

西藏黄绿卷毛菇生境土壤微生物群落组成

任丽莹^{1,2,3}, 白玛央宗⁴, 丹增晋美⁴, 刘晓玲^{3,5}, 宗同铠⁶, 刘淑艳^{1,2}, 刘小勇^{3,7}, 普布多吉^{4*}

1 吉林农业大学植物保护学院, 吉林 长春 130118

2 吉林农业大学食药菌教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118

3 中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室, 北京 100101

4 西藏自治区高原生物研究所, 西藏 拉萨 850000

5 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049

6 西南林业大学生物多样性保护学院, 云南 昆明 650224

7 山东师范大学生命科学学院, 山东 济南 250014

摘要: 牧草外生菌根菌黄绿卷毛菇 *Floccularia luteovirens* 具有较高的生态和经济价值, 其生境微生物对其菌丝生长、菌根化和子实体形成具有促进作用。本研究利用高通量测序技术对西藏黄绿卷毛菇菌窝土壤及其周围无菇土壤微生物群落组成进行分析, 挖掘促进黄绿卷毛菇生长的有益微生物资源。结果显示, 西藏黄绿卷毛菇生境土壤细菌隶属于 17 门 22 纲 116 目 161 科 227 属, 其中酸杆菌门、变形菌门、拟杆菌门和疣微菌门累计比例高达 81.75%; 生境土壤真菌隶属于 5 门 17 纲 34 目 55 科 61 属, 子囊菌门和担子菌门累计比例高达 80.89%。对比周围无菇土壤的微生物群落, 促进黄绿卷毛菇生长的潜在细菌类群为 *Flavisolibacter*、黄杆菌属 *Flavobacterium*、芽单胞菌属 *Gemmatimonas*、*Haliangium*、赛格特杆菌 *Segetibacter* 和鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*; 促进黄绿卷毛菇生长的潜在真菌类群为斜盖伞属 *Clitopilus*、丝膜菌属 *Cortinari*、被孢霉属 *Mortierella* 和毛霉属 *Mucor*。土壤微生物促进黄绿卷毛菇生长繁殖的机制有待进一步研究。

关键词: 黄绿蜜环菌; 宏基因组; 外生菌根菌; rDNA 小亚基; rDNA 转录间隔区

[引用本文] 任丽莹, 白玛央宗, 丹增晋美, 刘晓玲, 宗同铠, 刘淑艳, 刘小勇, 普布多吉, 2022. 西藏黄绿卷毛菇生境土壤微生物群落组成. 菌物学报, 41(6): 906-917

Ren LY, Pema YZ, Tenzin J, Liu XL, Zong TK, Liu SY, Liu XY, Phurba D, 2022. Composition of soil microbial community in the habitat of *Floccularia luteovirens* in Tibet, southwest China. Mycosystema, 41(6): 906-917

基金项目: 西藏自治区科技计划项目(XZ201901-GB-19); 国家自然科学基金(31970009)

Supported by the Science and Technology Project of Tibet Autonomous Region (XZ201901-GB-19) and the National Natural Science Foundation of China (31970009).

*Corresponding author. E-mail: puduo@126.com

ORCID: REN Liying (0000-0002-7385-490X)

Received: 2021-09-28, accepted: 2021-10-08

Composition of soil microbial community in the habitat of *Floccularia luteovirens* in Tibet, southwest China

REN Liying^{1,2,3}, PEMA Yangzom⁴, TENZIN Jigme⁴, LIU Xiaoling^{3,5}, ZONG Tongkai⁶,
LIU Shuyan^{1,2}, LIU Xiaoyong^{3,7}, PHURBU Dorji^{4*}

1 College of Plant Protection, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

2 Engineering Research Center of Edible and Medicinal Fungi, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

3 State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

4 Tibet Plateau Institute of Biology, Lhasa 850000, Tibet, China

5 College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

6 College of Biodiversity Conservation, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China

7 College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, Shandong, China

Abstract: *Floccularia luteovirens*, an ectomycorrhizal fungus in grassland, is highly valuable to ecology and economy. Herbage rhizosphere microorganisms can promote the growth of ectomycorrhizal fungi, mycorrhizal formation and the formation of fruiting bodies. In this study, high-throughput sequencing technology was applied to analyze the microbial community composition in fruiting body-emersed and surrounding soil of *F. luteovirens* in Tibet, attempting to explore beneficial microorganism resources for promoting the fungal growth. The results showed that bacteria in the soil of *F. luteovirens* habitat could be referred to 17 phyla, 22 classes, 116 orders, 161 families and 227 genera, and the dominant phyla Acidobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes and Verrucomicrobia accounted for 81.75%. Fungi in the habitat soil were referred to 5 phyla, 17 classes, 34 orders, 55 families and 61 genera, and dominant phyla Ascomycota and Basidiomycota accounted for 80.89%. The bacteria potentially promoting the growth of *F. luteovirens* were *Flavisolibacter*, *Flavobacterium*, *Gemmatimonas*, *Haliangium*, *Segetibacter* and *Sphingomonas*; the fungi potentially promoting the growth of *F. luteovirens* were *Clitopilus*, *Cortinarius*, *Mortierella* and *Mucor*. The mechanisms of soil microorganisms promoting the growth and reproduction of *F. luteovirens* need further study.

Keywords: *Armillaria luteovirens*; metagenome; ectomycorrhizal fungi; 16S rDNA; ITS rDNA

黄绿卷毛菇 *Floccularia luteovirens* (Alb. & Schwein.) Pouzar, 异名黄绿蜜环菌 *Armillaria luteovirens* (Alb. & Schwein.) Sacc., 隶属于担子菌门 Basidiomycota, 伞菌纲 Agaricomycetes, 伞菌目 Agaricales, 伞菌科 Agaricaceae, 卷毛菇属 *Floccularia* (戴玉成等 2010; 谢占玲等 2016), 在我国主要分布在青海、四川和西藏海拔 3 000–5 000 m 的草地上(周连玉 2010; 刘琳等 2013), 是牧草矮生嵩草 *Kobresia humilis* 的外生

菌根菌, 可提高其质量和产量(陈立红等 2002)。该菇也是草原著名的食药真菌(戴玉成和杨祝良 2008), 口感鲜嫩, 味香色美, 可增强人体免疫力, 可抗炎、抗氧化及抗肿瘤(陈海燕 2016; Wu *et al.* 2019), 具有较高的生态价值和经济价值。但是, 黄绿卷毛菇在进化过程中呈现出遗传结构简单、种群多样性不高, 受青藏高原地理变化等自然因素的影响, 其种群数量锐减、资源量急剧下降, 且因经济利益驱动, 无序、无度、不

合理采食的情况较严重,导致黄绿卷毛菇的生长和繁衍受到影响,使其面临资源枯竭的危险(刘琳等 2013; 刘昆等 2019)。因此,促进黄绿卷毛菇生长和繁衍的基础和应用研究亟待开展。

诸多学者曾探索了黄绿卷毛菇的人工培养,早期主要通过物理和化学的方法优化菌丝培养条件(刁治民 1997; 朱锦福等 2004; 柳焕章等 2007; 周劲松等 2007; 蔡箫等 2013)。研究黄绿卷毛菇生长地土壤微生物群落组成和多样性,是寻找促进其生长的微生物的基础。王启兰等(2005)培养青海省蘑菇圈上和圈外土壤微生物,发现圈上浅层土壤的细菌和真菌数量均显著高于圈外,但未对土壤微生物组成进行研究。Xing *et al.* (2018)对青海省黄绿卷毛菇蘑菇圈上、圈内和圈外的土壤微生物进行研究,结果显示,蘑菇圈上的微生物多样性较低,菌根辅助菌慢生根瘤菌 *Bradyrhizobium* spp.和类芽孢杆菌 *Paenibacillus* spp.等在蘑菇圈上较为常见。他们进一步从菌窝土壤中分离出 4 种促进其菌丝生长的细菌(荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens*、韩国假单胞菌 *Pseudomonas koreensis*、节杆菌 *Arthrobacter* sp.和氧化微杆菌 *Microbacterium oxydans*),正式开启了生态学方法探索黄绿卷毛菇促生菌的方向。Xu *et al.* (2020)扩大样品的采集,在青海省黄绿卷毛菇蘑菇圈上土壤中分离培养出 12 种细菌,有 7 种细菌显著促进了黄绿卷毛菇菌丝的生长,其中 4 种细菌(无色杆菌 *Achromobacter marplatensis*、蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus*、荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 和嗜根寡养单胞菌 *Stenotrophomonas rhizophila*)能进一步促进共生菌根的形成。Curto & Favelli (1972)研究发现巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*、大豆根瘤菌 *Rhizobium japonicum*、棕色固氮菌 *Azotobacter vinelandii* 等菌悬液,不同时期喷施于双孢菇 *Agaricus bisporus* 菌床或覆土上,可增加蘑菇菌丝的密度,促进蘑菇子实体原基提早形成,增产

20%–30%。同时, Cresswell & Hayes (1979)也指出合适的覆土层微生物区系可以显著提高蘑菇产量,提升蘑菇品质。可见微生物,尤其是细菌,可以促进大型真菌子实体的形成;虽然借鉴了以上研究方法,但在黄绿卷毛菇子实体的培养方面仍难以取得突破(黄强华 1985; 魏永林 2002)。

分子系统发育分析认为黄绿卷毛菇群体存在明显的地理演化分支,青海、西藏和四川地理群分布在不同谱系(谢占玲等 2015)。王启兰等(2005)和 Xing *et al.* (2018)仅对青海省黄绿卷毛菇生境土壤微生物进行了研究,本研究利用土壤宏基因组测序技术对西藏当雄黄绿卷毛菇生长地土壤微生物多样性进行了研究,为扩大和挖掘黄绿卷毛菇有益微生物资源提供有力的理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2018 年 7 月于西藏当雄县的高山草甸观察到黄绿卷毛菇,其生境主要的植被有肉果草、钉柱委陵菜、矮生嵩草、高山唐松草、活绒草、二裂委陵菜、高山米口袋、香青、翼首草、独一味、细果角茴香、藏波罗花、小金莲花和垫状点地梅等。挖取黄绿卷毛菇子实体菌窝土壤 500 g (a 组),同时选取相隔 1 m 没有生长黄绿卷毛菇的土壤作为对照样品(b 组),共 7 个生物重复。14 个样品的具体编号、海拔、经度和纬度信息见表 1。

1.2 DNA 提取及高通量测序

使用试剂盒 FastDNA SPIN (MP Biomedicals, Santa Ana, CA)从 10 g 土壤样品中提取总 DNA,使用荧光计 Qubit 2.0 (Invitrogen)检测 DNA 样品的浓度,以 30 ng DNA 为模板,使用文库构建试剂盒 MetaVx™ (GENEWIZ, Inc.)构建测序文库。使用上游引物(5'-CCTACGRRBGCASCAG KVRVGAAT-3')和下游引物(5'-GGACTACNVG GGTWTCTAATCC-3') PCR 扩增原核生物 16S rDNA 的 V3 及 V4 高度可变区(Xing *et al.* 2018)。

采用上游引物(5'-GTGAATCATCGARTC-3')和下游引物(5'-TCCTCCGCTTATTGAT-3') PCR 扩增真核生物 ITS rDNA 的 ITS2 区(Monard *et al.* 2013)。在 16S rDNA 和 ITS rDNA 的 PCR 产物末端加上带有 Index 的接头,生成用于 Illumina Miseq (Illumina)测序的索引文库。使用生物分析仪 Agilent 2100 (Agilent Technologies)检测文库质量,并且通过荧光计 Qubit2.0 检测文库浓度。DNA 文库混合后,进行 PE250/300 双端测序,用 MiSeq 控制软件(MCS)读取序列信息(Xing *et al.* 2018)。

表 1 供试 7 个黄绿卷毛菇菌窝及其 1 m 远对照(CK)土壤样品信息

Table 1 The information of seven soil samples collected from fruiting body emersion sites of *Floccularia luteovirens* (the surrounding soil of 1 m away from fruiting body was designed as control)

样品编号 Sample No.	海拔 Altitude (m)	东经 Longitude (E)	北纬 Latitude (N)
1	4 500	91°22'214"	30°30'785"
2	4 519	91°22'420"	30°30'693"
3	4 659	90°40'035"	30°13'367"
4	4 645	90°37'463"	30°10'771"
5	4 589	90°35'850"	30°09'872"
6	4 587	90°35'803"	30°09'817"
7	4 407	90°33'916"	30°03'881"
1CK	4 500	91°22'214"	30°30'785"
2CK	4 519	91°22'420"	30°30'693"
3CK	4 659	90°40'035"	30°13'367"
4CK	4 645	90°37'463"	30°10'771"
5CK	4 589	90°35'850"	30°09'872"
6CK	4 587	90°35'803"	30°09'817"
7CK	4 407	90°33'916"	30°03'881"

1.3 高通量测序数据分析

双端测序读取的正反向序列两两拼接,过滤拼接结果中含有 N 和长度小于 200 bp 的序列,去除嵌合体序列,最终得到的有效序列用于 OTU 分析。使用 Vsearch v1.9.6 (Rognes *et al.*

2016)进行序列聚类(OTU 阈值设为 97%),比对 Silva 132 (<https://www.arb-silva.de/>)的细菌 16S rRNA 参考数据库,比对 UNITE (<https://unite.ut.ee/>)的真菌 ITS rRNA 参考数据库。然后用 RDP (ribosomal database project) classifier 的贝叶斯算法(Maidak *et al.* 1994)对 OTU 的代表性序列进行物种分类学分析,并在不同物种分类水平下统计每个样品的群落组成。基于 OTU 的分析结果,用软件 Qiime 1.9.1 (Caporaso *et al.* 2010)对样品序列进行随机抽样法分别计算 Shannon index、Simpson index、文库覆盖率(Good's coverage)等 Alpha 多样性指数。利用软件 R 3.6.3 (RDC Team 2020)进行物种组成和多样性差异分析:执行 prcomp 命令进行主成分分析(PCA) (Groth *et al.* 2013),执行 plot 命令生成 PCA 图,执行软件包 VennDiagram 生成 Venn 图展示组间 OTU 数量差异(Chen & Boutros 2011)。根据相应的分类信息,用 EXCEL 制作出百分比堆叠图以表示各样品的微生物群落组成情况。使用 CIRCOS 0.69 (Krzywinski *et al.* 2009)对样品与物种进行共线性关系分析,反映每个样品的优势物种组成比例和各优势物种在不同样品之间的分布比例。原始数据保存在 NCBI,生物项目编号为 PRJNA759079。

2 结果与分析

2.1 群落多样性

14 个土壤样品 16S rDNA 测序原始读数数目为 46 913–66 103 条,去除嵌合体后有效序列数目为 36 428–57 719 条,序列长度集中分布在 440 bp 和 465 bp 左右。各样品 Good's coverage 均大于 0.992,覆盖率较高,能够比较真实地反映出供试的各土壤样品中的细菌群落组成状况。实验组(a 组)和对照组(b 组)的 Shannon 指数平均值分别为 7.95 和 7.80, Simpson 指数平均值均为 0.98 (表 2)。

表 2 供试 7 个黄绿卷毛菇菌窝及其 1 m 远对照(CK)土壤微生物群落 α 多样性

Table 2 Alpha diversity of soil microbial community of seven soil samples collected from fruiting body emersion sites of *Floccularia luteovirens* (the surrounding soil of 1 m away from fruiting body was designed as control)

样品编号 Sample No.	细菌群落 Bacterial community			真菌群落 Fungal community		
	Shannon index	Simpson index	Good's coverage	Shannon index	Simpson index	Good's coverage
1	7.86	0.99	0.993	3.29	0.92	0.999
2	8.44	0.99	0.993	3.49	0.92	0.999
3	8.37	0.99	0.993	2.90	0.79	0.999
4	6.37	0.91	0.993	2.49	0.83	0.999
5	8.42	0.99	0.994	3.95	0.95	0.999
6	7.79	0.98	0.993	3.58	0.94	0.998
7	8.37	0.99	0.994	4.28	0.97	0.998
1CK	7.49	0.98	0.994	1.62	0.55	0.999
2CK	8.41	0.99	0.992	3.24	0.90	0.999
3CK	8.30	0.99	0.992	2.62	0.71	0.999
4CK	7.74	0.98	0.993	2.99	0.89	0.999
5CK	6.01	0.92	0.993	3.29	0.92	1.000
6CK	8.27	0.99	0.993	3.80	0.94	0.999
7CK	8.36	0.99	0.992	4.14	0.97	0.999

14 个土壤样品 ITS rDNA 测序原始读数数目为 48 509–84 310 条，去除嵌合体后有效序列数目为 41 948–71 348 条，序列长度集中分布在 290 bp 和 340 bp 左右。各样品文库覆盖率均大于 0.999，覆盖率较高，能够比较真实地反映出供试的各土壤样品中的真菌群落组成状况。实验组(a 组)和对照组(b 组)的 Shannon 指数平均值分别为 3.43 和 3.10，Simpson 指数平均值分别为 0.90 和 0.84 (表 2)。

2.2 OTU 聚类分析

14 个土壤样品中细菌 OTU 总计 1 511 个，实验组(a 组)和对照组(b 组)共有 1 323 个，实验组(a 组)独有 87 个，对照组(b 组)独有 101 个(图 1)。实验组(a: 1 410 种)的细菌类群数量略低于对照组(b: 1 424 种)，差异不明显。两组有大部分一致的细菌类群(87.56%)，但各组仍然存在一定比例的独特类群(a: 5.76%; b: 6.68%)。

14 个土壤样品中真菌 OTU 总计 888 个，实验组(a 组)和对照组(b 组)共有 567 个，实验组(a 组)独有 131 个，对照组(b 组)独有 190 个(图 1)。

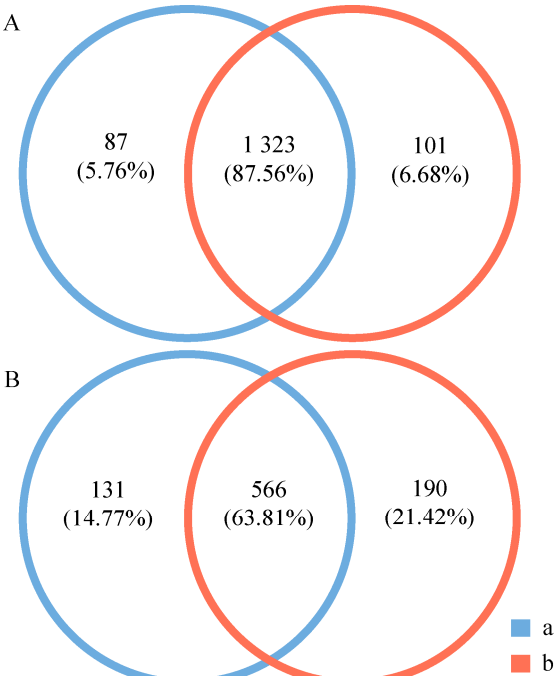


图 1 黄绿卷毛菇根际(a)及其周围无菇土壤样品(b)细菌 16S rDNA (A)和真菌 ITS rDNA (B)的 OTU 韦恩图

Fig. 1 OTU Venn diagrams based on bacterial 16S rDNA (A) and fungal ITS rDNA (B) of the soil microorganism in the *Floccularia luteovirens* growth habitat.

实验组(a: 698 种)的真菌类群数量略低于对照组(b: 757 种)。两组有大部分一致的真菌类群(63.85%), 但各组仍然存在一定比例的独特类群(a: 14.75%; b: 21.40%)。

2.3 PCA 分析

对 14 个土壤样品细菌 OTU 进行 PCA 分析(图 2A), 结果显示实验组(a 组)样品与对照组(b 组)样品在 PC1-PC2 主成分分析中重叠较多,

说明 A 组与 B 组的细菌群落组成无显著差异。对 14 个土壤样品真菌 OTU 进行 PCA 分析(图 2B), 结果显示 a 组样品与 b 组样品在 PC1-PC2 主成分分析中重叠较少, 说明 a 组与 b 组的真菌群落组成存在一定差异。

2.4 群落组分分析

14 个土壤样品的细菌归入 17 个门等级的分类群(图 3): 酸杆菌门 Acidobacteria、变形菌门

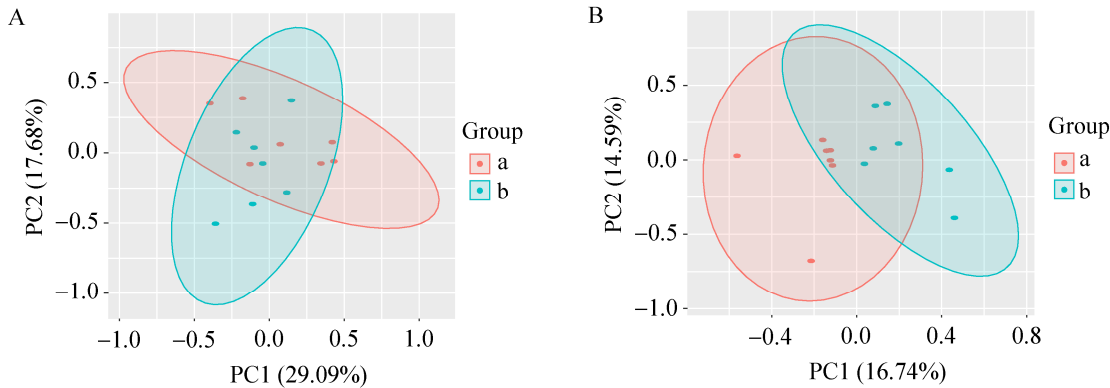


图 2 黄绿卷毛菇根际(a)及其周围无菇土壤样品(b)细菌(A)和真菌(B)群落主成分分析图
Fig. 2 Principal component analysis (PCA) diagram of the bacterial (A) and fungal (B) community in the soil of *Floccularia luteovirens* growth habitat.

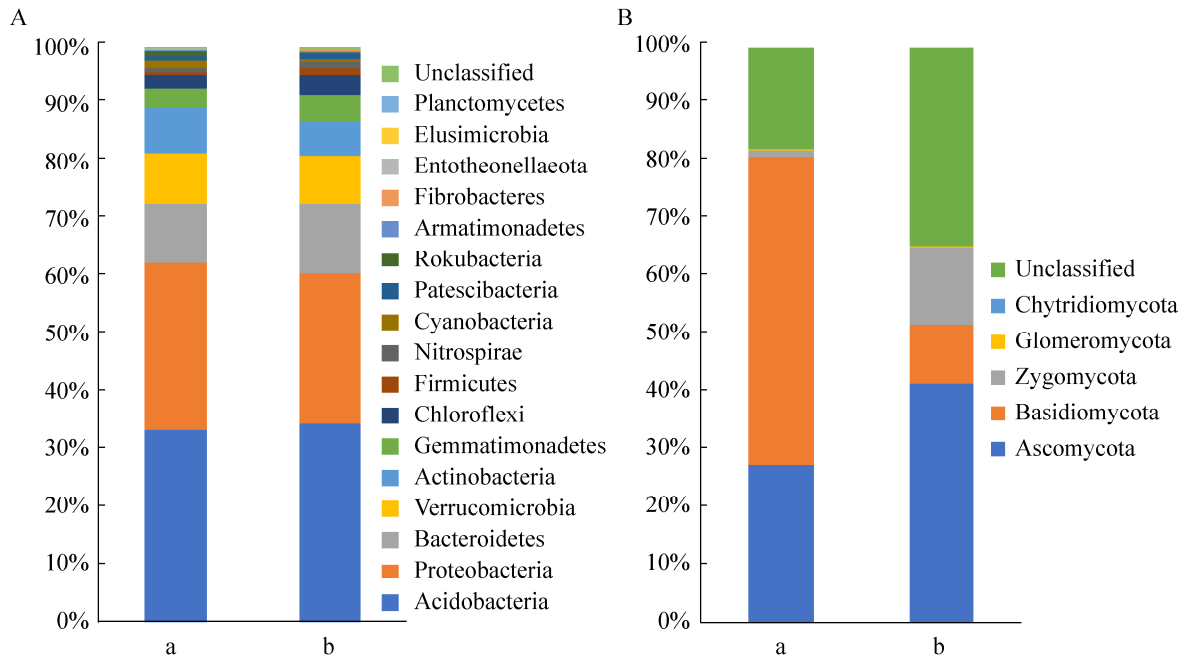


图 3 黄绿卷毛菇根际(a)及其周围无菇土壤样品(b)中细菌(A)和真菌(B)门级组成百分比堆叠图
Fig. 3 Percentage stack diagram of bacteria (A) and fungi (B) at the phylum rank in the soil of *Floccularia luteovirens* growth habitat.

Proteobacteria、拟杆菌门 Bacteroidetes、疣微菌门 Verrucomicrobia、放线菌门 Actinobacteria、芽单胞菌门 Gemmatimonadetes、绿弯菌门 Chloroflexi、厚壁菌门 Firmicutes、硝化螺菌门 Nitrospira、蓝菌门 Cyanobacteria、Patescibacteria、己科河菌门 Rokubacteria、装甲菌门 Armatimonadetes、纤维杆菌门 Fibrobacteria、Entotheonellaeota、迷踪菌门 Elusimicrobia 和浮霉菌门 Planctomycetes。其中酸杆菌门 Acidobacteria (a: 33.19%; b: 34.39%)、变形菌门 Proteobacteria (a: 29.28%; b: 26.30%)和拟杆菌门 Bacteroidetes (a: 10.28%; b: 12.12%)均超过 10%，为主要组成门。细菌丰度前 20 的属为鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*、酸杆菌属 *Acidibacter*、*Bryobacter*、黄杆菌属 *Flavobacterium*、*Flavisolibacter*、*Ferruginibacter*、红游动菌属 *Rhodoplanes*、硝化螺旋菌属 *Nitrospira*、赛格特杆菌 *Segetibacter*、*Terrimonas*、假单胞菌属 *Pseudomonas*、*Blastocatella*、马赛菌属 *Massilia*、芽单胞菌属 *Gemmatimonas*、*Haliangium*、*Parafilimonas*、无色杆菌属 *Achromobacter*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、寡氧单胞菌 *Stenotrophomonas* 和 *Chthoniobacter*。其中 *Parafilimonas* 与实验组(a 组)相关性较高；黄杆菌属 *Flavobacterium*、无色杆菌属 *Achromobacter* 和寡氧单胞菌 *Stenotrophomonas* 与对照组(b 组)相关性较高(图 4A)。

14 个土壤样品的真菌归入 5 个门等级的分类群(图 3)：子囊菌门 Ascomycota、担子菌门 Basidiomycota、接合菌门 Zygomycota、球囊菌门 Glomeromycota 和壶菌门 Chytridiomycota。其中子囊菌门 Ascomycota (a: 27.23%; b: 41.50%)和担子菌门 Basidiomycota (a: 53.66%; b: 10.34%)均超过 10%，为主要组成门。真菌丰度前 20 的属为被孢霉属 *Mortierella*、石蕊属 *Cladonia*、丝膜菌属 *Cortinarius*、短梗蠕孢属 *Trichocladium*、

小菇属 *Mycena*、镰孢属 *Fusarium*、团球腔菌属 *Massariosphaeria*、斜盖伞属 *Clitopilus*、古根茎菌属 *Archaeorhizomyces*、石果衣属 *Endocarpon*、地丝霉属 *Geomyces*、毛霉属 *Mucor*、*Hydropus*、湿伞属 *Hygrocybe*、杆孢衣属 *Bacidia*、光黑壳属 *Preussia*、隔孢球壳属 *Didymosphaeria*、隐球菌属 *Cryptococcus*、球旋霉属 *Spirosphaera*、棘壳孢属 *Pyrenochaeta* (图 4B)。其中丝膜菌属 *Cortinarius*、斜盖伞属 *Clitopilus*、古根茎菌属 *Archaeorhizomyces*、湿伞属 *Hygrocybe*、杆孢衣属 *Bacidia* 和隔孢球壳属 *Didymosphaeria* 与实验组(a 组)相关性较高；被孢霉属 *Mortierella*、石蕊属 *Cladonia*、短梗蠕孢属 *Trichocladium*、小菇属 *Mycena*、镰孢属 *Fusarium*、石果衣属 *Endocarpon*、地丝霉属 *Geomyces*、毛霉属 *Mucor*、光黑壳属 *Preussia* 和球旋霉属 *Spirosphaera* 与对照组(b 组)相关性较高。

3 讨论

本研究结果显示西藏黄绿卷毛菇生境土壤细菌 α 多样性(Shannon 指数平均值 7.88, 表 2; 1 511 个 OTU, 图 1)明显高于真菌 α 多样性(Shannon 指数平均值 3.27, 表 2; 888 个 OTU, 图 1), 与王启兰等(2005)和 Xing *et al.* (2018)的研究结果一致, 一方面可能是因为细菌本身就是土壤中数量最多的微生物种类(Wang *et al.* 2016), 另一方面则有可能是因为矮生嵩草与黄绿卷毛菇共生形成菌根, 其种间合作提高了黄绿卷毛菇的竞争能力, 在有限的生态位中抑制了其他真菌种类的生命活动(王芳和图力古尔 2014)。

西藏黄绿卷毛菇根际土壤细菌群落多样性(Shannon 指数平均值 7.95, 实验组, a 组, 表 1)略高于其周围不生长黄绿卷毛菇土壤(Shannon 指数平均值 7.80, 对照组, b 组, 表 1), 与王启兰等(2005)的研究结果一致(黄绿卷毛菇圈上细菌数量为 15.42×10^7 个/g; 圈外细菌数量为 10.34×10^7 个/g),

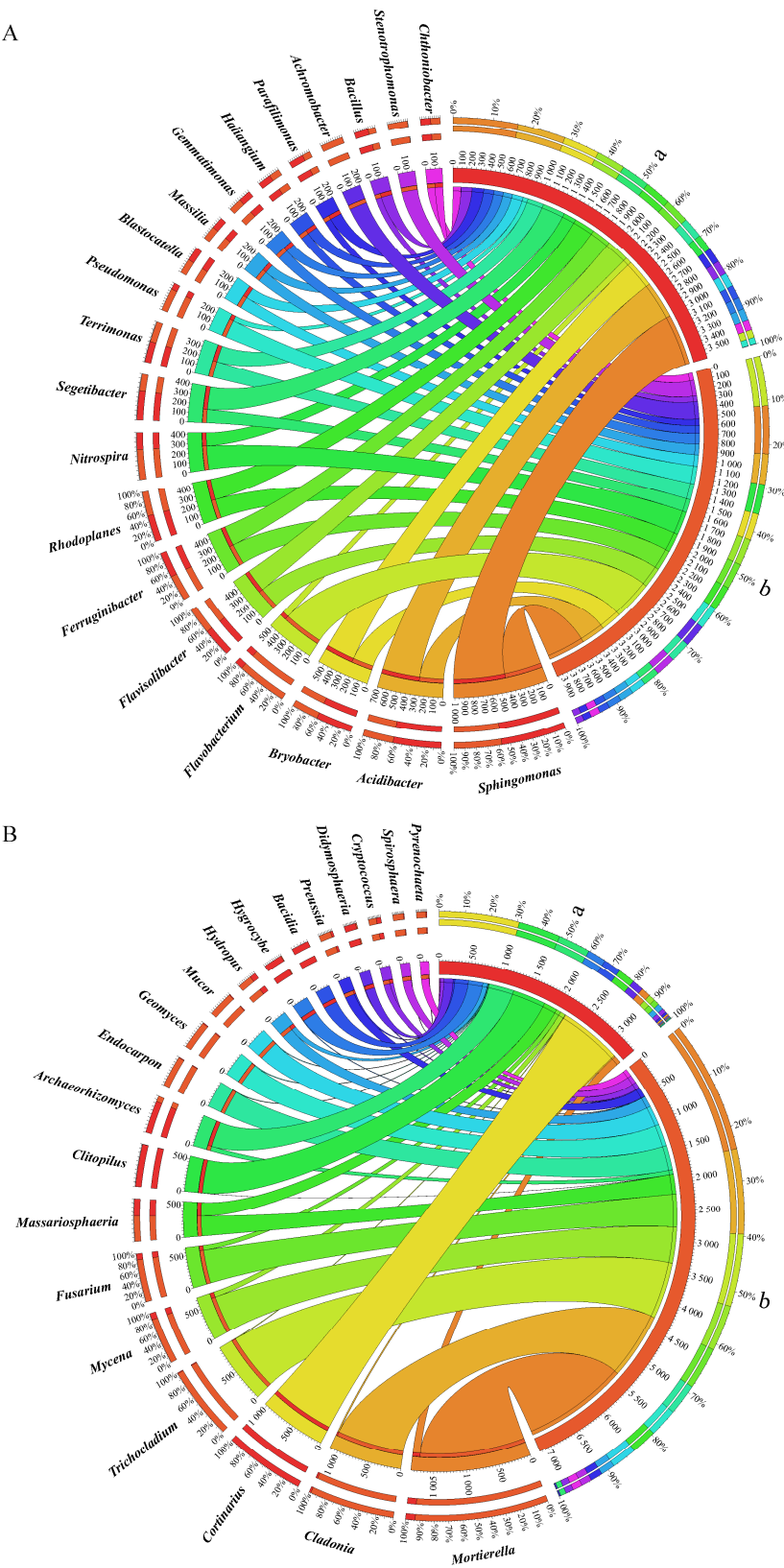


图 4 黄绿卷毛菇根际(a)及其周围无菇土壤样品(b)丰度前 20 的细菌(A)和真菌(B)属共线性关系图
Fig. 4 Collinearity diagram of top 20 bacterial (A) and fungal (B) genera in the soil of *Floccularia luteovirens* growth habitat.

这样的多样性差异并不显著($P>0.05$)。然而, Xing *et al.* (2018)的研究却发现青海省黄绿卷毛菇蘑菇圈上土壤细菌群落多样性低于圈外无菇土壤细菌群落多样性(黄绿卷毛菇蘑菇圈上细菌 Shannon 指数平均值 5.55, 蘑菇圈里 Shannon 指数平均值 7.38, 蘑菇圈外 Shannon 指数平均值 7.58)。西藏黄绿卷毛菇生境土壤细菌群落由 17 个门组成(图 3A), 丰度前 10 的门(酸杆菌门 Acidobacteria、变形菌门 Proteobacteria、拟杆菌门 Bacteroidetes、疣微菌门 Verrucomicrobia、放线菌门 Actinobacteria、芽单胞菌门 Gemmatimonadetes、绿弯菌门 Chloroflexi、厚壁菌门 Firmicutes、硝化螺菌门 Nitrospirae 和蓝菌门 Cyanobacteria)与 Xing *et al.* (2018)的研究结果一致(变形菌门 Proteobacteria、酸杆菌门 Acidobacteria、拟杆菌门 Bacteroidetes、放线菌门 Actinobacteria、绿弯菌门 Chloroflexi、芽单胞菌门 Gemmatimonadetes、厚壁菌门 Firmicutes、硝化螺菌门 Nitrospirae、疣微菌门 Verrucomicrobia 和蓝菌门 Cyanobacteria), 只是顺序稍有不同。Xu *et al.* (2020)在黄绿卷毛菇蘑菇圈上成功分离到无色杆菌属 *Achromobacter*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、假单胞菌属 *Pseudomonas* 和寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas* 真菌, 既能够显著促进黄绿卷毛菇菌丝的生长, 也能促进其与三叶草 *Trifolium repens* 形成菌根。本研究中, 虽然细菌属组成在 a 组与 b 组之间无显著差异(图 1A, 2A 和 4A), 但这 4 个属的丰度排名亦为前 20 (图 4A), 进一步验证了 Xu *et al.* (2020)的研究结果, 这 4 个属细菌的存在也将有利于西藏黄绿卷毛菇的生长和菌根形成。另外, *Flavisolibacter* (Picard & Bosco 2003)、黄杆菌属 *Flavobacterium* (Zhao *et al.* 2019)、芽单胞菌属 *Gemmatimonas* (Timmusk *et al.* 2011; Chuanyu *et al.* 2016)、*Haliangium* (Zhou *et al.* 2018)、赛格特杆菌 *Segetibacter* 和鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*

(Chen *et al.* 2014; Rincón-Molina *et al.* 2020)能够促进植物生长、增强植物抗逆性和对土壤的修复能力, 这 6 个属的丰度在本研究中排名亦为前 20 (图 4A)。黄绿卷毛菇与植物互利共生, 因此这些细菌也可能是黄绿卷毛菇潜在的促生菌。然而, Xing *et al.* (2018)利用 TSA (tryptic soy agar) 和 R2A (Reasoner's 2A agar)培养基在黄绿卷毛菇蘑菇圈上并未分离到这些细菌, 后续实验可以针对这些细菌进行分离并开展促进黄绿卷毛菇生长和促进菌根形成的探索。

西藏黄绿卷毛菇根际土壤真菌群落多样性 (Shannon 指数平均值 3.43, a 组, 表 1)略高于其周围不生长黄绿卷毛菇土壤 (Shannon 指数平均值 3.10, b 组, 表 1), 这与王启兰等(2005)的研究结果一致(黄绿卷毛菇圈上真菌数量为 64.46×10^3 个/g; 圈外真菌数量为 40.91×10^3 个/g)。然而, Xing *et al.* (2018)的研究却发现青海省黄绿卷毛菇蘑菇圈上土壤真菌群落多样性低于无菇土壤真菌群落多样性 (黄绿卷毛菇蘑菇圈上真菌 Shannon 指数平均值 3.69, 蘑菇圈里 Shannon 指数平均值 4.30, 蘑菇圈外 Shannon 指数平均值 4.74)。西藏黄绿卷毛菇生境土壤真菌群落由 5 个门组成(子囊菌门 Ascomycota、担子菌门 Basidiomycota、接合菌门 Zygomycota、球囊菌门 Glomeromycota 和壶菌门 Chytridiomycota, 图 3B), 包含 Xing *et al.* (2018)研究结果中丰度前 3 的门(子囊菌门 Ascomycota、担子菌门 Basidiomycota 和壶菌门 Chytridiomycota)。真菌属组成在 a 组与 b 组之间存在差异(两组共有 63.85% OTU, a 组独有 14.75% OTU, b 组独有 21.40% OTU, 图 1B, 图 2B), 其中杆孢衣属 *Bacidia*、斜盖伞属 *Clitopilus* 和丝膜菌属 *Cortinarius* 仅存在 a 组中(图 4B), 斜盖伞属 *Clitopilus* (Peng *et al.* 2021a, 2021b)和丝膜菌属 *Cortinarius* (Kühdorf *et al.* 2016; Niskanen *et al.* 2017)可以与多种乔木和灌木形成外生菌根, 增强宿主植物的抗旱、抗病能

力,促进植物生长,因此也可能促进矮生嵩草等植物的定植和生长,进而利于黄绿卷毛菇的生长。Oh *et al.* (2019)在外生菌根真菌松茸 *Tricholoma matsutake* 蘑菇圈上分离出被孢霉属 *Mortierella* 和毛霉属 *Mucor*, 它们产生的代谢产物能够促进松茸生长。本研究中这 2 个属也是丰度排名前 20 的真菌(图 4B), 这些真菌可能也有利于西藏黄绿卷毛菇生长,但目前还未有人针对真菌对黄绿卷毛菇的影响进行研究,因此后续将进一步完成真菌促进黄绿卷毛菇生长和菌根形成研究。

分子系统发育分析认为黄绿卷毛菇的青海、西藏和四川地理群分布在不同谱系(谢占玲等 2015)。Xing *et al.* (2018)研究了青海黄绿卷毛菇生境微生物群落,本研究讨论了西藏黄绿卷毛菇生境微生物群落,另外还需扩展分析四川康定黄绿卷毛菇土壤微生物群落组成,经过三地的对比,完善各个支系黄绿卷毛菇潜在促生菌的挖掘,为濒危珍稀物种黄绿卷毛菇各个种群的生长、繁衍和可持续利用奠定基础。

致谢: 感谢中国科学院微生物研究所助理研究员姜霖航和北京林业大学博士赵恒对本研究分析方法上的指导和帮助。

[REFERENCES]

- Cai X, Zhang Y, Wang XL, 2013. Study on medium optimization of yellow-green *Armillaria luteovirens* and condition of artificial culture. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 19(20): 33-34 (in Chinese)
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R, 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5): 335-336
- Chen B, Shen J, Zhang X, Pan F, Yang X, Feng Y, 2014. The endophytic bacterium, *Sphingomonas* SaMR12, improves the potential for zinc phytoremediation by its host, *Sedum alfredii*. *PLoS One*, 9(9): e106826
- Chen HB, Boutros PC, 2011. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics*, 12(1): 35
- Chen HY, 2016. Progress of research on medicinal values of *Armillaria luteovirens*. *Journal of Lishui University*, 38(2): 74-77 (in Chinese)
- Chen LH, Yan W, Liu J, 2002. Preliminary study of the effects of fairy ring of grassland on the growth of herbage. *Acta Botanica Sinica of Northwest China*, 22(6): 141-145 (in Chinese)
- Cresswell PA, Hayes WA, 1979. Further investigation on the bacterial ecology of the casing layer. *Mushroom Science*, 10(1): 347-359
- Curto S, Favelli F, 1972. Stimulative effect of certain microorganisms (bacteria, yeasts and microalgae) upon fruit-body formation of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *Mushroom Science*, (8): 67-74
- Dai YC, Yang ZL, 2008. A revised checklist of medicinal fungi in China. *Mycosystema*, 27: 801-824 (in Chinese)
- Dai YC, Zhou LW, Yang ZL, Wen HA, Bau T, Li TH, 2010. A revised checklist of edible fungi in China. *Mycosystema*, 29(1): 1-21 (in Chinese)
- Diao ZM, 1997. A preliminary study on the nutritive and physiological characteristics of *Armillaria luteovirens* hypha. *Journal of Microbiology*, 17(1): 14-17 (in Chinese)
- Ding CY, Zheng Y, Ren XM, Chen Z, 2016. Changes in bacterial community composition during the remediation of Cd-contaminated soils of bioenergy crops. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 8(36): 3009-3016
- Groth D, Hartmann S, Klie S, Selbig J, 2013. Principal components analysis. *Methods in Molecular Biology*, 930: 527-547
- Huang QH, 1985. Artificial cultivation of *Armillaria luteovirens*. *Edible Mushrooms*, 1: 32 (in Chinese)
- Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, Jones SJ, Marra MA, 2009. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Research*, 19(9): 1639-1645
- Kühndorf K, Münzenberger B, Begerow D, Gómez-Laurito J, Hüttl RF, 2016. Arbutoid mycorrhizas of the genus *Cortinari* from Costa Rica. *Mycorrhiza*, 26(6): 497-513
- Liu HZ, Wang HX, Liu QH, Feng K, 2007. A preliminary study on the culture conditions of *Armillaria luteovirens* hypha. *Edible Fungi of China*, 26(4): 16-19 (in Chinese)
- Liu K, Jiang J, Zheng QP, He J, 2019. Research progress on *Floccularia luteovirens*. *Edible Fungi of China*, 38(5): 1-5, 12 (in Chinese)
- Liu L, Lin YX, Chen ZM, Liu PW, 2013. Research progress

- on *Armillaria luteovirens*. Fujian Textile, 8(8): 23-28 (in Chinese)
- Maidak BL, Larsen N, Mccaughey MJ, Overbeek R, Olsen GJ, Fogel K, Bland J, Woese CR, 1994. The ribosomal database project. Nucleic Acids Research, 22(17): 3485-3487
- Monard C, Gantner S, Stenlid J, Sveriges L, 2013. Utilizing ITS1 and ITS2 to study environmental fungal diversity using pyrosequencing. FEMS Microbiology Ecology, 84(1): 165-175
- Niskanen T, Liimatainen K, Ammirati JF, Hughes K, 2017. *Cortinarius* section *Sanguinei* in North America. Mycologia, 105(2): 344-356
- Oh S, Park MS, Lim YW, 2019. The influence of microfungi on the mycelial growth of ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake*. Microorganisms, 7(6): 169
- Peng L, Shan X, Wang Y, Martin F, Vilgalys R, Yuan Z, 2021a. Hybrid genome assembly and gene repertoire of the root endophyte *Clitopilus hobsonii* QYL-10 (Entolomataceae, Agaricales, Basidiomycetes). Molecular Plant-Microbe Interactions, 34(6): 711-714
- Peng L, Shan X, Yang Y, Wang Y, Druzhinina IS, Pan X, Jin W, He X, Wang X, Zhang X, Martin FM, Yuan Z, 2021b. Facultative symbiosis with a saprotrophic soil fungus promotes potassium uptake in American sweetgum trees. Plant, Cell & Environment, 44(8): 2793-2809
- Picard C, Bosco M, 2003. Soil antimony pollution and plant growth stage affect the biodiversity of auxin-producing bacteria isolated from the rhizosphere of *Achillea ageratum* L. FEMS Microbiology Ecology, 46(1): 73-80
- RDC Team, 2020. R: a language and environment for statistical computing. Version 3.6.3. User's guide and application. <https://www.r-project.org/>
- Rincón-Molina CI, Martínez-Romero E, Ruiz-Valdiviezo VM, Velázquez E, Ruiz-Lau N, Rogel-Hernández MA, Villalobos-Maldonado JJ, Rincón-Rosales R, 2020. Plant growth-promoting potential of bacteria associated to pioneer plants from an active volcanic site of Chiapas (Mexico). Applied Soil Ecology, 146: 103390
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F, 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ, 4: e2584
- Timmusk S, Paalme V, Pavlicek T, Bergquist J, Vangala A, Danilas T, Nevo E, 2011. Bacterial distribution in the rhizosphere of wild barley under contrasting microclimates. PLoS One, 6(3): e17968
- Wang F, Tolgor B. 2014. Research advances in the diversity of soil fungi. Journal of Fungal Research, 12(3): 178-186 (in Chinese)
- Wang QL, Jiang WB, Chen B, 2005. Effects of fairy ring growth of *Armillaria luteovirens* on soil fertility and plant community. Chinese Journal of Ecology, 24(3): 269-272 (in Chinese)
- Wang X, Yu S, Zhou L, Fu S, 2016. Soil microbial characteristics and the influencing factors in subtropical forests. Acta Ecologica Sinica, 36: 8-15
- Wei YL, 2002. Preliminary study on artificial cultivation of wild *Armillaria luteovirens*. Journal of Qinghai Meteorology, 2002(2): 19-24 (in Chinese)
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. Fungal Diversity, 98: 1-76
- Xie ZL, Tian F, Yu J, Nie SY, Zhao LZ, Zhang JW, Lei YN, Guo J, 2015. The genetic structure analysis of *Floccularia luteovirens* using LUS and ITS assay. Mycosystema, 34(1): 26-37 (in Chinese)
- Xie ZL, Zhao LZ, Li Y, Lei JQ, Zhang FM, 2016. The correlation of geographic distribution and ecological environment of endemic species *Floccularia luteovirens* on Qinghai-Tibet Plateau. Acta Ecologica Sinica, 36(10): 2851-2857 (in Chinese)
- Xing R, Yan H, Gao Q, Zhang F, Wang J, Chen S, 2018. Microbial communities inhabiting the fairy ring of *Floccularia luteovirens* and isolation of potential mycorrhiza helper bacteria. Journal of Basic Microbiology, 58(6): 554-563
- Xu M, Xing R, Gao Q, Zhang F, Chen S, 2020. Isolation and characterization of the mycorrhiza helper bacteria from the fairy rings of *Floccularia luteovirens*. Research Square, doi:10.21203/rs.3.rs-47548/v1
- Zhao Y, Zhang M, Yang W, Di HJ, Ma L, Liu W, Li B, 2019. Effects of microbial inoculants on phosphorus and potassium availability, bacterial community composition, and chili pepper growth in a calcareous soil: a greenhouse study. Journal of Soils and Sediments, 19(10): 3597-3607
- Zhou JS, Xiong HY, Sheng HY, Jiao YC, Yang CJ, 2007. Effects of growth regulator on hypha growth of *Armillaria luteovirens*. Chinese Journal of Edible Fungi, 14(3): 44-46 (in Chinese)
- Zhou LY, 2010. Review on the research of *Armillaria luteovirens*. Anhui Agricultural Science Bulletin, 16(3): 52-60 (in Chinese)
- Zhou X, Zhang J, Pan D, Ge X, Jin X, Chen S, Wu F, 2018. p-Coumaric can alter the composition of cucumber rhizosphere microbial communities and induce negative plant-microbial interactions. Biology and Fertility of Soils, 54(3): 363-372
- Zhu JF, Diao ZM, Wang SC, Jiang QH, Wu BF, 2004. Effects of different nutrient conditions on hyphal growth of

Armillaria luteovirens. Qinghai Province Science and Technology, 11(6): 28-30 (in Chinese)

[附中文参考文献]

- 蔡箫, 张颖, 王晓立, 2013. 黄绿蜜环菌培养基优化及人工培养条件研究. 安徽农学通报, 19(20): 33-34
- 陈海燕, 2016. 黄绿蜜环菌药用价值的研究进展. 丽水学院学报, 38(2): 74-77
- 陈立红, 阎伟, 刘建, 2002. 草原蘑菇圈对牧草长势影响的初步分析. 西北植物学报, 22(6): 141-145
- 戴玉成, 杨祝良, 2008. 中国药用真菌名录及部分名称的修订. 菌物学报, 27: 801-824
- 戴玉成, 周丽伟, 杨祝良, 文华安, 图力古尔, 李泰辉, 2010. 中国食用菌名录. 菌物学报, 29(1): 1-21
- 刁治民, 1997. 黄绿蜜环菌菌丝营养生理特性的初步研究. 微生物学杂志, 17(1): 14-17
- 黄强华, 1985. 人工培养黄绿蜜环菌. 食用菌, 1: 32
- 柳焕章, 王贺祥, 刘庆红, 冯昆, 2007. 黄绿蜜环菌菌丝体培养条件初探. 中国食用菌, 26(4): 16-19
- 刘昆, 蒋俊, 郑巧平, 何捷, 2019. 黄绿卷毛菇研究进展. 中国食用菌, 38(5): 1-5, 12
- 刘琳, 林源晓, 陈志明, 刘潘炜, 2013. 黄绿蜜环菌的研究进展. 福建轻纺, 8(8): 23-28
- 王芳, 图力古尔, 2014. 土壤真菌多样性研究进展. 菌物研究, 12(3): 178-186
- 王启兰, 姜文波, 陈波, 2005. 黄绿蜜环菌蘑菇圈生长对土壤及植物群落的影响. 生态学杂志, 24(3): 269-272
- 魏永林, 2002. 野生黄蘑菇人工栽培试验初探. 青海气象, 2002(2): 19-24
- 谢占玲, 田飞, 余静, 聂守一, 赵联正, 张佳伟, 雷亚男, 郭璟, 2015. 基于 LUS 和 ITS 的青藏高原黄绿卷毛菇种群遗传多样性分析. 菌物学报, 34(1): 26-37
- 谢占玲, 赵联正, 李椰, 雷洁琼, 张凤梅, 2016. 青藏高原特有种黄绿卷毛菇的地理分布与生态环境的相关性. 生态学报, 36(10): 2851-2857
- 周劲松, 熊辉岩, 盛海彦, 焦迎春, 杨春江, 2007. 生长调节剂对黄绿蜜环菌菌丝生长的影响. 食用菌学报, 14(3): 44-46
- 周连玉, 2010. 黄绿蜜环菌的研究概述. 安徽农学通报, 3(16): 52-60
- 朱锦福, 刁治民, 王生财, 姜秋会, 吴保锋, 2004. 不同营养条件对黄蘑菇菌丝生长的影响. 青海科技, 11(6): 28-30