

黄河三角洲盐碱地土壤真菌多样性

王艳云, 郭笃发

(山东师范大学 地理与环境学院, 山东 济南 250014)

摘要:以黄河三角洲盐碱地(光板地、獐茅地、翅碱蓬地、柽柳地)土壤为研究对象,采用 454 高通量测序技术,对土壤中真菌群落和多样性进行了研究。结果表明:检测出的土壤真菌类群达 5 门 22 纲 59 目 87 科 157 属,其中,子囊菌门在所有样地中相对丰度最高,担子菌门次之。不同采样环境土壤中真菌多样性存在一定差异,光板地中多样性指数最高(2 070),獐茅地中最低(1 490)。子囊菌门和球囊菌门与土壤碱解氮相关性最大,担子菌门和壶菌门与土壤碱解氮和电导率相关性较大,毛霉亚门受速效磷影响最大。土壤速效磷对真菌属的作用最大。

关键词:黄河三角洲;盐碱地;454 高通量测序技术;真菌多样性

中图分类号:Q 938.1⁺3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)18-0185-05

盐碱地(土)是盐化土、碱化土和盐碱土的总称^[1],是世界性的低产土壤,有些甚至是不毛之地^[2]。土壤盐碱化是全世界关注的问题,据估计,全球的盐碱土以每年 100 万~150 万 hm^2 的速度增长^[3]。中国地域广大,气候多样,土壤盐碱化程度尤为严重,盐碱土的分布几乎遍及全国^[1],而黄河三角洲位于渤海西岸、渤海湾和莱州湾湾口,是我国三大河口三角洲之一。由于黄河携带大量泥沙入海,被海水浸渍成为盐渍淤土,不断沉积,日积月累海退成陆,经蒸发作用使盐分聚集地表。同时,潮水入侵补给地下水,参与土壤成盐过程,形成了典型的滨海盐碱地^[4]。其中,盐渍化土地面积 44.29 万 hm^2 ,占全区总面积的一半以上,而重度盐渍化土壤和盐碱光板地面积为 23.63 万 hm^2 ,约占区内土地面积的 28.4%^[5]。

以往对于土壤微生物的研究方法有很多,如传统的平板培养法、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)法以及克隆测序法,但是传统的培养法遗漏了土壤中绝大多数微生物,难以反映微生物群落多样性全貌。DGGE 和 T-RFLP 虽具有高通量的优势,能够指示不同群落结构的差别,但对微生物的认识也是有限的^[6-7],克隆测序给出的克隆文库显得太小,提供的信息仍然偏小。因为这些方法仅仅

能测定土壤中部分微生物种类,却难以发现稀有种类微生物^[8],因此土壤微生物仍常常被看作“黑箱”^[9-11]。高通量测序技术的发展,为人们认识土壤微生物多样性提供了新的契机。在多种高通量测序技术中,罗氏 454 测序技术和 Illumina 测序技术的应用比较多,而 454 高通量测序技术具有高通量、快捷、获得信息丰富等优点^[12-13],使得较准确、快速简单地获取土壤微生物信息成为可能,越来越多的被应用于微生物生态学研究。现使用 454 高通量测序技术开展了盐碱地土壤中真菌组成及多样性的研究和分析,以期为滨海盐碱地微生物修复与生态环境保护提供基础数据和微生物资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为黄河三角洲盐碱地(光板地、獐茅地、翅碱蓬地、柽柳地)的土壤。

1.2 试验方法

1.2.1 土样采集 在黄河三角洲的中心城市-东营市河口区进行采样。具体方法如下:分别在光板地、翅碱蓬地、獐茅地以及柽柳地各随机选取 3 个 20 cm×20 cm 的样方,以各植被为中心,采用对角线五点取样法在 0~20 cm 土层取样,3 次重复。将在多个地点采集的土壤分别进行充分混合并除去较大的石块和根系等杂物后,分成 2 份,每份约 200 g,分别编号光板地(GB)、翅碱蓬(JP)、獐茅(ZM)、柽柳(CL)。1 份封于灭菌袋中,4℃下干燥保存,用于土壤理化性质分析;另 1 份则放入液氮罐带回实验室,保存在-80℃冷冻条件下,用于分子生物学研究。

1.2.2 土壤 DNA 提取与 PCR 扩增 称取 0.5 g 土壤,

第一作者简介:王艳云(1990-),女,硕士研究生,研究方向为土壤微生物学。E-mail:1786582634@qq.com.

责任作者:郭笃发(1963-),男,博士,教授,现主要从事土壤微生物和重金属等研究工作。E-mail:guodufa@163.com.

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2012DM013)。

收稿日期:2016-04-20

用 Omega DNA 试剂盒(D5625-01)提取总 DNA。PCR 扩增体系包括:模板 DNA 10 ng、10×buffer、0.4 mmol·L⁻¹ dNTP(0.5 μL)、5 U *Taq* DNA 聚合酶(0.5 μL)、1 μL Bar-PCR primer F(50 μmol·L⁻¹)、1 μL primer R(50 μmol·L⁻¹)。按照 94℃预变性 5 min,95℃变性 45 s,57℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,30 个循环,最后 72℃延伸 5 min 的 PCR 扩增程序扩增,10℃保存 PCR 产物。PCR 扩增采用 Roche 454FLX 测序平台的通用引物,包括:18sF 引物(CGTATCGCCTCCTCGCGCCAT-CAG+bar+CAGTAGTCATATGCTTGCT)、18sR 引物(CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGGCTGCTGGCA-CCAGACTTGC)。扩增产物采用罗氏公司 454 测序仪(Roch GS FLX sequencer)进行测序。

1.3 项目测定

风干后测定土壤理化性质。碱解氮含量测定采用碱解扩散法,速效磷含量测定采用 Olsen 法,有机碳含量测定采用重铬酸钾氧化-外加热法^[14]。含水率测定采用土钻法取土并称鲜样质量,然后在 105℃的烘箱内烘干至恒重并称重,计算土壤含水率。土壤含水率(%)=土壤水质量/干土质量×100。

1.4 数据分析

试验数据采用 Excel 和 Canoco 5 软件进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 高通量测序原始数据处理

测序原始数据共得到 49 009 条序列(Reads),经过预处理、质控后剩余 48 198 条序列,预设每个样品 10 000 条序列,然后去除嵌合体(Chimeras)后得到每个样品的序列数(Sequences)(表 1)。

表 1 样品序列数及 OTUs

Table 1 Sequence and OTUs numbers of samples

样地 Sample	有效序列 Sequences	可操作分类单元 OTUs
光板地 GB	10 796	1 177
桤柳地 CL	9 389	1 089
獐茅地 ZM	14 298	958
翅碱蓬地 JP	13 019	1 077

2.2 土壤真菌组成及多样性

采用基于 Bergey's taxonomy 的软件 RDP classifier 对处理后序列进行物种分类,共分为 5 层,依次为门(phylum)、纲(class)、目(order)、科(family)、属(genus)。

所有土样中共获得 5 个真菌门,依次为子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、壶菌门(Chytridiomycota)、毛霉亚门(Mucoromycotina)、球囊菌门(Glomeromycota)。由图 1A 可知,在光板地和翅碱蓬地中只检测到前 4 个,獐茅地和桤柳地中含有检测到的所有门。在所有样地中,子囊菌门相对丰度最高,其在

光板地、翅碱蓬、獐茅和桤柳地中相对丰度分别为 4.43%、2.69%、69.97%、6.43%。

检测到的 22 个真菌纲中有 2 个未有明确分类名称信息。由图 1B 可知,獐茅地和桤柳地中纲最多,都是 17 个,光板地中最少,有 13 个。相对丰度最大的 3 个纲分别是 Sordariomycetes、Dothideomycetes 和 Pucciniomycetes,其中,Sordariomycetes 在光板地、桤柳、獐茅、翅碱蓬土壤中的相对丰度依次为 3.27%、1.57%、62.72%、1.71%,Dothideomycetes 的相对丰度依次为 0.64%、2.06%、6.68%、0.51%,Pucciniomycetes 的相对丰度依次为 1.39%、6.97%、0.04%、0.98%。

在检测到的 59 个真菌目中有 5 个未有明确分类名称信息。从图 1C 可以看出,桤柳地中目最多,有 42 个,光板地中最少,仅有 34 个。相对丰度最大的 3 个目分别是 Xylariales、Pucciniales、Pleosporales,其中,前者在光板地、桤柳、獐茅、翅碱蓬土壤中的相对丰度依次为 3.06%、0.47%、58.84%、0.29%,Pucciniales 的相对丰度依次为 1.39%、6.97%、0.04%、0.98%,后者的相对丰度依次为 0.21%、1.73%、5.32%、0.42%。

所有土样中共获得 87 个真菌科,其中有 14 个未有明确分类名称信息。从图 1D 可以看出,獐茅地中所含真菌科最多,为 57 个,翅碱蓬地中所含真菌科最少,仅有 37 个。相对丰度最大的 3 个科分别是 Mortierellaceae、Diatrypaceae、Pucciniales_Incertae_Sedis,前者在光板地、桤柳、獐茅、翅碱蓬土壤中的相对丰度依次为 0.64%、19.65%、0.09%、48.35%,Diatrypaceae 的相对丰度依次为 2.93%、0.32%、58.84%、0.28%,后者的相对丰度依次为 1.39%、6.97%、0.04%、0.98%。

所有土样中共获得 157 个真菌属,其中有 5 个未有明确分类名称信息。由图 1E 可以看出,獐茅地所含真菌属最多,达 94 个,翅碱蓬地中所含真菌属最少,仅有 67 个。相对丰度最大的 3 个属分别是 *Diatrype*、*Hemileia*、*Phaeosphaeria*。

2.3 土壤真菌多样性

由表 2 可知,4 个土样的覆盖率均大于 90%,表明该次测序深度合理,基本能代表样本的真实情况。此外,光板地多样性指数最高,而獐茅地中多样性指数最低,这与表 1 中 OTUs 的变化规律一致。

表 2 样品真菌多样性及覆盖度

Table 2 Diversity index and coverage of samples

样地 Sample	多样性指数 Diversity index	覆盖度 Coverage/%
光板地 GB	2 070	94.8
桤柳地 CL	1 892	94.7
獐茅地 ZM	1 490	97.3
翅碱蓬地 JP	1 847	96.3

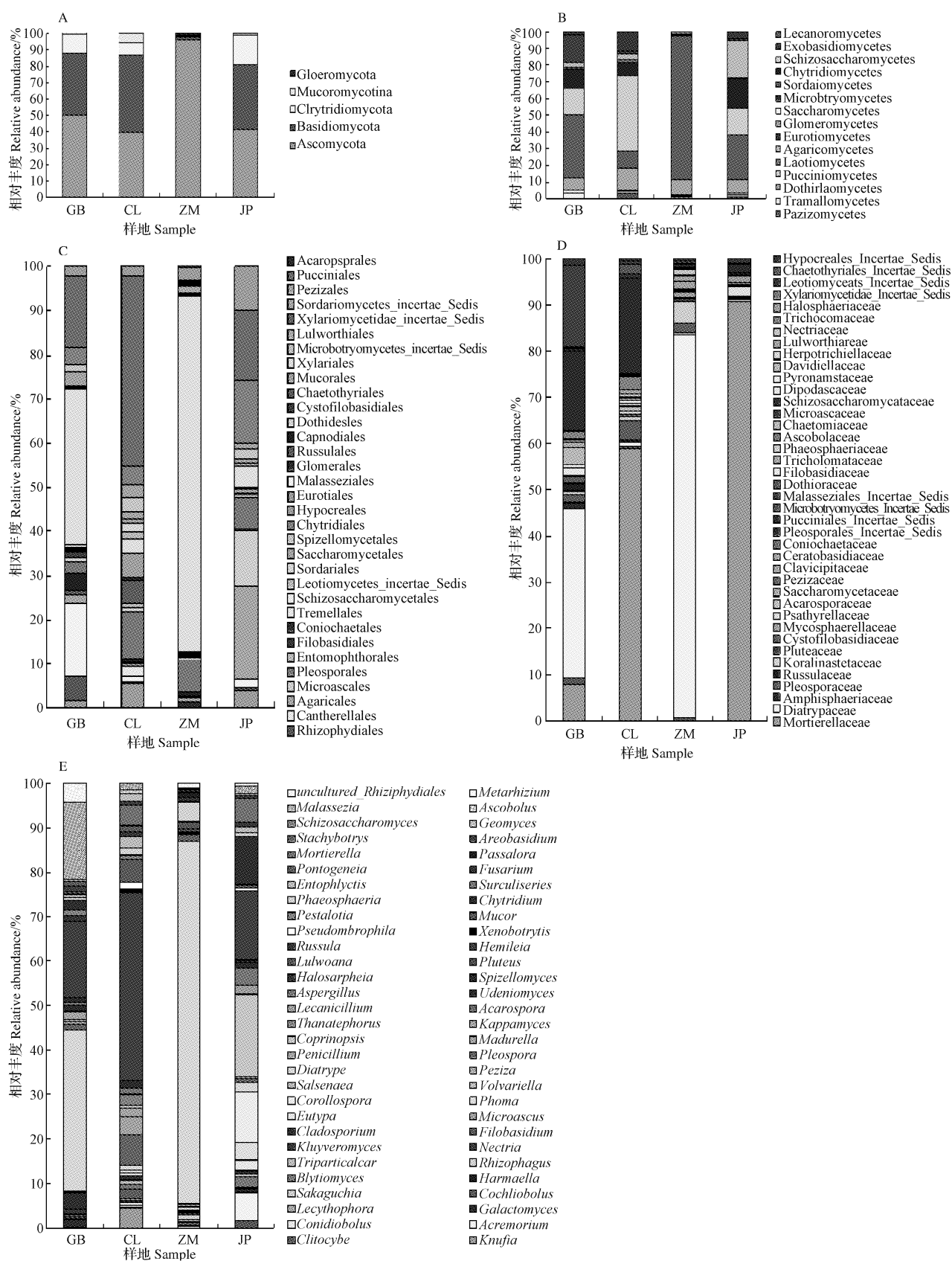
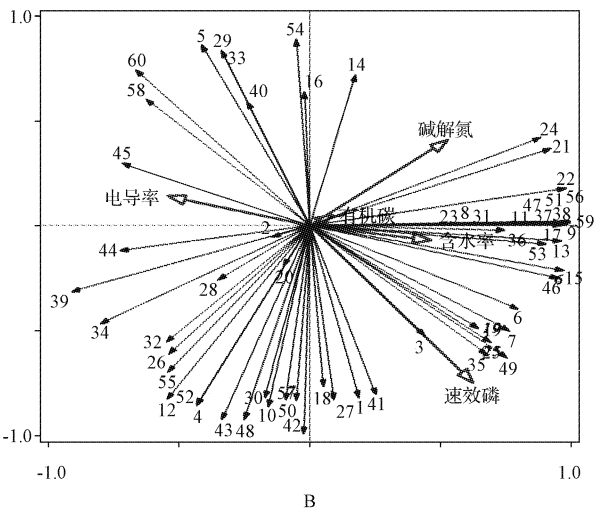
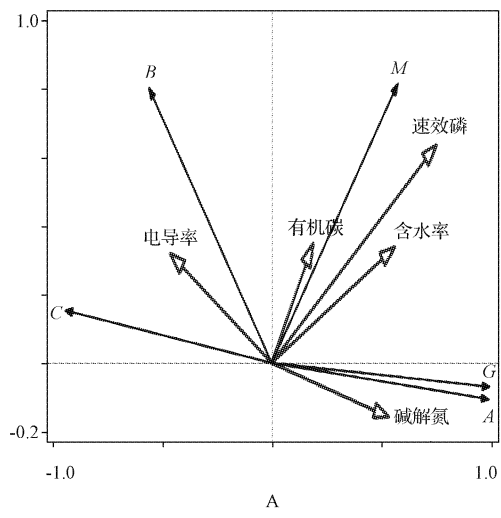
图1 黄河三角洲盐碱地土壤样品中检测到的不同分类水平上优势真菌类群(序列数 ≥ 10 条)及其相对丰度

Fig.1 Advantage fungus and relative abundance at different taxonomic levels in the Yellow River Delta saline soil samples(sequence numbers ≥ 10)

2.4 真菌种类分布与环境因子的关系

冗余分析(RDA)是一种直接梯度分析方法,能从统计学的角度来评价一个或一组变量与另一组多变量数据之间的关系^[15-16]。依此将5个环境变量(电导率、含水率、碱解氮、速效磷、有机碳)与优势真菌属(图1E)进行RDA分析。图2中优势真菌属和变量射线之间夹角的余弦值代表了二者之间的相关性,且变量箭头长度表示其所起作用的大小。从图2A可以看出,在真菌门水平上,子囊菌门和球囊菌门与土壤碱解氮、含水率、速效

磷、有机碳夹角为锐角,表明二者与土壤碱解氮、含水率、速效磷、有机碳呈正相关,且与土壤碱解氮夹角最小,表明二者受土壤碱解氮影响最大;子囊菌门和球囊菌门仅与土壤电导率成钝角,表明2个真菌门与土壤电导率呈负相关。担子菌门和壶菌门均与土壤碱解氮呈最大负相关,与电导率呈最大正相关。毛霉亚门与5个环境变量均呈正相关且与有机碳相关性最大,同时速效磷对毛霉亚门的影响最大。



注:图2A中,A表示Ascomycota,B表示Basidiomycota,C表示Chytridiomycota,M表示Mucoromycotina,G表示Glomeromycota。图2B中,数字具体含义见表3。

Note:In Fig. 2A,A represents Ascomycota,B represents Basidiomycota,C represents Chytridiomycota,M represents Mucoromycotina,G represents Glomeromycota. In Fig. 2B,number meaning see Table 3.

图2 优势真菌属与环境因子之间的关系(A图表示门水平上,B图表示属水平上)

Fig. 2 Relationship dominant fungi genus with environmental factors(Fig. 2A represents phylum, Fig. 2B represents genus)

表3 真菌属及编号

Table 3 Fungal diversity and number

真菌属	编号	真菌属	编号	真菌属	编号
Fungal diversity	No.	Fungal diversity	No.	Fungal diversity	No.
<i>Knufia</i>	1	<i>Volvariella</i>	21	<i>Xenobotrytis</i>	41
<i>Clitocybe</i>	2	<i>Saksenaea</i>	22	<i>Pseudombrophila</i>	42
<i>Acremonium</i>	3	<i>Peziza</i>	23	<i>Mucor</i>	43
<i>Conidiobolus</i>	4	<i>Diatrype</i>	24	<i>Pestalotia</i>	44
<i>Galactomyces</i>	5	<i>Pleospora</i>	25	<i>Chytridium</i>	45
<i>Lecythophora</i>	6	<i>Penicillium</i>	26	<i>Phaeosphaeria</i>	46
<i>Cochliobolus</i>	7	<i>Madurella</i>	27	<i>Surculiseries</i>	47
<i>Sakaguchia</i>	8	<i>Coprinopsis</i>	28	<i>Entophlyctis</i>	48
<i>Hannaella</i>	9	<i>Kappamyces</i>	29	<i>Fusarium</i>	49
<i>Blyttomyces</i>	10	<i>Thanatephorus</i>	30	<i>Pontogeneia</i>	50
<i>Rhizophagus</i>	11	<i>Acarospora</i>	31	<i>Passalora</i>	51
<i>Triparticalcar</i>	12	<i>Lecanicillium</i>	32	<i>Mortierella</i>	52
<i>Nectria</i>	13	<i>Udeniomyces</i>	33	<i>Aureobasidium</i>	53
<i>Kluyveromyces</i>	14	<i>Aspergillus</i>	34	<i>Stachybotrys</i>	54
<i>Filobasidium</i>	15	<i>Spizellomyces</i>	35	<i>Geomyces</i>	55
<i>Cladosporium</i>	16	<i>Halosarpheia</i>	36	<i>Schizosaccharomyces</i>	56
<i>Microascus</i>	17	<i>Pluteus</i>	37	<i>Ascobolus</i>	57
<i>Eutypa</i>	18	<i>Lulwoana</i>	38	<i>Malassezia</i>	58
<i>Phoma</i>	19	<i>Hemileia</i>	39	<i>Metarhizium</i>	59
<i>Corollospora</i>	20	<i>Russula</i>	40	<i>uncultured_Rhizophydiales</i>	60

由图2B可知,在5个环境变量中,有机碳的作用最小,速效磷的作用最大,且*Volvariella*和*Diatrype*与有机碳正相关性极大,而*Acremonium*与速效磷正相关性极大。电导率、含水率对*Clitocybe*、*Hemileia*、*Pestalotia*、*Chytridium*、*Filobasidium*、*Phaeosphaeria*、*Nectria*、*Halosarpheia*以及*Aureobasidium*等真菌属的作用截然相反,电导率与前4个真菌属呈正相关,与后面5个真菌属呈负相关,而含水率则与前四者呈负相关,与后面5个真菌属呈正相关。优势真菌属主要分布在第三象限(33%),表明这些真菌属均与土壤碱解氮呈负相关,此外,第二象限的*Chytridium*和第四象限的*Eutypa*、*Knufia*、*Madurella*、*Kluyveromyces*也与土壤碱解氮成负相关。此外,真菌属*Sakaguchia*、*Peziza*、*Acarospora*、*Rhizophagus*、*Pluteus*、*Lulwoana*、*Passalora*、*Schizosaccharomyces*、*Metarhizium*以及*Surculiseries*受环境变量影响的规律极为相似。

3 讨论

该研究在黄河三角洲盐碱地土壤中共检测出子囊菌门、担子菌门、壶菌门、球囊菌门 5 门,子囊菌门是最丰富的真菌类群,与何苑俾等^[17]的研究结果一致,表明子囊菌门对土壤的适应范围较大,不仅适合在盐碱条件下生存,在偏酸性(pH 4.25~5.72)条件下也能大量存在。韩世忠等^[18-19]发现在亚热带森林中担子菌门是含量最丰富的类群,这可能说明林型也是影响土壤真菌群落的因素,而该研究中担子菌门含量次于子囊菌门,居第 2 位,这表明土壤真菌具有非常丰富的多样性,不同类型的土壤中存在各自的优势真菌类群,同时又有相似的真菌类群。此外,曹迪^[20]、王笛等^[21]发现在黄河三角洲碱蓬土壤中真菌种类大于光板地真菌种类,与该研究所得结论相反,这可能与研究所用的检测方法有关。

该试验仅是对盐碱地土壤真菌与电导率、含水率、碱解氮、速效磷以及有机碳的相关性进行比较分析,若要解决如何运用微生态(真菌)的理论来改良盐碱情况,筛选具有生态修复作用的真菌菌株,仍需更加深入的研究。如分析不同盐生植物土壤真菌多样性异同形成的原因;对该环境中盐碱地真菌的分离培养方法进行进一步的研究;开发相应的土壤生态治理的技术方法以及植物根系分泌物、根际真菌与土壤理化性质的相互作用机制等。

参考文献

- [1] 张建锋,宋玉民,邢尚军,等.盐碱地改良利用与造林技术[J].东北林业大学学报,2002,30(6):124-129.
- [2] 高文星,张莉丽,任伟,等.河西走廊盐渍土不同种植年限苜蓿根际磷含量变异特征[J].草业科学,2008,25(7):54-58.
- [3] 王斌,马兴旺,单娜娜,等.新疆盐碱地土壤改良剂的选择与应用[J].干旱区资源与环境,2014,28(7):111-115.
- [4] 毕玉波,刘守军.黄河三角洲滨海盐渍土改良措施[J].农业开发与装备,2014(9):48-48.
- [5] 王伟,解建仓,黄俊铭,等.盐碱地治理新模式研究[J].水资源与水工程学报,2009,20(5):117-119.

- [6] BOON N, TOP E M, VERSTRAETE W, et al. Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shockload[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(3):1511-1520.
- [7] RAINA V, SUAR M, SINGH A, et al. Enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) in contaminated soils via inoculation with *Sphingobium indicum* B90A[J]. Biodegradation, 2008, 19(1):27-40.
- [8] 赵爱花,杜晓军,臧婧,等.宝天曼落叶阔叶林土壤细菌多样性[J].生物多样性,2015,23(5):649-657.
- [9] TIEDJE J M, ASUMING-BREMPONG S, NÜSSLEIN K, et al. Opening the black box of soil microbial diversity[J]. Applied Soil Ecology, 1999, 13(2):109-122.
- [10] MACAE A. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2000, 31(2):77-82.
- [11] FERNANDO WJD, Li R. Opening the black box: understanding the influence of cropping systems and plant communities on bacterial and fungal population dynamics[J]. Ceylon Journal of Science (Biology Science), 2012, 41:89-110.
- [12] 张文力.高通量测序数据分析现状与挑战[J].集成技术,2012,1(3):20-24.
- [13] 贺纪正,袁超磊,沈菊培,等.土壤宏基因组学研究方法与进展[J].土壤学报,2012,49(1):155-164.
- [14] 刘银银,孙庆业,李峰,等.洞庭湖典型湿地植被群落土壤微生物特征[J].生态学杂志,2013,32(5):1233-1237.
- [15] TER BRAAK C J F, SMILAUER P. CANOCO Reference manual and user's guide to canoco for Windows (version 4.5) [M]. New York: Centre for Biometry Wageningen, 2002.
- [16] BORCARD D, DRAPEAU P. Partialling out the spatial component of ecological variation[J]. Ecology, 1992, 73(3):1045-1055.
- [17] 何苑俾,周国英,王圣洁,等.杉木人工林土壤真菌遗传多样性[J].生态学报,2014,34(10):2725-2736.
- [18] 韩世忠,高人,马红亮,等.中亚热带森林土壤真菌多样性的案例研究[J].热带亚热带植物学报,2015(3):343-352.
- [19] 韩世忠,高人,马红亮,等.建瓯万木林自然保护区两种森林类型土壤真菌多样性[J].生态学杂志,2015,34(9):2613-2620.
- [20] 曹迪.黄河三角洲典型植物群落土壤微生物特征的研究[D].天津:南开大学,2011.
- [21] 王笛,马风云,姚秀粉,等.黄河三角洲退化湿地土壤养分、微生物与土壤酶特性及其关系分析[J].中国水土保持科学,2012,10(5):94-98.

Fungal Diversity of Saline Alkali Soil in Yellow River Delta

WANG Yanyun, GUO Dufa

(College of Geography and Environment, Shandong Normal University, Jinan, Shandong 250014)

Abstract: Saline alkali land soils, including Bare land, *Aeluropus littoralis* var. *sinensis*, *Suaeda glauca*, *Tamarix chinensis*, were researched by 454 high-throughput sequencing technologies to study soil fungal community and diversity. The results showed that, 5 phyla, 22 classes, 59 orders, 87 families, and 157 genus were obtained. Ascomycota was the most predominant phylum in all plots, Basidiomycetes was the second predominant phylum. Soil fungal diversity existed certain difference in different samples, and the diversity index in bare land was the highest (2.070) and in *Aeluropus littoralis* var. *sinensis* was the lowest (1.490). The relevance between Ascomycota with soil available nitrogen and Glomeromycota with soil available nitrogen were maximum. The relevance between Basidiomycota with soil available nitrogen, with conductivity, and Chytridiomycota with soil available nitrogen, with conductivity were more higher. Available phosphorus was the maximum factor to Mucoromycotina. The effect of soil available phosphorus on the fungi was the largest in the five environmental variables.

Keywords: Yellow River Delta; saline alkali land; 454 high throughput sequencing technology; fungal diversity