

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2022.006.006

玫瑰红菇和灰肉红菇对根际土壤微生物群落结构的影响

禹 飞^{1*}, 梁俊峰²

(1. 山西农业大学林学院, 山西 晋中 030801; 2. 中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520)

摘要: [目的] 通过分析玫瑰红菇和灰肉红菇根际土壤微生物群落, 筛选促进 2 种红菇生长的土壤微生物, 为 2 种红菇的保育促繁以及人工栽培的实现提供理论依据。[方法] 以同一生态条件下 2 种野生食药外用生菌根真菌(玫瑰红菇和灰肉红菇)的根际与非根际土壤作为研究对象, 采用高通量 Illumina MiSeq 测序技术分析 2 种红菇根际与非根际土壤微生物(真菌、细菌)的群落结构, 并结合土壤理化性质进行综合分析。[结果] 2 种红菇根际土壤微生物略有差异, 玫瑰红菇的根际土壤微生物优势菌群为热酸菌属、分枝杆菌属、*Reyranella* 属、纤线杆菌属、罗思河小杆菌属和 *Oidiodendron* 属; 灰肉红菇的根际土壤微生物优势菌群为变异杆菌属、*Bryobacter* 属, 芽生绿菌属、拟青霉属和节菱孢属; 细菌(变异杆菌属、*Candidatus_Solibacter* 属、堆囊菌属、分枝杆菌属、*Singulisphaera* 属、*Isosphaera* 属、蛭弧菌属、类芽孢杆菌属)和真菌(木霉属、青霉属和 *Hypomyces* 属)为 2 种红菇共有的菌根辅助菌。pH 是影响根际土壤微生物群落结构的关键因素。[结论] 2 种红菇会根据生长需要特异性地选择对自己生长有益的土壤微生物, 形成不同的微生物群落。本研究筛选出的红菇根际菌根辅助菌可为制备红菇微生物专用菌肥以及为红菇的人工促繁提供理论依据, 这对红菇的可持续利用, 扩大林下食用菌规模, 提高经济效益具有重要意义。

关键词: 玫瑰红菇; 灰肉红菇; 根际土壤微生物; 群落结构

中图分类号: S714

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2022)06-0052-12

外生菌根真菌与宿主植物共生过程中, 外生菌根真菌可以为宿主植物提供水分以及氮、磷等必要的矿质元素, 来促进宿主植物的生长和提高其抵抗不良环境的能力^[1]; 而宿主植物以脂质或糖的形式为外生菌根真菌提供碳水化合物供菌丝的生长^[2]。在森林生态系统中, 宿主植物-外生菌根真菌-根际土壤微生物之间存在相互依存、协同进化的关系, 根际土壤微生物不仅能够提高外生菌根真菌的接种率^[3], 还能促进外生菌根真菌与宿主植物发生共生关系^[4], 这类根际土壤微生物称之为菌根辅助菌。大量研究表明, 菌根辅助菌不仅能通过降解植物细

胞壁等促进外生菌根真菌定殖, 提高外生菌根真菌菌丝的存活率, 还能通过降解细胞壁获得碳源供外生菌根真菌生长, 诱导外生菌根真菌孢子萌发, 抑制病原菌的产生^[5]。菌根辅助菌还能分泌生长因子、次级代谢物等供外生菌根真菌生长, 因此, 筛选外生菌根真菌生长所需的菌根辅助菌对于提高外生菌根菌的产量十分重要^[6]。

灰肉红菇 (*Russula griseocarnosa* X.H. Wang, Zhu L. Yang & Knudsen 2009) 又名“正红菇”、“真红菇”、“大红菌”等, 味道鲜美, 干品价格为 800~1 000 元·kg⁻¹, 常见于广东、广西、云

收稿日期: 2022-03-16 修回日期: 2022-05-17

基金项目: 国家自然科学基金 (32101499); 山西省优秀博士资助项目 (SXBYKY2021035); 山西农业大学科技创新基金项目 (2020BQ85)

作者简介: 禹飞, 博士, 讲师。主要研究方向: 真菌的多组学研究及应用。电话: 17535435365。Email: yufei_1007@163.com

南、福建、贵州等地^[7];玫瑰红菇(*Russula rosea* Persoon 1796)别称苦红菇、红辣子等,其菌肉硬,子实体中存在苦红菇酸A和苦红菇酸B四环三萜化合物,稍带苦辣味^[8],很容易与灰肉红菇混淆,价格为200~500元·kg⁻¹,分布地方比较广,在全国各地均有分布。灰肉红菇和玫瑰红菇作为红菇属中常见的野生食药外生菌根菌,富含氨基酸、脂肪酸和矿质元素等营养物质,不仅具有高蛋白、低脂肪、粗纤维等功能,还具有抗氧化、抗肿瘤、抗癌等功效,是非常重要的林下非木质林产品资源^[9-10]。李国杰等^[11]报道了我国82种可食用红菇和22种可药用红菇,其中,灰肉红菇和玫瑰红菇均具有重要的食药价值。灰肉红菇与玫瑰红菇不仅在味道上有显著差异,而且亲缘关系较远^[12-13],目前均不能进行人工栽培。在野外考察中,发现灰肉红菇和玫瑰红菇共存于同一片区域。

本研究以同一生态条件下2种外生菌根真菌玫瑰红菇和灰肉红菇的根际和非根际土壤微生物(细菌、真菌)作为研究对象,采用Illumina MiSeq二代双端测序的方法进行测序分析,通过比较2种红菇根际与非根际土壤微生物的群落结构差异,筛选相应的菌根辅助菌,结合土壤理化性质和2种红菇的生境,为2种红菇的保育促繁、开发利用提供理论依据。

1 采集地概况

在广东省梅州市丰顺县(116°16'58" E, 24°5'25" N)采集到灰肉红菇和玫瑰红菇2种野生食药外生菌根菌,采集林分主要树种为藜蒗(*Castanopsis fissa* (Champ. ex Benth.) Rehd. et Wils.),2种红菇混杂于林内,该地区海拔147 m,属于亚热带季风气候,年均气温为21.4℃,年降水量为1776.1 mm。

2 研究方法

2.1 样品采集

在野外藜蒗林发现野生的灰肉红菇和玫瑰红菇,用抖落法收集粘附在红菇上的深度0~10 cm土壤作为根际土壤;在没长红菇、且与红菇横向距离相隔1 m地方,取深度0~10 cm的土壤作为非根际土壤。由于灰肉红菇和玫瑰红菇生长相距较近,非根际土壤采集可以共同使用。将上述采集的根际与非根际土壤分别分为2份,一份装入无菌自

封袋,液氮运回实验室,在-70℃冰箱保存用于分子水平高通量测序研究;另一份带回实验室自然风干,风干后的土壤过2 mm筛,用于理化性质测定。采集地的土壤为红壤。样品标记中,RR为玫瑰红菇根际土壤;RG为灰肉红菇根际土壤;BK为非根际土壤。

2.2 土壤理化性质测定

土壤pH使用土水比(w/v)为1:2.5的pH510酸度计测定^[14];土壤有机碳使用重铬酸钾加热法测定^[15];土壤有效氮利用碱解扩散法测定^[16];土壤有效磷采取碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法测定^[17];土壤有效钾使用火焰分光光度法测定^[18]。

2.3 土壤微生物多样性分析

2.3.1 土壤DNA提取、PCR扩增和测序 称取0.30 g土壤,按照上海生工提供的Ezup柱土壤DNA抽提试剂盒说明提取土壤DNA样品,利用NanoDrop 2000分光光度计检测DNA浓度和纯度,确保DNA纯度OD_{260/280}处于1.8~2.0间,DNA浓度>50 mg·L⁻¹。

检测合格的DNA样品分别使用真菌ITS和细菌16S引物序列进行扩增。真菌ITS引物片段约为300 bp,引物序列为:ITS1F(5'-CTTGGTCA TTTAGAGGAAGTAA-3')和ITS2R(5'-GCTG CGTTCTTCATCGATGC-3')^[19]。细菌16S的引物序列为338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')^[20],片段长度约为468 bp。20 μL PCR扩增反应体系均为:5×PCR扩增缓冲液4 μL,2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs 2 μL,2.0 g·L⁻¹牛血清白蛋白溶液(BSA)0.2 μL,5 μmol·L⁻¹正反向引物各0.8 μL,Taq DNA聚合酶0.4 μL,50 mg·L⁻¹ DNA模板2 μL,ddH₂O 9.8 μL。PCR反应扩增程序均为:95℃预变性3 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸45 s,共35个循环;72℃延伸10 min;4℃保存。PCR扩增产物使用2%(质量体积比)琼脂糖凝胶电泳进行检测,检测合格的样品送至上海美吉生物公司进行Illumina MiSeq PE300双端测序。

2.3.2 测序分析 通过MiSeq PE300双端测序获得原始下机数据,对原始下机数据进行过滤及质量评估:选取平均质量值>20、长度>100 bp的序列;根据首尾两端的barcode和引物序列调整序列方向,去除首尾两端的barcode和引物序列;

利用 FLASH v1.2.11 软件将成对 reads 拼接成一条序列，拼接后的序列最大错配比率<0.2 的作为有效序列，进行后续分析。

使用 Uparse v7.0.1 软件对所有样品的有效序列基于 97% 的相似性进行 OTUs 聚类，在聚类过程中去除嵌合体，得到 OTUs 代表序列，将这些代表序列使用 RDP classifier 贝叶斯算法与数据库进行比对得到物种的注释信息。真菌的比对数据库为 Unite (Release 8.0) [21]；细菌的比对数据库为 Silva (Release138) [22]。结合比对物种组成信息可以得到不同样品在各个分类水平的物种丰度表。土壤真菌多样性研究，除去红菇属序列，避免对实验结果造成影响[23]。土壤真菌和细菌在数据分析前期，均使用最小样品的序列数进行抽平[24]。抽平后的 OTUs 丰度信息使用 Qiime v1.9.0 计算样品的物种数、Chao 指数、Shannon 指数等 α 多样性指数。Chao 指数反映物种群落丰富度，Shannon 指数反映物种群落多样性。

土壤细菌的功能预测先通过 PICRUST 对 OTU 丰度表进行标准化分析，根据 OTU 对应的 greengene id，与 KEGG 数据库进行比对，可获得各个样本在不同代谢通路的注释结果 [23]。

2.4 统计学水平分析

使用 Excel 2016 进行数据前处理，并进行正态分析，符合正态分布且方差齐性的数据使用

SPSS 21.0 进行单因素邓肯 Duncan 方差分析，数据的描述采取平均值 $\pm$ 标准误差，在统计学水平 $p<0.05$ 下，同列不同字母表示存在显著差异，字母相同表示差异不显著。两组样本在属水平上的数据符合正态分布且方差不等的情况下，选择 Welch's t 检验进行比较分析[25]，并使用 STAMP 软件进行绘制。

分别对土壤细菌、真菌的 OTU 数据进行去趋势对应排序分析 (DCA) [26]，DCA 分析结果显示第一轴的长度均<3，因此使用 R v 4.1.0 语言 vegan 包进行冗余分析 (RDA)，探讨样本、菌群与土壤理化性质之间的关系。

在属水平上，物种的丰度注释信息以及土壤微生物与土壤理化性质的 Spearman 相关性分析均使用 R v 4.1.0 语言中 Pheatmap 包绘制。利用 R 语言绘制稀释性曲线图和在门水平上的物种相对丰度柱状图。

3 结果分析

3.1 2 种红菇根际与非根际土壤理化性质

2 种红菇根际与非根际土壤理化性质表明：灰肉红菇和玫瑰红菇根际土壤的有机碳 ($p=0.047$) 和有效钾 ($p=0.046$) 显著高于非根际土壤，在土壤 pH、有效氮和有效磷中差异不显著 (表 1)。

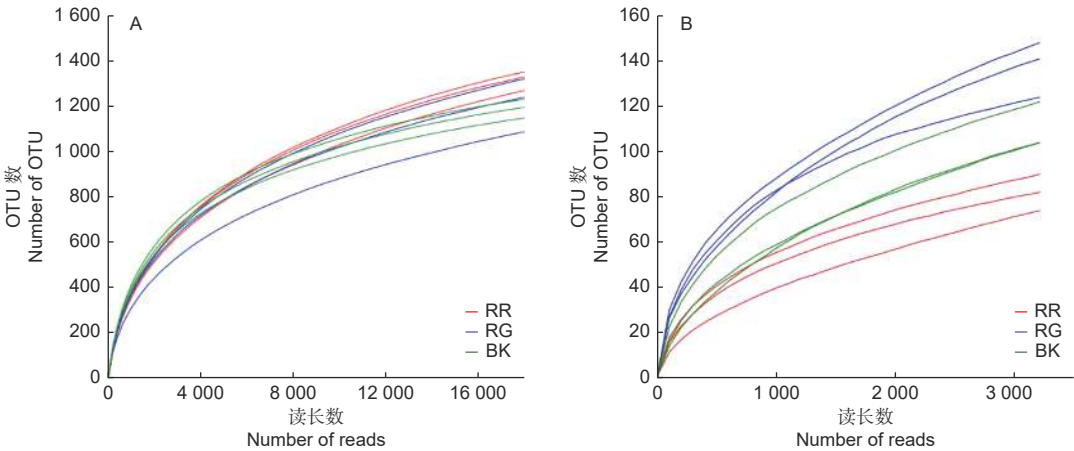
表 1 2 种红菇根际与非根际土壤理化性质					
Table 1 Physicochemical properties of mycosphere and bulk soil of two species of <i>Russula</i>					
样品 Sample	pH	有机碳 SOC/ (g·kg ⁻¹)	有效氮 AN/ (mg·kg ⁻¹)	有效磷 AP/ (mg·kg ⁻¹)	有效钾 AK/ (mg·kg ⁻¹)
RR	4.22 $\pm$ 0.11 a	38.80 $\pm$ 3.69 a	327.98 $\pm$ 30.38 a	10.40 $\pm$ 3.38 a	241.52 $\pm$ 42.44 a
RG	4.25 $\pm$ 0.06 a	35.39 $\pm$ 6.07 a	281.06 $\pm$ 52.77 a	6.97 $\pm$ 1.15 a	307.30 $\pm$ 32.35 a
BK	4.46 $\pm$ 0.08 a	12.88 $\pm$ 7.81 b	132.48 $\pm$ 86.95 a	2.44 $\pm$ 2.03 a	112.14 $\pm$ 51.54 b
注：平均值 $\pm$ 标准误差。RR为玫瑰红菇根际土壤；RG为灰肉红菇根际土壤；BK为非根际土壤。下同。 Notes: Means $\pm$ standard error. RR stands for the mycosphere soil of <i>Russula rosea</i> , RG stands for the mycosphere soil of <i>Russula griseocarnosa</i> , BK stands for bulk soil. The same below.					

3.2 2 种红菇对根际微生物多样性的影响

通过对 2 种红菇根际与非根际土壤细菌、真菌的高通量测序分析，数据经过过滤、质控后，玫瑰红菇根际、灰肉红菇根际和非根际土壤细菌分别获得 39 685、40 681、33 688 条有效数据；玫瑰红菇根际、灰肉红菇根际和非根际土壤真菌分别获得 46 151、52 073、65 339 条有效数据。2 种红菇根际与非根际土壤的细菌、真菌实际测量出的

OTU 数目的稀释性曲线均趋于平坦 (图 1)，说明测序的结果合理可靠，更多的测序数据量发现新的 OTU 贡献率较低。在本研究中，土壤细菌共获得 2 914 个 OTU，土壤真菌共获得 536 个 OTU。

2 种红菇根际土壤细菌 Chao 指数显著高于非根际土壤 ($p=0.03$)，Shannon 指数低于非根际土壤，2 种红菇的根际土壤细菌多样性差异不显著 (表 2)。在土壤真菌多样性中发现，灰肉红菇的



注: RR 为玫瑰红菇根际土壤; RG 为灰肉红菇根际土壤; BK 为非根际土壤。A: 细菌; B: 真菌。

Notes: RR stands for the mycosphere soil of *Russula rosea*, RG stands for the mycosphere soil of *Russula griseocarnosa*, BK stands for bulk soil.A: Bacterial; B: Fungal.

图 1 2 种红菇根际与非根际土壤微生物的稀释性曲线

Fig. 1 Rarefaction curve of mycosphere and bulk soil in two species of *Russula*

根际土壤真菌 Chao 指数 ($p=0.034$) 和 Shannon 指数 ($p=0.01$) 显著高于玫瑰红菇根际土壤

表 2 2 种红菇根际与非根际土壤微生物多样性指数的比较分析

Table 2 Diversity index of mycosphere and bulk soil microorganism of two species of *Russula*

样品 Sample	细菌 Bacterial		真菌 Fungal	
	Chao指数 Chao index	Shannon指数 Shannon index	Chao指数 Chao index	Shannon指数 Shannon index
RR	1 724.65±11.97 a	5.76±0.04 ab	140.75±10.45 b	1.58±0.22 b
RG	1 650.96±47.92 a	5.63±0.14 b	215.57±23.31 a	2.95±0.17 a
BK	1 457.40±27.87 b	5.96±0.05 a	169.08±5.73 ab	1.80±0.27 b

3.3 2 种红菇对根际微生物群落结构的影响

2 种红菇的根际和非根际土壤共注释到 24 个细菌门, 5 个真菌门, 其中, 变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 和放线菌门 (Actinobacteria) 为主要的细菌门 (图 2A); 子囊菌门 (Ascomycota)、担子菌门 (Basidiomycota) 和接合菌门 (Zygomycota) 为主要的真菌门 (图 2B)。灰肉红菇和玫瑰红菇的根际土壤细菌中变形菌门 ($p=0.017$)、酸杆菌门 ($p<0.01$) 和土壤真菌中担子菌门 ($p=0.002$) 均显著高于非根际土壤 (图 2)。

在细菌属共计注释到 445 个属, 变异杆菌属 (*Variibacter*)、热酸菌属 (*Acidothermus*)、慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、*Candidatus_Solibacter* 属和 *Burkholderia-Paraburkholderia* 属

等 13 个属的相对丰度大于 0.1%, 为主要的细菌属。在前 50 个属中, 玫瑰红菇和灰肉红菇根际土壤细菌的变异杆菌属 (*Variibacter*) ($p<0.01$)、*Candidatus_Solibacter* 属 ($p=0.033$)、堆囊菌属 (*Sorangium*) ($p=0.029$)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) ($p<0.01$)、*Singulisphaera* 属 ($p=0.023$)、*Isosphaera* 属 ($p=0.001$)、蛭弧菌属 (*Bdellovibrio*) ($p=0.034$) 和类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*) ($p=0.005$) 显著高于非根际土壤, 这些可能是红菇属生长的主要菌根辅助细菌; 丛生放线菌属 (*Actinospica*) ($p=0.016$)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) ($p=0.023$)、*Chthonomonas* 属 ($p=0.001$) 和 *Vicinamibacter* 属 ($p<0.01$) 等显著低于非根际土壤 (图 3A)。在土壤细菌的群落结构发现, 灰肉红菇和玫瑰红菇处于同一支, 说明二者之间的菌群结构相似。进一

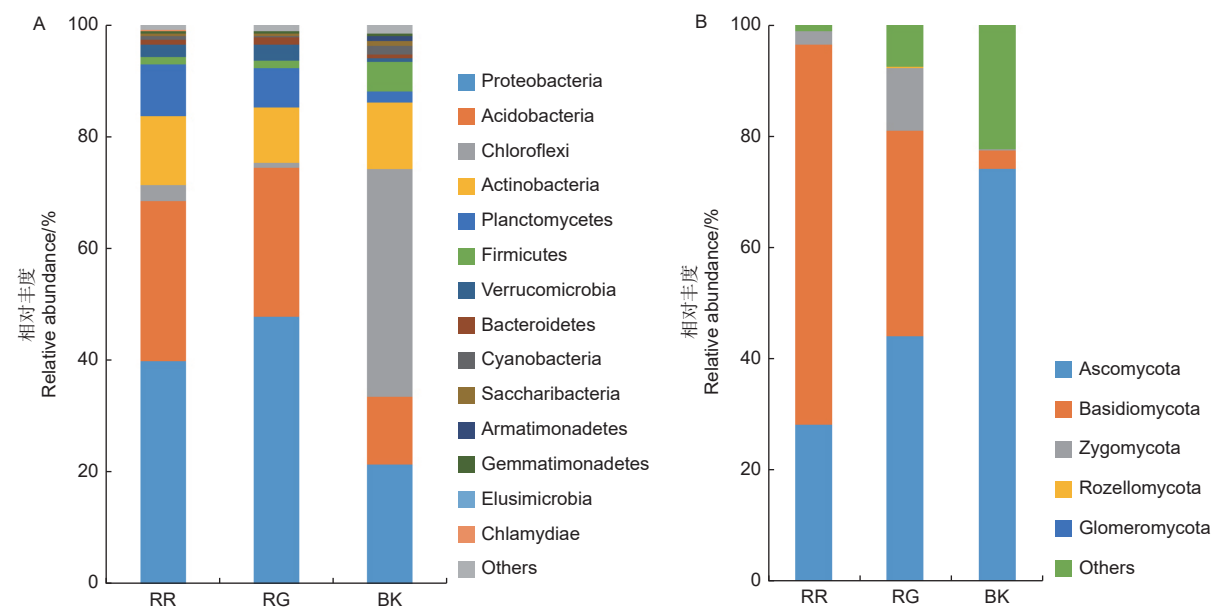


图 2 2 种红菇根际与非根际土壤微生物在门水平上的群落组成 (A: 细菌 B: 真菌)
Fig. 2 Community composition of mycosphere and bulk soil in two species of *Russula* at phylum level (A: Bacterial B: Fungal)

步对灰肉红菇和玫瑰红菇的根际土壤细菌进行比较发现，灰肉红菇根际土壤细菌中变异杆菌属 (*Variibacter*) ($p=0.022$)、*Bryobacter* 属 ($p=0.023$) 和芽生绿菌属 (*Blastochloris*) ($p=0.0089$) 显著高于玫瑰红菇根际土壤细菌，而热酸菌属 (*Acidothermus*) ($p=0.013$)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) ($p=0.044$)、*Reyranelia* 属 ($p=0.009$)、纤线杆菌属 (*Ktedonobacter*) ($p=0.013$) 和罗思河小杆菌属 (*Rhodanobacter*) ($p=0.013$) 显著低于玫瑰红菇根际土壤细菌 (图 4A)，这说明不同红菇中的土壤细菌优势辅助菌略有差异。

在土壤真菌属共计注释到 146 个属，木霉属 (*Trichoderma*)、被孢霉属 (*Mortierella*)、青霉属 (*Penicillium*)、棉革菌属 (*Tomentella*) 和粘头束霉属 (*Gliocephalotrichum*) 为主要的真菌属。在前 50 个属中，灰肉红菇和玫瑰红菇根际土壤真菌中木霉属 (*Trichoderma*) ($p=0.023$)、青霉属 (*Penicillium*) ($p=0.038$) 和 *Hypomyces* 属 ($p=0.038$) 显著高于非根际土壤，而豆马勃属 (*Pisolithus*) ($p=0.023$)、枝孢属 (*Cladosporium*) ($p=0.030$) 和拟棘壳孢属 (*Pyrenochaetopsis*) ($p=0.003$) 显著低于非根际土壤 (图 3B)。进一步对灰肉红菇和玫瑰红菇的根际土壤真菌进行比较，发现玫瑰红菇根际土壤真菌的 *Oidiodendron*

属 ($p=0.018$) 和木霉属 (*Trichoderma*) ($p=0.018$) 显著高于灰肉红菇根际土壤真菌，灰肉红菇根际土壤真菌的 *Cladophialophora* 属 ($p=0.049$)、拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis*) ($p=0.023$)、拟青霉属 (*Paecilomyces*) ($p=0.020$) 和节菱孢属 (*Arthrinium*) ($p=0.044$) 显著高于玫瑰红菇根际土壤真菌 (图 4B)，这些结果表明不同红菇中主要的优势真菌菌群略有差异。

3.4 土壤理化性质对根际微生物的影响

RDA 结果分析可以反映菌群、样本和环境之间的关系。通过对 2 种红菇根际与非根际土壤 (细菌、真菌) 在 97% 水平上的 OTU 进行 RDA 分析，结果表明：2 两种红菇根际土壤样品与非根际土壤样品相距较远，菌群结构差异明显，而 2 种红菇样品相距较近，菌群结构相似，重复样地之间测序结果合理 (图 5)。通过对样地菌群与环境因子进行分析，发现 pH 与土壤细菌 ($p=0.020$)、真菌 ($p=0.048$) 群落之间的相关性最大，说明 pH 是影响土壤微生物群落结构的主要因素。

通过对前 50 个属水平的菌群和环境因子进行 Spearman 相关性分析，结果显示：有效氮 (AN)、有效磷 (AP)、有机碳 (SOC)、有效钾 (AK) 为一类，pH 为单独的一类，说明 pH 对菌群的影响较大 (图 6)。在土壤细菌中，变异杆菌属 (*Variibacter*) ($p=0.049$)、堆囊菌属

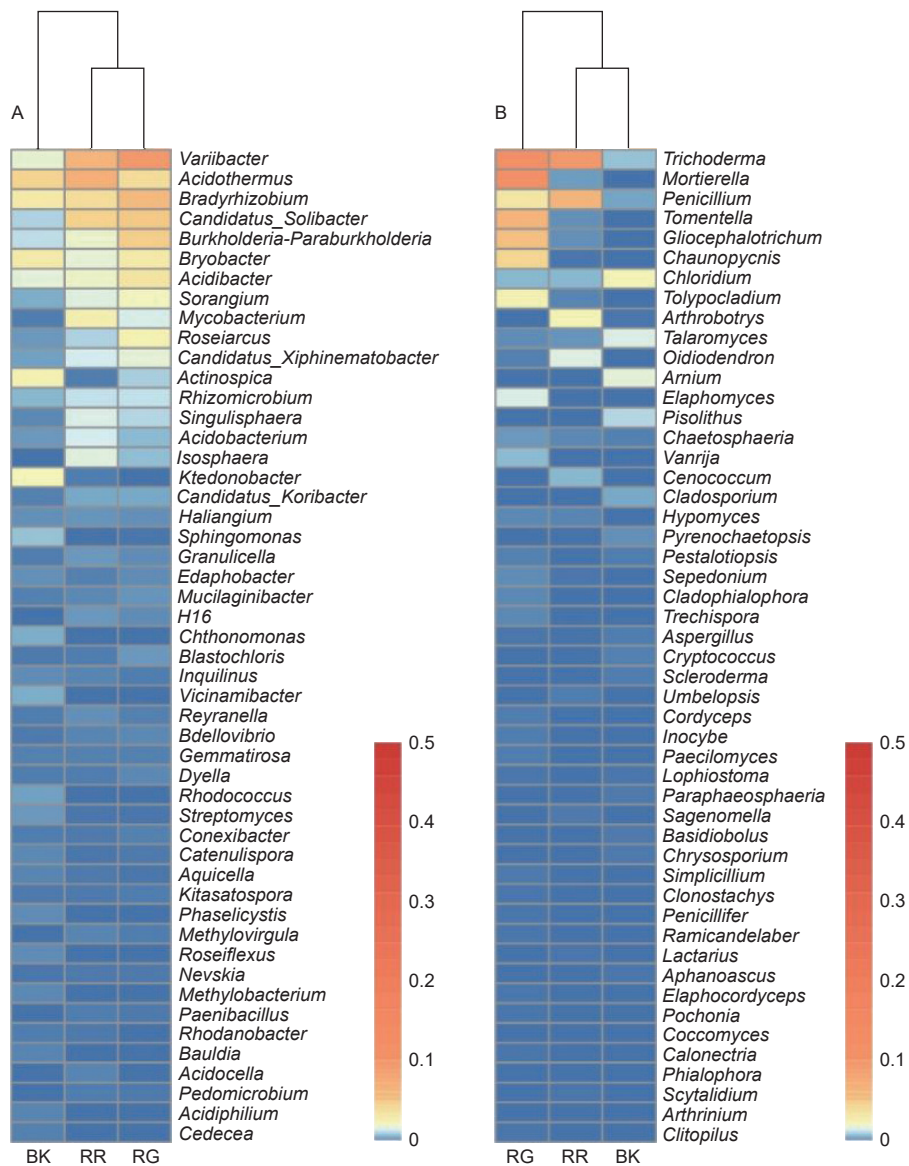


图 3 2 种红菇根际与非根际土壤微生物在前 50 个属水平上的群落组成 (A: 细菌 B: 真菌)

Fig. 3 Community composition of mycosphere and bulk soil in two species of *Russula* at the top 50 genera (A: Bacterial B: Fungal)

(*Sorangium*) ($p=0.025$)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) ($p=0.038$)、根微菌属 (*Rhizomicrobium*) ($p=0.005$)、芽生绿菌属 (*Blastochloris*) ($p=0.030$)、*Reyranella* 属 ($p=0.036$)、蛭弧菌属 (*Bdellovibrio*) ($p=0.020$) 和北里孢菌属 (*Kitasatospora*) ($p=0.049$) 与 pH 呈显著负相关, *Chthonomonas* 属 ($p=0.007$)、*Aquicella* 属 ($p=0.013$) 和玫瑰弯菌属 (*Roseiflexus*) ($p=0.015$) 与 pH 呈显著正相关; *Candidatus_Solibacter* 属、堆囊菌属 (*Sorangium*) 和 *Mucilaginibacter* 属与土壤 SOC、AN、AP 和 AK 呈显著正相关, *Chthonomonas*

则与土壤 SOC、AN、AP 和 AK 呈显著负相关 (图 6A)。在土壤真菌中, 木霉属 (*Trichoderma*)、被孢霉属 (*Mortierella*)、粘头束霉属 (*Gliocephalotrichum*)、茎霉属 (*Chaunopycnis*) 和瘤孢属 (*Sepedonium*) 与 pH 呈显著负相关, 与有机碳呈显著正相关; *Arnium* 属、豆马勃属 (*Pisolithus*) 和隐囊菌属 (*Aphanoascus*) 与 pH 呈显著正相关, 与有机碳、AK 呈显著负相关 (图 6B)。

3.5 2 种红菇对土壤细菌群落功能的影响

通过对 2 种红菇根际与非根际土壤细菌在 KEGG 代谢通路注释结果进行单因素方差分析, 发

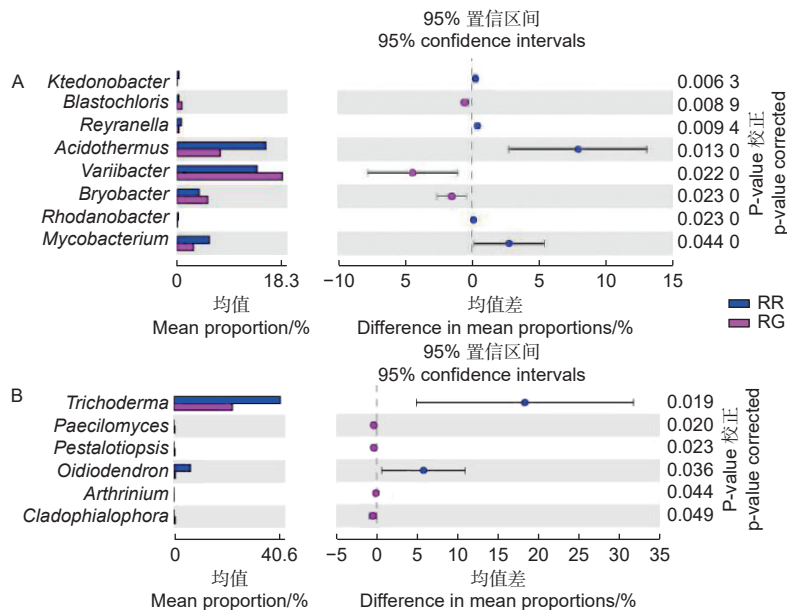


图 4 2 种红菇根际土壤微生物在属水平上的比较分析（A: 细菌 B: 真菌）
Fig. 4 Comparative analysis of mycosphere soil microorganisms of two species *Russula* at genus level (A: Bacterial B: Fungal)

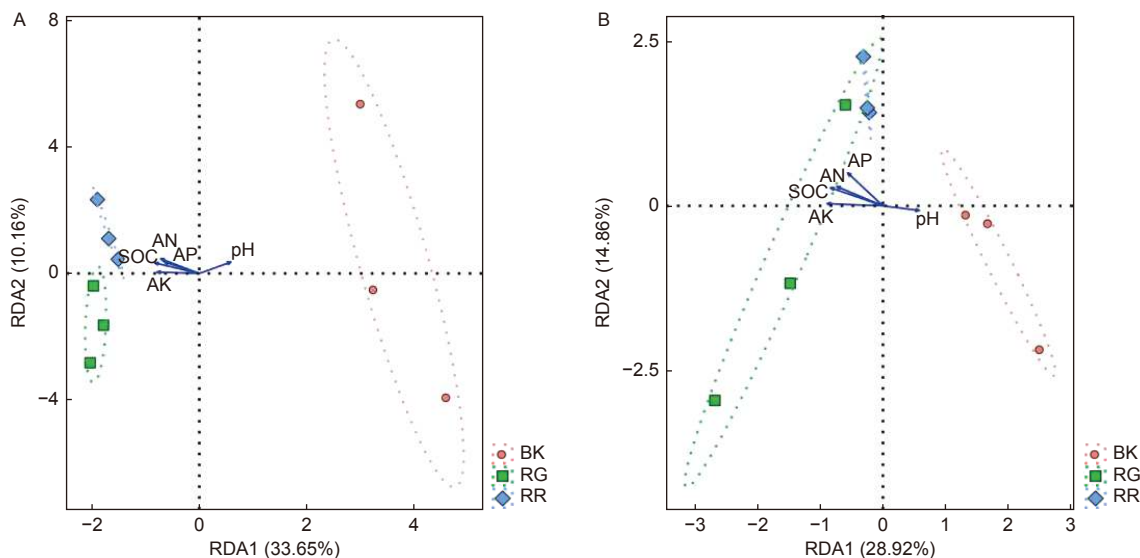


图 5 样地与土壤理化性质的 RDA 冗余分析（A: 细菌 B: 真菌）
Fig. 5 Redundancy analysis (RDA) between soil physicochemical properties and sample (A: Bacterial B: Fungal)

现相对丰度超过 0.5% 的代谢通路共有 71 条，其中具有显著性差异的代谢通路有 33 条（图 7）。玫瑰红菇和灰肉红菇根际土壤细菌在信号转导 [双组分调节系统（Two-component system）（ $p<0.001$ ）]、氨基酸代谢 [甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢（Glycine, serine and threonine metabolism）（ $p<0.001$ ）、半胱氨酸和蛋氨酸代谢（Cysteine and methionine metabolism）（ $p=0.026$ ）、组氨

酸代谢（Histidine metabolism）（ $p=0.001$ ）、酪氨酸代谢（Tyrosine metabolism）（ $p=0.001$ ）、能量代谢 [氮代谢（Nitrogen metabolism）（ $p<0.001$ ）]、膜运输 [分泌系统（Secretion system）（ $p<0.001$ ）、细菌分泌系统（Bacterial secretion system）（ $p<0.001$ ）、细胞迁移 [细菌趋化性（Bacterial chemotaxis）（ $p<0.001$ ）、聚糖生物合成与代谢 [脂多糖生物合成蛋白（Lipopolysaccharide

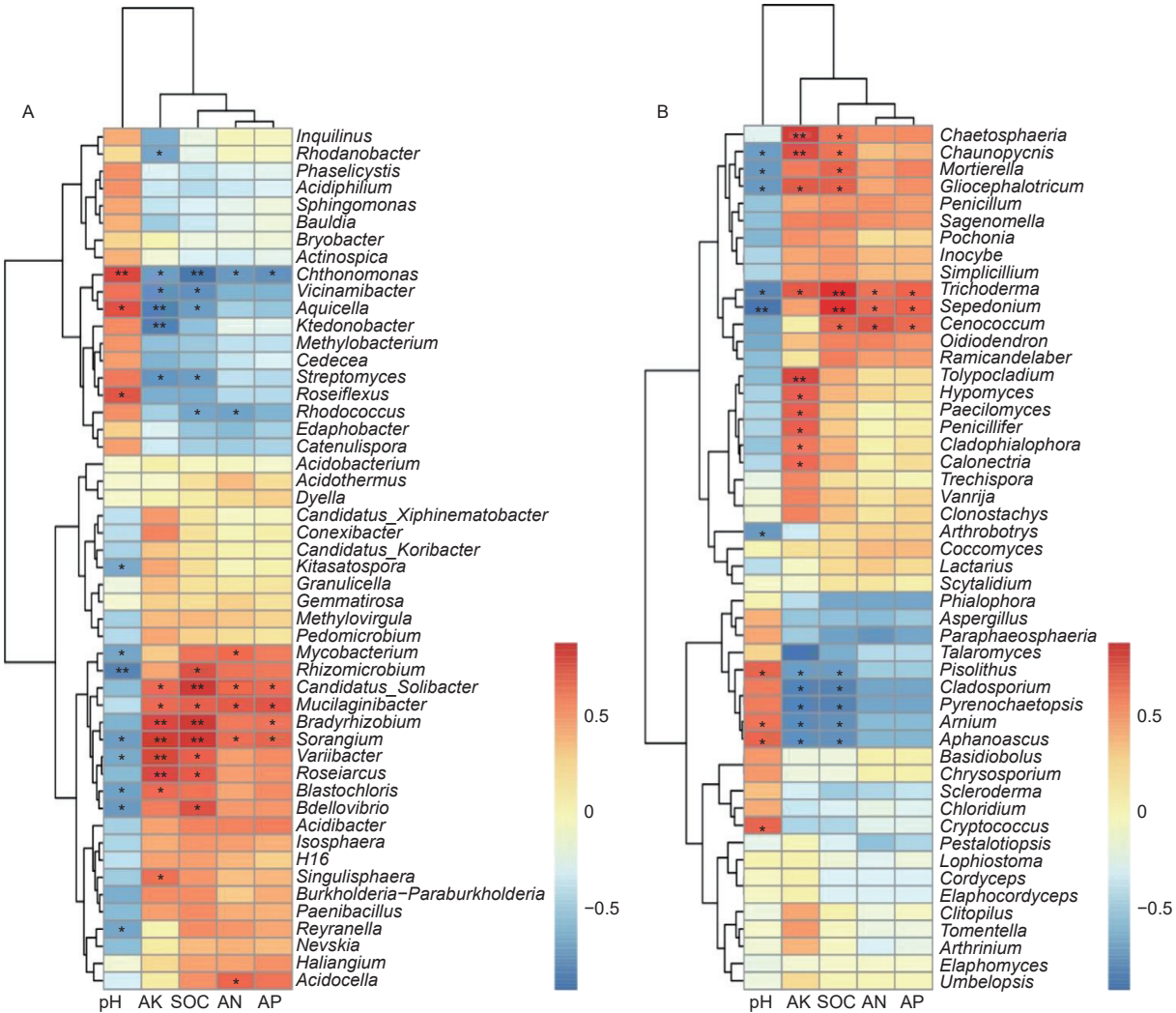


图 6 前 50 个属的土壤微生物与土壤理化性质的 Spearman 相关性分析 (A: 细菌 B: 真菌)

Fig. 6 Spearman correlation analysis between the top 50 genera and soil physicochemical properties (A: Bacterial B: Fungal)

biosynthesis proteins) ($p=0.014$)] 显著高于非根际土壤 (图 7), 其中, 灰肉红菇的分泌系统 (Secretion system) 和细菌分泌系统 (Bacterial secretion system) 代谢途径显著高于玫瑰红菇 (图 7), 而甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 (Glycine, serine and threonine metabolism) 和组氨酸代谢 (Histidine metabolism) 显著低于玫瑰红菇 (图 7)。

4 讨论

已有研究表明, 外生菌根真菌如牛肝菌科、鹅膏菌科和红菇科等多生长于植物覆盖度较大、腐殖质丰富、土壤肥沃的森林环境中[27]。范俐等[28]发现正红菇根际土壤中全氮、有机质的含量丰富;

罗佳煜等[29]在樟子松根际土壤接种褐环乳牛肝菌和互作细菌假单胞杆菌发现, 根际土壤养分指标有机质、全氮、速效氮、全磷、速效磷含量显著提高。本研究中, 2 种红菇根际的 SOC、AN、AP 和 AK 均高于非根际土壤, 表明由于 2 种红菇的生长使得土壤养分含量增加, 这与前人的研究结果一致, 说明外生菌根真菌与植物共生能够改善根际土壤的营养状况。外生菌根真菌的生长也受土壤因子如 pH 值、N 和 P 等影响[30], 特别是 pH 值, 研究发现, 外生菌根菌喜酸性土壤, 最适宜生长的 pH 值范围在 4~6[31], 本研究中玫瑰红菇和灰肉红菇的根际土壤 pH 值介于 4.2~4.3, 证实了外生菌根菌喜好酸性土壤的结论。Avis 等[32]发现, 土壤氮元素增加可以刺激外生菌根真菌定植和生长[33]。

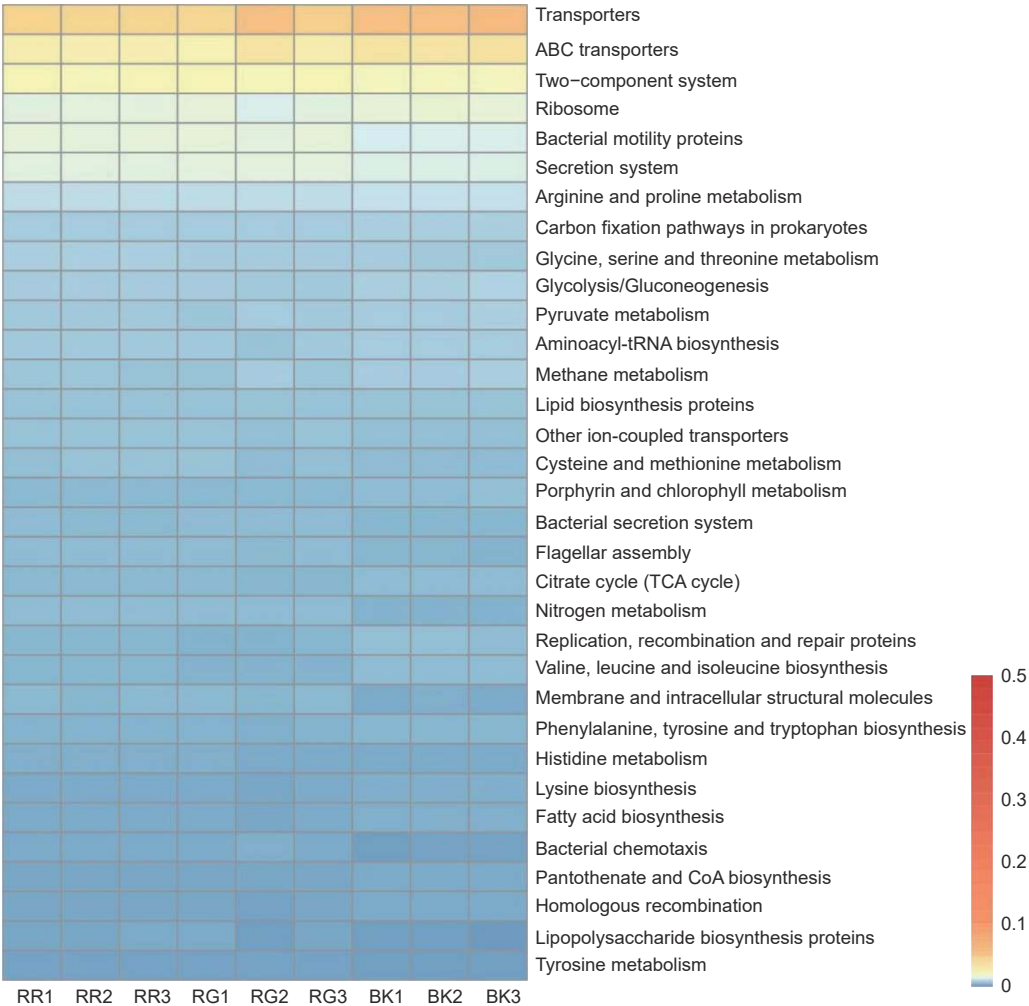


图 7 根际与非根际土壤细菌在 KEGG level3 水平上具有显著性差异的代谢通路

Fig. 7 KEGG level3 metabolic pathways with significant differences between mycosphere and bulk soil bacteria

土壤中磷在一定临界值有利于外生菌根形成，若土壤中磷含量过高，则降低外生菌根真菌的侵染率^[34]，这些结果说明了外生菌根菌能影响土壤的养分状况，反过来，土壤养分也能调节外生菌根菌的定殖及生长。

Oh 等^[23]发现，松茸根际土壤细菌、真菌多样性显著低于非根际土壤（ $p<0.05$ ）。本研究中，2 种红菇根际与非根际土壤微生物多样性指数存在显著差异，表明 2 种红菇不仅依据偏向影响了根际土壤微生物的群落结构，而且影响了微生物的多样性。在细菌属水平上，2 种红菇根际土壤中变异杆菌属、*Candidatus_Solibacter* 属、堆囊菌属、分枝杆菌属、*Singulisphaera* 属、*Isosphaera* 属、蛭弧菌属和类芽孢杆菌属显著高于非根际土壤；在真菌属水平上，木霉属、青霉属和 *Hypomyces* 属显著高于非根际土壤，这些可能是红菇属生长的重要

微生物。进一步比较 2 种红菇的根际土壤微生物之间的差异，发现相对丰度较高的类群相似，含量略有差异，如根际土壤细菌中，灰肉红菇根际土壤中变异杆菌属和 *Bryobacter* 属显著高于玫瑰红菇根际土壤，而热酸菌属和分枝杆菌属显著低于玫瑰红菇根际土壤；根际土壤真菌中，玫瑰红菇根际土壤中 *Oidiodendron* 属和木霉属显著高于灰肉红菇根际土壤，这些可能是由于两种红菇特异性地选择对自己生长有益的土壤微生物^[5]。因此，可以推测这些共有的和特异性的微生物可能是 2 种红菇的菌根辅助菌。研究发现，变异杆菌属（*Variibacter*）、慢生根瘤菌属、*Candidatus_Solibacter* 属和伯克氏菌属为外生菌根真菌中主要的菌根辅助菌^[35-37]。在欧洲赤松的根际土壤中加入伯克氏菌属，红乳菇的侵染率增加 1.9~2.4 倍^[36]，而加入芽孢杆菌属，褐环乳牛肝菌的侵染率增加 2.1 倍^[38]；在三角

叶杨根际土壤中加入类芽孢杆菌,发现双色蜡蘑的侵染率提高了2.5倍^[3]。Kataoka等^[39]发现,土壤中慢生根瘤菌属和伯克氏菌属存在外生菌根真菌红菇属、牛肝菌属与宿主植物共生的根尖部位。Oh等^[23,40]发现,细菌伯克霍尔德氏菌属、分枝杆菌属和类芽孢杆菌和真菌青霉属、木霉属、被孢霉属和毛霉属均是外生菌根真菌松茸的菌根辅助菌。Yu等^[7]对不同地区的灰肉红菇土壤细菌进行研究,发现伯克氏菌属、分枝杆菌属、*Candidatus_Xiphinematobacter*属、*Roseiarcus*属和堆囊菌属是灰肉红菇主要的外生菌根辅助菌,这些研究表明菌根辅助菌在外生菌根菌生长过程中具有重要的作用。2种红菇中主要的菌根辅助菌具有能够影响外生菌根菌定殖的生态功能,如在根际土壤细菌中,*Candidatus_Solibacter*属可以有效分解有机质^[41];堆囊菌属存在降解木聚糖酶,可以降解植物细胞壁和生物大分子,有利于外生菌根真菌定殖,提高外生菌根真菌产量^[42];分枝杆菌属具有固氮功能,能为外生菌根真菌的生长提供氮源^[43]; *Singulisphaera*属能够降解木聚糖和果胶^[44];而土壤真菌中,木霉属不仅分泌降解植物细胞壁的纤维素酶和半纤维素酶、降解真菌细胞壁的几丁质酶等^[45],还能与被孢霉属和青霉属溶解土壤中的有机磷和无机磷,促进植物对土壤磷元素的吸收,参与土壤碳、磷循环^[46]。两种红菇根际土壤中具有降解植物细胞壁功能的微生物显著高于非根际土壤,这表明这些微生物菌群参与外生菌根真菌与宿主植物的共生机制。此外,在根际与非根际土壤中相对丰度高的菌群也具有类似的生态功能,如 *Bryobacter* 可以促进土壤碳循环^[41];慢生根瘤菌属起到固氮、溶解土壤有机和无机磷能力^[46];伯克氏菌属不仅具有固氮作用,还能优先与菌根结合,随着外生菌根菌菌丝进行迁移^[35],说明这些微生物菌群对红菇的生长也起到了促进作用。Oh等^[23]通过对松茸根际土壤细菌的功能进行预测发现,根际土壤主要参与氨基酸代谢和碳水化合物代谢。2种红菇在信号转导、氨基酸代谢、能量代谢、膜运输、细胞迁移等代谢途径中显著高于非根际土壤,这可能是由于菌根菌与植物的共生导致根系分泌物中氨基酸、脂肪酸、碳水化合物等增加,为土壤微生物提供重要的碳源,有助于土壤微生物的富集^[23,47]。2种红菇根际土壤微生物群落功能存在差异,可能是由于不同的菌根菌对根际微生物的偏向性选择,导致微生物菌群的功能

能表现出差异,这些差异也可能会反过来影响2种红菇的特性。

5 结论

本研究发现,玫瑰红菇和灰肉红菇2种红菇根际土壤微生物与非根际土壤微生物群落结构具有显著差异,细菌(变异杆菌属、*Candidatus_Solibacter*属、堆囊菌属、分枝杆菌属、*Singulisphaera*属、*Isosphaera*属、蛭弧菌属、类芽孢杆菌属)和真菌(木霉属、青霉属和 *Hypomyces* 属)为2种红菇共有的优势菌根辅助菌,这些菌群具有降解植物细胞壁、固氮和溶磷等功能,能促进红菇与植物根系形成共生关系。2种红菇根际土壤微生物菌群之间也存在显著差异,这是由于2种红菇会特异性地选择对自己生长有益的土壤微生物。pH是影响2种红菇生长的主要因素。2种红菇根际土壤细菌群落在能量代谢,信号转导通路,膜运输通路等显著高于非根际土壤。本研究的目的是筛选外生菌根真菌红菇的菌根辅助菌,制备专用微生物菌肥,扩大林下经济规模,为红菇的保育促繁提供理论依据。

参考文献:

- [1] Hall I R, Yun W, Amicucci A. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms[J]. Trends in Biotechnology, 2003, 21(10): 433-438.
- [2] Giomaro G M, Sisti D, Zambonelli A. Cultivation of edible ectomycorrhizal fungi by in vitro mycorrhizal synthesis[M]//Decker S, Strullu D G, Fortin J A, et al. In vitro Culture of Mycorrhizas. Berlin: Springer, Heidelberg, 2005: 253-267.
- [3] Labbé J L, Weston D J, Dunkirk N, et al. Newly identified helper bacteria stimulate ectomycorrhizal formation in *Populus*[J]. Frontiers in Plant Science, 2014, 5: 579.
- [4] 盛江梅, 吴小芹. 菌根真菌与植物根际微生物互作关系研究[J]. 西北林学院学报, 2007, 22(5): 104-108.
- [5] 徐 漫, 傅婉秋, 戴传超, 等. 外生菌根真菌促生微生物生态功能研究进展[J]. 生态学杂志, 2018, 37(4): 1246-1256.
- [6] Oh S Y, Lim Y W. Root-associated bacteria influencing mycelial growth of *Tricholoma matsutake* (pine mushroom)[J]. Journal of Microbiology, 2018, 56(6): 399-407.
- [7] Yu F, Liang J F, Song J, et al. Bacterial Community Selection of *Russula griseocarnosa* Mycosphere Soil[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 347.
- [8] 王 敏. 贵阳市市场野生食用菌多样性及营养价值与安全性评价[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2021.
- [9] Chen Q, Qi C, Peng G, et al. Immune-enhancing effects of a polysaccharide PRG1-1 from *Russula griseocarnosa* on RAW264.7 macrophage cells via the MAPK and NF- κ B signalling pathways[J]. Food and Agricultural Immunology, 2018,

- 29(1): 833-844.
- [10] 严 明, 陈 旭, 王婷婷, 等. 云南7种红菇科野生食用菌营养成分分析[J]. 中国食用菌, 2019, 38 (5): 32-38.
- [11] 李国杰, 李赛飞, 赵 东, 等. 红菇属研究进展[J]. 菌物学报, 2015, 34 (5): 821-848.
- [12] 肖冬来, 陈丽华, 陈宇航, 等. 利用变性梯度凝胶电泳分析正红菇菌根围土壤真菌群落多样性[J]. 热带作物学报, 2013, 34 (12): 2508-2512.
- [13] 余文英, 胡红莉, 鲍坚东, 等. 福建正红菇保护林中壳斗科外生菌根真菌多样性研究[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28 (5): 771-783.
- [14] Wu J, He Z L, Wei W X, *et al.* Quantifying microbial biomass phosphorus in acid soils[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2000, 32(6): 500-507.
- [15] Nelson D W, Sommers L E. Total carbon, organic carbon, and organic matter[J]. *Methods of soil analysis: Part 3 Chemical methods*, 1996, 5: 961-1010.
- [16] Liu P, Wang X H, Li J G, *et al.* Pyrosequencing reveals fungal communities in the rhizosphere of Xinjiang Jujube[J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 1-8.
- [17] Retamal-Salgado J, Hirzel J, Walter I, *et al.* Bioabsorption and bioaccumulation of cadmium in the straw and grain of maize (*Zea mays* L.) in growing soils contaminated with cadmium in different environment[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, 14(11): 1399.
- [18] Zhao J, Zhang R, Xue C, *et al.* Pyrosequencing reveals contrasting soil bacterial diversity and community structure of two main winter wheat cropping systems in China[J]. *Microbial Ecology*, 2014, 67(2): 443-453.
- [19] Adams R I, Miletto M, Taylor J W, *et al.* Dispersal in microbes: fungi in indoor air are dominated by outdoor air and show dispersal limitation at short distances[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(7): 1262-1273.
- [20] Mori H, Maruyama F, Kato H, *et al.* Design and experimental application of a novel non-degenerate universal primer set that amplifies prokaryotic 16S rRNA genes with a low possibility to amplify eukaryotic rRNA genes[J]. *DNA Research*, 2014, 21(2): 217-227.
- [21] Kõljalg U, Nilsson R H, Abarenkov K, *et al.* Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi[J]. *Molecular Ecology*, 2013, 22(21): 5271-5277.
- [22] Cole J R, Wang Q, Fish J A, *et al.* Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(D1): D633-D642.
- [23] Oh S Y, Fong J J, Park M S, *et al.* Distinctive feature of microbial communities and bacterial functional profiles in *Tricholoma matsutake* dominant soil[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0168573.
- [24] Ye J, Joseph S D, Ji M, *et al.* Chemolithotrophic processes in the bacterial communities on the surface of mineral-enriched biochars[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(5): 1087-1101.
- [25] Delacre M, Lakens D, Leys C. Why psychologists should by default use Welch's t-test instead of Student's t-test[J]. *International Review of Social Psychology*, 2017, 30(1): 92-101.
- [26] Lepš J, Šmilauer P. *Multivariate analysis of ecological data using CANOCO*[M]. Cambridge university press, 2003: 51
- [27] 许美玲, 朱教君, 孙军德, 等. 树木外生菌根菌与环境因子关系研究进展[J]. 生态学杂志, 2004, 23 (5): 212-217.
- [28] 范 俐, 陈 锋. 南平市建阳区林地土壤养分与正红菇营养成分相关性的研究[J]. 食用菌学报, 2015, 22 (2): 82-88.
- [29] 罗佳煜, 宋瑞清, 邓 勋, 等. PGPR 与外生菌根菌互作对樟子松促生作用及根际微生态环境的影响[J]. 中南林业科技大学学报, 2021, 41 (9): 22-34.
- [30] Trappe M J, Cromack K, Caldwell B A, *et al.* Diversity of mat-forming fungi in relation to soil properties, disturbance, and forest ecotype at Crater Lake National Park, Oregon, USA[J]. *Diversity*, 2012, 4(2): 196-223.
- [31] 谢一青, 李志真, 杨宗武. pH、盐浓度及铝离子对菌根菌生长的影响[J]. 江西农业大学学报(自然科学版), 2002, 23 (2): 204-207.
- [32] Avis P G, McLaughlin D J, Dentinger B C, *et al.* Long-term increase in nitrogen supply alters above-and below-ground ectomycorrhizal communities and increases the dominance of *Russula* spp. in a temperate oak savanna[J]. *New Phytologist*, 2003, 160(1): 239-253.
- [33] Baum C, Weihb M, Verwijstb T, *et al.* The effects of nitrogen fertilization and soil properties on mycorrhizal formation of *Salix viminalis*[J]. *Forest Ecology and Management*, 2002, 160(1-3): 35-43.
- [34] 刘润进, 陈应龙编著. 菌根学[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [35] Sawana A, Adeolu M, Gupta R S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species[J]. *Frontiers in Genetics*, 2014, 5: 429.
- [36] Poole E J, Bending G D, Whipps J M, *et al.* Bacteria associated with *Pinus sylvestris*-*Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation in vitro[J]. *New Phytologist*, 2001, 151(3): 743-751.
- [37] Nguyen N H, Bruns T D. The microbiome of *Pinus muricata* ectomycorrhizae: community assemblages, fungal species effects, and *Burkholderia* as important bacteria in multipartnered symbioses[J]. *Microbial Ecology*, 2015, 69(4): 914-921.
- [38] Bending G D, Poole E J, Whipps J M, *et al.* Characterisation of bacteria from *Pinus sylvestris*-*Suillus luteus* mycorrhizas and their effects on root-fungus interactions and plant growth[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 39(3): 219-227.
- [39] Kataoka R, Taniguchi T, Ooshima H, *et al.* Comparison of the bacterial communities established on the mycorrhizae formed on *Pinus thunbergii* root tips by eight species of fungi[J]. *Plant and Soil*, 2008, 304(1-2): 267-275.
- [40] Oh S, Park M S, Lim Y W. The Influence of microfungi on the mycelial growth of ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake*[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(6): 169.
- [41] 黎妍妍, 冯 吉, 王 林, 等. 万寿菊-烟草轮作调理植烟土壤细菌群落结构的作用[J]. 中国烟草科学, 2021, 42 (1): 14-19.
- [42] Zhou J, Bai X, Zhao R. Microbial communities in the native

habitats of *Agaricus sinodeliciosus* from Xinjiang Province revealed by amplicon sequencing[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1-13.

[43] Rilling J I, Acuña J J, Sadowsky M J, *et al.* Putative Nitrogen-fixing bacteria Associated with The Rhizosphere and Root Endosphere of wheat plants grown in an Andisol from southern Chile[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2710.

[44] Costa O Y. A, de Hollander M, Agata P, *et al.* Cultivation-independent and cultivation-dependent metagenomes reveal genetic and enzymatic potential of microbial community involved in the degradation of a complex microbial polymer[J]. Microbio-

me, 2020, 8(1): 76.

[45] 许文爽. 长白山自然保护区北坡森林土壤真菌多样性的研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2013: 5-6.

[46] 杨 顺, 杨 婷, 林 斌, 等. 两株溶磷真菌的筛选、鉴定及溶磷效果的评价[J]. 微生物学报, 2018, 58 (2): 264-273.

[47] Michielse C B, Reijnen L, Olivain C, *et al.* Degradation of aromatic compounds through the β -ketoadipate pathway is required for pathogenicity of the tomato wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(9): 1089-1100.

The Effect of *Russula rosea* and *Russula griseocarnosa* on Microorganism Structure of Mycosphere Soil

YU Fei¹, LIANG Jun-feng²

(1. College of Forestry, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, Shanxi, China; 2. Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

Abstract: [Objective] To provide a theoretical basis for the conservation and propagation of the two species of *Russula* and the realization of artificial cultivation, the mycosphere soil microbial communities of *Russula rosea* and *Russula griseocarnosa* was analyzed, and the soil microorganisms that promoting the growth of the two species of *Russula* were screened. [Method] The community structure of mycosphere and bulk soil microorganisms (fungi and bacteria) of two species of *Russula* were analyzed by Illumina MiSeq sequencing technology, and evaluated comprehensively based on soil physicochemical property. [Result] The mycosphere soil microorganisms of the two species of *Russula* were slightly different. The dominant mycosphere soil microorganisms of *R. rosea* were *Acidothermus*, *Mycobacterium*, *Reyranella*, *Ktedonobacter*, *Rhodanobacter* and *Oidiodendron*, while the dominant mycosphere soil microorganisms of *R. griseocarnosa* were *Variibacter*, *Bryobacter*, *Blastochloris*, *Cladophialophora*, *Paecilomyces* and *Arthrinium*. Bacteria (*Variibacter*, *Candidatus_Solibacter*, *Sorangium*, *Mycobacterium*, *Singulisphaera*, *Isosphaera*, *Bdellovibrio* and *Paenibacillus*) and fungi (*Trichoderma*, *Penicillium*, and *Hypomyces*) were the common growth promoting microbes of *Russula rosea* and *R. griseocarnosa*. pH was the key factor affecting mycosphere soil microorganisms. [Conclusion] The two species of *Russula* can specifically select soil microorganisms that are beneficial to their growth according to their growth needs and form different microbial community structures. The mycosphere mycorrhizal auxiliary bacteria that were screened out in this study can provide theoretical basis for the preparation of special microbial fertilizer and artificial propagation promotion of *Russula*, which has great promotion for the sustainable utilization of *Russula*, the expansion of understory edible fungi scale and the improvement of economic benefits.

Keywords: *Russula rosea*; *Russula griseocarnosa*; mycosphere soil microorganism; community structure

(责任编辑: 张 研)