

## 松萎蔫病发生区和未发生区 油松根部真菌群落研究

徐风美, 王春燕, 褚洪龙, 唐 明\*

(西北农林科技大学 林学院, 陕西杨陵 712100)

**摘 要:** 植物根部真菌群落结构和多样性与植物的抗病性和病害的危害程度相互影响。为揭示松萎蔫病与松树根部真菌群落的相互作用, 该研究对陕西省商洛市柞水县松萎蔫病发生区和未发生区油松的根尖活性、根部外生菌根真菌(ECMF)和深色有隔内生真菌(DSE)的侵染率进行分析, 并通过油松根部可培养真菌的分离和鉴定, 分析了两地油松根部真菌的群落结构及多样性。结果显示: (1) 松萎蔫病未发生区油松根部的活性根尖比、菌根根尖比和ECMF的侵染率均显著高于发生区, 而DSE的侵染率和微菌核密度却低于松萎蔫病发生区, ECMF的侵染率在两个样区油松根部都显著高于DSE。(2) 从两个样区油松根部共分离到131个菌株, 根据形态和分子学特征最终鉴定为23种真菌, 其中DSE占绝对优势, 且 *Phialocephala fortinii* 和 *Cryptosporiopsis ericae* 为油松根部分离真菌的优势种。(3) 两个样区真菌的群落组成存在明显差异, 共有真菌仅5种。(4) 松萎蔫病未发生区真菌群落的丰富度(17)和多样性(2.012 0)、以及ECMF的相对丰度(8%)都高于松萎蔫病发生区(分别为11、1.197 9和1.6%), 而DSE的相对丰度(70%)却明显低于发生区(82.7%)。研究表明, 松萎蔫病的发生影响了油松根部的活性、菌根的形成、ECMF和DSE的侵染, 以及根部真菌的群落组成和多样性。该文首次报道了DSE与松萎蔫病的关系, 但分离真菌对油松松萎蔫病抗性的影响有待进一步研究。

**关键词:** 外生菌根真菌; 深色有隔内生真菌; 群落结构; 多样性; 相对丰度

**中图分类号:** Q948.12<sup>+</sup>2.3

**文献标志码:** A

## Research on Root Fungal Community of *Pinus tabulaeformis* in Pine Wilt Disease Damaged and Undamaged Areas

XU Fengmei, WANG Chunyan, CHU Honglong, TANG Ming\*

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** There is an interaction between the root fungal community and the plant disease. In order to uncover the interaction between the pine wilt disease and fungal community in the root of pine tree, we investigated the activity of root tips, the colonization rates of ectomycorrhizal fungi(ECMF) and dark septate endophytes(DSE), and analyzed the root fungal community structures and diversities of *Pinus tabulaeformis* in the pine wilt disease damaged and undamaged areas through the isolation and identification of culturable fungi. The results showed that: (1) Not only the ratio of active root tips and ectomycorrhizal tips, but also the colonization rate of ECMF were significantly higher in pine wilt disease undamaged area than those in damaged area ( $P < 0.05$ ), while the colonization rate of DSE and the density of microsclerotium were lower

**收稿日期:** 2014-04-18; **修改稿收到日期:** 2014-05-29

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31300543; 31170567); 西北农林科技大学引进人才科研启动费(Z111021204)和基本科研创新项目(Z109021308)

**作者简介:** 徐风美(1988—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事森林微生物学方面的研究。E-mail: twtmqgdu@126.com

\* 通信作者: 唐 明, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物学方面的研究。E-mail: tangmingyl@163.com

than damaged area. The colonization rates of ECMF were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than those of DSE in both of the two sample areas. (2) Based on the morphological and molecular characteristics of 131 isolates, they were finally identified as 23 species, in which, the dominant fungi were DSE, especially *Phialocephala fortinii* and *Cryptosporiopsis ericae*. (3) The two sample areas only shared 5 species, exhibited obvious difference in root fungal community structure and diversity. (4) In the pine wilt disease undamaged area, the richness (17) and Shannon-Wiener biodiversity index (2.012 0) of root fungal community, as well as the relative abundance of ECMF (8%) were higher than those in damaged area (11, 1.197 9 and 1.6%, respectively), but the relative abundance of DSE (70%) was lower than that in damaged area (82.7%). Above all, it is suggested that the outbreak of pine wilt disease affected the root activity, ectomycorrhizal development, colonization of ECMF and DSE, as well as the fungal community structure and diversity. This is the first report about the relationship between DSE and pine wilt disease. Further research is required to make clear the influence of these isolates on the resistance of pine tree against pine wilt disease.

**Key words:** ectomycorrhizal fungi; dark septate endophytes; community structure; diversity; relative abundance

松萎蔫病是由松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 引起的松树快速枯萎死亡、连片毁灭的危险性病害, 由于传播途径多、发病速度快、治理难度大, 被称为松树的“癌症”<sup>[1]</sup>。该病 1982 年在中国南京市中山陵首次发现, 目前已扩散蔓延至福建、浙江、江苏等 16 个省份<sup>[2]</sup>。长江流域以北的陕西省商洛市柞水县<sup>[3]</sup>和山阳县天竺山森林公园 (海拔 1 700 ~ 1 800 m, 年均气温 7.9 °C) 相继于 2009 和 2011 年发现疫情<sup>[4]</sup>, 打破了松萎蔫病不会在长江流域以北、年均气温 10 °C 以下的地区造成危害的常规认识, 也表明松萎蔫病正逐步由中国的南方向北方、东部向西部扩展, 其防控已刻不容缓。

植物根部真菌群落结构和多样性会影响植物的抗病性和病害的危害程度<sup>[5]</sup>, 而病害的发生又会引起植物根部真菌群落结构和多样性的变化<sup>[6]</sup>。已有研究表明, 松树根部的外生菌根真菌 (ectomycorrhizal fungi, ECMF) 能增强松树对松萎蔫病的抗性<sup>[7]</sup>, 其种群结构也可能影响松萎蔫病的危害程度<sup>[8]</sup>; 另一方面, 松萎蔫病的发生也会影响外生菌根的形成和发育<sup>[9]</sup>。除了 ECMF, 其他的根相关真菌 (root-associated fungi, RAF), 如深色有隔内生真菌 (dark septate endophytes, DSE)、病原菌和腐生菌, 也可能与松萎蔫病相互作用。

为揭示松萎蔫病与松树根部真菌群落的相互作用, 为进一步研究根部真菌对松萎蔫病抗性的影响提供试验材料和理论依据, 本试验研究了陕西省商洛市柞水县松萎蔫病发生区和未发生区油松的根尖活性、根部 ECMF 和 DSE 的侵染率, 并通过对油松根部可培养真菌的分离和鉴定, 分析其群落结构和多样性。

## 1 材料和方法

### 1.1 样地概况与根样采集

陕西省商洛市柞水县 (108°50' ~ 109°36' E, 33° N) 于 2009 年发现松萎蔫病疫情<sup>[3]</sup>。该地介于亚热带和暖温带的过渡地带, 平均海拔 820 m, 森林覆盖率 78%, 年均气温 12.4 °C, 年均降雨量 742 mm, 无霜期 209 d。

本试验以柞水县城周边松萎蔫病发生区 (松萎蔫病致死率为 30.5%) 和未发生区的两个立地条件相似的油松 (*Pinus tabulaeformis*) 林作为研究样地。两个样地的土壤类型为沙质土, 除了油松, 均间杂个别的华山松 (*P. armandii*)、栎属植物和其他灌木。每个样地各选择坡向相同的 3 个斜坡, 在每个斜坡的上、中、下分别选取 3 棵 20 ~ 30 年生的油松, 去除表面杂物后, 沿东西南北 4 个方向采集 20 ~ 30 cm 处的油松根作为样品, 标记后装入冰盒带回实验室, 并于 4 °C 冰箱保存备用。用自来水洗净后, 每个根样分成 3 份, 分别用于根尖活性观测、真菌侵染率检测和真菌分离。

### 1.2 根尖活性观测

从每个样品中随机选取 100 个根尖, 在体视显微镜下 (20 ~ 40 倍) 观察并记录活性根尖和菌根根尖数, 计算活性根尖比和菌根根尖比<sup>[8]</sup>。

活性根尖比 = 活性根尖数 / 100

菌根根尖比 = 菌根根尖数 / 活性根尖数

### 1.3 真菌侵染率检测

从每个样品中随机选取 30 个 0.5 ~ 1.0 cm 长的根段, 采用 Phillips 等<sup>[10]</sup>的方法进行染色后, 在普通光学显微镜 (10 × 20 倍) 下观察, 并采用放大交叉

法测定 ECMF 和 DSE 的侵染率<sup>[11]</sup>。

#### 1.4 根部真菌分离与鉴定

**1.4.1 真菌分离与纯化** 从每个样品中挑选形态不同的新鲜根尖 30 个,经 0.5% NaClO 表面消毒 3 min、无菌蒸馏水充分漂洗后,斜切成约 0.2 cm 长的小段,将切口斜插于马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)(每升添加 3 mL 乳酸和 0.06 g 链霉素)平板上,于 25 °C 恒温培养箱中倒置培养<sup>[12]</sup>。待菌丝长出后,立即采用尖端菌丝挑取法,把菌丝转移到新的 PDA 平板上进行培养和纯化。纯化后的菌株转接到 PDA 斜面上,于 4 °C 冰箱保存。

**1.4.2 分离菌株形态学鉴定** 纯化菌株接种到直径为 9 cm 的 PDA 平板上 25 °C 培养 14 d 后,观察并记录其菌落特征,并在普通光学显微镜(10×40~10×100 倍)下观测菌丝和孢子的颜色、形态和大小等显微特征,对分离菌株进行初步的形态学分类和鉴定<sup>[13-15]</sup>。

**1.4.3 分离菌株分子学鉴定** 由于大多数分离菌株不产孢,形态结构比较简单,仅依靠传统的形态指标无法进行准确的分类鉴定,本研究选用真菌核糖体内转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)基因序列,对分离菌株进行分子学鉴定。

(1)真菌基因组 DNA 提取与 ITS 序列扩增 分离菌株在表面铺有无菌玻璃纸的 PDA 平板上 25 °C 培养 2 周后,收集新鲜菌丝,并采用真菌 DNA 微量提取试剂盒(美国 Omega 公司,产品编号:D3390-01)提取总基因组 DNA 作为 ITS 序列扩增的模板。ITS 序列扩增引物为 ITS5(5'-GGAAGTAAAAGT-CGTAACAAGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3')<sup>[16]</sup>。PCR 扩增采用 25 μL 体系:引物各 0.5 μL(10 pmol/μL),2×Taq mixture 12.5 μL(Takara),模板 DNA 0.5 μL,ddH<sub>2</sub>O 11 μL。PCR 扩增反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环;72 °C 终止延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测和多功能胶回收试剂盒(百泰克公司,北京)纯化后,由南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

(2)序列分析与系统发育树构建 测序所得 ITS 序列用 BioEdit 进行编辑后,在 NCBI 上进行 Blast 序列比对,并从 GenBank 数据库中下载高同源性序列及其相关信息,用 ClustalX 1.8 进行多序列比对分析,最后用 MEGA 5.05 中的邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树。

#### 1.5 多样性分析

物种丰富度( $S$ )以每个样地出现的不同真菌种类的个数来表示。多样性指数( $H'$ )和分离真菌的相对丰度( $RB$ )分别用下列公式进行计算<sup>[17]</sup>:

$$H' = -\sum_{i=1}^k p_i \times \ln p_i$$

$RB(\%) = (\text{某种分离菌株的数量} / \text{该样地分离菌株的总数量}) \times 100\%$

式中, $k$  是指分离真菌种类的总数, $p_i$  是第  $i$  物种个体占有所有物种个体总数的比例。

#### 1.6 数据分析

数据分析用 SPSS 17.0 软件,用 SigmaPlot 软件绘图。

## 2 结果与分析

#### 2.1 油松活性根尖和菌根根尖比例

根据试验结果(图 1),松萎蔫病未发生区油松根部活性根尖比(0.896 7)和菌根根尖比(0.928 4)均显著高于松萎蔫病发生区(0.840 0 和 0.856 7)( $P < 0.05$ ),表明松萎蔫病的发生影响了油松根尖的活性和菌根的形成。

#### 2.2 油松根部 ECMF 和 DSE 的侵染情况

表 1 显示,无论是松萎蔫病发生区还是未发生区,ECMF 的侵染率都显著高于 DSE,说明 ECMF 是侵染油松根部的主要真菌类群。此外,松萎蔫病未发生区油松根部 ECMF 的侵染率显著高于发生区;而 DSE 的侵染率和微菌核的密度却低于发生区( $P > 0.05$ ,表 1)。这表明松萎蔫病的发生显著影响了油松根部真菌的侵染,即 ECMF 的侵染降低,而

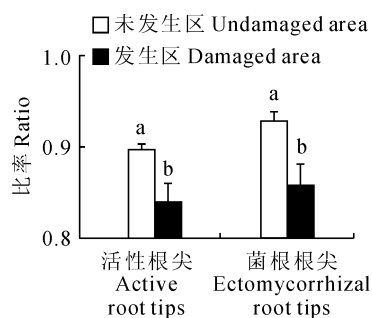


图 1 松萎蔫病发生区和未发生区油松根部的活性根尖比和菌根根尖比  
不同字母表示在 0.05 水平上差异显著  
Fig. 1 Ratios of active and ectomycorrhizal root tips of *P. tabulaeformis* in pine wilt disease damaged and undamaged areas  
Different letters above the bars indicate significant difference at 0.05 level

DSE 的侵染则大幅度提高。

2.3 油松根部真菌分离与鉴定

2.3.1 分离真菌的形态特征 从松萎蔫病未发生区油松根部分离纯化得到 50 个菌株,发生区分离得到 81 个菌株,共 131 个,根据形态特征初步归为 63 种。除 5 种真菌产生分生孢子、厚垣孢子或节孢子外,其余真菌均不产孢,菌落呈黑色、灰色或橄榄青色,菌丝浅棕色或深褐色、分枝。5 种产孢真菌的形态特征描述如下:

X2,生长缓慢(菌落直径 20.26 mm,下同),菌落青黑色,绒毛状,无色素及液体分泌物;分生孢子梗枝状,产孢细胞分化不明显或长瓶型,端生或间生;单细胞分生孢子无色透明,卵形、椭圆形或圆柱形,1~4×2~9 μm(图2,A,B);X8,生长缓慢(21.74 mm),菌落灰色,粉状,致密有褶皱,无色素,有液体

分泌物;产孢梗顶端产生无色的节孢子,亚球形或细长形,有略粗糙的孢子周壁,1~2.5×2~5 μm(图2,C,D);X10,生长较快(41.57 mm),菌落橄榄灰,绒毛状,无色素及液体分泌物;菌丝有隔、光滑、多不分枝;无特化产孢细胞,单生的分生孢子顶生或侧生,椭圆形、圆形或梨形,笔直或稍微弯曲,顶部钝圆,光滑,厚壁褐色,成熟后 1~2 个隔膜,隔膜处缢缩明显,4~13×6~10 μm(图2,E,F);X19,生长快(53.24 mm),菌落中央呈黄色,边缘白色,粉状、棉状,产黄色色素,无液体分泌物;菌丝内含有色素,厚垣孢子无色,球形,连接成串珠状,直径 4~9 μm(图2,G,H);X20,生长快(77.96 mm),菌落白色,菌丝稀疏,绒毛状,产黄色色素,无液体分泌物;厚垣孢子褐色,圆形或椭圆形,连接成串珠状,直径 3~8 μm;节孢子短杆状,1~3×2~9 μm(图2,I,J)。

2.3.2 分离真菌的分子生物学鉴定 由于仅依据简单的形态特征不能准确地进行分类鉴定,本研究对初步归类的 63 种真菌的 ITS 序列(约 513~739 bp)进行了剪切和比对(图3),相似度大于等于 97% 的序列被认为是相同序列<sup>[18]</sup>,合并后共获得了 23 个不同的 ITS 序列(相应菌株编号为 X1~X23)。

进一步将获得的 23 个序列在 GenBank 中进行同源序列比对后,挑选相似度较高的序列进行聚类分析,生成系统进化树(图4)。在系统发育树上,X1~X20 与聚在同一进化枝上相应菌种的 ITS 序列相似度均大于等于 97%,自展支持率也在 92% 以上,从分子生物学角度上认为它们的分类地位相同;X21、X22和X23与聚在一起的相近种属的ITS序

表 1 松萎蔫病发生区和未发生区油松根部 ECMF 和 DSE 的侵染情况

Table 1 Colonization of ECMF and DSE at *P. tabulaeformis* roots in pine wilt disease damaged and undamaged areas

样地 Sample area	ECMF 侵染率 Colonization rate of ECMF/%	DSE	
		侵染率 Colonization rate/%	微菌核密度(个/cm) Density of microsclerotium
未发生区 Undamaged area	66.40±4.26a	13.65±3.93a	1.091 1±0.204 8a
发生区 Damaged area	53.64±3.65b	36.12±3.37b	2.322 2±0.602 6a

注:表内数字表示平均值±标准差,同一列不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。

Note: The figures are the means±standard deviation. Different letters indicate significant differences at 0.05 level.

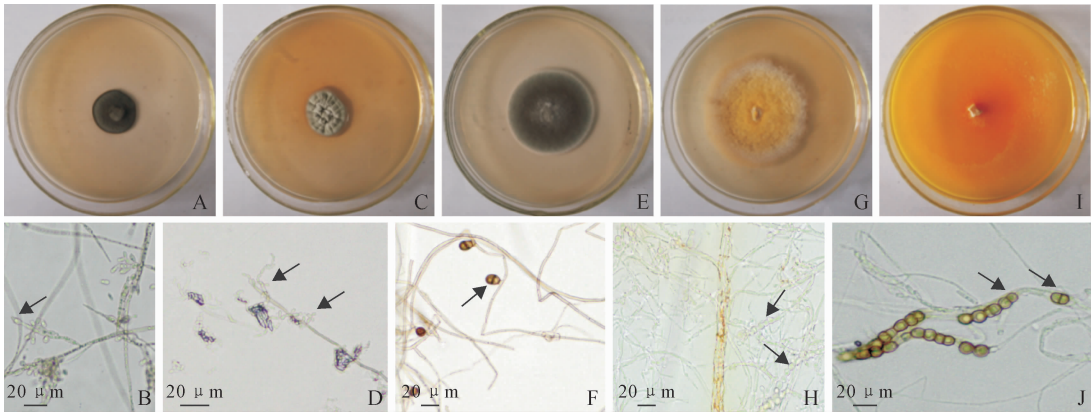


图 2 松萎蔫病发生和未发生区油松根部分离的 5 种产孢真菌的形态特征(PDA 上 25 °C 培养 14 d)

A、B. X2;C、D. X8;E、F. X10;G、H. X19;I、J. X20;箭头示孢子

Fig. 2 Morphological characteristics of five spore formed fungi isolated from *P. tabulaeformis* roots in pine wilt disease damaged and undamaged areas(PDA,14 d at 25 °C)

A、B. X2;C、D. X8;E、F. X10;G、H. X19;I、J. X20;Arrows showing spores

列相似度较低(86%~92%),只能初步确定为子囊菌门真菌,其分类地位有待进一步确定(图4;表2)。因此,结合序列比对和聚类分析,初步归类的63种真菌在分子生物学上最终被鉴定为23种,其中20个分类地位确定菌种的ITS序列已提交至GenBank 核酸数据库,登录号(Accession number)为KF850364~KF850383(图4)。

分离真菌的形态特征与其分类地位相同的菌种基本一致,支持了分子生物学分类的结果,即从油松根部共分离到23种真菌,包括8种DSE<sup>[12,14,19]</sup>,2种ECMF<sup>[20-21]</sup>,5种内生菌<sup>[22-25]</sup>,1种共生菌<sup>[26]</sup>,1种腐生菌<sup>[27]</sup>和2种病原菌<sup>[28]</sup>(表2)。

2.4 油松根部真菌群落结构及多样性

松萎蔫病的发生影响了油松根部真菌的群落结构和多样性。本研究中,两个样区共有真菌5种,占分离菌种总数的21.7%,包含2种DSE、1种EC-

MF、1种内生菌和1种病原菌。腐生菌(*Cadophora luteo-olivacea*)、内生菌(*Myxotrichum stipitatum*)和 *Berkleasmium* sp.,以及 *Ascomycota* sp. (X20)为松萎蔫病未发生区油松根部的特有真菌,而共生菌(*Lophiostoma* cf. *cynaroidis*)以及内生菌

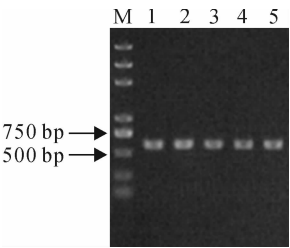


图3 部分菌种的ITS序列扩增结果  
Fig.3 The results of ITS PCR products of some strains  
M. Marker DL2000 plus;1—3. *Phialocephala fortinii*;  
4. *Oidiodendron flavum*;5. *Exophiala salmonis*

表2 松萎蔫病发生区和未发生区油松根部真菌的群落结构及多样性

Table 2 Fungal community composition and diversity at the roots of *P. tabuliiformis* in pine wilt disease damaged and undamaged areas

分离真菌 Isolate	分类地位 Taxonomic status	类型 Type	未发生区 Undamaged area		发生区 Damaged area	
			菌株数 No. of isolates	相对丰度 Relative abundance/%	菌株数 No. of isolates	相对丰度 Relative abundance/%
X1	<i>Phialophora mustea</i>	DSE	1	2.0	—	—
X2	<i>Exophiala salmonis</i>	DSE	1	2.0	—	—
X3	<i>Paraphoma chrysanthemicola</i>	DSE	1	2.0	—	—
X4	<i>Phialocephala fortinii</i>	DSE	24	48.0	55	67.9
X5	<i>Cadophora finlandia</i>	DSE	—	—	1	1.2
X6	<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	腐生菌 Saprophyte	1	2.0	—	—
X7	<i>Cryptosporiopsis ericae</i>	DSE	6	12.0	11	13.6
X8	<i>Oidiodendron maius</i>	DSE	1	2.0	—	—
X9	<i>Oidiodendron flavum</i>	内生菌 Endophyte	3	6.1	2	2.5
X10	<i>Trichocladium opacum</i>	DSE	1	2.0	—	—
X11	<i>Lycoperdon perlatum</i>	ECMF	3	6.0	1	1.2
X12	<i>Ceriporia lacerata</i>	ECMF	1	2.0	—	—
X13	<i>Phoma herbarum</i>	病原菌 Pathogen	2	4.0	1	1.2
X14	<i>Phoma medicaginis</i>	病原菌 Pathogen	—	—	1	1.2
X15	<i>Lophiostoma</i> cf. <i>cynaroidis</i>	共生菌 Mycobiont	—	—	6	7.4
X16	<i>Phaeosphaeria fuckelii</i>	内生菌 Endophyte	—	—	1	1.2
X17	<i>Myxotrichum stipitatum</i>	内生菌 Endophyte	1	2.0	—	—
X18	<i>Berkleasmium</i> sp.	内生菌 Endophyte	1	2.0	—	—
X19	<i>Helotiales</i> sp. REF050	内生菌 Endophyte	—	—	1	1.2
X20	<i>Ascomycota</i> sp. GPO_LL_03_D10		1	2.0	—	—
X21	<i>Ascomycota</i>		1	2.0	—	—
X22	<i>Ascomycota</i>		1	2.0	—	—
X23	<i>Ascomycota</i>		—	—	1	1.2
总计 Total			50	100	81	100

注:—表示0。  
Note:— means zero.

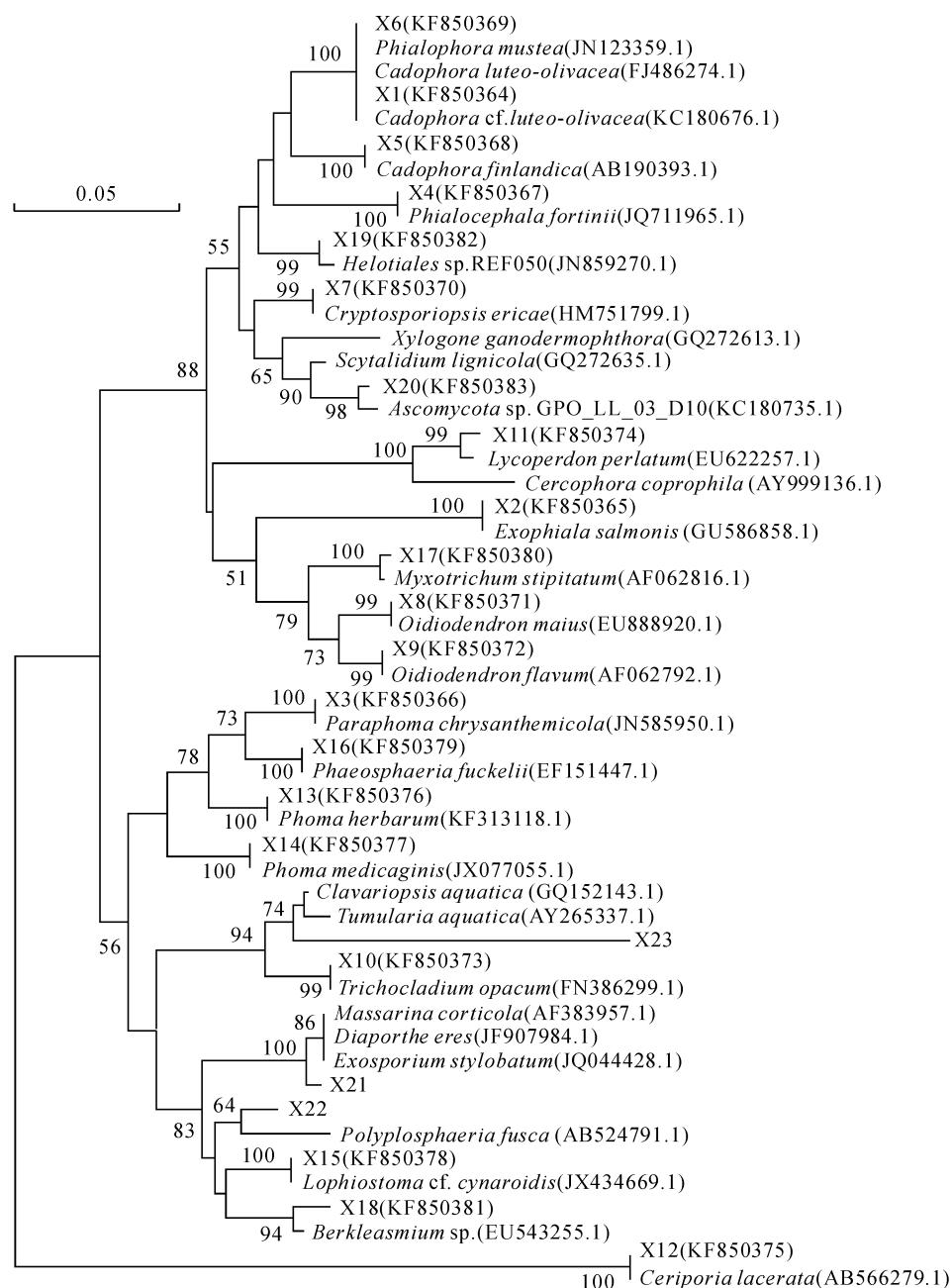


图4 松萎蔫病发生区和非发生区油松根部分离真菌的系统发育树

分支上的数字表示 Bootstrap 验证中基于 1 000 次重复该节点的可信度(仅显示 50% 以上的数据);标尺表示演化距离

Fig. 4 Phylogenetic tree of the fungi isolated from the roots of *P. tabuli formis*

in pine wilt disease damaged and undamaged areas

The numbers on the branches represent the reliability percent of bootstrap values based on 1 000 replications

(only showing values above 50%);Scaleplate represents the evolution distance of these fungi

(*Phaeosphaeria fuckelii*) 和 *Helotiales* sp. 仅分离自松萎蔫病发生区(表 2)。从松萎蔫病未发生区仅分离到 1 种病原菌(*Phoma herbarum*),而从发生区分离到 2 种(*P. herbarum* 和 *P. medicaginis*),这可能是由于松萎蔫病的发生导致油松抵抗力下降,故而有利于病原菌的入侵。从松萎蔫病未发生区的油松根部分离到 17 种真菌( $S=17$ ),包含 7 种 DSE

(占该区分离菌种总数的 41.2%,下同)、2 种 ECMF (11.7%)、3 种内生菌(17.6%)、1 种腐生菌和 1 种病原菌(各占 5.9%),以及 3 种未知子囊菌门真菌,多样性指数( $H'$ )为 2.012 0。松萎蔫病发生区仅分离到 11 种真菌( $S=11$ ),包含 3 种 DSE(27.3%)、1 种 ECMF(9.1%)、3 种内生菌(27.3%)、2 种病原菌(18.2%)、1 种共生菌和 1 种未知子囊菌门真菌



(各占 9%),  $H'$  为 1.1979(表 2)。由此可见,松萎蔫病未发生区油松根部真菌群落的丰富度和多样性都略高于松萎蔫病发生区;DSE 和内生菌在两个样区分离菌种总数中所占比例最大,明显高于 ECMF 和其他真菌,为分离真菌中的优势类群。

从松萎蔫病未发生区油松根部分离到 7 种 DSE,相对丰度之和为 70%,而仅分离到 2 种 ECMF(*Lycoperdon perlatum* 和 *Ceriporia lacerata*),相对丰度之和为 8%(表 2)。虽然从松萎蔫病发生区分离到的 DSE 仅有 3 种,但其相对丰度之和高达 82.7%,而分离到的 1 种 ECMF(*L. perlatum*)的相对丰度仅为 1.6%(表 2)。这些结果表明,在两个样区油松根部分离的真菌群落中,DSE 占绝对优势,其相对丰度远远高于 ECMF 和其他真菌种类;松萎蔫病未发生区 ECMF 的相对丰度略高于松萎蔫病发生区,而 DSE 的相对丰度却明显较低。本研究分离到的 23 种真菌中,相对丰度最高的是 *Phialocephala fortinii*,其在松萎蔫病未发生区和发生区的相对丰度分别为 48%和 67.9%,其次为 *Cryptosporiopsis ericae*(12%和 13.6%)(表 2)。根据优势种的划分原则<sup>[17]</sup>,这 2 种 DSE 为油松根部分离真菌中的优势种。

### 3 结论和讨论

本研究结果显示松萎蔫病未发生区油松的活性根尖比、菌根根尖比和 ECMF 的侵染率均显著高于松萎蔫病发生区。一方面表明松萎蔫病危害程度与菌根的形成率呈负相关,这与 Akema 等<sup>[29]</sup>的报道相一致;另一方面也表明松萎蔫病的发生影响了油松根部的活性、ECMF 的侵染和菌根的形成。Ichihara 等<sup>[9]</sup>的研究也显示松萎蔫病的发生影响菌根的形成和发育。但是,Ugawa 等<sup>[8]</sup>却发现松萎蔫病危害程度轻重不同的松林中松树根部的菌根根尖比和菌根形成率并没有明显差异。这种研究结果的差异可能是由于菌根的形成还受到宿主和其他环境因子(如土壤条件)的影响而造成的。因此,下一步还需要更多的调查研究去揭示松萎蔫病和菌根的相互关系。

Ugawa 等<sup>[8]</sup>调查发现,松萎蔫病危害较重的松林中土生空团菌(*Cenococcum geophilum*)的相对丰度较高,而 ECMF 子实体的数量远低于危害较轻的松林,故推断 ECMF 的群落结构可能与松树对松萎蔫病的抗性有关。本研究通过油松根部真菌的分离

和鉴定,分析了松萎蔫病发生区和未发生区油松根部真菌群落结构和多样性的差异。结果显示,两个样区油松根部真菌的群落组成存在差异,并且松萎蔫病未发生区的物种丰富度和多样性,以及 ECMF 的相对丰度均高于松萎蔫病发生区,而 DSE 的相对丰度却明显低于松萎蔫病发生区。这从一定程度上说明,油松根部真菌的群落结构和多样性,以及 ECMF 和 DSE 的相对丰度可能与松树对松萎蔫病的抗性和松萎蔫病的发生有关。本研究中分离的菌种可为下一步系统地分析根部真菌对油松松萎蔫病抗性的影响提供试验材料。

尽管 DSE 广泛分布于各种生境中,尤其是一些逆境环境和受干扰严重的地区,但其生态学功能尚不十分清楚。越来越多的研究表明,DSE 具有类似菌根真菌的生态学功能,能提高宿主植物的抗病性<sup>[30]</sup>。除了 ECMF, DSE 也广泛存在于松树根部<sup>[31]</sup>,但 DSE 与松萎蔫病的关系至今未见研究报道。本研究中,无论是松萎蔫病未发生区,还是发生区,DSE 的种类数量和相对丰度在油松根部分离真菌中都占绝对优势,尤其是 *P. fortinii* 和 *C. ericae*。值得注意的是,*P. fortinii* 在松萎蔫病发生区的相对丰度显著高于未发生区。据报道,该菌能提高白菜的抗病性,抑制白菜黄萎病<sup>[30]</sup>,并能提高杜鹃花的生物量及其他一些生理指标<sup>[32]</sup>。但该菌在松萎蔫病发生过程中所起的作用,以及其对油松生长和松萎蔫病抗性的影响还有待进一步研究。同时,松萎蔫病发生区油松根部 DSE 的侵染率和相对丰度显著高于未发生区,微菌核的密度也高于未发生区,说明松萎蔫病的发生影响了油松根部 DSE 的侵染。本文首次发现和初步揭示了 DSE 与松萎蔫病的相互关系,但 DSE 的侵染程度和微菌核的存在是否与油松对松萎蔫病的抗性有关,尚有待进一步研究。

油松是专性外生菌根树种,无论是松萎蔫病发生区还是未发生区,ECMF 的侵染率都显著高于 DSE,说明 ECMF 是侵染油松根部的主要真菌类群。但本研究从油松根部仅仅分离到 2 种 ECMF,其余分离菌株大都属于 DSE 或其他内生菌。这可能是由于大部分 ECMF 为专性共生真菌,不能纯培养,或者不能在营养简单的 PDA 培养基上生长。获得 ECMF 的纯培养菌株是系统研究其对松萎蔫病影响的前提,因此,ECMF 的分离和培养仍需要更多的探索。

## 参考文献:

- [1] ZHAO B G, FUTAI K, SUTHERLAND J R, *et al.* Pine wilt disease[M]. Japan: Springer, 2008.
- [2] 国家林业局. 国家林业局 2012 年第 2 号公告. 2012.
- [3] SHI J, CHEN F, LUO Y Q, *et al.* First isolation of pine wood nematode from *Pinus tabulaeformis* forests in China[J]. *Forest Pathology*, 2013, **43**(1): 59–66.
- [4] WU S L(吴斯亮), MA L(马玲), LÜ Q(吕全), *et al.* Identification of nematode isolated from *Pinus armandii* and its pathogenicity on *P. massoniana* in Tianzhu Mountain in Shaanxi Province[J]. *Forest Pest and Disease*(中国森林病虫), 2013, **32**(3): 5–9(in Chinese).
- [5] LIAN J, WANG Z F, ZHOU S N. Response of endophytic bacterial communities in banana tissue culture plantlets to *Fusarium* wilt pathogen infection[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2008, **54**(2): 83–92.
- [6] SCATTOLIN L, DAL MASO E, MUTTO ACCORDI S, *et al.* Detecting asymptomatic ink-diseased chestnut trees by the composition of the ectomycorrhizal community[J]. *Forest Pathology*, 2012, **42**(6): 501–509.
- [7] WU X Q(吴小芹), SUN M Q(孙民琴), GAO Y(高悦), *et al.* Effects of some ectomycorrhizas on pine seedlings to disease resistance[J]. *Scientia Silvae Sinicae*(林业科学), 2007, **43**(6): 88–93(in Chinese).
- [8] UGAWA S, ICHIHARA Y, FUKUDA K, *et al.* Ectomycorrhizae and ectomycorrhizal fungal fruit bodies in pine stands differentially damaged by pine wilt disease[J]. *Mycoscience*, 2009, **50**(1): 63–69.
- [9] ICHIHARA Y, FUKUDA K, SUZUKI K. Suppression of ectomycorrhizal development in young *Pinus thunbergii* trees inoculated with *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. *Forest Pathology*, 2001, **31**(3): 141–147.
- [10] PHILLIPS J M, HAYMEN D S. Improved procedures for clearing and attaining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection[J]. *Transactions of British Mycological Society*, 1970, **55**: 158–161.
- [11] MCGONIGLE T P, MILLER M H, EVANS D G, *et al.* A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *New Phytologist*, 1990, **115**(3): 495–501.
- [12] BAN Y H, TANG M, CHEN H, *et al.* The response of dark septate endophytes(DSE) to heavy metals in pure culture[J]. *Plos One*, 2012, **7**(10): e47968.
- [13] KIRK P M, CANNON P F, DAVID J C, *et al.* Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi(9th edition)[M]. Wallingford(Oxon, UK): CABI Publishing, 2001.
- [14] ADDY H D, PIERCEY M M, CURRAH R S. Microfungal endophytes in roots[J]. *Canadian Journal of Botany*, 2005, **83**(1): 1–13.
- [15] 张燕. 云南几种特殊生境中深色有隔内生真菌(DSE)研究[D]. 昆明: 云南大学, 2012.
- [16] WHITE T J, BRUNS T D, LEE S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal genes for phylogenetics. In: PCR protocols: A guide to methods and applications[M]. Academic Press, San Diego, 1990, 315–322.
- [17] LIU ZH(刘准), TAO G(陶刚), LIU Z Y(刘作易), *et al.* Diversity analysis of endophytic fungi associated with *Bletilla ochracea* (Orchidaceae)[J]. *Mycosystema*(菌物学报), 2013, **32**(5): 812–818(in Chinese).
- [18] WAALWIJK C, BAAYEN R P, KONING J D, *et al.* Ribosomal DNA analyses challenge the status of *Fusarium* sections *Liseola* and *El-eigans*[J]. *Sydowia*, 1996, **48**(1): 90–104.
- [19] PETERSON R L, WAGG C, PAUTLER M. Associations between microfungal endophytes and roots; do structural features indicate function?[J]. *Botany*, 2008, **86**: 445–456.
- [20] 卢丽君. 大青山外生菌根真菌培养特性及油松菌根合成研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2005.
- [21] YUE A L(岳爱玲), ZHANG Y(张悦), YAO Q(姚琼), *et al.* Isolation, purification and phylogenetic analysis of *Ceriporia lacerate* [J]. *Biotechnology*(生物技术), 2010, **20**(5): 47–50.
- [22] CÂMARA M P S, PALM M E, VAN BERKUM P, *et al.* Molecular phylogeny of *Leptosphaeria* and *Phaeosphaeria*[J]. *Mycologia*, 2002, **94**(4): 630–640.
- [23] ABDULLAH S K, AL-SAADON A H, AL-SALIH M H. Fungi from the tidal zone of Khawr Al-Zubair canal, Southern Iraq[J]. *Marsh Bull.*, 2007, **2**(1): 18–31.
- [24] ZHAO J L, LI Y, SHAN T J, *et al.* Enhancement of diepoxin  $\zeta$  production with in situ resin adsorption in mycelial liquid culture of the endophytic fungus *Berkleasmium* sp. Dzf12 from *Dioscorea zingiberensis*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, **27**(12): 2 753–2 758.
- [25] YUAN L H(袁丽红), LU Y T(陆玉婷), XU L(许琳), *et al.* Isolation and characteristics of an endophytic fungus from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright co-cultivated with host calli[J]. *Sciencepaper Online*(中国科技论文在线), 2007(in Chinese).
- [26] WU Q, LI Y, LI Y, *et al.* Identification of a novel fungus, *Leptosphaerulina chartarum* SJTU59 and characterization of its xylanolytic enzymes[J]. *Plos One*, 2013, **8**(9): e73729.
- [27] HIROSE D, TANABE Y, UCHIDA M, *et al.* Microfungi associated with withering willow wood in ground contact near Syowa Station, East Antarctica for 40 years[J]. *Polar Biology*, 2013, **36**(6): 919–924.
- [28] NEUMANN BREBAUM S, BOLAND G J. First report of *Phoma herbarum* and *Phoma exigua* as pathogens of dandelion in southern Ontario[J]. *Plant Disease*, 1999, **83**(2): 200.
- [29] AKEMA T, FUTAI K. Ectomycorrhizal development in a *Pinus thunbergii* stand in relation to location on a slope and effect on tree mortality from pine wilt disease[J]. *Journal of Forest Research*, 2005, **10**(2): 93–99.
- [30] NARISAWA K, USUKI F, HASHIBA T. Control of verticillium yellows in Chinese cabbage by the dark septate endophytic fungus LtVB3[J]. *Phytopathology*, 2004, **94**(5): 412–418.
- [31] WAGG C, PAUTLER M, MASSICOTTE H B, *et al.* The co-occurrence of ectomycorrhizal, arbuscular mycorrhizal, and dark septate fungi in seedlings of four members of the Pinaceae[J]. *Mycorrhiza*, 2008, **18**(2): 103–110.
- [32] VOHNÍK M, ALBRECHTOVÁ J, VOSÁTKA M. The inoculation with *Oidiodendron maius* and *Phialocephala fortinii* alters phosphorus and nitrogen uptake, foliar C : N ratio and root biomass distribution in *Rhododendron* cv. Azurro[J]. *Symbiosis*, 2005, **40**(2): 87–96.