

杉木根系接种 AMF 染色条件的筛选及观察

许静静^{1,2}, 田云龙^{1,2}, 魏 博^{1,2}, 马祥庆^{1,2}, 吴鹏飞^{1,2*}

(1. 福建农林大学 林学院, 福建 福州 350002; 2. 福建省杉木种质创新工程研究中心, 福建 福州 350002)

摘 要:丛枝菌根真菌(AMF)侵染情况观察是深入研究植物根系与土壤微生物共生机制的重要基础。以杉木同一无性系 1 年生幼苗为研究对象,在接种根内球囊霉(*Glomus intraradices*, Gi)3 个月,基于经典的台盼蓝染色法,利用正交试验设计,对影响杉木根系染色效果的 KOH 浓度、温度以及染色时间等主要因素进行优化研究,比较分析杉木不同根序的 AMF 侵染率差异性规律。结果表明,对于杉木幼苗 1 级根,筛选出 20% 的 KOH 浓度、水煮温度 90 ℃ 和染色时间 30 min 这一组合的染色效果较好,显微制片中的根系皮层组织细胞、菌丝结构清晰;对于杉木 2 级根,采用 20% KOH 浓度、水煮温度 96 ℃ 和染色时间 10 min 处理下的染色效果较好;相对木质化程度最高的 3 级根,采用 20% KOH 浓度、水煮温度 100 ℃、染色时间 30 min 或 10% KOH 浓度、水温 96 ℃、染色时间 20 min 这 2 种组合的染色效果较好。与杉木幼苗 1 级根和 3 级根相比,2 级根的 AMF 侵染率明显较高($P < 0.05$)。

关键词:杉木;根级;丛枝菌根真菌;染色方法;侵染率

中图分类号:S718.8 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2023)04-0166-07

Screening and Observation of AMF Staining Conditions for Chinese Fir Roots Inoculation

XU Jing-jing^{1,2}, TIAN Yun-long^{1,2}, WEI Bo^{1,2}, MA Xiang-qing^{1,2}, WU Peng-fei^{1,2*}

(1. Forestry College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China;

2. Fujian Engineering Research Center of Chinese Fir Germplasm Enhancement, Fuzhou 350002, Fujian, China)

Abstract: The observation of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) infection is an important basis for the further study of the symbiotic mechanisms between plant root system and soil microorganisms. In this study, objected with annual seedlings cultivated from the same Chinese fir clone, using an orthogonal test design based on the classical Taipan Blue staining method, the main factors of the staining effect in Chinese fir root system tissues, including KOH concentration, boiling water temperature and staining time were optimized respectively, after the tested seedlings were inoculated with *Glomus intraradices* (Gi) for three months. Furthermore, the differences of AMF infection rate among different root orders were compared and analyzed. Main results showed that the combination conditions with 20% KOH concentration, water temperature of 90 ℃ and staining time of 30 min were better for the first order roots of Chinese fir seedlings, and both of the cellular and mycelial structures of the root cortex in the microfilm were clear. For the second order of Chinese fir roots, the staining effect was better under the treatment with 20% KOH concentration, water temperature of 96 ℃ and staining time of 10 min. Both of the two combination conditions of 20% KOH concentration, water temperature of 100 ℃ and staining time of 30 min or 10% KOH concentration, water temperature of 96 ℃ and staining time of 20 min were more effective in staining the tertiary roots with the highest relative lignification. Compared with the first or third order of Chinese fir roots,

收稿日期:2022-05-20 修回日期:2022-07-04

基金项目:福建省自然科学基金重点项目(2020J02029);福州市科学技术局科技计划项目(2021-P-035)。

第一作者:许静静。研究方向:水土保持。E-mail: xujj0221@foxmail.com

* 通信作者:吴鹏飞,教授,博士,博士生导师。研究方向:森林培育和水土保持。E-mail: ffwupengfei@126.com

AMF infestation rate in the second order root was significantly higher ($P<0.05$).

Key words: Chinese fir; root order; arbuscular mycorrhizal fungus; staining method; infection rate

杉木(*Cunninghamia lanceolata*)是我国南方重要造林用材树种,但其生产力因多代连栽、土壤有效磷匮乏等问题日趋下降^[1-3]。大量研究表明,菌根真菌的侵染有利于植物对 N、P、K 等矿质营养元素的吸收,也可显著增强其抗逆、抗病性^[4-5]。卢妮妮等^[6]研究发现丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhiza fungi, AMF)中的球囊霉属(*Glomus*)类群易与杉木根系共生;景跃波等^[7]认为乡土菌种能够促进杉木幼苗生长。随着林分年龄的增加,杉木根系 AMF 的侵染以及孢子密度呈逐渐增加的趋势^[8]。与杉木纯林相比,杉木与火力楠(*Michelia macclurei*)混交林土壤中菌根真菌孢子数明显较多,土壤中铵态氮和钾含量也随之增加,进而促进了杉木生长^[9]。可见,开展杉木菌根真菌研究对维持杉木人工林可持续经营具有重要意义,但目前研究多集中于杉木根际土壤方面,通过菌根侵染规律挖掘 AMF 促进杉木生长内在影响机制的研究甚少,尤其是有关其根系 AMF 侵染观察方法还未成熟。

早在 1970 年 Phillips 等^[10]建立了台盼蓝(Trypan blue)染色法来观察 AMF 的侵染与发育状况,后经过许多学者的改进和发展,根据植物根系类型的差异提出了不同的染色方法。由于草本植物根系较幼嫩,木质化程度较轻,采用浓度过高的碱液($>10\%$ KOH 溶液)或处理时间过长(>60 mins),根系皮层细胞结构会被破坏,染色后难以观察和区分。与之相比较,木本植物根系较为庞大,且不同根级组织的生物学功能、显微结构以及养分含量等方面均存在较大差异^[11-12],这必然造成同一树种根系

不同根级样品的透明、染色处理条件存在差异,从而影响 AMF 染侵率、菌丝发育及泡囊定殖情况等指标的观察与测定。

鉴于此,本研究选择同一杉木无性系幼苗为材料,针对台盼蓝染色法中 KOH 溶液浓度、温度和染色时间等关键因素,采用 4 因素 3 水平正交试验设计,分别对杉木不同根级进行染色处理,比较分析不同处理条件下菌根显微结构清晰度、着色和透明度等染色效果指标的差异性,结合不同根级的菌根侵染率测定,拟筛选出杉木不同根级的染色方法,为开展相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选择福建省洋口国有林场培育的 1 a 生杉木无性系(洋-061)为研究对象,该无性系具速生高抗的特点^[13]。参试材料生长良好,试验初始苗高(17.27 ± 1.72)cm、地径(2.85 ± 0.52)mm。

1.2 研究方法

1.2.1 盆栽试验设计 采用长 29 cm、宽 16 cm、高 12.5 cm 的聚乙烯材质花盆于福建农林大学科技园温室大棚内进行室内盆栽试验。培养基质为接种 0.1 kg 根内球囊霉(*Glomus intraradices*)的灭菌土^[14],菌种由北京蔬卉科技有限责任公司提供。其中,灭菌土由红壤与洗净河沙按体积比 3:1 均匀混合组成,以防止土壤板结,每盆装 2.8 kg。不同培养基质基本理化性质如表 1 所示。

表 1 培养基质的基本理化性质

Table 1 Basic physical and chemical properties of culture media

培养基质	有效磷含量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	速效钾/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	铵态氮/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	硝态氮/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	pH
灭菌土	5.61 ± 0.23	16.73 ± 4.43	2.76 ± 0.20	13.23 ± 1.66	5.34 ± 0.16
根内球囊霉菌种土与灭菌土的混合基质	6.18 ± 0.69	16.7 ± 2.67	3.10 ± 0.13	13.69 ± 0.36	5.59 ± 0.08

参试杉木幼苗在盆栽种植之前,用 0.5% NaClO 溶液对根系表面消毒 5 s,再用无菌水反复冲洗。为保证试验期间杉木幼苗的正常生长,每隔 7 d 浇 1 次不含磷素的 Hoagland's 1/4 营养液,每盆每次浇 400 mL。利用 KCl 来补充平衡不同供磷处理间 K^+ 含量的差异。每 2 d 午后浇纯水 400 mL。温室大棚室温 $19\sim32\text{ }^{\circ}\text{C}$,光照 12 h/d,相对湿度 $>60\%$ 。盆栽 3 个月进行收获,取杉木幼苗完整根系、洗净、取样用于菌根显微结构制片效果及侵染率的

观察与测定。

按照 Pregizter 等^[15]提出的方法对杉木幼苗根系进行分级处理,将最前端具有根尖的根定义为 1 级根,1 级根的母根定义为 2 级根,2 级根的母根定义为 3 级根。每个根级分别取根样 8~10 条,剪成 1 cm 根段,按照正交试验设计进行分组,每个根级随机挑选 40 条根段,共 27 组,进行制片及侵染率测定观察。

1.2.2 根系 AMF 侵染情况镜检条件设计 基于

台盼蓝 Trypan blue 染色方法^[10],采用 4 因素 3 水平正交试验设计(表 2),对 AMF 菌种侵染的杉木幼苗根系进行染色观察,分析比较不同根序组织的侵染率。即 KOH 浓度(因素 C): C_1 (2%)、 C_2 (10%)和 C_3 (20%)3 个水平;水煮温度(因素 T): T_1 (90℃)、 T_2 (96℃)和 T_3 (100℃)3 个水平,但对于杉木 1 级根系,由于其组织较为细嫩,根段容易煮烂,故温度设置梯度为 T_1 (70℃)、 T_2 (80℃)和 T_3 (90℃)3 个水平;染色时间(因素 S): S_1 (10 min)、 S_2 (20 min)和 S_3 (30 min)3 个水平。

表 2 杉木根系 AMF 侵染情况镜检的正交试验 $L_9(3^4)$ 设计

Table 2 Orthogonal test $L_9(3^4)$ design for microscopic examination of Chinese fir roots infected by AMF

处理	因素				试验指标 X_i
	KOH 浓度	温度	染色时间	空列	
Z1	C_3	T_3	S_3	CK ₁	X_1
Z2	C_3	T_1	S_2	CK ₃	X_2
Z3	C_2	T_3	S_1	CK ₃	X_3
Z4	C_1	T_1	S_1	CK ₁	X_4
Z5	C_1	T_3	S_2	CK ₂	X_5
Z6	C_1	T_2	S_3	CK ₃	X_6
Z7	C_2	T_1	S_3	CK ₂	X_7
Z8	C_3	T_2	S_1	CK ₂	X_8
Z9	C_2	T_2	S_2	CK ₁	X_9

1.2.3 菌根侵染率测定 对于不同处理条件下的杉木根系样品,分别采用储存溶液(99%乙醇:60%乙酸=3:1)固定 4 h 之后,利用去离子水冲洗干净,加入表 2 设定浓度的 KOH 溶液进行加热 45 min 以上,至根系组织完全透明;用去离子水洗去 KOH,加入 2% HCl 溶液酸化 30 min;再次利用去离子水冲洗干净,加入 0.05% Trypan blue 溶液染色;经表 2 设定的染色时间,洗去染色剂,加入脱色液脱色,制片,利用镜检法观察。

1.2.4 菌根侵染情况观察 如表 3 所示,对镜片的染色效果进行等级划分与评价^[16-17]。为筛选出较优的杉木根系接种 AMF 染色条件,本研究仅将染色结果优良(G_0)和一般(G_1)的根系样品即视为已有菌根侵染。

表 3 杉木根系 AMF 侵染情况的染色效果等级划分

Table 3 Classification on staining effect of AMF infection in Chinese fir roots

评判等级	根系染色结果情况
优良(G_0)	AMF 着色,清晰可见,与根部细胞反差明显
一般(G_1)	AMF 着色,与根部细胞反差明显,细胞内含物未被透明完全
较差(G_2)	AMF 着色,反差极其不明显,大量细胞内含物着色,影响对菌根结构观察

1.3 数据统计与分析

利用 SPSS(19.0)数据统计软件进行 4 因素 3 水平正交试验设计(表 2)。根据正交试验中杉木菌根根序分级染色的清晰度情况调查结果,通过直观分析法,得到 R 值(同一因素不同水平影响指数的极差)与 K 值(影响指数,即代表的同一因素同一水平试验值的平均数),结合不同根序组织染色效果及制片清晰度,筛选出适合不同杉木根序的最优染色处理组合。菌根侵染率(%)以菌根侵染样品数量与待测根系样品总量的百分比表示。

试验数据采用 Excel 2010 软件进行处理,利用 SPSS(19.0)进行单个因素 ANOVA 的方差分析以及一般线性模型中单变量分析,利用 LSD 多重比较方法进行检验($P=0.05$)。采用 Origin 2021 软件将所有数据结果以平均值±标准误差表示,不同字母分别代表不同处理间有显著差异($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 杉木不同根序菌根染色处理方法的筛选

根据杉木根系 AMF 侵染情况的染色效果等级划分(表 3), G_0 等级观察的结果效果最好,染色效果组合筛选以 G_0 为依据。从杉木 1 级根的染色效果来看(表 4),不同影响因素的 R 排序为: R (温度)=25.33, R (KOH 浓度)=22.67, R (染色时间)=6.67,即温度在 G_0 评判等级中对最优组合的筛选起着重要的影响。最佳组合的选取应选择 K 所代表的平均数大的水平的试验指标,因此,在表 2 的正交设计组合中,杉木 1 级根的优化搭配为 Z1 处理($C_3T_3S_3$)。

表 4 $L_9(3^4)$ 杉木幼苗不同根级菌根染色等级直观分析结果比较

Table 4 $L_9(3^4)$ comparison of visual analysis results of AMF staining of different Chinese fir root orders

根级	因素	G_0 (%)			
		K_1	K_2	K_3	R
1 级根	KOH 浓度	15.33	30.00	38.00	22.67
	温度	23.33	17.33	42.67	25.33
	染色时间	27.33	24.67	31.33	6.67
2 级根	KOH 浓度	17.33	30.00	42.67	25.33
	温度	26.67	33.33	30.00	6.67
	染色时间	35.33	20.00	34.67	15.33
3 级根	KOH 浓度	14.67	32.67	33.33	18.67
	温度	23.33	28.00	29.33	6.00
	染色时间	16.67	28.00	36.00	19.33

注: K_1 、 K_2 和 K_3 分别表示同一个影响因素不同水平的影响指数; R 表示同一影响因素不同影响指数的极差。

对于杉木 2 级根而言,不同影响因素的 R 排序为: R (KOH 浓度)=25.33, R (染色时间)=15.33,

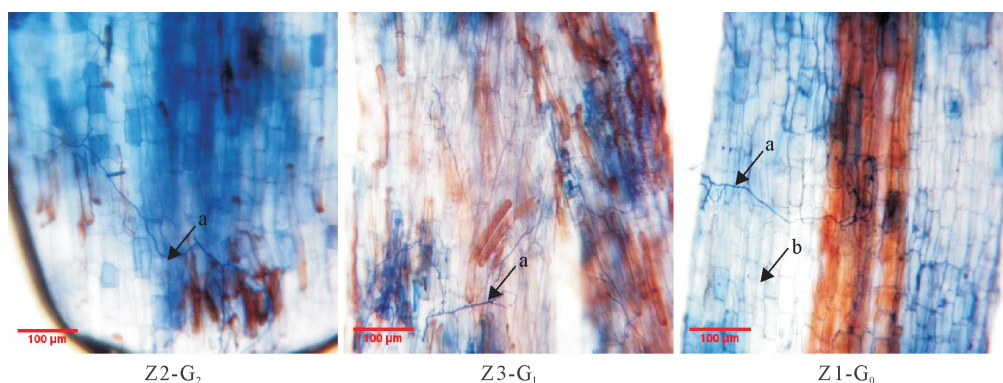
$R(\text{温度})=6.67$, 即 KOH 浓度在 G_0 评判等级中对最优组合的筛选起着重要的影响(表 4), 其最佳染色方法为 Z8 处理($C_3T_2S_1$); 而杉木 3 级根的染色效果来看, $R(\text{染色时间}) > R(\text{KOH 浓度}) > R(\text{温度})$, 其优化搭配方法为 Z1 处理($C_3T_3S_3$)。

2.2 杉木不同根级 AMF 侵染效果的观察

在不同根级 AMF 侵染的组合中, 部分处理条件下, 制片清晰度较差, 影响菌根结构观察, 故仅对染色评判等级 G_0 、 G_1 、 G_2 代表加以展示(图 1—图 3)。结合图 1 杉木 1 级根系 AMF 侵染效果可以看出, Z1 处理条件下(20% 的 KOH 浓度, 温度控制在 90°C , 染色时间 30 min)染色效果较好, 根系皮层组织细胞、菌丝结构清晰, 根系皮层组织细胞内含物被透明, 不会干扰菌根的观察。Z3 处理(10% 的 KOH 浓度, 温度控制在 90°C , 染色时间 10 min)染色效果与 Z1 相近, 也能观察到较为清晰的菌丝, 但根系

皮层组织细胞内含物透明不够, 若为节省时间可以选用此组合。

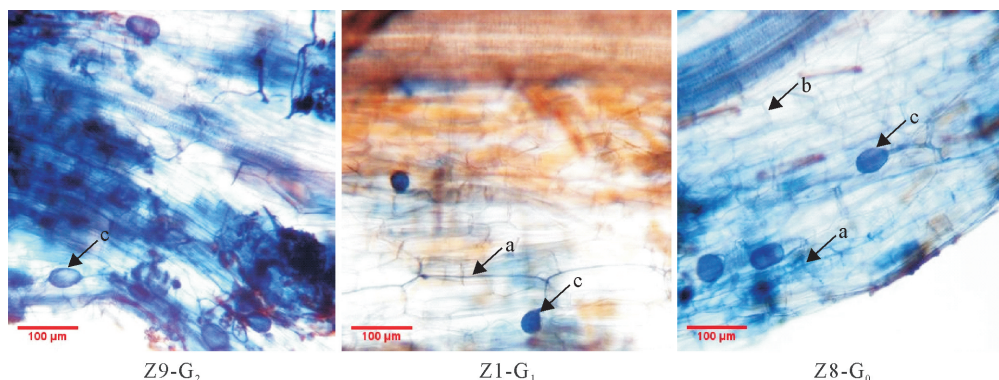
结合图 2 杉木 2 级根系 AMF 侵染效果可以看出, Z8 处理(20% 的 KOH 浓度, 温度控制在 96°C , 染色时间 10 min)染色效果较好。脱色后, 位于根系皮层组织区域的细胞与菌丝二者间色彩反差明显, 能够较清晰地分辨出菌丝。在 10 倍镜下, 能清晰观察到孢囊定殖于细胞间质或皮层组织, 根系皮层组织细胞、菌丝、孢囊结构清晰。对于杉木 3 级根而言, 结合图 3 根系 AMF 侵染效果可以看出, Z1 处理(20% 的 KOH 浓度, 温度控制在 100°C , 染色时间 30 min)、Z9 处理(10% 的 KOH 浓度, 温度控制在 96°C , 染色时间 20 min)染色效果均较好; 根系皮层组织细胞、菌丝、孢囊结构清晰, 其中, 根系皮层组织细胞内含物透明效果好, 不会干扰对菌根的观察。根内球囊霉孢囊(孢子)局部放大图见图 4。



显微放大倍数为 $10\times$, a 代表丛枝菌根菌丝; b 代表根系皮层组织细胞细胞壁结构。

图 1 杉木 1 级根系 AMF 侵染效果

Fig. 1 AMF infection effect of Chinese fir primary root system



显微放大倍数为 $10\times$, a 代表丛枝菌根菌丝; b 代表根系皮层组织细胞细胞壁结构; c 代表孢囊(孢子)。

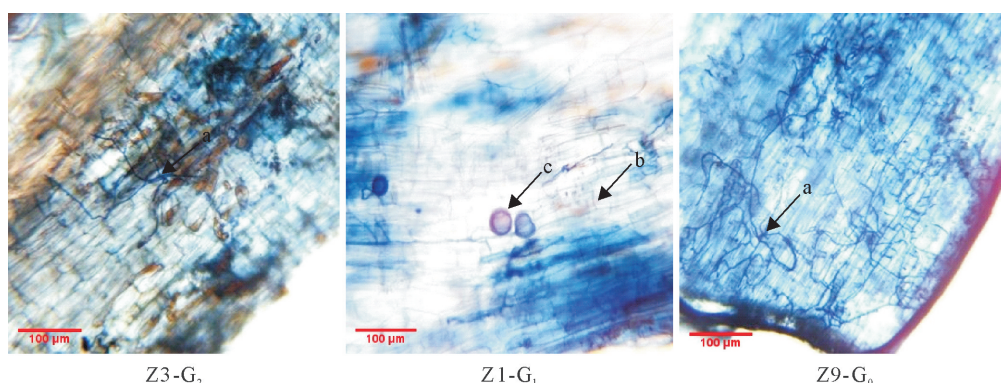
图 2 杉木 2 级根系 AMF 侵染效果

Fig. 2 AMF infection effect of Chinese fir second-order root system

2.3 杉木不同根级 AMF 侵染率的比较

从图 5 可见, 杉木不同根级 AMF 侵染率的差异达显著水平($P < 0.05$), 其中杉木 2 级根侵染率

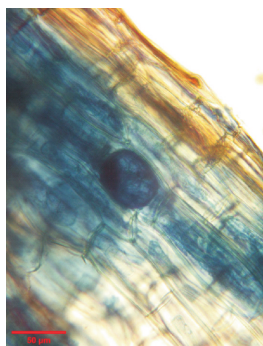
最高, 高达 14.50%, 为 1 级根侵染率的 3.17 倍, 2 级根侵染率的 2.11 倍。结果表明根内球囊霉易于在杉木 2 级根内定殖生长。



显微放大倍数为 $10\times$, a 代表丛枝菌根菌丝; b 代表根系皮层组织细胞细胞壁结构; c 代表泡囊(孢子)。

图3 杉木3级根系 AMF 侵染效果

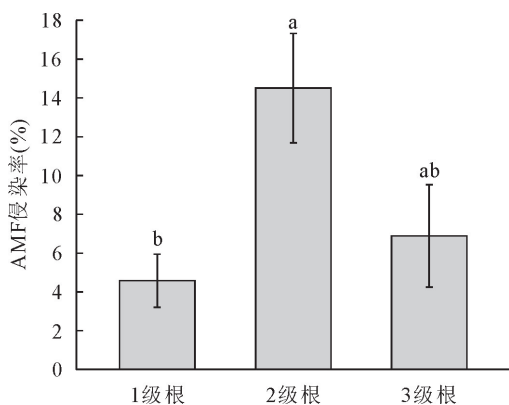
Fig. 3 AMF infection effect of Chinese fir third grade roots



显微放大倍数为 $40\times$ 。

图4 根内球囊霉泡囊(孢子)观察

Fig. 4 Observation of vesicles (spores) of *Glomus intraradices*



不同小写字母代表处理间具有显著差异($P<0.05$)。

图5 杉木幼苗根系不同根序级别 AMF 侵染率

Fig. 5 AMF infection rate at different root orders in Chinese fir seedlings

3 结论与讨论

本研究通过对杉木幼苗不同根级组织的染色观察,筛选出了杉木不同根级 AMF 侵染染色处理的较优组合。对 2 级根而言,筛选出 20% 的 KOH 浓度,温度控制在 $96\text{ }^{\circ}\text{C}$,染色时间 10 min 这一组合的染色效果较好。与杉木幼苗 1 级根和 3 级根相比,2

级根的 AMF 侵染率明显较高($P<0.05$),为今后深入研究杉木根系生长发育与 AMF 侵染过程的内在互作机制提供重要依据。

菌根染色是观察 AMF 侵染根系结构情况的基础^[18],其效果直接影响试验结果的准确性。本研究表明,对于组织细嫩的杉木 1 级根,采用 20% 的 KOH 浓度,水煮温度控制在 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$,染色时间 30 min 这一组合的染色效果好,可观察到清晰的根系细胞、泡囊结构及菌丝结构;而对于木质化程度逐渐增强的 2 级根、3 级根,则应分别采取不同方法进行染色处理。当不同根级样品采用各自最优处理方法进行制片时,其 AMF 侵染率也存在显著差异。从图 5 可见,根内球囊霉对杉木 2 级根的侵染率显著高于 1 级根和 3 级根。这进一步说明丛枝菌根真菌与植物形成共生结构时,AMF 结构特征与其功能密切相关^[19]。

从杉木不同根级组织解剖结构及其生理功能上的差异来推测,杉木 1 级根细胞间排列紧凑、皮层薄壁细胞数目多且细胞间隙小,皮层组织发达、养分含量高、代谢快、对土壤中的养分吸收速率高,在根系中主要承担吸收功能^[12],不利于 AMF 菌丝在根系组织内定殖与生长。Wu 等^[20]研究发现杉木距根尖 10~15 mm 的根段未发现有皮层溶解的情况,观察到其细胞间排列紧凑且细胞间隙小,从根系内部结构上推测可能并未提供给 AMF 充足生长空间。随着根级的加大,杉木 2 级根多为成熟区组织,该区域皮层组织细胞疏松,排列不规则,特别是在低磷逆境条件下,杉木根系成熟区皮层组织细胞溶解明显^[20-21],一方面因皮层组织细胞溶解释放的磷素在体内循环利用加快^[22];另一方面因皮层组织细胞溶解形成更大的空间,可能有利于 AMF 的侵染。

本研究表明,丛枝菌根真菌对杉木 2 级根侵染程度最高,这与刘润进等^[23]研究 AMF 对白车轴草

(*Trifolium repens*)根系不同功能区侵染率以及吴强盛等^[24]研究 AMF 对枳(*Poncirus trifoliata*)2 级根侧根侵染率的结果大体一致。相比较而言,杉木 3 级根的侵染率较低,这可能与 3 级根皮层组织退化、维管束逐渐发达有关,该根级组织细胞代谢开始变慢,养分吸收速率低,主要承担运输和储藏功能^[12]。可见,功能改变可能引起菌根真菌和宿主植物在互利共生关系中“成本-收益”平衡的打破^[25-26],这是否会导致菌根真菌有选择性地寻找利于自己生长的位置?但也有学者猜测共生菌根在平衡被打破后,对植物的作用将变成是消极的寄生^[27],甚至会病理性地增加侵染强度,这还需要进一步深入研究和探讨。

参考文献:

- [1] 索沛衡,杜大俊,王玉哲,等.杉木连栽对土壤氮含量和氮转化酶活性的影响[J].森林与环境学报,2019,39(2):113-119.
SUO P H, DU D J, WANG Y Z, *et al.* Effects of successive rotation Chinese fir plantations on soil nitrogen content and soil enzyme activities related to nitrogen transformation[J]. Journal of Forest and Environment, 2019, 39(2): 113-119. (in Chinese)
- [2] 夏丽丹,于姣姐,邓玲玲,等.杉木人工林地力衰退研究进展[J].世界林业研究,2018,31(2):37-42.
XIA L D, YU J D, DENG L L, *et al.* Researches on soil decline of Chinese fir plantation[J]. World Forestry Research, 2018, 31(2): 37-42. (in Chinese)
- [3] YU Y C, YANG J Y, ZENG S C, *et al.* Soil pH, organic matter, and nutrient content change with the continuous cropping of *Cunninghamia lanceolata* plantations in South China[J]. Journal of Soils and Sediments, 2017, 17(9): 2230-2238.
- [4] 袁志林,潘雪玉,靳微.林木共生菌系统及其作用机制——以杨树为例[J].生态学报,2019,39(1):381-397.
YUAN Z L, PAN X Y, JIN W. Tree-associated symbiotic microbes and underlying mechanisms of ecological interactions: a case study of poplar[J]. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(1): 381-397. (in Chinese)
- [5] 赖文珍,王思佳,胡文涛,等.华南主要树木丛枝菌根真菌物种多样性调查研究[J].西北林学院学报,2018,33(6):171-179.
LAI W Z, WANG S J, HU W T, *et al.* Investigation on species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi occurring in the main tree species in Southern China[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2018, 33(6): 171-179. (in Chinese)
- [6] 卢妮妮,张鹏,徐雪蕾,等.杉木林地土壤微生物研究进展[J].世界林业研究,2017,30(5):8-12.
LU N N, ZHANG P, XU X L, *et al.* A review of soil microorganisms in Chinese fir forest[J]. World Forestry Research, 2017, 30(5): 8-12. (in Chinese)
- [7] 景跃波,卯吉华,李荣波,等.杉木人工林丛枝菌根真菌群落多样性及苗期接种效应[J].西部林业科学,2020,49(6):100-106.
JING Y B, MAO J H, LI R B, *et al.* Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in *Cunninghamia lanceolata* plantation and their effects on growth of seedlings[J]. Journal of West China Forestry Science, 2020, 49(6): 100-106. (in Chinese)
- [8] 崔莉娜,郭弘婷,李维扬,等.不同林龄杉木人工林菌根侵染特征研究[J].生态学报,2019,39(6):1926-1934.
CUI L N, GUO H T, LI W Y, *et al.* Study on the characteristics of mycorrhizal colonization in Chinese fir plantations at different ages[J]. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(6): 1926-1934. (in Chinese)
- [9] 周崇莲,吴文芳,齐玉臣.杉木和火力楠纯林及混交林内生菌根的研究[J].微生物学杂志,1989,9(1):6-9.
ZHOU C L, WU W F, QI Y C. Studies on V-A mycorrhizal fungi in pure and mixed forest of Chinese fir[J]. Journal of Forest and Environment, 1989, 9(1): 6-9. (in Chinese)
- [10] PHILLIPS J M, HAYMAN D S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1970, 55(1): 118-158.
- [11] 盛萍萍,刘润进,李敏.丛枝菌根观察与侵染率测定方法的比较[J].菌物学报,2011,30(4):519-525.
SHENG P P, LIU R J, LI M. Methodological comparison of observation and colonization measurement of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Mycosystema, 2011, 30(4): 519-525. (in Chinese)
- [12] 李鹏,赵忠,李占斌,等.植被根系与生态环境相互作用机制研究进展[J].西北林学院学报,2002(2):26-32.
LI P, ZHAO Z, LI Z B, *et al.* Advances on the interactional mechanism between root system and eco-environment[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2002(2): 26-32. (in Chinese)
- [13] 李林源,连华萍,许鲁平.杉木种子园良种与优良无性系造林试验[J].林业科技开发,2015,29(1):30-32.
LI L Y, LIAN H P, XU L P. One forestation experiment by improved varieties and superior clone of *Cunninghamia* plantation[J]. Journal of Forestry Engineering, 2015, 29(1): 30-32. (in Chinese)
- [14] 曹鹏,付学鹏,王绍娴,等.土壤高压蒸汽灭菌的条件优化及其对植物生长的影响[J].江苏农业科学,2016,44(9):456-458.
- [15] PREGITZER K S, DEFOREST J L, BURTON A J, *et al.* Fine root architecture of nine North American trees[J]. Ecological Monographs, 2002, 72(2): 293-309.
- [16] 毕银丽,吴王燕.染色法——一种改进的丛枝菌根孢子密度快速测定方法[J].能源环境保护,2007,21(2):9-11.
BI Y L, WU W Y. Dyeing method—a kind of the method for mycorrhizal spore density quick improved measurement[J]. Energy Environmental Protection, 2007, 21(2): 9-11. (in Chinese)
- [17] 杨亚宁,巴雷,白晓楠,等.一种改进的丛枝菌根染色方法[J].生态学报,2010,30(3):774-779.
YANG Y N, BA L, BAI X N, *et al.* An improved method to stain arbuscular mycorrhizal fungi in plant roots[J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(3): 774-779. (in Chinese)
- [18] 覃晓娟,陈廷速,李冬萍,等.香蕉根系丛枝菌根(AM)真菌染色方法比较[J].基因组学与应用生物学,2017,36(6):

- 2447-2451.
- Qin X J, Chen T S, Li D P, *et al.* Comparison of staining methods on arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in banana roots[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(6): 2447-2451. (in Chinese)
- [19] 田蜜, 陈应龙, 李敏, 等. 丛枝菌根结构与功能研究进展[J]. *应用生态学报*, 2013, 24(8): 2369-2376.
- TIAN M, CHEN Y L, LI M, *et al.* Structure and function of arbuscular mycorrhiza: a review[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(8): 2369-2376. (in Chinese)
- [20] WU P F, LAI H Y, TIGABU M, *et al.* Does phosphorus deficiency induce formation of root cortical aerenchyma maintaining growth of *Cunninghamia lanceolata*? [J]. *Trees*, 2018, 32(6): 1633-1642.
- [21] 汪攀, 吴鹏飞, 马祥庆, 等. 杉木根系细胞壁活化铁磷能力及其影响因子分析[J]. *林业科学*, 2015, 51(9): 59-64.
- WANG P, WU P F, MA X Q, *et al.* Mobilization of insoluble iron bound phosphate and effective factors by root cell walls of Chinese fir[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2015, 51(9): 59-64. (in Chinese)
- [22] 陈思同, 邹显花, 蔡一冰, 等. 基于³²P示踪的不同供磷环境杉木幼苗磷的分配规律分析[J]. *植物生态学报*, 2018, 42(11): 1103-1112.
- CHEN S T, ZOU X H, CAI Y B, *et al.* Phosphorus distribution inside Chinese fir seedlings under different P supplies based on ³²P tracer[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2018, 42(11): 1103-1112. (in Chinese)
- [23] 刘润进, 李敏, 王维华. 丛枝菌根真菌对植物根尖分生区和根冠细胞的侵染(英文)[J]. *菌物系统*, 2001, 20(1): 116-121.
- LIU R J, LI M, WANG W H. Colonization of AM fungi in meristematic zone and cap cells of plant roots[J]. *Mycosystema*, 2001, 20(1): 116-121.
- [24] 吴强盛, 夏仁学, 邹英宁, 等. 丛枝菌根真菌对柑橘组培苗生长和抗氧化酶的影响(英文)[J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(5): 635-639.
- WU Q S, XIA R X, ZOU Y N, *et al.* Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth and antioxidant enzymes of micropropagated citrus [J]. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, 2006, 12(5): 635-639.
- [25] XING X K, KOCH A M, JONES A M P, *et al.* Mutualism breakdown in breadfruit domestication[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2012, 279 (1731): 1122-1130.
- [26] 潘璐, 牟溥, 白尚斌, 等. 毛竹林扩张对周边森林群落菌根系统的影响[J]. *植物生态学报*, 2015, 39(4): 371-382.
- PAN L, MOU P, BAI S B, *et al.* Impact of phyllostachys heterocycla 'Pubescens' expansion on mycorrhizal associations of the adjacent forests[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2015, 39(4): 371-382. (in Chinese)
- [27] ROONEY D C, PROSSER J I, BENDING G D, *et al.* Effect of arbuscular mycorrhizal colonisation on the growth and phosphorus nutrition of *Populus euramericana* cv. Ghoy[J]. *Bio-mass and Bioenergy*, 2011, 35(11): 4605-4612.