

杉木连栽土壤微生物多样性的比较研究*

李延茂^{1,2} 胡江春^{1,*} 张晶^{1,2} 汪思龙¹ 王书锦¹

(¹中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016; ²中国科学院研究生院, 北京 100039)

【摘要】 分析了位于湖南会同广坪镇 1~4 代人工杉木林根际土壤微生物数量变化情况, 结果表明, 随杉木连栽代数的增加, 根际土壤中三大类群微生物数量发生显著变化, 细菌和放线菌数量明显减少, 真菌数量显著增加. 利用 PCR 和 DGGE 技术分析了 1~4 代杉木林根际土壤细菌区系和真菌区系. 结果表明, 细菌生物多样性在不同连栽代数杉木根际土壤中变化不明显, 各代杉木土壤之间细菌的遗传相似性为 87%. 而真菌随连栽代数的增加, DGGE 图谱带逐渐减少, 真菌生物多样性降低, 各代杉木土壤之间真菌的遗传相似性也较低, 仅为 45%. 对各代杉木土壤主要真菌类群的分析表明, 随连栽代数的增加, 病原真菌及产毒真菌增加显著.

关键词 杉木 连栽障碍 土壤微生物 PCR-DGGE 生物多样性

文章编号 1001-9332(2005)07-1275-04 **中图分类号** S154.37 **文献标识码** A

Microbial diversity in continuously planted Chinese fir soil. LI Yanmao^{1,2}, HU Jiangchun¹, ZHANG Jing^{1,2}, WANG Silong¹, WANG Shujin¹ (¹Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; ²Graduate School of Chinese Academy Sciences, Beijing 100039, China). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2005, 16(7): 1275~1278.

The study on the microbial diversity of 1st, 2nd, 3rd and 4th generation Chinese fir soil at Huitong Forest Experimental Station showed that with the increase of generation, the numbers of bacteria and actinomycetes decreased markedly, while that of fungi increased evidently. It was found by PCR and DGGE that the bacterial diversity changed slightly and its genetic similarity among different generations reached 87%, but the fungal diversity reduced and its genetic similarity was only 45%. The numbers of pathogenic and deleterious fungi increased markedly with increasing Chinese fir generations.

Key words Chinese fir, Continuous planting, Soil microbes, PCR-DGGE, Biodiversity.

1 引言

杉木(*Cunninghamia lanceolata*)是我国南方重要速生造林树种,栽培面积达 $4.498 \times 10^6 \text{ hm}^2$, 占全国人工林总面积的 24%^[11]. 但是, 在杉木人工林栽培过程中, 出现杉木连栽生长量普遍下降, 甚至死亡的现象. 据报道, 杉木林二耕土其树高生长分别比头耕土下降 10%~15%, 第 2 代杉木材积生长量比第 1 代下降 41%. 连栽障碍现象已严重影响了杉木人工林的持续经营, 因此掌握不同栽植代数杉木人工林生产力变化规律、揭示杉木人工林林地退化机制已成为当前林业科学研究中急需解决的问题^[2, 7, 15, 19, 22]. 不少学者^[6, 10, 18]研究指出, 森林土壤中毒现象与微生物有关, 且森林土壤比耕作土壤有更强的毒性. 杉木连栽导致土壤中病原微生物及 DRMO(非病原致害菌)的积累可能是造成杉木连栽土壤中毒的原因之一^[13]. 本文通过对不同连栽代数杉木人工林土壤微生物区系变化情况的调查, 探讨了杉木连栽土壤微生物生态过程, 为解决杉木连栽

障碍问题提供科学依据.

2 研究地区与研究方法

2.1 自然概况

实验区在中国科学院会同森林生态实验站, 该站位于云贵高原东缘斜坡和雪峰山西南地段, 地处湖南省会同县广坪镇内, $103^{\circ}39'E, 26^{\circ}48'N$, 属于亚热带湿润季风气候区. 年平均气温 $16.5^{\circ}C$, 年降雨量 1 200~1 400 mm, 湿润度大于 1. 土壤为板、页岩风化形成的红黄壤, 海拔 300~600 m^[23].

2.2 材料

2.2.1 土样 2003 年 10 月在湖南省会同县广坪镇境内选取 1 代、2 代、3 代、4 代杉木林 4 块样地, 选择相同立地条件采集根际土壤样品, 每个样地选择 3 个采样点, 采样深度为 0~20 cm.

2.2.2 培养基 培养真菌用 Martin 氏培养基; 细菌用牛肉膏蛋白胨培养基; 放线菌用高氏 1 号培养基; 真菌发酵培养基: 葡萄糖(1%)、蔗糖(3%)、蛋白胨(1%)、NaCl(0.2%)、麦麸

* 中国科学院沈阳应用生态研究所知识创新工程前沿领域项目(SLYQY0413)和中国科学院陆地生态过程重点实验室基金资助项目(LDSTSJJ0406).

** 通讯联系人.

2004-12-10 收稿, 2005-03-18 接受.

(0.3%)、小米(0.3%)。

2.3 方法

2.3.1 可培养微生物计数 采用稀释平板分析法^[12]。细菌接种时采用 $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的土壤稀释液 0.1 ml; 真菌接种时头耕土、二耕土采用 $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的土壤稀释液 0.05 ml, 三耕土、四耕土采用 $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的土壤稀释液 0.1 ml; 放线菌接种时采用 $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的土壤稀释液 0.1 ml。各类群分析均采用表面涂布法, 每一样品 3 个重复, 接种后置于 $25\sim 28^\circ\text{C}$ 培养箱中培养。细菌、真菌、放线菌分别在第 2 天、5 天、7 天观察结果。

2.3.2 土壤微生物多样性分析 1) 土壤 DNA 的提取与纯化: 参照罗海峰^[14] 的方法进行。2) 引物: 细菌引物: GM5F-GC: 5'-CGCCC GCCGC GCGCG GGCGG GGCGG GGGCA CGGGG GGCCT ACGGG AGGCA GCAG-3'; R518: 5'-AT-TAC CGCGG CTGCT GG-3'; GM5F: 5'-CCTAC GGGAG GCAGC AG-3'。真菌引物: U1 (20bp): 5'-GTGAA ATTGT TGAAA GGGAA-3', U2 (18bp): 5'-GACTC CTTGG TCCGT GTT-3', U2-GC (58bp): 5'-CGCCC GCCGC GCGCG GCGGG CGGGG CGGGG GCACG GGGGG GACTC CTTGG TCCGT GTT-3'。以上引物均由大连宝生物公司合成。3) PCR 反应条件: 预变性条件为 94°C 3 min, 并在 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 1 min 条件下进行 35 个循环。然后在 72°C 条件下延伸 10 min。4) PCR 反应产物的变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析 使用 30%~70% 的变性梯度凝胶, 其中变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递增。在 200V 电压下, 60°C 条件下电泳 5 h。电泳完毕后, 用银染法染色 (Bio-rad 系统)。

2.3.3 土壤主要真菌类群的初步鉴定 参见文献^[4]。

3 结果与分析

3.1 连栽对杉木土壤微生物数量的影响

分析结果 (图 1) 表明, 不同代数杉木林土壤细菌、真菌、放线菌的数量有明显差异, 土壤真菌随连栽代数的增加明显增加, 不同代数杉木土壤真菌数量变化均达差异极显著水平 ($P < 0.01$)。第 1~4 代的代次比为 1:1.41:2.54:4.23。第 4 代人工杉木林土壤真菌的数量是第一代的 4.23 倍。土壤细菌、放线菌随连栽代数的增加则明显减少, 除第一代与第二代杉木林土壤细菌变化不明显外, 不同代数杉木土壤细菌、放线菌数量变化均达差异极显著水平 ($P < 0.01$)。细菌 1~4 代的代次比为 1:0.97:0.71:0.56, 放线菌的代次比为 1:0.92:0.64:0.57。这与已报道的研究结果相似^[5]。

3.2 连栽对杉木土壤微生物多样性的影响

3.2.1 连栽对杉木土壤细菌多样性的影响 采用对大多数细菌的 16SrRNA 基因片断具有特异性的引物进行了供试土壤细菌的基因组 DNA 特异性扩

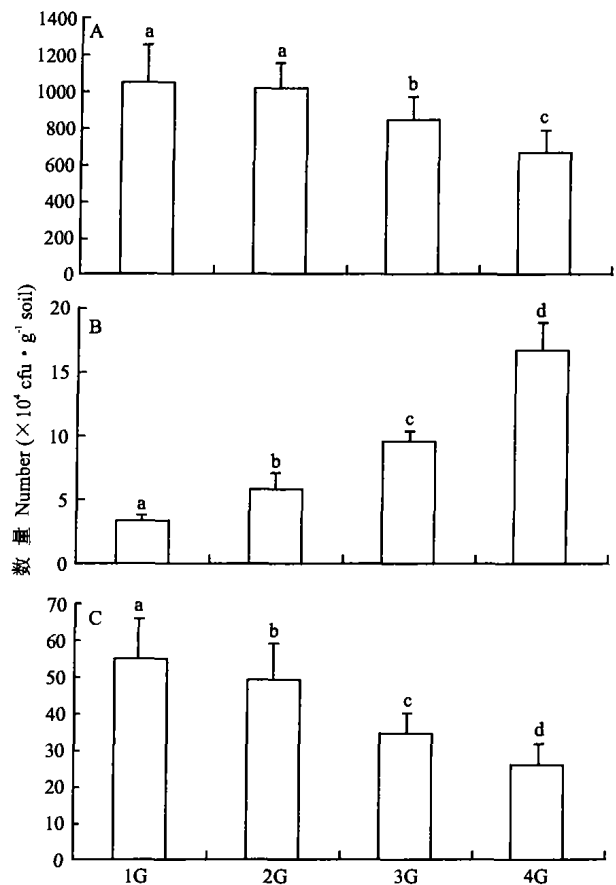


图 1 不同连栽代数杉木土壤细菌(A)、真菌(B)、放线菌(C)总数
Fig. 1 Total bacteria(A), fungi(B), actinomycetes(C) in different generations soils.

不同字母代表差异极显著 (LSD test $P < 0.01$) Different letters are significantly different (LSD test $P < 0.01$). 1G: 头耕土 1st generation soil; 2G: 二耕土 2nd generation soil; 3G: 三耕土 3rd generation soil; 4G: 四耕土 4th generation soil.

增, 其 PCR 扩增产物的变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 图谱如图 2 所示。在第 1 代、第 2 代、第 3 代和第 4 代杉木土样 DGGE 电泳条带数目均有一定差异但变化不明显。供试土壤有许多共同的条带, 说明供试土壤有相似的细菌类型, 但个别条带的强度在不同土样中存在明显差异, 表明杉木连栽能影响某些种类细菌的数量。采用非加权成对算术平均法 (UPGMA) 对土壤细菌 DGGE 指纹图谱作相似性聚类分析, 结果 (图 3) 表明, 各代杉木土壤之间的细菌遗传相似性为 87%, 4 代杉木土壤细菌的遗传差异并非随连栽代数的增加而增加。如与第 3 代杉木土壤相比, 第 2 代杉木土壤细菌的遗传差异大于第 1 代杉木土壤细菌, 表明连栽对土壤细菌多样性影响不大。

3.2.2 连栽对杉木土壤真菌多样性的影响 真菌的 DGGE 图谱如图 3 所示。第 1、2、3、4 代杉木土壤真菌 DGGE 电泳条带数目、各条带的强度均存在较大差异。随连栽代数的增加, 电泳条带数目逐渐减少, DGGE 带谱中每个条带都代表一个微生物物种或类

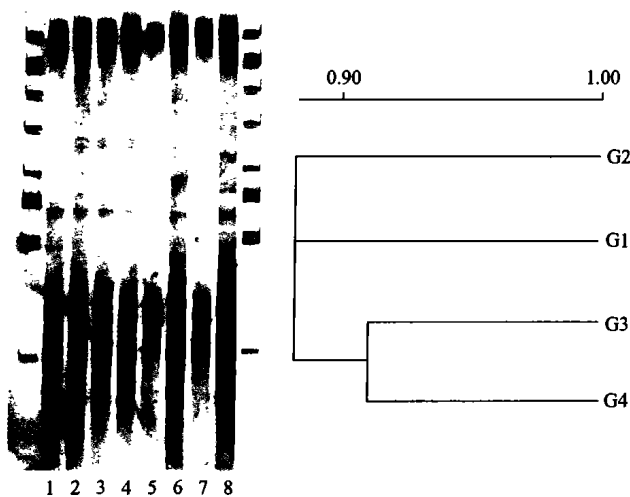


图2 不同连栽代数杉木土壤细菌 16SrRNA 片断的 DGGE 图谱及其遗传相似性聚类分析

Fig.2 DGGE patterns of 16SrRNA fragments of bacteria and genetic similarity of bacteria community obtained with PCR-DGGE from four different generation soils of Chinese fir.

每个土样设 2 个重复(即 2 条泳道),泳道 1~2 代表头耕土;泳道 3~4 代表二耕土;泳道 5~6 代表三耕土;泳道 7~8 代表四耕土 Each soil has three replicates(tree lanes). Lanes 1~2 are the 1st generation soil; Lanes 3~4 are the 2nd generation soil; Lanes 5~6 are the 3rd generation soil; Lanes 7~8 are the 4th generation soil. 下同 The same below.

群,条带的多少即反映出该环境中微生物类群的数量^[1].因此,电泳条带数目逐渐减少表明长期种植杉木纯林降低了土壤真菌的多样性.某些条带的强度在不同连栽代数的土壤中存在明显差别,表明杉木连栽影响了土壤生态系统某些真菌的数量,从而使土壤真菌群落结构发生变化.不同代数间相似性聚类分析(图 3)表明,各代杉木土壤之间的真菌遗传相似性较低,仅为 45%.与第 1 代杉木土壤相比,随连栽代数的增加其遗传相似性越低,表明长期种植杉木纯林对土壤真菌群落结构有较明显的影响,种植时间越长影响越明显.

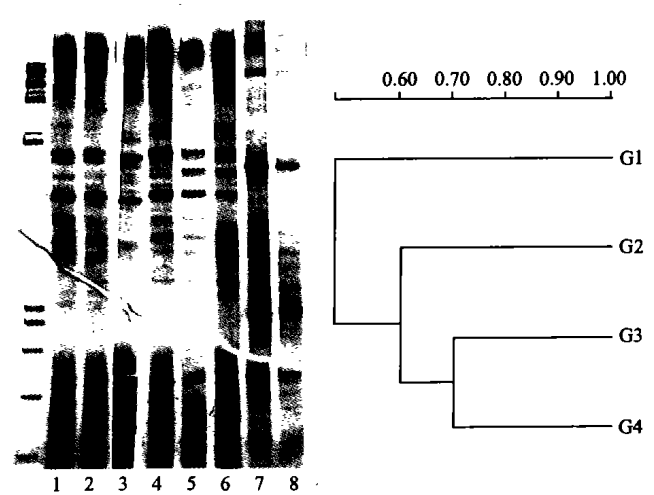


图3 不同连栽代数杉木土壤真菌 18SrRNA 片断的 DGGE 图谱及其土壤真菌群落 PCR-DGGE 的遗传相似性聚类分析

Fig.3 DGGE patterns of 18SrRNA fragments of fungi and genetic similarity of fungi community obtained with PCR-DGGE from four different generation soils of Chinese fir.

3.3 连栽对杉木土壤真菌主要类群的影响

对不同连栽代数土壤真菌的分析表明(表 1),1 代、2 代、3 代、4 代杉木土壤中均以青霉菌为主要类群,青霉菌的变化趋势不明显.曲霉和木霉在土壤中所占的比例有较显著的减少,镰刀菌所占比例增加明显,其它非典型类群的真菌除二耕土外,其所占比例亦呈下降趋势.这进一步表明同一块地长期种植杉木能影响土壤微生物区系,印证了图 3 所反映的结论.镰刀菌是重要的植物病原菌类群,它可以以活体直接侵染寄主植物,亦可以分泌植物毒素毒害植物.调查结果表明,镰刀菌在头耕土中所占的比例为 2.4%,二耕土为 3.3%,三耕土为 4.6%,四耕土中所占比例上升到 6.3%.镰刀菌等病原菌及其致害真菌所占比例及绝对数量的明显增加可能是造成杉木连栽土壤中毒的一个原因.

表 1 不同连栽代数土壤真菌的比较

Table 1 Comparison of soil fungi under different generations soils (cfu·g⁻¹ soil)

真菌类型 Fungi type	头耕土 1st generation soil	二耕土 2nd generation soil	三耕土 3rd generation soil	四耕土 4th generation soil
青霉 <i>Penicillium</i>	1.3×10 ⁵ (61.9)*	2.2×10 ⁵ (73.3)	4.1×10 ⁵ (77.4)	6.4×10 ⁵ (71.9)
曲霉 <i>Aspergillus</i>	3.5×10 ³ (1.7)	4.1×10 ³ (1.4)	6.7×10 ³ (1.3)	6.6×10 ³ (0.7)
木霉 <i>Trichoclerna</i>	8.8×10 ³ (4.2)	9.5×10 ³ (3.2)	1.45×10 ⁴ (2.7)	7.2×10 ³ (0.8)
毛霉 <i>Mucor</i>	2.8×10 ⁴ (13.4)	3.1×10 ⁴ (10.3)	2.5×10 ⁴ (4.7)	1.3×10 ⁵ (14.6)
镰刀菌 <i>Fusarium</i>	5.0×10 ³ (2.4)	9.9×10 ³ (3.3)	2.4×10 ⁴ (4.6)	5.0×10 ⁴ (5.7)
其它 Others fungi	3.4×10 ⁴ (16.4)	2.5×10 ⁴ (8.5)	4.9×10 ⁴ (9.3)	5.6×10 ⁴ (6.3)
总数 Total	2.1×10 ⁵ (100)	3.0×10 ⁵ (100)	5.3×10 ⁵ (100)	8.9×10 ⁵ (100)

* 括号中数字表示所占比例 Numbers in the parentheses are relative values over total.

4 讨 论

森林土壤微生物在枯枝落叶分解、腐殖质合成、土壤养分循环、物质和能量的代谢过程中起着十分

重要的作用,土壤微生物的数量分布,不仅是土壤中有有机养分、无机养分及土壤通气透水性能的反应,而且亦是土壤中生物活性的具体体现^[21],是土壤肥沃程度的一个重要指标^[5].通过对不同连栽代数杉木

土壤细菌、真菌、放线菌的调查,发现随连栽代数的增加,细菌、放线菌数量明显减少;而真菌数量随连栽代数的增加而显著增加。土壤微生物在土壤养分的转化过程中起着非常重要的作用,微生物区系的改变必然影响土壤中养分的转化和土壤有效养分的含量^[3]。大量研究表明,随杉木连栽次数的增加,土壤养分含量呈逐代下降趋势,N、P、K含量明显降低^[2,8,9,16,20]。可以认为,土壤微生物数量及组成的改变是造成杉木连栽土壤肥力下降的一个重要原因。

森林土壤中毒与植物和微生物之间的相互关系这一观点是由莱尼尔、米柯拉和克拉西里科夫等人的工作确立起来的^[17]。他们证明了森林土壤比耕作土壤具有更强的毒性,灰化土地带表现的最明显,枞树林下土壤比松树、白桦树和柞树林下的土壤毒性更大,并认为森林土壤中毒的原因可能来自于土壤微生物。早在20世纪60年代,中国科学院林业土壤研究所(现中国科学院沈阳应用生态研究所)的周崇莲等人在湖南会同森林生态实验站对杉木连栽土壤中毒现象进行了研究,证实了杉木连栽土壤存在毒性物质,并进一步用三耕土中分得的真菌代谢产物进行毒性试验,证实微生物抑制体可能是土壤中毒性物质的来源之一。不同连栽代数杉木土壤真菌经PCR-DGGE分析显示:杉木连栽对土壤真菌多样性、群落结构、丰富度影响较大。随连栽代数的增加,土壤真菌生物多样性降低,某些真菌种类富集,通过传统方法发现,真菌数量随连栽次数的增加而增加(图1),镰刀菌等致害真菌所占的比例也显著提高。可以认为,真菌作为主要的植物病原菌类群,杉木土壤中,随连栽次数增加真菌,尤其是镰刀菌等致害真菌的增加,可能是造成杉木连栽土壤中毒的重要原因之一。

参考文献

- Casamayor EO, Schofer H, Baneras L, et al. 2000. Identification of spatiotemporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: Comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 66(2):199~508
- Chen C-Y(陈楚莹), Zhang J-W(张家武), Zhou C-L(周崇莲), et al. 1990. Researches on improving the quality of forest land and the productivity of artificial *Cunninghamia lanceolata* stands. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 1(2):97~106(in Chinese)
- Chen L-C(陈龙池), Wang S-L(汪思龙), Chen C-Y(陈楚莹). 2004. Degradation mechanism of Chinese fir plantation. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 15(10):1953~1957(in Chinese)
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH. 1980. Compendium of Soil Fungi. London. Academic Press.
- Du G-J(杜国坚), Zhang Q-R(张庆荣), Hong L-X(洪利兴), et al. 1995. Study on soil microbiota and its biochemical and physical chemistry properties of *Cunninghamia lanceolata* succession cultivation stand. *J Zhejiang For Sci Technol* (浙江林业科技), 15(5):14~20(in Chinese)
- Dullabide SR, Stirling GR, Nikulin A, et al. 1994. The role of nematodes, fungi, bacteria, and abiotic factors in the etiology of apple replant problems in the Granite Belt of Queensland. *Aust J Exp Agric*, 34:1177~1182
- Fang Q(方奇). 1990. Effects of strengthening soil and cover plants management on energy utilization and nutrient cycle of ecosystem biomass in *Cunninghamia lanceolata*. *Sci Silvae Sin* (林业科学), 25(3):201~208(in Chinese)
- Fang Q(方奇). 1987. Effects of continued planting of Chinese fir on the fertility of soil and the growth of stands. *Sci Silvae Sin* (林业科学), 23(4):389~397(in Chinese)
- Feng Z-W(冯宗炜), Chen C-Y(陈楚莹), Li C-H(李昌华), et al. 1982. The relationship of environment and growth and development of Chinese fir plantation in Huitong in Hunan Province. *J Nanjing Technol Coll Product* (南京林产工业学院学报), 6(3):19~36(in Chinese)
- Jaffee BA, Abawi GS, Mai WF. 1982. A role of soil micro-flora and *Pratylenchus penetrans* in an apple replant disease. *Phytopathology*, 72:247~251
- Li C-H(李传涵), Li M-H(李明鹤), He S-J(何绍江), et al. 1999. The reasons for yield reduction of Chinese fir caused by continuous cropping. *J Huazhong Agric Univ* (华中农业大学学报), 18(3):277~279(in Chinese)
- Li F-D(李阜棣), Yu Z-N(喻子牛), He S-J(何绍江). 1996. Experimental Techniques in Agricultural Microbiology. Beijing: China Agricultural Press. 69~71(in Chinese)
- Li Y-M(李延茂), Hu J-C(胡江春), Wang S-L(汪思龙), et al. 2004. Function and application of soil microorganisms in forest ecosystem. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 15(10):1943~1946(in Chinese)
- Luo H-F(罗海峰), Qi H-Y(齐鸿雁), Xue K(薛凯), et al. 2003. A preliminary application of PCR-DGGE to study microbial diversity in soil. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 23(8):1570~1575(in Chinese)
- Ma X-Q(马祥庆). 2001. A review for research of productivity decline in Chinese fir plantations after successive plantings. *J Fujian Univ For* (福建林学院学报), 21(4):380~384(in Chinese)
- Ma X-Q(马祥庆), Fan S-H(范少辉), Liu A-Q(刘爱琴), et al. 2000. A comparison on soil fertilities of Chinese fir plantation of different generations. *For Res* (林业科学研究), 13(6):577~582(in Chinese)
- Mikola P. 1952. Effect of forest humus on parasitic fungi causing damping-off disease of coniferous seedlings. *Phytopathology*, 42(4):202~203
- Mazzola M. 1998. Elucidation of the microbial complex having a causal role in the development of apple replant disease in Washington. *Phytopathology*, 88:930~938
- Yang C-D(杨承栋), Zhang X-Q(张小泉), Jiao R-Z(焦如珍), et al. 1996. Variations of chemical properties, biochemical, microorganism activities and function in soil of successive rotation of Chinese fir and their influences on growing. *Sci Silvae Sin* (林业科学), 32(2):175~181(in Chinese)
- Yang Y-S(杨玉盛), He Z-M(何宗明), Chen G-S(陈光水), et al. 2001. PCA of soil fertility under different gaps of continuously planting Chinese fir. *Soil Environ Sci* (土壤与环境), 10(1):33~38(in Chinese)
- Yang Y-S(杨玉盛), Qiu R-H(邱仁辉), Yu X-T(俞新妥), et al. 1999. Study on soil microbes and biochemical activity in the continuous plantations of *Cunninghamia lanceolata*. *Chin Biodiv* (生物多样性), 7(1):1~7(in Chinese)
- Xu H-C(徐化成). 1992. On the decrease of fertility in plantations. *World For Res* (世界林业研究), 5(1):66~73(in Chinese)
- Yu X-J(于小军), Wang S-L(汪思龙), Deng S-J(邓仕坚), et al. 2003. Nutrient characteristics of stemflow and throughfall in evergreen broad-leaved forest and *Cunninghamia lanceolata* plantation forest. *Chin J Ecol* (生态学杂志), 22(6):7~11(in Chinese)

作者简介 李延茂,男,1979年生,硕士研究生.主要从事微生物生态学方面的研究,已发表论文数篇. E-mail: liyan-mao2000@yahoo.com.cn