

# 铝胁迫对酸性红壤中真菌种群多样性的影响

贺根和<sup>1</sup>, 王小东<sup>2</sup>, 刘强<sup>1</sup>, 吴吉春<sup>3</sup>

(1.井冈山大学生命科学学院,江西吉安343009;2.江西省林业科学院,南昌330013;3.南京大学地球科学与工程学院,南京210093)

**摘要:**通过聚合酶链式反应-限制性片段长度多态(PCR-RFLP)技术构建了红壤真菌的内转录间隔区(Internal Transcribed Spacer, ITS) rDNAs 文库, 比较分析了红壤地区典型森林土和农田土真菌群落结构对铝胁迫的响应, 构建了 6 个土壤样品的真菌 ITS rDNAs 文库。从这 6 个克隆文库中随机挑取克隆进行了 PCR-RFLP 指纹图谱分析, 共获得 77 个独特的真菌操作分类单元(Operational Taxonomical Units, OTUs)。对 77 个 OTUs 的代表性克隆测序并利用 Blast 工具进行分析(相似性 95%~100%)。研究结果表明森林土壤和农田土壤样品中真菌类群 79.2%(61)属于子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)和球囊菌门(Glomeromycota), 20.8%(16)属于未分类的簇(Unclassified fungi), 其中担子菌门真菌在两种土壤中具有明显优势。物种多样性指数(Simpson, Shannon 和 Chao1)分析表明, 铝胁迫降低了土壤真菌种群的多样性, 农田土壤中真菌的种群多样性明显高于森林土壤。而且随着铝胁迫浓度的增加, 担子菌门真菌在两种土壤中丰度明显下降, 子囊菌门真菌的丰度显著上升, 在高铝处理浓度处理的土壤中演变为优势种群。

**关键词:**铝胁迫;酸性红壤;真菌种群多样性;PCR-RFLP

中图分类号:S154.3 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2014)09-1736-07 doi:10.11654/jaes.2014.09.010

## Effect of Aluminum Stress on Fungal Community Diversity in Acidic Red Soils

HE Gen-he<sup>1</sup>, WANG Xiao-dong<sup>2</sup>, LIU Qing<sup>1</sup>, WU Ji-chun<sup>3</sup>

(1.School of Life Sciences, Jinggangshan University, Ji'an 343009, China; 2. Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang 330013, China; 3. Department of Hydrosciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

**Abstract:** Aluminum(Al) in acidic soils shows toxicity to soil microbes. In this study, we constructed fungal internal transcribed spacer (ITS) rDNAs clone library using the PCR-amplified restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) method, and comparatively studied the responses of fungal community in forest soil and agriculture soil to Al stress. A total of six fungal clone communities was obtained from the tested soil samples. Clones of each library were randomly selected for PCR-RFLP analysis of ITS rDNA fragments. Totally 77 genotypes were identified by RFLP fingerprinting and sequenced. These 77 genotypes were then sequenced and their respective phylotypes were identified through the Basic Local Alignment Search Tool(BLAST) of the National Center for Biotechnology Information(NCBI) with similarity of 95%~100%. Sequence results revealed that 79.2%(61) of the clone sequences have the highest similarity with those of the *Ascomycota*, *Basidiomycota* and *Glomeromycota*, and 20.8%(16) have near similarity with unclassified fungi. *Basidiomycota* was predominant in both soils. The Simpson, Shannon and Chao1 indices all showed that Al addition reduced the richness and diversity of soil fungi. However, the diversity of fungal communities was lower in the forest soil than in the agriculture soil. Elevated Al increased the relative abundance of *Ascomycota* but decreased that of *Basidiomycota*, thus evolving into dominant population in high Al soils.

**Keywords:** aluminum stress; acidic red soils; fungal community diversity; PCR-RFLP

铝是地壳中含量最丰富的元素之一, 同时又是一种缺乏生物功能的非必需化学元素<sup>[1]</sup>。在微酸性和中

收稿日期:2014-02-19

基金项目:江西省科技支撑计划项目(2011BBE50015);井冈山大学博士启动项目(JZB1307)

作者简介:贺根和(1977—),男,博士,副教授,主要从事环境微生物学研究。E-mail:genhexh@gmail.com

性土壤中,铝主要以三价氧化态和稳定的矿物质形式存在,表现出极低的生物有效性。但是,随着土壤 pH 的降低,铝可逐渐解离,以离子态释放到土壤溶液中,成为有活性的单体形式(Monomeric Al),对土壤生物产生较强的毒害作用<sup>[2]</sup>。而且,土壤铝浓度的持续升高会直接导致土壤微生物生态系统的文化和土壤质量的降低<sup>[3]</sup>。

微生物在土壤生态系统物质循环和能量流动过程中发挥着重要作用,是衡量土壤质量的一个重要指标。然而,土壤的理化特征、污染物浓度等因素都会严重影响土壤微生物的数量及活性。我们前期的研究表明:当土壤溶液中铝浓度大于 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,土壤细菌的数量受到显著抑制;当浓度大于 $160\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,真菌的数量受到明显抑制<sup>[4]</sup>。Kawai 等<sup>[5]</sup>在 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 铝污染的土壤中只分离出少数几种真菌。可见,铝胁迫影响土壤真菌的种群数量。然而由于以往大多采用传统培养分离的方法研究土壤真菌的群落特征,很难全面揭示土壤真菌在铝胁迫下的多样性特征。目前,分子生物学技术被认为是对土壤真菌种群丰度和分布分析最有效的方法<sup>[6]</sup>,聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析技术(PCR-RFLP)研究真菌 ITS 序列特征已被广泛用于土壤真菌多态性的分析<sup>[7]</sup>。

红壤具有低 pH 值、高铝含量和低有机质等特征。近年来,随着全球酸沉降的日益严重以及酸性肥料在农业中的大量投入,土壤中的富铝化作用加剧,使得土壤溶液中活性铝的数量呈明显增加的趋势<sup>[8]</sup>。然而,目前有关酸性红壤中铝胁迫对红壤真菌种群结构特征影响的研究报道较少。因此,本研究以酸性红壤为研究对象,应用 PCR-RFLP 技术对铝胁迫下土壤真菌的群落结构进行分析,比较铝胁迫下农田土壤和森林土壤中真菌的群落结构特征。研究结果可为评价铝胁迫对土壤质量的影响以及深入研究土壤真菌的耐铝机理提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试土壤样品采集

供试土壤样品取自江西省井冈山大井村( $27^{\circ}06'N$ ,  $115^{\circ}01'E$ ) $2\sim20\text{ cm}$  的土层。森林土为典型的酸性红壤土,农田土为种植过水稻的土壤。将样品用封口袋封装带回实验室,风干、磨碎并过 $2\text{ mm}$  筛后,贮藏于 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。土壤的基本理化特性见表 1。

### 1.2 土壤样品的处理

取制备好的土壤样品( $100\text{ g}$  干土)置于 $250\text{ mL}$ 的锥形瓶中,调节土壤含水量为 $60\%$ ,再置于 $28^{\circ}\text{C}$ 的人工气候箱中预培养 1 周。然后将铝( $\text{AlCl}_3\cdot6\text{H}_2\text{O}$ )加入到土壤中,使土壤外源 $\text{Al}^{3+}$ 的含量分别为 $0$ 、 $100$ 、 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 干土。被测土壤样品分别标记为 $F_0$ (森林土,加 $\text{ddH}_2\text{O}$ )、 $F_{100}$ (森林土, $100\text{ mg Al}^{3+}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、 $F_{200}$ (森林土, $200\text{ mg Al}^{3+}\cdot\text{kg}^{-1}$ )和 $A_0$ (农田土,加 $\text{ddH}_2\text{O}$ )、 $A_{100}$ (农田土, $100\text{ mg Al}^{3+}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、 $A_{200}$ (农田土, $200\text{ mg Al}^{3+}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。

表 1 供试土壤基本理化特征

Table 1 Basic physicochemical properties of studied soils

参数	森林土	农田土
pH	4.46	6.23
OM/g·kg <sup>-1</sup>	17.8	80.0
AN/mg·kg <sup>-1</sup>	127.5	1066
AP/mg·kg <sup>-1</sup>	4.05	58.7
AK/mg·kg <sup>-1</sup>	48.5	198.5
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /mg·kg <sup>-1</sup>	21.4	10.3
SiO <sub>2</sub> /mg·kg <sup>-1</sup>	40.6	39.8
Al <sup>3+</sup> /mg·kg <sup>-1</sup>	11.5	1.84
EC/dS·m <sup>-1</sup>	0.15	5.25

注:OM:有机质;AN:有效氮;AP:有效磷;AK:有效钾;EC:电导率。

铝加入后充分混合,置于 $28^{\circ}\text{C}$ 的人工气候箱中温育,保持恒定的 $60\%$ 土壤含水量。所有实验均设三个重复,在培养后的第 30 d 从锥形瓶中取样进行分析。

### 1.3 土壤 DNA 的提取

各取 $10\text{ g}$  土壤样品,向土壤样品中分别加入 $10\text{ mL}$  DNA 提取缓冲液( $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl,  $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Na<sub>2</sub>EDTA,  $1.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 和 pH8.0 的 1% CTAB)、 $100\text{ }\mu\text{L}$  蛋白酶 K( $10\text{ mg}$ ; Sangon) 和 $1\text{ mL}$  溶菌酶( $60\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Sangon),混匀, $37^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 30 min 后,加入 $1.5\text{ mL}$  20% 的 SDS,  $65^{\circ}\text{C}$  培养 2 h, 室温下 $6000\times g$  离心 10 min, 收集上清液, 将上清液转移到 $50\text{ mL}$  的离心管中;往离心后的土壤沉淀物中分别加入 $4.5\text{ mL}$  DNA 提取缓冲液和 $0.5\text{ mL}$  20% 的 SDS, 涡旋 10 s,  $65^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min, 室温下 $6000\times g$  离心 10 min, 收集上清液,并与前次上清液合并;上清液( $12\text{ mL}$  左右)与等体积的氯仿-异戊醇(24:1)混合,室温下 $6000\times g$  离心 10 min,吸取上清液分装转移至 $10\text{ mL}$  离心管中(每管 $5\text{ mL}$  左右); $0.6$  倍体积的异丙醇室温沉淀 1 h 或过夜;室温下 $10000\times g$  离心 20 min,收集核酸沉淀;用冷的 $70\%$ 乙醇洗涤沉淀,重悬于灭菌的 $50\text{ }\mu\text{L}$ 无离子水中,加入适量 RNA 酶溶液, $37^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后于 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

### 1.4 真菌 ITS rDNA 的扩增

运用巢式 PCR(Nested-PCR)完成核糖体 rDNA 内部转录间隔区 ITS 序列的扩增。第一轮反应体系( $25\text{ }\mu\text{L}$ )为: $1\text{ }\mu\text{L}$ (约 $1\text{ ng}$ )DNA 模板、 $0.5\text{ }\mu\text{L}$  引物( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、 $2\text{ }\mu\text{L}$  dNTP 混合物( $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、 $1.5\text{ }\mu\text{L}$  MgCl<sub>2</sub> ( $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、 $2.5\text{ }\mu\text{L}$   $10\times$ PCR 反应缓冲液和 $0.2\text{ }\mu\text{L}$  Taq DNA 聚合酶( $5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , Takara);所用的引物为: NSI1( $5'-GAT\text{ TGA ATG GCT TAG TGA GG}-3'$ ) 和 NLB4( $5'-GGA\text{ TTC TCA CCC TCT ATG}$ )

AC-3')<sup>[9]</sup>; PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 53 °C 45 s、72 °C 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。第二轮反应以第一轮反应的 PCR 产物为模板, 引物为: ITS1-F (5'-CTT GGT CAT TTT AGA GGA ACT AA-3') 和 ITS4-B (5'-CAG GAG ACT TGT ACA CCG TCC AG-3')<sup>[9]</sup>。在第二轮反应中, 设置 30 个循环, 条件同第一轮反应。PCR 产物用含 1% 溴化乙锭的琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.5 真菌 ITS rDNA 克隆文库的构建

利用上述 PCR 扩增得到的 ITS rDNA 片段创建基因克隆文库, 具体过程如下: 将 ITS rDNA PCR 扩增产物和 pMD18-T 质粒载体(Takara.)进行重组后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。随机挑取大约 150 个阳性菌落进行 PCR 以验证 rDNA 序列插入的正确性, 完成 6 个土壤样品中 ITS rDNA 序列克隆文库的创建( $F_0$ 、 $F_{100}$ 、 $F_{200}$ 、 $A_0$ 、 $A_{100}$  和  $A_{200}$ ), 相应文库中的阳性克隆依次从 1 到 156 标记。PCR 反应中的引物为: M13F(5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3') 和 M13R(5'-GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3')。

### 1.6 真菌 ITS rDNA 的 RFLP 分析

利用限制性内切酶 *Hha* I 或 *Rsa* I 对文库中各克隆的 ITS PCR 产物进行酶切(37 °C, 1 h)。DNA 酶切片段用 2% 的琼脂糖凝胶(H, 上海生工)电泳分离, 经溴化乙锭染色和凝胶成像系统成像后, 将所获得的 DNA 带型图谱在 GIS 凝胶分析软件的辅助下进行人工比较。以基因片段多态图谱为基础进行聚类, 聚合到一起的具有相同图谱的克隆用第 2 种限制性内切酶进行消化并电泳分离。当第二次所获得的基因图谱仍然相同时, 则认为它们是相同的基因型。每一个基因型作为一个分类操作单位(OTU, Operational Taxonomic Unit)或称之为唯一基因型<sup>[10]</sup>。选取每个 OTU 中的代表性克隆测序。去除序列两端的载体片段及嵌合

序列后, 通过 Blast(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和 RDP 聚类(RDP classifier, <http://rdp.cme.msu.edu/>)分析分类, 确定序列的种属特征。

### 1.7 数据统计分析

用文库总的克隆和 OTU 数量计算文库的库容( $C$ ), 表征样品中微生物种类的覆盖程度<sup>[11]</sup>。计算公式如下:

$$C = [1 - (n/N)] \times 100\%$$

式中:  $n$  代表在文库中仅出现一次的 OTU 的数量;  $N$  为文库中总克隆数。

应用 Mothur 聚类分析分析文库内种群的丰度(距阵小于或等于 0.02)<sup>[12]</sup>。通过 Clustal X 2.0<sup>[13]</sup> and Mega 4.0<sup>[14]</sup>构建基于 16S rDNA 序列的系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤 DNA 的提取和 ITS rDNA 基因的扩增

分别提取  $F_0$ 、 $F_{100}$ 、 $F_{200}$ 、 $A_0$ 、 $A_{100}$  和  $A_{200}$  6 个土壤样品中的 DNA(图 1A), 并以上述 DNA 为模板, 利用巢式 PCR 扩增得到各土壤样品中真菌的 ITS rDNAs 序列产物, 该产物大小约为 1000 bp(图 1B), 其扩增的片段大小与预计的一致。这显示供试土壤环境中可能含有丰富的真菌。

### 2.2 真菌 ITS rDNA 基因文库的构建及种群多样性分析

将上述 PCR 产物回收纯化并克隆至 pMD18-T 载体中, 构建 6 个土壤样品的 ITS rDNA 基因文库, 筛选出 906 个阳性克隆(表 2)。对文库中的 906 个阳性克隆进行 PCR 扩增, 扩增产物分别用限制性内切酶 *Rsa* I 和 *Hal* I 进行 RFLP 分析, 获得 6 个土壤样品的 ITS DNA 酶切指纹图谱, 确定了 77 个独特的 OTU。从各代表性的 OTUs 中随机挑取 1 个克隆子进行测序, 共获得 77 条序列。经 VecScreen 去除载体后, 利用 Bellerophon 检测各文库中的嵌合体(Chimeria)序列, 结果并没有发现嵌合体序列。统计各文库中的 OTUs,

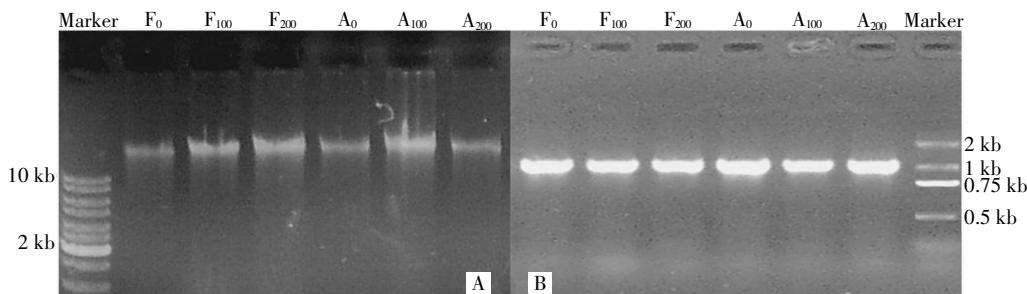


图 1 土壤样品 DNA(A)和 ITS rDNA PCR 产物(B)

Figure 1 Soil DNA (A) and PCR amplification of ITS rDNA fragments(B)

库容(Coverage)、Simpson、Shannon 和 Chao1 等物种多样性指数,结果见表 2。

从表 2 可以看出,6 个基因文库的库容从 70.5% 到 82.4%,表明本实验构建的克隆文库能比较真实地代表不同铝处理浓度下土壤样品中真菌的多样性。真菌多样性指数 Simpson 值和 Shannon 值表明,铝浓度的提高会降低土壤真菌种群的多样性,而物种丰富度 Chao1 的统计值发现,农田土壤中真菌的种群丰度明显高于森林土壤。此外,物种的稀缺曲线也进一步证实了上述结果(图 2)。

### 2.3 真菌 ITS rDNA 基因文库的系统发育分析

将 77 条 ITS rDNA 基因序列提交到 DDBJ 数据库,序列的登录号为:AB711952–AB712028。Blast

表 2 真菌 ITS rDNA 克隆文库的多样性指数

Table 2 Fungal diversity index in ITS rDNA clone libraries from tested soils

Soil samples	OTU richness number	Total Clones	Coverage/ %	Chao1 index	Simpson index	Shannon index
F <sub>0</sub>	36	153	76.5	70.9	0.047	3.47
F <sub>100</sub>	34	150	77.3	63.5	0.053	3.40
F <sub>200</sub>	27	147	81.6	60.3	0.017	3.02
A <sub>0</sub>	46	156	70.5	230.0	0.013	3.52
A <sub>100</sub>	32	152	78.9	156.0	0.004	3.13
A <sub>200</sub>	26	148	82.4	101.0	0.006	3.15

和 RDP 分类分析真菌种群的相对丰度,结果如表 3 所示。79.2%(61)的真菌类群属于子囊菌门(*Ascomycota*)、担子菌门(*Basidiomycota*)和球囊菌(*Glomeromycota*),相似性为 95%~100%,另有 20.8%(16)的真菌类群属于未分类的簇(Unclassified fungi)。而且,77 条序列中有 23 条序列属于子囊菌门(*Botryosphaerales*,*Pezizaceae*,*Capnodiales*,*Pleosporales*,*Sclerotiniaceae*,*Eurotiales*,*Rhizosphaera*,*Chaetothyriales*,*Scyphomyces*,*Helotiales*,Unclassified)匹配,37 条序列属于担子菌(*Cantharellales*,*Agaricales*,*Thelephoraceae*,*Rhizoctonia*,*Erythrobasidiaceae*,*Hysterangiales*,Unclassified),1 条序列属于球囊菌门(*Rhizophagus*)。担子菌门真菌在所有测试样品中种类最多,其相对丰度在森林土壤中分别为 50.0%、45.9% 和 23.3%,在农田土壤中分别达 52.1%、43.7% 和 34.6%,明显表现为随铝胁迫浓度提高而丰度下降的趋势(表 3)。球囊菌门真菌丰度最低,并且只出现于未添加外源铝胁迫的森林土壤(F<sub>0</sub>)中。子囊菌门和未分类真菌的丰度在两种供试土壤样品中随铝胁迫浓度的提高呈上升趋势。此外,基于相似度高达 97%~100% ITS rDNA 序列的土壤真菌系统发育树直观反映了这些序列之间在进化上的关系(图 3)。

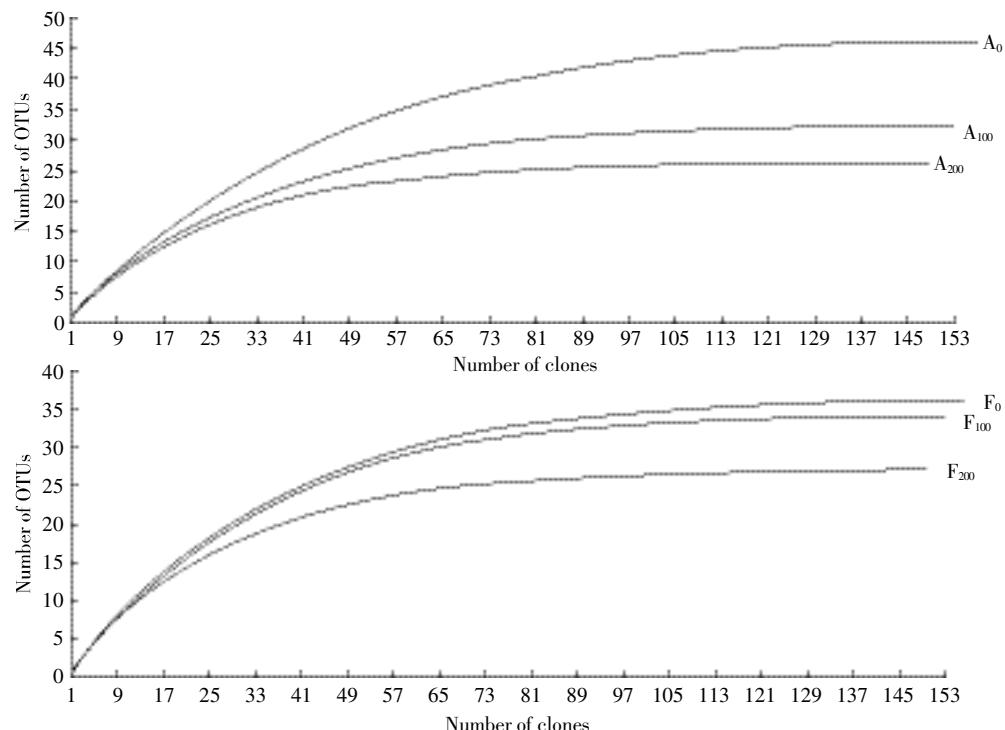


图 2 不同土壤样品中真菌 ITS rDNAs 克隆 OTUs 的稀缺曲线

Figure 2 Rarefaction curves for OTUs of ITS rDNAs gene clones in different Al treated acidic red soil samples

表3 真菌种群的相对丰度(%)

Table 3 Relative abundances of fungal groups (%)

Fungi groups	Total	F <sub>0</sub>	F <sub>100</sub>	F <sub>200</sub>	A <sub>0</sub>	A <sub>100</sub>	A <sub>200</sub>
Ascomycota	29.9	30.5	29.4	44.4	28.3	31.3	38.5
Basidiomycota	48.1	50.0	45.9	23.3	52.1	43.7	34.6
Glomeromycota	1.20	2.80	0	0	0	0	0
Unclassified fungi	20.8	16.7	24.7	33.3	19.6	25.0	26.9

### 3 讨论

真菌在土壤生态系统的物质循环和能量流动过程中发挥着重要作用。然而,外界环境的变化可能对土壤真菌的多样性及其功能产生影响,例如重金属、农药及化学肥料等均会影响土壤真菌群落特征<sup>[15-17]</sup>。目前,也有不少文献报道铝毒影响真菌的生长及种群

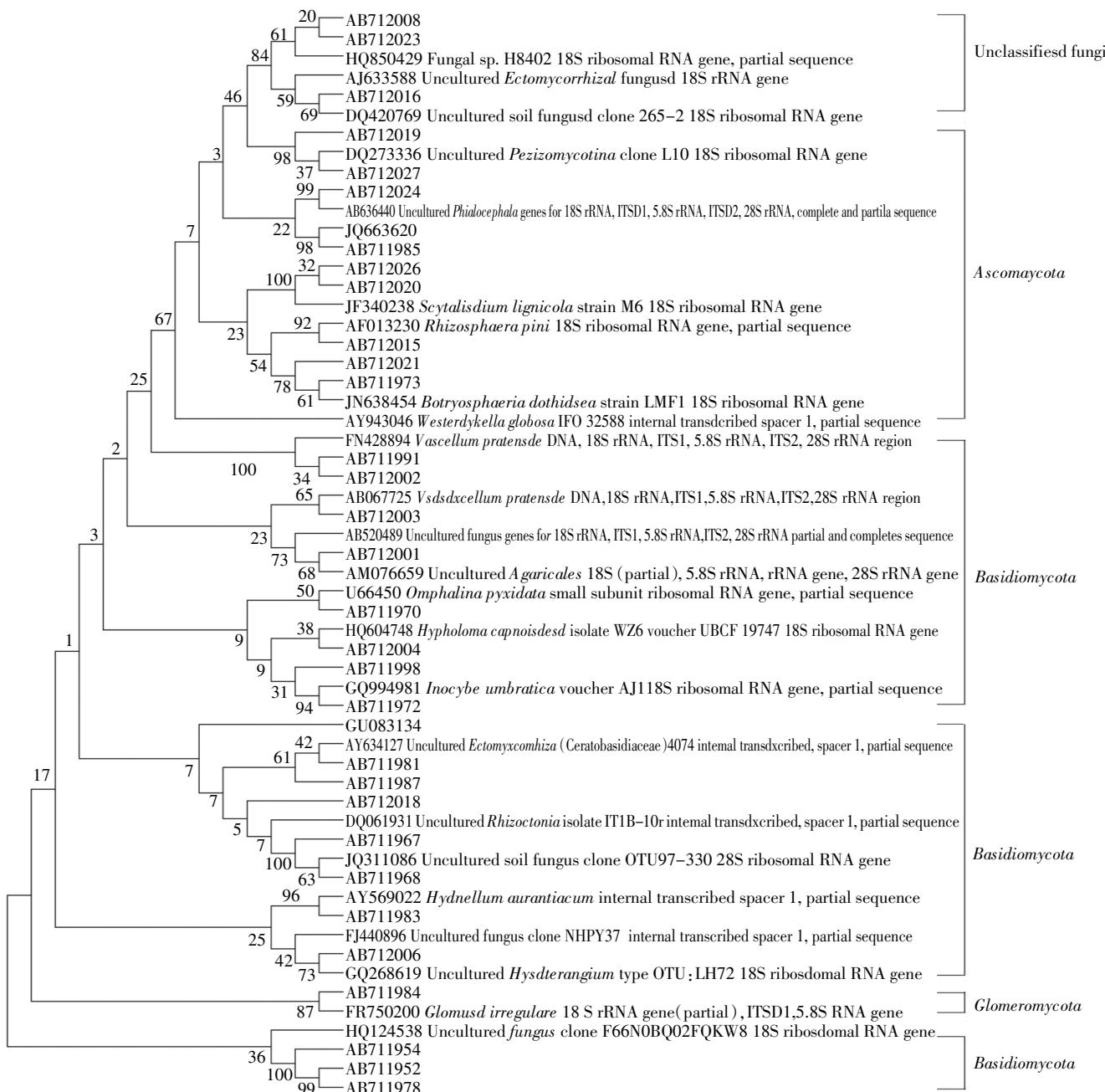


图3 基于ITS rDNA的土壤真菌系统发育树

Figure 3 A dendrogram of soil fungi based on ITS rDNA sequencing

数量<sup>[4-5,18]</sup>,但在实际土壤条件下研究铝毒对真菌群落特征影响的研究报道还较少。本研究选取酸性土壤区域的森林土和农田土为研究对象,利用PCR-RFLP技术分析在外加铝胁迫的条件下研究两种供试土壤中真菌种群结构的多样性变化规律。构建了6个基因克隆,文库的库容从70.5%到82.4%,表明本研究构建的基因克隆文库库容值均较大、文库的覆盖程度较高,具有较好的代表性,从而能比较真实地代表不同铝处理浓度下土壤样品中真菌的多样性。这与滕齐辉等<sup>[19]</sup>报道的太湖地区典型菜地土壤微生物多样性中构建的文库值比较一致。

土壤微生物多样性的影响因素有很多,包括土壤类型、土壤的理化性质等<sup>[20]</sup>。本研究采用的森林土壤和农田土壤样品在理化性质上存在着明显的差异,前者活性铝的浓度远高于后者,但有机质及氮的含量却远低于后者(表1),供试土壤理化性质上的差异直接导致土壤的物种丰富度指数(Chao1)的不同(表2),表现为农田土壤中真菌的种群丰度明显高于森林土壤。此外,在添加外源铝胁迫后,两种土壤真菌种群的多样性指数均呈下降趋势,这与重金属镉、铅、锌等对土壤真菌的影响一致<sup>[21-22]</sup>。可见,与大多数重金属胁迫一样,铝胁迫也影响着土壤真菌的群落特征<sup>[23]</sup>。

将文库中的77条序列与真菌典型的ITS rDNA序列进行相似性比较并作系统发育分析,发现有61条(79.2%)序列代表的真菌属于子囊菌门(*Ascomycota*)、担子菌门(*Basidiomycota*)和球囊菌门(*Glomeromycota*),相似性为95%~100%,16条(20.8%)序列代表的真菌属于未分类的基因簇。这一研究结果与Viaud等<sup>[7]</sup>报道的相似,说明土壤中普遍存在一定比例待发掘的未知真菌。而且,这些类型的真菌随着外源铝浓度的增加,丰度呈现上升的趋势(森林土中相对丰度从16.7%上升至33.3%,农田土中从19.6%上升至26.9%)(表3),在铝处理过的土壤样品中未分类真菌的比例更高,表明未知真菌在土壤响应铝胁迫中具有非常重要的意义。

此外,通过比较农田土壤和森林土壤中真菌种类的差异还发现担子菌门真菌在两种类型土壤中均占明显优势。这与Valinsky等<sup>[24]</sup>报道的农田生态系统中子囊菌占优势的结果不一致,可能与取样地的气候条件、土壤原有植物种类等因素有关<sup>[25]</sup>。然而,随着铝胁迫浓度的增加,供试土壤样品中担子菌门的真菌丰度明显下降,子囊菌门真菌的丰度显著上升,并在高铝浓度的土壤中( $F_{200}$ 和 $A_{200}$ )演变为优势种群(表2),表

明子囊菌门真菌可能对铝胁迫具有更强的耐受性,更能适应一些极端环境<sup>[26]</sup>。该研究结果与目前分离纯化得到的耐铝真菌大多为子囊菌门真菌的结果一致<sup>[5,27-28]</sup>,因而能为在供试土壤样品中分离和鉴定耐铝真菌提供重要的参考价值。

## 4 结论

本研究提供了森林土和农田土壤中真菌对不同铝胁迫响应的群落结构特征。研究结果表明:

(1)森林土壤和农田土壤样品中79.2%的真菌类群属于子囊菌门(*Ascomycota*)、担子菌门(*Basidiomycota*)和球囊菌门(*Glomeromycota*),20.8%的真菌类群属于未分类的簇(Unclassified fungi),其中担子菌门真菌在两种土壤中具有明显优势。

(2)铝胁迫可降低土壤真菌种群的多样性,农田土壤中真菌的种群多样性明显高于森林土壤,农田土壤中真菌的丰度也高于森林土壤。

(3)随着铝胁迫浓度的增加,两种土壤中担子菌门真菌丰度明显下降,子囊菌门真菌的丰度显著上升,在高铝处理( $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )的土壤中( $F_{200}$ 和 $A_{200}$ )演变为优势种群。

## 参考文献:

- [1] Paul I, Ulrike O, Franz S. Microbiological properties in acidic forest soils with special consideration of KCl extractable Al[J]. *Water, Air, and Soil pollution*, 2003, 148(1-4):3-14.
- [2] Hue N V, Craddock G R, Adams F. Effect of organic anions on aluminum toxicity in subsoil[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1986, 50(1):28-34.
- [3] Papathanasiou G, White K N, Walton R, et al. Toxicity of aluminium in natural waters controlled by type rather than quantity of natural organic matter[J]. *Science of the Total Environment*, 2011, 409(24):5277-5283.
- [4] He G H, Wu J C, Liu Q, et al. Microbial and enzyme properties of acidic red soils under aluminum stress[J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2012, 21(9):2818-2825.
- [5] Kawai F, Zhang D, Sugimoto M. Isolation and characterization of acid- and Al-tolerant microorganisms[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 189(2):143-147.
- [6] He J Z, Zheng Y, Chen C R, et al. Microbial composition and diversity of an upland red soil under long-term fertilization treatments as revealed by culture-dependent and culture-independent approaches[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2008, 8(5):349-358.
- [7] Viaud M, Pasquier A, Brygaa Y. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS[J]. *Mycological Research*, 2000, 104(9):1027-1032.
- [8] Ma J F, Frukawa J. Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: A minireview[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2003, 97(1):46-51.

- [9] Martin K J, Rygiewicz P T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts[J]. *BMC Microbiology*, 2005, 5(1):28.
- [10] 夏北成, Zhou J, Tiedje J M. 土壤细菌类克隆群落及其结构的生态学特征[J]. 生态学报, 2001, 21(4):574-578.
- XIA Bei-cheng, Zhou J, Tiedje J M. Structures of bacteria cloning communities in the soil environment and their ecological characteristics[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21(4):574-578.
- [11] Giovannoni S J, Mullins T D, Field K G. Microbial diversity in oceanic systems; rRNA approaches to the study of uncultivable microbes[M]// Joint I. Molecular ecology of aquatic microbes. Berlin: Springer, 1995: 217-248.
- [12] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23):7537-7541.
- [13] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21):2947-2948.
- [14] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8):1596-1599.
- [15] Westergaard K, Muller A K, Christensen S, et al. Effects of tylosin as a disturbance on the soil microbial community[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33(15):2061-2071.
- [16] Young A L. Enhanced co-metabolism of TCDD in the presence of high concentrations of phenoxy herbicides[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2006, 13(3):149-150.
- [17] Voříšková J, Brabcová V, Cajthaml T, et al. Seasonal dynamics of fungal communities in a temperate oak forest soil[J]. *New Phytologist*, 2014, 201(1):269-278.
- [18] Nguyen V A T, Senoo K, Mishima T, et al. Multiple tolerance of *Rhodotorula glutinis* R-1 to acid, aluminum ion and manganese ion, and its unusual ability of neutralizing acidic medium[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 92(4):366-371.
- [19] 滕齐辉, 曹慧, 崔中利, 等. 太湖地区典型菜地土壤微生物 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析[J]. 生物多样性, 2006, 14(4):345-351.
- TENG Qi-hui, CAO Hui, CUI Zhong-li, et al. PCR-RFLP analysis of bacterial 16S rDNA from a typical garden soil in Taihu region[J]. *Biodiversity Science*, 2006, 14(4):345-351.
- [20] Wu M N, Qin H L, Chen Z, et al. Effect of long-term fertilization on bacterial composition in rice paddy soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47(4):397-405.
- [21] 滕应, 黄昌勇, 龙健, 等. 铅锌银尾矿污染区土壤微生物区系及主要生理类群研究[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(4):408-411.
- TENG Ying, HUANG Chang-yong, LONG Jian, et al. Microbial populations and major physiological groups in soils contamination by tailing from Pb, Zn and Ag mine[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2003, 22(4):408-411.
- [22] 王秀丽, 徐建民, 姚槐应, 等. 重金属铜、锌、镉、铅复合污染对土壤环境微生物群落的影响[J]. 环境科学学报, 2003, 23(1):22-27.
- WANG Xiu-li, XU Jian-min, YAO Huai-ying, et al. Effects of Cu, Zn, Cd and Pb compound contamination on soil microbial community [J]. *Acta Science Circumstantiae*, 2003, 23(1):22-27.
- [23] Williams R J P. Aluminium and biological systems: An introduction[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 1996, 149:1-9.
- [24] Valinsky L, Vedova G D, Jiang T, et al. Oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes for analysis of fungal community composition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(12):5999-6004.
- [25] 张晶, 张惠文, 李新宇, 等. 土壤真菌多样性及分子生态学研究进展[J]. 应用生态学报, 2004, 15(10):1958-1962.
- ZHANG Jing, ZHANG Hui-wen, LI Xin-yu, et al. Research advances in soil fungal diversity and molecular ecology[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(10):1958-1962.
- [26] 张伟, 许俊杰, 张天宇. 土壤真菌研究进展[J]. 菌物研究, 2005, 3(2): 52-58.
- ZHANG Wei, XU Jun-jie, ZHANG Tian-yu. Advancement on soil fungal research[J]. *Journal of Fungal Research*, 2005, 3(2):52-58.
- [27] Kanazawa S, Kunito T. Preparation of pH 3.0 agar plate, enumeration of acid-tolerant, and Al-resistant microorganisms in acid soils[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1996, 42(1):165-173.
- [28] Wang C, Zhao X Q, Aizawa T, et al. High aluminum tolerance of *Rhodotorula* sp. RS1 is associated with thickening of the cell wall rather than chelation of aluminum ions[J]. *Pedosphere*, 2013, 23(1):29-38.