

DOI:10.12403/j.1001-1498.20220168

横断山脉亚高山带几种高山栎林下 丛枝菌根菌 (AMF) 调查

李鸿博¹, 黄耀华¹, 康定旭¹, 伍建榕², 马焕成^{1*}, 陈诗^{1*}

(1. 西南林业大学, 西南地区生物多样性保育国家林业和草原局重点实验室, 云南 昆明 650224; 2. 云南省高校森林火灾预警控制重点实验室, 西南林业大学生物多样性保护学院, 云南 昆明 650224)

摘要: [目的] 明确横断山脉亚高山带高山栎林下 AMF 孢子分类地位。[方法] 自横断山脉亚高山带不同地段选择 6 个高山栎根围土壤和根系样本, 对其土壤中 AMF 孢子利用湿筛沉淀法进行选取。利用 AMF 特异引物对其 ITS 区段 18S rRNA 基因进行扩增, 结合形态学与分子生物学手段对其进行鉴定, 构建系统发育演化树并推测其亲缘关系。[结果] 四川、西藏高山栎林下土壤 AMF 孢子与根系克隆为类球囊霉属 (*Paraglomus*), 云南香格里拉高山栎林下土壤 AMF 孢子与根系克隆为球囊霉属 (*Glomus*)。克隆结果表明: AMF 能够广泛存在于高山栎组植物根系。根系苯胺蓝染色结果可见明显类似丛枝和泡囊的结构。综合高山栎土壤 AMF 孢子与根际 AMF 鉴定结果认为, 高山栎林下存在大量 AMF, 且目前不同采样地高山栎林下根围土和根系分别仅发现一种 AMF 存在, 提示各高山栎同时仅能与一种 AMF 发生共生关系。此外, 高山栎林下 AMF 孢子在演化过程中发生分化并介于 *Paraglomus* 与 *Glomus* 的分类地位之间, 且西藏、四川地区 AMF 与云南香格里拉地区 AMF 存在差异。[结论] 本研究发现, 自然条件下横断山脉亚高山地区高山栎林下菌塘普遍存在 AMF, 且云南香格里拉地区高山栎根系 AM 与 *Glomus* 属更接近, 说明 AM 在长期演化过程中随地域迁移出现分化。为了解横断山脉亚高山带高山栎林下 AMF 的形成与演化提供理论参考。

关键词: 横断山脉高山栎; 丛枝菌根真菌 (AMF); 系统发育构建; 分类地位

中图分类号: Q945.31

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2023)01-0079-12

菌根是建立于植物根系和土壤菌根真菌之间的古老共生体系, 在自然界中存在已有 4 亿年之久^[1], 有研究统计, 地球上大约 86% 的陆生被子植物能够与真菌互作形成菌根共生体^[2-3]。丛枝菌根真菌 (AMF) 作为植物根系所在土壤环境中微生物群落的重要组成者之一, 在个体层面可以促进植物对 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子的有效吸收, 帮助植物抵御逆境中来自生物或非生物的胁迫, 宏观群落层面则能够优化植被分布, 森林中地下的庞大菌根系统能够将林木个体有机相连而形成一个物质资源共

享体, 加速种群建成并形成植物优势种, 从而改变生态格局^[4-6], 可以说, 菌根真菌和植物共生, 是维护森林生态系统稳定及发展的基础^[7-8]。

高山栎 (*Quercus* spp.) 作为一类广泛分布在我国西部川、滇、藏地区的常绿硬叶栎类植物, 是横断山脉地区重要的野生植被群落优势种, 多以成规模的林地出现或以离散点状方式与其他乔木混生长于海拔 1 800~4 800 m 的地区^[9-10], 其热值高、生长速度快及萌蘖更新能力强的特点对该地区生态环境保持具有重要意义^[11-12]。当前, 外界公认

收稿日期: 2022-04-08 修回日期: 2022-06-01

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFD100200X) 国家级; 云南教育厅科学研究基金产业化培育项目 (2016CYH14) 省市级; 国家自然科学基金 (31860208) 国家级; 西南林业大学木棉纤维人工林产业化培育省创新团队 (2018HC014) 区市级; 国家自然科学基金 (31560207) 国家级

* 通讯作者: 马焕成, 博士, 教授, 研究方向: 干旱河谷生态修复, Email: mhc@swfu.edu.cn; 陈诗, 在读博士生, 实验师。研究方向: 植物生理生态。Email: cshi1981@qq.com

松科植物共生菌根类型为外生菌根已毋庸置疑,而栎属植物存在外生菌根共生现象的同时,是否能与内生菌根真菌共生尚鲜有报道。杨淑娇等^[13]对云南香格里拉高山栎和高山松(*Pinus densata* Mast.)的林下菌塘微生物分布研究发现,高山栎林下菌塘有大量AMF存在,且高山栎林下菌塘中真菌和AMF生物量显著高于高山松,但AMF种类丰度只有1种,综合高山栎和高山松林型下菌塘的多种微生物比较认为,菌塘中的微生物类型是其菌落结构组成的重要影响因素,林型则未影响林下微生物群落特征构成。该研究说明在错综复杂的地下根系网络中,不同类型土壤微生物之间的相互联系往往对宿主植物林下菌群结构和分布具有重要影响。张中峰等^[14]将摩西球囊霉(*Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trapp)和根内球囊霉(*Glomus intraradices* Schenck & Smith)接种至青冈栎(*Quercus glauca* (Thunberg) Oersted)幼苗发现,AMF能够显著促进青冈栎幼苗叶面积和生物量增长,提升幼苗成活率,该结果表明,在人为干扰措施下,栎属植物能够与AMF形成互惠共生关系。基于上述前人研究不难推测,AMF与高山栎组植物间应当存在相应的联系。这种联系是否具有广泛性和普遍性?同为被子植物门下的栎属植物高山栎根系在非人为干扰的野生生境中,其根际及根系是否同AMF共生等问题值得深入探究。基于此,本研究假设横断山脉亚高山地区高山栎林下同样具有AMF分布,并且在自然条件下高山栎植物

根系存在AMF。分三步验证上述假设:第一,利用湿筛沉淀法对采自横断山脉不同地区高山栎林下土壤样本进行孢子湿筛,利用形态学、分子生物学结合的手段对其种类进行鉴定。第二,利用分子克隆方法选取针对AMF 18S rRNA gene的特异引物对高山栎外根际潜在的AMF进行扩增,测序检验扩增结果中是否存在AMF。第三,利用染色观察的方法观察高山栎根系样本内是否存在典型的AMF丛枝、泡囊结构,结合对比单孢提取与克隆扩增结果,以期明确横断山脉亚高山带自然环境中生长的高山栎林下根围、根际AMF种类,揭示横断山脉亚高山高山栎林下AMF的演化方向。

1 采样地与材料

1.1 采样地概况

横断山脉作为世界年轻的山脉群之一,纵跨川、滇二省西部及西藏东部,山岭曲折蜿蜒,谷高差悬殊,植被分布以海拔梯度差异明显,受高空西风环流、印度洋及太平洋季风环流影响,气候主要分为干湿两季,降水多集中于5—10月,但因地形地势复杂,地域辽阔,年均气温13.6℃,年降水量942.6mm,部分地区降雨差异较明显^[9,15]。由于该地区地势陡峭,降雨所致的水土流失成为潜在威胁。

1.2 样品采集

于2020年7月、10月和2021年8月分别前往位于28°45'3"~30°59'35" N, 97°40'25"~102°

表1 横断山脉亚高山几种高山栎样地分布情况调查表

Table 1 Survey of the distribution of several types of *Quercus* sample plots in the subalpine regions of Transverse Mountains

树种 species	采集地 collected location	经纬度 Altitude & Longitude	海拔/m Elevation	树高/m Tree height	胸径/地径 DBH/cm	坡度/(°) Slope	编号 Sample NO.
高山栎 <i>Quercus semicarpifolia</i>	西藏林芝察隅 国道219、559旁	97°29'17"~ 97°29'19" E 28°50'7"~ 28°50'27" N	2 610	28	92	33	GSL1
				14	20	3	
				18	40	4	
				24	80	4	
长穗高山栎 <i>Quercus longispica</i>	西藏林芝察隅国道559旁	97°11'29" E 29°13'31" N	3 440	2.0	6	阳坡12	GSL2
刺叶高山栎 <i>Quercus spinosa</i>	四川阿坝马尔康县梦笔山	31°43'28" E 102°16'38" N	3 630	2.2	4	半阳坡28	GSL3
川滇高山栎 <i>Quercus aquifolioides</i>	四川阿坝巴郎山国道310旁	102°50'18" E 30°59'35" N	3 480	2.1	4.5	阳坡30	GSL4
高山栎 <i>Quercus semicarpifolia</i>	西藏察隅桑久村219国道	101°8'42" E 31°52'42" N	2 970	1.8 3.2	8 18	阳坡48	GSL5
乔木型高山栎(未鉴定) <i>Quercus arborescens</i> (not identified)	云南香格里拉奔子栏镇附近	99°11'46" E 28°11'51" N	2 740	17	55	阳坡30	G

50°18" E (四川、西藏等地) 以及 99°11'46"E、28°11'51"N (云南香格里拉) 地段, 横断山脉亚高山带的不同海拔 (2 340~3 630 m) 地区 (表 1) 阳坡地段高山栎天然林, 各高山栎林均为乔木或灌木纯林, 林下无其他植被。采集其根部 10~30 cm 处的土壤混合装入 9 号自封袋, 沿主根对高山栎根系进行挖掘, 找到高山栎根系侧根、须根等与根际土装入自封袋, 放入含冰袋的保温箱隔离贮存, 标记并编号, 带回实验室将根系于 -80 °C 保存, 土壤平铺风干置于塑封袋用于后续实验。

2 试验方法

2.1 高山栎根系土壤 AMF 湿筛与鉴定

2.1.1 高山栎根部土壤 AMF 孢子筛取 将高山栎根部土壤过 40 目筛后, 精确称量 20 g 土壤, 倒入玻璃烧杯, 加 500 mL 超纯水浸泡 12 h 后, 利用湿筛沉淀法^[16-17]过 4 目 (100 目 165 μm、140 目 105 μm、200 目 74 μm、300 目 50 μm) 筛出并将每一目筛出的孢子及细土倒入容积为 1 L 的烧杯静置, 静置 15 min 后倒 300 mL 入封液漏斗, 后向烧杯内加水至 500 mL。静置 15 min 后向漏斗中填 200 mL ddH₂O, 此步骤重复 3 次。后静置 15 min 并弃漏斗废液 300 mL。将每一目筛孢子用的封液漏斗置于铁架台, 使用抽滤机 (Rocker 600) 将孢子抽滤至实验前预备好的画有方格的滤纸上, 编号标记并放入 4 °C 冰箱保存备用。

2.1.2 孢子形态学鉴定与孢子密度统计 在体式镜 (LAICA SE6) 下从培养皿中的滤纸上挑出形态、颜色等不同的孢子, 单个置于滴加 ddH₂O 的载玻片上在光学显微镜 (LEICA MC170) 下观察并拍照, 记录孢子颜色、大小, 轻轻将其压破, 观察孢壁颜色、类型、厚度、层数及内含物特征等, 载玻片上还可加入 Melzer's 染液观察是否存在显色反应^[18], 并拍照保存。同时, 每拍摄一个孢子将与其形态相同的孢子挑至 1.5 mL 的离心管内 -20 °C 冰冻保存, 以便做分子鉴定时一一对应。参照《VA 菌根真菌鉴定手册》(1988) 和 <http://invam.caf.wvu.edu> 网址上的图片对照及近年来所发表的文献成果, 进行形态学鉴定^[19]。

在体式镜下统计每个土样下的孢子数目, 并计算出孢子密度, 每个土样 4 次重复。

孢子密度 (SD): 指每克土样中丛枝菌根真菌

的孢子个数。

$SD = \text{某土样中 AMF 所有孢子数} / \text{土壤干质量}^{[20]}$ 。

2.1.3 孢子的分子生物学鉴定 利用 Chelex-100 提取单孢 DNA, 向装有孢子的离心管中加入 600 μL ddH₂O, 置入超声波震荡洗涤仪器 (30 Hz) 震荡 3 min, 挑出孢子转移至新的离心管, 重复上述步骤以清洗孢子表面存在的杂质。将清洗后的单孢转移至新的离心管中 (1.5 mL), 加入 30 μL TE buffer, 置于盛有液氮的保温瓶速冻, 取已灭菌的研磨棒在体式显微镜下将孢子研碎。加入 15 μL 20% Chelex-100 后置于金属恒温水浴锅 98 °C 裂解 10 min, 放入 -20 °C 冰箱冰浴 5 min 后取出, 置于离心机 (Eppendorf Centrifuge 5417R) 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 所得上清液即为用于扩增的孢子的 DNA 模板。

参照《菌根学》^[21] 中的扩增办法, 对孢子 DNA 模板进行巢式 PCR 扩增。第一轮扩增上下游引物为 GeoL1 (5'-ACCTTGTTACGACTTTTACTTCC-3'), GeoA2 (5-CCAGTAGTCATATGCTTGTC TC-3') 反应体系为 50 μL (ddH₂O 20 μL, Taq PCR Master Mix 25 μL, GeoL1 1.5 μL, GeoA2 1.5 μL, DNA 2 μL)。94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 其中变性、退火、延伸进行 35 个循环, 后 72 °C 延伸 10 min。将扩增后的 PCR 原液稀释 10~20 倍作为第二轮 DNA 扩增模板, 第二轮 PCR 上下游引物为 AM1 (5'-GTTTCCCCTAAGGCGCCGAA-3') 和 NS 31-GC (5'-TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3') 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 45 s, 其中变性、退火、延伸进行 35 个循环, 后 72 °C 延伸 7 min, 回收 PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳 (110 V, 25 min) 经凝胶成像系统 (Molecular Imager GEL Doc TM XR) 检测, 观察结果, 拍照并记录。将条带清晰的产物送擎科生物公司 (TSINGKE 昆明) 测序分析。

2.2 高山栎根际潜在的 AMF 鉴定

2.2.1 高山栎根际 AMF 分子克隆 为证明高山栎根系内外根际存在 AMF, 取 -80 °C 冷冻保存的西藏、四川 (GSL1-a, GSL4-a) 以及香格里拉地区的高山栎根系 (G) 样本, 置于流水下冲洗根系表面后, 分别剪成 1 cm 长的小段放入 1.5 mL 的离心管中, 加入 75% 的酒精后剧烈震荡 30 s, 将根

系取出至 ddH₂O 下冲洗, 后放入已灭菌的研钵加液氮速冻并研磨至粉末状。利用试剂盒 (EZUP 柱式植物基因组 DNA 抽提试剂盒, SANGONG), 严格按照盒内使用说明书的操作步骤提取高山栎根系总 DNA, 使用 AMF 的特异上下游引物 AML1, AML2 对高山栎内外根际潜在的 AM 真菌 DNA 进行扩增。反应体系为 50 μL(ddH₂O 24.8 μL, Taq PCR Master Mix 16.2 μL, AML1、AML2 各 2.5 μL, DNA 4 μL)。步骤为 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 54 °C 复性 1 min, 72 °C 退火 2 min, 其中变性、复性、退火进行 35 个循环, 后 72 °C 延伸 10 min。之后经凝胶电泳 (同 2.1.3) 检测后, 利用 PCR 产物纯化回收试剂盒, 纯化回收产物, 使用克隆试剂盒 (零背景 TOPO-TA 克隆试剂盒) 严格按照使用说明将回收的 DNA 插入质粒载体。于 37 °C 在 LB 液体培养基中培养 1 h (将液体培养基放入摇床 180~200 rpm 震荡培养)。培养完成后在超净工作台下取 200 μL 菌液涂布于提前加入氨苄青霉素 (AMP) 的 LB 固体培养基上, 待培养基吸收后封存, 37 °C 恒温培养 12~16 h。

在超净工作台下将培养好的菌落用无菌的移液器吸头 (量程为 20 μL) 挑入提前加装 10 μL ddH₂O 的 PCR 管并抽吸混匀, 利用 AML1 和 AML2 引物对 DNA 模板进行扩增。反应体系为 50 μL(ddH₂O 22.8 μL, Taq PCR Master Mix 20.2 μL, AML1、AML2 各 2.5 μL, DNA 2 μL)。94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 45 s, 65 °C 复性 1 min, 72 °C 退火 45 min, 其中变性、复性、退火进行 35 个循环, 后 72 °C 延伸 10 min。经凝胶电泳检测后将扩增结果良好的样本送至测序公司 (SanGong 昆明) 测序。

2.2.2 高山栎根系 AMF 染色观察 分别将 2 次采集的根系须根样本剪成 0.5~1 cm 的小段, 置入盛有 10% KOH 溶液的试管于水浴锅 90 °C 脱色处理, 直至根系颜色变淡, 用蒸馏水反复冲洗后加入 0.5% 的苯胺蓝染液继续 90 °C 染色 1 h, 重复冲洗步骤用 3% 乳酸、甘油脱色 2~3 d 至半透明后, 置于显微镜下观察根系内的 AMF 泡囊丛枝结构。

2.3 数据处理

利用 Chromas2.22、观察序列峰图、DNA man 8 剪贴与拼接序列。将序列提交至 NCBI 基因

数据库比对并下载同源序列。使用 Mega X 多序列比对并筛选建树模型, 选择参数值最高的推荐模型, 利用最大似然法 1000 次迭代循环检验构建系统发育树。

运用 EXCEL2016 统计孢子密度数据及扩增样本序列比对数据。

3 结果与分析

3.1 几种高山栎土壤 AMF 孢子形态及土壤孢子密度特征

对高山栎根部 10~30 cm 土壤的筛取结果表明: 各高山栎样地下均有大量 AMF 孢子存在, 孢子直径为 50~220 μm, 形状以球形、近球形为主。颜色多以黑色和深棕色出现, 偶见棕黄或深棕红, 其中, 部分孢子呈黑色, 该类孢子在显微镜下压裂未见明显孢壁层数, 部分孢子有分泌物渗出 (表 2, 图 1)。目前, 经实验观察的孢子均未见 Melzer's 染液染色反应。5 种高山栎根系土壤样本中孢子密度分别为 GSL2 (205.49) > GSL4 (178.90) > GSL1 (88.39) > GSL3 (43.84) > GSL5 (16.16) 个·g⁻¹, 不同高山栎土壤样本具有明显差异, 且呈乔木高山栎大于灌木的趋势 (图 2), 其中, GSL3 为灌木但表现出孢子密度相对较低的特征。各样本孢子 100 目下 (直径 > 165 μm) 以黑色硬质孢子为主, 多数孢子密集分布于 300 目筛 (50~74 μm) 内, 呈深棕色。

3.2 结合形态学和分子生物学手段对高山栎林下菌塘 AMF 孢子及根系 AMF 克隆的鉴定

对西藏、四川各高山栎根围土壤中的 AMF 分子鉴定结果表明: 横断山脉不同海拔地区采集的高山栎土壤 AMF 均与类球囊霉科 (Paraglomeraceae) 类球囊霉属 (*Paraglomus*) 具有较近的亲缘关系 (表 3)。经西弗吉尼亚大学孢子比对网站 (occultum | Davis - INVAM | West Virginia University (wvu.edu)) 比对发现, *Paraglomus* 属下目前收录的菌种仅有巴西类球囊霉 (*Paraglomus brasilianum* (Spain & J. Miranda) J.B. Morton & D. Redecker) 和隐类球囊霉 (*Paraglomus occultum* (C. Walker) J.B. Morton & D. Redecker), 但这 2 种 AM 孢子颜色、质地、孢壁层数与 Melzer's 染液反应效果与目标菌种均明显不同。利用 Mycobank 检索 AMF *Paraglomus* 属, 选取 Gosling 等^[22] 和 Mello 等^[23] 发表的 AMF *Paraglomus* 属的几种序列以及

表 2 几种高山栎根部土壤 AMF 形态特征

Table 2 Morphological characteristics of soil AMF in roots of several *Quercus alpine*

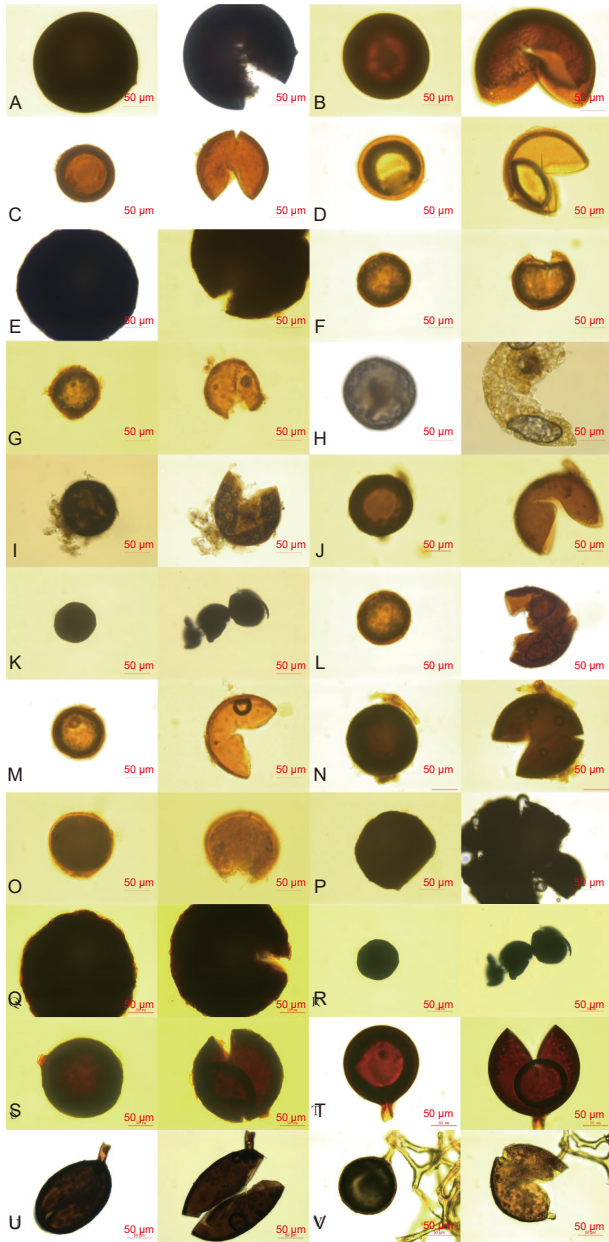
采集树种 Tree species	孢子编号 Spore NO.	孢子颜色 Spore color	孢子形状 Spore shape	孢子直径/ um Diameter of spore	孢壁层数 Spore wall layers	Melzer's 染色反应 staining reaction	其他特征 Other features
高山栎 <i>Quercus semicarpifolia</i> Smith (乔木)	GSL1-001	黑色	近圆形	130~160	—	—	整体通黑、质硬, 压裂后未能明显分辨包子层数
	GSL1-003	深棕黑色	近球形	110~140	1	—	孢子质软, 有内含物
	GSL1-005	棕褐色	球形或近球形	70~100	2	—	孢子壁较厚, 颜色由外及里发生渐变
	GSL1-007	深黄色	球形	90~130	2	—	孢子壁界限清晰, 有内含物
长穗高山栎 <i>Quercus longispica</i> (Hand.-Mazz.) A. Camus (灌木)	GSL2-008	黑色	球形或近球形	130~170	—	—	质硬、表面有轻微凸起并有内含物
	GSL2-010	棕色或暗棕色	圆形至近圆形	120~150	2	—	孢子壁光滑、分层明显
	GSL2-012	深棕色	椭圆形	50~80	2	—	表面不光滑且有少量覆盖物孢内含分泌物
	GSL2-014	深棕色至棕黑色	圆形至近椭圆形	80~110	2	—	孢表面有明显双层网纹, 网孔呈不规则多边形
刺叶高山栎 <i>Quercus spinosa</i> David ex Franch. (灌木)	GSL3-007	黑色	球形或近球形	80~100	1	—	表面粗糙, 具分泌物且具网状结构
	GSL3-009	深棕色	近球形或椭圆	70~100	1	—	表面光滑, 可见纹路零散分布
	GSL3-010	黑色	椭圆形、近球形	50~70	—	—	黑色, 孢壁破损后未见明显孢子壁及分层
川滇高山栎 <i>Quercus aquifolioides</i> Rehd. et Wils (灌木)	GSL4-003	深棕至红棕色	圆形或近圆形	60~90	2	—	内含物为无色透明似油滴状
	GSL4-004	深棕至黄棕色	球形或近球形	60~90	2	—	孢壁界限明显, 表面不光滑
	GSL4-006	深棕色	球形至近球形	100~120	1	—	表面光滑, 有覆盖物
	GSL4-00Y	黑褐色	近球形	120~150	2	—	表面光滑孢子壁界限, 颜色较浅, 内容物为深棕黑色
高山栎 <i>Quercus semicarpifolia</i> Smith (巨大乔木)	GSL5-004	黑色	近球形或不规则	160~220	3	—	质硬易碎、实心; 压破孢子孢壁未见明显分层
	GSL5-006	黑色	球形至近球形	120~160	3	—	孢壁未见明显分层且不光滑
	GSL5-008	黑色	近球形或卵形	50~75	2	—	压破未见明显孢壁分层
	GSL5-012	深棕至暗棕红	近球形	100~130	1	—	孢壁较厚, 内含分泌物
	GSL5-016	棕色至深棕色	球形或近球形	280~480	2	—	可见孢子梗
云南香格里拉高山栎 <i>Quercus</i> spp.	GA	棕至深棕褐色	近橄榄球型	75~90	3	—	表面光滑, 具有内含物
	GB	深棕至黑色	球形	55~75	3	—	具内含物, 可见孢子梗

MAARJAM (ut.ee) 中与本研究孢子相似度高于 90% (相似度为 90.9%~99.2%) 的序列对几种高山栎林下 AMF 孢子进行系统发育树构建。结果表明: 明确到种的 *Paraglomus* 序列聚为一支, MAARJAM (ut.ee) 中 *Paraglomeraceae Paraglomus* sp. 属序列与样本 GSL2-014 聚为一支 (图 3), 其余所有孢子与根系 AMF 克隆样本能够单独聚为一支, 其中, 同源序列相似度高于 97%^[24] 的个体极有可能为类球囊霉属内某种真菌。

3.3 云南香格里拉高山栎根际 AMF 孢子和根系 AMF 的分子克隆

利用 AMF 特异引物 AML1、AML2 对香格里

拉地区的高山栎根系潜在 AMF 的 ITS 片段 DNA 克隆, 结果表明: 经 75% 浓度酒精对高山栎根系表面消毒 30 s 后, 其根系表面仍存在 AMF 的 DNA。通过 MAARJAM (ut.ee) 网站比对发现, 存在真菌普遍与球囊霉属 *Glomus* 在 Genbank 中的标准序列相似度较高, 部分目标菌种序列与 Genbank 中的序列对比有相似度较高的类球囊霉属 *Paraglomus* 序列存在 (表 4), 但其在覆盖度 (Query coverage) 或最大识别度 (Max identity) 2 个指标并非最高。利用 Bio-edit 软件检验克隆所得目标 AM 菌种同源性, 发现 17 个菌种均为同一菌株, 故选择 G1 为代表, 与该样本下



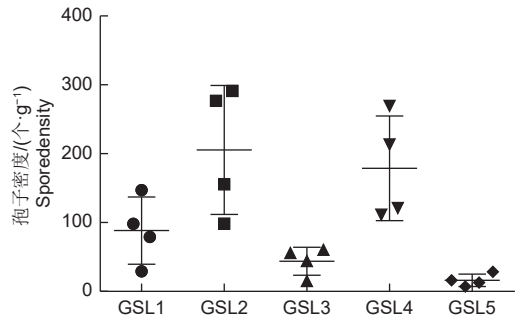
注：A-D为 GSL1-001、003、005、007；E-H为 GSL2-008、010、012、014；I-K为 GSL3-007、009、010；L-O为 GSL4-003、004、006、00Y；P-T为 GSL5-004、006、008、012、016；U-V为样本G

Notes: A-D are GSL1-001、003、005、007；E-H are GSL2-008、010、012、014；I-K are GSL3-007、009、010；L-O are GSL4-003、004、006、00Y；P-T are GSL5-004、006、008、012、016；U-V are sample G

图1 高山栎根部土壤中的AMF孢子形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of AMF spore in soil of *Quercus alpine* root

AMF孢子序列(GA、GB)一同构建系统发生演化树(图4),分析表明:目标菌种样品G1、GA和GB与*Glomus versiforme*(Y17651.1)聚为一支,说明其亲缘关系与该属较近,置信度可达98%,推测高山栎能够和与*Glomus*



注：GSL1-5 分别对应表2中5个高山栎林下土壤样本

Notes: GSL1-5 corresponds to soil samples under *Quercus* forest in Table 5, respectively

图2 5种高山栎孢子密度特征

Fig. 2 Spore density characteristics of five species of *Quercus alpine*

versiforme 同源性较高的AMF形成共生关系,且其与林下菌塘孢子类似,二者均未能鉴定到种。说明能够与香格里拉地区高山栎根系共存的AMF极可能为球囊霉属和类球囊霉属,或与其并列的某一新属真菌。

3.4 几种高山栎根系AMF泡囊丛枝结构观察

几种高山栎根系苯胺蓝染色结果表明:100~200倍放大时可见明显的类泡囊和丛枝结构,此类结构在高山栎根系内主要呈圆形或近圆形(图5a、b),部分呈椭圆形,部分泡囊分布密集,并伴随“向无规则方向伸展”的横向菌丝结构,推测其为高山栎根系于AMF共生所形成的泡囊和丛枝。

4 讨论

4.1 高山栎根围土AMF的验证

自然界中能够独立生存的生物少之又少,几乎所有生物之间普遍存在共生关系^[23]。AM作为一种重要的功能型土壤微生物,其与宿主植物间形成的共生体系能够使宿主植物在群落构成及其对外界生境在生态适应性层面产生深远影响^[5,25]。调查野生生境中的AMF不仅能够扩充AMF菌种资源库,有利于发掘AMF在不同宿主植物根系下的群落构成及多样性,且在探究其对于生态系统平衡稳定的可持续发展层面具有重要意义^[21,26]。

横断山脉一直以来是生物多样性研究的热点地区,不少学者研究认为,4000~5000万年前印度次大陆与欧亚板块碰撞导致的青藏高原隆起,随后该地区可能成为东亚北温带植物的避难所^[27-29]。

表 3 各高山栎 AMF 与 GenBank 中的序列信息比对

Table 3 Comparison of sequence information of each alpine oak AMF with that in GenBank

树种 species	采集地 collected location	菌株号 Strains No.	GenBank中相近菌株 Nearest type strain		GenBank登录号 Accession No.	相似度 Identity/%
			科 Family	属 Genus		
高山栎 <i>Quercus semicarpifolia</i>	西藏林芝察隅 国道219旁2610 m	GSL1-001		<i>Paraglomus</i> sp.	LT935278	97.2
		GSL1-003		<i>Paraglomus</i> sp.	LT935278	99.2
		GSL1-005		<i>Paraglomus</i> IH1 VTX00444	LT983307	99.2
		GSL1-007		<i>Paraglomus</i> sp.	LT935278	96.1
长穗高山栎 <i>Quercus longispica</i>	西藏林芝察隅 国道559旁3440 m	GSL2-008		<i>Paraglomus</i> sp.	LT935278	97.2
		GSL2-010		<i>Paraglomus</i> IH1 VTX00444	LT935278	98.0
		GSL2-012		<i>Paraglomus</i> IH1 VTX00444	LT983306	98.5
刺叶高山栎 <i>Quercus spinosa</i>	四川阿坝马尔康县 梦笔山3630 m	GSL2-014		<i>Paraglomus</i> IH1 VTX00444	LT984328	91.7
		GSL3-007		<i>Paraglomus</i> IH1 VTX00444	LT983306	98.6
		GSL3-009	类球囊霉科 Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i> sp.	LT935278	95.8
GSL3-010	<i>Paraglomus</i> sp.	LT935517		96.3		
川滇高山栎 <i>Quercus aquifolioides</i>	四川阿坝巴郎山 国道310旁3540 m	GSL4-003		<i>Paraglomus</i> IH1 VTX00444	LT984234	93.3
		GSL4-004		<i>Paraglomus</i> sp.	LT935517	96.5
		GSL4-006		<i>Paraglomus</i> sp.	LT935482	93.9
		GSL4-00Y		<i>Paraglomus</i> IH1 VTX00444	LT984234	90.9
(巨大乔木) 高山栎 <i>Quercus semicarpifolia</i>	西藏林芝察隅国道 桑久村219旁	GSL5-004		<i>Paraglomus</i> IH1 VTX00444	LT983016	91.3
		GSL5-006		<i>Paraglomus</i> sp.	LT935278	96.4
		GSL5-008		<i>Paraglomus</i> sp.	LT935278	96.2
		GSL5-012		<i>Paraglomus</i> IH1 VTX00444	LT983306	98.6
高山栎 <i>Quercus semicarpifolia</i>	西藏林芝察隅 国道219旁2610 m	GSL5-016		<i>Paraglomus</i> sp.	LT935517	95.6
		GSL1-a		<i>Paraglomus</i> IH1 VTX00444	LT983016	90.3
川滇高山栎 <i>Quercus aquifolioides</i>	云南香格里拉奔子栏镇附近	GSL4-a		<i>Paraglomus</i> sp.	LT935482	92.9

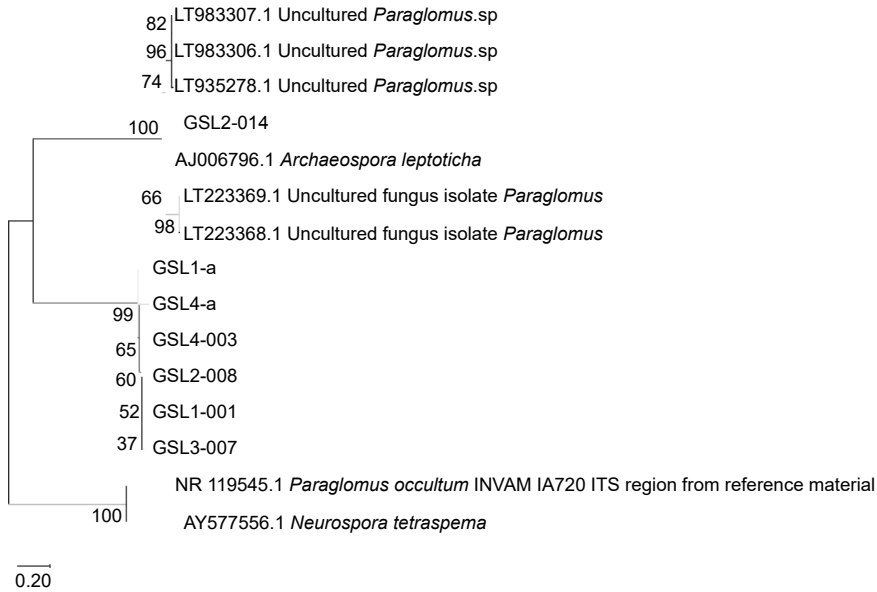
注: GSL1-a、GSL4-a为根系克隆结果比对, 其余为AMF孢子序列比对

Note: GSL1-a and GSL4-a were the comparison of root clone results, and the rest were the comparison of AMF spore sequences

杨钦周^[30]认为, 横断山脉纵向深切及垂直气候带的明显分布促使硬叶栎类古老栎群的残遗保留和新生类群的分化形成。因此, 选择古老的高山栎组植物对其根系潜在的 AMF 进行研究, 从演化发育的角度能够更有助于理解并揭示该地区 AMF 的起源、营养类型、生活方式及分类问题。

本研究利用湿筛沉淀法从形态学和分子生物学结合的视角证实高山栎林下菌塘中存在 AMF 真菌孢子, 这与杨淑娇等^[13]基于磷脂脂肪酸 (RLFP) 方法研究香格里拉高山栎林下菌塘微生物的结果一

致, 验证了 AMF 在野生条件下能够广泛存在于横断山脉亚高山地区高山栎林下的假设。西藏、四川等地各土壤样本中的孢子 18S rRNA gene 分子证据表明, 所有孢子均与类球囊霉属 *Paraglomus* 的亲缘关系较接近, 通过将各孢子的形态学特征与已证实或发表的孢子形态对比发现, 其在颜色、质地、孢壁层数和 Melzer's 染液反应效果等方面均与目前已知的巴西类球囊霉、隐类球囊霉及其他几种该属下发表的新种具有明显差异, 故认为该地区高山栎林下 AMF 很有可能为类球囊霉属下的未知



注：GSL1-a 和 GSL4-a 为此对应编号 2 个高山栎样本根系 AMF 的克隆菌株编号

Note: GSL1-a and GSL4-a correspond to the numbers of clonal strains of root AMF of two *Quercus* samples

图 3 四川、西藏几种高山栎根际土壤 AMF 孢子和根系克隆 AMF 基于 18S rRNA 基因序列与参考序列构建的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree constructed by 18S rRNA gene sequence and reference sequence of several species of *Quercus* alpine rizosphere AMF spore and roots AMF clone in SiChuan and Tibet

表 4 香格里拉地区高山栎根系 AMF 克隆与其土壤中 AMF 孢子的对比结果

Table 4 Comparison of AMF clones in roots of *Quercus* alpine and AMF spores in soil in Shangri-La area

树种 species	采集地 collected location	孢子/菌株号 Strains No.	GenBank中相近菌株 Nearest type strain		GenBank登录号 Accession No.	相似度 Identity/%
			科 Family	属 Genus		
(乔木型) 高山栎 <i>Quercus semicarpifolia</i> (not identified)	云南香格里拉奔子栏镇	GA	球囊霉科	<i>Glomus</i> sp. VTX00301	KC579428	98.1
		GB	Glomeraceae	<i>Glomus</i> sp. VTX00113	JX144124	99.0
(乔木型) 高山栎 <i>Quercus semicarpifolia</i> (not identified)	云南香格里拉奔子栏镇	G1		<i>Glomus</i> sp. VTX00113	JX144124	99.0
		G2		<i>Glomus</i> sp. VTX00113	JX144124	98.9
		G3		<i>Glomus</i> sp. VTX00113	JX144124	99.0
		G4		<i>Glomus</i> sp. VTX00113	JX144124	99.0
		G5		<i>Glomus</i> sp. VTX00113	JX144124	99.0
		G6		<i>Glomus</i> sp. VTX00113	JX144124	99.0
		G7	球囊霉科	<i>Glomus</i> sp. VTX00113	JX144124	99.0
		G9	Glomeraceae	<i>Glomus</i> sp. VTX00113	JX144124	99.0
		G10		<i>Glomus</i> sp. VTX00113	JX144124	99.0
		G11		<i>Glomus</i> sp. VTX00113	JX144124	99.0
		G12		<i>Glomus</i> sp. VTX00113	JX144124	99.0
		G15		<i>Glomus</i> sp. VTX00113	JX144124	99.0
		G16		<i>Glomus</i> sp. VTX00113	JX144124	99.0
		G17		<i>Glomus</i> sp. VTX00113	JX144124	99.0

注：GA、GB为香格里拉高山栎样点孢子的18S rRNA基因扩增结果，与根系克隆结果形成对照

Notes: GA、GB was the result of amplification of 18S rRNA gene from the spores of *Quercus* shangrila

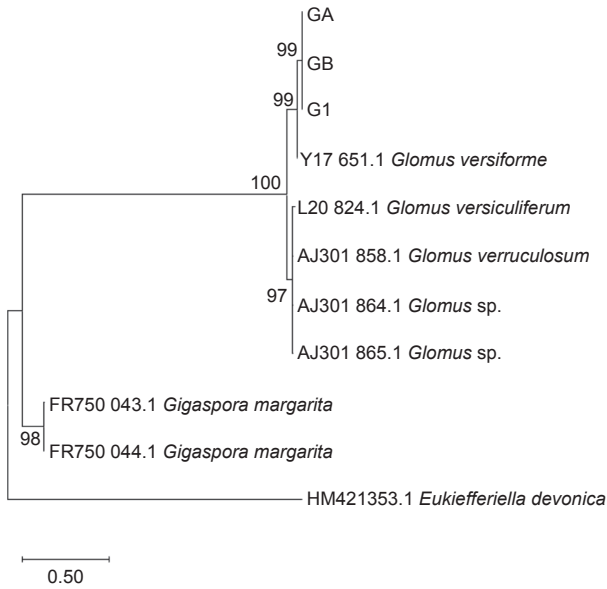
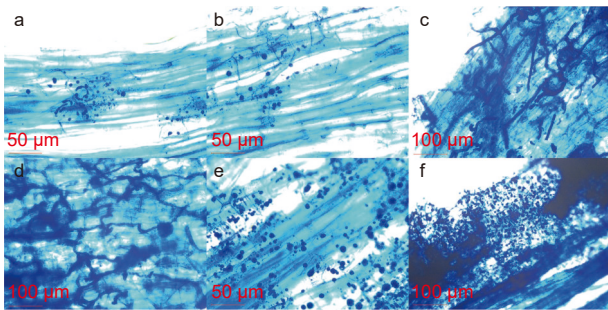


图 4 云南香格里拉高山栎根际土壤与根系 AMF 克隆结果基于 18SrDNA 序列与参考序列构建的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed by 18S rRNA gene sequence and reference sequence of several species of *Quercus alpine* rizosphere AMF spore and roots AMF clone in Shangri-la, YunNan



注: 图 5 中 a-e 分别对应 GSL1-5, f 对应 G

Note: a-e in Figure 5 respectively correspond to GSL1-5, and f correspond to G

图 5 各高山栎根系 AMF 泡囊、丛枝结构

Fig. 5 AMF vesicles and arbuscular structure of roots of *Quercus alpine*

种。由于其所处地理位置植被分布的古老与独特性, 结合 18S rRNA gene 序列相似度比对分析认为, 其或在漫长演化进程中在 *Glomeraceae* 和 *Paraglomeraceae* 科便已出现分化。基于系统发育树 (图 3) 对横断山北部西藏四川等地区孢子的演化进行推测, *GSL2-14* 的演化介于 *Paraglomus* 和 *Archeaspora* 之间, 而 *GSL1-001*、*2-008*、*3-007*、*4-003* 等则独立分为一支, 与前者呈并列关系, 这与前人基于真菌分类学为“科”级别将 *Paraglomus* 和 *Archeaspora* 从 *Glomus* 中分离出去的分类学

定位相吻合^[31]。

4.2 高山栎根系 AMF 扩增结果的提示

由于目前 AMF 分子研究技术仍旧有一定的局限性, 即缺乏一套通用的既能扩增所有 AM 家族, 又能排除非 AM 真菌的引物^[32]。因此, 为保证克隆质量, 选择 *AML1* 和 *AML2* 作为引物扩增高山栎根系 (样本 *GSL1-a*、*GSL4-a*、*G*) AMF 的 18srRNA 基因, 发现与四川、西藏等地高山栎克隆菌株相似度较高的 AMF 均为类球囊霉属 *Paraglomus*, 与香格里拉地区高山栎克隆菌株相似度较高的 AMF 则均为球囊霉属 *Glomus*。系统发育树构建结果表明: *Glomus versiforme* 与后者 AMF 同源性极高 (图 4), 西藏、四川与香格里拉等地高山栎根系 AMF 结果存在一定差异。这种现象出现的原因可能是 AMF 在长期演化过程中随地域环境变化 (从西藏、四川到云南) 和不同高山栎种 (表 1) 而逐渐发生分化。同时, 本研究克隆结果与张中峰等^[14] 将摩西球囊霉和根内球囊霉接种至青冈栎幼苗的结果类似, 说明栎属植物在非人为干扰的野生环境下根系也存在 AMF。第二, PCR 扩增过程中由于 DNA 模板中存在残留的酚类及腐殖酸等, 此类物质难以去除并会对 DNA 扩增造成一定影响^[33]。引物不同, 扩增过程中的靶向序列碱基对存在差异, 并且扩增时碱基错配的概率也可能呈倍放大, 从而造成序列比对时发生单孢提取与分子克隆出现结果上的差异。此外, 高山栎根系、土壤样本均分别仅有一种 AMF 出现, 可能提示不同高山栎同时仅与一种 AMF 在内外根际范围产生联系。有研究表明, 碳源和植物内源激素能够对 AM 产孢能力产生重要影响, 二者条件丰富的情况下孢子萌发率较高^[34-35]。同理, 高山栎生长在半阳坡地区, 当地气候、海拔及水热条件使得土壤生境中的碳源及高山栎宿主植物内源激素发生变化, 进而一定程度干扰 AMF 产孢, 而 *Paraglomus* 和 *Glomus* 在高山栎根际微生物的生态位竞争过程中占据了相对优势地位, 以此来确保自身所需碳源的充分供给。

综合横断山脉亚高山带几种高山栎林下菌塘 AMF 孢子调查及其根际 AMF 的克隆结果发现, 高山栎组植物作为典型的被子植物, 在与外生菌根真菌发生共生现象的同时, 极有可能在自然环境中保留了与 AMF 存在共生的现象。在喜马拉雅造山运

动后^[30], 横断山区长时间与外界环境隔离, 土壤微生物在漫长的演化进程中由于地理环境的相对封闭而发生分化, 最终形成了现有存在的 AMF 孢子, 而该类孢子随区域(从西藏、川西到云南)变化显示出一定的演化差异, 具体体现在其形态及分子学方面的不同。因此, 在系统发育进化关系的构树结果中, 该类孢子以单独汇聚为一支呈现。

5 结论

本研究利用形态学与分子生物学的手段证明, 自然条件下横断山脉亚高山地区高山栎林下菌塘普遍存在 AMF, 利用分子克隆手段发现 AMF 可分布于高山栎植物根系, 且发现西藏、四川等地该类孢子在形态上与已知 AMF 属种存在较大差异, 极有可能为 *Paraglomus* 属下的新种。同时, 云南香格里拉地区高山栎根系 AM 与 *Glomus* 属更接近, 说明 AM 在长期演化过程中随地域迁移出现分化。本研究结果为揭示 AMF 对横断山脉亚高山带高山栎生态适应性机制的影响提供新的证据, 为进一步了解横断山脉亚高山带高山栎林下 AMF 的形成与演化提供理论参考。

参考文献:

- [1] REMY W, TAYLOR T N, HASS H, *et al.* Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, 91(25): 11841-11843.
- [2] TRAPPE J M. Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint[J]. *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*, 1987: 5-25.
- [3] ASEEL D G, RASHAD Y M, HAMMAD S M. Arbuscular mycorrhizal fungi trigger transcriptional expression of flavonoid and chlorogenic acid biosynthetic pathways genes in tomato against Tomato Mosaic Virus[J]. *Scientific reports*, 2019, 9(1): 1-10.
- [4] LEAKE J, JOHNSON D, DONNELLY D, *et al.* Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning[J]. *Canadian Journal of Botany*, 2004, 82(8): 1016-1045.
- [5] SMITH S E, READ D J. *Mycorrhizal symbiosis*[M]. New York: Academic press, 2010.
- [6] SELVAKUMAR G, SHAGOL C C, KIM K, *et al.* Spore associated bacteria regulates maize root K^+ / Na^+ ion homeostasis to

promote salinity tolerance during arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 1-13.

- [7] van der HEIJDEN M G A, MARTIN F M, Selosse M A, *et al.* Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future[J]. *New phytologist*, 2015, 205(4): 1406-1423.
- [8] BAHADUR A, BATOOL A, NASIR F, *et al.* Mechanistic insights into arbuscular mycorrhizal fungi-mediated drought stress tolerance in plants[J]. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20(17): 4199.
- [9] 王襄平, 王志恒, 方精云. 中国的主要山脉和山峰[J]. *生物多样性*, 2004, 12(1): 212-218.
- [10] 周浙昆. 中国栎属的地理分布[J]. *中国科学院研究生院学报*, 1993, 10(1): 95-102.
- [11] 尤海舟, 刘兴良, 缪宁, 等. 川滇高山栎种群不同海拔空间格局的尺度效应及个体间空间关联[J]. *生态学报*, 2010, 30(15): 4004-4011.
- [12] 王国严, 徐阿生. 川滇高山栎研究综述[J]. *四川林业科技*, 2008, 29(2): 23-29.
- [13] 杨淑娇, 杨永平, 石玲玲, 等. 基于 PLFA 的高山栎和 高山松林松茸菌塘土壤微生物群落特征研究[J]. *生态学报*, 2018, 38(5): 1630-1638.
- [14] 张中峰, 张金池, 黄玉清, 等. 接种丛枝菌根真菌对青冈栎幼苗生长和光合作用的影响[J]. *广西植物*, 2013, 33(3): 319-323, 294.
- [15] 徐飞, 贾仰文, 牛存稳, 等. 横断山区气温和降水年季月变化特征[J]. *山地学报*, 2018, 36(2): 171-183.
- [16] KOSKE R E, WALKER C. *Gigaspora erythropha*, a new species forming arbuscular mycorrhizae[J]. *Mycologia*, 1984, 76(2): 250-255.
- [17] 唐燕, 李敏, 马焕成, 等. 云南轿子山腋花杜鹃菌根多样性研究[J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2019, 41(5): 1062-1072.
- [18] 林先贵, 胡君利, 戴珏, 等. 丛枝菌根真菌群落结构与多样性研究方法概述及实例比较[J]. *应用与环境生物学报*, 2017, 23(2): 343-350.
- [19] 李龙, 李丽, 伍建榕, 等. 高黎贡山丛枝菌根真菌多样性研究[J]. *贵州农业科学*, 2017, 45(12): 45-50.
- [20] 崔莉娜, 郭弘婷, 李维扬, 等. 不同林龄杉木人工林菌根侵染特征研究[J]. *生态学报*, 2019, 39(6): 1926-1934.
- [21] 刘润进. *菌根学*[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [22] GOSLING P, PROCTOR M, JONES J, *et al.* Distribution and diversity of *Paraglomus* spp. in tilled agricultural soils[J]. *Mycorrhiza*, 2014, 24(1): 1-11.
- [23] de MELLO C M A, da SILVA G A, de ASSIS D M A, *et al.* *Paraglomus pernambucanum* sp. nov. and *Paraglomus bolivianum* comb. nov., and biogeographic distribution of *Paraglomus* and *Pacispora*[J]. *Journal of Applied Botany and Food Quality*,

- 2013, 86(1): 113-125.
- [24] TEDERSOO L, DRENKHAN R, ANSLAN S, *et al.* High-throughput identification and diagnostics of pathogens and pests: overview and practical recommendations[J]. *Molecular ecology resources*, 2019, 19(1): 47-76.
- [25] 金 樑, 赵 洪, 李 博. 我国菌根研究进展及展望[J]. *应用与环境生物学报*, 2004, 10 (4): 515-520.
- [26] 胡从从, 成 斌, 王 坤, 等. 蒙古沙冬青及其伴生植物AM真菌物种多样性[J]. *生态学报*, 2017, 37 (23): 7972-7982.
- [27] QIU Y X, FU C X, COMES H P. Plant molecular phylogeography in China and adjacent regions: Tracing the genetic imprints of Quaternary climate and environmental change in the world's most diverse temperate flora[J]. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 2011, 59(1): 225-244.
- [28] YIN A, HARRISON T M. Geologic evolution of the Himalayan-Tibetan Orogen[J]. *Ann. Rev. Earth Planet.*, 2003, 28: 211-280.
- [29] FENG L, ZHENG Q J, QIAN Z Q, *et al.* Genetic structure and evolutionary history of three Alpine Sclerophyllous oaks in East Himalaya-Hengduan Mountains and adjacent regions[J]. *Frontiers in plant science*, 2016, 7: 1688.
- [30] 杨钦周. 中国—喜马拉雅地区硬叶栎林的特点与分类[J]. *植物生态学与地植物学学报*, 1990, 14 (3): 197-211.
- [31] SCHWARZOTT D, WALKER C, SCHÜßLER A. *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic.[J]. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 2001, 21(2): 190-197.
- [32] 罗 睿, 郭建军. PCR反应的动力学模拟和相关因素对扩增结果的影响[J]. *贵州大学学报 (自然科学版)*, 2007 (6): 653-660.
- [33] 武 慧, 田 媛, 周晓馥. 土壤AM真菌PCR扩增方法优化[J]. *吉林师范大学学报 (自然科学版)*, 2020, 41 (04): 93-97.
- [34] BÉCARD G, PICHÉ Y. Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. *Applied and environmental microbiology*, 1989, 55(9): 2320-2325.
- [35] BAGO B, PFEFFER P E, DOUDS D D, *et al.* Carbon Metabolism in Spores of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* as Revealed by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy[J]. *Plant Physiology*, 1999, 121(1): 263-272.

Investigation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) in Several Alpine Oak Understory Forests in the Subalpine Zone of the Hengduan Mountains

LI Hong-bo¹, HUANG Yao-hua¹, KANG Ding-xu¹, WU Jian-rong², MA Huan-cheng¹, CHEN Shi¹

(1. Key Laboratory of Southwest Regional Biodiversity Conservation, National Forestry and Grassland Administration, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China; 2. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Yunnan Universities, School of Biodiversity Conservation, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: [Objective] To clarify the taxonomic status of AMF spores under the oak forest in the subalpine belt of the Hengduan Mountains. [Method] Six samples of alpine oak root enclosures and root systems were selected from different parts of the subalpine belt of the Hengduan Mountains, and AMF spores in the soil were selected by wet sieving sedimentation method. AMF-specific primers were used to amplify the 18S rRNA gene of the ITS region, which was identified by combining morphological and molecular biological means, and the phylogenetic relationships were constructed to infer their affinities. [Result] The results showed that AMF spores and root cloning consequences of alpine oak in Sichuan and Tibet were the genus *Paraglomus*. And the consequence of AMF cloning on the root surface and the AMF in soil of alpine oak in Shangri-La showed that AMF could exist in the inter-roots of alpine oak plants. These AMF were the genus *Glomus*. In addition, only one AMF was found in the root envelope and inter-root soil of alpine oak forest in different sampling sites, suggesting that AMF might have a symbiotic relationship with alpine oak. Aniline blue pigment staining result showed obvious arbuscular and vesicle structures in roots. In addition, the AMF spores under the Alpine oak forest differentiated during the evolution and were between the taxonomic status of *Paraglomus* and *Glomus*, and there were differences in AMF in Tibet, Sichuan and Shangri-La, Yunnan. [Conclusion] AMF generally exists in the pure understory root rhizosphere and inter-root soil of alpine oak in the subalpine belt of the Hengduan Mountains, which provides a theoretical reference for understanding the formation and evolution of AMF in the understory of alpine oak in the subalpine belt of the Hengduan Mountains

Keywords: alpine oak of the Hengduan Mountains; arbuscular mycorrhizal fungi (AMF); phylogenetic construction; taxonomic status.

(责任编辑: 张 研)