

马尾松不同叶型幼苗外生菌根真菌群落特征

涂晶晶 吴峰[✉] 孙学广 王好运 石长双

贵州大学贵州省森林资源与环境研究中心贵州省高原山地林木培育重点实验室 林学院 贵州 贵阳 550025

摘要: 马尾松 *Pinus massoniana* 当年生幼苗中会出现全初生叶和全次生针叶两种变异类型, 它们的根系生长以及外生菌根 (ectomycorrhiza, ECM) 真菌群落是否也表现出差异, 截止目前尚不明晰。本研究以马尾松全初生叶及全次生针叶幼苗类型为材料, 采集幼苗根系, 利用万深 LA-S 植物根系分析系统测定根系形态, 采用 TTC 法测定根系活力, 利用 IonS5™XL 平台对根系真菌 DNA 扩增子区进行高通量测序, 探析马尾松幼苗变异类型与根系构型及 ECM 真菌群落之间的关系。结果表明: 两种类型幼苗的根系构型存在显著差异, 全次生针叶幼苗的根系总长度、表面积、体积、分叉数以及根系活力等参数比全初生叶幼苗的高 16%–44%。测序所得 ECM 真菌序列可划分为 44 个 OTUs, 隶属 2 门 5 纲 9 目 13 科 15 属。ECM 真菌群落组成上, 小球孢盘菌属 *Sphaerosporella* 为马尾松两种类型幼苗共有优势属, 其在全初生叶幼苗 ECM 真菌中占比达 95.59%, 但在全次生针叶幼苗 ECM 真菌中仅占 60.43%, 同时全次生针叶幼苗 ECM 真菌中须腹菌属 *Rhizopogon* 也占有较高比例, 为 16.43%。ECM 真菌群落多样性分析结果显示, 马尾松全次生针叶幼苗中 Shannon 多样性指数、Chao 1 与 Ace 丰富度指数均显著高于全初生叶幼苗。

关键词: 外生菌根, 马尾松, 幼苗形态, 根系特征, 扩增子测序

[引用本文] 涂晶晶, 吴峰, 孙学广, 王好运, 石长双, 2021. 马尾松不同叶型幼苗外生菌根真菌群落特征. 菌物学报, 40(1): 124-134

Tu JJ, Wu F, Sun XG, Wang HY, Shi CS, 2021. Community structure characteristics of ectomycorrhizal fungi in different leaf type seedlings of *Pinus massoniana*. Mycosystema, 40(1): 124-134

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0600302); 国家自然科学基金 (31660201); 贵州省教育厅项目 ([2015]444); 贵州省一流学科建设项目 (GNYL[2017]007)

Supported by the National Key Research and Development Plan (2017YFD0600302), the National Natural Science Foundation of China (31660201), the Project of Education Bureau of Guizhou Province ([2015]444), and the First-class Disciplines Project of Guizhou Province (GNYL[2017]007).

✉ Corresponding author. E-mail: fww@gzu.edu.cn

ORCID: TU Jing-Jing (0000-0003-1786-596X), WU Feng (0000-0002-4146-6267)

Received: 2020-07-06, accepted: 2020-08-06

Community structure characteristics of ectomycorrhizal fungi in different leaf type seedlings of *Pinus massoniana*

TU Jing-Jing WU Feng[✉] SUN Xue-Guang WANG Hao-Yun SHI Chang-Shuang

Institute for Forest Resources and Environment of Guizhou, Key Laboratory of Forest Cultivation in Plateau Mountain of Guizhou Province, College of Forestry, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China

Abstract: There are two variations of one-year-old *Pinus massoniana* seedlings, one with primary needles and another with secondary needles. However, it is still poorly understood that whether there are variations in root morphology and ectomycorrhiza (ECM) fungal community between these seedlings. In this study, the seedlings' roots of the two variants were collected to analyze root morphology by WANSHEN LA-S system and measure root activity by TTC method, and DNA ITS regions of the fungi in roots were sequenced with IonS5TMXL platform. The results showed that there were significant differences in the root system of the seedlings. The total root length, surface area, volume, number of branching, and root activity of the seedlings with secondary needles were 16% to 44% higher than those of the seedlings with primary needles. The DNA sequences of ECM fungi were classified into 44 OTUs belonging to 2 phyla, 5 classes, 9 orders, 13 families, and 15 genera. *Sphaerospora* was dominant genera, reaching 95.59% of total genera in the seedlings with primary needles, and 60.43% in the seedlings with secondary needles. *Rhizopogon* also occupied a higher proportion (16.43%) of ECM fungi in the seedlings with secondary needles. Shannon diversity index, Chao 1, and Ace abundance index of ECM fungi of the seedlings with secondary needles were significantly higher than those of the seedlings with primary needles.

Key words: ectomycorrhiza, *Pinus massoniana*, seedling morphology, root characteristics, amplicon sequencing

外生菌根 (ectomycorrhiza, ECM) 真菌是温带和寒带森林生态系统中的重要组成部分, 能与大多数针叶树形成 ECM (Smith & Read 2008)。ECM 真菌通过特有的菌丝套、哈氏网、外延菌丝等结构与宿主植物形成共生体, 拓展植物根系与土壤接触范围 (Smith & Read 2008; Turjaman *et al.* 2011), 促进宿主植物对土壤养分和水分的吸收, 提高宿主植物对逆境的适应性 (Lang *et al.* 2013; Velmala *et al.* 2014; Patterson *et al.* 2019)。在宿主植物与 ECM 真菌形成的共生体中, 宿

主植物的光合作用产物运送到根部, 为 ECM 真菌的生长提供了碳源 (Walker *et al.* 2003)。ECM 真菌与宿主植物根系之间也存在相互作用, ECM 真菌在宿主植物根尖周围形成菌丝套, 会限制根的皮质组织发育, 促进根分支数及根尖数的增加从而影响根系的发育 (Barker *et al.* 1998; Smith & Read 2008)。同时, 宿主植物的根系会引起 ECM 真菌物种的空间隔离, 对 ECM 真菌群落结构产生影响, 已形成的 ECM 根系可通过优化根系分泌物和根系构型实现协同变化 (Lang *et al.*

2013; Akatsuki & Makita 2020)。

近年来研究发现, 宿主植物的遗传变异类型也会影响 ECM 的形成以及 ECM 真菌群落结构 (Velmalu *et al.* 2014; Lamit *et al.* 2016; Patterson *et al.* 2019)。宿主基因型在根系生长和形态上的差异, 会对 ECM 真菌群落结构产生直接影响 (Korkama *et al.* 2006), 最佳的根系构型能提高 ECM 真菌组成的多样性, 从而提高 ECM 真菌群落的功能多样性, 增加宿主植物的养分获取潜力 (Lang *et al.* 2013; Velmalu *et al.* 2014)。同时, 由于 ECM 真菌不同种类之间, 对宿主根系有机碳的需求也有所不同 (Lamit *et al.* 2016), 当宿主植物地上部分的生长性状发生变异后, 其根系 ECM 群落也会随之变化, 例如, 欧洲云杉 *Picea abies* 中, 速生型家系与慢生型家系相比, 地上部分的生长更快, 与之对应的是速生型家系根系的 ECM 真菌多样性更高, 根尖数和分叉数也比慢生型家系更多 (Korkama *et al.* 2006; Hamberg *et al.* 2018)。Patterson *et al.* (2019) 研究发现, 沼泽松 *Pinus edulis* 抗旱型幼苗的生物量显著大于非抗旱型幼苗, 前者根系 ECM 真菌群落多样性更高。而针叶树作为温带和寒带森林的主要建群树种, 其种内的遗传变异是适应环境变化的基础。探析 ECM 真菌群落与针叶树种内遗传变异之间的联系, 对于在全球气候变化背景下, 深入理解针叶树-ECM 真菌群落共生体的适应机制至关重要。

马尾松 *Pinus massoniana* 具有适应性强、生长快、生产力高等特点, 是我国南方山区造林先锋树种和主要工业用材树种 (丁贵杰等 2006)。基于马尾松苗圃地、人工林及天然林研究结果显示, 其对 ECM 真菌的选择无专一性, 为广谱寄生 (陈连庆 1989)。课题组前期研究发现, 马尾松当年生幼苗出圃前会出现全初生叶 (primary needle

seedling, PNS)、全次生针叶 (secondary needle seedling, SNS) 两种变异类型, 其中前者只具有初生叶, 后者全为次生针叶。而松属 *Pinus* 树种苗期个体发育主要过程为: 种子萌发后, 随着子叶的伸长会从上胚轴生长点萌发的幼茎上逐渐长出初生叶, 再从初生叶的叶腋分化发育出次生针叶, 初生叶呈条形较纤细, 单枚着生; 次生针叶, 即成年树上所见的针叶, 通常 2–5 枚 1 束着生 (中国科学院植物研究所形态细胞研究室比较形态组 1978)。进一步研究发现, 具有次生针叶的马尾松幼苗整体光合能力更高, 可获得更多干物质积累量 (王好运等 2019)。多年来, 已有大量的研究从人工接种 ECM 真菌对马尾松幼苗促生机理方面, 证实了 ECM 幼苗的苗高、地径、生物量等表现会显著高于未接种的对照苗木 (王元贞等 1995; 翟帅帅等 2015; 汪远秀等 2020), 这些研究充分表明了马尾松与 ECM 真菌存在着紧密的联系。但是, 上述两种马尾松幼苗变异类型地上部分发生了变化, 是否会影响其根系生长以及 ECM 真菌的形成未见报道。为此, 本研究以马尾松当年生全初生叶、全次生针叶幼苗为对象, 对两种类型幼苗根系以及 ECM 真菌群落特征进行研究, 旨在阐明马尾松幼苗变异类型对根系构型及 ECM 真菌群落的影响, 以期为深入研究马尾松-ECM 真菌的共生机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

本研究供试材料来源于贵州省都匀市马鞍山林场国家马尾松良种基地的育苗圃 (北纬 26°169′–26°170′, 东经 107°623′–107°624′)。采用良种基地内 1.5 代种子园种子进行容器育苗。2017 年 3 月底, 用 0.5% 高锰酸钾溶液对种子进行消毒, 在 30–40℃

温水浸种 30–48h, 待种子露白后进行播种育苗。育苗容器为无纺布营养袋(直径 8cm, 深 10cm), 基质由种子园内马尾松林地表土与轻基质混合而成, 苗期的水、肥及病虫害管理由良种基地员工按周政贤(2001)总结的方法进行。2017 年 11 月, 选取苗圃内生长健康的 PNS 和 SNS 两种类型幼苗用于试验。每种幼苗类型随机挑选 5 株, 经无菌水冲洗后, 选取幼苗的根尖混合成 1 个生物学重复, 置于无菌塑封袋保存用于高通量测序; 每种幼苗类型 3 个生物学重复。同时, 每种幼苗类型随机挑选 5 株幼苗, 经清水冲洗后, 将幼苗由根茎结合部截断, 分别采集每株幼苗的完整根系用于根系形态指标测定; 每种幼苗类型再随机挑选 5 株幼苗, 经清水冲洗后, 每株幼苗分别采集根尖样品, 用于根系活力测定。

1.2 幼苗根系形态指标及活力的测定

采集的幼苗根系, 经展平后采用 Epson 数字扫描仪获取根系图像, 利用万深 LA-S 植物根系分析系统对图像进行分析, 获取根系总长度、表面积、体积、连接数、根尖数以及分叉数等参数。根系活力的测定采用氯化三苯基四氮唑(TTC)法, 制作 TTC 标准曲线; 再称取根尖样品 0.5g, 浸泡于 0.4% TTC 溶液和磷酸缓冲液混合液(体积比 1:1)中, 在 37℃下暗保温 1–2h 后立即加入硫酸停止反应, 同时做一空白实验; 把根取出, 用乙酸乙酯提出 TTF, 经定容后用分光光度计在波长 485nm 下比色, 以空白试验作参照测出吸光度, 查标准曲线, 求出 TTC 还原量, 最后参照孔祥生和易现峰(2008)所述方法计算根系活力。

1.3 根系样品总 DNA 提取及扩增子测序

利用 CTAB 法进行样品 DNA 提取, 使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测其质量。以稀释后的基因组 DNA 为模板, 使用带 Barcode 且针对

真菌 ITS2 区的标准特异引物 ITS3-2024F (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') 及 ITS4-2409R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行 PCR 扩增。根据 PCR 产物浓度进行等量混样, 充分混匀后使用 2%琼脂糖胶电泳纯化 PCR 产物, 然后剪切回收、纯化目标条带。使用 Thermo fisher 的 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 文库试剂盒进行文库的构建, 构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测合格后, 使用 Thermo fisher 的 IonS5™XL 进行上机测序。

1.4 数据分析

测序原始数据经质控、去除嵌合体序列后, 得到 Clean Reads 用于后续分析。利用 Uparse 软件(Uparse v7.0.1001, <http://drive5.com/uparse/>)对所有样品的 Clean Reads 进行聚类, 默认以 97%的一致性(identity)将序列聚类成为 OTUs (operational taxonomic units)。用 Qiime 软件 (Version 1.9.1) 中的 Blast 方法 (http://qiime.org/scripts/assign_taxonomy.html)与 Unit 数据库(<https://unite.ut.ee/>)进行 OTUs 代表序列的物种注释分析, 并在界、门、纲、目、科、属各个分类水平统计各样本的群落组成。若比对结果的相似率≥97%, 则鉴定到种水平; 若比对结果相似率介于 90%–97%之间, 则鉴定到属水平。根据所有样本的物种注释结果和 OTUs 的丰度信息, 进一步计算 Unifrac 距离(unweighted unifrac), 构建 UPGMA 聚类树。利用 Qiime 软件 (Version 1.9.1) 计算 Simpson、Shannon 和 Chao 1 等多多样性指数, 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 应用独立样本 *t* 检验进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 马尾松两种类型幼苗的根系生长参数

两种类型幼苗根系生长参数测定结果见表 1。全次生针叶幼苗的根长、表面积、

表 1 马尾松两种类型幼苗根系生长参数

Table 1 Root morphological parameters of the *Pinus massoniana* seedlings

幼苗类型	根长	表面积	体积	连接数	根尖数	分叉数	根系活力
Types	Length (cm)	Surface area (cm ²)	Volume (cm ³)	Linking number	Tips	Branch number	Activity (μg/g)
PNS	81.6±10.6b	225.2±23.0b	83.5±9.7b	332±22b	354±18b	82.6±6.0b	13.5±1.1 b
SNS	101.3±10.5a	289.9±26.9a	112.4±9.7a	435±39a	411±21a	119.3±4.3a	18.6±1.2 a

注：同列不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。PNS：全初生叶；SNS：全次生针叶。表 3 同

Note: Different letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$). PNS: Primary needle seedling; SNS: Secondary needle seedling. Table 3 is the same.

体积、连接数、根尖数及分叉数均高于全初生叶幼苗，其中分叉数提高幅度最大，达 44%，根尖数提高的幅度最小，只有 16%，其他根系指标提高幅度介于 24%–35%之间。 t 检验的结果表明，两种类型幼苗根系生长参数的差异均达到显著水平($P<0.05$)。此外，全次生针叶幼苗的根系活力也显著高于全初生叶幼苗，是全初生叶幼苗的 1.4 倍。

2.2 总测序结果

两种类型幼苗根系样本测序结果见表 2。经质控后所得 Clean reads，在 Raw reads 中所占比例分别为 92.3%和 96.5%。各样本 Clean reads 经 97%的一致性进行聚类注释后，其中 PNS 样本平均获得 357.3 个 OTUs，SNS 样本平均获得 369.7 个 OTUs。

从各样本中，随机抽取一定测序量的数据，统计其能构建的 OTU 数量，构建稀释曲线（图 1）。当测序序列达到 30 000 条以上，各样本曲线趋向平坦，表明测序数据量渐进合理，测序深度可保证各样本 OTUs 信息的完整性。进一步对各样品进行 UPGMA 聚类

分析显示，两种类型幼苗的 3 个生物学重复样品分别聚为一类，表明所研究的两种类型幼苗根系真菌群落构成存在差异（图 2）。

2.3 测序所得 ECM 真菌组成

所有样本测序所得 OTUs 依文献排除非 ECM 真菌，共获得 44 个 OTUs，其中 13 个 OTUs 鉴定到科，其余 31 个 OTUs 全部鉴定到属及以下水平。鉴定到的 ECM 真菌可归为 2 门 5 纲 9 目 13 科 15 属。担子菌门 Basidiomycota 占总数的 17.53%，子囊菌门 Ascomycota 占比为 82.47%。Basidiomycota 中仅有伞菌纲 Agaricomycetes，而 Ascomycota 包含 4 个纲：盘菌纲 Pezizomycetes、散囊菌纲 Eurotiomycetes、锤舌菌纲 Leotiomycetes 和粪壳菌纲 Sordariomycetes，分别占该门的 98.03%、1.24%、0.64%和 0.09%。Agaricomycetes 包括 6 个科，在科级水平中占比由高到低依次为阿太菌科 Atheliaceae（13.23%）、革菌科 Thelephoraceae（2.25%）、须腹菌科 Rhizopogonaceae（1.52%）、丝盖伞科 Inocybaceae（0.38%）、乳牛肝菌科 Suillaceae

表 2 测序结果统计

Table 2 Statistics of sequencing results

幼苗类型	原始数据	有效数据	有效数据率	OTU 数量
Seedling types	Raw reads	Clean reads	Effective rate (%)	Number of OTUs
PNS	86 770.0±674.9	80 097.0±36.4	92.3%	357.3±22.5
SNS	58 516.7±3 994.0	56 449.7±4 387.9	96.5%	369.7±33.3

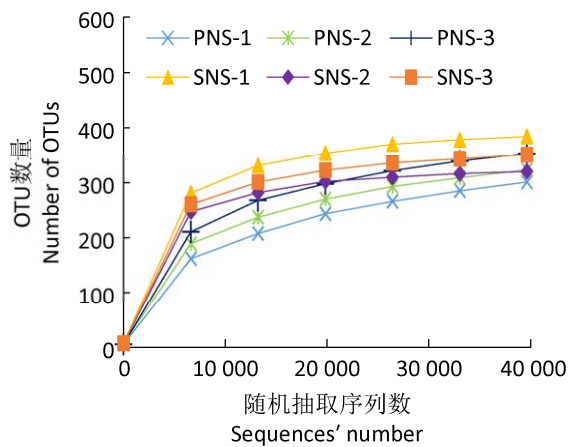


图 1 各样本物种稀释曲线

Fig. 1 Rarefaction curve of samples.

(0.14%) 和丝膜菌科 Cortinariaceae (0.02%)。Ascomycota 的 4 个纲共包含 7 个科,在科级水平中占比由高到低依次为火丝菌科 Pyrenomataceae (80.83%)、大团囊菌科 Elaphomycetaceae (1.02%)、Incertae sedis

Leotiomyces (Unidentified, 未鉴定到科名, 已鉴定到属, 0.46%)、柔膜菌科 Helotiaceae (0.07%)、肉座菌科 Hypocreaceae (0.05%)、腐皮壳科 Diaporthaceae (0.02%) 和盘菌科 Pezizaceae (0.01%)。在属水平上, 相对丰度占比 $\geq 1\%$ 的仅有 5 个, 依次为小球孢盘菌属 *Sphaerosporella* (89.19%)、须腹菌属 *Rhizopogon* (3.11%)、*Cenococcum* (2.08%)、阿太菌属 *Amphinema* (1.86%) 和棉草菌属 *Tomentella* (1.22%)。

2.4 ECM 真菌多样性和丰富度指数

对两种类型幼苗根系 ECM 真菌在 97% 一致性阈值下的 Shannon 指数、Simpson 指数、Chao 1 指数及 ACE 指数进行统计, 结果显示除辛普森指数外, 全次生针叶幼苗根系 ECM 真菌的 Shannon 指数、Chao 1 和 ACE 指数均显著高于全初生叶幼苗 (表 3)。

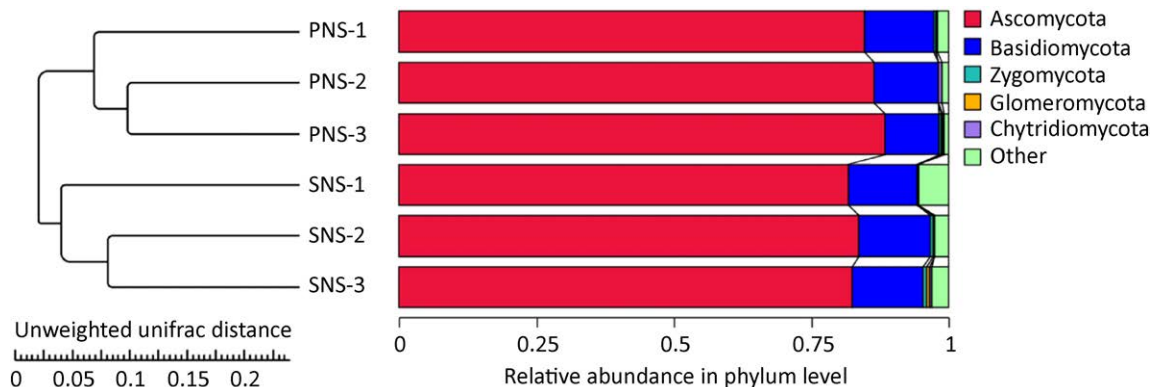


图 2 基于 unweighted unifracs 距离的 UPGMA 聚类树

图中右侧为各样本中门水平上的物种相对丰度分布图

Fig. 2 UPGMA clustering tree based on unweighted unifracs distance. The relative abundance distribution of species at the phylum level is on the right of the figure.

表 3 马尾松幼苗外生菌根真菌多样性和丰富度指数

Table 3 Diversity and richness index of ectomycorrhizal fungi in *Pinus massoniana* seedlings

幼苗类型	香农指数	辛普森指数	Chao 1 指数	ACE 指数
Seedling types	Shannon index	Simpson index	Chao 1 index	ACE index
PNS	3.69 \pm 0.43 b	0.33 \pm 0.05 a	78.24 \pm 2.55 b	77.18 \pm 3.11 b
SNS	5.57 \pm 0.34 a	0.22 \pm 0.04 b	90.65 \pm 2.31 a	93.92 \pm 2.87 a

2.5 ECM 真菌群落组成

在属分类水平上,两种类型幼苗 ECM 真菌类群组成存在差异。两种叶型幼苗 ECM 真菌属 OTU 的百分比堆积图见图 3, 其中全初生叶幼苗的优势类群为 *Sphaerosporella*, 相对丰度达 95.59%, 其次为 *Cenococcum* (2.15%)、*Amphinema* (0.82%) 和 *Meliniomyces* (0.71%); *Sphaerosporella* 同时也是在全次生针叶幼苗优势菌属, 但相对丰度只有 60.43%。全次生针叶幼苗中, *Rhizopogon* 的相对丰度排名第二, 为 16.43%, 而相对丰度超过 1% 的还有 *Amphinema* (6.50%)、*Tomentella* (4.46%)、*Meliniomyces* (2.01%)、*Cenococcum* (1.76%)、火丝菌属 *Pyronema* (1.50%) 以及乳牛肝菌属 *Suillus* (1.44%)。两种类型幼苗共有的 ECM 真菌 OTUs 为 26 个, 归属于: *Sphaerosporella*、*Rhizopogon*、*Cenococcum*、*Amphinema*、*Tomentella*、*Meliniomyces*、革菌属 *Thelephora*、*Inocybe* 和盘菌属 *Peziza*。两种类型幼苗的优势 ECM 真菌属见表 4, 共有的优势菌属为 *Sphaerosporella* (89.19%)、*Rhizopogon*

(3.11%)、*Cenococcum* (2.08%)、*Amphinema* (1.86%) 和 *Tomentella* (1.22%)。

3 讨论

本研究中马尾松全次生针叶幼苗的根系长度、表面积、体积显著高于全初生叶幼苗, 表明前者的根系分布范围更大。全次生针叶幼苗的根尖数、分叉数也更多, 分别比全初生叶幼苗高 16% 和 44%, 且差异均达到显著水平。此外根系分叉数决定根系营养吸收效率与空间分布密度, 分叉数越多, 根系吸收和代谢营养物质的能力越大 (李雪萍等 2019), 表明全次生针叶幼苗的根系吸收功效更高。由此可见, 本研究中马尾松全初生叶、全次生针叶两种幼苗类型除了地上部分的形态、光合作用能力等表型上呈现出变异外, 根系构型也表现出了明显的差异。

本研究采用 ITS 测序方法, 在两种类型幼苗根系上共检出 44 个 ECM 真菌 OTUs, 属担子菌门和子囊菌门。其中以 *Pyronemataceae*、*Rhizopogonaceae*、*Elaphomycetaceae*、*Atheliaceae* 和 *Thelephoraceae* 为优势科。有关马尾松 ECM 真菌群落的研究显示, 其 ECM 真菌群落主要由红菇科 *Russulaceae*、乳牛肝菌科 *Suillaceae*、马勃科 *Lycoperdaceae* 和 *Thelephoraceae* 等组成, 其中 *Lycoperdaceae* 主要在人工纯林占优势, *Thelephoraceae* 为天然次生林的优势科, *Suillaceae* 和 *Russulaceae* 普遍存在于马尾松林下的 ECM 真菌中 (陈连庆 1989; Huang *et al.* 2012; 李敏 2016; 冯万燕等 2019)。本研究也发现有 OTU 注释到 *Suillaceae* 的 *Suillus* 属, 但其丰度非常低。有研究表明, *Pyronemataceae* 可与油松 *Pinus tabulaeformis* Carr. 形成外生菌根 (王琴和郭良栋 2013), *Pyronemataceae* 中的 *Sphaerosporella* 是栎属 *Quercus* 树种 ECM 真菌中的优势菌属 (Marta *et al.* 2019;

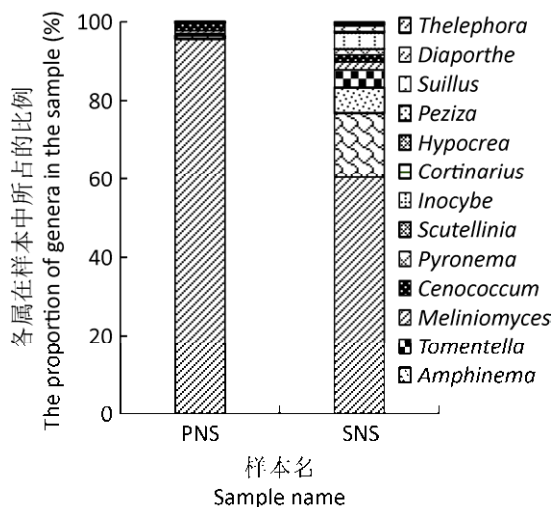


图 3 不同叶型马尾松幼苗 ECM 真菌群落组成 (属水平)

Fig. 3 Community of ECM fungi in different leaf types of *Pinus massoniana* seedlings (generic level).

表 4 优势 ECM 真菌 OTU 的归属与分布情况

Table 4 The classification and distribution of dominant ECM fungal OTUs

优势科	百分比	优势属	百分比	优势 OTUs	百分比	分布情况
Dominant families	Percentage (%)	Dominant genera	Percentage (%)	Dominant OTUs	Percentage (%)	Distribution
Pyronemataceae	89.47	<i>Sphaerosporella</i>	89.19	OTU_5 (32.26%)	66.16	PNS, SNS
				OTU_37 (4.35%)	8.93	PNS, SNS
				OTU_143 (3.39%)	6.97	PNS, SNS
				OTU_370 (1.46%)	3.01	PNS, SNS
				OTU_351 (1.42%)	2.92	PNS, SNS
				OTU_580 (0.46%)	0.95	PNS, SNS
				OTU_417 (0.09%)	0.18	PNS, SNS
				OTU_530 (0.03%)	0.07	PNS, SNS
		<i>Pyronema</i>	0.28	OTU_78 (0.14%)	0.28	SNS
Rhizopogonaceae	3.13	<i>Rhizopogon</i>	3.11	OTU_179 (1.52%)	3.11	PNS, SNS
Elaphomycetaceae	2.09	<i>Cenococcum</i>	2.08	OTU_16 (1.01%)	2.08	PNS, SNS
Atheliaceae	1.87	<i>Amphinema</i>	1.86	OTU_4 (0.82%)	1.67	PNS, SNS
				OTU_299 (0.08%)	0.19	PNS, SNS
Thelephoraceae	1.22	<i>Tomentella</i>	1.22	OTU_394 (0.28%)	0.56	PNS, SNS
				OTU_340 (0.19%)	0.39	PNS, SNS
				OTU_573 (0.07%)	0.14	SNS
				OTU_455 (0.06%)	0.13	SNS

注：优势 OTU 名称后的括号中显示的是该 OTU 在总的 ECM 真菌 OTU 数量中所占例
Note: The number in brackets behind the dominant OTU name is its percentage in the total number of ECM fungal OTUs.

Mrak *et al.* 2019)。近期研究证实，在利用马尾松、辐射松 *Pinus radiata* 等松属幼苗与乳菇属 *Lactarius* 进行菌根合成实验中，*Sphaerosporella* 是造成实验污染的主要属（黄兰兰等 2020）。本研究所用的幼苗来源于马尾松室外苗圃，非人工接种条件下，发现 *Sphaerosporella* 在两种类型幼苗 ECM 真菌中占绝对优势，表明 *Sphaerosporella* 与马尾松幼苗的亲合力非常强，极易形成外生菌根。此外，*Rhizopogon* 与松树具有较高亲合力（黄兰兰等 2020），是红松 *Pinus koraiensis* 和樟子松 *Pinus sylvestris* var. *Mongolica* 的优势 ECM（郭米山等 2018；冀瑞卿等 2020），本研究马尾松幼苗的 ECM 真菌中 *Rhizopogon* 也占有一定比例，所得结果与上述研究相符。

在马尾松两种类型幼苗的 ECM 真菌群

落组成上，虽然 *Sphaerosporella* 占绝对优势，但其在全初生叶幼苗和全次生针叶幼苗根系 ECM 真菌群落中所占比例并不一致。其中在全初生叶幼苗 ECM 真菌群落中相对丰度达 95.59%，而在全次生针叶幼苗中仅为 60.43%。此外，全初生叶幼苗 ECM 真菌群落中，相对丰度仅次于 *Sphaerosporella* 的依次为 *Cenococcum*、*Amphinema* 和 *Meliniomyces*，但只有 *Cenococcum* 的相对丰度超过 1%；而全次生针叶幼苗 ECM 真菌群落中 *Rhizopogon* 也占有较高的比例，相对丰度达 16.43%，同时 *Amphinema*、*Tomentella*、*Meliniomyces*、*Cenococcum*、*Pyronema* 以及 *Suillus* 的相对丰度均高于 1%。从测序所得 ECM 真菌 OTU 的多样性、丰富度指数中均可发现，马尾松全次生针叶幼苗的 ECM 真菌群落多样性和

丰富度都显著的高于全初生叶幼苗。上述结果表明, 马尾松当年生苗中全初生叶、全次生针叶两种类型幼苗根系的 ECM 真菌群落组成上呈现出了明显的差异。近年来的研究表明, 尽管 ECM 真菌与宿主植物形成菌根后, 在促进宿主植物生长方面表现出功能上的相似性, 但 ECM 真菌的不同物种之间会在定殖程度、菌丝生长速度、形成的菌根形态, 以及对土壤中氮、磷等养分的溶解与吸收等方面表现出差异 (Velmala *et al.* 2014; Smith *et al.* 2015; Ning *et al.* 2020), 如 *Amphinema* 属对白云杉 *Picea glauca* 幼苗的磷含量有显著促进作用, 而 *Thelephora terrestris* 则表现出负向影响 (Smith *et al.* 2015)。进一步的研究证实, 不同物种 ECM 真菌所分泌酶的活性差异很大, ECM 群落组成上的差异会体现在酶的作用能力上 (Maillard *et al.* 2018; Ning *et al.* 2020)。近年来, 陆续有研究者证实外生菌根真菌群落多样性也会影响宿主植物生长, 如 ECM 真菌多样性的提高可促进欧洲云杉、欧洲山毛榉 *Fagus sylvatica* 等林木幼苗养分的吸收, 促进幼苗生长 (Korkama *et al.* 2006; Kipfer *et al.* 2012; Hazard *et al.* 2017; Köhler *et al.* 2018)。课题组前期的研究显示全次生针叶幼苗的苗木质量和抗旱性表现更好 (王好运等 2018, 2019), 由此可见马尾松幼苗根系 ECM 真菌群落多样性与幼苗生长之间表现出正向的相关性。

[REFERENCES]

Akatsuki M, Makita N, 2020. Influence of fine root traits on in situ exudation rates in four conifers from different mycorrhizal associations. *Tree Physiology*, 40(8): 1071-1079

Barker SJ, Tagu D, Delp G, 1998. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal

symbioses. *Plant Physiology*, 116(4): 1201-1207

Chen LQ, 1989. Investigation on symbiotic mycorrhizal fungi of *Pinus massoniana*. *Forest Research*, 2(4): 357-362 (in Chinese)

Ding GJ, Zhou ZC, Wang ZR, 2006. Cultivation and utilization of pulpwood stand for *Pinus massoniana*. China Forestry Publishing House, Beijing. 27 (in Chinese)

Feng WY, Zhao YZ, Tan JH, Yang ZQ, Sun XG, 2019. Establishment of *Pinus massoniana* - *Suillus bovinus* symbiosis. *Mycosystema*, 38(10): 1620-1630 (in Chinese)

Guo MS, Gao GL, Ding GD, Zhang Y, Zhao YY, Ren Y, 2018. Diversity of ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus sylvestris* var. *mongolica* in Hulunbuir Sandy Land. *Mycosystema*, 37(9): 1133-1142 (in Chinese)

Hamberg L, Velmala SM, Sievänen R, Kalliokoski T, Pennanen T, 2018. Early root growth and architecture of fast-and slow-growing Norway spruce (*Picea abies*) families differ - potential for functional adaptation. *Tree Physiology*, 38(6): 853-864

Hazard C, Kruitbos L, Davidson H, Taylor AF, Johnson D, 2017. Contrasting effects of intra - and interspecific identity and richness of ectomycorrhizal fungi on host plants, nutrient retention and multifunctionality. *New Phytologist*, 213(2): 852-863

Huang J, Nara K, Lian C, Zong K, Peng K, Xue S, Shen Z, 2012. Ectomycorrhizal fungal communities associated with Masson pine (*Pinus massoniana* Lamb.) in Pb-Zn mine sites of central south China. *Mycorrhiza*, 22(8): 589-602

Huang LL, Wang YL, Yu FQ, 2020. Exogenous competitive mycorrhizal fungi and their mycorrhiza morphology during ectomycorrhiza synthesis of some *Lactarius* and *Tuber* species on pine and oak seedlings. *Mycosystema*, 39(5): 955-962 (in Chinese)

Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, 1978. Pine - morphological structure and

- development. Science Press, Beijing. 27-28 (in Chinese)
- Ji RQ, Gao TT, Li GL, Xu Y, Xing PJ, Zhou JJ, Xie ML, Li JQ, Li Y, 2020. Correlation between ectomycorrhizal fungal community and environmental factors in *Pinus koraiensis* forest in Northeast China. *Mycosystema*, 39(4): 1-12 (in Chinese)
- Kipfer T, Wohlgemuth T, van der Heijden MGA, Ghazoul J, Egli S, 2012. Growth response of drought-stressed *Pinus sylvestris* seedlings to single-and multi-species inoculation with ectomycorrhizal fungi. *PLoS One*, 7(4): e35275
- Köhler J, Yang N, Pena R, Raghavan V, Polle A, Meier IC, 2018. Ectomycorrhizal fungal diversity increases phosphorus uptake efficiency of European beech. *New Phytologist*, 220(4): 1200-1210
- Kong XS, Yi XF, 2008. Experimental techniques of plant physiology. China Agricultural University Press, Beijing. 58 (in Chinese)
- Korkama T, Pakkanen A, Pennanen T, 2006. Ectomycorrhizal community structure varies among Norway spruce (*Picea abies*) clones. *New Phytologist*, 171(4): 815-824
- Lamit LJ, Holeski LM, Flores-Renteria L, Whitham TG, Gehring CA, 2016. Tree genotype influences ectomycorrhizal fungal community structure: ecological and evolutionary implications. *Fungal Ecology*, 24: 124-134
- Lang C, Finkeldey R, Polle A, 2013. Spatial patterns of ectomycorrhizal assemblages in a monospecific forest in relation to host tree genotype. *Frontiers in Plant Science*, 4: 103
- Li M, 2016. Ectomycorrhiza fungal diversity in main community of *Pinus massoniana* in Guizhou. Master Thesis, Guizhou University, Guiyang. 39 (in Chinese)
- Li XP, Zhao CZ, Ren Y, Zhang J, Lei L, 2019. Fractal root systems of *Elymus nutans* under different density conditions in Gahai Wetland. *Acta Ecologica Sinica*, 39(10): 3670-3676 (in Chinese)
- Maillard F, Didion M, Fauchery L, Bach C, Buée M, 2018. N-acetylglucosaminidase activity, a functional trait of chitin degradation, is regulated differentially within two orders of ectomycorrhizal fungi: Boletales and Agaricales. *Mycorrhiza*, 28(4): 391-397
- Marta AT, Jacek O, Marcin S, Alexander U, 2019. Do silver nanoparticles stimulate the formation of ectomycorrhizae in seedlings of pedunculate oak (*Quercus robur* L.)? *Symbiosis*, 79: 89-97
- Mrak T, Štraus I, Grebenc T, Gričara J, Hoshikab Y, Carriero G, Paolettib E, Kraighera H, 2019. Different belowground responses to elevated ozone and soil water deficit in three European oak species (*Quercus ilex*, *Q. pubescens* and *Q. robur*). *Science of the Total Environment*, 651(1): 1310-1320
- Ning C, Xiang W, Mueller GM, Egerton-Warburton LM, Yan W, Liu S, 2020. Differences in ectomycorrhizal community assembly between native and exotic pines are reflected in their enzymatic functional capacities. *Plant and Soil*, 446(1): 179-193
- Patterson A, Flores-Rentería L, Whipple A, Whitham T, Gehring C, 2019. Common garden experiments disentangle plant genetic and environmental contributions to ectomycorrhizal fungal community structure. *New Phytologist*, 221(1): 493-502
- Smith AJ, Potvin LR, Lilleskov EA, 2015. Fertility-dependent effects of ectomycorrhizal fungal communities on white spruce seedling nutrition. *Mycorrhiza*, 25(8): 649-662
- Smith SE, Read DJ, 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd ed. Academic Press, London. 192-268
- Turjaman M, Santoso E, Susanto A, Gaman S, Limin SH, Tamai Y, Osaki M, Tawaraya K, 2011. Ectomycorrhizal fungi promote growth of *Shorea balangeran* in degraded peat swamp forests. *Wetlands Ecology and Management*, 19(4): 331-339
- Velmala SM, Rajala T, Heinonsalo J, Taylor AFS, Pennanen T, 2014. Profiling functions of ectomycorrhizal diversity and root structuring in seedlings of Norway spruce (*Picea abies*) with fast- and slow-growing phenotypes. *New*

- Phytologist, 201: 610-622
- Walker TS, Bais HP, Grotewold E, Vivanco JM, 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology*, 132(1): 44-51
- Wang HY, Wu F, Wu CM, Yu S, Zhu XK, 2018. Growth and physiological responses of seedlings with different leaf shapes to drought and re-watering in *Pinus massoniana*. *Journal of Northeast Forestry University*, 46(1): 1-6 (in Chinese)
- Wang HY, Wu F, Zhu XK, Xie WB, 2019. Effects of leaf types on growth and chlorophyll fluorescence characteristics in *Pinus massoniana* seedlings. *Scientia Silvae Sinicae*, 55(3): 183-192 (in Chinese)
- Wang Q, Guo LD, 2013. Morphological characteristics of ectomycorrhizae associated with *Pinus tabulaeformis*. *Scientia Silvae Sinicae*, 49(2): 100-111 (in Chinese)
- Wang YX, Li KF, Ding GJ, Liu HY, 2020. Effects of aluminum on growth and nutrient element absorption of mycorrhizal *Pinus massoniana* seedlings. *Journal of Forest and Environment*, 40(2): 119-125 (in Chinese)
- Wang YZ, Pan TG, Ke YQ, Zheng SK, 1995. Effect of inoculating ectomycorrhizal fungus on *Acacia confusa* and *Pinus massoniana* seedlings. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 6(2): 186-189 (in Chinese)
- Zhai SS, Ding GJ, Wang Y, Luo XM, Li M, 2015. Effects of *Suillus luteus* on root architecture of *Pinus massoniana*. *Journal of Forest and Environment*, 35(3): 243-248 (in Chinese)
- Zhou ZX, 2001. Chinese masson pine. China Forestry Publishing House, Beijing. 38-45 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 陈连庆, 1989. 马尾松共生菌根真菌调查研究. *林业科学研究*, 2(4): 357-362
- 丁贵杰, 周志春, 王章荣, 2006. 马尾松纸浆用材林培育与利用. 北京: 中国林业出版社. 27
- 冯万燕, 赵燕珍, 谭健辉, 杨章旗, 孙学广, 2019. 马尾松与粘盖乳牛肝菌菌根共生体形成过程. *菌物学报*, 38(10): 1620-1630
- 郭米山, 高广磊, 丁国栋, 张英, 赵媛媛, 任悦, 2018. 呼伦贝尔沙地樟子松外生菌根真菌多样性. *菌物学报*, 37(9): 1133-1142
- 黄兰兰, 汪延良, 于富强, 2020. 外生菌根合成过程中外源竞争性真菌及其菌根形态. *菌物学报*, 39(5): 955-962
- 冀瑞卿, 高婷婷, 李冠霖, 徐洋, 邢鹏杰, 周吉江, 谢孟乐, 李佳奇, 李玉, 2020. 东北红松纯林菌根外生菌根真菌群落与环境因子的相关性. *菌物学报*, 39(4): 1-12
- 孔祥生, 易现峰, 2008. 植物生理学实验技术. 北京: 中国农业大学出版社. 67-68
- 李敏, 2016. 贵州主要马尾松群落中 ECM 真菌多样性研究. 贵州大学硕士论文, 贵阳. 39
- 李雪萍, 赵成章, 任悦, 张晶, 雷蕾, 2019. 尕斯库勒湖湿地不同密度下甘肃马先蒿根系分叉数与连接数、分支角度的关系. *生态学报*, 39(10): 3670-3676
- 王好运, 吴峰, 吴昌明, 于淞, 朱小坤, 2018. 马尾松不同叶型幼苗对干旱及复水的生长及生理响应. *东北林业大学学报*, 46(1): 1-6
- 王好运, 吴峰, 朱小坤, 谢维斌, 2019. 叶型对马尾松幼苗生长及叶绿素荧光特征的影响. *林业科学*, 55(3): 183-192
- 王琴, 郭良栋, 2013. 油松外生菌根的形态解剖特征. *林业科学*, 49(2): 100-111
- 汪远秀, 李快芬, 丁贵杰, 刘海燕, 2020. 铝对马尾松菌根苗生长及营养元素吸收的影响. *森林与环境学报*, 40(2): 119-125
- 王元贞, 潘廷国, 柯玉琴, 郑伸坤, 1995. 外生菌根接种马尾松和相思树幼苗的研究. *应用生态学报*, 6(2): 186-189
- 翟帅帅, 丁贵杰, 王艺, 罗晓蔓, 李敏, 2015. 褐环乳牛肝菌对马尾松幼苗根系构型的影响. *森林与环境学报*, 35(3): 243-248
- 中国科学院植物研究所形态细胞研究室比较形态组, 1978. 松树形态结构与发育. 北京: 科学出版社. 27-28
- 周政贤, 2001. 中国马尾松. 北京: 中国林业出版社. 126-132

(本文责编: 韩丽)