

黄依蓝,岳倩倩,倪爱新,等. 宽阔水自然保护区3种类型土壤的真菌多样性[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):458-460.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.131

# 宽阔水自然保护区3种类型土壤的真菌多样性

黄依蓝,岳倩倩,倪爱新,周礼红

(贵州大学生命科学院,贵州贵阳 550000)

**摘要:**利用稀释平板法和基于 ITS rDNA 基因序列的分析方法对宽阔水自然保护区3种类型的土壤进行真菌的分离鉴定,共分离得到353株真菌,归为34个不同的属。对土壤真菌多样性进行评估,结果表明:紫色土真菌优势属为酵母菌属(*Saccharomyces*),黄棕壤真菌优势属为酵母菌属(*Saccharomyces*)和被孢霉属(*Mortierella*),黄壤真菌优势属为青霉属(*Penicillium*)和木霉属(*Trichoderma*)。土壤真菌 Margalef 丰富度指数( $R$ )最高的是黄壤,最低的是黄棕壤; Shannon - Wiener 多样性指数( $H'$ )最高的是紫色土; Pielou 均匀度指数( $J$ )黄棕壤最高; Jaccard 相似性指数( $C_j$ )为 0.444 ~ 0.536,表明3种类型土壤的真菌多样性均具有一定差异。

**关键词:**宽阔水;土壤真菌;多样性

**中图分类号:** S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0458-03

宽阔水自然保护区位于贵州省遵义市绥阳县境内,总面积 26 231 km<sup>2</sup>,海拔在 650 ~ 1 762 m 之间,地形切割强烈,除中南部以中低山谷地为主的侵蚀地貌外,保护区东、西部及北部多为典型的喀斯特地貌。宽阔水保护区的森林植被主体为亮叶水青冈林与常绿阔叶树种构成落叶常绿阔叶混交林,林下土壤发育良好,具有较丰富的腐殖质积累<sup>[1]</sup>。由于特殊的气候及地质土壤条件,宽阔水自然保护区为森林野生动植物及微生物的生长繁育提供了有利的栖息场所,形成了复杂多样的生境类型。与动植物的分布类似,微生物的分布是确定性(环境)和随机性(扩散)的共同结果。由于微生物个体较小,可以通过孢子抵御长距离传播中的不良环境,在适宜条件下以多种繁殖方式存活下来,这种巨大的分散潜力和对小环境的敏感性,是微生物群落结构与大型生物群落结构之间的区别。土壤真菌作为微生物群落结构中的一个重要组成部分,其多样性程度与土壤肥力和生态状况密切相关,同时生态系统的物质循环及环境变化,也直接影响到真菌物种多样性和空间分布情况<sup>[2-4]</sup>。

本研究采用传统分离方法对宽阔水自然保护区3种不同土壤的真菌多样性进行调查,结合微生物多样性的分析方法,对该地区真菌菌群的基本特征、空间分布状况和物种多样性进行调查,为进一步揭示微生物和环境之间的关系奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

土样采自宽阔水自然保护区。马丁氏培养基、马铃薯琼脂培养基、沙氏培养基均按标准方法配制,所用试剂为国产分

析纯。真菌基因组 DNA 提取试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 土样采集** 选取宽阔水自然保护区内的红沙地、花生地、太阳山、煤场湾、天鹅湖、拱桐沟和一线天7个区域, GPS 记录采集地的地理位置,采集地环境描述(表1)。采用对角线型路线多点采集腐殖质层土壤样品于灭菌袋中,进行编号,4℃保存。

**1.2.2 土壤真菌的分离及纯化** 分离培养基为马丁氏琼脂培养基、改良沙氏孟加拉红培养基和马铃薯孟加拉红培养基,均在使用前加入链霉素,使培养基中含链霉素 30 μg/mL。

用稀释涂布法分离土壤真菌。称取 10 g 土壤于 90 mL 含少量玻璃珠的无菌水中,充分振荡混匀,按 10 倍稀释法稀释到  $1 \times 10^{-3}$ ,取 400 μL 菌悬液于培养基上,均匀涂布,28℃培养 5 d,进行菌落计数。

### 1.2.3 ITS 序列分子鉴定

**1.2.3.1 真菌基因组 DNA 的提取** 基因组 DNA 提取按照试剂盒操作说明书进行。

**1.2.3.2 ITS 序列的 PCR 扩增** (1)引物序列如下: ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG; ITS4: TCCTCCGCTTATGATATGC。(2)PCR 反应体系:扩增反应体系为 25 μL(表2)。配制完成后,充分混匀,稍加离心使体系在 PCR 管底部,再置于 PCR 仪上进行扩增。(3)PCR 扩增条件:94℃预变性 4 min; 94℃变性 30 s,55℃引物退火 30 s,72℃延伸 1 min,30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。

**1.2.3.3 PCR 扩增产物的检测** 反应结束后,分别取 3 μL PCR 产物和 DNA marker 点于 1% 琼脂糖凝胶的点样孔中进行电泳,结束后使用凝胶成像系统进行观察,若条带单一且明亮清晰则表明扩增成功,样品可用于进一步测序。

### 1.2.4 序列测定与分析方法

**1.2.4.1 测序** PCR 产物经纯化后用全自动 DNA 测序仪进行测序,获得 ITS 序列。

**1.2.4.2 序列及真菌种群分布分析** 将已测定的序列在

收稿日期:2015-11-22

基金项目:国家科技基础性工作专项(编号:2014FY120100)。

作者简介:黄依蓝(1992—),女,硕士研究生,主要从事土壤真菌资源研究。E-mail:ylhuang77@163.com。

通信作者:周礼红,博士,副教授,主要从事微生物应用方向的研究。

E-mail:lhzhou33@126.com。

表1 土壤采集地环境描述

采集地	纬度(N)	经度(E)	海拔(m)	土壤类型	土壤 pH 值	生境类型
红沙地	28°13'10"	107°9'17"	1 486 ~ 1 510	紫色土	5.5	灌木丛
花生地	28°13'26"	107°9'43"	1 503 ~ 1 517	黄棕壤	6.0	竹林地
太阳山	28°14'9"	107°9'37"	1 592 ~ 1 722	黄棕壤	6.0	方竹
煤场湾	28°13'56"	107°9'42"	1 555 ~ 1 579	黄壤	6.5	灌木丛
天鹅湖	28°13'45"	107°9'43"	1 515 ~ 1 524	黄壤	7.0	灌木丛
琪桐沟	28°13'59"	107°10'1"	1 582 ~ 1 629	黄壤	6.5	灌木丛
一线天	28°14'11"	107°11'12"	1 411 ~ 1 455	黄壤	6.5	灌木丛

表2 PCR 反应体系组分

反应组分	体积(μL)
引物 ITS1	1
引物 ITS4	1
模板	2
2 × PCR Master Mix	12
dd H <sub>2</sub> O	9

GenBank 上使用 Blast (basic local alignment search tool, Blast 2.2.31) 进行序列比对分析、鉴定。

1.2.5 真菌多样性分析方法 采用物种个体数量( $N$ )、物种数( $S$ )、种群优势度( $d$ )、Margalef 丰富度指数( $R$ )、Shannon - Wiener 的多样性指数( $H'$ )、Pielou 均匀度指数( $J$ )和 Jaccard 相似性指数( $C_j$ )对宽阔水保护区不同土壤真菌群落多样性进行分析<sup>[5-7]</sup>。

种群优势度:  $d_i = N_i/N$ ;

Margalef 丰富度指数:  $R = (S - 1)/\ln N$ 。

Shannon - Wiener 多样性指数:  $H' = -\sum P_i \ln P_i$  ( $i = 1, 2, 3, \dots, n$ );

Pielou 均匀度指数:  $J = H'/\ln S$ 。

式中,  $P_i = d_i$ , 表示第  $i$  种个体数占总个体数的比例。

Jaccard 相似性指数:  $C_j = c/(a + b + c)$ 。

式中,  $a$  和  $b$  分别为 2 种生境地中真菌的种数或属数,  $c$  为 2 种生境地中共有的真菌种数或属数。Jaccard 相似性系数 ( $C_j$ ) 用于比较 2 个生境中真菌种类组成的相似程度, 根据其原理: 当  $C_j$  为 0.00 ~ <0.25 时, 为极不相似; 当  $C_j$  为 0.25 ~ <0.50 时, 为中等不相似; 当  $C_j$  为 0.50 ~ <0.75 时, 为中等相似; 当  $C_j$  为 0.75 ~ 1.00 时, 为极相似。

## 2 结果与分析

### 2.1 总体土壤真菌的群落组成

在宽阔水自然保护区的不同区域共采集了 28 份土壤样品, 包含紫色土、黄棕壤和黄壤 3 种土壤类型, 采用传统方法分离得到 353 株真菌。根据 ITS 序列进行分析将 353 株真菌归为 34 个属 (表 3), 分别为青霉属 (*Penicillium*)、木霉属 (*Trichoderma*)、酵母菌属 (*Saccharomyces*)、被孢霉属 (*Mortierella*)、柄孢壳菌属 (*Podospora*)、棘壳孢菌属 (*Pyrenochaeta*)、隐球菌属 (*Cryptococcus*)、肉座菌属 (*Hypocrea*)、小不整球壳属 (*Plectosphaerella*)、枝孢霉属 (*Cladosporium*)、篮状菌属 (*Talaromyces*)、黏鞭霉属 (*Gliomastix*)、绿僵菌属 (*Metarhizium*)、腐质霉属 (*Humicola*)、镰刀菌属 (*Fusarium*)、壳二孢属 (*Ascochyta*)、微座孢菌属 (*Microdochium*)、枝顶孢属 (*Acremonium*)、座囊菌属 (*Dothideomycetes*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、茎霉属 (*Chaunopycnis*)、毛孢子菌属 (*Trichosporon*)、毛壳菌属

(*Chaetomium*)、轮枝孢属 (*Verticillium*)、鹿虫草属 (*Elaphocordyceps*)、假丝酵母属 (*Candida*)、棒孢酵母属 (*Clavispora*)、拟青霉属 (*Paecilomyces*)、威克汉逊酵母属 (*Wickerhamomyces*)、黏帚霉属 (*Gliocladium*)、*Myrmecridium*、三毛孢属 (*Robillarda*)、拟盾壳霉属 (*Paraconiothyrium*)、假小尾孢属 (*Pseudocercospora*)。

### 2.2 不同土壤真菌群落组成及优势度分析

根据庞雄飞等研究, 某物种占整体物种的百分比  $\geq 10\%$  为优势属,  $>1\% \sim <10\%$  为常见属,  $\leq 1\%$  为稀有属<sup>[8]</sup>。由表 3 可见, 宽阔水自然保护区紫色土真菌优势属为酵母菌属 (*Saccharomyces*)。其中绿僵菌属 (*Metarhizium*)、枝顶孢属 (*Acremonium*)、座囊菌属 (*Dothideomycetes*)、黏帚霉属 (*Gliocladium*)、*Myrmecridium*、黏鞭霉属 (*Gliomastix*)、拟盾壳霉属 (*Paraconiothyrium*) 为该类型土壤真菌的特有类群, 其中 *Myrmecridium* 为稀有属。

黄棕壤真菌优势属为酵母菌属 (*Saccharomyces*) 和被孢霉属 (*Mortierella*)。棘壳孢菌属 (*Pyrenochaeta*)、轮枝孢属 (*Verticillium*) 为其特有类群, 其中棘壳孢菌属 (*Pyrenochaeta*) 为稀有属。

黄壤真菌优势属为青霉属 (*Penicillium*) 和木霉属 (*Trichoderma*)。腐质霉属 (*Humicola*)、拟青霉属 (*Paecilomyces*)、微座孢菌属 (*Microdochium*)、威克汉逊酵母属 (*Wickerhamomyces*)、假小尾孢属 (*Pseudocercospora*)、三毛孢属 (*Robillarda*) 真菌为黄壤中的特有类群, 其中威克汉逊酵母属 (*Wickerhamomyces*) 为稀有属。

### 2.3 不同土壤真菌群落多样性差异

生境条件越适宜, 丰富度指数和多样性指数越高, 多样性指数也可反映出群落稳定性大小。均匀度反映的是群落中不同物种分布的均匀程度<sup>[9-10]</sup>。由表 4 可见, 真菌单菌落数量  $S$  为黄壤 > 紫色土 > 黄棕壤, 物种数 (属数)  $N$  为紫色土 > 黄壤 > 黄棕壤, Margalef 丰富度指数  $R$  黄壤 > 紫色土 > 黄棕壤, Shannon - Wiener 多样性指数  $H'$  紫色土 > 黄壤 > 黄棕壤, Pielou 均匀度指数  $J$  黄棕壤 > 黄壤 > 紫色土。紫色土和黄棕壤的 Jaccard 相似性指数  $C_j$  为 0.536, 中等相似; 紫色土和黄壤  $C_j$  为 0.500, 中等相似, 黄棕壤和黄壤  $C_j$  为 0.444, 中等不相似。

## 3 讨论

本研究采用种群优势度、丰富度指数、多样性指数、均匀度和相似度指数, 对宽阔水自然保护区 3 种不同土壤的真菌群落多样性进行了分析。结果表明, 从群落组成来看, 各类土壤的优势种属、常见种属和稀有种属均有较大差异, 其中有一些属为其相应土壤所特有。宽阔水自然保护区土壤中大量存

表3 3种土壤中真菌归属情况

属名	紫色土		黄棕壤		黄壤	
	菌落数	优势度	菌落数	优势度	菌落数	优势度
柄壳孢菌属	5	0.039 4	4	0.044 4	0	0.000 0
棘壳孢菌属	0	0.000 0	6	0.066 7	0	0.000 0
隐球菌属	1	0.007 9	2	0.022 2	1	0.007 4
被孢霉属	1	0.007 9	12	0.133 3	12	0.088 2
肉座菌属	2	0.015 7	8	0.088 9	6	0.044 1
青霉属	9	0.070 9	8	0.088 9	27	0.198 5
小不整壳孢属	4	0.031 5	1	0.011 1	3	0.022 1
轮枝孢属	0	0.000 0	3	0.033 3	0	0.000 0
酵母菌属	33	0.259 8	21	0.233 3	12	0.088 2
鹿虫草属	1	0.007 9	2	0.022 2	0	0.000 0
假丝酵母属	1	0.007 9	0	0.000 0	1	0.007 4
棒孢酵母属	1	0.007 9	0	0.000 0	1	0.007 4
枝孢霉属	7	0.055 1	3	0.033 3	9	0.066 2
木霉属	9	0.070 9	8	0.088 9	16	0.117 6
篮状菌属	5	0.039 4	0	0.000 0	6	0.044 1
绿僵菌属	4	0.031 5	0	0.000 0	0	0.000 0
腐质霉属	0	0.000 0	0	0.000 0	12	0.088 2
拟青霉属	0	0.000 0	0	0.000 0	2	0.014 7
镰刀菌属	6	0.047 2	1	0.011 1	6	0.044 1
壳二孢属	3	0.023 6	0	0.000 0	3	0.022 1
微座孢菌属	0	0.000 0	0	0.000 0	2	0.014 7
枝顶孢属	5	0.039 4	0	0.000 0	0	0.000 0
座囊菌属	4	0.031 5	0	0.000 0	0	0.000 0
威克汉逊酵母属	0	0.000 0	0	0.000 0	1	0.007 4
曲霉属	10	0.078 7	6	0.066 7	6	0.044 1
黏帚霉属	3	0.023 6	0	0.000 0	0	0.000 0
茎霉属	2	0.015 7	2	0.022 2	0	0.000 0
<i>Myrmecridium</i>	1	0.007 9	0	0.000 0	0	0.000 0
毛孢子菌属	3	0.023 6	1	0.011 1	2	0.014 7
毛壳菌属	1	0.007 9	2	0.022 2	3	0.022 1
假小尾孢属	0	0.000 0	0	0.000 0	2	0.014 7
三毛孢属	0	0.000 0	0	0.000 0	3	0.022 1
黏鞭霉属	4	0.031 5	0	0.000 0	0	0.000 0
拟盾壳霉属	2	0.015 7	0	0.000 0	0	0.000 0
总计	127		90		136	

表4 3种类型土壤真菌群落多样性

土壤类型	S(N)	R	H'	J
紫色土	26(127)	5.160 8	2.775 6	0.851 9
黄棕壤	17(90)	3.555 7	2.468 2	0.871 2
黄壤	22(136)	4.274 7	2.676 1	0.865 8

在的酵母菌属(*Saccharomyces*)、木霉属(*Trichoderma*)、被孢霉属(*Mortierella*)、拟青霉属(*Paecilomyces*)、绿僵菌属(*Metarhizium*)、黏帚霉属(*Gliocladium*)等,具有较高的利用价值和前景,可作为农林病害防治和可持续发展的资源<sup>[11-15]</sup>。此外,不同土壤真菌群落多样性存在一定差异,Margalef丰富度指数最高的是黄壤真菌,最低的是黄棕壤;3种土壤真菌群落的Shannon-Wiener多样性指数在2.46~2.78之间,紫色土最高,黄棕壤最低;黄棕壤的Pielou均匀度指数最高,紫色土最低;Jaccard相似性指数为0.444~0.536,表明3种土壤相似性介于中等相似和中等不相似之间。造成不同土壤真菌群落多样性的差异原因比较复杂,除了土壤质地和土壤肥力外,还与其对应生境地的光照、降雨量、植被类型等有关<sup>[16-17]</sup>。同时由于其中一些种属的菌株具有生防功能,且不同微生物群落之间产生的相互作用使网络结构发生改

变,因此在一定程度上也影响了环境中的真菌多样性<sup>[18]</sup>。

由于传统培养方法的局限性,大量不可培养微生物无法通过分离获得,菌株数量十分有限。因此还需尝试多种不同的分离方法,结合以分子生物学为基础的相关技术进行多样性分析,才能更加全面地了解宽阔水保护区的土壤真菌多样性分布特征以及与环境之间的相互关系。

#### 参考文献:

- [1] 喻理飞, 谢双喜, 吴太伦. 宽阔水自然保护区综合科学考察集[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2004.
- [2] Jessica L G, Brendan J M B, Rachel J W. Microbial biogeography: from taxonomy to Traits[J]. Science, 2008, 320: 1039-1041.
- [3] Pagaling E, Wang H Z, Venables M, et al. Microbial biogeography of six salt lakes in Inner Mongolia, China, and a salt lake in Argentina[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(18): 5750-5760.
- [4] Finlay B J. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species[J]. Science, 2002, 296(5570): 1061-1063.
- [5] 周游. 九寨沟县自然保护区土壤真菌研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2010: 1-45.
- [6] 张群, 刘春阳, 于晓丹, 等. 辽河保护区土壤可培养真菌多样性分析[J]. 辽宁林业科技, 2014(6): 7-13.
- [7] Leslie J F, Summerell B A, Bullock S. The *Fusarium* laboratory manual[M]. Oxford: Blackwell Publishing, 2006: 1-278.
- [8] 庞雄飞, 尤民生. 昆虫群落生态学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 77-103.
- [9] 王娜, 吕国忠, 孙晓东, 等. 烟草根际土壤真菌多样性的研究[J]. 菌物学报, 2012, 31(6): 827-836.
- [10] 张颖慧. 森林植被与土壤微生物关系研究进展[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(30): 10683-10684, 10758.
- [11] Kumar M R, Kumaran M D, Balashanmugam P. Production of cellulase enzyme by *Trichoderma reesei* Cef9 and its application in the production of bio-ethanol[J]. Pakistan Journal of Biological Science, 2014, 17(5): 735.
- [12] Mutschlechner M, Illmer P, Wagner A O. Biological pre-treatment: enhancing biogas production using the highly cellulolytic fungus *Trichoderma viride*[J]. Waste Management, 2015, 43: 98-107.
- [13] Vadivelan G, Venkateswaran G. Production and enhancement of omega-3 fatty acid from *Mortierella alpina* CFR-GV15: its food and therapeutic application[J]. Bio Med Research International, 2014: 657414.
- [14] Patil N P, Patil K P, Chaudhari B L, et al. Production, purification of exo-polygalacturonase from soil isolate *Paecilomyces variotii* NFCCI 1769 and its application[J]. Indian Journal of Microbiology, 2012, 52(2): 240-246.
- [15] Ment D, Iraki N, Gindin G, et al. Thermal limitations of *Metarhizium anisopliae* efficacy: selection for application on warm-blooded vertebrates[J]. Bio Control, 2011, 56(1): 81-89.
- [16] 潘好芹, 张天宇, 黄悦华, 等. 太白山土壤淡色丝孢真菌群落多样性及生态位[J]. 应用生态学报, 2009, 20(2): 363-369.
- [17] 张俊忠, 陈秀蓉, 杨成德, 等. 东祁连山高寒草地土壤可培养真菌多样性分析[J]. 草业学报, 2010, 19(2): 124-132.
- [18] Faust K, Raes J. Microbial interactions: from networks to models[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(8): 538-550.