

中亚热带森林土壤真菌多样性的案例研究

韩世忠^{1a}, 高人^{1a,1b,2*}, 马红亮^{1a,1b}, 尹云锋^{1a,1b}, 司友涛^{1a,1b}, 杨玉盛^{1a,1b},
陈仕东^{1a,1b}, 陆建芳^{1a}, 刘功辉^{1a}, 李爱萍^{1a}, 郑群瑞³

(1. 福建师范大学, a. 地理科学学院; b. 湿润亚热带山地生态国家重点实验室培育基地, 福州 350007; 2. 福建武夷山森林生态系统国家定位研究站, 福建 武夷山 354315; 3. 建瓯万木林自然保护区管理站, 福建 建瓯 353105)

摘要: 为了解中亚热带森林土壤的真菌多样性, 利用 PCR-DGGE 分子指纹图谱技术对武夷山国家级自然保护区和建瓯万木林自然保护区内的米槠(*Castanopsis carlesii*)天然林土壤真菌进行研究。结果表明, 中亚热带地区森林土壤真菌群落丰富, 土壤真菌的多样性指数、丰富度指数和均匀度指数分别为 3.37~3.80、26~29 和 0.977~0.984。经测序及同源性比对, 真菌以担子菌类(Basidiomycota)最多, 占总数的 35.9%; 其次为子囊菌类(Ascomycota), 占总数的 15.4%; 接合菌类(Zygomycota)和半知菌类(Deuteromycota)分别占总数的 10.3% 和 7.7%。主成分分析表明, 地点和土层深度共同影响真菌群落组成, 其中由地点引起的真菌群落组成差异大于土层深度。土壤真菌多样性指数与土壤铵态氮呈显著正相关, 与土壤碳氮比呈显著负相关; 丰富度指数和均匀度指数与土壤因子间没有显著的相关性, 因此, 土壤碳、氮含量是影响土壤真菌群落结构的重要因子。

关键词: 土壤真菌; 米槠天然林; PCR-DGGE; 真菌多样性

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.03.017

Soil Fungal Diversities of *Castanopsis carlesii* Nature Forests in Mid-subtropical China

HAN Shi-zhong^{1a}, GAO Ren^{1a,1b,2*}, MA Hong-liang^{1a,1b}, YIN Yun-feng^{1a,1b}, SI You-tao^{1a,1b}, YANG Yu-sheng^{1a,1b},
CHEN Shi-dong^{1a,1b}, LU Jian-fang^{1a}, LIU Gong-hui^{1a}, LI Ai-ping^{1a}, ZHENG Qun-rui³

(1a. College of Geographical Sciences; 1b. Key Laboratory for Subtropical Mountain Ecology, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China; 2. The state Forest Ecosystem Research Station of Wuyi Mountain (Fujian), Wuyishan 354315, China; 3. Administrative Station of Jian'ou Wanmulin Nature Reserve, Jian'ou 353105, China)

Abstract: In order to understand the soil fungal diversity in mid-subtropical forest, the soil fungal community structure of *Castanopsis carlesii* nature forests in Wuyi Mountain and Jian'ou Wanmulin Nature Reserves at northern Fujian, eastern China was studied by PCR-DGGE molecular fingerprint techniques. The results showed that the diversity index, richness index and evenness index of soil fungal in the two subtropical forests were 3.37–3.80, 26–29 and 0.977–0.984, respectively, indicating that the natural forest soil fungal communities were abundant. Thirty-nine fungi species were obtained by sequencing and homologous alignment, among which Basidiomycota were the most, accounting for 35.9%; followed by Ascomycota for 15.4%, then Zygomycota for 10.3% and Deuteromycota for 7.7%. Principal component analysis showed both soil depth and sample location were the major factors influencing fungal community composition, and the effect of location was bigger than soil depth. Correlation analysis showed that soil fungal diversity index had significant positive correlation with

收稿日期: 2014-08-18

接受日期: 2014-11-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(41271282, 31070548, 31170578)资助

作者简介: 韩世忠(1987~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为森林生态系统碳氮循环。E-mail: 512073738@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: r.gao@hotmail.com

ammonium nitrogen content and negative with carbon nitrogen ratio, nevertheless, the community richness index and evenness index showed no significant relation with the soil factors. So, the carbon and nitrogen contents in soil were important factors affecting the soil fungal community structure.

Key words: Soil fungi; *Castanopsis carlesii* nature forest; PCR-DGGE; Fungal diversity

土壤真菌作为微生物区系中的主要成分,它不仅能分解纤维素、半纤维素、木质素、单宁等化合物,还能更有效地分解众多难分解的凋落物^[1-2],在推动土壤物质转换、能量流动和生物转化循环中起着重要的作用,是生态系统健康的指示物^[3]。Hawksworth^[4]指出,自然界中真菌大约有150万种,但能够被分离和培养的只占总数的0.17%,这就说明利用传统方法得到的真菌种类和数量,并不能准确地反映研究地区真菌的原始状况。近年来,随着一系列分子指纹分析方法的发展,尤其是PCR-DGGE技术的运用,为研究微生物群落结构提供了一个有力的分子指纹标记技术,克服传统培养方法信息大量丢失的缺点,因而可以更好地揭示河流^[5]、草地^[6]、森林^[7]以及农田^[8]土壤真菌群落结构的变化。有研究表明,与碱性和中性土壤相比,真菌更喜好偏酸性土壤^[9],因此,与其它地区相比,中国南方地区土壤的真菌群落更加丰富^[10]。福建省地处湿润亚热带地区,气候温和、雨量充沛,土壤高度风化,并且呈现出很强的酸性,其丰富的植物资源,是研究森林生态系统土壤真菌多样性的理想场所。近年来,全球温室气体大量排放以及酸雨和氮硫沉降增加等,土壤环境发生了很大变化,对该地区森林生态系统造成极大影响,引起土壤真菌群落结构发生变化^[11]。Treseder等^[12]报道,大气中CO₂浓度升高对土壤不同菌根的影响不同,推测CO₂浓度越高,*Acaulospora*属和*Scutellospora*属在菌根区系中所占比例越大。目前对中亚热带地区的土壤真菌已有研究报道,庄铁诚等^[13]对武夷山不同类型森林土壤丝状真菌进行了研究,认为青

霉属(*Penicillium*)、木霉属(*Trichoderma*)和曲霉属(*Aspergillus*)是各森林类型土壤中分布广、密度大的主要优势菌属。宋漳^[14]等对闽北常绿阔叶林土壤微生物学特性的研究表明,受人为干扰破坏的退化森林(Degraded forest, DF)土壤真菌数量比长期受保护的中亚热带森林(Conserved forest, CF)多,并且占土壤微生物总量的比值也较大。吴则焰等^[15]运用BIOLOG微平板技术对武夷山国家自然保护区不同植被类型土壤微生物群落结构和代谢功能多样性进行了研究,表明不同海拔植被带土壤微生物群落的功能多样性差异显著。但已有的研究大多以传统培养筛选的方式对土壤真菌进行分类和鉴定,而利用分子生物学技术对土壤真菌多样性的研究报道较少。本文以中亚热带地区典型的阔叶天然林为研究对象,利用PCR-DGGE分子指纹图谱技术及PCR方法,对武夷山国家自然保护区和建瓯万木林自然保护区内米楮天然林的土壤真菌进行研究,探讨该地区土壤真菌群落的结构组成及其影响因子,为研究土壤真菌对森林生态系统物质循环以及生态环境影响等提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验样地概况和样地设置

试验地分别位于福建省武夷山国家级自然保护区(27°33' N, 117°27' E)和建瓯万木林自然保护区(27°03' N, 118°09' E)。武夷山国家级自然保护区为典型中亚热带季风气候,平均海拔1000~1100 m,年均气温19.4℃,年均降水量1731.4 mm,

表1 样地的基本特征

Table 1 Basic characteristics of sampling plots

地点 Position	森林类型 Forest type	密度 Density (ind. hm ⁻²)	年龄 Age (a)	平均胸径 (cm) Average DBH	平均树高 Average tree height (m)	海拔 (m) Elevation	坡向 Aspect	坡度 Slope
武夷山 Wuyi Mont.	米楮天然林 <i>Castanopsis carlesii</i>	5600	50	10.0	7.4	610	西北 Northwest	20°
建瓯 Jian'ou	米楮天然林 <i>Castanopsis carlesii</i>	2800	200	15.1	9.5	510	西 West	20°

年均蒸发量 1466 mm, 相对湿度 81%, 全年无霜期达 277 d, 土壤为花岗岩发育的普通山地红壤。建瓯万木林自然保护区地处武夷山和鹫峰山之间, 属亚热带海洋性季风气候, 年均气温 19.3℃, 年均降水量 1600~1800 mm, 日照时数 1612 h, 无霜期 286 d, 相对湿度 80%, 土壤为花岗岩发育的普通山地红壤。在武夷山自然保护区按照上坡、中坡和下坡分别设置 3 个 10 m×10 m 样地; 在建瓯万木林自然保护区沿等高线设置 9 个 10 m×10 m 样地。每个样地用尼龙细线隔成 25 个 2 m×2 m 的小样方。试验样地基本概况见表 1, 样地中植株密度、平均胸径和平均高度根据胸径大于 2 cm 的树木计算; 年龄为优势木的平均年龄。

表 2 样地土壤基本理化性质

Table 2 Physical and chemical properties of soil

编号 Code	土层 depth (cm)	Soil pH	总氮 Total nitrogen (g kg ⁻¹)	有机碳 Organic carbon (g kg ⁻¹)	C/N	总磷 Total phosphorus (mg kg ⁻¹)	有效磷 Available phosphorus (mg kg ⁻¹)	砂粒 Sand (%)	粉粒 Powder (%)	黏粒 Clay (%)
WU	0~10	4.85	1.96	33.92	17.30	27.67	6.62	46.3	42.2	11.4
WL	10~20	4.79	1.14	17.62	15.47	23.29	5.71	54.1	33.4	12.5
JU	0~10	4.55	2.14	36.55	16.96	56.23	7.36	22.5	65.1	12.4
JL	10~20	4.54	1.28	21.32	16.37	48.87	6.13	21.8	64.0	14.2

含水量采用铝盒烘干法测定; pH 用玻璃电极 pH 计测定, 水土比 2.5:1 (V/V); 土壤有机碳和总氮采用 CN 元素分析仪(Elementar Vario EL III, Elementar, 德国)测定; 硝态氮、铵态氮采用连续流动分析仪(Skalar san++, 荷兰)测定。各样地土壤基本理化性质见表 2。

1.3 土壤总DNA提取

土壤总 DNA 参照 PowerSoil DNA Isolation Kit 试剂盒(MO BIO, 美国)提取。提取的 DNA 采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测质量。

1.4 真菌18S rRNA片段的PCR扩增

采用真菌 18S rRNA 部分片段的通用引物 NS₁ (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')和 GC-Fungi (5'-GC-clamp-ATTCCCGTTACCCGTTG-3'), 其中, GC-Fungi 的 5' 端有一段约 40 bp 的 GC 夹子(5'-CGCCGCGCGCCCCGCGCCCGGCCGCGC-

1.2 土壤样品采集与处理

2013 年 4 月在每块样地按照均匀采样法, 用土钻采集 25 钻 0~10 cm 和 10~20 cm 土层土壤, 混匀后用聚乙烯塑料袋封装迅速带回实验室, 人工挑除凋落物、细根和小石块等杂物, 过 2 mm 尼龙筛后一部分土壤样品放在阴凉通风处晾干, 用于土壤有机碳和总氮分析; 一部分土壤样品保存在 4℃ 下用于土壤微生物生物量碳/氮、pH 值、溶解性有机质、硝态氮、铵态氮等的测定; 用于土壤真菌多样性分析的样品为混合样品, 武夷山 9 块样地按照坡位和土层分别混合形成 6 个样品, 建瓯 9 块样地按顺序相邻 3 块为一组, 分别土层混合形成 6 个样品, 并标号(表 2 和图 4), 放入 -20℃ 低温冰箱保存。土壤

CCCCGCCCC-3'), 以提高 DGGE 的分离效果。PCR 反应体系为 25 μL, 包含 1 μL 模板 DNA、2.5 μL 10× Ex Taq 缓冲液(含 20 mmol L⁻¹ Mg²⁺, TaKaRa)、2 μL 2.5 mmol L⁻¹ dNTP mixture、1 μL 正反引物(10 μmol L⁻¹)、0.25 μL 5 U mL⁻¹ Ex Taq DNA 聚合酶和 17.25 μL 灭菌双蒸水。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 然后 94℃ 30 s、60℃ 30 s、72℃ 15 s, 共 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min^[16]。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用 OMEGA 公司的 DNA Gel Extraction Kit 纯化回收。PCR 仪为 Biometra 公司生产的 T-gradient, 凝胶成像仪为 Bio-Rad 公司的 Gel-Doc2000 凝胶成像系统。

1.5 PCR产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)

取 10 μL PCR 产物, 用 D-Code 基因突变检测系统(Bio-Rad Laboratories Inc, USA)进行 DGGE 分析, 变性梯度为 20%~40%、聚丙烯酰胺凝胶浓度为 6%, 在 1×TAE 缓冲液中 150V 60℃ 下电泳 8 h。

1.6 土壤真菌18S rDNA片段的克隆与测序

用灭菌的手术刀切下待回收的 DGGE 条带,采用 OMEGA 公司的 Poly-Gel DNA Extraction Kit 回收目的条带。以 2 μ L 回收产物为模板, NS₁/GC-Fungi 为引物进行 PCR 扩增, PCR 反应体系以及扩增程序同上。将重新扩增的 DNA 片段切胶回收、纯化后,连接到 Pmd18-T 载体上,并转化至大肠杆菌(*Echerichia coli*) DH5 α 感受态细胞中,筛选阳性克隆,送北京博友新创生物技术有限公司测序分析。

1.7 数据处理与统计分析

数据采用 Excel 2007 和 SPSS 17.0 进行统计分析和作图,不同类型土壤各变量之间的显著性检验采用单因子方差分析(ANOVA)和最小显著差异法(LSD),一元线性回归分析土壤真菌多样性指数与各因子的相关关系,显著性水平设定为 $\alpha=0.05$ 。利用 Quantity One 软件 version 4.6 (Bio-Rad Laboratories Inc, USA)进行 DGGE 图谱数字化处理和分析,主成分分析采用 Conoco for windows 4.5 软件进行,利用 NCBI 的 BLAST-N 进行序列同源性比较。土壤真菌的多样性水平用 Shannon-Wiener 多样性指数(H')、Margalef 丰富度指数(S)和 Pielou 均匀度指数(J)表示。

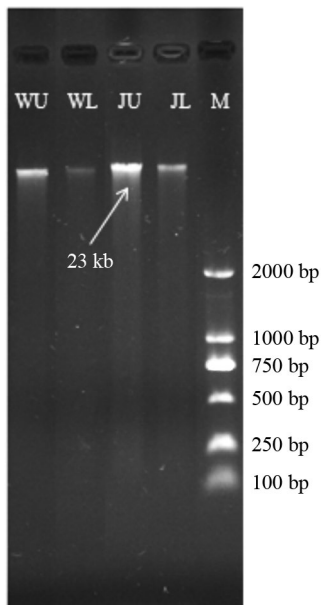


图1 土壤总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱。M: 2000 bp DNA Marker; WU、WL、JU 和 JL 见表 2。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total DNA of soil samples. M: 2000 bp DNA Marker; WU, WL, JU and JL see Table 2.

Shannon-Wiener 多样性指数: $H' = -\sum p_i \ln p_i$

Pielou 均匀度指数: $J = H' / \ln S$

其中, p_i 为某样品中第 i 个条带的强度占该样品所有条带总强度的比率,可以用 $p_i = N_i / N$ 计算, N 为 DGGE 图谱单一泳道中所有条带的丰度, N_i 为第 i 条带的丰度, S 为某样品中所有条带数目总和。

2 结果和分析

2.1 土壤总DNA提取及PCR扩增

将提取到的土壤总 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳,获得条带清晰,大小约为 23 kb 的 DNA 片段(图 1)。以提取的 DNA 为模板,采用真菌 18S rRNA 部分片段通用引物 NS₁/GC-Fungi 进行 PCR 扩增,结果在 250~500 bp 处出现一条预期长度约 370 bp 的 DNA 条带(图 2),该条带清晰,没有出现引物二聚体和其他非特异性条带,可判断为目的条带,适宜后续的 DGGE 分析。

2.2 土壤真菌群落结构的DGGE指纹图谱分析

利用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术对土壤真菌 18S rRNA 部分片段 PCR 产物进行分离,根据 DGGE 能分离长度相同而序列不同 DNA 的原理,每一条带大致与一优势种群或分类操作单元(OTUs)相对应^[17]。DGGE 图谱中不同位置的条带代表不同的真菌类群,不同泳道同一位置条带的灰

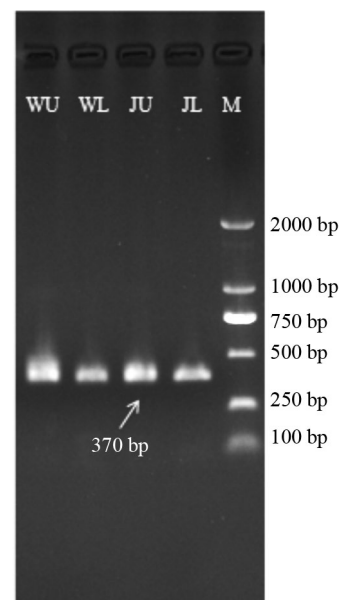


图2 真菌 18S rRNA 部分片段的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of fragment in fungi 18S rRNA

度值则反映该真菌类群在不同土样中的相对丰度, 通过对比分析 DGGE 图谱中不同泳道中条带的数量和灰度值, 即可判断不同土壤样品中真菌群落结构以及种群丰富度状况。采用 Quantity One 分析软件对 DGGE 胶图进行条带识别和图谱分析(图 3: A), 可以看出, 各样地的真菌群落组成丰富, 每个土壤样品均可以分离出 25~32 条带, 其中 WL 土壤样品分离的数量最多, JU 和 JL 次之, WU 最少, 说明在武夷山样地, 真菌丰富度深层土壤高于表层,

而建瓯样地则是表层土壤高于深层。根据泳道比较图(图 3: B)可知, 在不同类型的土壤中, 分离出的条带数量和灰度值均有差异, 灰度值高, 说明该真菌数量较多, 为该地区的优势种群。在所有真菌群落中有 5 个真菌种群在每个土壤样品中都有分布(箭头所示), 说明这些种群属于生态幅比较广的基本微生物类型, 广泛存在于各类土壤样品中, 但同一条带的灰度值在不同土壤样品中差异较大, 说明这些种群在数量分布上有一定的差别。

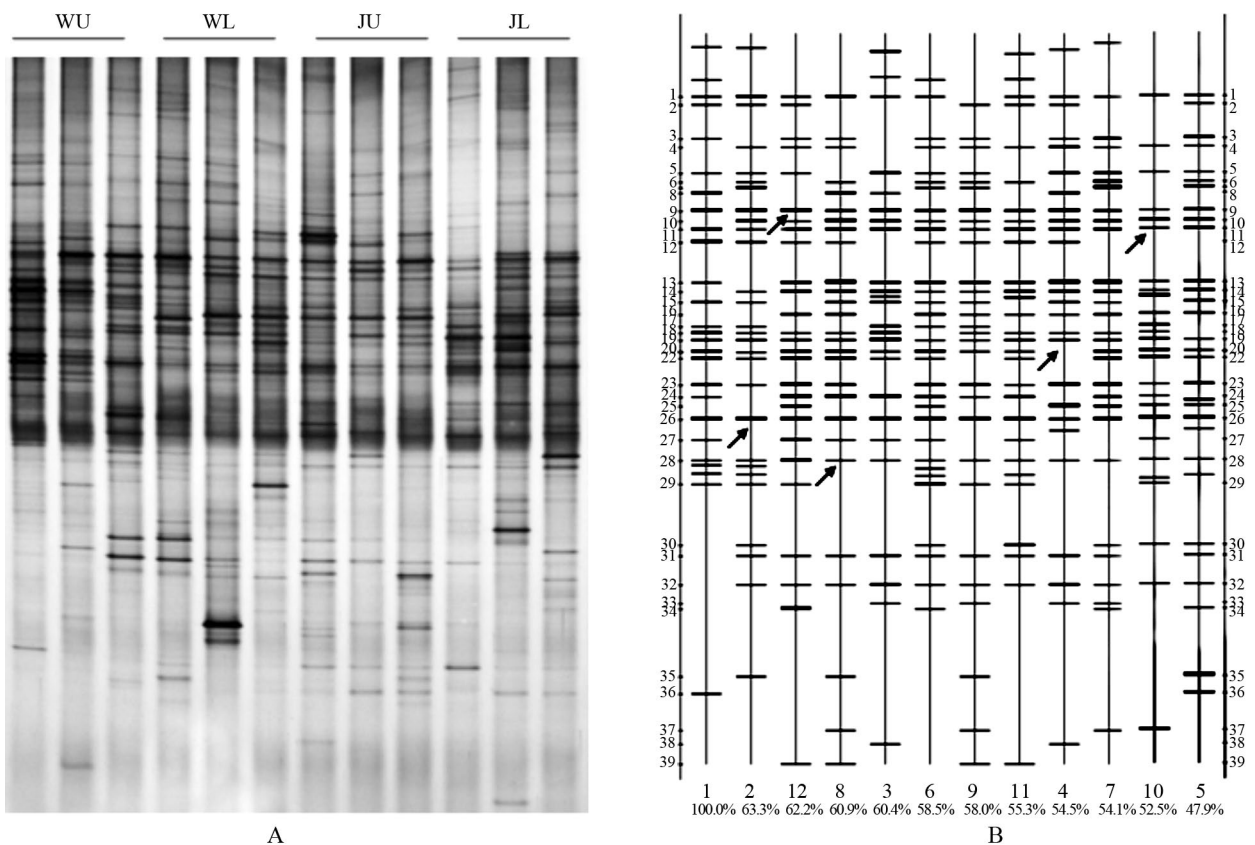


图 3 18S rRNA 部分片段 DGGE 分离图谱(A)和泳道比较图(B)。百分数表示各泳道与第 1 条泳道的相似性。

Fig. 3 DGGE profile of 18S rRNA fragment (A) and electrophoretic comparison chart (B). Percentage showed similarity of each lane compared to the first lane.

2.3 土壤真菌群落主成分分析

为了进一步了解不同样地土壤真菌群落组成的差异, 根据 DGGE 图谱中各条带的峰密度和 Rf 值(Relative front), 对不同样地土壤真菌类群进行主成分分析(图 4)。结果表明, 第一和第二主成分分别解释了真菌群落组成变化的 24.9% 和 14.6%, 第三主成分解释了 13.4%, 第四主成分解释了 10.6%, 前 4 个主成分累计解释了真菌群落组成变化的 63.6%。从图 4 可知, 武夷山自然保护区土壤样品

主要在第一和第四象限, 建瓯万木林自然保护区土壤样品都集中在第三象限。在纵向坐标轴上, 武夷山自然保护区 0~10 cm 土壤样品大部分位于坐标轴中轴线的上方, 而大部分 10~20 cm 土壤样品和所有的建瓯万木林自然保护区土壤样品都位于坐标轴中轴线的下方, 表明在第一主成分中, 真菌群落组成的差异由不同地点和土层深度共同影响。在横向坐标轴上, 武夷山自然保护区土壤样品都位于坐标轴中轴线的右侧, 而建瓯万木林自然保护区

土壤样品都位于坐标轴中轴线的左侧,表明在第二主成分上,真菌群落组成的差异主要由地点的不同引起。

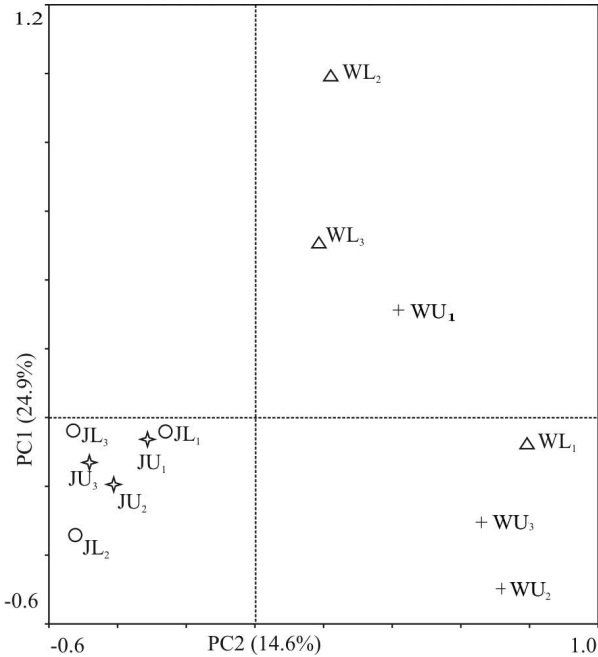


图4 土壤真菌 DGGE 图谱主成分分析
Fig. 4 Principal component analysis of soil fungi DGGE patterns

2.4 土壤真菌的多样性

由表3可知,不同样地土壤真菌的多样性指数、丰富度指数和均匀度指数均有差异,平均值分

表3 土壤真菌的多样性、丰富度及均匀度指数
Table 3 Diversity index, richness index and evenness index of soil fungi

样地 Sample	土层深度 Soil depth (cm)	多样性指数 Diversity index (<i>H'</i>)	丰富度指数 Richness index (<i>S</i>)	均匀度指数 Evenness index (<i>J</i>)
WU	0~10	3.37	26	0.983
WL	10~20	3.78	29	0.984
JU	0~10	3.74	28	0.982
JL	10~20	3.80	27	0.977

表4 土壤真菌群落指数与理化参数的相关性分析
Table 4 Pearson correlation analysis for soil fungal community indices against physicochemical parameters

	pH	含水量 Water content	总氮 Total nitrogen	有机碳 Organic carbon	C/N	硝态氮 Nitrate nitrogen	铵态氮 Ammonium nitrogen
<i>H'</i>	-0.365	-0.177	-0.350	-0.432	-0.674*	-	0.609*
<i>S</i>	-0.056	-0.213	-0.339	-0.351	-0.310	-	-0.037
<i>J</i>	0.419	0.300	0.202	0.182	0.010	-	-0.453

*: $P < 0.05$; $n = 12$

别为 3.3736~3.7991、26~29 和 0.977~0.984。武夷山国家自然保护区样地, 0~10 cm 土层的真菌多样性指数、丰富度指数和均匀度指数都低于 10~20 cm 土层;而建瓯万木林自然保护区样地, 0~10 cm 土层的真菌多样性指数低于 10~20 cm, 丰富度指数和均匀度指数则高于 10~20 cm 土层。

同样是 0~10 cm 土层,武夷山国家自然保护区样地多样性指数和丰富度指数低于建瓯万木林自然保护区样地,均匀度指数则高于建瓯万木林自然保护区样地;而在 10~20 cm 土层上,武夷山国家自然保护区样地多样性指数低于建瓯万木林自然保护区样地,丰富度指数和均匀度指数高于建瓯万木林自然保护区样地。对土壤真菌群落指数与土壤理化性质进行相关分析,结果表明(表4),土壤真菌的多样性指数与铵态氮呈显著正相关($r = 0.609$, $P < 0.05$),与碳氮比呈显著负相关($r = -0.674$, $P < 0.05$),与其他土壤理化性质的相关性不显著;丰富度指数和均匀度指数与各土壤理化性质均没有显著的相关性。

2.5 土壤真菌DGGE条带基因片段的测序

对 DGGE 图谱中 39 条已经标记的差异条带进行测序分析(表5),结果表明,真菌群落中以担子菌类(Basidiomycota)的数量最多,共 14 个,占总数的 35.9%;其次为子囊菌类(Ascomycota),共 6 个,占总数的 15.4%;接合菌类(Zygomycota)有 4 个,占

表 5 DGGE 条带的序列比对分析

Table 5 Sequence alignment of DGGE

条带 Band	碱基对 Base pairs	最相近种属(GenBank 登录号) Closest species or genera (GenBank accession No.)	分类 Taxonomy	界 Kingdom	相似性 Identity (%)
1	351	<i>Arthromyces matolae</i> (EU708331)	Basidiomycota	Fungi	99
2	351	<i>Multiclavula mucida</i> (AF026613)	Basidiomycota	Fungi	99
3	345	<i>Lasiosphaeris hispida</i> (JN938597)	Ascomycota	Fungi	94
4	351	<i>Tricholoma viridiolivaceum</i> (JF706318)	Basidiomycota	Fungi	99
5	352	<i>Gliophorus laetus</i> (DQ440640)	Basidiomycota	Fungi	97
6	350	<i>Mortierella indohii</i> (EU736291)	Zygomycota	Fungi	98
7	350	Uncultured fungus clone (JN559245)	Environmental samples	Eukaryota	98
8	352	<i>Umbelopsis isabellina</i> (AF545632)	Zygomycota	Fungi	99
9	346	<i>Trichoderma harzianum</i> (JF499072)	Deuteromycetes	Fungi	99
10	350	<i>Mortierella verticillata</i> (AB016017)	Zygomycota	Fungi	98
11	347	<i>Cryptococcus humicolus</i> (AB035583)	Basidiomycota	Fungi	92
12	350	Uncultured Sarcosomataceae (EF023647)	Ascomycota	Fungi	98
13	345	<i>Alatospora acuminata</i> (AY204583)	Deuteromycota	Fungi	99
14	351	<i>Mycena amabilissima</i> (DQ457647)	Basidiomycota	Fungi	99
15	351	<i>Lactarius lignyotus</i> (DQ457626)	Basidiomycota	Fungi	99
16	347	<i>Aspergillus terreus</i> (GU573850)	Deuteromycota	Fungi	97
17	347	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> (EU673146)	Ascomycota	Fungi	99
18	351	Uncultured Auriculariaceae (EF023716)	Basidiomycota	Fungi	99
19	342	Uncultured eukaryote (HQ999394)	Eukaryote	Fungi	96
20	345	<i>Coniochaeta ligniaria</i> (AY198389)	Ascomycota	Fungi	98
21	350	<i>Pleurocybella porrigens</i> (GU187660)	Basidiomycota	Fungi	97
22	353	<i>Gastrum saccatum</i> (AF026620)	Basidiomycota	Fungi	97
23	348	<i>Penicillium clavariiformis</i> (AB003946)	Ascomycota	Fungi	98
24	346	<i>Aspergillus terreus</i> (GU573850)	Ascomycota	Fungi	99
25	358	Uncultured fungus (JX126759)	Environmental samples	Eukaryota	99
26	354	<i>Mycena aurantiidisca</i> (DQ457694)	Basidiomycota	Fungi	96
27	358	Uncultured Banisveld eukaryote (EU091841)	Environmental samples	Eukaryota	95
28	351	<i>Pluteus petasatus</i> (HM562273)	Basidiomycota	Fungi	99
29	357	<i>Megaselia scalaris</i> (KC177299)	Arthropoda	Metazoa	99
30	367	<i>Arthropoda environmental sample</i> (AY496484)	Arthropoda	Metazoa	92
31	365	<i>Gehyochthonius urticinus</i> (EU433994)	Arthropoda	Metazoa	99
32	363	<i>Craterellus fallax</i> (AY771604)	Basidiomycota	Fungi	97
33	351	<i>Sinella curviseta</i> (DQ016565)	Arthropoda	Metazoa	99
35	379	<i>Camponotus laevigatus</i> (AY218314S1)	Arthropoda	Metazoa	99
36	370	<i>Phyllopertha horticola</i> (EF487722)	Arthropoda	Metazoa	99
37	361	<i>Theristus agilis</i> (AY284693)	Nematoda	Metazoa	99
38	350	<i>Achaeta unibilba</i> (GU901858)	Annelida	Fungi	98
39	352	<i>Mortierella minutissima</i> (EU736292)	Zygomycota	Metazoa	99

总数的 10.3%;半知菌类(Deuteromycota)有 3 个,占总数的 7.7%;还有未知属名的菌株 4 个,占总数的 10.3%。此外,有 8 个条带与后生动物(Metazoa)的同源性较高,目前关于后生动物对森林土壤影响的报道较少。

3 结论和讨论

土壤真菌作为森林土壤微生物的重要组成部分,其适宜的群落结构组成对于森林生态系统物质循环和能量转换具有重要的促进作用。本研究利用 PCR-DGGE 分子指纹图谱技术分析了中亚热带地区两个自然保护区内米楮常绿阔叶天然林土壤的真菌群落结构多样性,结果表明,该地区土壤真菌群落结构十分丰富,各样地土壤真菌多样性指数、丰富度指数和均匀度指数平均数量分别为 3.37~3.80、26~29 和 0.977~0.984。测序及同源性比对结果表明,真菌群落中以担子菌类(Basidiomycota)数量最多,其次为子囊菌类(Ascomycota)、接合菌(Zygomycota)和半知菌(Deuteromycota),分别占总数的 35.9%、15.4%、10.3% 和 7.7%。赵志祥等^[18]对海南热带雨林土壤的真菌群落进行研究,认为该地区森林土壤中子囊菌最为丰富(占克隆文库的 64.7%),担子菌次之(占 15.5%)。王继伟等^[2]对甘肃小陇山日本落叶松(*Larix kaempferi*)人工林的研究表明,该地区子囊菌纲的青霉属和丝孢纲的曲霉属最为丰富。董爱荣等^[19]对小兴安岭红松(*Pinus koraiensis*)林土壤真菌多样性的研究表明,接合菌纲的被孢霉属(*Mortierella*)、子囊菌纲的青霉属以及丝孢纲的木霉属和轮枝孢属(*Verticillium*)是该地区土壤真菌的优势种群。贾丽等^[1]对天水小陇山白皮松(*Pinus bungeana*)林的土壤真菌多样性进行研究,认为不同样地真菌的多样性指数差异较大,以青霉属和曲霉属为优势菌群,均与本研究结果不同,可能是本研究所在的中亚热带地区气候温和且高湿,森林生长旺盛,枯枝落叶等凋落物较多,有机质含量高,导致腐生担子菌大量繁殖,从而使担子菌种类较多^[20];此外,真菌引物的选择往往起着关键作用,由于引物扩增具有一定的偏爱性,对某一类或几类真菌特异性较高,不同的引物扩增出来的真菌种类会有所差异。本研究选用的引物是真菌 18S rRNA 部分片段通用引物 NS₁/GC-Fungi,该引物对担子菌的特异性相对较

高,这也可能是本研究得到担子菌种类最多的原因之一。如果能够结合该地区真菌种类的特点,设计具有针对性的引物,同时与 T-RFLP、FISH 等分子生物学方法结合,将有助于更全面了解该地区真菌群落的组成。

氮源参与蛋白质、核酸等大分子物质的合成,是微生物生长和代谢所必需的大量元素,氮素的供给直接影响着微生物活性的高低。有研究表明^[21],土壤中氮素含量的变化会引起土壤微生物生物量、活性和群落组成的变化。喻国策等^[22]对一种能够降解木质素的真菌进行研究,结果表明在一定范围内,氮源的增加能够促进木质素过氧化氢酶的产生,说明氮素能够增加真菌的代谢活性,促进对木质素等大分子物质的分解。刘丽等^[23]的研究表明,不同发育阶段杉木(*Cunninghamia lanceolata*)人工林的土壤真菌群落多样性和丰富度均与土壤中氮素含量显著相关,土壤中的氮素含量是生物生长的限制因子。本研究相关分析表明,土壤真菌群落多样性与土壤中的氨态氮呈显著正相关,这是否与土壤中参与物质分解与转换的真菌功能群有关,还有待进一步研究。土壤 C/N 是影响土壤微生物群落结构变化的重要因子之一^[24],适宜的 C/N 不仅能促进真菌的生长,而且还能影响生防真菌孢子的萌发^[25]。有研究表明^[26-27],与细菌相比,真菌对有机底物的利用率更高,在相同底物数量时,真菌比细菌能够形成更多的生物量,因此,在偏酸性、养分有效性低、难分解底物和 C/N 较高的土壤中,真菌生长更加旺盛。本研究样地的土壤 C/N 为 15.47~17.30,这远高于杉木人工林(11.13~12.39)^[24]。相关分析表明,土壤真菌群落多样性与 C/N 呈显著负相关,说明土壤中高的 C/N 虽然有利于真菌生物量的增加,但降低了真菌群落的多样性。

本研究还分离出了 5 种真菌优势种群,分别为 *Trichoderma harzianum*、*Cryptococcus humicolus*、*Coniochaeta ligniaria*、*Mycena aurantiidisca* 和 *Pluteus petasatus*。这些优势种群几乎在所有土壤样品中都有分布,属于生态幅比较广的基本微生物类型。其中的 26 号条带与担子菌门口蘑科(Tricholomataceae)小菇属(*Mycena*)的同源性较高。有研究表明^[28],土壤凋落物中的木质素为天然大分子物质,不易降解,严重影响着土壤碳循环,漆酶广泛存在于自然界的多种植物和真菌中,该酶能将土壤凋落物中的木质素彻底分解为水和 CO₂,而能够分泌漆酶的真

菌主要是担子菌门。陈香碧等^[29]对亚热带森林土壤担子菌漆酶基因的多样性进行研究,认为4个克隆库中含漆酶基因的担子菌在目水平上均以伞菌目(Agaricales)占绝对优势,克隆子绝大部分与小菇属的相似性在70%以上。9号条带与木霉属哈茨木霉(*Trizhoderma harzianum*)的同源性最高,该条带亮度较高,属于该地区的真菌优势种群。木霉菌属于半知菌亚门丝孢纲(Hyphomycetes)丛梗孢科(Moniliaceae),是一类普遍存在的真菌,常见于土壤中,是土壤微生物的重要类群,具有很强的拮抗活性和分解纤维素的能力^[30-31],而哈茨木霉是一种重要的生物防治菌,它可以通过重寄生、抗生作用、营养和空间竞争以及提高植物抗性等机制来防治多种土传、气传植物病害^[32],对保持森林生态系统稳定性具有重要作用。有研究表明^[33],哈茨木霉能诱导产生一系列几丁质酶和 β -1,3葡聚糖酶,这两种酶对病原真菌细胞壁降解有重要作用,从而抑制病原菌孢子萌发,最终导致菌丝和孢子的崩溃。目前,对中亚热带地区森林土壤真菌多样性的研究还比较薄弱,对该地区真菌种群的认识还十分有限,本研究利用PCR-DGGE分子指纹图谱技术获得了几种能够有效分解木质素、纤维素等大分子物质以及具有生物防治功能的真菌,如果能够对这些功能真菌进一步研究,了解其生物学特性,应用于森林生态系统物质循环与调控,土壤病虫害研究等方面,将具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] Jia L, Feng K K, Wang Q H, et al. Preliminary study on the diversity of soil fungi in *Pinus bungeana* on Xiaolongshan, Tianshui [J]. J Fujian For Sci Techn, 2006, 33(4): 53-57.
贾丽, 冯克宽, 王勤花, 等. 天水小陇山白皮松林土壤真菌多样性的初步研究 [J]. 福建林业科技, 2006, 33(4): 53-57.
- [2] Wang J W, Ju T Z, Cao C, et al. The diversity discusse on soil dominant fungi in the pure *Larix kaempferi* plantations of Xiaolongshan of Tianshui City in Gansu [J]. J Arid Land Res Environ, 2013, 27(3): 173-176.
王继伟, 巨天珍, 曹春, 等. 甘肃小陇山日本落叶松人工林土壤优势真菌多样性探讨 [J]. 干旱区资源与环境, 2013, 27(3): 173-176.
- [3] Vandenkoornhuysen P, Baldauf S L, Leyval C, et al. Extensive fungal diversity in plant roots [J]. Science, 2002, 295(5562): 2051-2051.
- [4] Hawksworth D L. The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance, and conservation [J]. Mycol Res, 1991, 95(6): 641-655.
- [5] Nikolcheva L G, Cockshutt A M, Bärlocher F. Determining diversity of freshwater fungi on decaying leaves: Comparison of traditional and molecular approaches [J]. Appl Environ Microb, 2003, 69(5): 2548-2554.
- [6] Li G, Fan B L, Wendu R L, et al. Analysis of soil fungal community structure of stipa steppes in Hulunbuir, Inner Mongolia [J]. Acta Pedol Sin, 2011, 48(5): 1096-1102.
李刚, 范宝莉, 文都日乐, 等. 呼伦贝尔针茅草原土壤真菌群落结构分析 [J]. 土壤学报, 2011, 48(5): 1096-1102.
- [7] Klamer M, Roberts M S, Levine L H, et al. Influence of elevated CO₂ on the fungal community in a coastal scruboak forest soil investigated with terminal-restriction fragment length polymorphism analysis [J]. Appl Environ Microb, 2002, 68(9): 4370-4376.
- [8] Meng P P, Liu X, Qiu H Z, et al. Fungal population structure and its biological effect in rhizosphere soil of continuously cropped potato [J]. Chin J Appl Ecol, 2012, 23(11): 3079-3086.
孟品品, 刘星, 邱慧珍, 等. 连作马铃薯根际土壤真菌种群结构及其生物效应 [J]. 应用生态学报, 2012, 23(11): 3079-3086.
- [9] Xue L, Kuang L G, Chen H Y, et al. Soil nutrients, microorganisms and enzyme activities of different stands [J]. Acta Pedol Sin, 2003, 40(2): 280-285.
薛立, 邝立刚, 陈红跃, 等. 不同林分土壤养分、微生物与酶活性的研究 [J]. 土壤学报, 2003, 40(2): 280-285.
- [10] Wu Y P, Ma B, Zhou L, et al. Changes in the soil microbial community structure with latitude in eastern China, based on phospholipid fatty acid analysis [J]. Appl Soil Ecol, 2009, 43(2/3): 234-240.
- [11] Smlander A, Kurka A, Kitunen V, et al. Microbiomass C and N and respiratory activity in soil of repeatedly limed and N and P fertilized Norway Spruce stands [J]. Soil Biol Biochem, 1994, 26(8): 957-962.
- [12] Treseder K K, Egerton L M, Allen M F, et al. Alteration of soil carbon pools and communities of mycorrhizal fungi in chaparral exposed to elevated carbon dioxide [J]. Ecosystems, 2003, 6(8): 786-796.
- [13] Zhuang T C, Lin P, Chen R H. A preliminary investigation on dominant genera of heterotrophic bacteria and filamentous fungi in soils under different types of forest on Wuyi Mountain, Fujian [J]. Acta Pedol Sin, 1998, 35(1): 119-123.
庄铁诚, 林鹏, 陈仁华. 武夷山不同类型森林土壤细菌、丝状真菌优势菌属的初步研究 [J]. 土壤学报, 1998, 35(1): 119-123.
- [14] Song Z, Zhu J M, Yang Y S. Studies on soil microbiological characteristics of evergreen broad-leaved forest in northern Fujian Province [J]. J Fujian Coll For, 2000, 20(4): 317-320.
宋漳, 朱锦懋, 杨玉盛. 闽北常绿阔叶林土壤微生物学特性的研究 [J]. 福建林学院学报, 2000, 20(4): 317-320.
- [15] Wu Z Y, Lin W X, Chen Z F, et al. Characteristics of soil microbial community under different vegetation types in Wuyishan National

- Nature Reserve, East China [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2013, 24(8): 2301–2309.
- 吴则焰, 林文雄, 陈志芳, 等. 武夷山自然保护区不同植被类型土壤微生物群落特征 [J]. *应用生态学报*, 2013, 24(8): 2301–2309.
- [16] Luo J, Ran W, Hu J, et al. Application of bio-organic fertilizer significantly affected fungal diversity of soils [J]. *Soil Sci Soc Amer J*, 2010, 74(6): 2039–2048.
- [17] Wang Q Z, Xu Q F, Jiang P K, et al. DGGE analysis of PCR of 16S rDNA V3 fragments of soil bacteria community in soil under natural broadleaf forest invaded by *Phyllostachy pubescens* in Tianmu Mountain Nature Reserve [J]. *Acta Pedol Sin*, 2009, 46(4): 662–669.
- 王奇赞, 徐秋芳, 姜培坤, 等. 天目山毛竹入侵阔叶林后土壤细菌群落16S rDNA V3区片段PCR的DGGE分析 [J]. *土壤学报*, 2009, 46(4): 662–669.
- [18] Zhao Z X, Xiao M, Zheng F, et al. Diversity analysis of soil fungal communities in tropical rain forest by 18S rRNA gene cloning [J]. *J Anhui Agri Sci*, 2012, 40(11): 6378–6382.
- 赵志祥, 肖敏, 郑芬, 等. 热带雨林土壤真菌18S rRNA基因多样性分析 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(11): 6378–6382.
- [19] Dong A R, Lü G Z, Wu Q Y, et al. Diversity of soil fungi in Liangshui Natural Reserve, Xiaoxing'anling Forest Region [J]. *J NE For Univ*, 2004, 32(1): 8–10.
- 董爱荣, 吕国忠, 吴庆禹, 等. 小兴安岭凉水自然保护区森林土壤真菌的多样性 [J]. *东北林业大学学报*, 2004, 32(1): 8–10.
- [20] Zang M. Taxonomy, mycogeography and ecto-mycorrhizal association of the boletales from China: I. Family Strobilomycetaceae [J]. *Mycosystema*, 1997, 16(3): 192–196.
- [21] Sarathchandra S U, Ghani A, Yeates G W, et al. Effect of nitrogen and phosphate fertilizers on microbial and nematode diversity in pasture soils [J]. *Soil Biol Biochem*, 2001, 33(7/8): 953–964.
- [22] Yu G C, Wen X H, Li D F, et al. Formation of the ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* under various ammonium nitrogen concentrations [J]. *Acta Sci Circum*, 2003, 23(6): 802–806.
- 喻国策, 文湘华, 李东锋, 等. 黄孢原毛平革菌在多种氨氮浓度下木质素降解酶的产生 [J]. *环境科学学报*, 2003, 23(6): 802–806.
- [23] Liu L, Duan Z H, Wang S L, et al. Effects of *Cunninghamia lanceolata* plantations at different developmental stages on soil microbial community structure [J]. *Chin J Ecol*, 2009, 28(12): 2417–2423.
- 刘丽, 段争虎, 汪思龙, 等. 不同发育阶段杉木人工林对土壤微生物群落结构的影响 [J]. *生态学杂志*, 2009, 28(12): 2417–2423.
- [24] Myrold D D. Transformations of nitrogen [C]// Sylvia D M, Fuhrmann J J, Hartel P G, et al. *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 1998: 259–294.
- [25] Gao L, Liu X Z, Zong Z F. Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on spore germination of several biocontrol fungi [J]. *Acta Phytophylac Sin*, 2009, 36(1): 93–94.
- 高利, 刘杏忠, 宗兆锋. 碳浓度及碳氮比对几种生防真菌孢子萌发的作用 [J]. *植物保护学报*, 2009, 36(1): 93–94.
- [26] Sakamoto K, Oba Y. Effect of fungal to bacterial biomass ratio on the relationship between CO₂ evolution and total soil microbial biomass [J]. *Biol Fert Soils*, 1994, 17(1): 39–44.
- [27] Högberg M N, Högberg P, Myrold D D. Is microbial community composition in boreal forest soils determined by pH, C-to-N ratio, the trees, or all three? [J]. *Oecologia*, 2007, 150(4): 590–601.
- [28] Xu Y, Lan J. Advances in the research of fungal laccase [J]. *Acta Edul Fungi*, 2005, 12(1): 57–64.
- 许颖, 兰进. 真菌漆酶研究进展 [J]. *食用菌学报*, 2005, 12(1): 57–64.
- [29] Chen X B, Su Y R, He X Y, et al. Basidiomycetous laccase gene diversity in two subtropical forest soils [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2011, 22(10): 2699–2704.
- 陈香碧, 苏以荣, 何寻阳, 等. 亚热带两种森林土壤担子菌漆酶基因多样性比较 [J]. *应用生态学报*, 2011, 22(10): 2699–2704.
- [30] Xiao X L, Yang H T, Xia X Z, et al. Identification and classification of *Trichoderma spp.* by morphology and soluble protein gel electrophoresis analysis [J]. *Shandong Sci*, 2002, 15(1): 5–12.
- 肖性龙, 杨合同, 夏贤志, 等. 木霉菌的形态学和可溶性蛋白质电泳鉴定与分类 [J]. *山东科学*, 2002, 15(1): 5–12.
- [31] Zhang H, Yan Y W, Xian H Q. The research of classification of *Tichoderma* species in Shandong Peninsul [J]. *Chin Agri Sci Bull*, 2011, 27(9): 184–190.
- 张红, 颜艳伟, 咸洪泉. 山东半岛地区土壤中木霉菌资源分类研究 [J]. *中国农学通报*, 2011, 27(9): 184–190.
- [32] Yin G L, Wang W M, Sha S, et al. Isolation and sequence analysis of *Tri101* gene from *Trichoderma harzianum* [J]. *J Chin Univ Metrol*, 2010, 21(2): 133–139.
- 尹国良, 王为民, 沙莎, 等. 哈茨木霉菌*Tri101*基因的克隆与序列分析 [J]. *中国计量学院学报*, 2010, 21(2): 133–139.
- [33] Chen Y X, Chen B, Pan Z D, et al. Application and studies on plant-growth promoting rhizobacteria [J]. *Chin J Biol Control*, 1985, 1(2): 22–23.
- 陈延熙, 陈璧, 潘贞德, 等. 增产菌的应用与研究 [J]. *生物防治通报*, 1985, 1(2): 22–23.