487-3497.
- [13] 潘云云,张寿洲,王晓明,等.深圳地区野生兰科植物资源及 其区系特征[J].亚热带植物科学,2015,44(2):116-122.
- [14] 陈建兵,王美娜,潘云云,等.深圳野生兰花[M].北京:中国林业出版社,2020:1-210.
- [15] 刘 亚, 唐光大, 洪文君, 等. 深圳梧桐山毛棉杜鹃根内真菌的分离与鉴定[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(29): 9-12.
- [ 16 ] RAO G D, SUI J K, ZHANG J G. Metabolomics reveals significant variations in metabolites and correlations regarding the maturation of walnuts ( *Juglans regia* L.) [ J ]. Biology Open, 2016, 5: 829-836.
- [17] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J].

- Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [18] MAGOČ T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [19] BOKULICH N A, SUBRAMANIAN S, FAITH J J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing [J]. Nature Methods, 2013, 10(1): 57-59.
- [20] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [21] KÕLJALG U, NILSSON R H, ABARENKOV K, et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi [J]. Molecular Ecology, 2013, 22: 5271-5277.
- [22] WHITE J R, NAGARAJLAN N, POP M. Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples [J]. PLoS Computational Biology, 2009, 5 (4): e1000352.
- [23] BOULESTEIX A-L, STRIMMER K. Partial least squares: a versatile tool for the analysis of high-dimensional genomic data[J]. Briefings in Bioinformatics, 2007, 8(1): 32-44.
- [24] YUAN M, BREITKOPF S B, YANG X M, et al. A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue [J]. Nature Protocols, 2012, 7(5): 872-881.
- [25] 王亚妮, 王丽琨, 苗宗保, 等. 流苏石斛根部内生真菌多样性研究[J]. 生态科学, 2014, 33(4): 672-679.
- [26] ZHANG J, MU X L, XIA Y K, et al. Metabolomic analysis reveals a unique urinary pattern in normozoospermic infertile men [J]. Journal of Proteome Research, 2014, 13: 3088-3099.
- [27] 杨 亿. 不同生境土壤中绿僵菌的物种及遗传多样性研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2019: 1-4.
- [28] 祝明亮, 张克勤, 李天飞. 隔指孢属 rDNA ITS 区间限制性片断 长度多态性(RFLP)分析[J]. 山地农业生物学报, 2001, 20 (3): 174-179.
- [29] LIANG X X, XIONG C, GAO Y Y, et al. Antioxidantive activities and gastrodin determination of extracts of endophytic fungi isolated from *Gastrodia elata* Bl. [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2020, 29(3): 206-213.
- [30] 徐玲玲,张 焱,周 敏,等. 三种杓兰根相关真菌多样性和 生态功能[J]. 微生物学通报, 2019, 46(9): 2134-2145.
- [31] 张晋彦. 春兰'宋梅'和杂交兰组培苗的菌根化研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2016: 10-24.
- [32] 付亚娟, 张 剑, 付琦媛, 等. 大花杓兰根际土壤真菌及兰科 菌根真菌多样性分析[J]. 西南农业学报, 2019, 32(3): 573-578.
- [33] 王 芬. 两种兰科植物组织培养及有益菌根真菌的筛选[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2012: 20-30.
- [34] 刁海欣,黄清俊,苗利媛,等.土壤含水量对白芨与菌根真菌 共生关系的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(22):122-130.
- [35] 周 珊. 扇脉杓兰(Cypripedium japonicum Thunb.)内生和根际

- 真菌多样性研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2020: 16-88.
- [36] 郭顺星, 陈晓梅, 于雪梅, 等. 金线莲菌根真菌的分离及其生物活性研究[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(7): 443-445.
- [37] 王 涵, 林清强, 胡雪娇, 等. 金线莲内生促生真菌的筛选及 其促生机制探讨[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2019, 35(3): 72-79, 95.
- [38] 叶冰竹. 金线莲内生真菌促进宿主生长代谢及增强抗病性作用研究[D]. 上海: 海军军医大学, 2019: 1-2.
- [39] 周 康, 吴文碟, 宋希强, 等. 金线莲促生内生真菌的筛选与鉴定[J]. 热带生物学报, 2018, 9(4): 440-444.
- [40] 唐 齐. 金线莲菌根真菌的分离、筛选和应用研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2017: 13-28.
- [41] HU L F, RORERT C A M, CADOT S, et al. Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota [J]. Nature Communications, 2018, 9: 2738.
- [42] VOGES M J E E E, BAI Y, SCHULZE-LEFERT P, et al. Plant-derived coumarins shape the composition of an Arabidopsis synthetic root microbiome [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116 (25): 12558-12565.
- [43] LIU K H, DING X W, WANG J J. Soil metabolome correlates with bacterial diversity and co-occurrence patterns in root-associated soils on the Tibetan Plateau[J]. Science of the Total Environment, 2020, 735: 139572.
- [44] 唐燕静,郭顺星,陈 娟. 兰科植物与菌根真菌专一性研究进展[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2021, 42(3): 63-74
- [45] 徐小博,王选年,徐 萍,等.不同产地高节竹竹叶次生代谢 物与土壤微生物的关系分析[J]. 西南林业大学学报(自然科学),2021,41(4):18-24.
- [46] 周煜杰,贾 夏,赵永华,等.秦岭火地塘真菌群落海拔分布格局[J].应用生态学报,2021,32(7):2589-2596.
- [47] VEACH A M, MORRIS R, YIP D Z, et al. Rhizosphere microbiomes diverge among *Populus trichocarpa* plant-host genotypes and chemotypes, but it depends on soil origin [J]. Microbiome, 2019, 7: 76.
- [48] SUN L T, WANG Y, MA D X, et al. Differential responses of the rhizosphere microbiome structure and soil metabolites in tea (*Camellia sinensis*) upon application of cow manure [J]. BMC Microbiology, 2022, 22: 55.
- [49] KAZAKS A, MAKRECKA-KUKA M, KUKA J, et al. Expression and purification of active, stabilized trimethyllysine hydroxylase [J]. Protein Expression and Purification, 2014, 104: 1-6.
- [50] 吕玉彬. 新型戊二酰胺类 S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶抑制剂的研发[D]. 桂林: 桂林医学院, 2021: 1-3.
- [51] WARREN C R. Quaternary ammonium compounds can be abundant in some soils and are taken up as intact molecules by plants [J]. New Phytologist, 2013, 198; 476-485.
- [52] CAO X C, MA Q X, ZHONG C, et al. Elevational variation in soil

- amino acid and inorganic nitrogen concentrations in Taibai Mountain, China[J]. PLoS ONE, 2016, 11(6): e0157979.
- [53] 冯彦丽. 高寒草甸植物吸收土壤有机氮的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2020: 44-63.
- [54] FURSE S, SHEARMAN G C. Do lipids shape the eukaryotic cell cycle? [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2018, 1863(1): 9-19.
- [55] XIONG W, JOUSSET A, GUO S, et al. Soil protist communities form a dynamic hub in the soil microbiome[J]. The ISME Journal, 2018, 12(2): 634-638.
- [56] SUGIURA Y, AKIYAMA R, TANAKA S, et al. Myristate can be used as a carbon and energy source for the asymbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117 (41): 25779-25788.
- [57] LINGWOOD D, SIMONS K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle [J]. Science, 2010, 327(5961): 46-50.
- [58] BALLAUFF J, SCHNEIDER D, EDY N, et al. Shifts in root and soil chemistry drive the assembly of belowground fungal communities in tropical land-use systems [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2021, 154; 108140.
- [59] BATTY A L, DIXON K W, BRUNDRETT M, et al. Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a mediterranean bushland[J]. New Phytologist, 2001, 152; 511-520.
- [60] LIU H J, XIONG W, ZHANG R F, et al. Continuous application of different organic additives can suppress tomato disease by inducing the healthy rhizospheric microbiota through alterations to

- the bulk soil microflora[J]. Plant and Soil, 2018, 423; 229-240.
- [61] BLENCKE H-M, HOMUTH G, LUDWIG H, et al. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus* subtilis: regulation of the central metabolic pathways[J]. Metabolic Engineering, 2003, 5: 133-149.
- [62] JIANG Y N, WANG W X, XIE Q J, et al. Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi [J]. Science, 2017, 356(6343): 1172-1175.
- [63] MIURA C, YAMAGUCHI K, MIYAHARA R, et al. The mycoheterotrophic symbiosis between orchids and mycorrhizal fungi possesses major components shared with mutualistic plantmycorrhizal symbioses [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2018, 31(10): 1032-1047.
- [64] FAVRE-GODAL Q, GOURGUILLON L, LORDEL-MADELEINE S, et al. Orchids and their mycorrhizal fungi: an insufficiently explored relationship[J]. Mycorrhiza, 2020, 30: 5-22.
- [65] HUANG A C, JIANG T, LIU Y X, et al. A specialized metabolic network selectively modulates *Arabidopsis* root microbiota [J]. Science, 2019, 364(6440): eaau6389.
- [66] GHIRARDO A, FOCHI V, LANGE B, et al. Metabolomic adjustments in the orchid mycorrhizal fungus *Tulasnella calospora* during symbiosis with *Serapias vomeracea* [J]. New Phytologist, 2020, 228: 1939–1952.
- [67] 张 蒙, 丛方地, 任德忠,等. 静置的固定化荧光假单胞菌脂肪酶(PFL)生物反应器中催化合成乙酸香茅酯[J]. 生物加工过程, 2020, 18(5): 572-576.

(责任编辑:郭严冬)

# 公益宣传: 国际臭氧层保护日

国际臭氧层保护日(International Ozone Layer Protection Day)为每年的9月16日,旨在纪念1987年9月16日在加拿大蒙特利尔召开的国际臭氧层保护大会通过了《关于消耗臭氧层物质的蒙特利尔议定书》。1974年,美国加利福尼亚大学教授 Frank Sherwood Rowland 和 Mario Molina 发现地球表面的臭氧层出现了严重的空洞,并造成温室效应加剧,长期发展下去将严重影响全球气候、生态平衡和农业生产。为了唤起公众对臭氧层的保护意识,1995年1月23日联合国大会决定将每年的9月16日定为国际臭氧层保护日。

臭氧层是指距离地球表面 25~30 km 处臭氧分子相对富集的大气平流层。臭氧层能吸收太阳光中 99%以上的紫外线,保护地球上的人类和动植物免遭短波紫外线的伤害,被誉为地球上生物生存和繁衍的保护伞。此外,臭氧层还对地球的能量平衡和气候稳定起到重要作用,影响植物生长和生态系统平衡。因此,国际臭氧层保护目的设立旨在呼吁全世界关注臭氧层的保护,提醒人类减少对臭氧层有害的物质的生产和使用,保护地球上的生命和生态系统。