

DOI: 10.5846/stxb201812132724

熊丹, 欧静, 李林盼, 杨舒婷, 何跃军, 李朝婵. 黔中地区马尾松林下杜鹃根部内生真菌群落组成及其生态功能. 生态学报, 2020, 40(4): 1228-1239.
Xiong D, Ou J, Li L P, Yang S T, He Y J, Li C C. Community composition and ecological function analysis of endophytic fungi in the roots of *Rhododendron simsii* in *Pinus massoniana* forest in central Guizhou. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(4): 1228-1239.

黔中地区马尾松林下杜鹃根部内生真菌群落组成及其生态功能

熊 丹¹, 欧 静^{1,*}, 李林盼¹, 杨舒婷¹, 何跃军¹, 李朝婵²

¹ 贵州大学林学院, 贵阳 550025

² 贵州师范大学贵州省山地环境重点实验室, 贵阳 550001

摘要:探索黔中马尾松 (*Pinus massoniana*) 林下杜鹃 (*Rhododendron simsii*) 根内生真菌物种多样性和生态功能。采集黔中乌当 (WD)、孟关 (MG)、龙里 (LL) 3 个地区马尾松林下杜鹃的根, 提取真菌 DNA 进行高通量测序。分析真菌 Alpha 多样性, 借助 FUNGuild 注释平台解析真菌的生态功能类别, 探索真菌群落中的核心微生物组, 并结合网络图展示菌群之间的关联性。结果, 3 个地区的杜鹃根部内生真菌多样性非常丰富, WD 地区杜鹃内生真菌多样性和丰富度最高。试验共获得有效序列 425799 条, 817 个可操作分类单元 (OTU), 分属于 6 门 19 纲 52 目 103 科 154 属, 主要隶属于子囊菌门 (81.2%)、接合菌门 (5.8%) 和担子菌门 (4.7%); 优势纲、目、科分别为: 散囊菌纲 (43.0%)、散囊菌目 (39.2%)、发菌科 (39.2%); 在属的水平上, 青霉属 (38.60%) 占比最高, 其次是木霉属 (7.20%)、拟盘多毛孢属 (6.10%)。根部的真菌拥有多种生态功能群, 如未定义腐生菌 (194 OTU)、植物病原菌 (20 OTU)、土壤腐生菌 (18 OTU)、外生菌 (14 OTU)、地衣共生真菌 (10 OTU)、杜鹃类菌根真菌 (5 OTU)、木腐生菌 (5 OTU)、丛枝菌根 (4 OTU)、内生菌 (2 OTU)、动物病原菌 (8 OTU), 以及多种混合营养型类群 21 类, 102 个 Undefined 种类在 FUNGuild 数据库中没有参考信息。根部真菌可以形成生态位共享模式, 而且不同功能群之间存在耦合性, 核心基因组与关键物种以真菌组形成的生态功能团表现。

关键词:杜鹃; 内生真菌; 多样性; 营养型; FUNGuild

Community composition and ecological function analysis of endophytic fungi in the roots of *Rhododendron simsii* in *Pinus massoniana* forest in central Guizhou

XIONG Dan¹, OU Jing^{1,*}, LI Linpan¹, YANG Shuting¹, HE Yuejun¹, LI Chaochan²

¹ College of Forestry, Guizhou University, Guiyang 550025, China

² Key Laboratory of Mountainous Environmental of Guizhou, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China

Abstract: To explore the species diversity and ecological functions of endophytic fungi in the roots of *Rhododendron simsii* Planch under *Pinus massoniana* forests in central Guizhou, the hairy roots of *R. simsii* under *P. massoniana* forests in Wudang (WD), Mengguan (MG) and Longli (LL) areas were collected. DNA of endophytic fungi in the roots was extracted for high throughput sequencing. Alpha was used to analyze the species diversity of fungi. FUNGuild annotation platform was used to analyze the ecological function categories of fungi and explore the core microbial groups in fungal communities. The network graph was used to show the correlation between fungal flora. The results showed that the species diversity of endophytic fungi in the roots of *Rhododendron* was rich in three regions. The diversity and richness of endophytic fungi of *Rhododendron* in WD area was the highest. A total of 425799 valid sequences and 817 operational classification

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31560223, 31660156); 贵州省科技计划项目 [黔科合支撑 (2016) 2522 号, 黔科合 LH 字 (2017) 7354 号]

收稿日期: 2018-12-13; 网络出版日期: 2019-11-20

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: coloroj@126.com

units (OTU) were obtained, belonging to 6 phylas, 19 classes, 52 orders, 103 families, and 154 genera. They mainly belong to Ascomycota (81.2%), Zygomycota (5.8%), and Basidiomycota (4.7%). The dominant class, order, and family of them were Eurotiomycetes (43.0%), Eurotiales (39.2%), and Trichocomaceae (39.2%), respectively. At the genus level, *Penicillium* accounted for the highest proportion (38.60%), followed by *Trichoderma* (7.20%) and *Pestalotiopsis* which constituted 6.10%. The fungi in the root had a variety of ecological functional groups, such as Undefined Saprotroph (194 OTU), Plant Pathogen (20 OTU), Soil Saprotroph (18 OTU), Ectomycorrhizal fungi (14 OTU), Lichenized fungi (10 OTU), Ericoid Mycorrhizal fungi (5 OTU), Wood Saprotroph (5 OTU), Arbuscular Mycorrhizal fungi (4 OTU), Endophyte (2 OTU), Animal Pathogen (8 OTU), and 21 kinds of mixed nutritional groups, in which 102 undefined species had no reference in the FUNGuild database. The endophytic fungi in the root can form niche sharing model and have coupling among different functional groups. The expression of core genomes and ecological functional groups formed by fungal groups in key species.

Key Words: *Rhododendron simsii*; endophytic fungi; diversity; nutritional type; FUNGuild

真菌多样性是生物多样性的重要组成部分,主要包括形态多样性、物种多样性和功能多样性,有研究表明菌根真菌能提高苗木移栽成活率,研究其多样性可以为荒山改造、水土保持、增加森林覆盖率等做贡献,因而具有重大意义^[1-2]。杜鹃(*Rhododendron simsii*)生于海拔 500—1200(-2500)m 的山地疏灌丛或松林下^[3],素有“花中此物最西施”的美誉,具有重要的观赏价值和园林应用价值^[4]。植物与土壤中的真菌互作形成根系共生体(Root-associated fungi, RAF)^[5],真菌通过分解有机物质为宿主植物提供必须的营养^[6-7],可促进种子的萌发^[8]、营养物质的吸收^[9]、幼苗的生长与发育^[10],增加对水分胁迫的耐受性和光合效率,进而提高其对恶劣生境的适应能力^[11-12]。杜鹃属植物具有丰富的真菌多样性^[13-14],Heinonsalo 等^[15]对同一生境下的杜鹃属植物菌根(Ericoid mycorrhizal fungi,ERM)及伴生植物菌根进行比较研究,得出 ERM 在其他植物根部也能形成,共生植物菌根之间存在关联性。以往对 ERM 的研究多从分离鉴定其菌根菌后回接到宿主植物,通过观察其对宿主生理生态的影响分析其功能性,故而忽略了杜鹃根部不能分离的未知真菌类群,分离真菌回接到宿主具有随机性和盲目性,工作量大且研究周期长。相关报道发现直接分子检测法能较为全面地反映杜鹃属植物 RAF 多样性^[16],FUNGuild 注释软件可不依赖于培养的分子检测技术,根据不同类型真菌能以相似方式利用相同类型营养物质为划分依据,借助生态功能群从分类学上解析真菌的生态类型^[17],近年来以 Venn 图中重叠的圆圈部分表示核心微生物组为微生物群落的研究提供了新的思路^[18-19],而鲜有关于马尾松林下杜鹃 RAF 群落组成和生态功能结构分析的报道,其核心基因组真菌研究更是罕见。

本文基于高通量测序技术,从真菌分类学和功能多样性角度对黔中 3 个地区马尾松林下杜鹃根内生真菌进行多样性分析,在系统了解菌群结构组成的基础上对真菌功能多样性进行深入探讨,分析生活在马尾松林下的杜鹃根内生菌中是否存在具标记性的核心真菌组(core microbiome)及关键物种(keystone species),并以网络图的形式展现不同菌群之间的相关性,初步探讨了黔中三个地区杜鹃根部真菌的群落组成及生态功能群二者间的联系,有助于揭示宿主植物的环境适应性机制,为今后开展杜鹃菌根真菌在杜鹃人工繁育中的应用奠定基础,同时为园林上将杜鹃与马尾松配植提供数据参考。

1 研究方法

1.1 研究地概况

选取黔中贵阳市花溪区孟关乡(N26.840, E106.989,海拔 1270m)、乌当区百宜镇拐比村(N26.415, E106.749,海拔 1196m)和贵州省黔南龙里县龙架山森林公园(N26.465, E106.937,海拔 1182m)为试验样地。研究区植物群落从上到下依次为乔木层、灌木层、草本层。其中马尾松-杜鹃为样地常见植物群落,马尾松树高 15—20 m,胸径 25—35 cm;杜鹃高 1.75—2.40 m,地径 2.5—3.2 cm。此外,样地伴生植物为:白栎(*Quercus*

fabri Hance)、茅栗(*Castanea seguinii* Dode)等多种灌木。黔中地区属亚热带季风性湿润气候,土壤以山地黄壤为主,呈酸性,土质粘重。年均温约 15.3 °C,年降雨量高于 870 mm,平均相对空气湿度 79.9%,日照百分率 25.7%,无霜期 200 d 以上。

1.2 试验方法

1.2.1 样品采集

于 2017 年 5 月 15 日、17 日、20 日分别在贵州省黔南龙里龙架山森林公园(LL),贵阳市乌当区百宜镇拐比村(WD)、花溪区孟关乡(MG)选取马尾松-杜鹃生长良好且杜鹃长势相似的群落,在不破坏生态环境的情况下,去除杜鹃垂直盖度以下的枯枝落叶层和杂物,由主干追踪到侧根和发根区域,挖出 5—20 cm 的杜鹃根段主要分布层,剪取粗壮发根(直径 0.5—1.5mm,样品 0.5g)用作杜鹃根部真菌群落组成分析,取样后覆土。每个地区选择三个样方采集 3 个样品,每个样品之间间隔超过 5 m,试验一共 9 个样品。试验工具在采样之前均经过严格灭菌处理,样本采集后立刻用液氮处理,带回后保存在-20 °C 冰箱中备用。

1.2.2 根样中真菌基因组 DNA 提取、扩增及测序

采用 Illumina MiSeq 二代测序平台对样本 DNA 片段进行双端(Paired-end)测序(由上海派森诺生物测序公司完成)。利用试剂盒 omega EZNA soil extraction kit 提取杜鹃菌根真菌 DNA,操作步骤如下:

- (1)将预处理好的根样放到对应编号且预装有 500mg glassbeads 的 2mL 离心管中;
- (2)向上述样品管中加入 0.8mL Buffer SLX Mlus.于组织破碎仪 25HZ 振荡 7min;
- (3)加入 80 μ L Buffer DS,振荡混匀;
- (4)90°C 孵育 10min,孵育期间颠倒离心管以混匀其中液体 1—2 次(因不知样品中是否含有难裂解的真菌,故将孵育温度提高至 90°C);
- (5)13000 \times g(12000rpm)室温离心 5min,转移 600 μ L 上清至新的 96 深孔板中,加入 200 μ L Buffer SP2,用手轻轻振荡混匀,加入 100 μ L HTR Reagent;
- (6)冰浴 5min,4000 \times g(3700rpm)离心 10min;
- (7)转移上清 400 μ L 至 96 深孔板中,加入 40 μ L 磁珠,450 μ L Binding Buffer,混匀,室温放置 2min;
- (8)上核酸纯化仪进行纯化。

利用 0.8% 的凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 的质量和浓度。检测合格后,利用真菌 rDNA-ITS 保守区上游引物:5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'和下游引物:5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'^[20],进行特异性扩增,PCR 反应程序为:98 °C 预热变性 2 min;25 个循环,每个循环 98 °C,热变性 15 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s;最后 72 °C 延伸 5 min,10 °C 保存。将扩增产物进行回收、荧光定量,回收采用 AXYGEM 公司的凝胶回收试剂盒。采用 Illumina 公司的 TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit 制备测序文库,文库制备合格后上机测序,测序得到的基因序列提交至 GenBank 数据库。登录号 PRJNA505090,编号为 SAMN10386261-SAMN10386263,SAMN10386267-SAMN10386269,SAMN10386273-SAMN10386275。

获得原始数据后,对测序质量进行评估和质控,利用 QIIME 软件将分类单元 OTU (Operational Taxonomic Units)归并和聚类(相似度阈值为 97%)^[21],采用 UNITE 数据库^[22]进行 OTU 分类注释;获得 OTU 丰度矩阵之后,计算每个样本真菌群落的 Alpha 多样性。

1.2.3 杜鹃根内生真菌多样性检测和功能分析

生态功能群分析:选取菌群丰度大于 10 的 OTU 序列,采用 FUNGuild 在线数据库平台(<https://github.com/UMNFuN/FUNGuild>)^[17],将杜鹃根部内生菌划到不同的营养型(Trophic mode)和共位群(Guild)。营养型包括共生型(Symbiotroph)、腐生型(Saprotroph)、病原型(Pathotroph);共位群包括杜鹃菌根真菌、外生菌根真菌、丛枝菌根真菌、兰科植物菌根真菌、内生真菌、病原真菌、腐生真菌等^[23-24]。

关联网图分析:根据真菌在各样本中的分布,选取丰度大于 20 的物种,调用 R 语言 vegan、Igraph、psych、pheatmap、magrittr、ggplot2、RColorBrewer、reshape2、cluster 包,对菌群进行关联网图分析。

2 结果

2.1 杜鹃根内生真菌的群落结构

通过高通量测序方法对黔中乌当(WD)、孟关(MG)、龙里(LL)三个地区的杜鹃根内生真菌群落组成分析,共获得有效序列 425799 条,按照 97%的相似阈值对有效序列进行聚类,共获得 817 个 OTU,韦恩图(图 1)显示,MG 真菌 OTU 总数 441,WD 为 449,LL 为 433,共有真菌 OTU 数 143,表明三个地区杜鹃根部内生菌 OTU 值数量差异较小。

经聚类,817 个 OTU 分属于 8 门、18 纲、53 目、105 科、152 属,优势菌群系为子囊菌门(81.2%)、接合菌门(5.8%)、担子菌门(4.7%);优势菌纲主要为散囊菌纲(43.0%)、粪壳菌纲(18.9%)、锤舌菌纲(7.0%)等;优势菌目为散囊菌目(39.2%)、肉座菌目(9.1%)、Xylariales(8.4%)、柔膜菌目(6.1%)等;优势科有发菌科(39.2%)、圆孔壳科(8.4%)、肉座菌科(7.2%)等;152 属中相对丰度大于 0.01%的真菌共有 30 个属,主要是青霉属(38.60%)、木霉属(7.20%)、拟盘多毛孢属(6.10%)、*Umbelopsis* 4.40%等(见图 2)。

2.2 不同区系优势菌群

孟关(MG)地区杜鹃根内生优势真菌为子囊菌门 Ascomycota 的青霉菌属 *Penicillium*、拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis*、木霉属 *Trichoderma*、新拟水蚤属 *Neopestalotiopsis* 和一未知属,接合菌门 Zygomycota 伞状霉属 *Umbelopsis*,担子菌门 Basidiomycota 隐球菌属 *Cryptococcus*;乌当(WD)地区优势真菌组成为子囊菌门的青霉菌属、*Hydropunctaria*、木霉属、*Chloridium*、*Neopestalotiopsis*、隐球菌属 *Cryptococcus*,接合菌门的 *Umbelopsis*;龙里(LL)地区的优势真菌子囊菌门的青霉菌属、拟盘多毛孢属、木霉属、*Archaeorhizomyces*、*Phialocephala*、*Chloridium*、*Neopestalotiopsis*、*Cryptococcus*,接合菌门的 *Umbelopsis*,担子菌门伞菌纲 Agaricomycetes 的未定属。三个地区杜鹃根部真菌具有较高的多样性,真菌之间既有相似又有差异,其中包括了典型的 ERM 树粉孢属 *Oidiodendron*(0.4%),ECM 红菇属 *Russula*(0.2%)、乳菇属 *Lactarius*(0.2%)及其他类型的菌根菌。而丰度最高的是青霉菌属、木霉属和拟盘多毛孢属,在杜鹃根部均有分布,表现出一定的寄主专一性。杜鹃根部内生真菌类型丰富,但杜鹃类菌根菌(ERM)占比相对较低。

2.3 真菌的 Alpha 多样性

通过 R 软件,对属水平的真菌群落组成结构进行 PCA 分析,第一和第二主轴的累积方差贡献率为 83.46%,其中第一主轴解释真菌属水平组成方差变异的 72.58%,第二主轴解释 10.88%,不同地区之间菌群组成差异较大(图 3)。3 个样地的 α 多样性指数见表 1,Simpson 指数、Shannon 指数 LL>WD>MG,LL Simpson 指数显著高于 MG($P<0.05$),LL 与 WD、WD 与 MG 之间不存在显著差异,而 Shannon 指数 WD、LL 显著高于 MG($P<0.05$),WD、LL 之间不存在显著差异。ACE 指数、Chao1 指数 WD>MG>LL,Chao1 指数 WD 显著高于 MG 和 LL($P<0.05$),MG 和 LL 不存在显著差异。可见,WD 地区真菌多样性最大,丰富度也最高,LL 地区真菌多样性次之,MG 丰富度略高于 LL,但不存在显著差异。马尾松林下杜鹃根部内生真菌 OTU 数量差异值较小,但组成上存在较大差异。

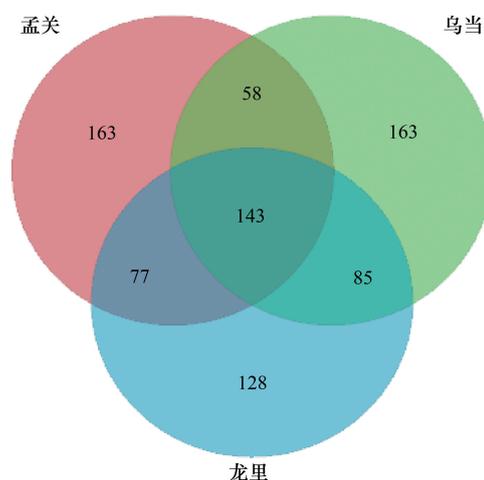


图 1 共有分类单元(OTU)的 Venn 图

Fig.1 Venn diagrams of OTU

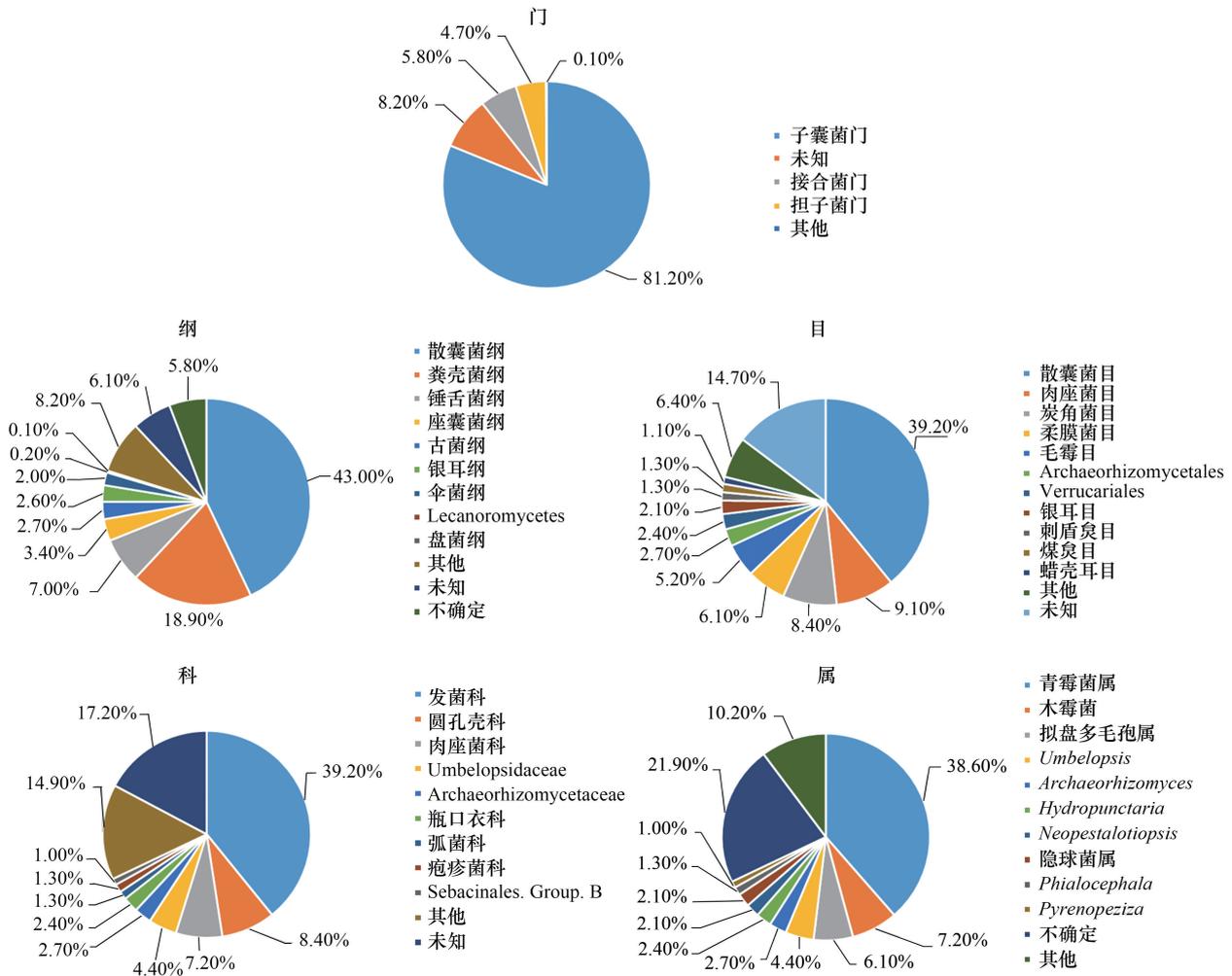


图 2 杜鹃根内生真菌群系组成

Fig.2 Composition of endophytic fungi in roots of *Rhododendron simsii*

表 1 杜鹃根内生真菌 Alpha 多样性指数表

Table 1 Alpha diversity index of endophytic fungi in roots of *Rhododendron simsii*

地名 Place name	Simpson	Shannon	Chao1	ACE
孟关 (MG)	0.77±0.08 B	3.57±0.34 B	240.3±11.84 B	241.10±12.83 B
乌当 (WD)	0.86±0.06 AB	4.21±0.37 A	285.3±24.39 A	285.46±23.59 A
龙里 (LL)	0.91±0.02 A	4.42±0.12 A	232±14.18 B	232.12±14.32 B

同列数据后不同大写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

2.4 杜鹃根内生菌的生态功能分析

基于 FUNGuild 软件解析结果显示 (表 2), 除未知菌群外杜鹃根内生真菌主要分为 10 个生态功能群, 分别是未定义腐生菌 Undefined Saprotroph (194 OTU)、植物病原菌 Plant Pathogen (20 OTU)、土壤腐生菌 Soil Saprotroph (18 OTU)、外生菌 Ectomycorrhizal (14 OTU)、地衣共生真菌 Lichenized fungi (10 OTU)、杜鹃类菌根真菌 Ericoid Mycorrhizal (5 OTU)、木腐生菌 Wood Saprotroph (5 OTU)、丛枝菌根 Arbuscular Mycorrhizal (4 OTU)、内生菌 Endophyte (2 OTU) 和动物病原菌 Animal Pathogen (8 OTU) 10 类。此外还有多种混合营养型的真菌如: 寄生性真菌-不定腐生菌 Fungal Parasite-Undefined Saprotroph (11 OTU); 植物病原-土壤腐生-木材腐生菌 Plant Pathogen-Soil Saprotroph-Wood Saprotroph (8 OTU); 植物内生-病原菌 Endophyte-Plant Pathogen

(2 OTU)等 21 类,102 个 Undefined 种类在 FUNGuild 数据库中没有参考信息。

2.5 根内生真菌核心真菌组及关键物种分析

不同类型的真菌行使不同的功能,推测存在着重要的功能菌群,为此,采用 R 语言对杜鹃根部内生菌功能群做关联网络分析,获得的有效功能类别关联图结构为 8 大部分,包含 265 个真菌 OTU,3357 条关系,不同颜色代表不同关联性的菌群,OTU 所在网络图中的圆球越大,则竞争能力越大,之间的连线越粗代表影响力和关联性也越高(图 3)。结合三个地区杜鹃根内生共有真菌 Venn 图发现,共有属中有 19 个分类单元 otu 在共有功能群中分布频率较高,分别是 otu3717 青霉属 (*Penicillium*)、otu1062 木霉属 (*Trichoderma*)、otu0 青霉属 (*Penicillium*)、otu1580 拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis*)、otu2468 (*Chloridium*)、隐球菌属 (*Cryptococcus*)、otu108 银耳目 (*Tremellales*)、otu807 (*Hydropunctaria*)、otu2049

毛孢子菌属 (*Trichosporon*)、otu2592 树孢菌属 (*Oidioidendron*)、otu2115 短梗霉属 (*Aureobasidium*)、otu376 短梗霉属 (*Aureobasidium*)、otu1537 (*Phialocephala*)、otu3296 支顶孢属 (*Acremonium*)、otu3433 假裸囊菌属 (*Pseudogymnoascus*)、otu1800 (*Purpureocillium*)、otu2492 腐质霉属 (*Humicola*)、otu1787 (unidentified)、otu313 (unidentified)。这些核心真菌在不同地区的杜鹃根部均有出现,其生态类型见表 2,从功能网络图分析看出,不同生态型真菌之间存在关联性,根部真菌可以形成生态位共享模式,而且不同功能群之间存在耦合性,功能大小不一。功能团之间包含有多种类型的菌群结构,在时间和空间上相互联系,推测这是多个 OTU 在微生物组内功能冗余的表现形式,核心基因组与关键物种以真菌组形成的生态功能团表现。

表 2 杜鹃根内生真菌功能解析

Table 2 Functional analysis of endophytic fungi in *Rhododendron simsii* roots

FUNGuild 软件解析杜鹃根内生真菌功能种类 Analysis of functional species of endophytic fungi in <i>Rhododendron simsii</i> roots by FUNGuild Software					
序号 Number	分类单元 OTU	分类单位 Taxon	可靠度 Confidence	共位群 Guild	数量 Amount
1	otu3717	Eurotiales	Possible	Undefined Saprotroph	194
	otu0	Eurotiales	Possible		
	otu1062	Hypocreales	Possible		
2	otu1787	—	—	Undefined	102
	otu313	—	—		
	otu396	—	—		
3	otu1557	<i>Pestalotiopsis</i>	Probable	Plant Pathogen	20
	otu1580	<i>Pestalotiopsis</i>	Probable		
	otu2526	<i>Pyrenopeziza</i>	Probable		
4	otu242	Archaeorhizomyces	Probable	Soil Saprotroph	18
	otu371	Archaeorhizomyces	Probable		
	otu590	Archaeorhizomyces	Probable		
5	otu2468	<i>Chloridium</i>	Highly Probable	Ectomycorrhizal	14
	otu912	<i>Russula</i>	Highly Probable		
	otu2287	<i>Lactarius</i>	Highly Probable		

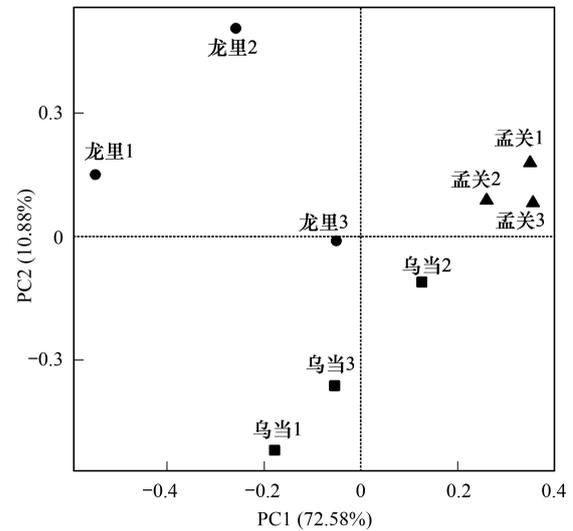


图 3 属水平的群落组成结构 PCA 分析

Fig.3 PCA analysis of community composition at genus level

续表

FUNGuild 软件解析杜鹃根内生真菌功能种类					
Analysis of functional species of endophytic fungi in <i>Rhododendron simsii</i> roots by FUNGuild Software					
序号 Number	分类单元 OTU	分类单位 Taxon	可靠度 Confidence Ranking	共位群 Guild	数量 Amount
6	otu108	Tremellales	Possible	Fungal Parasite- Undefined Saprotroph	11
	otu2903	Tremellales	Possible		
	otu3605	Tremellales	Possible		
7	otu807	Hydropunctaria	Highly Probable	Lichenized	10
	otu657	Hydropunctaria	Highly Probable		
	otu2065	Heteroplacidium	Highly Probable		
8	otu3722	<i>Trichosporon</i>	Probable	Animal Pathogen	8
	otu2049	<i>Trichosporon</i>	Probable		
	otu672	Metarhizium	Probable		
9	otu3391	<i>Fusarium</i>	Probable	Plant Pathogen-Soil Saprotroph-Wood Saprotroph	8
	otu3008	<i>Fusarium</i>	Probable		
	otu331	<i>Fusarium</i>	Probable		
10	otu2592	<i>Oidiiodendron</i>	Probable	Ericoid Mycorrhizal	5
	otu3579	<i>Oidiiodendron</i>	Probable		
	otu323	<i>Oidiiodendron</i>	Probable		
	otu106	<i>Oidiiodendron</i>	Probable		
	otu1936	<i>Oidiiodendron</i>	Probable		
11	otu2722	Trechispora	Highly Probable	Wood Saprotroph	5
	otu560	Berkleasium	Possible		
	otu94	Berkleasium	Possible		
12	otu904	<i>Chaetomium</i>	Probable	Animal Pathogen-Dung Saprotroph-Endophyte- Epiphyte-Plant Saprotroph- Wood Saprotroph	4
	otu786	<i>Chaetomium</i>	Probable		
	otu1206	Chaetomiaceae	Probable		
13	otu2451	Glomeraceae	Highly Probable	Arbuscular Mycorrhizal	4
	otu282	Ambisporaceae	Highly Probable		
	otu1866	Archaeosporales	Highly Probable		
	otu3205	Claroideoglossus	Highly Probable		
14	otu3621	<i>Phoma</i>	Highly Probable	Plant Pathogen- Wood Saprotroph	3
	otu3402	<i>Phoma</i>	Highly Probable		
	otu437	<i>Phoma</i>	Highly Probable		
15	otu2412	<i>Rhodotorula</i>	Probable	Animal Endosymbiont- Undefined Saprotroph	2
	otu1014	<i>Pichia</i>	Highly Probable		
16	otu2115	Aureobasidium	Possible	Animal Pathogen- Endophyte-Epiphyte- Plant Pathogen- Undefined Saprotroph	2
	otu376	Aureobasidium	Possible		
17	otu1537	Phialocephala	Highly Probable	Endophyte	2
	otu3583	Phialocephala	Highly Probable		
18	otu2219	Camarosporium	Possible	Endophyte-Plant Pathogen	2
	otu3193	Colletotrichum	Probable		
19	otu1791	Phyllosticta	Highly Probable	Endophyte-Plant Pathogen- Wood Saprotroph	2
	otu434	Periconia	Possible		
20	otu3077	Dermateaceae	Probable	Plant Pathogen- Plant Saprotroph	2
	otu2551	Dermateaceae	Probable		
21	otu1874	Chaetosphaeriaceae	Probable	Plant Saprotroph- Wood Saprotroph	2
	otu65	Chaetosphaeriaceae	Probable		
22	otu597	Basidiobolaceae	Probable	Animal Endosymbiont- Animal Pathogen- Undefined Saprotroph	1

续表

FUNGuild 软件解析杜鹃根内生真菌功能种类					
Analysis of functional species of endophytic fungi in <i>Rhododendron simsii</i> roots by FUNGuild Software					
序号 Number	分类单元 OTU	分类单位 Taxon	可靠度 Confidence Ranking	共位群 Guild	数量 Amount
23	otu148	<i>Cordyceps</i>	Possible	Animal Pathogen- Clavicipitaceous Endophyte-Fungal Parasite	1
24	otu3296	<i>Acremonium</i>	Possible	Animal Pathogen- Endophyte-Fungal Parasite-Plant Pathogen- Wood Saprotroph	1
25	otu3433	<i>Pseudogymnoascus</i>	Possible	Animal Pathogen- Soil Saprotroph	1
26	otu3651	<i>Cercophora</i>	Highly Probable	Dung Saprotroph	1
27	otu1036	<i>Chaetosphaeria</i>	Probable	Endophyte-Litter Saprotroph- Wood Saprotroph	1
28	otu3097	<i>Diplodia</i>	Possible	Epiphyte-Plant Pathogen- Wood Saprotroph	1
29	otu1800	<i>Purpureocillium</i>	Probable	Fungal Parasite	1
30	otu1970	<i>Sporobolomyces</i>	Probable	Fungal Parasite- Litter Saprotroph	1
31	otu857	<i>Mycena</i>	Probable	Leaf Saprotroph-Plant Pathogen-Undefined Saprotroph-Wood Saprotroph	1
32	otu2492	<i>Humicola</i>	Probable	Undefined Saprotroph- Wood Saprotroph	1

3 讨论

3.1 杜鹃根内生真菌的群落多样性

根部真菌(RAF)多样性决定了植物的多样性、生态系统的变异性和生产量^[25]。高通量测序获得杜鹃根内生真菌 DNA 序列 425799 条,聚类后得到的 817 个 OTU 分属于 8 门、18 纲、53 目、105 科、152 属。主要隶属于子囊菌门(81.2%)、接合菌门(5.8%)和担子菌门(4.7%);优势纲、目、科分别为:散囊菌纲(43.0%)、散囊菌目(39.2%)、发菌科(39.2%);在属的水平上,青霉属(38.60%)占比最高,其次是木霉属(7.20%)、拟盘多毛孢属(6.10%)。

杜鹃 RAF 中有典型的树粉孢属 *Oidiiodendron*(ERM),红菇属 *Russula*(ECM)、乳菇属 *Lactarius* 及其他类型的菌根菌。研究发现的杜鹃 RAF 已有大量报道,如青霉属、红菇属、蜡壳耳属、隐球菌属等在不同林型马银花(*R. ovatum*)根部均有分布^[26],台湾杜鹃(*R. formosan*)^[7]、树枫杜鹃(*R. changii*)和云南大理灰背杜鹃(*R. hippophaeoides*)^[27]菌根中均有隐球菌属。不同生态类型的菌根真菌在杜鹃根部共生,其形成原因可能是共生植物之间菌根存在着关联性,马尾松林中不同植物地下部分菌根能形成关联网。子囊菌门柔膜菌目和担子菌门蜡壳耳目是典型的杜鹃花类植物菌根菌,张春英等^[14]、刘仁阳等^[28]也分别从云锦杜鹃(*R. fortunei*)和雷山杜鹃(*R. leishanicum*)根中分离到此类真菌。相比于黄彩微等^[16]从薄叶马银花(*R. leptothrium*)根系检测到的 8 个 OTU 和锈红杜鹃(*R. bureavii*)根系的 7 个 OTU,黔中马尾松林下生长的杜鹃根内生真菌丰富度和多样性极高,OTU 数量大于来自于我国长白山(355 OTU)、大兴安岭(229 OTU)和小兴安岭(226 OTU)地区的越桔

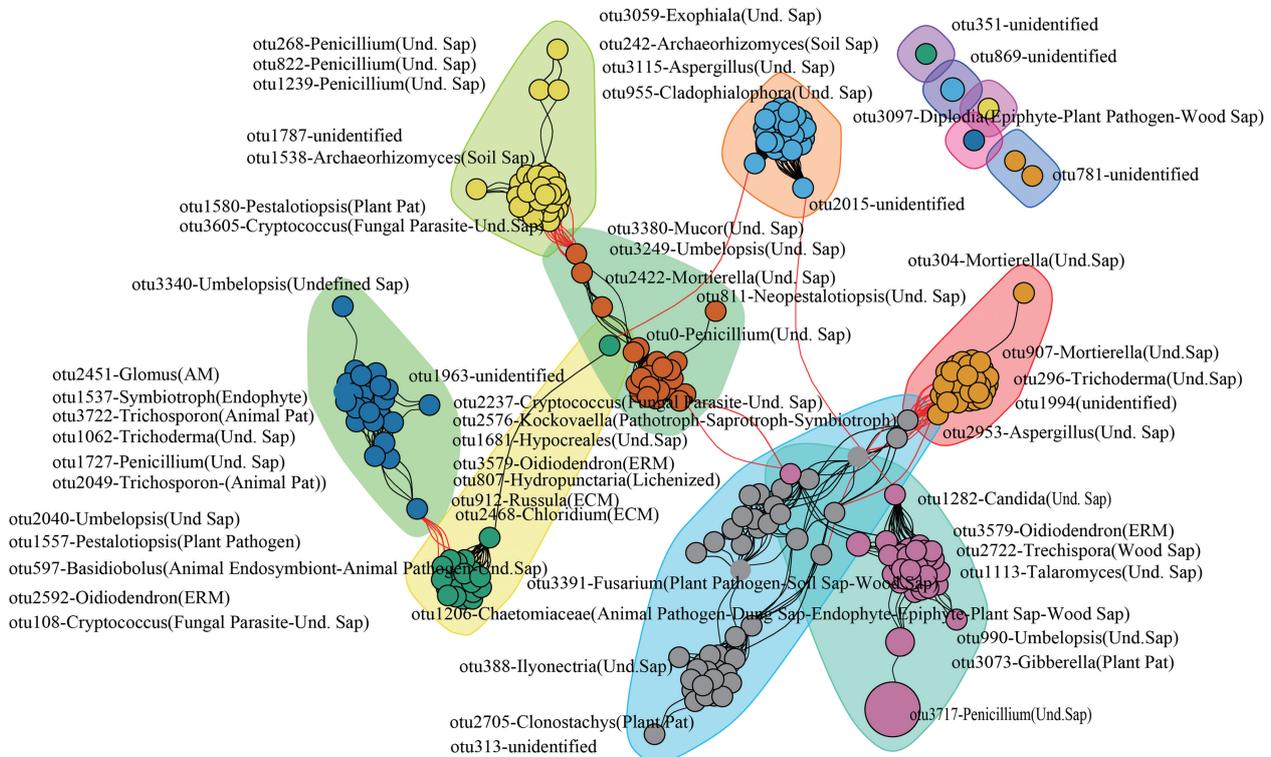


图4 杜鹃根内生真菌 OTU 生态功能群的共存网络图

Fig.4 Coexistence Network of Endophytic Fungi OTU in *Rhododendron simsii* Roots

Animal pat 和 Plant pat 表示动物病原菌和植物病原菌, Und. sap 表示未知腐生菌 (图中只显示部分 OTU 名称)

(*Vaccinium uliginosum*)^[29] 根部真菌。Alpha 多样性分析显示, WD 地区真菌多样性最大, 丰富度也最高, LL 地区真菌多样性次之, MG 丰富度略高于 LL, 但不存在差异显著。导致这一现象的原因可能是受杜鹃自身生长周期与生境因素的影响, 三个区系杜鹃处于不同小生境下, 内生真菌菌群的分布及组成也会有所不同。植物内生真菌菌群在宿主植物中的组成及生态分布特征往往会随着宿主树龄、组织类型、营养成分、生长季节、温度升降、降水量多寡等众多因素的变化而变化^[30-31]。受植物种、植物群落和环境因子的相互作用, 植物组成接近的生态群落, 其环境因子组成上也比较接近, 但生境差异促进了菌群数量和结构的多样化^[32]。笔者所在课题组已对黔中不同片区马尾松林植物多样性和杜鹃根部土壤的理化性质进行分析, 探讨植物多样性和土壤理化性质对马尾松-杜鹃混交林真菌群落结构的影响 (论文待发表)。

3.2 根内生真菌的生态功能多样性

菌群中真菌的群落组成对宿主和环境的影响一直是该领域的热点, 微生物群落组成和丰度对生态系统有重要的调节功能, 核心真菌组与关键物种的贡献也成为研究的重要部分。FUNGuild 软件解析菌群结果显示, otu2592、otu3579、otu323、otu106、otu1936 同属于 ERM, 生长形态学 (Growth Morphology) 属于黑色有隔内生菌 (Dark Separate Endophytes, DSE), DSE 广泛存在于高山和极地的植物根部, 能增强植物对 P 的吸收和获取^[16,33]。外生菌根 (Ectomycorrhizal, ECM) 功能群包含有 otu2468、otu912、otu2287 等 14 个 OTU, 它们分别是 *Chloridium*、*Russula*、*Lactarius* 等^[34], ECM 多为子囊菌门和担子菌门真菌, 能够在温带和热带生态系统中与广泛的宿主建立共生关系, 常与松科 (Pinaceae)、桦木科 (Betulaceae)、豆科 (Fabaceae)、龙脑香科 (Dipterocarpaceae)、壳斗科 (Fagaceae) 和桃金娘科 (Myrtaceae) 等高等植物形成菌根^[35-36]。以子囊菌门为主的腐生型真菌在杜鹃 RAF 群落中也较常见, 如未定义腐生菌群 (Undefined Saprotrroph 194 OTU), 其中 otu3717、otu0、otu1062 分别是 *Penicillium abidjanum*、*Penicillium spinulosum*、*Trichoderma atroviride*, 这三类真菌出

现在有云杉属(*Picea*)、欧洲赤松(*Pinus sylvestris* L.)和杜鹃属(*Rhododendron* L.)共生的瑞典中部混交林中,反映了真菌多样性与宿主的相关性^[37]。土壤腐生菌(Soil Saprotroph)功能群中包含有 otu242、otu371、otu590 等 18 个菌群,它们都是古生菌 *Archaeorhizomycetaceae*,普遍存在于松属、杜鹃属和其他阔叶树的根和根际土壤中,对宿主选择具有专一性并具腐生潜力,其形成的菌根包括数百种复杂且不可识别的丝状结构,在热带潮湿森林中具有丰富的多样性^[38]。

与 Nguyen 等^[17]结论相似,FUNGuild 数据库解析不全面,还需补充完善,Undefined 包含 otu1787、otu313、otu396 等 102 个 OTU,此类真菌在属水平上分类地位未定,需要进一步探索其真菌资源。本研究中杜鹃为马尾松林下伴生植物,数据分析显示其根部内生真菌功能群分类达到 32 个,传统的 ERM 真菌在杜鹃中所占比例不大,而未定义腐生菌群(Undefined Saprotroph)占比最高。研究发现,一些 OTU 无法在属水平上被解析到定义的功能群中;而另一方面被定义的 OTU 则又属于各种功能群中,FUNGuild 主要是基于营养型来对真菌进行功能划分的,但有的真菌不仅只有一种营养方式,他们在生活史的不同阶段变换着营养方式适应环境的改变,所以才有多样的功能营养型。如本研究中,植物病原-土壤腐生-木材腐生菌功能群(Plant Pathogen-Soil Saprotroph-Wood Saprotroph)的 8 个 OTU 均为 *Fusarium*,既是腐生菌也是内生菌或植物病原菌。植物内生真菌在植物的不同生活周期中扮演不同的角色,在发育学上处于不稳定的阶段,在植物组织健康生长的时候是内生真菌,但当组织衰老或死亡时它们是腐生真菌,这些具复杂生活史的真菌为应对不同的生存条件而可采取了不同的生存策略^[39-40]。此外,杜鹃根部内生菌中生活着动物病原菌(Animal Pathogen)功能群,Baarlen 等^[41]把这一现象解释为一些病原微生物能够感染不同生物寄主,在自然界跨界感染人与动物。RAF 可以形成促进、拮抗或竞争的地下生态模式,以及真菌之间的生态位共享^[24]。植物内生真菌与宿主植物之间往往是一种动态平衡的协同关系,菌群的群落组成对宿主植物多样性及生态环境稳定性起着巨大的影响,菌群组成丰度保证了生态功能系统正常运行,其多样性增加生态系统对外界环境抵抗力,具有重要的生态功能^[42-43]。有研究表明,生物多样性越高,在新的环境条件下,部分多余的生物体可以承担这种功能的可能性就越高,即生物多样性的保险效应^[44]。因此,与地上生物多样性类似,真菌多样性可能会对环境变化下的生态系统稳定性产生直接影响^[45],共生植物之间菌根存在着关联性,增加了森林生态系统的生物多样性和生态稳定性,核心基因组与关键物种的存在说明了真菌与宿主之间的相互选择关系。菌群功能团包含有多种类型的真菌,在时间和空间上相互联系,推测这是多个 OTU 在微生物组内功能冗余的表现形式,核心基因组与关键物种以真菌组形成的生态功能团而表现。

4 结论

黔中马尾松林下杜鹃根部拥有丰富的菌根类群,除了传统的 ERM 菌根类型外,还有 ECM、AM、ENM 等多种类型菌根,生态功能群丰富,其中乌当(WD)地区杜鹃菌根真菌多样性最大,丰富度也最高。这些功能复杂的菌群耦合,增加了森林生态系统的生物多样性和生态稳定性,而核心基因组与关键物种只能以真菌组形成的生态功能团表现,这些核心真菌类群值得进一步研究其生态意义。

参考文献(References):

- [1] 林双双,孙向伟,王晓娟,豆存艳,李媛媛,罗巧玉,孙莉,金樑.我国菌根学研究进展及其应用展望.草业学报,2013,22(5):310-325.
- [2] 石兆勇,陈应龙,刘润进.菌根多样性及其对植物生长发育的重要意义.应用生态学报,2003,14(9):1565-1568.
- [3] 中国科学院中国植物志编委会.中国植物志:第57(2)卷386页.北京:科学出版社,1994.
- [4] 冯国楣.花中西施杜鹃花.园林,2008,(12):124-125.
- [5] Vandenkoornhuysen P, Husband B, Daniell T J, Watson I J, Duck J M, Fitter A H, Young J P W. Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. Molecular Ecology, 2002, 11(8): 1555-1564.
- [6] Read D J. The structure and function of the ericoid mycorrhizal root. Annals of Botany, 1996, 77(4): 365-374.
- [7] Lin L C, Lee M J, Chen J L. Decomposition of organic matter by the ericoid mycorrhizal endophytes of Formosan rhododendron (*Rhododendron formosanum* Hemsl.). Mycorrhiza, 2011, 21(5): 331-339.

- [8] 欧静, 刘仁阳, 陈训, 钟登慧. 菌根真菌对桃叶杜鹃种子萌发及幼苗移植的影响. 南方农业学报, 2013, 44(2): 293-298.
- [9] Cairney J W G, Meharg A A. Ericoid mycorrhiza: a partnership that exploits harsh edaphic conditions. European Journal of Soil Science, 2003, 54(4): 735-740.
- [10] Jansa J, Vosátka M. In vitro and post vitro inoculation of micropropagated Rhododendrons with ericoid mycorrhizal fungi. Applied Soil Ecology, 2000, 15(2): 125-136.
- [11] 欧静, 韦小丽, 何跃军, 刘仁阳, 陈训. 接种 ERM 真菌对桃叶杜鹃幼苗的促生效应及生理生化影响. 林业科学, 2013, 49(7): 48-56.
- [12] 陈荣建, 熊丹, 欧静, 龙海燕, 熊贤荣, 何跃军, 李朝婵. 持续干旱下杜鹃花类菌根真菌对桃叶杜鹃内源激素的影响. 西南大学学报: 自然科学版, 2018, 40(3): 26-33.
- [13] 欧静, 刘仁阳, 陈训. 桃叶杜鹃菌根显微结构及侵染情况. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(11): 28-33.
- [14] 张春英, 戴思兰. 杜鹃花类菌根研究进展. 北京林业大学学报, 2008, 30(3): 113-119.
- [15] Heinonsalo J H, Koskiahde I K, Sen R S. Scots pine bait seedling performance and root colonizing ectomycorrhizal fungal community dynamics before and during the 4 years after forest clear-cut logging. Canadian Journal of Forest Research, 2010, 37(2): 415-429.
- [16] 黄彩微, 廖映辉, 张琪, 丁琼. 凉山州龙肘山锈红杜鹃与薄叶马银花根部真菌分子检测. 微生物学通报, 2017, 44(5): 1108-1120.
- [17] Nguyen N H, Song Z W, Bates S T, Branco S, Tedersoo L, Menke J, Schilling J S, Kennedy P G. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. Fungal Ecology, 2016, 20(1): 241-248.
- [18] Hamonts K, Trivedi P, Garg A, Janitz C, Grinyer J, Holford P, Botha F C, Anderson I C, Singh B K. Field study reveals core plant microbiota and relative importance of their drivers. Environmental Microbiology, 2018, 20(1): 124-140.
- [19] Shade A, Handelsman J. Beyond the Venn diagram; the hunt for a core microbiome. Environmental Microbiology, 2012, 14(1): 4-12.
- [20] Machida R J, Knowlton N. PCR primers for metazoan nuclear 18S and 28S ribosomal DNA sequences. PLoS One, 2012, 7(9): e46180.
- [21] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [22] Kõljalg U, Nilsson R H, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor A F S, Bahram M, Bates S T, Bruns T D, Bengtsson-Palme J, Callaghan T M, Douglas B, Drenkhan T, Eberhardt U, Dueñas M, Grebenc T, Griffith G W, Hartmann M, Kirk P M, Kohout P, Larsson E, Lindahl B D, Lücking R, Martin M P, Matheny P B, Nguyen N H, Niskanen T, Oja J, Peay K G, Peintner U, Peterson M, Põldmaa K, Saag L, Saar I, Schüßler A, Scott J A, Senés C, Smith M E, Suija A, Taylor D L, Telleria M T, Weiss M A, Larsson K. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of Fungi. Molecular Ecology, 2013, 22(21): 5271-5277.
- [23] Tedersoo L, Bahram M, Põlme S, Kõljalg U, Yorou N S, Wijesundera R, Ruiz L V, Vasco-Palacios A M, Thu P Q, Suija A, Smith M E, Sharp C, Saluveer E, Saitta A, Rosas M, Riit T, Ratkowsky D, Pritsch K, Põldmaa K, Piepenbring M, Phosri C, Peterson M, Parts K, Pärtel K, Otsing E, Nouhra E, Njouonkou A L, Nilsson R H, Morgado L N, Mayor J, May T W, Majuakim L, Lodge D J, Lee S S, Larsson K H, Kohout P, Hosaka K, Hiiesalu I, Henkel T W, Harend H, Guo L D, Greslebin A, Grelet G, Geml J, Gates G, Dunstan W, Dunk C, Drenkhan R, Dearnaley J, De Kesel A, Dang T, Chen X, Buegger F, Brearley F Q, Bonito G, Anslan S, Abell S, Abarenkov K. Global diversity and geography of soil fungi. Science, 2014, 346(6213): 1256688.
- [24] Toju H, Kishida O, Katayama N, Takagi K. Networks depicting the fine-scale Co-occurrences of fungi in soil horizons. PLoS One, 2016, 11(11): e0165987.
- [25] Van Der Heijden M G A, Klironomos J N, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders I R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature, 1998, 396(6706): 69-72.
- [26] Zhang Y H, Ni J, Tang F P, Jiang L F, Guo T R, Pei K Q, Sun L F, Liang Y. The effects of different human disturbance regimes on root fungal diversity of *Rhododendron ovatum* in subtropical forests of China. Canadian Journal of Forest Research, 2017, 47(5): 659-666.
- [27] 刘振华. 杜鹃花菌根真菌分离鉴定及多样性分析[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2010.
- [28] 刘仁阳, 欧静, 李冠楠, 刘玲, 张伟丽. 梵净山雷山杜鹃根部真菌分离与鉴定. 西北农业学报, 2014, 23(4): 178-185.
- [29] Yang H Y, Zhao X Y, Liu C L, Bai L, Zhao M, Li L L. Diversity and characteristics of colonization of root-associated fungi of *Vaccinium uliginosum*. Scientific Reports, 2018, 8(1): 15283.
- [30] 陈龙, 梁子宁, 朱华. 植物内生菌研究进展. 生物技术通报, 2015, 31(8): 30-34.
- [31] 姚领爱, 胡之璧, 王莉莉, 周吉燕, 黎万奎. 植物内生菌与宿主关系研究进展. 生态环境学报, 2010, 19(7): 1750-1754.
- [32] 张金屯. 数量生态学(第2版). 北京: 科学出版社, 2011.
- [33] Newsham K K. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. The New Phytologist, 2011, 190(3): 783-793.
- [34] Tedersoo L, Bahram M, Toots M, Diédhiou A G, Henkel T W, Kjøller R, Morris M H, Nara K, Nouhra E, Peay K G, Polme S, Ryberg M, Smith M E, Kõljalg U. Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. Molecular Ecology, 2012, 21(17): 4160-4170.
- [35] Brundrett M C. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving

- conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*, 2009, 320(1/2): 37-77.
- [36] Tedersoo L, Bahram M, Jairus T, Bechem E, Chinoya S, Mpumba R, Leal M E, Randrianjohany E, Razafimandimbison S G, Sadam A, Naadel T, Kõljalg U. Spatial structure and the effects of host and soil environments on communities of ectomycorrhizal fungi in wooded savannas and rain forests of Continental Africa and Madagascar. *Molecular Ecology*, 2011, 20(14): 3071-3080.
- [37] Sterkenburg E, Bahr A, Durling M B, Clemmensen K E, Lindahl B D. Changes in fungal communities along a boreal forest soil fertility gradient. *New Phytology*, 2015, 207(4): 1145-1158.
- [38] Rosling A, Cox F, Cruz-Martinez K, Ihrmark K, Grelet G A, Lindahl B D, Menkis A, James T Y. Archaeorhizomycetes: unearthing an ancient class of ubiquitous soil fungi. *Science*, 2011, 333(6044): 876-879.
- [39] Arnold A E, Lutzoni F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots?. *Ecology*, 2007, 88(3): 541-549.
- [40] 郑欢, 张芝元, 韩燕峰, 陈万浩, 梁宗琦. 刺槐内生真菌群落组成及其生态功能结构分析. *菌物学报*, 2018, 37(2): 256-263.
- [41] Van Baaren P, Van Belkum A, Summerbell R C, Crous P W, Thomma B P H J. Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps?. *FEMS Microbiology Reviews*, 2007, 31(3): 239-277.
- [42] Maherali H, Klironomos J N. Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science*, 2007, 316(5832): 1746-1748.
- [43] 杨海水, 熊艳琴, 王琪, 郭伊, 戴亚军, 许明敏. AM 真菌物种多样性: 生态功能、影响因素及维持机制. *生态学报*, 2016, 36(10): 2826-2832.
- [44] Yachi S, Loreau M. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(4): 1463-1468.
- [45] Isbell F, Craven D, Connolly J, Loreau M, Schmid B, Beierkuhnlein C, Bezemer T M, Bonin C L, Helge B, De Luca E, Ebeling A, Griffin J N, Guo Q F, Hautier Y, Hector A, Jentsch A, Kreyling J, Lanta V, Manning P, Meyer S T, Mori A, Naeem S, Niklaus P A, Polley H W, Reich P B, Roscher C, Seabloom E W, Smith M D, Thakur M P, Tilman D, Tracy B F, Van Der Putten W H, Van Ruijven J, Weigelt A, Weisser W W, Wilsey B J, Eisenhauer N. Biodiversity increases the resistance of ecosystem productivity to climate extremes. *Nature*, 2015, 526(7574): 574-577.