

越橘与根际微生物互作影响中国北方森林火干扰后的自然演替过程的机制研究

娄虎^{1,2}, 张杰¹, 蔡慧颖², 范宝珍¹, 郭超¹, 付饶², 胡海清², 孙龙^{2*}

(1. 东北林业大学生命科学学院 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 东北林业大学林学院 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要:【目的】火干扰通过直接和间接的方式改变森林结构, 对森林生态系统构成严重的威胁。火干扰后自然演替过程的调控机理在很大程度上是未知的, 了解这一点对于受火干扰影响的植被恢复尤为重要。【方法】本研究使用野外调查和实验操作相结合, 通过构建根际土壤微生物群落结构, 室内栽培越橘无菌苗, 筛选特定的菌根真菌和根际细菌, 测定植物根系分泌物等手段。【结果】越橘生长发育在火干扰后演替初期影响较大。火灾改变了越橘根际微生物群落结构, 但通过与菌根真菌相互作用利用纤维素和木质素的能力没有改变。种子萌发结果表明, 越橘和白桦根系分泌物影响了森林演替初期种子的萌发。【结论】火干扰对越橘根际微生物结构产生了影响。越橘根际土壤微生物的改变不会影响越橘与根际微生物相互作用分解利用纤维素和木质素的能力。但越橘分泌物能够影响白桦和兴安落叶松的种子萌发。越橘与根际微生物相互作用可能是北方森林火干扰后自然恢复的模式之一。

关键词: 火干扰; 根系分泌物; 火灾历史; 微生物群落; 基因表达

The synergistic effect between lingonberry and rhizosphere microorganisms determines the direction of natural succession after wildfires in northern China.

Abstract: 【Objective】 Wildfires change forest structure directly and indirectly, posing a serious threat to forest ecosystems. The regulatory mechanism of natural succession processes after wildfires is largely unknown, and understanding this mechanism is particularly important for vegetation restoration affected by wildfires. 【Method】 We used a combination of field investigation and experimental operation by constructing the rhizosphere soil microbial community structure, indoor cultivation of lingonberry aseptic seedlings, screening specific mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria, and measuring plant root exudates. 【Result】 The results showed that the growth and development of lingonberry were greatly affected in the early stage of succession after wildfire. Wildfire changed the microbial community structure of the lingonberry rhizosphere, but the ability to utilize cellulose and lignin by interacting with mycorrhizal fungi did not change. The results of seed germination showed that the root exudates of lingonberry and birch affected the germination of seeds in the early stage of forest succession. 【Conclusion】 Our data show that wildfires have an impact on the microbial structure of the lingonberry rhizosphere. The change in microorganisms in the rhizosphere soil of lingonberry did not affect the ability of the interaction between lingonberry and rhizosphere microorganisms to decompose cellulose and lignin. However, lingonberry secretions can affect the seed germination of birch and larch. The interaction between lingonberry and rhizosphere microorganisms may be one of the patterns of natural recovery after wildfires in northern forests.

Key words: Wildfire; Root exudates; Fire history; Microbial community; Gene expression.

火干扰是森林生态系统重要的干扰因子之一, 也是促进森林进化的力量(Bowman et al., 2009; Pereira, Rein, Martin, 2016)。化石证据表明, 火干扰开始于 4.2 亿年前, 当维管束植物在陆地上生长时就有火干扰的发生(Glasspool, Scott, Waltham, Pronina, Shao, 2015)。北方森林占据着全球森林面积的 30%左右, 由于人很少, 所以经常有火干扰的发生(Randerson et al., 2006)。火干扰是北方地区森林结构和物种组成的主

要驱动因素，影响北方森林生态系统的能量交换，元素循环，物质流动，水文学和碳储量的时空变化(Koster et al., 2017; Su et al., 2022)。森林生态系统的各个组成部分，包括林分组成，地面植被类型，有机层，土壤，土壤微生物群落和动植物群都受到火干扰的严重影响(Gibson et al., 2018; Gonzalez-Perez, Gonzalez-Vila, Almendros, Knicker, 2004)。火干扰发生的强度，频率，严重性和季节性的变化是影响火后森林植被自然演替原因之一。火干扰可能会通过降低植物密度和覆盖率以及改变土壤的化学和生物学特性(例如 pH 值，有机物和营养成分，土壤微生物和土壤动物)来影响生态群落的组成(Certini, 2005)。其中，土壤微生物是发生在地下的受火干扰影响的关键，也包括了土壤有机物分解和养分循环(Baldrian, 2017)。火干扰会导致土壤过热而直接影响微生物的数量和多样性，或通过改变其周围环境物理和化学变化而间接影响微生物。土壤温度升高会导致微生物生物量显著减少，进而影响微生物群落的结构和多样性(Knorre, Kirdyanov, Prokushkin, Krusic, Buntgen, 2019; Tas et al., 2014)。

虽然众所周知火干扰能够促进灌木和草本植物的生长，但我们对这种增强生长模式背后的机制以及这些机制如何随时间变化知之甚少。将植物生理学和环境过程联系起来，能够提供关于火后演替的许多宝贵信息(Bradshaw, Dixon, Hopper, Lambers, Turner, 2011; Cornelissen Makoto, 2014)。北方森林火干扰通过植被和土壤特性的变化改变植物根际微生物结构和养分有效性(Keuper et al., 2012; Loranty et al., 2018)。植物生理指标和基因表达沿火灾后连续梯度的变化将提供火灾后环境变化如何影响植物的证据(Heim et al., 2021)。

火干扰后森林植被的演替对维持北方森林生态系统的稳定至关重要。对幼苗建立机制的理解是预测北方森林生态系统演替方向的关键(Lloyd, 2005)。然而，在火干扰后自然恢复过程中灌木和乔木幼苗能够成功建立的关键驱动因素尚不清楚。树苗建立受到很多因素的影响，包括种子萌发、土壤性质、环境和与其他竞争性植物之间的相互作用(Finkel et al., 2020)。幼苗建立中一个经常被忽视但在生理上很重要的因素是与植物共生的根际微生物。在大兴安岭森林中，火后植物幼苗的建立与火情密切相关(Heim et al., 2021; Su et al., 2022)。由于火干扰引起的真菌生物组成的变化可能会影响幼苗的成功建立，这是因为演替初期营养物质的缺乏(Hobbie Agerer, 2010)。然而火干扰后快速恢复的灌木和其杜鹃花菌根真菌(ERM)定殖的研究较少(Hewitt, Chapin, Hollingsworth, Taylor, 2017; Hewitt, Hollingsworth, Chapin, Taylor, 2016)。

虽然北方森林中常见的灌木、桦树和兴安落叶松都有微生物的定殖，但是，尚不清楚这些微生物是否通过在火干扰后与灌木和乔木连接来促进初期树苗的建立。为了探讨这个问题，我们进行了一项具有三个主要目标的研究：(i) 调查火干扰后自然演替初期越橘大量存在的原因，(ii) 确定生长在树桩上的越橘是否与根际微生物协同利用纤维素和木质素。以及 (iii) 检查越橘和白桦根系分泌物对越橘、白桦和兴安落叶松种子萌发的影响。最后，我们构建了火干扰后自然恢复过程中森林演替过程的模型。总之，这些调查有助于我们了解火干扰后的自然恢复过程中灌木是否有可能为森林演替起始白桦的建立提供营养和导向，以及越橘如何影响森林演替的分子机制。

1 研究区概况和实验设计

本研究在中国大兴安岭地区(124°5'1"E, 52°2'14"N, 中国哈尔滨)的北方森林进行(图 1)。采样地为原始未破坏的林地和火干扰后自然恢复林地(2020 火烧迹地, 2017 火烧迹地, 2012 火烧迹地, 2004 火烧迹地, 1991 火烧迹地, 和未火烧林地), 主要乔木为兴安落叶松(*Larix gmelini*)、樟子松(*Pinus sylvestris* var. *mongolica*)、白桦(*Betula platyphlla*)和山杨(*Populus davidiana*)等。主要灌木为越橘(*Vaccinium vitis-idaea*)、兴安杜鹃(*Rhododendron dauricum*)和杜香(*Ledum palustre* var. *dilatatum*)等。主要草本为蔷薇科(*Rosaceae*)、莎草科(*Cyperaceae*)、豆科(*Leguminosae*)、菊科(*Compositae*)等植物(Hu, Wei, Sun, 2012)。pH 约为 4.85。土层具有很厚的腐殖质层，主要凋落物以松针和白桦叶片为主，苔藓广泛分布。全年最高

温度 32℃左右。全年最低温度-52.0℃左右。年均温差为 49℃。全年平均日照时间约为 2052 h。全年平均温度约为-4.3℃。2021 年平均降水为 497.7 mm (H. Lou et al., 2022; Su et al., 2022; Xiang et al., 2014)。

本研究在 2021 年 7 月 30 日选择了 6 个火干扰后自然演替阶段的地块 ((2020 fires, 2017 fires, 2012 fires, 2004 fires, 1991 fires, 和 unburned))。(图 1) 地块之间的最小距离为 10km。我们选择的地块人迹罕至, 人为干预很少。我们采用经典的空间换时间替代方法来评估火灾及其对越橘菌根真菌定殖的影响。每个受火灾影响的地点都被视为一个独立的复制品, 我们选择的采样区气候和地形差异不大。根据林业局的历史记录和遥感影像, 每个受火灾影响的采样点都发生过一次特大山火。参考 Xiang's 的方法, 我们使用遥感 Landsat™ 图像的差分归一化燃烧率 (*dNBR*) 定义火灾严重程度, 这已被证明适用于我们的研究区域(Xiang et al., 2014)。鉴于地块在结构上是相似的, 所有样本的采集都遵循统一的标准, 即土壤类型相同, 地貌相似。

本研究分析了总共 36 个选定的样品, 其中 6 个用于 2020 火烧迹地, 6 个用于 2017 火烧迹地, 6 个用于 2012 火烧迹地, 6 个用于 2004 火烧迹地, 6 个用于 1991 火烧迹地, 和 6 个用于未火烧林地。在每个地块设置 6 个样方 (2 m×2 m) 中, 采用五点法取样混合为一个样方。分别测定细菌和真菌, 共产生 72 个测序结果。

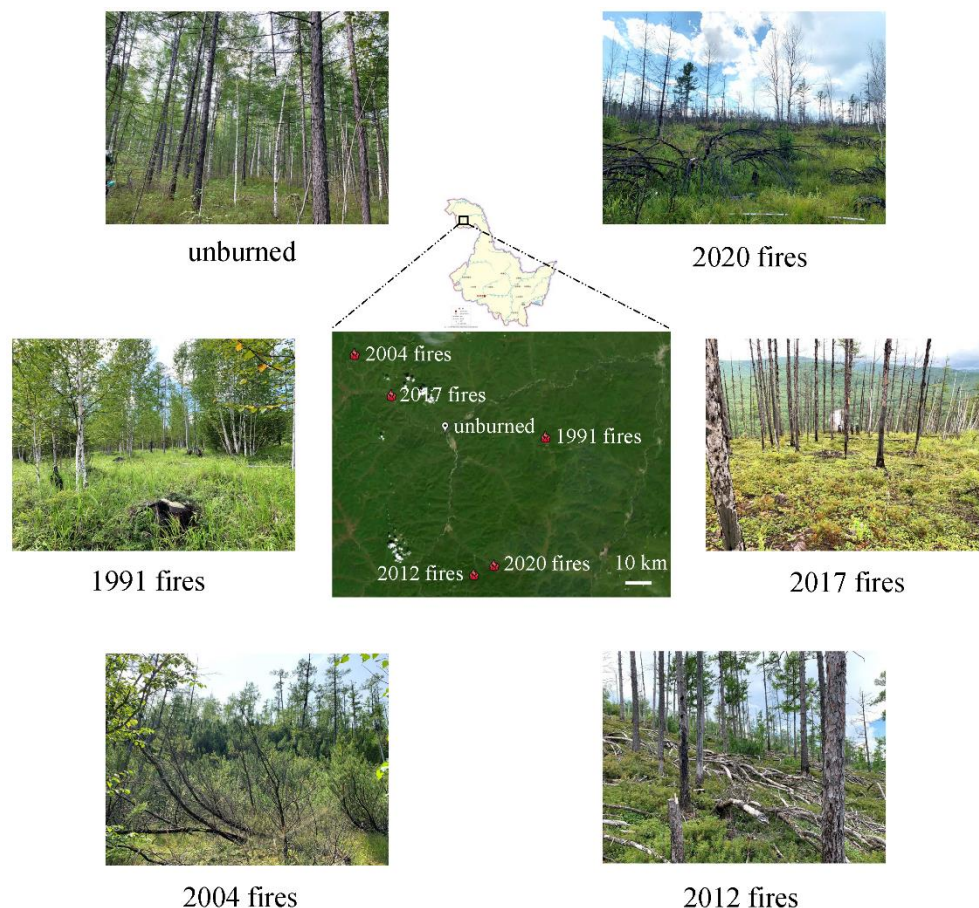


图 1 野火后自然演替样地的地理位置和森林环境

Fig. 1 Geographical location and forest environment of natural succession quadrats after wildfires.

2 研究方法

2.1 取样和室内培养

按照上述样方, 我们调查了样方内越橘的数量、株高、当年生枝重量和果实大小。采集野外越橘-

20 \square 带回实验室立即用液氮速冻放入-80 备用。无菌植物生长在东北林业大学的培养室内 (45°43'45.71"N, 126°38'11.04"E)。无菌组培瓶中的蔓越莓分别接种在土+蛭石 (2: 1), 木屑+蛭石 (2: 1), 凋落物+蛭石 (2: 1) 中 (图 3c)。幼苗在 22 \square \pm 2 \square 的组织培养室中生长。16/8 小时光照/黑暗模式, 光照强度为 30 μ mol m⁻² s⁻¹。30 天后进行统计分析和生理指标的测量。此外, 我们在上述培养瓶中接种了分离纯化得到的菌根真菌和根际促生细菌混合液(M8,M15,M25 和 N1013), 培养条件与上述相同(H. Lou et al., 2022)。

2.2 生理指标测定

叶绿素含量的测量参照 Lichtenthaler 所述的方法, 使用 80% 丙酮中从新鲜叶片样品中提取光合色素 (类胡萝卜素和叶绿素)。6000 rpm 离心 10 分钟后, 使用分光光度计在 470、646 和 661 nm 处记录上清液的吸光度数值 (Lichtenthaler, 1987)。

叶片中丙二醛 (MDA) 的含量的测量参照 Velikova 等人的方法, 取 0.5 g 叶片在 5 ml 0.1% (w/v) 三氯乙酸 (TCA) 中研磨成匀浆, 11500 \times g 离心 10 分钟。将 1ml 上清与 4 mL 硫代巴比妥酸(TBA) 试剂 (0.5% TBA 在 20% TCA 中) 混合。于 95 \square 加热 30 分钟, 迅速冰浴中冷却后 11500 \times g 离心 15 分钟。通过分光光度计在 532 nm 和 600 nm 处测量 MDA-TBA 复合物的量, 计算 MDA 的含量(Velikova, Yordanov, Edreva, 2000)。超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的测量参照 Sairam 等人 and Monazzah 的方法 (Monazzah, Rabiei, Enferadi, 2018; Sairam, Rao, Srivastava, 2002)。

EMF 染色及定殖率计算: 挑选大小粗细适当的根段, 用无菌水清洗干净, 剪成大约 0.5 cm 长的根段, 使用锥虫蓝染色法对根段进行染色, 将根放在含有甘油的载玻片中, 镜检观察。采用根段频率常规法测定菌根侵染率。菌根侵染率= $\Sigma(0\times$ 根段数+10% \times 根段数+20% \times 根段数+...+100% \times 根段数)/总根段数 \times 100%。

2.3 根系分泌物的收集和 GC-MS 的测定

将 4 摄氏度取回的植物根部清洗干净, 放入 2L 0.5 mmol \cdot L⁻¹ 的 CaCl₂ 溶液中, 在温室光线充足的条件下培养 12 h, 重复三次。三次得到的溶液混合冻干后使用乙酸乙酯进行溶解, 0.22 μ m 滤膜过滤后上机测定。仪器型号为 Thermo Fisher Trace GC 2000 DSQII, 毛细管柱 BP-5MS, 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m, 载气为 He, 采用不分流进样。分析检测的条件如下: 初始柱温 50 \square , 升温速度为 10 \square /min, 在 250 \square 保持 15min, 进样口温度 250 \square , 传输线温度 250 \square , 离子源温度 250 \square , 离子源为 EI 源, 扫描模式质量范围为 35-453 m z⁻¹。

2.4 RNA 的提取和实时定量 PCR

参照娄等方法, 使用改良的 CTAB 方法从植物材料中提取总 RNA (Hu Lou et al., 2022)。使用 Takara™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Takara, 大连, 中国, 货号: RR047A) 合成第一链 cDNA。PCR 使用 2 μ L cDNA, 相当于 50 ng 总 RNA, 终体积为 50 μ L、1X PCR 缓冲液、0.2 mM dNTP、1.5 mM MgCl₂、Taq DNA 聚合酶 (Invitrogen®) 0.05 U 和 0.2 μ M 每个引物 (表格 S2)。荧光 qPCR 在 Applied Biosystems 7500 实时 PCR 系统上进行。QPCR 实验根据 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒 (Takara) 的指导方针进行。QPCR 在 96 孔板中进行。总体积为 20 μ L, 其中含有 10 μ L 2 \times SYBR Premix Ex Taq™、6.8 μ L PCR 级水、2 μ L cDNA 模板、0.4 μ L 50 \times ROX 参考染料 I 和 0.4 μ L 每个正向和反向引物 (10 μ M)。热循环条件如下: 95 \square C 变性 5 分钟, 然后是 40 个循环, 95 \square C 8 秒, 58 \square C 30 秒, 72 \square C 20 秒扩增。用于 qRT-PCR 分析的基因序列来自白桦转录组数据库

(<http://birch.genomics.cn/page/species/index.jsp>) 和 NCBI 数据库 (L-rbcL, GeneID: KC484320.1; L-COR11, GeneID: FJ429387.1; L-DREB1, GeneID: JN866912.1; L-MADS-box, GeneID: KF871069.1; L-ndhF, GeneID: MN150135.1; L-matK, GeneID: MZ400437.1; L-ATPC1, GeneID: LC000142.1; L-PHYB, GeneID: LC000357.1; L-PsbA, GeneID: GU361911.1)。特异性引物列于附加文件表 S2。每个处理或对照使用三个生物学重复。使用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 算法方法计算相对定量值的原始数据。

2.5 统计分析

所有实验均采用完全随机设计，每个处理重复 3 次。所有的数据分析均在美吉生物云平台 (<https://cloud.majorbio.com>) 上进行，具体如下：采用 mothur[8] 软 (<http://www.mothur.org/wiki/Calculators>) 计算 Alpha 多样性知识 Chao 1、Shannon 指数等，并采用 Wilcoxon 秩和检验进行 Alpha 多样性的组间差异分析；使用基于 bray-curtis 距离算法的 PCoA 分析（主坐标分析）检验样本间微生物群落结构的相似性，并结合 PERMANOVA 非参数检验分析样本组间微生物群落结构差异是否显著；用 LEfSe 分析（Linear discriminant analysis Effect Size） (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/LEfSe>) ($LDA > 2$, $P < 0.05$) 确定不同组间从门到属水平丰度显著差异的的细菌类群(Callahan et al., 2016)。使用基于距离的冗余分析（distance-based redundancy analysis, db-RDA）用来调查土壤理化指标对土壤微生物群落结构的影响。线性回归分析用于评估 db-RDA 分析中确定的主要土壤理化指标对微生物 Alpha 多样性指数的影响。基于 spearman 相关性 $|r| > 0.6$ $p < 0.05$ 挑选物种进行相关性网络图分析(Amir et al., 2017)。我们测定了不同火干扰自然恢复阶段影响杜鹃花类菌根真菌定殖的生理指标和基因表达。我们进行了 t 检验以确定显著差异 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$, 取决于实验)。使用 SPSS 软件 v 19.0 分析数据。

3 结果与分析

3.1 越橘在树桩上生长能够利用木质素和纤维素需要微生物的参与

火干扰后自然演替过程越橘的大量繁殖，并且可以在树桩和枯倒木上生存（图 2ab）。为验证越橘是否能够利用纤维素和木质素，我们将无菌越橘组培苗接种在三种灭菌培养基中（图 2c）。我们前期已经培养出无菌越橘的组培苗。（附图 1）。结果表明，越橘无菌苗可以正常在土壤中生存，并且形成了大量的根。但是不能在木屑和凋落物中生存（图 2d）。我们通过对越橘生物量的统计表明，木屑和凋落物培养基显著抑制了越橘的生长发育，降低了越橘茎和根的干重和湿重（图 2d）。

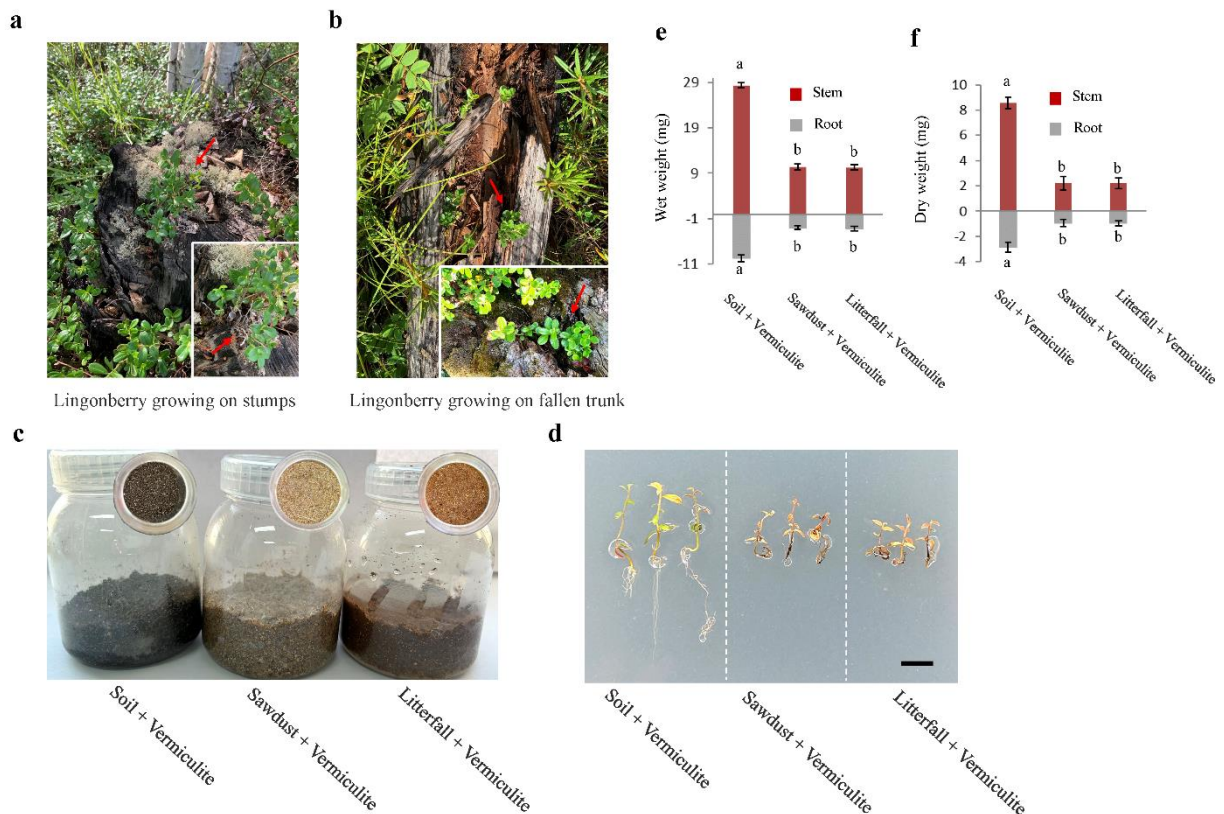


图 2 越橘在树桩上生长利用木质素和纤维素需要根际微生物的参与。

Fig. 2 The utilization of lignin and cellulose in lingonberry requires the participation of rhizosphere microorganisms.

3.2 火灾对不同自然演替阶段越橘根际微生物多样性和群落组成的影响

总共从 16S 序列中识别出 7141 个细菌 OUT (Domain:1 Kingdom:1 Phylum:37 Class:112 Order:266 Family:429 Genus:756 Species:1611 OTU:7141)。从 18S 序列中识别出 4366 个分类真菌 OUT (Domain:1 Kingdom:1 Phylum:16 Class:67 Order:161 Family:360 Genus:730 Species:1267 OTU:4366)。Proteobacteria 是土壤样品中最丰富的细菌门 (图 3 和附图 1a)。其次是 Acidobacteriota, Actinobacteriota 和 Chloroflexi。变形杆菌、放线菌和酸杆菌的相对丰度在不同的火灾历史中通常是恒定的,与恢复时间无关。大部分真菌 OTU 位于 Basidiomycota 中,其次位于 Ascomycota 中,较少位于 Mortierellomycota。总体而言,真菌门类组成在火灾历史中大致相似 (图 3a)。

越橘根际细菌和真菌群落的 Alpha 多样性指数在受火干扰影响和未燃烧的森林之间没有显著差异 (图 3b)。然而,在不同的火后森林自然演替阶段中,土壤微生物群落的 β 多样性存在显著差异 ($p < 0.001$, PERMANOVA) (图 3c)。Bray-Curtis 差异的 NMDS 显示了细菌和真菌 β -多样性在不同火干扰恢复阶段中的显著不同 ($p < 0.005$, PERMANOVA) (图 3c)。

在不同的生物标志物中,细菌群落贡献最大的是变形菌门 Elsterales 目 (图 4a)。真菌群落贡献最大的是 Leotiomyces, 其次是 Helotiales 和 hyaloscyphaceae (图 4b)。为了进一步解释火干扰后自然演替过程中土壤微生物群落结构变化的主要驱动因素,在不考虑解释变量相互作用的情况下,使用随机森林回归对每个影响变量的重要性进行排序。在细菌群落中重要性最高的影响变量是土壤腐殖质厚度,其次是海拔和土壤含水率。在真菌群落中重要性最高的影响变量是土壤有机层厚度,其次是海拔和土壤腐殖质厚度,由此可见根际微生物的主要影响因子与环境有关 (图 4c-d)。

共现和共排斥由正负 Spearman 相关性表示,以分析不同火后森林自然演替条件下属间相互作用的网络。结果表明,不同的微生物群落与各自的细菌和真菌的自然演替时间和特定的土壤性质有关。属水平的网络分析表明,不同的自然演替时间和土壤性质均在微生物群落中引起不同的共现模式 (图 4 e-f)。对复杂土壤微生物中细菌和真菌物种相互作用的分析表明,细菌比真菌具有高合作网络模式。细菌网络有 50 节点和 302 条边,而真菌网络有 31 个节点和 43 条边。这说明细菌比真菌具有更高的合作模型 (图 4 e-f)。

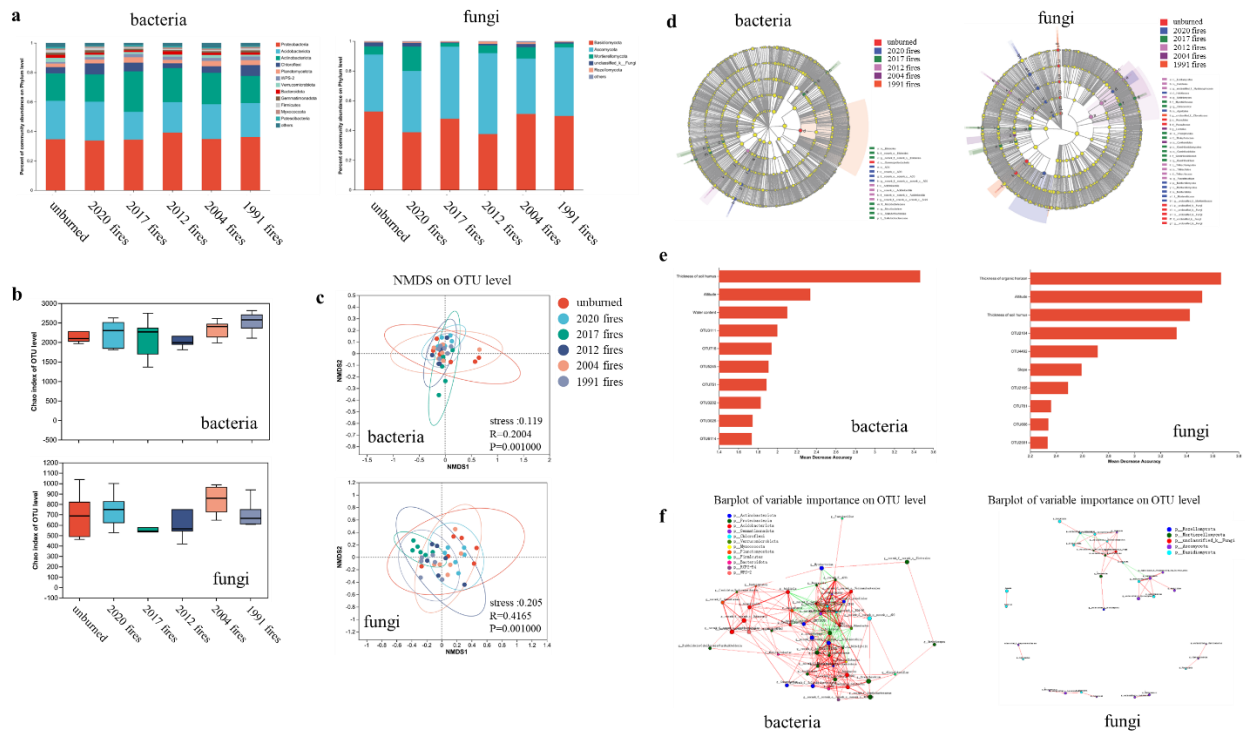


图 3 不同火后自然演替阶段越橘根际土壤样品中的微生物组成和结构。

Fig. 3 Microbial composition and structure in rhizosphere soil samples of lingonberry at different postfire natural succession stages.

3.3 越橘与根际微生物利用木质素和纤维素的证据

接种在土壤、木屑和凋落物三种培养基中的越橘，同时接种了真菌和细菌的混合液后能够在木屑和凋落物培养基中生存，并且产生了大量的根（图 4a）。这一结果说明越橘利用纤维素和木质素的原因是因为越橘菌根真菌和根际促生细菌的作用（附图 2）。我们通过对越橘生物量的统计表明，木屑和凋落物培养基显著抑制了越橘的生长发育，降低了越橘茎和根的干重和湿重（图 4b-c）。进一步通过生理指标的测定，我们发现木屑和凋落物培养基显著降低了植物叶绿素的含量（图 4d）。没有充足的碳源，越橘和根际微生物只能利用木屑和凋落物作为碳源维持生长发育。这促使越橘体内 MDA 含量的提高和 SOD 酶活性的增加（图 4e-f）。

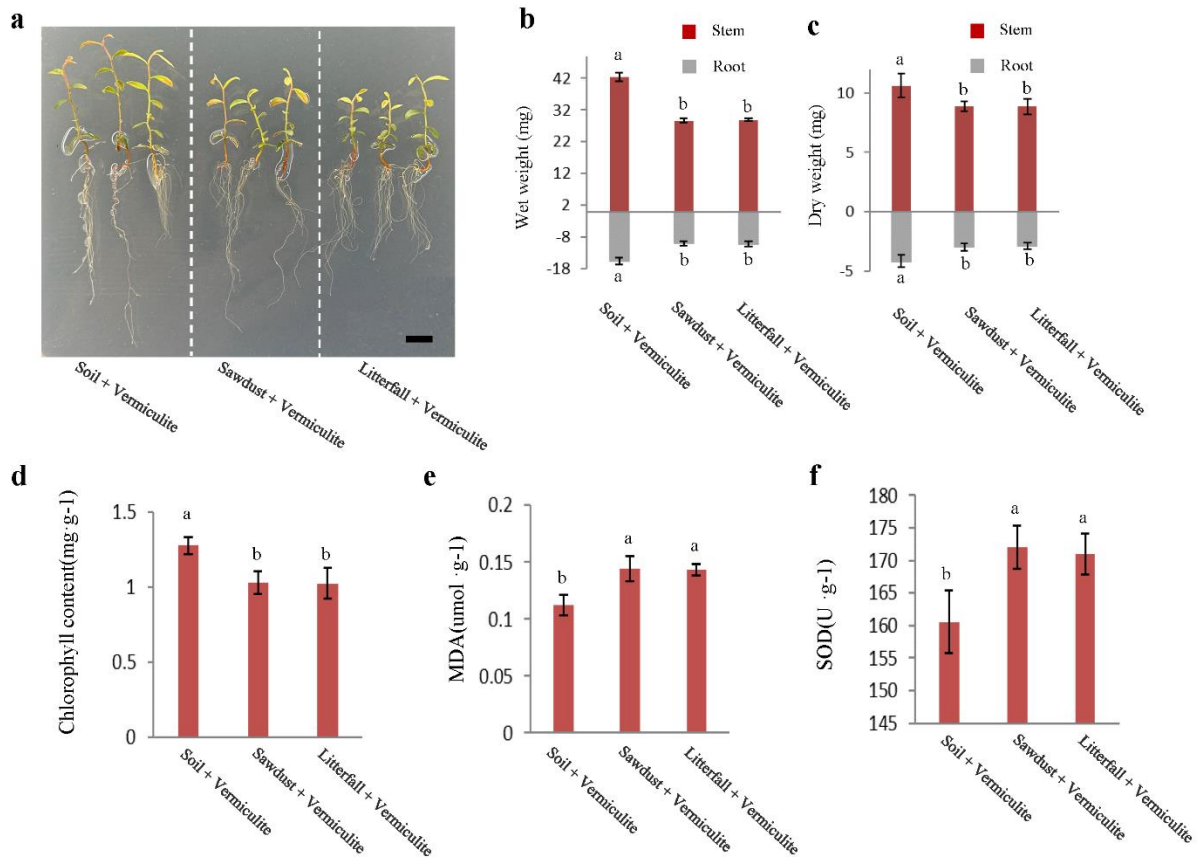


图 4 越橘与根际微生物相互作用利用木质素和纤维素的证据

Fig. 4 Evidence for the interaction between lingonberry and rhizosphere microorganisms using lignin and cellulose.

3.4 越橘对火灾后自然演替初期种子萌发的影响

为验证火干扰后自然演替过程中越橘利用木质素和纤维素维持生长发育。越橘与菌根真菌相互作用通过什么方式将有机物反馈给土壤。我们进行了越橘和白桦根系分泌物的收集和种子萌发实验（图 5a-c, l-n）。结果表明，越橘根系分泌物的添加显著抑制了兴安落叶松的种子萌发（图 5e-g）。但是，稀释 100 倍的根系分泌物对兴安落叶松种子萌发抑制作用减弱（图 5g）。越橘根系分泌物对白桦种子萌发没有影响，但是稀释 100 倍的根系分泌物对白桦种子萌发具有显著促进作用（图 df）。为进一步解释越橘根系分泌物促进白桦种子萌发的分子机制。我们进行了白桦种子萌发相关胚胎发育基因表达分析。白桦中维持干细胞特性的关键基因 *BpSTM* 和生长素转运关键基因 *BpPIN1* 在根系分泌物和稀释 100 倍的根系分泌物处理中高表达（图 5h-j）。促进胚胎发育关键基因 *BpWUS* 在越橘根系分泌物 100 倍稀释的条件下表达最高，根系分泌物添加表达下降（图 5i）。植物胚胎发育的关键调控因子 *BpLEC1* 的表达在越橘根系分泌物 100 倍稀释的条件下表达最高，与 *BpWUS* 基因表达相似（图 5k）。

白桦根系分泌物的添加显著抑制了兴安落叶松的种子萌发（图 5pr）。但是，稀释 100 倍的根系分泌物对兴安落叶松种子萌发抑制作用减弱（图 5r）。白桦根系分泌物对越橘种子萌发具有轻微促进作用，但是稀释 100 倍的根系分泌物对越橘种子萌发具有显著的促进作用（图 o-q）。为进一步解释白桦根系分泌物促进越橘种子萌发的分子机制。我们进行了越橘生长发育相关基因表达分析。越橘中维持生长发育特性的关键基因 *MADS-box* 基因在根系分泌物和稀释 100 倍的根系分泌物处理中高表达（图 5s）。植物冷胁迫应答

的关键转录因子 *DREB1* 基因在越橘根系分泌物添加条件下基因表达不变 (图 5t)。越桔 *PHYB* 基因在越橘根系分泌物 100 倍稀释的条件下表达先最高, 可能对种子萌发具有促进作用 (图 5u)。

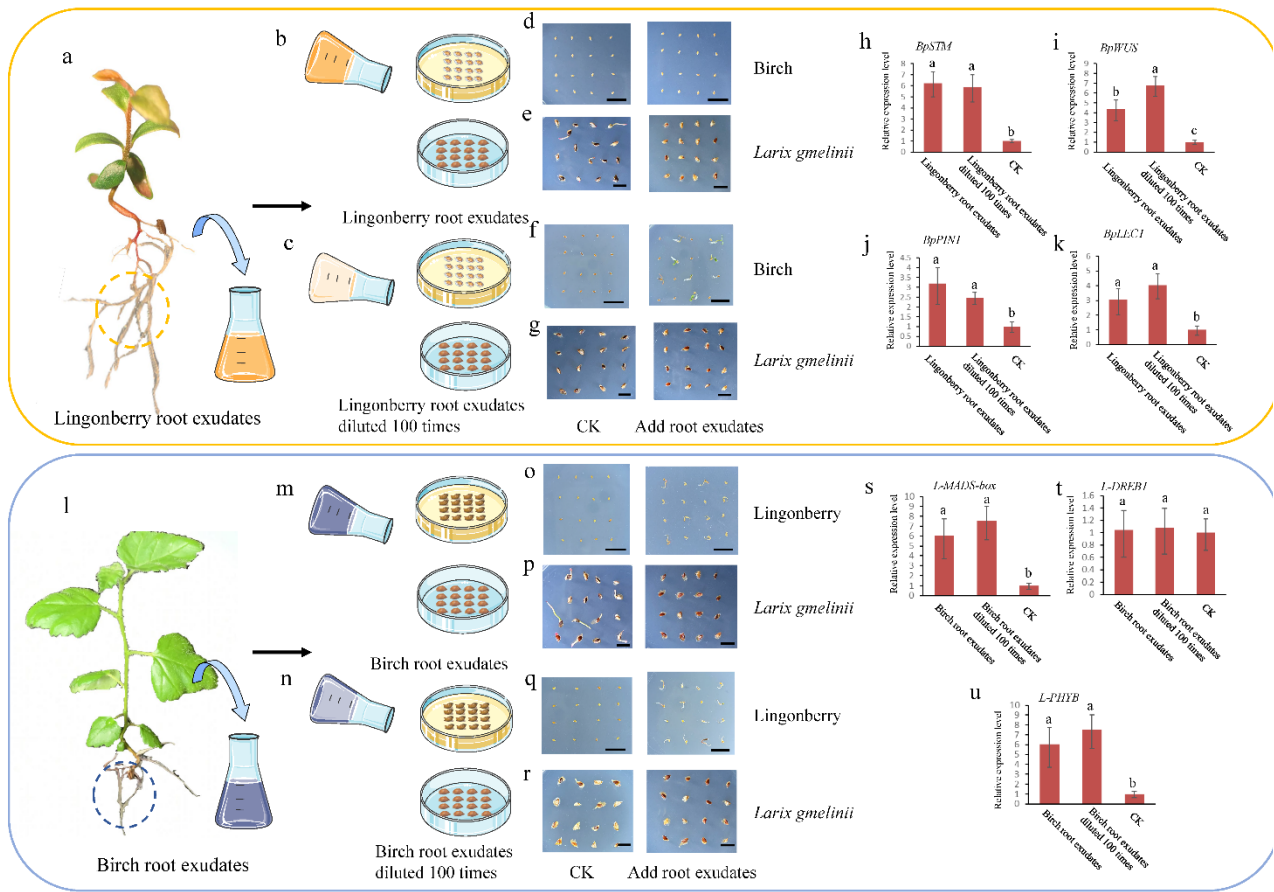


图 5 越橘对火灾后自然演替初期种子萌发的影响

Fig. 5 Effect of lingonberry on seed germination in the early stage of natural succession after wildfire.

GC-MS 的结果表明, 越橘根系分泌物和白桦根系分泌物的组成较为复杂, 主要有酯类、酸类和烷烃类物质。这类物质是抑制种子萌发和促进种子萌发的关键。但是, 我们不能忽视添加的浓度, 根系分泌物促进后者是抑制种子的机理仍需要进一步研究。

3.5 越橘调控火灾后自然演替的机理模型

中国大兴安岭地区火干扰后自然演替过程如图 6 所示, 未火烧的森林经过火烧后草本植物凭借顽强的生命力和复杂的根系迅速生长 (图 6b)。随着土壤腐殖质的积累, 越橘等灌木占据主要生态位, 通过分解火烧木和凋落物进行生长繁殖 (图 6c)。然后逐渐形成白桦林和兴安落叶松白桦混交林, 最终形成兴安落叶松顶级群落 (图 6d-e)。

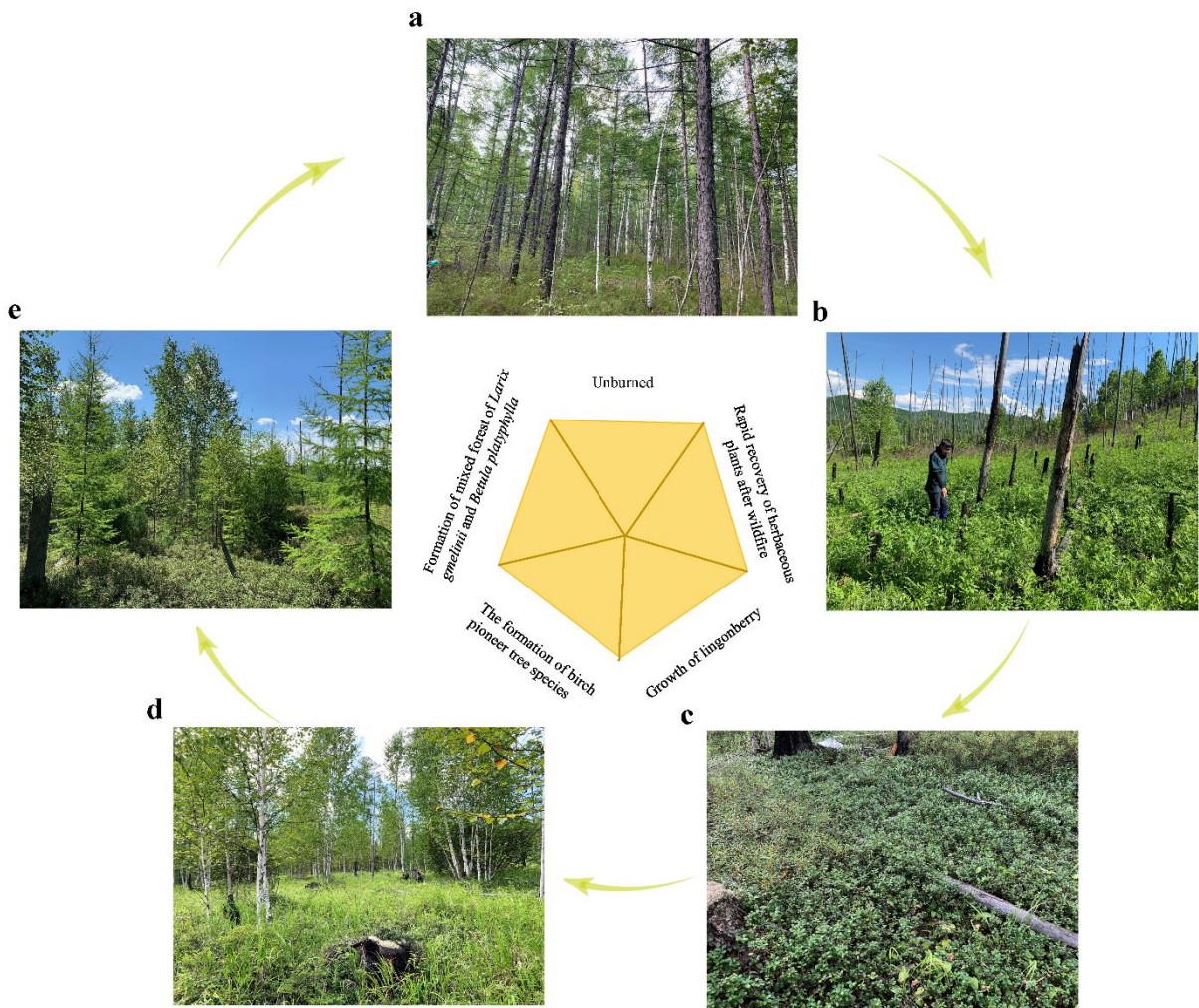


图 6 大兴安岭兴安落叶松林火后自然演替的特征

Fig. 6 Characteristics of postfire natural succession of *Larix gmelinii* forest in the Greater Khingan Range.

火干扰后森林表面植被和微生物被杀死（图 7），自然演替过程中，空气中的微生物沉降到土壤和织物表面，来自土壤深层的微生物向表层土壤移动。当越橘占据主要生态位的时候，越橘通过分解火烧木和凋落物将碳源通过根系分泌物的形式回归土壤。然而，越橘根系分泌物的产生促进了白桦种子萌发，抑制了兴安落叶松种子萌发。这一现象可能是导致白桦作为先锋树种形成的原因之一。白桦种子萌发后迅速占据森林上层空间，进一步通过根系分泌物促进越橘种子萌发以提供给土壤更多能量物质。同时抑制兴安落叶松种子萌发，这可能与白桦和兴安落叶松的生态环境的竞争有关（图 7）。

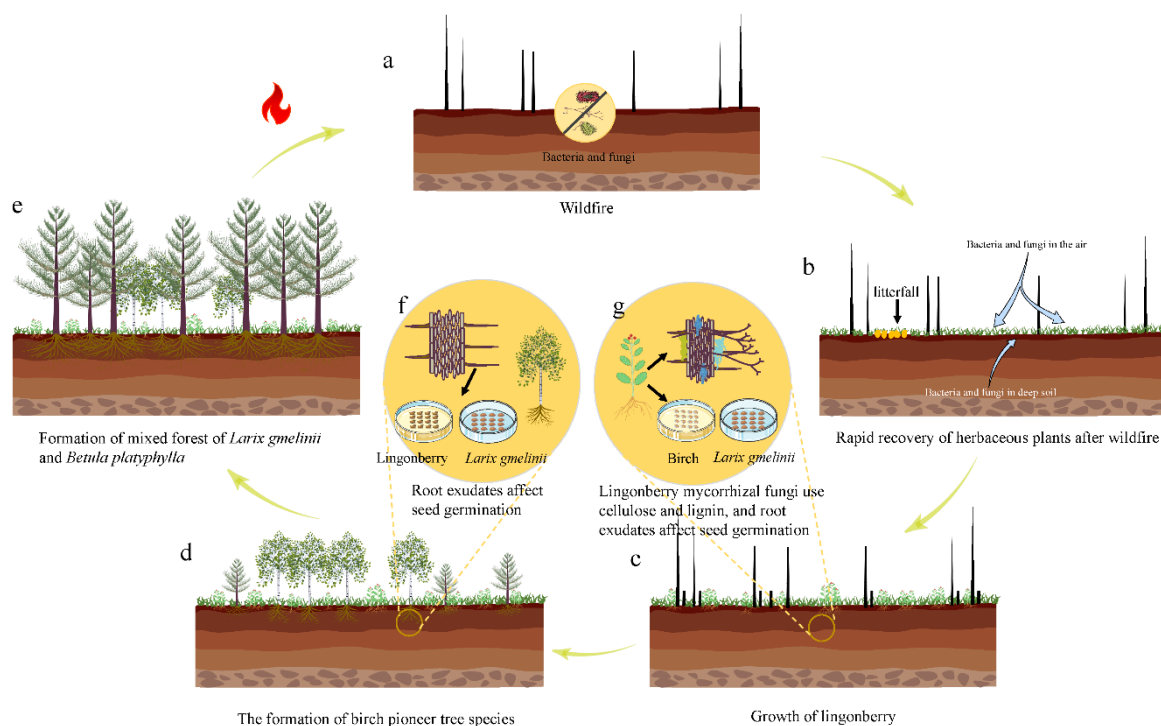


图 7 越橘调控火灾后自然演替的机理模型

Fig. 7 Mechanistic model of lingonberry regulating natural succession after wildfire.

4 讨论

植物微生物组被认定为植物健康生长的一个重要的决定因素。植物微生物组不仅仅影响植物的生长发育等，它同样会影响人类生活的健康，影响食物安全以及生命安全(Berendsen, Pieterse, Bakker, 2012)。16S rRNA 被认为是最适于细菌系统发育和分类鉴定的指标，目前已经成为研究环境样品中微生物组成结构的重要手段(Caporaso et al., 2012; Caporaso et al., 2011)。16S 位于原核细胞核糖体小亚基，包括保守区和高变区。其高变区具有属、种的特异性，随亲缘关系不同会存在差异。因此，在以往的研究中，16S 已经被用于研究植物微生物组中。真菌的分类鉴定以往主要是根据形态、生长及生理生化等进行，随着分子生物学的发展，序列分析也被逐步应用于真菌鉴定中，常用的技术包括 18S rDNA 和 ITS(Bachy, Dolan, Lopez-Garcia, Deschamps, Moreira, 2013)。我们使用扩增了细菌 16S V3-V4 区和真菌 ITS1 区用于根际土壤微生物群落结构的分析(图 3 和图 4)。我们的结果显示了根际微生物 Alpha 多样性指数无显著变化，然而 β 多样性指数差异较大(图 3c-d)。

研究学者发现将根际促生细菌(PGPR)与菌根真菌二者复合使用对植物促生、生防作用要大于单独使用。菌根真菌与根际促生细菌协同发挥作用，提高植物对土壤养分含量吸收、诱导植物产生系统抗性(Vestberg et al., 2004)。我们先前的研究表明，越橘菌根真菌的定殖能够显著缓解干旱胁迫对越橘造成的损害(H. Lou et al., 2022)。PGPR 与菌根真菌可以相互促进对方在植物根部定植。Barea 研究发现，在豆科作物上双接种 PGPR 菌株和丛枝菌根真(Barea, Toro, Orozco, Campos, Azcón, 2002)。结果在 AMF 接种处理的土壤根系周围的溶磷细菌数量要多于未接种 AMF 处理的土壤根系。AMF 菌丝在土壤中能够产生分泌物促进 PGPR 菌株的定殖。Meyer 发现恶臭假单胞菌和泡状丛枝菌根真菌复合接种可显著增加植物根的干重和根结瘤数(Meyer, Linderman, biochemistry, 1986)。我们拥有同样的结果，植物在接种菌根真菌和细菌后能够显著提高生物量(图 4)。同时，我们发现接种后的植物能够产生新的功能，即分解和利用纤维素和木质素(图 4)。这一结果解释了越橘在火烧迹地中广泛存在，尤其是火干扰后几十年的恢复时间内大量存在

的原因。

根系分泌物是维系土壤根际微生态环境的重要因素,也是植物与土壤根际环境进行物质交换和信息交流的化学通讯物质(Dakora Phillips, 2002)。根系分泌物具有促进或抑制植物生长、化感作用、防御作用等多种功能(Baetz Martinoia, 2014; Li et al., 2011)。我们的结果显示,越橘利用木质素和纤维素后通过根系分泌物的形式将营养物质转移到土壤中(图 5)。但是这一过程也会对火干扰后森林自然演替过程中的种子萌发产生影响(图 5)。根系分泌物对土壤理化性质的影响根系分泌物占植物光合作用的 5%-30%,作为有机质不断地注入到土壤,为土壤提供营养物质。根系分泌物中的多糖等大分子物质可以与土壤颗粒形成土壤团聚体,影响土壤微团聚体的大小、分布、吸附性等性能(Sun et al., 2010)。根系分泌物中的有机酸类化合物通过改变土壤 pH,螯合金属离子、改变土壤理化性质等方式。糖类和脂类能够增加土壤活性养分,提高根际土壤养分的有效性(Zheng, Zhang, Li, 2003)。根系分泌物能够活化土壤中难溶性磷,增加植物磷的吸收(Carvalho et al., 2013),根系分泌物同样有利于土壤中铁离子的利用(Kraemer, Crowley, Kretzschmar, 2006)。根系分泌物的作用广泛,我们发现白桦和越橘根系分泌物能够显著抑制兴安落叶松种子的萌发(图 5)。

根系分泌物对土壤微生物的影响是保证森林生态系统正常运行的重要因子之一,作为土壤中植物与土壤微生物交流的媒介,土壤微生物的区系组成结构、数量变化、多样性可以反映出森林土壤生态系统中植物的健康状态,对保持土壤肥力,维护森林生态系统的健康具有重要的意义(Foote, Boutton, Scott, 2015)。

根系分泌物和土壤微生物之间是一种长期的互动关系。Egamberdieva 研究发现根系分泌物加入到土壤后,微生物的活性被激活,数量也显著增加。土壤微生物数量比原土体高 5 倍-50 倍(Tan et al., 2013)。Dennis 研究发现根际土壤中真菌与细菌的生物量发生了显著变化,相比于非根际土壤,两者的比值由 1.5-9 降低为 0.13-1.5。说明加入根系分泌物后土壤中细菌的生物量显著提高。Zhang 研究发现根系分泌物具有一定的趋化诱导作用,苹果酸、柠檬酸、草酸等小分子化合物能够显著诱导根际促生细菌的趋化活性(Zhang et al., 2014)。

根际微生境对土壤养分有效性植物根系对养分的吸收利用有直接影响,并与植物的抗逆性、根系病害的防治以及农业持续发展密切相关。据估计,根系分泌的有机化合物一般在 200 种以上(Lynch, Brimecombe, De Leij, 2001)。按分子量大小可分为低分子和高分子分泌物。低分子分泌物主要有糖类、酚类、有机酸、和各种氨基酸,高分子分泌物主要包括胞外酶。我们的 GC-MS 具有相同的结果(附图 3)。主要是酚类和有机酸类等化合物(附图 3)。

研究表明,黑麦(*Secale cereale* L.)根系分泌物苯并-1,3-二氧杂环己腈等物质能够促进 *Orobanche* 种子胚根生长(Cimmino et al., 2015)。紫云英(*Vicia sativa* L.)根系分泌物可促进高粱种子发芽(Evidente et al., 2011)。油菜根系分泌物可促进石竹属植物(*Phelipanche* spp.)种子发芽(Miura et al., 2022)。豌豆根分泌物中的多酚,可刺激 *Orobanche foetida* 种子发芽(Evidente et al., 2010)。胡芦巴(*Trigonella foenum-graecum*)根分泌物能够抑制 *Orobanche crenata* 种子萌发(Evidente, Fernandez-Aparicio, Andolfi, Rubiales, Motta, 2007)。我们的结果显示越橘和白桦根系分泌物能够抑制兴安落叶松种子的萌发(图 5)。种子萌发是火干扰后森林自然演替过程中重要的环节之一,决定了森林的演替时间和演替方向。越橘植物根系分泌物影响种子萌发,能够很好的解释火干扰后的自然演替过程中白桦先锋树种的形成(图 5 和图 7)。然而,火干扰后森林自然演替的机制仍然还有很多不清楚的地方,需要展开更多的研究,这一结果将为火干扰后森林恢复提供技术支持。

参 考 文 献

- Amir A, McDonald D, Navas-Molina J A, *et al.* 2017. Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns. 2(2), e00191-00116.
- Bachy C, Dolan J R, Lopez-Garcia P, *et al.* 2013. Accuracy of protist diversity assessments: morphology compared with cloning and direct pyrosequencing of 18S rRNA genes and ITS regions using the conspicuous tintinnid ciliates as a case study. *Isme Journal*, 7(2), 244-255.
- Baetz U, Martinoia E. 2014. Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science*, 19(2), 90-98.
- Baldrian P. 2017. Forest microbiome: diversity, complexity and dynamics. *Fems Microbiology Reviews*, 41(2), 109-130.
- Barea J, Toro M, Orozco M, *et al.* 2002. The application of isotopic (^{32}P and ^{15}N) dilution techniques to evaluate the interactive effect of phosphate-solubilizing rhizobacteria, mycorrhizal fungi and *Rhizobium* to improve the agronomic efficiency of rock phosphate for legume crops. 63, 35-42.
- Berendsen R L, Pieterse C M, Bakker P A J T. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. 17(8), 478-486.
- Bolyen E, Rideout J R, Dillon M R, *et al.* 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. 37(8), 852-857.
- Bowman D M J S, Balch J K, Artaxo P, *et al.* 2009. Fire in the Earth System. *Science*, 324(5926), 481-484.
- Bradshaw S D, Dixon K W, Hopper S D, *et al.* 2011. Response to Keeley *et al.*: Fire as an evolutionary pressure shaping plant traits. *Trends in Plant Science*, 16(8), 405-405.
- Callahan B J, McMurdie P J, Rosen M J, *et al.* 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581.
- Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, *et al.* 2012. Ultrahigh-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *Isme Journal*, 6(8), 1621-1624.
- Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, *et al.* 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 4516-4522.
- Carvalhais L C, Dennis P G, Fan B, *et al.* 2013. Linking plant nutritional status to plant-microbe interactions. 8(7), e68555.
- Certini G. 2005. Effects of fire on properties of forest soils: a review. *Oecologia*, 143(1), 1-10.
- Chen S F, Zhou Y Q, Chen Y R, *et al.* 2018. fastp: an ultrafast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), 884-890.
- Cimmino A, Fernandez-Aparicio M, Avolio F, *et al.* 2015. Rycyanatines A and B and rycarbonitrines A and B, substituted cyanatophenol, cyanatobenzo[1,3]dioxole, and benzo[1,3]dioxolecarbonitriles from rye (*Secale cereale* L.) root exudates: Novel metabolites with allelopathic activity on *Orobanche* seed germination and radicle growth. *Phytochemistry*, 109, 57-65.
- Comelissen J H C, Makoto K. 2014. Winter climate change, plant traits and nutrient and carbon cycling in cold biomes. *Ecological Research*, 29(4), 517-527.
- Dakora F D, Phillips D A J F. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. 201-213.
- Douglas G M, Maffei V J, Zaneveld J R, *et al.* 2020. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, 38(6), 685-688.
- Edgar R C. 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10(10), 996.
- Evidente A, Cimmino A, Fernandez-Aparicio M, *et al.* 2010. Polyphenols, including the new Peapolyphenols A-C, from pea root exudates stimulate *Orobanche foetida* seed germination. *J Agric Food Chem*, 58(5), 2902-2907.
- Evidente A, Cimmino A, Fernandez-Aparicio M, *et al.* 2011. Soyasapogenol B and trans-22-dehydrocampesterol from common vetch (*Vicia sativa* L.) root exudates stimulate broomrape seed germination. *Pest Manag Sci*, 67(8), 1015-1022.
- Evidente A, Fernandez-Aparicio M, Andolfi A, *et al.* 2007. Trigoxazonane, a monosubstituted trioxazonane from *Trigonella foenum-graecum* root exudate, inhibits *Orobanche crenata* seed germination. *Phytochemistry*, 68(19), 2487-2492.
- Finkel O M, Salas-Gonzalez I, Castrillo G, *et al.* 2020. A single bacterial genus maintains root growth in a complex microbiome. *Nature*, 587(7832), 103-+.
- Foote J A, Boutton T W, Scott D A. 2015. Soil C and N storage and microbial biomass in US southern pine forests: Influence of forest management. *Forest Ecology and Management*, 355, 48-57.
- Gibson C M, Chasmer L E, Thompson D K, *et al.* 2018. Wildfire as a major driver of recent permafrost thaw in boreal peatlands. *Nature Communications*, 9.

- Glasspool I J, Scott A C, Waltham D, *et al.* 2015. The impact of fire on the Late Paleozoic Earth system. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- Gonzalez-Perez J A, Gonzalez-Vila F J, Almendros G, *et al.* 2004. The effect of fire on soil organic matter - a review. *Environment International*, 30(6), 855-870.
- Heim R J, Bucharova A, Brodt L, Kamp, J, *et al.* 2021. Postfire vegetation succession in the Siberian subarctic tundra over 45 years. 760, 143425.
- Hewitt R E, Chapin F S, Hollingsworth T N, *et al.* 2017. The potential for mycobiont sharing between shrubs and seedlings to facilitate tree establishment after wildfire at Alaska arctic treeline. *Molecular Ecology*, 26(14), 3826-3838.
- Hewitt R E, Hollingsworth T N, Chapin F S, *et al.* 2016. Fire-severity effects on plant-fungal interactions after a novel tundra wildfire disturbance: implications for arctic shrub and tree migration. *Bmc Ecology*, 11;16:25.
- Hobbie E A, Agerer R. 2010. Nitrogen isotopes in ectomycorrhizal sporocarps correspond to belowground exploration types. *Plant and Soil*, 327(1-2), 71-83.
- Hu H, Wei S, Sun L. 2012. Estimation of carbon emissions due to forest fire in Daxing'an Mountains from 1965 to 2010. 36(7), 629-644.
- Keuper F, van Bodegom P M, Dorrepaal E, *et al.* 2012. A frozen feast: thawing permafrost increases plant-available nitrogen in subarctic peatlands. *Global Change Biology*, 18(6), 1998-2007.
- Knorre A A, Kirdyanov A V, Prokushkin A S, *et al.* 2019. Tree ring-based reconstruction of the long-term influence of wildfires on permafrost active layer dynamics in Central Siberia. *Science of the Total Environment*, 652, 314-319.
- Koster E, Koster K, Berninger F, *et al.* 2017. Carbon dioxide, methane and nitrous oxide fluxes from a fire chronosequence in subarctic boreal forests of Canada. *Science of the Total Environment*, 601, 895-905.
- Kraemer S M, Crowley D E, Kretschmar R. 2006. Geochemical aspects of phytosiderophore-promoted iron acquisition by plants. *Advances in Agronomy*, Vol 91, 91, 1-46.
- Li X F, Wang J, Huang D, *et al.* 2011. Allelopathic potential of *Artemisia frigida* and successional changes of plant communities in the northern China steppe. 341, 383-398.
- Lichtenthaler H K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in Enzymology* (Vol. 148, pp. 350-382): Academic Press.
- Liu C S, Zhao D F, Ma W J, *et al.* 2016. Denitrifying sulfide removal process on high-salinity wastewaters in the presence of *Halomonas* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1421-1426.
- Lloyd A H. 2005. Ecological histories from Alaskan tree lines provide insight into future change. *Ecology*, 86(7), 1687-1695.
- Lorant M M, Abbott B W, Blok D, *et al.* 2018. Reviews and syntheses: Changing ecosystem influences on soil thermal regimes in northern high-latitude permafrost regions. 15(17), 5287-5313.
- Lou H, Guo C, Fan B, *et al.* 2022. Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) Interact With *Lachnum pygmaeum* to Mitigate Drought and Promote Growth. *Front Plant Sci*, 13, 920338.
- Lou H, Huang Y, Wang W, *et al.* 2022. Overexpression of the *AtWUSCHEL* gene promotes somatic embryogenesis and lateral branch formation in birch (*Betula platyphylla* Suk.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 150(2), 371-383.
- Lynch J M, Brimecombe M J, De Leij F A J, *et al.* 2001. Rhizosphere.
- Magoc T, Salzberg S L. 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), 2957-2963.
- Meyer J R, Linderman R J S. 1986. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. 18(2), 185-190.
- Miura H, Ochi R, Nishiwaki H, *et al.* 2022. Germination Stimulant Activity of Isothiocyanates on *Phelipanche* spp. *Plants (Basel)*, 11(5).
- Monazzah M, Rabiei Z, Enferadi S T. 2018. The Effect of Oxalic Acid, the Pathogenicity Factor of *Sclerotinia Sclerotiorum* on the Two Susceptible and Moderately Resistant Lines of Sunflower. *Iran J Biotechnol*, 16(1), e1832.
- Pereira P, Rein G, Martin D. 2016. Past and Present PostFire Environments. *Science of the Total Environment*, 573, 1275-1277.
- Randerson J T, Liu H, Flanner M G, *et al.* 2006. The impact of boreal forest fire on climate warming. *Science*, 314(5802), 1130-1132.
- Sairam R K, Rao K V, Srivastava G C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, 163(5), 1037-1046.
- Su W Q, Tang C X, Lin J H, *et al.* 2022. Recovery patterns of soil bacterial and fungal communities in Chinese boreal forests along a fire chronosequence. *Science of the Total Environment*, 805.

- Sun T-R, Cang L, Wang Q-Y, *et al.* 2010. Roles of abiotic losses, microbes, plant roots, and root exudates on phytoremediation of PAHs in a barren soil. *176*(1-3), 919-925.
- Tan S Y, Yang C L, Mei X L, *et al.* 2013. The effect of organic acids from tomato root exudates on rhizosphere colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5. *Applied Soil Ecology*, *64*, 15-22.
- Tas N, Prestat E, McFarland J W, *et al.* 2014. Impact of fire on active layer and permafrost microbial communities and metagenomes in an upland Alaskan boreal forest. *Isme Journal*, *8*(9), 1904-1919.
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, *151*(1), 59-66.
- Vestberg A, Kukkonen S, Saari K, *et al.* 2004. Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. *Applied Soil Ecology*, *27*(3), 243-258.
- Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, *et al.* 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(16), 5261-5267.
- Xiang X J, Shi Y, Yang J, *et al.* 2014. Rapid recovery of soil bacterial communities after wildfire in a Chinese boreal forest. *Scientific Reports*, *23*;4:3829.
- Zhang F, Meng X, Yang X, *et al.* 2014. Quantification and role of organic acids in cucumber root exudates in *Trichoderma harzianum* T-E5 colonization. *83*, 250-257.
- Zheng Y, Zhang F, Li L J J. 2003. Iron availability as affected by soil moisture in intercropped peanut and maize. *26*(12), 2425-2437.