

山核桃林地土壤真菌群落结构研究

李 皓, 董建华, 袁紫倩, 胡俊靖, 赵伟明

(杭州市林业科学研究院, 浙江 杭州 310022)

摘要: 采用 16S rDNA 高通量测序技术分析杭州临安区正常生长和不良生长状况 2 种山核桃 *Carya cathayensis* 林地土壤真菌群落结构。结果表明, 生长不良山核桃林地与正常林地真菌优势类群相同, 不同样地中子囊菌门 Ascomycota、接合菌门 Zygomycota、担子菌门 Basidiomycota 均为优势类群, 但相对丰度不同, 正常林地土壤中担子菌门和接合菌门的相对丰度高于生长不良林地。在属的分类水平上, 正常林地土壤中小画线壳属 *Monographella*、镰刀霉属 *Fusarium* 和土赤壳属 *Ilyonectria* 的相对丰度明显低于生长不良林地。生长不良林地土壤真菌多样性高于正常林地, Shannon-Wiener 指数, ACE 指数, Chao1 指数与土壤 pH 之间呈显著负相关 ($P < 0.05$), 与有机质、碱解氮和交换性酸显著正相关 ($P < 0.05$)。

关键词: 山核桃; 土壤真菌; 群落结构; 16S rDNA 测序

中图分类号: S664.9 文献标识码: A 文章编号: 1001-3776(2018)05-0067-06

Soil Fungi Community Structure in *Carya cathayensis* Forest

LI Hao, DONG Jian-hua, YUAN Zi-qian, HU Jun-jing, ZHAO Wei-ming

(Hangzhou Forestry Academy, Hangzhou 310022, China)

Abstract: Soil samples in 0-20 cm layers were collected in August of 2016 from six plots at normal and unhealthy growth *Carya cathayensis* stands in Lin'an, Zhejiang province. Determinations on chemical properties were implemented and fungi community structure was analyzed by 16S rDNA sequencing. The results indicated that dominant phylums and genera were similar in the two different kinds of soil, including Ascomycota, Zygomycota and Basidiomycota, but relative abundance was different. Relative abundance of Basidiomycota and Zygomycota in normal growth plots was higher than that in unhealthy ones. Relative abundance of *Monographella*, *Fusarium* and *Ilyonectria* in unhealthy plots was higher than that in normal ones. Correlation analysis demonstrated that Shannon-wiener, ACE and Chao1 index had significant negative correlation with pH and positive one with organic matter, alkaline nitrogen and exchangeable acidity.

Key words: *Carya cathayensis*; fungi; community structure; 16S rDNA sequencing

山核桃 *Carya cathayensis* 为我国特有的干果和木本油料树种, 主要分布于浙皖交界的天目山系^[1]。浙江省杭州市临安区是山核桃主产区, 种植面积和产量都居全国首位。由于长期采用高强度的经营方式, 过量施用化肥和化学除草剂, 许多林地土壤环境急剧恶化^[2-3]。土壤环境的改变, 导致山核桃生长不良, 根系枝条死亡, 产量大幅下降。要解决这一问题, 亟需研究土壤环境发生了怎样的变化, 以便提出山核桃林地土壤科学管理措施。

收稿日期: 2018-04-02; 修回日期: 2018-08-11

基金项目: 山核桃退化林地修复技术应用示范与推广(2016TS10 号)

作者简介: 李皓, 工程师, 从事经济林研究; E-mail: 38761202@qq.com。

土壤微生物是土壤环境的组成部分,其种群结构对植物健康状况有影响。土壤微生物中,真菌除了在氨化、硝化、氮转化、纤维素分解过程中发挥着重要的作用^[4-5]之外,还通过与植物相互作用,进而影响植物生长^[6]。近些年,许多植物土壤微生物群落研究都采用高通量测序技术^[7-8]。该技术基于 16S rDNA 测序,通过对 Reads 过滤,OTUs 聚类进行物种分类和丰度分析,再采用 Alpha 多样性分析揭示不同样品群落结构组成和多样性的差异。

本文采用基于 16S rDNA 的高通量测序技术分析正常生长和不良生长山核桃林地土壤真菌群落结构和丰度,为山核桃林地的土壤管理和高效栽培提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究区位于浙江省杭州市临安区龙岗镇林坑村,地理坐标 119°05'35"~119°06'49" E, 30°09'27"~30°10'40" N,属亚热带季风气候,四季分明,气候温和,年均降水量 1 628.6 mm,年平均气温 15.8℃,年平均日照时数为 1 939 h,全年无霜期 234 d。2016 年 5 月,在研究区内开展山核桃林分生长状况调查。调查发现,研究区内的林分多数为人工纯林,林龄在 20~30 a,株行距 5 m×6 m。根据林分生长状况将山核桃林分为 2 类:(1)正常,山核桃长势良好;(2)生长不良,多数植株树叶稀少,枝条枯死或整株死亡。2016 年 8 月,随机选择 3 个正常林地(样地 4,样地 5,样地 6)和 3 个生长不良林地(样地 1,样地 2,样地 3),每个样地面积为 666.67 m²,海拔 187~230 m,土层厚度 90~100 cm,正常林地内近 3 a 未施化肥,生长不良林地之前一直施化肥,出现山核桃生长不良症状后停施,近 1 a 未施化肥。

1.2 试验材料

2016 年 8 月 17 日,在每个样地内随机设 5 个采样点,去除表面杂草和浮土,采集 0~20 cm 土层中的土壤,将每个样地 5 个样点采样土壤充分混合后,一部分用聚乙烯袋密封,带回实验室置于 -80℃ 冰箱中保存,另一部分样品自然风干,用于测定土壤化学性质。

1.3 试验方法

土壤化学性质测定:土壤化学性质包括 pH、有机质、碱解氮、有效磷、速效钾和交换性酸。其中,土壤 pH 采用 pH 计(水土比 1:2.5)电位法测定;有机质采用重铬酸钾外加热法;碱解氮采用碱解扩散法;有效磷采用 Olsen 法;有效钾采用乙酸铵浸提-火焰光度法;土壤交换性酸采用氯化钾交换—中和滴定法^[9]。

真菌基因组 DNA 提取和 16S rDNA 扩增与测序^[10]:所有样品真菌基因组 DNA 提取和 16S rDNA 扩增与测序工作委托生工生物工程(上海)有限公司完成。实验流程为:对提取到的基因组 DNA 进行琼脂糖电泳检测,查看基因组 DNA 的完整性与浓度。利用 Qubit 2.0 DNA 检测试剂盒对基因组 DNA 精确定量,以确定 PCR 反应需加入的 DNA 量。PCR 所用的引物已经融合了 Miseq 测序平台的通用引物。PCR 结束后,对 PCR 产物进行琼脂糖电泳,采用生工琼脂糖回收试剂盒(cat:SK8131)对 DNA 进行回收。回收产物用 Qubit 2.0 定量,根据测得的 DNA 浓度,将所有样品按照 1:1 的比例进行混合;混合后充分震荡均匀。该混合样品可用于后续建库(加测序标签)与测序。

测序分析流程:采用 Flash 软件融合双末端序列,而后通过各样品 barcode 使数据回归样品,并对各样本序列做 QC。去除非靶区域序列及嵌合体,采用 RDPclassifier 将序列进行物种分类,将多条序列根据其序列之间的距离来对它们进行聚类,以序列之间的相似性 97%作为域值分成操作分类单元(OTU)。相同的 OTU 数量越多说明样本间真菌种类越相近。

1.4 数据处理

运用不同分类水平的 OTU 分析,说明山核桃林地土壤真菌群落结构。采用 Alpha 多样性分析,计算 Shannon-Wiener 指数,ACE 指数,Chao1 指数,Coverage 等,衡量每个样本的物种多样性^[11]。使用 SPSS 19.0

对不一样地土壤化学性质与真菌多样性指数进行相关分析。

Shannon-Wiener 多样性指数:

$$H' = - \sum_{i=1}^S P_i \ln(P_i) \quad (i=1,2,\cdots,S)$$

式中, H' 为物种多样性指数, S 为种数, P_i 为样品中属于第 i 个种的个体比例, 表示群落的多样性。

ACE 指数:

$$ACE = S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{n_1}{C_{ACE}}$$
$$C_{ACE} = \frac{n_1}{N_{rare}}, N_{rare} = \sum_{i=1}^{abund} in_i$$

式中, n_i 表示含有 i 条序列的 OTU 数目, S_{rare} 表示含有 “abund” 条序列或者少于 “abund” 的 OTU 数目, S_{abund} 表示多于 “abund” 条序列的 OTU 数目, “abund” 为 “优势” OTU 的阈值, 默认为 10。

Chao1 指数:

$$Chao1 = S_{obs} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)}$$

式中, S_{chao1} 表示估计的 OTU 数, S_{obs} 表示实际 OTU 数, n_1 表示只有 1 条序列的 OTU 数目, n_2 表示只有 2 条序列的 OTU 数目。

Coverage:

$$C = 1 - \frac{n_1}{N}$$

式中, n_1 =只含有 1 条序列的 OTU 的数目, N =抽样中出现的总的序列数目。

2 结果与分析

2.1 不一样地的基本化学性质分析

各样地土壤基本化学性质见表 1。

由表 1 中可以看出, 生长不良的林地 (样地 1, 样地 2, 样地 3) pH 均值低于正常林地 (样地 4, 样地 5, 样地 6 号), 有机质碱解氮和交换性酸的均值高于正常林地。pH 低和交换性酸高说明生长不良林地酸化严重, 碱解氮含量高可能是由于之前施用化肥, 导致林地土壤氮素积累较多。

表 1 不一样地土壤基本化学性质
Table 1 Soil chemical properties in 6 sample plots

样地号	pH	有机质/(g·kg ⁻¹)	碱解氮/(mg·kg ⁻¹)	速效磷/(mg·kg ⁻¹)	速效钾/(mg·kg ⁻¹)	交换性酸/(cmol·kg ⁻¹)
生长不良林地 1	4.64	46.28	218.83	29.41	136.00	7.42
生长不良林地 2	4.59	43.28	247.60	27.51	114.00	6.11
生长不良林地 3	4.67	37.14	183.36	33.13	123.00	5.20
平均	4.63	42.23	216.60	30.02	124.33	6.24
正常林地 4	5.92	22.35	113.76	28.29	107.00	0.31
正常林地 5	5.73	21.74	110.42	26.94	118.00	0.42
正常林地 6	6.28	24.44	104.07	25.52	98.00	0.09
平均	5.98	22.84	109.42	26.92	107.67	0.27

2.2 不一样地土壤真菌群落结构分析

通过 OTU 分析得出,在相似水平为 97%的条件下,6 个样地中土壤真菌共有 5 门 19 纲 74 目 134 科 271 属。在门的分类水平上, 包括壶菌门 Chytridiomycota, 聚合菌门 Glomeromycota, 子囊菌门 Ascomycota, 接合菌门

Zygomycota, 担子菌门 Basidiomycota, 其中子囊菌门、接合菌门和担子菌门为主要类群。样地 4, 样地 5, 样地 6 土壤中担子菌门的相对丰度(19.68%, 21.36%, 26.57%)和接合菌门的相对丰度(21.73%, 30.88%, 29.36%) 高于样地 1, 样地 2, 样地 3。

表 2 不同样地土壤真菌优势门相对丰度
Table 2 Relative abundance of dominant Phylum in 6 sample plots

分类	样地 1/%	样地 2/%	样地 3/%	样地 4/%	样地 5/%	样地 6/%
<i>Chytridiomycota</i> 壶菌门	0.04	0.01	0.01	0.17	0.23	0.23
<i>Glomeromycota</i> 聚合菌门	0.30	0.41	0.28	0.93	0.36	0.28
<i>Ascomycota</i> 子囊菌门	44.71	25.13	29.53	23.37	33.92	30.97
<i>Zygomycota</i> 接合菌门	3.28	5.67	6.54	21.73	30.88	29.36
<i>Unclassified</i> 无法分类	31.55	27.66	34.20	18.82	11.04	14.20
<i>Basidiomycota</i> 担子菌门	3.46	5.12	4.56	19.68	21.36	26.57

在属的分类水平上, 被孢霉属 *Mortierella*, 小画线壳属 *Monographella*, 镰刀霉属 *Fusarium* 和土赤壳属 *Ilyonectria* 是优势属, 样地 4, 样地 5, 样地 6 土壤中被孢霉属的相对丰度(12.95%, 11.25%, 13.44%) 高于样地 1、样地 2、样地 3, 小画线壳属的相对丰度(1.33%, 1.89%, 1.97%)、镰刀霉属的相对丰度(1.44%, 1.14%, 1.22%) 和土赤壳属的相对丰度(1.03%, 1.64%, 1.25%) 均低于样地 1, 样地 2, 样地 3。

表 3 不同样地真菌优势属相对丰度
Table 3 Relative abundance of dominant genera in 6 sample plots

样地 1		样地 2		样地 3	
属名	相对丰度/%	属名	相对丰度/%	属名	相对丰度/%
<i>Russula</i> 红菇属	1.35	<i>Clitopilus</i> 斜盖菇属	1.37	<i>Mortierella</i> 被孢霉属	1.44
<i>Trichosporon</i> 毛孢子菌属	1.56	<i>Cryptococcus</i> 隐球菌	1.54	<i>Cryptococcus</i> 隐球菌	1.63
<i>Mortierella</i> 被孢霉属	2.27	<i>Mortierella</i> 被孢霉属	1.79	<i>Monographella</i> 小画线壳属	8.97
<i>Cryptococcus</i> 隐球菌	2.38	<i>Fusarium</i> 镰刀霉属	7.17	<i>Fusarium</i> 镰刀霉属	9.25
<i>Monographella</i> 小画线壳属	7.65	<i>Monographella</i> 小画线壳属	9.06	<i>Ilyonectria</i> 土赤壳属	13.75
<i>Fusarium</i> 镰刀霉属	8.69	<i>Ilyonectria</i> 土赤壳属	9.69		
<i>Ilyonectria</i> 土赤壳属	11.17				
样地 4		样地 5		样地 6	
属名	相对丰度/%	属名	相对丰度/%	属名	相对丰度/%
<i>Ilyonectria</i> 土赤壳属	1.03	<i>Fusarium</i> 镰刀霉属	1.14	<i>Fusarium</i> 镰刀霉属	1.22
<i>Monographella</i> 小画线壳属	1.33	<i>Trichoderma</i> 木霉属	1.57	<i>Ilyonectria</i> 土赤壳属	1.25
<i>Fusarium</i> 镰刀霉属	1.44	<i>Ilyonectria</i> 土赤壳属	1.64	<i>Cryptococcus</i> 隐球菌	1.63
<i>Mycenella</i>	1.56	<i>Monographella</i> 小画线壳属	1.89	<i>Monographella</i> 小画线壳属	1.97
<i>Cryptococcus</i> 隐球菌	2.95	<i>Cryptococcus</i> 隐球菌	2.88	<i>Mortierella</i> 被孢霉属	13.44
<i>Mortierella</i> 被孢霉属	12.95	<i>Mortierella</i> 被孢霉属	11.25		

2.3 不同林地土壤真菌 Alpha 多样性分析

由表 4 样地土壤真菌多样性分析显示, 6 个样地 Shannon-Wiener 多样性指数排序为: 样地 2>样地 1>样地 3>样地 6>样地 4>样地 5, 指数越大, 说明群落多样性越高; ACE 多样性指数排序为样地 1>样地 2>样地 3>样地 5>样地 6>样地 4; Chao1 多样性指数排序为样地 1>样地 2>样地 3>样地 5>样地 6>样地 4; Chao1 和 ACE 指数越大, 说明群落丰富度越高。综合 3 种多样性指数, 发现生长不良林地土壤真菌多样性和丰富度均高于正常林地。

表 4 不同样地土壤真菌多样性
Table 4 Soil fungi diversity in 6 sample plots

样地号	序列数	OTU 数	Shannon-Wiener 指数	ACE 指数	Chao1 指数	Coverage
1	10 015	685	4.510 913	1 198.684 950	1 261.991 379	0.974 638
2	11 563	661	5.285 624	1 014.467 531	1 047.242 991	0.975 093
3	10 422	790	4.302 487	989.458 152	996.519 380	0.965 266
4	3 274	234	2.394 772	414.730 489	363.893 617	0.966 097
5	3 442	240	2.225 277	532.158 523	504.893 617	0.963 684
6	3 744	257	2.779 196	510.271 057	453.370 370	0.984 934

2.4 土壤化学性质与真菌多样性的相关分析

由表 5 相关分析表明, 土壤 pH 与 Shannon-Wiener 指数间呈显著负相关 ($P<0.05$), 与 ACE 指数和 Chao1 指数间呈极显著负相关 ($P<0.01$)。有机质、碱解氮和交换性酸均与 3 种多样性指数显著正相关 ($P<0.05$)。

表 5 山核桃林地土壤化学性质与真菌多样性的相关分析
Table 5 Correlation analysis on soil chemical properties with fungi species diversity

	Shannon-Wiener 指数	ACE 指数	Chao1 指数
pH	-0.905*	-0.941**	-0.942**
有机质	0.956**	0.979**	0.980**
碱解氮	0.975**	0.922**	0.925**
速效磷	0.431	0.551	0.539
速效钾	0.508	0.788	0.799
交换性酸	0.935**	0.990**	0.991**

注: *表示在 0.05 水平上显著相关, **表示在 0.01 水平上极显著相关。

3 讨论

本研究确定了临安山核桃林地土壤的优势真菌类群, 生长不良林地与正常林地土壤真菌优势类群基本一致, 但相对丰度有明显差异, 可能是这些差异导致林分生长状况不同。在门的分类水平上, 正常林地土壤中担子菌门和接合菌门的相对丰度高于生长不良林地。在属的分类水平上, 正常林地中小画线壳属、镰刀霉属和土赤壳属的相对丰度明显低于生长不良林地。两类林地的种群和丰度差异可能是影响山核桃健康的主要原因。有研究表明, 小画线壳属、镰刀霉属和土赤壳属的真菌与植物根腐病有关^[12-13], 生长不良林地中植株根大量死亡可能和这三个真菌属的相对丰度较高有关。

本研究中山核桃林地土壤真菌多样性与 pH、有机质、碱解氮和交换性酸有关, pH 与林地土壤真菌多样性之间呈负相关, 有机质、碱解氮和交换性酸与林地土壤真菌多样性呈正相关。pH 和交换性酸反映土壤的酸性。生长不良林地比正常林地土壤酸性强, 酸性土壤中真菌多样性会更丰富^[14]。生长不良林地中的山核桃植株有大量枝条和根死亡, 林地中有机质含量会高于正常林地, 土壤有机质含量高, 也会使土壤真菌数量和物种多样性增加^[15]。山核桃林生长不良通常和氮肥施用过多有关^[16], 生长不良林地之前一直施用化肥, 土壤碱解氮普遍高于正常林地, 碱解氮含量升高也会影响土壤真菌多样性^[17]。土壤化学性质对真菌群落的数量和组成影响较大, 因此不能只根据真菌多样性来判断林地土壤环境的优劣。

4 结论

(1) 6 个样地中土壤真菌共有 5 门 19 纲 74 目 134 科 271 属。生长不良林地与正常林地土壤真菌群落结构有明显差异, 在门的分类水平上, 正常林地土壤中担子菌门和接合菌门的相对丰度高于生长不良林地。在属的分类水平上, 正常林地土壤中小画线壳属、镰刀霉属和土赤壳属的相对丰度明显低于生长不良林地。

(2) 生长不良林地土壤真菌多样性和丰富度高于正常林地。Shannon-Weiner 指数, ACE 指数和 Chao1 指数与土壤 pH 之间呈显著负相关 ($P<0.05$), 与有机质、碱解氮和交换性酸之间呈显著正相关 ($P<0.05$)。

参考文献:

[1] 陈世权, 黄坚钦, 黄兴召, 等. 不同母岩发育山核桃林地土壤性质及叶片营养元素分析[J]. 浙江林学院学报, 2010, 27(4): 572-578.
[2] 钱孝严, 黄坚钦, 帅小白, 等. 临安市不同乡镇山核桃林地土壤理化性质比较[J]. 浙江林业科技, 2013, 33(1): 7-11.
[3] 张圆圆. 山核桃林地土壤养分现状与山核桃植物营养研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2010.
[4] 高云超, 朱文珊, 陈文新. 秸秆覆盖免耕土壤真菌群落结构与生态特征研究[J]. 生态学报, 2001, 21(10): 1704-1710.
[5] 何玉梅, 张仁陟, 张丽华, 等. 不同耕作措施对土壤真菌群落结构与生态特征的影响[J]. 生态学报, 2007, 27(1): 113-119.
[6] 韦俊, 杨焕文, 徐照丽, 等. 烤烟不同套作模式对土壤理化性质和真菌群落结构的影响[J]. 土壤通报, 2017, 48(3): 631-638.
[7] 郝海婷, 王若愚, 赵霞, 等. 基于高通量测序技术的堆肥对兰州百合根际微生物多样性的影响[J]. 西北农业学报, 2017, 26(3): 437

– 447.

- [8] 赵柏霞, 潘凤容, 韩晓日. 基于高通量测序技术的樱桃根际细菌群落研究[J]. 土壤通报, 2018, 49 (3): 596–601.
- [9] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [10] 赵裕栋, 周俊, 何靖. 土壤微生物总 DNA 提取方法的优化[J]. 微生物学报, 2012, 52 (9): 1143–1150.
- [11] 张彩霞. 新一代高通量测序技术研究土壤微生物群落结构对环境条件的响应[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [12] 苗翠苹. 三七根际土壤微生物的群落特征[D]. 昆明: 云南大学, 2012.
- [13] 胡国良, 俞彩珠. 山核桃病虫害防治彩色图谱[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [14] 高玉峰, 贺字典. 影响土壤真菌多样性的土壤因素[J]. 中国农学通报, 2010, 26 (10): 178–181.
- [15] UPADHYAY R, RAI B. Ecological survey of Indian soil fungi with special reference to *Aspergillus*, *Penicillia* and *Trichoderma*. [J]. *Rev Ecol Biol Soil*, 1979, 16 (1): 39–49.
- [16] 宋素灵. 山核桃林地土壤退化现状和施肥改良研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2014.
- [17] 张国青, 赵盼, 董彦旭, 等. 高通量测序分析环保肥料增效剂对马铃薯根际土壤真菌多样性变化影响[J]. 微生物学通报, 2017, 44(11): 2644–2651.