

丛枝菌根真菌通过改变植物基因表达水平和微生物群落结构促进红叶石楠对镉的吸收

刘琛, 林义成, 郭彬, 李凝玉, 李华, 傅庆林

浙江省农业科学院 环境资源与土壤肥料研究所, 浙江 杭州 310021

刘琛, 林义成, 郭彬, 李凝玉, 李华, 傅庆林. 丛枝菌根真菌通过改变植物基因表达水平和微生物群落结构促进红叶石楠对镉的吸收. 生物工程学报, 2022, 38(1): 287-302.

LIU C, LIN YC, GUO B, LI NY, LI H, FU QL. Arbuscular mycorrhizal fungi enhanced cadmium uptake in *Photinia fraseri* through altering root transcriptomes and root-associated microbial communities. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 287-302.

摘要: 作为一种非必需元素, 重金属镉 (cadmium, Cd) 的污染对植物、环境乃至人类健康具有严重影响。利用绿化苗木移栽修复 Cd 污染土壤具有广阔的应用前景。为了明确丛枝菌根真菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) 对红叶石楠 (*Photinifraseri frase*) Cd 吸收的促进作用, 本研究利用盆栽试验比较了接种扭形伞房球囊霉 (*Sieverdingia tortuosa*) 和摩西斗管囊霉 (*Funneliformis mosseae*) 后红叶石楠的生长和 Cd 吸收差异, 并利用转录组和微生物组测序技术分析了对红叶石楠根系基因表达水平和根围微生物群落结构的影响。结果表明, 接种摩西斗管囊霉后, 红叶石楠根、茎、叶中 Cd 浓度相比对照分别增加了 57.2%、44.1% 和 71.1%, 全株 Cd 含量达到 182 $\mu\text{g}/\text{株}$ 。东京基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 代谢通路分析结果表明, 接种摩西斗管囊霉影响了植物蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路、植物激素信号转导、糖酵解/糖异生和次生代谢产物的生物合成等相关基因的表达。微生物群落结构分析表明, 接种扭形伞房球囊霉增加了酸杆菌门 (Acidobacteria) 的相对丰度, 而接种摩西斗管囊霉则增加了土壤中绿弯菌门 (Chloroflexi) 和骸骨细菌门 (Patescibacteria) 的相对丰度。接种 AMF 后球囊霉目 (Glomerales) 丰度显著增加, 由对照的 23% 上升至 70% 以上。相关性分析结果显示, 乙烯反应转录因子、 α -氨基己二酸半醛合酶、异淀粉酶和胍丁胺脱氨酶等基因表达与球囊霉目丰度显著负相关, 半胱氨酸氧化、热休克蛋白、肉桂酰辅酶 A 还原酶和脱落酸受体等相关基因表达与骸骨细菌门丰度呈显著正相关。结果表明, 摩西斗管囊霉的接种不仅直接影响了红叶石楠的基因表达水平, 促进了红叶石楠对 Cd 的吸收, 而且通过改变红叶石楠根围细菌群落结构, 进

Received: March 3, 2021; Accepted: May 10, 2021; Published online: May 18, 2021

Supported by: Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (LQ16D010007, Y19D010037); National Natural Science Foundation of China (41907113)

Corresponding author: FU Qinglin. Tel: +86-571-86404360; E-mail: fuql161@aliyun.com

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LQ16D010007, Y19D010037); 国家自然科学基金 (41907113)

一步提高了红叶石楠在 Cd 胁迫条件下的适应性。研究结果为进一步认识植物根系转录组和根围微生物组的相互关系提供了理论依据, 并为 Cd 污染土壤修复提供了一种新的策略。

关键词: 丛枝菌根真菌; 红叶石楠; 镉; 土壤修复; 转录组测序

Arbuscular mycorrhizal fungi enhanced cadmium uptake in *Photinia frase* through altering root transcriptomes and root-associated microbial communities

LIU Chen, LIN Yicheng, GUO Bin, LI Ningyu, LI Hua, FU Qinglin

Institute of Environment, Resource, Soil and Fertilizer, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang, China

Abstract: As a non-essential metal, cadmium (Cd) pollution poses severe threats to plant growth, environment, and human health. Phytoextraction using nursery stocks prior to their transplantation is a potential useful approach for bioremediation of Cd contaminated soil. A greenhouse pot experiment was performed to investigate the growth, Cd accumulation, profiles of transcriptome as well as root-associated microbiomes of *Photinia frase* in Cd-added soil, upon inoculation of two types of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) *Sieverdingia tortuosa* and *Funneliformis mosseae*. Compared with the control, inoculation of *F. mosseae* increased Cd concentrations in root, stem and leaf by 57.2%, 44.1% and 71.1%, respectively, contributing to a total Cd content of 182 $\mu\text{g}/\text{plant}$. KEGG pathway analysis revealed that hundreds of genes involved in ‘Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway’, ‘plant hormone signal transduction’, ‘biosynthesis of secondary metabolites’ and ‘glycolysis/gluconeogenesis’ were enriched upon inoculation of *F. mosseae*. The relative abundance of Acidobacteria was increased upon inoculation of *S. tortuosa*, while Chloroflexi and Patescibacteria were increased upon inoculation of *F. mosseae*, and the abundance of Glomerales increased from 23.0% to above 70%. Correlation analysis indicated that ethylene-responsive transcription factor, alpha-amino adipic semialdehyde synthase, isoamylase and agmatine deiminase related genes were negatively associated with the relative abundance of Glomerales operational taxonomic units (OTUs) upon inoculation of *F. mosseae*. In addition, plant cysteine oxidase, heat shock protein, cinnamoyl-CoA reductase and abscisic acid receptor related genes were positively associated with the relative abundance of Patescibacteria OTUs upon inoculation of *F. mosseae*. These findings suggested that AMF can enhance *P. frase* Cd uptake by modulating plant gene expression and altering the structure of the soil microbial community. This study provides a theoretical basis for better understanding the relationship between root-associated microbiomes and root transcriptomes of *P. frase*, from which a cost-effective and environment-friendly strategy for phytoextraction of Cd in Cd-polluted soil might be developed.

Keywords: arbuscular mycorrhizal fungus (AMF); *Photinia frase*; Cd; soil remediation; RNA-Seq

城市化进程的加快,矿业的开采,工业“三废”的排放,化肥和农药的高投入等现象均导致土壤重金属镉(cadmium, Cd)污染日趋严重,由此产生的生态问题备受关注^[1-2]。红叶石楠是园林绿化首选的苗木品种之一,具有生物量大、耐性强、适种性广等优点,是一种理想的、针对于重金属污染修复的植物材料^[3-4]。区别于传统植物提取只收获植物地上部的方式,利用红叶石楠“整体移栽-绿化”的方式,突破了修复植物后续处置难的瓶颈,具有较高的产业化推广前景^[5]。

虽然红叶石楠生物量上显著高于超累积植物,但其重金属的累积能力相对较低^[6]。研究表明,丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)可以与多种植物根系形成共生体系,是提高植物修复效率的一项重要生物技术措施^[7]。一方面,AMF可以改变Cd在寄主体内的分布,促进Cd在寄主体内的固定^[8-9];提高寄主抗氧化酶水平,平衡Cd胁迫引起的自由基损害^[10];调节寄主对其他养分的吸收,增强植物的耐性^[11]。另一方面,AMF影响Cd在寄主体内发生的细胞壁结合、跨膜转运、液泡沉淀隔离等过程^[12],改变寄主的根围微生物群落结构^[13],在微环境与基因调控层面促进植物对Cd的吸收^[14-15]。由于共生体系是一个多生物组分的复杂系统,不同菌种与寄主的共生体对不同浓度的重金属敏感性有所不同,其作用效果也并不相同^[16-19]。因此,筛选合适的AMF促进红叶石楠对Cd的吸收,提高其可提取总量,对土壤Cd修复具有重要意义。

鉴于AMF和红叶石楠在Cd污染土壤修复中的潜在应用价值,本文拟研究Cd胁迫条件下接种不同AMF对红叶石楠Cd积累的促进效果;结合转录组测序技术解析AMF调控红叶石楠基因表达水平的过程;通过高通量测序技术

明确AMF对土壤微生物群落结构的影响;解析微生物群落结构与植物转录组水平间的相互关系;进而在理论层面系统阐释AMF提高红叶石楠Cd耐性机理,也为研发高效、易推广的植物-微生物联合修复技术提供重要理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

扭形伞房球囊霉(*Sieverdingia tortuosa*, NM03A, 15116001BGCAM001)和摩西斗管囊霉(*Funneliformis mosseae*, HK01, 1511C001BGCAM0064)由北京市农林科学院植物营养与资源研究所提供。扩繁选择高粱作为寄主植物。经过3个月的生长,培养基质自然风干后磨碎过筛,获得细根根段、菌丝和孢子混合物作为后续试验的AMF菌剂。每克菌剂中含有15-20个孢子。

1.2 试验设计

将228 g CdCl₂·2.5H₂O溶解于3 L蒸馏水中然后混于5 kg土,该土Cd含量为20 000 mg/kg,将其风干过2 mm筛后作为母土。将母土与清洁土壤(有机质:11.81 g/kg;总氮:0.80 g/kg;总磷:0.44 g/kg;总K:0.88 g/kg,总Cd:0.16 mg/kg, pH:6.52)进行混合,最终配制成土壤的Cd浓度为10.1 mg/kg。土壤使用前采用120 °C灭菌2 h。

实验材料为株高约30 cm的2年生红叶石楠。塑料盆(直径20 cm,高15 cm)底部填入灭菌土壤2 kg,其上放置一个300目的尼龙网(直径20 cm)。尼龙网上部填入灭菌土壤1 kg,预先按5%的接种量(W/W)混入灭菌或未灭菌AM菌剂50 g。试验设3个处理,分别为:添加灭活AMF菌剂(CK),接种扭形伞房球囊霉(T1)和接种摩西斗管囊霉(T2)。随机排列,重复3次。

移栽红叶石楠后,在自然光照的温室中培养,培养温度为22-28 °C。培养期间定时向根

箱底部浇水。培养期为 2019 年 3 月至 2019 年 6 月, 共计 3 个月。培养结束后, 采集植物的根、茎、叶和尼龙网中的土壤, 其中鲜根用于转录组分析, 鲜土用于微生物组分析。烘干后的植株样品测定其生物量和 Cd 含量。

1.3 菌根感染率测定

取新鲜根样, 剪成 1 cm 根段, 随机取出部分根样用曲利苯蓝-直线截获法测定根系感染率, 并在显微镜下观察丛枝菌根感染状况^[13]。

1.4 植物生物量和 Cd 含量测量

生物量测定: 将采集的植物样品在 105 °C 下预处理 30 min 后, 于 70 °C 下烘干 24 h, 称量干重。

植物样品中 Cd 含量分析: 将前述烘干后的样品磨碎后, 称取 0.25 g, 加入 5 mL 硝酸微波消解至溶液清亮, 将消解液用超纯水定容至 40 mL。采用等离子体-电感耦合发射光谱仪测定消解液中 Cd 含量。

1.5 根的转录组分析

1.5.1 总 RNA 的提取与转录组测序

取鲜根在液氮中研成粉末, 用 Trizol 试剂盒 (Invitrogen) 提取总 RNA。每处理包括 3 份生物学重复。将每处理 3 份 RNA 样品等量混合, 委托上海派森诺生物科技有限公司构建测序文库, 并使用 Illumina HiSeq X-ten 测序平台进行转录组测序。

1.5.2 测序数据组装及 Unigenes 功能注释

对原始测序数据进行过滤, 去除测序接头、引物以及低质量 ($Q < 20$) 的序列后, 获得高质量的 clean reads。使用 Trinity 软件 (<http://trinityrnaseq.sf.net>) 将干净序列 (clean reads) 进行组装, 并获得 Unigenes 库。使用 Blast 软件将 Unigenes 序列与不同数据库进行比对, 获得注释信息。数据库包括非冗余蛋白数据库 (non-redundant protein sequences, NR)、基因本体论数据库

(Gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、直系同源蛋白的功能描述和功能分类 (Evolutionary genealogy of genes: Non-supervised orthologous groups, eggNOG) 和蛋白质序列数据库 (Swiss-prot protein database, Swiss-Prot)。基于 Swiss-Prot 数据库的注释信息, 剔除与植物不相关的基因。

1.5.3 差异表达基因分析

使用 FPKM (Fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) 计算 Unigenes 的表达量, 利用 Dseq2 分别筛选差异表达基因 (different gene expression, DGEs), 筛选条件为错误发现率 (false discovery rate, FDR) ≤ 0.05 且差异倍数 (fold change, FC) ≥ 2 。并对筛选出的差异基因进行 GO、KEGG 富集分析。

1.5.4 qRT-PCR 验证

将根的总 RNA 用 M-MLV reverse transcriptase 试剂盒 (TaKaRa) 逆转录成 cDNA, 用于后续 qRT-PCR 反应。选取 KEGG 代谢途径中与转运蛋白 (金属烟酰胺转运体、无机磷酸盐转运体、离子通道蛋白、输出蛋白)、抗氧化反应 (铁还原氧化酶、半胱氨酸蛋白酶) 相关的 6 个 Unigenes 和内参 18S rRNA 基因进行相对定量 PCR 验证, 利用预测的 CDS 序列和 Primer Premier 6 软件设计特异性引物 (表 1), 反应程序参照 AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master (Vazyme) 试剂盒。基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算。

1.6 土壤微生物群落 HiSeq 测序

AMF 18S rRNA 基因采用 AMV4.5NF (5'-AAGCTCGTAGTTGAATTTTCG-3') 和 AMDGR (5'-CCCAACTATCCCTATTAATCAT-3'), 细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区采用 341F (5'-CCTAY

表 1 相关基因扩增引物

Table 1 Primers used in this study

Gene ID	Gene annotation	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
TRINITY_DN478409_c0_g2	YSL2	CATAGGCGTGGCGAAGAAGA	GGTGGTCTCTCGTCCGTTTT
TRINITY_DN506339_c4_g1	SAP7	AAGGGATTTTGGCCCGACAC	CATCCACACCTCATCCACAA
TRINITY_DN508455_c1_g6	PHT16	AGGATATGCGCGAGGAATGG	CGTCGTTCCTCATCCTCC
TRINITY_DN517613_c9_g2	FRO2	ATAACCAGCCGCGAAGTCTC	CGAGCTGGTCTCTCGCTTTA
TRINITY_DN520459_c1_g1	XPO1A	GTACGTTCTTGGCGTCTTTGG	ACAAGTTCCGCTTCCTGAT
TRINITY_DN521203_c4_g1	RD21A	TATGGACGGTTCTGCTTGGG	TATCCGTCCATCCCCAACT
TRINITY_DN531601_c2_g1	MSL1	CACCGTCTCGGAACAACCTCA	ACAAAATGTGCCAAGCGACC
18S rRNA gene		GTGAAACTGCGAATGGCTCA	AATCATCAGAGCAACGGGCA

GGGRBGCASCAG-3') 和 806R (5'-GGACTAC NNGGGTATCTAAT-3')。

扩增体系为 25 μ L, 包括 5 μ L Buffer (5 \times)、2 μ L dNTPs、2 μ L DNA 模板、正反引物各 1 μ L (10 μ mol/L)、0.25 μ L 高保真聚合酶和 8.75 μ L 的灭菌双蒸水。反应程序为: 98 $^{\circ}$ C 2 min; 98 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 25 循环。上述 PCR 产物纯化后由派森诺生物科技有限公司利用 Illumina MiSeq 测序平台完成测序。

对于下机的测序数据,进行质量筛查、识别、去除嵌合体后,得到有效序列。使用 QIIME 软件 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, v1.8.0, <http://qiime.org/>) 按 97%的序列相似度进行操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 归并划分,获得每个样本在各分类水平的具体组成。细菌采用 Greengenes 数据库,AMF 采用数据库 maarjAM 数据库。

1.7 数据分析

生物转移系数 (translocation factor, TF')= $C_{\text{地上部分}}/C_{\text{根}}$ 。 $C_{\text{地上部分}}$ 表示地上部分的重金属含量, $C_{\text{根}}$ 表示地下部分的重金属含量。

所有结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。利用 SPSS 22.0 统计软件对结果进行单因素方差分析,并利用 Tukey 法检验同一因素下各处理间差异的显著性。在基迪奥云平台 (<https://www.omicshare.com/tools/>) 进行富集差异基因与富集 OTU 的相关性分析,并绘制热图。

com/tools/) 进行富集差异基因与富集 OTU 的相关性分析,并绘制热图。

2 结果与分析

2.1 接种 AMF 对红叶石楠生长及 Cd 吸收的影响

红叶石楠可与两种 AMF 形成良好的互利共生关系。扭形伞房球囊霉侵染率为 35.3%,摩西斗管囊霉侵染率为 44.3%,显著高于对照 (表 2)。与对照相比,接种 AMF 后对红叶石楠总生物量影响不显著,但显著促进了根和茎的生长。

种植 3 个月后,Cd 胁迫条件下,红叶石楠根、茎、叶 Cd 浓度分别为 3.55、2.41 和 1.35 mg/kg (表 3)。添加 AMF 菌剂后,红叶石楠对 Cd 的吸收显著增加,扭形伞房球囊霉处理的根、茎、叶 Cd 浓度分别为 4.68、2.92 和 1.70 mg/kg,相比 CK 增加了 32.0%、21.6%和 26.5%,摩西斗管囊霉处理的根、茎、叶 Cd 浓度分别为 5.58、3.46 和 2.31 mg/kg,相比 CK 增加了 57.2%、44.1%和 71.1%。总体而言,摩西斗管囊霉的促吸收效果优于扭形伞房球囊霉。Cd 胁迫条件下,对照红叶石楠全株 Cd 含量分别为 111 μ g/株,转移系数为 1.36,说明红叶石楠吸收的 Cd 主要是固定在地上部。接种 AMF 后,红叶石楠全株

表 2 接种 AMF 对红叶石楠侵染率和生物量的影响

Table 2 Effects of AMF on colonization rates and dry mass of *Photinifraseri frase*

Treatment	AMF colonization rate (g)	Root dry mass (g)	Stem dry mass (g)	Leaf dry mass (g)	Total mass (g)
CK	26.70±4.04 b	12.40±0.29 a	14.70±0.15 b	17.70±1.14 a	44.70±1.54 a
T1	35.30±4.51 ab	13.10±0.84 ab	16.90±1.47 ab	17.10±2.67 a	47.00±4.24 a
T2	44.30±10.40 a	14.00±0.67 a	17.70±0.41 a	18.90±2.18 a	50.60±2.69 a

Note: The data is expressed by mean value±standard deviation. Different letters (a, b) within a column indicated significant differences between treatments ($P<0.05$).

表 3 接种 AMF 对红叶石楠 Cd 吸收的影响

Table 3 Effects of AMF on Cd absorption of *Photinifraseri frase*

Treatment	Cd concentration in root (mg/kg)	Cd concentration in stem (mg/kg)	Cd concentration in leaf (mg/kg)	Total Cd content ($\mu\text{g/plant}$)	TF'
CK	3.55±0.20 c	2.41±0.07 b	1.35±0.07 b	103±6.83 c	1.36±0.24 a
T1	4.68±0.26 b	2.92±0.41 ab	1.70±0.19 ab	138±7.09 b	1.28±0.13 a
T2	5.58±0.41 a	3.46±0.17 a	2.31±0.41 a	182±2.95 a	1.36±0.22 a

Note: The data is expressed by mean value±standard deviation. Different letters (a, b, c) within a column indicated significant differences between treatments ($P<0.05$).

Cd 含量分别为 138 和 182 $\mu\text{g/株}$ ，相比对照增加了 34.7%和 76.9%。扭形伞房球囊霉和摩西斗管囊霉处理红叶石楠转移系数分别为 1.28 和 1.36，与 CK 无显著差异。

2.2 接种 AMF 对红叶石楠基因表达水平的影响

2.2.1 测序和组装 Unigenes 的基本信息

原始下机数据过滤后得到的序列 reads 数在 36 334 234–40 793 762，占总测序 reads 的 92.93%–93.78%。通过 Trinity 组装后的 Unigenes 序列总长为 312 501 376 bp，平均长度为 542 bp， N_{50} 为 728 bp，说明组装质量可以满足后续分析要求。所有样品组装的 Unigenes 共 576 484 个。将 Unigenes 与 NR、GO、KEGG、eggNOG、Swiss-Prot 五个数据库进行比对注释，分别比对到 234 592、101 958、146 514、214 485 和 235 236 个相关基因。获得注释的 Unigenes 共 275 031 个，其中在五大数据库中均注释到的共 38 716 个，占注释到的 14.1%。

2.2.2 差异基因表达与功能显著性富集分析

以拟南芥作为模式植物，共筛选到 29 461 个

有注释信息的 Unigenes。通过 DESeq2 分析后 (图 1)，扭形伞房球囊霉处理与对照相比 (CK_T1) 共有 132 个差异基因，其中 68 个上调基因，64 个下调基因；摩西斗管囊霉处理与对照相比 (CK_T2) 共有 332 个差异基因，其中 186 个上调基因，146 个下调基因；摩西斗管囊霉处理与扭形伞房球囊霉处理相比 (T1_T2) 共有 450 个差异基因，其中 242 个上调基因，208 个下调基因。

对差异基因进行 GO 富集分析。扭形伞房球囊霉处理与对照相比 (图 2A)，在排名前 20 位中细胞组分类别共富集到 4 个 GO 条目，差异表达基因主要归属于细胞膜组分 (GO: 0044425、GO: 0016021、GO: 0031224、GO: 0016020)。分子功能类别共富集 14 个 GO 条目，差异表达基因主要归属于催化活性 (GO: 0003824) 和氧化还原酶活性 (GO: 0016491)。生物过程类别共富集 2 个 GO 条目，主要归属于单个有机体过程 (GO: 0044699) 和氧化还原过程 (GO: 0055114)。摩西斗管囊霉处理与对

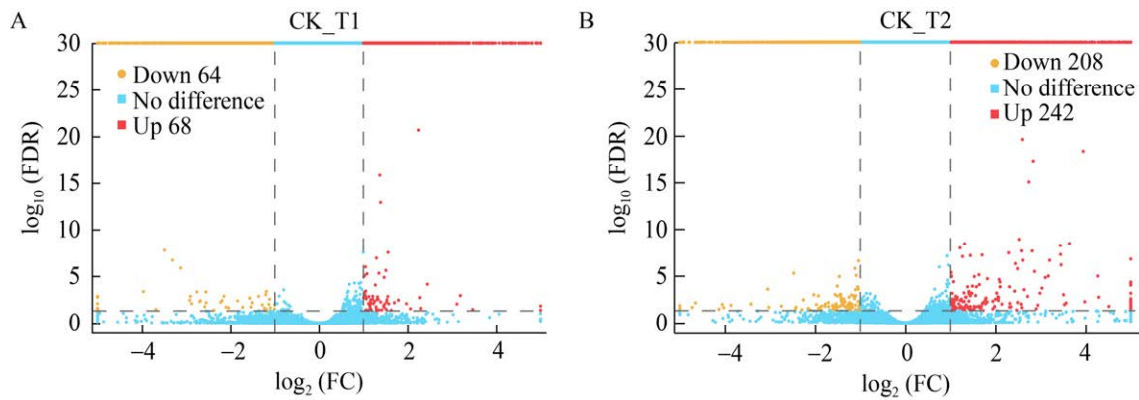


图 1 红叶石楠差异基因火山图 红色点表示上调基因,黄色点表示下调基因,蓝色点代表无差异基因
Figure 1 Volcano plot of differentially expressed genes (DEGs) in T1 (A) and T2 (B) compared to CK (red and yellow dots indicate the up-regulated and the down-regulated DEGs, respectively. Blue dots represent genes with no significant difference).

照相比 (图 2B), 在排名前 20 位中分子功能类别共富集 11 个 GO 条目, 最主要的差异表达基因归属于催化活性 (GO: 0003824)、结合活性 (GO: 0036094)、氧化还原酶活性 (GO: 0016491)。生物过程类别共富集 9 个 GO 条目, 主要归属于代谢过程 (GO: 0008152、GO: 0044710)、磷酸化 (GO: 0016310)、磷代谢过程 (GO: 0006793)。

2.2.3 代谢通路显著性富集分析

进一步研究差异基因参与的代谢路径。富集分析结果 (表 4) 显示, 摩西斗管囊霉处理与对照相比, 共有 318 个差异基因参与的 22 个代谢路径具有显著性差异。分别为氨基酸生物合成 (27 个)、糖酵解/糖异生 (15 个)、碳代谢 (23 个)、代谢途径 (81 个)、次生代谢产物的生物合成 (49 个)、植物蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路 (11 个)、植物激素信号转导 (13 个)、磷酸戊糖途径 (9 个)、果糖和甘露糖代谢 (9 个)、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 (8 个)、半乳糖代谢 (8 个)、牛磺酸和低牛磺酸代谢 (5 个)。而扭形伞房球囊霉

处理与对照相比, 代谢路径并无显著性差异。

2.2.4 qRT-PCR 验证

为了验证转录组测序结果的可靠性, 选择 6 个候选基因进行 qRT-PCR 检测 (图 3)。这些基因包括转运蛋白 (金属烟酰胺转运体、无机磷酸盐转运体、离子通道蛋白、输出蛋白) 和抗氧化反应相关蛋白 (铁还原氧化酶、半胱氨酸蛋白酶)。结果表明, 所有选择的基因表达水平均与转录组结果基本一致 ($R^2=0.793$, $P<0.001$), 说明转录组测序的结果是可靠的。

2.3 接种 AMF 对红叶石楠根围微生物群落结构组成的影响

从细菌群落结构组成图 (图 4A) 可以看出, 所有样本中的细菌主要分属于 7 个门, 分别是变形菌门 (Proteobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、髌骨细菌门 (Patescibacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和厚壁菌门 (Firmicutes), 其中变形菌门占总细菌的 50% 以上, 数量占绝对优势。与对照相比, 扭形伞房球囊霉处理酸杆菌门的相对丰度显著增加, 由对照的 9.8% 上

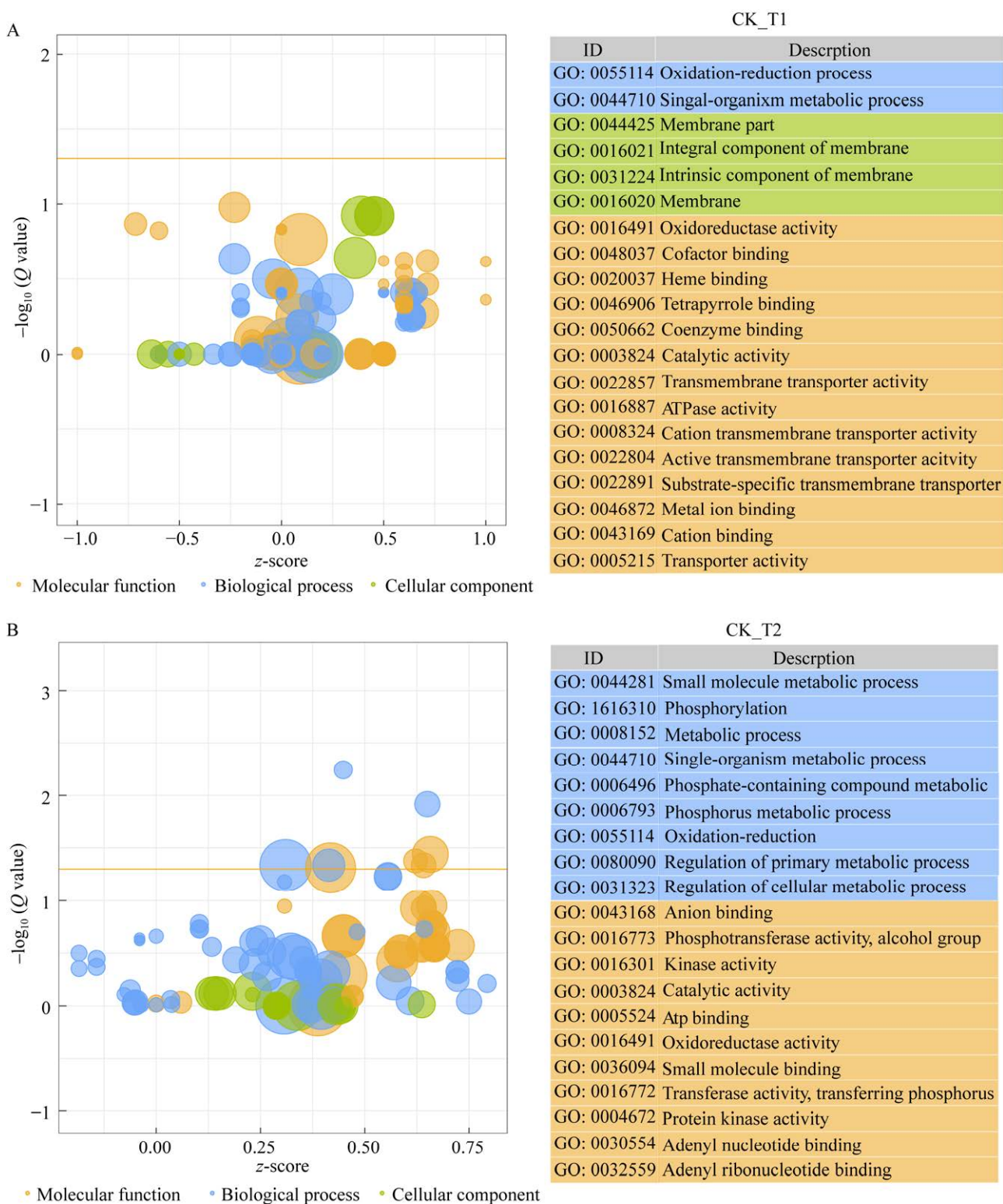


图 2 红叶石楠基因功能 GO 富集

Figure 2 Top 20 functional enrichment groups of three gene ontology (GO) categories in T1 (A) and T2 (B) compared to CK.

表 4 CK_T2 差异基因的 KEGG 显著性富集分析 ($P<0.05$)Table 4 Analysis of KEGG pathways in T2 treatment compared to CK ($P<0.05$)

Category	KO	DEGs	<i>P</i> value	<i>Q</i> value
Biosynthesis of amino acids	KO01230	27	<0.001	<0.001
Glycolysis/Gluconeogenesis	KO00010	15	<0.001	<0.001
Carbon metabolism	KO01200	23	<0.001	<0.001
Metabolic pathways	KO01100	81	<0.001	<0.001
Biosynthesis of secondary metabolites	KO01110	49	<0.001	<0.001
Pentose phosphate pathway	KO00030	9	<0.001	<0.001
Galactose metabolism	KO00052	8	<0.001	<0.001
Taurine and hypotaurine metabolism	KO00430	5	<0.001	<0.001
One carbon pool by folate	KO00670	6	<0.001	0.002
Fructose and mannose metabolism	KO00051	9	<0.001	0.003
Glycine, serine and threonine metabolism	KO00260	8	0.002	0.013
RNA degradation	KO03018	9	0.011	0.076
MAPK signaling pathway-plant	KO04016	11	0.014	0.085
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	KO01040	4	0.017	0.095
Carbon fixation in photosynthetic organisms	KO00710	5	0.022	0.120
Plant hormone signal transduction	KO04075	13	0.026	0.126
Sulfur metabolism	KO00920	4	0.028	0.126
Arginine and proline metabolism	KO00330	5	0.029	0.126
Cyanoamino acid metabolism	KO00460	4	0.029	0.126
Selenocompound metabolism	KO00450	3	0.037	0.150
Protein processing in endoplasmic reticulum	KO04141	15	0.044	0.167
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	KO00630	5	0.045	0.167

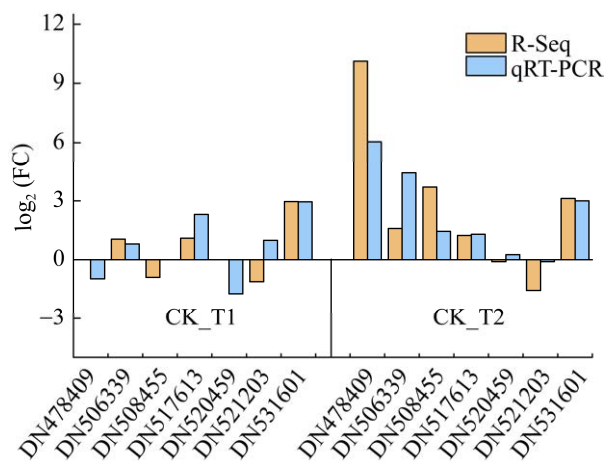


图 3 定量 PCR 验证结果

Figure 3 Validation of RNA-Seq data by real-time quantitative PCR.

升至 14.3%。接种摩西斗管囊霉后,绿弯菌门则由 20.9% 上升至 40.6%, 骸骨细菌门则由 2.86% 上升至 4.36%。

从 AMF 群落结构组成图 (图 4B) 可以看出,所有样本中的 AMF 主要分属于球囊霉目 (Glomerales)、类球囊霉目 (Paraglomerales)、原囊霉目 (Archaeosporales) 和多孢囊霉目 (Diversisporales)。对照中,类球囊霉目占总 AMF 的 67.7%, 占绝对优势。接种后显著降低了类球囊霉的相对丰度,增加了球囊霉目的相对丰度。

2.4 微生物群落结构与差异表达基因关系分析

摩西斗管囊霉处理与对照相比,代谢通路

富集的差异基因和微生物群落结构组成的相关性分析结果表明,一些差异基因的表达与AMF的富集呈显著相关(图5,表5)。接种摩西斗管囊霉后,参与“植物MAPK信号通路”的

TRINITY_DN499387_c1_g1(乙烯反应转录因子),涉及“次生代谢产物的生物合成”的TRINITY_DN529506_c0_g1(α -氨基己二酸半醛合酶)、TRINITY_DN529252_c1_g1(异淀粉

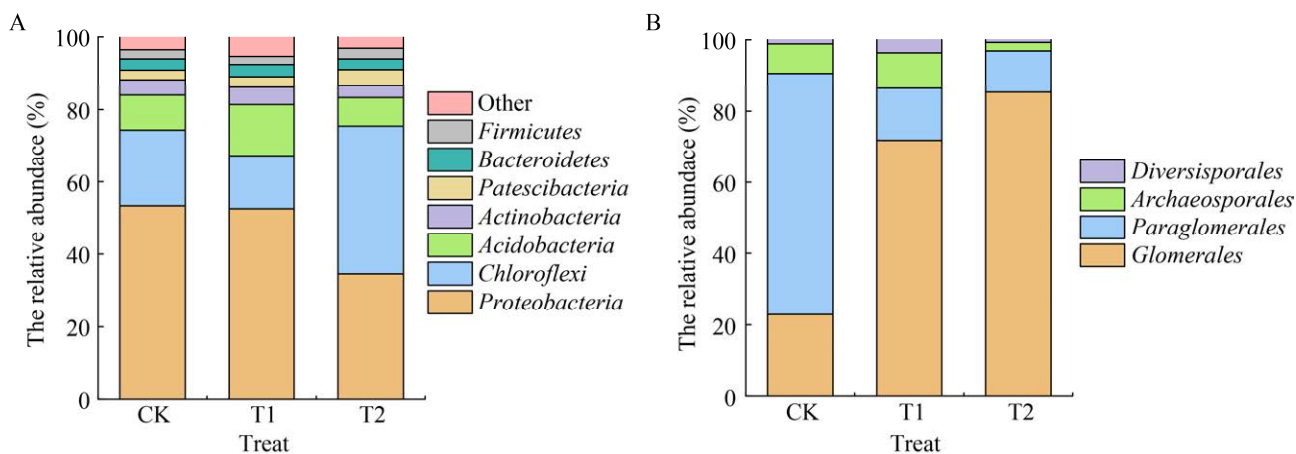


图4 红叶石楠根围细菌(A)和AMF(B)群落组成相对丰度

Figure 4 The relative abundance of bacterial (A) and AMF (B) community in rhizosphere of *P. frase*.

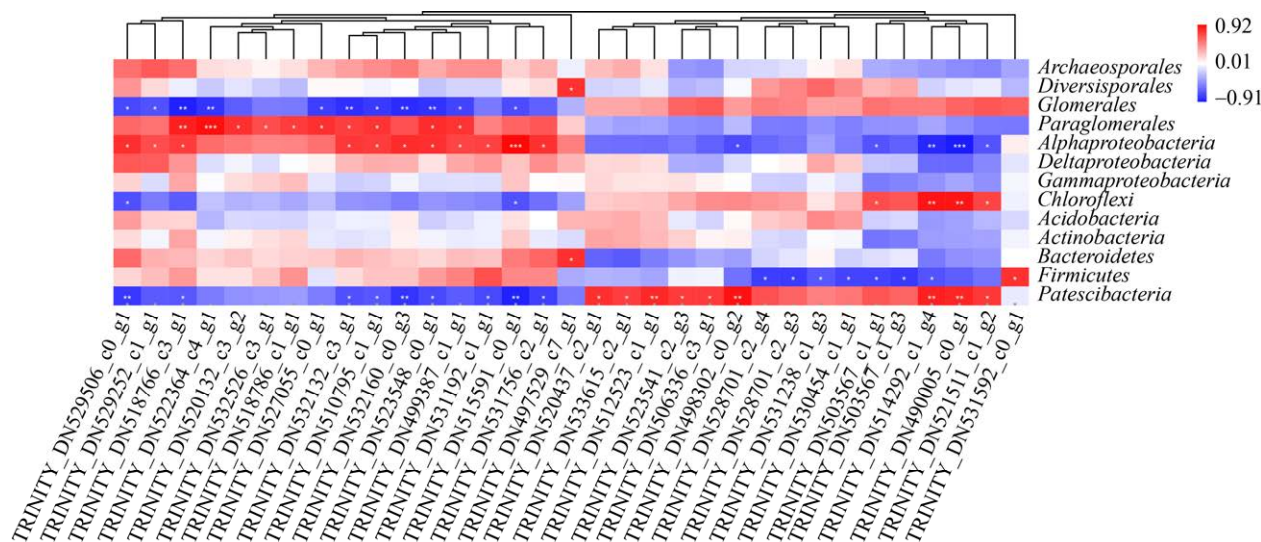


图5 CK_T2代谢通路富集的差异基因与细菌、AMF的OTU相关性分析 *表示显著相关, $P < 0.05$; **表示极显著相关, $P < 0.01$; 颜色表示差异基因与微生物群落相对丰度的相关性, 红色代表正相关, 蓝色代表负相关, 颜色由深到浅代表相关系数由高到低

Figure 5 Correlation analysis between enriched DEGs involved in various KEGG pathways and enriched bacterial and AMF OTU species in T2 treatment compared to CK. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; Different colors represent correlation between genes and relative abundance of taxa. The red and blue represent positive and negative correlation, respectively. The color from dark to light indicate correlation index from high to low.

表 5 CK_T2 差异基因 (FDR<0.05)

Table 5 Analysis of DEGs in T2 treatment compared to CK (FDR<0.05)

DEGs	Category	Log ₂ (FC)	Swissprot annotation
TRINITY_DN529506_c0_g1	Metabolic pathways/Biosynthesis of secondary metabolites	-1.09	Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase
TRINITY_DN529252_c1_g1	Metabolic pathways/Biosynthesis of secondary metabolites	-1.10	Isoamylase 3, chloroplastic
TRINITY_DN518786_c1_g1	Metabolic pathways	-3.42	Alpha-trehalose-phosphate synthase
TRINITY_DN522364_c4_g1	Metabolic pathways/Carbon metabolism	-0.59	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial
TRINITY_DN527055_c0_g1	Biosynthesis of amino acids/Carbon metabolism/Glycine, serine and threonine metabolism	-1.36	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 2, chloroplastic
TRINITY_DN532132_c3_g1	Biosynthesis of amino acids/ Carbon metabolism/Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	-0.76	Aconitate hydratase 1
TRINITY_DN510795_c1_g1	Arginine and proline metabolism	-1.18	Agmatine deiminase
TRINITY_DN532160_c0_g3	Metabolic pathways/Biosynthesis of secondary metabolites	-0.99	4-coumarate-CoA ligase-like 7
TRINITY_DN523548_c0_g1	Plant hormone signal transduction	-1.19	Transcription factor TGA7
TRINITY_DN499387_c1_g1	MAPK signaling pathway-plant	-1.04	Ethylene-responsive transcription factor 1B
TRINITY_DN515591_c0_g1	Metabolic pathways	-0.80	Ureidoglycolate hydrolase
TRINITY_DN520437_c2_g1	Metabolic pathways/Taurine and hypotaurine metabolism	1.94	Plant cysteine oxidase 1
TRINITY_DN523541_c2_g3	Protein processing in endoplasmic reticulum	2.34	Heat shock protein 90-1
TRINITY_DN514292_c1_g4	MAPK signaling pathway/Plant hormone signal transduction	1.48	Abscisic acid receptor PYL4
TRINITY_DN533615_c2_g1	Metabolic pathways/aurine and hypotaurine metabolism	1.62	Plant cysteine oxidase 2
TRINITY_DN512523_c1_g1	Metabolic pathways/Biosynthesis of secondary metabolites	1.10	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 8
TRINITY_DN521511_c1_g2	Metabolic pathways/Biosynthesis of secondary metabolites	1.30	Cinnamoyl-CoA reductase 2
TRINITY_DN506336_c3_g1	Protein processing in endoplasmic reticulum	1.44	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c
TRINITY_DN498302_c0_g2	Protein processing in endoplasmic reticulum	1.32	Heat shock 70 kDa protein 3
TRINITY_DN490005_c0_g1	Protein processing in endoplasmic reticulum	2.07	15.4 kDa class V heat shock protein

酶) 和 TRINITY_DN532160_c0_g3 (4-香豆酸-CoA 连接酶样 7), 参与“精氨酸和脯氨酸代谢”的 TRINITY_DN532132_c3_g1 (胍丁胺脱氨酶), 以及参与“植物激素信号转导”的 TRINITY_

DN523548_c0_g1 (转录因子 TGA7) 与球囊霉目丰度呈负相关, 与类球囊霉目呈正相关。涉及“牛磺酸和低牛磺酸代谢”的 TRINITY_DN520437_c2_g1 (半胱氨酸氧化酶 1) 和

TRINITY_DN521511_c1_g2 (半胱氨酸氧化酶 2), 参与“植物病原相互作用”的 TRINITY_DN523541_c2_g3 (热休克蛋白), 参与“次级代谢产物合成”的 TRINITY_DN533615_c2_g1 (肉桂酰辅酶 A 还原酶) 和 TRINITY_DN514292_c1_g4 (“脱落酸受体”), 与髌骨细菌门相对丰度呈显著正相关。

3 讨论

植物修复主要分为植物固定和植物提取^[11]。对于植物提取来说, 主要是通过植物的地上部来富集重金属, 从而在移除地上部的同时减少土壤中重金属的含量; 而对于植物固定而言, 主要是将重金属固定在植物的根围。红叶石楠的转移系数为 1.28–1.36, 这说明红叶石楠主要是将 Cd 固定在地上部, 适宜作为一种提取类修复植物。与常规的 Cd 超积累植物相比, 红叶石楠生长较为迅速, 年生长量可达 70 cm 以上。通过修剪和移栽, 可以将固定的重金属带走。红叶石楠根吸收的 Cd 占总体的 40% 以上, 建议在幼苗栽种时使用根袋, 在移栽时将更多的根系带走, 提高植物提取效率。

在不同重金属浓度下, 接种 AMF 对不同植物的作用效果并不相同^[20]。Liu 等^[15]研究发现接种变形球囊霉 (*Glomus versiforme*) 后可以提高龙葵 *Sorghum bicolor* 根围土壤中酸性磷酸酶的活性, 增加龙葵对磷的吸收, 从而增加龙葵的生物量。当土壤中 Cd 浓度为 25 mg/kg 和 50 mg/kg 时可以促进龙葵对 Cd 的吸收, 但在 100 mg/kg 时则是通过稀释作用降低龙葵体内 Cd 浓度, 提高其抗逆性。本研究中, 接种 AMF 菌剂后, 均提高了根围土壤中 Cd 的有效性, 促进了红叶石楠对 Cd 的吸收与富集。除寄主植物外, AMF 的作用效果与 AMF 种类密切相关^[21]。Jiang 等比较了变形球囊霉和根内根孢囊霉

(*Rhizophagus intraradices*) 对忍冬 *Lonicera japonica* Cd 吸收的影响, 结果表明前者会降低植物根系对 Cd 的吸收, 而后者则相反^[22]。在本研究中, 摩西斗管囊霉的促吸收效果优于扭形伞房球囊霉。因此利用红叶石楠与摩西斗管囊霉形成共生体更适用于 Cd 污染土壤修复。

目前还没有完整的红叶石楠基因组序列, 因此, 在本研究中选择拟南芥作为参比植物。接种摩西斗管囊霉后, 红叶石楠中 22 个代谢途径具有显著性差异, 其中的植物 MAPK 信号通路和植物激素信号转导与 Cd 胁迫密切相关。MAPK 在各种非生物和生物胁迫的植物信号转导中起着重要作用, 通过三级底物磷酸化调控转录因子, 从而激活应激适应所需的基因, 如金属转运蛋白和螯合物合成的相关基因^[23]。植物激素, 如生长素、乙烯、茉莉酸、水杨酸和脱落酸, 是植物生长发育的重要信号分子, 通过调节植物激素可以影响植物对 Cd 胁迫的适应性^[24]。Xian 等^[25]研究结果也显示高 Cd 耐受的早熟禾 *Poa pratensis* 通过调节参与生长素、乙烯、油菜素类固醇和脱落酸信号转导的相关基因影响信号转导, 从而协调了与 Cd 耐受相关的细胞壁和细胞膜稳定性、细胞伸长相关基因的表达。此外, 摩西斗管囊霉处理下富集的糖酵解/糖异生和碳代谢主要参与光合作用, 有助于产生更多的淀粉和其他多糖^[26], 促进红叶石楠的生长。前人研究也表明, 利用 AMF 可以影响植物体的谷胱甘肽代谢、植物激素和 MARK 信号等相关代谢途径, 减少 Cd 对植物体的损害^[12]。

本研究表明, 摩西斗管囊霉处理上调了转运蛋白基因的表达 (ABC 转运蛋白 A/F、金属烟碱胺转运蛋白 YSL2 和肽转运蛋白 PTR16), 这些转运蛋白在根系吸收和转运 Cd 过程中发挥重要作用^[27], 这意味着接种摩西斗管囊霉可以促进红叶石楠吸收更多的 Cd。ABC 转运蛋白家

族在植物激素的运输中发挥着重要作用,如生长素和脱落酸。本研究结果也显示,在摩西斗管囊霉处理中,脱落酸的受体 PYL4 也上调表达。脱落酸受体 PYL 是脱落酸和茉莉酸信号通路之间串联的关键成分, PYL4 的增强表达,可以增强脱落酸和茉莉酸积累水平,从而应对缓解 Cd 胁迫^[28]。对于液泡膜上的肽转运蛋白家族,除了作为次生代谢物转运蛋白,也可以协助植物在生物和非生物胁迫下发挥防御作用^[29]。因此接种摩西斗管囊霉后这些基因的上调表达在一定程度上提高了红叶石楠的耐受性。

转录因子在调节植物对各种内部或外部信号的适应过程中起着关键作用,如乙烯反应转录因子 (Ethylene-responsive factor, ERF)、bZIP、MYB 家族等。在胁迫条件下,它们可以通过激活和抑制基因来控制应激信号转导途径中的下游基因表达^[30]。本研究表明,接种摩西斗管囊霉下调了红叶石楠 2 个 MYB 和 3 个 ERF 的表达,同时,耐 Cd 的松柳 *Salix matsudana* 根系的 ERF 表达也受到抑制,有助于提高植物对的 Cd 胁迫耐受性^[31]。此外,氨基酸合成相关基因 (如编码半胱氨酸氧化酶、丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶、丝氨酸羟甲基转移酶和热休克蛋白) 在摩西斗管囊霉处理中上调表达,这意味着这些蛋白对于缓解 Cd 对红叶石楠的损伤也起着重要作用。

Cd 胁迫会产生过量的活性氧导致植物体损伤,如单线态氧 (${}^1\text{O}_2$)、超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、过氧化氢 (H_2O_2) 和羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$)^[32]。植物主要通过构建抗氧化防御系统从而降低活性氧的损伤^[33]。在本研究中,接种摩西斗管囊霉后上调了抗氧化相关基因 (如编码 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶、内质网氧化还原素、细胞色素 P450 等基因),但未见过氧化物酶、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶等相关基因的差异表

达。一种可能在于缺少全基因组序列,依据拟南芥所注释的基因有限,另一种可能在于植物所采用的氧化还原稳态机制因寄主植物、金属浓度和暴露时间而异^[22]。细胞色素 P450 协助植物氧化降解环境毒素,从而提升植物的防御能力。Yan 等在高耐受 Cd 的江南星蕨 *Microsorium fortune* 体内也发现了细胞色素 P450 相关基因的上调表达^[34]。

据报道接种 AMF 菌剂会影响土壤的根围环境^[35],不同处理间,细菌群落的多样性和丰富度差异不显著,主要的种群变形菌门、绿弯菌门、酸杆菌门和放线菌门占总量的 85%以上,与其他 Cd 污染土壤中的主要种群一致^[36]。在本研究中,扭形伞房球囊霉处理增加了土壤中酸杆菌门的相对含量;摩西斗管囊霉处理增加了绿弯菌门和髌骨细菌门的相对含量。酸杆菌门可以降解土壤中的植物凋落物并利用植物根围分泌物中的糖^[37-38]。绿弯菌门是一类光合细菌,与土壤有机质代谢密切相关,对建立微生物群落发挥重要作用^[39]。前人研究也表明,接种 AMF 后可以降低了根中碳的相对分配,增加了根的净沉积量^[40]。因此,这两类种群的增加可能促进了土壤有机质的转化,影响了土壤中养分的有效性,促进了植物的生长,并进而增加了红叶石楠的抗逆性。研究结果也显示,接种 AMF 促进了根和茎的生长。

土壤中 AMF 主要是球囊霉目、类球囊霉目、原囊霉目和多孢囊霉目,与一般 Cd 污染土壤中 AMF 群落结构研究结果一致^[41]。相比细菌群落,接种 AMF 对 AMF 群落结构的影响更为直接。接种后,球囊霉目相对比例显著增加,发展成为优势种群。接种扭形伞房球囊霉和摩西斗管囊霉后,AMF 群落结构并不相同。接种与否不能区分处理间细菌的群落组成,但可以区分 AMF 群落,这意味着土壤细菌组成由植物

种类、土壤状态等多种因素决定,而AMF群落组成主要受到接种和植物种类的影响^[42]。

植物根围微生物组与植物的生长发育密切相关。接种摩西斗管囊霉后,球囊霉目成为主要AMF种群,与红叶石楠植物激素信号转导的代谢途径相关基因表达密切相关。Tian等研究结果也表明,土壤中AMF会影响野生型水稻的基因表达水平^[43]。髌骨细菌门在微生物种群中相对含量仅为2.63%–4.36%,但却影响红叶石楠的重金属抗性,与“植物病原相互作用”(热休克蛋白)代谢途径的相关基因呈显著正相关。热休克蛋白是植物在Cd胁迫条件下的应激产物,参与细胞蛋白稳定平衡与修复,表达量的增加可以提高植物体的抗性^[44]。这说明,AMF不仅直接影响红叶石楠的基因表达,而且通过改变红叶石楠根围细菌的群落结构,进一步影响了红叶石楠在Cd胁迫条件下的适应性。

4 结论

本研究表明,接种摩西斗管囊霉可促进红叶石楠生长,增加红叶石楠根、茎和叶Cd的浓度,同时上调红叶石楠根系中参与转运、氧化还原反应、激素信号转导等相关基因表达,促进红叶石楠对Cd吸收的同时缓解了Cd的胁迫损害。接种AMF可增加土壤中酸杆菌门、绿弯菌门和髌骨细菌门的相对丰度,并使球囊霉成为土壤中的优势种群。土壤根围微生物组的变化也影响了根系转录组表达,增强了红叶石楠的抗逆性。因此,利用摩西斗管囊霉与红叶石楠共生可以增加红叶石楠对Cd的提取量,提高其修复效率。该技术兼顾生态和经济效益,具有潜在的修复应用价值。

REFERENCES

[1] Bolan N, Kunhikrishnan A, Thangarajan R, et al.

Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils—to mobilize or to immobilize? *J Hazard Mater*, 2014, 266: 141-166.

[2] Rezapour S, Kouhinezhad P, Samadi A. The potential ecological risk of soil trace metals following over five decades of agronomical practices in a semi-arid environment. *Chem Ecol*, 2018, 34(1): 70-85.

[3] Mori J, Sæbø A, Hanslin HM, et al. Deposition of traffic-related air pollutants on leaves of six evergreen shrub species during a Mediterranean summer season. *Urban For Urban Green*, 2015, 14(2): 264-273.

[4] 付广义, 邱亚群, 宋博宇, 等. 东江湖铅锌矿渣堆场优势植物重金属富集特征. *中南林业科技大学学报*, 2019, 39(4): 117-122.

Fu GY, Qiu YQ, Song BY, et al. Heavy metals enrichment characteristics of the dominant plants in lead-zinc slag yard along Dongjiang lake reservoir. *J Central South Univ For Technol*, 2019, 39(4): 117-122 (in Chinese).

[5] Guo B, Liang YC, Fu QL, et al. Cadmium stabilization with nursery stocks through transplantation: a new approach to phytoremediation. *J Hazard Mater*, 2012, 199/200: 233-239.

[6] Luo J, Cai LM, Qi SH, et al. Heavy metal remediation with *Ficus microcarpa* through transplantation and its environmental risks through field scale experiment. *Chemosphere*, 2018, 193: 244-250.

[7] Basu S, Rabara RC, Negi S. AMF: The future prospect for sustainable agriculture. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2018, 102: 36-45.

[8] de Oliveira VH, Ullah I, Dunwell JM, et al. Mycorrhizal symbiosis induces divergent patterns of transport and partitioning of Cd and Zn in *Populus trichocarpa*. *Environ Exp Bot*, 2020, 171: 103925.

[9] Zhang XF, Hu ZH, Yan TX, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate Cd phytotoxicity by altering Cd subcellular distribution and chemical forms in *Zea mays*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 171: 352-360.

[10] Abdelhameed RE, Metwally RA. Alleviation of cadmium stress by arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Int J Phytoremediation*, 2019, 21(7): 663-671.

[11] Huang XC, Ho SH, Zhu SS, et al. Adaptive response of arbuscular mycorrhizal symbiosis to accumulation of elements and translocation in *Phragmites australis* affected by cadmium stress. *J Environ Manag*, 2017, 197: 448-455.

[12] Gu LJ, Zhao ML, Ge M, et al. Transcriptome analysis

- reveals comprehensive responses to cadmium stress in maize inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 186: 109744.
- [13] Chen XW, Wu L, Luo N, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi and the associated bacterial community influence the uptake of cadmium in rice. *Geoderma*, 2019, 337: 749-757.
- [14] Hu JL, Wu SC, Wu FY, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance both absorption and stabilization of Cd by Alfred stonecrop (*Sedum alfredii* Hance) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) in a Cd-contaminated acidic soil. *Chemosphere*, 2013, 93(7): 1359-1365.
- [15] Liu H, Yuan M, Tan SY, et al. Enhancement of arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus versiforme*) on the growth and Cd uptake by Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum*. *Appl Soil Ecol*, 2015, 89: 44-49.
- [16] Rasouli-Sadaghiani MH, Barin M, Khodaverdilo H, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobacteria promote growth of Russian knapweed (*Acroptilon repens* L.) in a Cd-contaminated soil. *J Plant Growth Regul*, 2019, 38(1): 113-121.
- [17] Zhang FG, Liu MH, Li Y, et al. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi, biochar and cadmium on the yield and element uptake of *Medicago sativa*. *Sci Total Environ*, 2019, 655: 1150-1158.
- [18] 李娇娇, 曾明. 丛枝菌根对植物根际逆境的生态学意义. *应用生态学报*, 2020, 31(9): 3216-3226.
Li JJ, Zeng M. Ecological significance of arbuscular mycorrhiza on plant rhizosphere stress. *Chin J Appl Ecol*, 2020, 31(9): 3216-3226 (in Chinese).
- [19] 滕秋梅, 张中峰, 李红艳, 等. 丛枝菌根真菌对镉胁迫下芦竹生长、光合特性和矿质营养的影响. *土壤*, 2020, 52(6): 1212-1221.
Teng QM, Zhang ZF, Li HY, et al. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, photosynthesis characteristics and mineral nutrition of *Arundo donax* under Cd stress. *Soils*, 2020, 52(6): 1212-1221 (in Chinese).
- [20] Chen BD, Nayuki K, Kuga Y, et al. Uptake and intraradical immobilization of cadmium by arbuscular mycorrhizal fungi as revealed by a stable isotope tracer and synchrotron radiation μ X-ray fluorescence analysis. *Microbes Environ*, 2018, 33(3): 257-263.
- [21] Riaz M, Kamran M, Fang Y, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi-induced mitigation of heavy metal phytotoxicity in metal contaminated soils: a critical review. *J Hazard Mater*, 2021, 402: 123919.
- [22] Jiang QY, Zhuo F, Long SH, et al. Can arbuscular mycorrhizal fungi reduce Cd uptake and alleviate Cd toxicity of *Lonicera japonica* grown in Cd-added soils? *Sci Rep*, 2016, 6: 21805.
- [23] Singh S, Parihar P, Singh R, et al. Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 1143.
- [24] Lei GJ, Sun L, Sun Y, et al. Jasmonic acid alleviates cadmium toxicity in *Arabidopsis* via suppression of cadmium uptake and translocation. *J Integr Plant Biol*, 2020, 62(2): 218-227.
- [25] Xian JP, Wang Y, Niu KJ, et al. Transcriptional regulation and expression network responding to cadmium stress in a Cd-tolerant perennial grass *Poa Pratensis*. *Chemosphere*, 2020, 250: 126158.
- [26] Nambara E. Metabolic balance and its outcome: deficiency of vitamin B9 and sucrose supply ectopically induces starch synthesis in etioplasts. *Plant Cell Physiol*, 2017, 58(8): 1284-1285.
- [27] Zhu HH, Ai HL, Cao LW, et al. Transcriptome analysis providing novel insights for Cd-resistant tall fescue responses to Cd stress. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 160: 349-356.
- [28] Khan A, Bilal S, Khan AL, et al. Silicon-mediated alleviation of combined salinity and cadmium stress in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by regulating physio-hormonal alteration. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 188: 109885.
- [29] Nour-Eldin HH, Andersen TG, Burow M, et al. NRT/PTR transporters are essential for translocation of glucosinolate defence compounds to seeds. *Nature*, 2012, 488(7412): 531-534.
- [30] Rao G, Sui J, Zeng Y, et al. De novo transcriptome and small RNA analysis of two Chinese willow cultivars reveals stress response genes in *Salix matsudana*. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109122.
- [31] Zou JH, Wang G, Ji J, et al. Transcriptional, physiological and cytological analysis validated the roles of some key genes linked Cd stress in *Salix matsudana* Koidz. *Environ Exp Bot*, 2017, 134: 116-129.
- [32] Gupta DK, Pena LB, Romero-Puertas MC, et al. NADPH oxidases differentially regulate ROS metabolism and nutrient uptake under cadmium toxicity. *Plant Cell Environ*, 2017, 40(4): 509-526.
- [33] Yan L, Du CQ, Riaz M, et al. Boron mitigates citrus root injuries by regulating intracellular pH and reactive

- oxygen species to resist H⁺-toxicity. *Environ Pollut*, 2019, 255: 113254.
- [34] Yan YY, Yang B, Lan XY, et al. Cadmium accumulation capacity and resistance strategies of a cadmium-hypertolerant fern-*Microsorium fortunei*. *Sci Total Environ*, 2019, 649: 1209-1223.
- [35] Nuccio EE, Hodge A, Pett-Ridge J, et al. An arbuscular mycorrhizal fungus significantly modifies the soil bacterial community and nitrogen cycling during litter decomposition. *Environ Microbiol*, 2013, 15(6): 1870-1881.
- [36] Hou DD, Wang K, Liu T, et al. Unique rhizosphere micro-characteristics facilitate phytoextraction of multiple metals in soil by the hyperaccumulating plant *Sedum alfredii*. *Environ Sci Technol*, 2017, 51(10): 5675-5684.
- [37] Bell TH, Cloutier-Hurteau B, Al-Otaibi F, et al. Early rhizosphere microbiome composition is related to the growth and Zn uptake of willows introduced to a former landfill. *Environ Microbiol*, 2015, 17(8): 3025-3038.
- [38] Wang L, Zou R, Li YC, et al. Effect of Wheat-*Solanum nigrum* L. intercropping on Cd accumulation by plants and soil bacterial community under Cd contaminated soil. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 206: 111383.
- [39] An MJ, Wei CZ, Wang KY, et al. Effects of polymer modifiers on the bacterial communities in cadmium-contaminated alkaline soil. *Appl Soil Ecol*, 2021, 157: 103777.
- [40] Zhou J, Zang HD, Loepmann S, et al. Arbuscular mycorrhiza enhances rhizodeposition and reduces the rhizosphere priming effect on the decomposition of soil organic matter. *Soil Biol Biochem*, 2020, 140: 107641.
- [41] Yang YR, Song YY, Scheller HV, et al. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Robinia pseudoacacia* in uncontaminated and heavy metal contaminated soils. *Soil Biol Biochem*, 2015, 86: 146-158.
- [42] Lin LT, Chen Y, Qu LY, et al. Cd heavy metal and plants, rather than soil nutrient conditions, affect soil arbuscular mycorrhizal fungal diversity in green spaces during urbanization. *Sci Total Environ*, 2020, 726: 138594.
- [43] Tian L, Shi SH, Ma LN, et al. Co-evolutionary associations between root-associated microbiomes and root transcriptomes in wild and cultivated rice varieties. *Plant Physiol Biochem*, 2018, 128: 134-141.
- [44] Leng Y, Li Y, Wen Y, et al. Transcriptome analysis provides molecular evidences for growth and adaptation of plant roots in cadmium-contaminated environments. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 204: 111098.

(本文责编 陈宏宇)