

# 呼伦贝尔针茅草原土壤真菌群落结构分析\*

李刚<sup>1</sup> 范宝莉<sup>2</sup> 文都日乐<sup>1</sup> 杨殿林<sup>1†</sup>

(1 农业部环境保护科研监测所, 天津 300191)

(2 天津师范大学生命科学学院, 天津市细胞遗传与分子调控天津市重点实验室, 天津 300387)

## Analysis of Soil Fungal Community Structure of *Stipa* Steppes in Hulunbuir, Inner Mongolia

Li Gang<sup>1</sup> Fan Baoli<sup>2</sup> Wendu Rile<sup>1</sup> Yang Dianlin<sup>1</sup>

(1 Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China)

(2 Tianjin Key Laboratory of Cyto-Genetical and Molecular Regulation,  
College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

**关键词** 呼伦贝尔; 针茅草原; 真菌; 群落结构; 系统发育

**中图分类号** S154.3

**文献标识码** A

土壤真菌作为土壤微生物区系的重要组成部分, 是一种种类繁多、分布广泛的真核微生物<sup>[1-2]</sup>。真菌是构成土壤微生物生物量的主要来源, 具有分解有机质的功能, 是物质循环和能量循环的重要组成部分, 是生态系统中生物与非生物之间循环并维持正常运转的重要动力, 是一类不可忽视的微生物类群, 土壤真菌的种类构成可作为评价土壤生态状况的生物指标<sup>[3-6]</sup>。因此, 研究土壤真菌群落结构组成对评价生态系统功能、维护生态系统平衡具有重要的指导意义。

目前由于受到实验条件的限制, 采用传统培养方法所能获得的土壤真菌数量非常少, 土壤中绝大多数的真菌无法被直接分离培养, 迄今为止, 被正式描述的种类仅占总量的5%~10%<sup>[7]</sup>。随着分子生物学技术的发展, 人们直接研究不同生境土壤真菌的种群结构及其与环境的关系<sup>[8]</sup>。真菌核糖体DNA的内转录间隔区(Internal Transcribed Spacers, ITS)是非常重要的目标区域, 针对此区域设计特异性引物并进行PCR扩增的方法, 可以用作真菌的定性、多样性、分子生态学和真菌系统学等方面的研究<sup>[9-11]</sup>。

贝加尔针茅(*Stipa baicalensis*)草原、大针茅(*Stipa grandis*)草原和克氏针茅(*Stipa krylovii*)草原是呼伦贝尔草原的主要草地类型, 在畜牧业生产中占有重要地位<sup>[12]</sup>。本文以土壤真菌ITS区为目标区域, 采用PCR-DGGE分子生物学技术及扩增产物序列分析方法, 初步研究了呼伦贝尔针茅草原土壤真菌群落结构组成, 旨在了解呼伦贝尔草原土壤真菌种类资源情况,

\*国家自然科学基金(30770367)、中国农业科学院院长基金和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(农业部环境保护科研监测所)资助

†通讯作者: 杨殿林, 男, 博士, 研究员, 主要从事生物多样性与生态农业研究, E-mail: dianlinyang@yahoo.com

作者简介: 李刚, 男, 1981年7月生, 辽宁辽阳人, 硕士, 助理研究员。主要从事生物多样性与生物安全研究, E-mail: gangli1981@gmail.com

收稿日期: 2010-10-12; 收到修改稿日期: 2010-12-15

为该地区的可持续发展提供理论依据,为深入研究我国温带草原土壤微生物生态系统提供技术资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区概况

试验地位于呼伦贝尔市境内,地理位置为北纬(47°05'~53°20'),东经(115°31'~126°4')。该地区属温带大陆性季风气候,年平均气温-2.2℃左右,无霜期 115~124d,年降水量 339mm<sup>[13]</sup>。本试验以呼伦贝尔市境内的贝加尔针茅草原(SBS)、大针茅草原(SGS)、克氏针茅草原(SKS)为研究对象,在植被典型、地势平坦、开阔的区域,分别选择自 2001 年以来的围栏草地作为试验样地,围封年限均为 8a。试验样地基本情况见表 1。

表 1 观测样地基本情况

草地类型	经度	纬度	海拔 (m)	植物群落
贝加尔针茅草原	119°30'42"	49°30'56"	732	贝加尔针茅+羊草+日荫菅
大针茅草原	119°17'45"	48°25'30"	723	大针茅+羊草+糙隐子草
克氏针茅草原	117°58'53"	48°11'29"	595	克氏针茅+糙隐子草

### 1.2 样品采集

于 2009 年 7 月进行野外采样,每个样地内按照 S 型曲线选择 40 个点,去除表层植被,用直径为 5 cm 的土钻,取 0~20 cm 土壤,最后将 40 份土样混匀过筛,去除根系和土壤入侵物,采用“四分法”选取 1kg 土样冷藏带回实验室保存于-70℃超低温冰箱,其余土样带回实验室风干后过 0.15 mm 筛用于土壤理化性质分析<sup>[14]</sup>。土壤理化性质见表 2。

表 2 不同草地类型土壤理化性质

草地类型	pH	土壤含水量 (%)	容重 (gcm <sup>-3</sup> )	全氮 (gkg <sup>-1</sup> )	全磷 (gkg <sup>-1</sup> )	有机碳 (gkg <sup>-1</sup> )	C/N 值
贝加尔针茅草原	6.85±0.08 ab	17.20±0.03 b	1.07±0.03 d	1.74±0.05 b	0.30±0.00 c	20.76±0.46 b	11.92±0.34 b
大针茅草原	6.69±0.07 b	9.21±0.04 d	1.49±0.02 b	1.16±0.01 d	0.21±0.01 e	12.51±0.10 c	10.79±0.25 c
克氏针茅草原	6.36±0.03 c	6.17±0.02 e	1.73±0.01 a	1.57±0.01 c	0.23±0.00 d	10.33±0.12 d	6.58±0.14 d

注:同列不同字母表示差异显著( $p < 0.05$ )

### 1.3 土壤总 DNA 提取

称取 0.35g 土壤样品,采用 BBI 公司(Canada)的 EZ-10 Spin Soil DNA Extraction kit 按操作说明提取总 DNA,获得的总 DNA 使用 Biophotometer (Eppendorf, Germany)进行定量分析,并在 0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,检测总 DNA 质量。

### 1.4 PCR 扩增

采用巢式 PCR (Nested PCR)方法,针对真菌的ITS片段进行扩增,引物序列及反应程序见表3。第一轮PCR反应体系: 25pmol 每种引物, 1.25U的Ex Taq polymerase (Takara), 5 μl 的10×Ex Taq Buffer (with MgCl<sub>2</sub>), 4 μl dNTP (各10 mmolL<sup>-1</sup>), 20 ng的模板DNA, 终体积为

50  $\mu$ l; 第二轮PCR反应体系: 25 pmol每种引物, 1.25U的Ex Taq polymerase (Takara), 5 $\mu$ l的10 $\times$ Ex Taq Buffer (with MgCl<sub>2</sub>), 4  $\mu$ l dNTP (各10 mmolL<sup>-1</sup>), 以3  $\mu$ l第一轮PCR产物为模板, 补充无核酸酶水(Nuclease-Free water, Promega)至50  $\mu$ l。

表 3 PCR 反应的引物及反应条件

巢式 PCR	引物	引物序列(5'至 3')	反应条件
第一步	ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	95 $^{\circ}$ C, 5min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
第二步	GC-ITS1F	GCTTGGTCATTTAGGAAGTAA	95 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min
	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCATCGATGC	

注: GC 夹序列为: 5'-CGCCCCGCGCGCCCCGCGCCCCGCGCCCCGCGCCCCGCCCC-3'

### 1.5 变性梯度凝胶电泳

采用 Dcode<sup>TM</sup> 通用突变检测系统(Bio-Rad, USA)按照操作说明进行 DGGE 分析。丙烯酰胺凝胶(37.5:1)浓度为 8%, 变性剂梯度为 30%~50% (100%变性剂含有 7M 尿素和 40%(v/v)去离子甲酰胺), 电泳缓冲液为 1 $\times$ TAE。将 25  $\mu$ l PCR 产物和 5  $\mu$ l 6 $\times$ loading buffer 混合后用微量进样器加入胶孔中, 200V、60  $^{\circ}$ C 条件下电泳 5h。电泳结束后, 小心取出凝胶, 放在 SYBR<sup>TM</sup> Green I (1: 10000) (Invitrogen, USA)染液中染色 30min, 然后用 Gel Dox XR 凝胶成像系统(Bio-Rad, USA)观察与拍照。

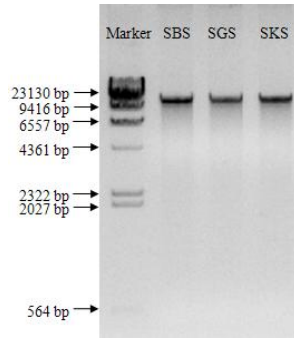
### 1.6 DGGE 条带回收、测序和系统发育分析

选取 DGGE 图谱中主要条带进行割胶回收, 用不含 GC 夹的 ITS1F 和 ITS2 引物扩增。PCR 产物用纯化试剂盒(Promega)纯化后与载体 pMD<sup>TM</sup> 19-T Vector(Takara)连接, 转化 *E. coli* JM109, 用菌落 PCR 方法检测阳性克隆<sup>[15]</sup>。选择 3 个阳性克隆送上海生工生物技术公司进行测序, 测序结果于 NCBI 上进行 Blastn 比对获取相近典型菌株信息。利用 Clustal X 1.83 和 Mega 4.1 中的邻接法(Neighbor-Joining)建立土壤真菌系统发育树。

## 2 结果与分析

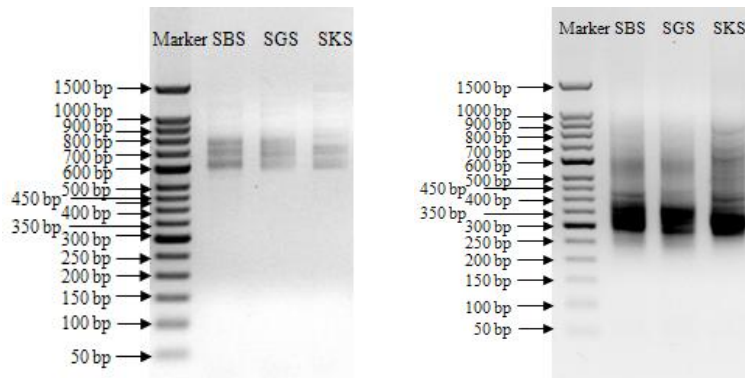
### 2.1 土壤总 DNA 的提取及 PCR 扩增

各土壤样品的总DNA经过0.8%的琼脂糖凝胶电泳(图1), 结果显示所有土壤样品总DNA大小均在在9416~23130 bp之间, 表明所获得的土壤DNA质量很好。将获取的土壤总DNA均稀释成20 ng $\mu$ l<sup>-1</sup>用于PCR扩增。由图2可知, 第一轮PCR扩增后所得片段集中在600~800 bp之间, 且为弥散条带, 这与文献<sup>[16]</sup>中所报道的450~750 bp的结果有偏差, 原因可能为不同地区所存在的真菌种类不同, 其ITS区间的长度变化不一, 碱基的变异度也各不相同。第二轮PCR扩增所获得的片段集中在250~450 bp之间。



Marker为Hind III digested  $\lambda$ -DNA, SBS、SGS和SKS分别为贝加尔针茅草原、大针茅草原和克氏针茅草原

图1 土壤总DNA电泳图



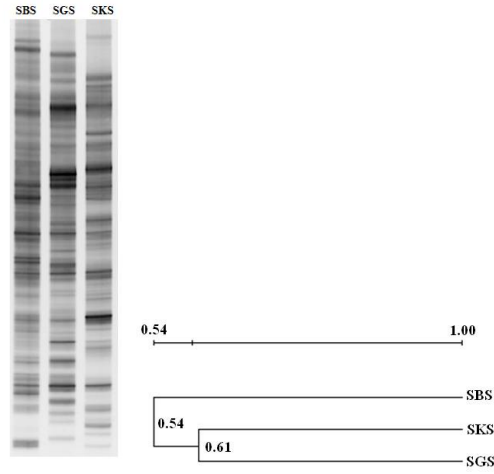
Marker 为 50 bp DNA Ladder, SBS、SGS 和 SKS 分别为贝加尔针茅草原、大针茅草原和克氏针茅草原

图2 土壤真菌 ITS 片段 PCR 扩增产物(左: 第一轮 PCR 扩增产物, 右: 第二轮 PCR 扩增产物)

## 2.2 典型针茅草原土壤真菌(ITS 片段) DGGE 图谱及系统发育分析

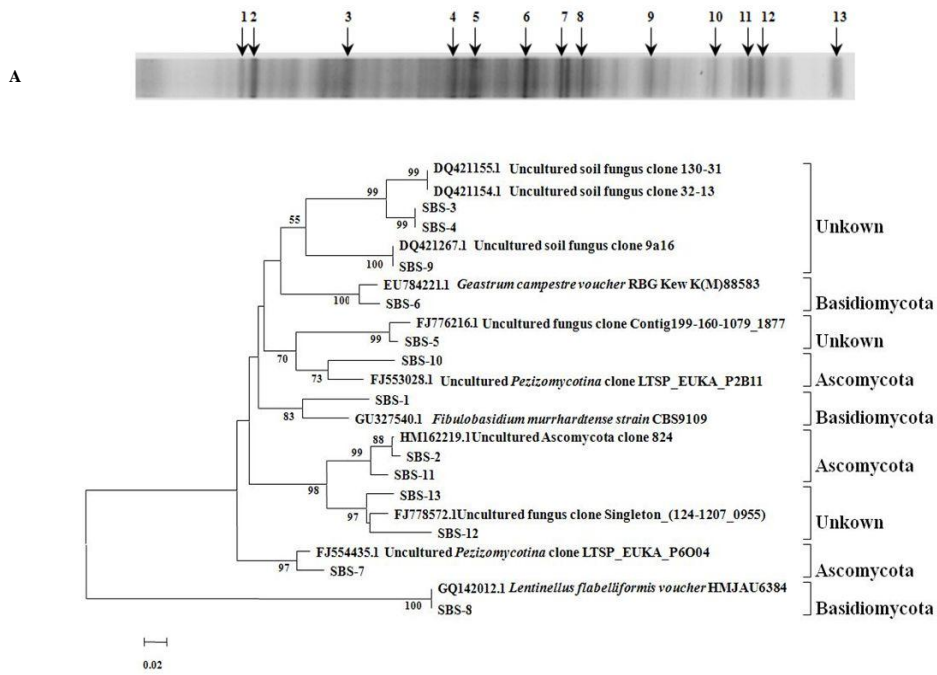
由图 3 可知, 呼伦贝尔 3 种针茅草原土壤真菌 DGGE 图谱间存在明显差异(最大相似度仅为 61%)。造成此结果的原因可能为不同草地类型植被结构类型不同, 土壤表面的覆盖程度不同, 造成土壤养分、温度及湿度等的差异, 从而影响了土壤真菌群落结构组成及活性。Ranjard 等<sup>[17]</sup>应用核糖体 RNA 基因间隔区自动分析技术(ARISA)研究不同地理起源、植被覆盖及理化差异地区的土壤真菌群落, 也发现不同地点土壤真菌图谱条带的数量、亮度及群落优势结构截然不同。

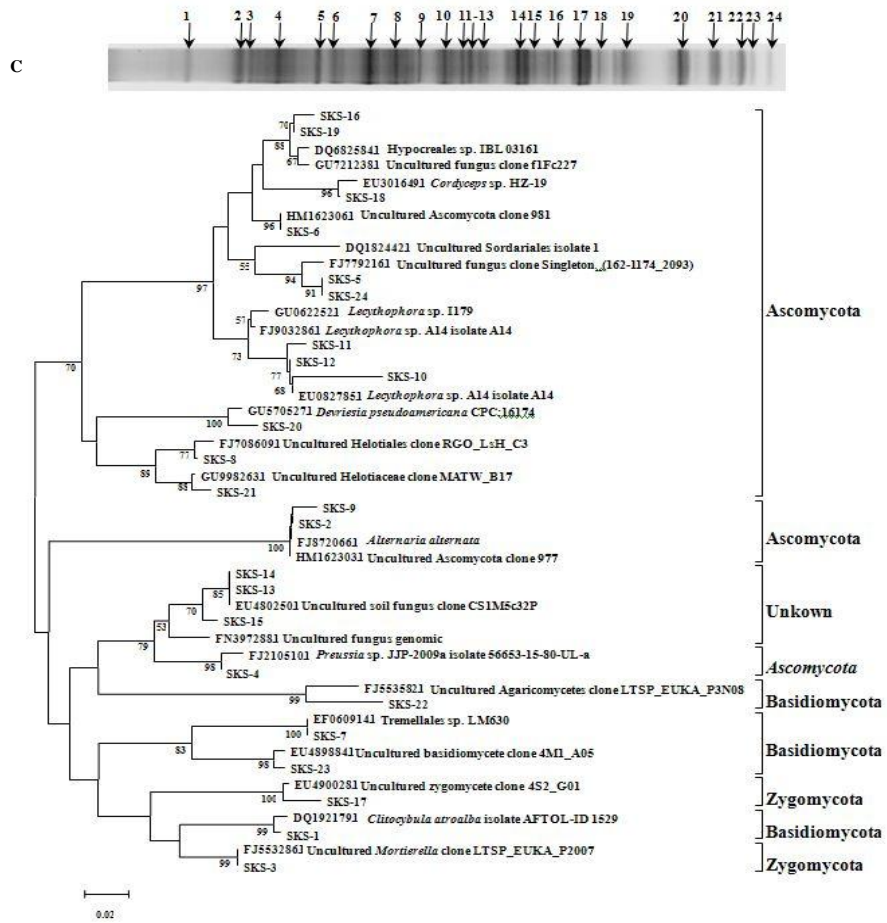
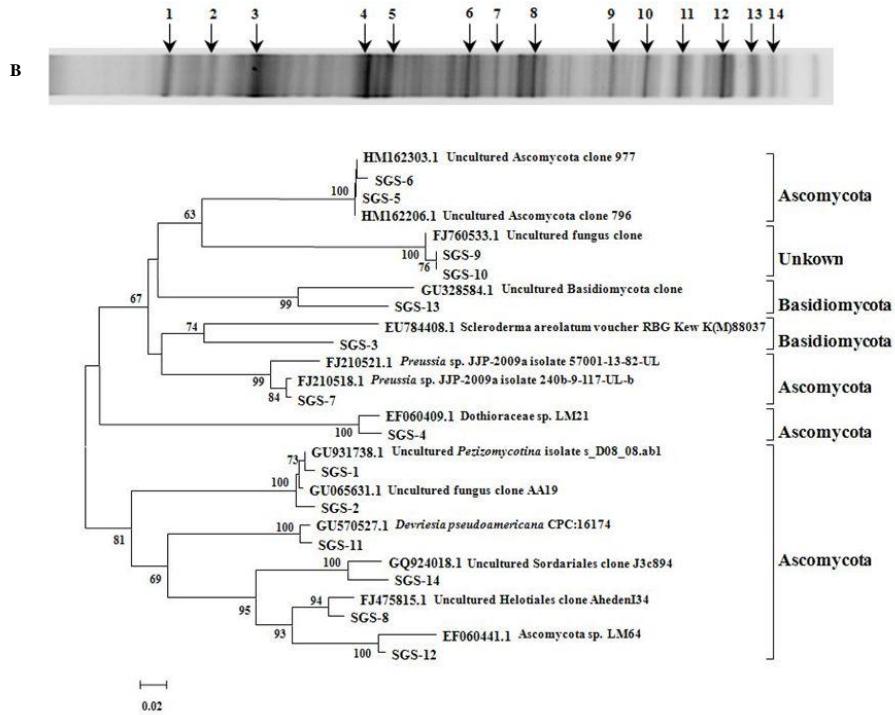
根据 3 种典型针茅草原(贝加尔针茅草原(SBS)、大针茅草原(SGS)、克氏针茅草原(SKS))土壤真菌 DGGE 图谱结果, 选取主要条带割胶共回收 51 条带, 其中克氏针茅草原 24 条、大针茅草原 14 条、贝加尔针茅草原 13 条(图 4A 至图 4C)。对所获得的 51 条带序列进行 Blastn 比对分析(表 4), 结果表明 51 个条带的序列与已知序列的相似性在 79%~100%之间, 其中 SKS-2、SKS-3、SKS-6、SKS-18、SKS-19、SGS-5 与已知序列的相似性达到 100%, 占序列总数的 11.8%。由此可见所获得的大部分序列与已知的真菌均具有一定的亲缘关系但不完全相同, 推断这些真菌种类很可能是该地区所特有的。



SBS、SGS 和 SKS 分别为贝加尔针茅草原、大针茅草原和克氏针茅草原

图 3 呼伦贝尔针茅草原土壤真菌 DGGE 指纹图谱及聚类分析





A-贝加尔针茅草原, B-大针茅草原, C-克氏针茅草原

图 4 呼伦贝尔针茅草原土壤真菌系统发育树(邻接法)

表 4 DGGE 条带的确认及根据测序结果推测的 DGGE 条带代表的同源性最高的菌株

条带编号	GenBank 登录号	同源性最高的菌株	相似度
SKS-1	DQ192179.1	<i>Clitocybula atroalba</i> isolate	84%
SKS-2, SGS-5	HM162303.1	Uncultured Ascomycota clone	100%
SKS-3	FJ553286.1	Uncultured <i>Mortierella</i> clone	100%
SKS-4	FJ210510.1	<i>Preussia</i> sp.	93%
SKS-5	DQ182442.1	Uncultured Sordariales isolate	84%
SKS-6	HM162306.1	Uncultured Ascomycota clone	100%
SKS-7	EF060914.1	Tremellales sp.	95%
SKS-8	FJ708609.1	Uncultured Helotiales clone	96%
SKS-9	FJ872066.1	<i>Alternaria alternata</i>	99%
SKS-10	GU062252.1	<i>Lecythophora</i> sp.	86%
SKS-11	FJ903286.1	<i>Lecythophora</i> sp.	93%
SKS-12	EU082785.1	Coniochaetaceae sp.	90%
SKS-13	EU480250.1	Uncultured soil fungus clone	97%
SKS-14, SKS-15	FN397288.1	Uncultured fungus genomic	87%
SKS-16	GU721238.1	Uncultured fungus clone	95%
SKS-17	EU490028.1	Uncultured zygomycete clone	91%
SKS-18	EU301649.1	<i>Cordyceps</i> sp.	100%
SKS-19	DQ682584.1	Hypocreales sp.	100%
SKS-20, SGS-11	GU570527.1	<i>Devriesia pseudoamericana</i>	97%
SKS-21	GU998263.1	Uncultured Helotiaceae clone	94%
SKS-22	FJ553582.1	Uncultured Agaricomycetes clone	89%
SKS-23	EU489884.1	Uncultured basidiomycete clone	97%
SKS-24	FJ779216.1	Uncultured fungus clone	94%
SGS-1	GU931738.1	Uncultured <i>Pezizomycotina</i> isolate	99%
SGS-2	GU065631.1	Uncultured fungus clone	99%
SGS-3	EU784408.1	<i>Scleroderma areolatum</i> voucher	98%
SGS-4	EF060409.1	Dothioraceae sp.	94%
SGS-6	HM162206.1	Uncultured Ascomycota clone	99%
SGS-7	FJ210518.1	<i>Preussia</i> sp.	99%
SGS-8	FJ475815.1	Uncultured Helotiales clone	97%
SGS-9	FJ760533.1	Uncultured fungus clone	99%
SGS-10	FJ210521.1	<i>Preussia</i> sp.	83%
SGS-12	EF060441.1	Ascomycota sp.	95%
SGS-13	GU328584.1	Uncultured Basidiomycota clone	79%
SGS-14	GQ924018.1	Uncultured Sordariales clone	87%
SBS-1	GU327540.1	<i>Fibulobasidium murrhardtense</i> strain	86%
SBS-2, SBS-11	HM162219.1	Uncultured Ascomycota clone	91%, 97%
SBS-3	DQ421155.1	Uncultured soil fungus clone	81%
SBS-4	DQ421154.1	Uncultured soil fungus clone	81%
SBS-5	FJ776216.1	Uncultured fungus clone	94%

SBS-6	EU784221.1	<i>Geastrum campestre voucher</i>	87%
SBS-7	FJ554435.1	Uncultured <i>Pezizomycotina</i> clone	82%
SBS-8	GQ142012.1	<i>Lentinellus flabelliformis voucher</i>	98%
SBS-9	DQ421267.1	Uncultured soil fungus	98%
SBS-10	FJ553028.1	Uncultured <i>Pezizomycotina</i> clone	82%
SBS-12, SBS-13	FJ778572.1	Uncultured fungus clone	84%, 93%

注: SBS、SGS 和 SKS 分别为贝加尔针茅草原、大针茅 0 草原和克氏针茅草原

将 3 种典型针茅草原土壤中所获得的真菌 ITS 片段序列与 Genbank 其它近缘序列分别进行系统发育分析(图 4A 至图 4C)。所获得的 51 条序列中伞菌目(Agaricales)的 *Clitocybula*、银耳目(Tremellales)的 *Fibulobasidium*、牛肝菌目(Boletales)的硬皮马勃菌属(*Scleroderma*)、地星目(Geastrales)的 *Geastrum*、多孔菌目(Polyporales)的 *Lentinellus* 均属于担子菌门(Basidiomycota); 格孢菌目(Pleosporales)的光黑壳属(*Preussia*)、柔膜菌目(Helotiales)的柔膜菌科(*Helotiaceae*)、肉座菌目(Hypocreales)的多虫夏草属(*Cordyceps*)、Coniochaetales 目的毛孢壳科(Coniochaetaceae)和油瓶霉属(*Lecythophora*)、格孢菌目(Pleosporales)的链格孢菌属(*Alternaria*)、座囊菌目(Dothideales)的穴壳菌科(Dothioraceae)、煤炱目(Capnodiales)的(*Devriesia*)、粪壳菌目(Sordariales)均属于子囊菌门(Ascomycota); 而被孢霉目(Mortierellales)的被孢霉属(*Mortierella*) 则属于接合菌门(Zygomycota)。克氏针茅草原土壤真菌群落主要包括子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)及接合菌门(Zygomycota), 而在大针茅和贝加尔针茅草原中均仅出现子囊菌门(Ascomycota)和担子菌门(Basidiomycota), 其中子囊菌门(Ascomycota)为 3 种针茅草原土壤真菌土壤真菌群落中的优势菌群。张俊忠等<sup>[18]</sup>研究发现东祁连山高寒草地土壤真菌主要为半知菌门和接合菌门真菌, 与本研究结果有所不同。分析原因为研究区域不同, 气候条件、植被组成及土壤养分状况差异较大, 可知不同地区的草地土壤真菌群落结构组成有具有差异性。3 种针茅草原土壤中克氏针茅草原土壤真菌群落结构组成较贝加尔针茅草原与大针茅草原种类丰富, 原因可能与土壤真菌其本身的生长适应特性有关, 并且可能与其所处的土壤环境、植物类群、植被状况、气候带特点等多种因素相关。

### 3 结论

呼伦贝尔 3 种典型针茅草原之间土壤真菌群落结构组成有明显差异(最大相似度仅为 61%)。克氏针茅草原土壤真菌群落主要有子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)和接合菌门(Zygomycota), 而在大针茅和贝加尔针茅草原中仅出现子囊菌门(Ascomycota)和担子菌门(Basidiomycota)。子囊菌门(Ascomycota)为 3 种针茅草原土壤真菌群落中的优势菌群。克氏针茅草原土壤真菌群落结构组成较贝加尔针茅草原与大针茅草原丰富, 形成这种差异的具体原因仍有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] 张于光, 张小全, 曲良建, 等. 土地利用变化对土壤真菌群落结构的影响. 生态学报, 2007, 27(10): 4325-4332



- [2] 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. 应用生态学报, 2004, 15(10): 1958-1962
- [3] 张文婷, 来航线, 王延平, 等. 黄土高原不同植被坡地土壤微生物区系特征. 生态学报, 2008, 28(9): 4229-4243
- [4] Anderson I C, Campbell C D, Prosser J I. Potential bias of fungal 18S and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. Environmental Microbiology, 2003, 5(1): 36-47
- [5] Anderson I C, Campbell CD, Prosser J I. Diversity of fungi in organic soils under a moorland - Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. Environmental Microbiology, 2003, 5(11): 1121-1132
- [6] 徐严. 诺尔盖高原湿地土壤真菌的初步研究. 四川: 四川农业大学, 2008
- [7] Hawksworth D L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research, 2001, 105(12): 1422-1432
- [8] Laforgue R, Guerin L, Pernelle J J, et al. Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(4): 1208-1218
- [9] Bridge P, Spooner B. Soil fungi: diversity and detection. Plant and Soil, 2001, 232(1/2): 147-154
- [10] Glen M, Tommerup I C, Bougher N L, et al. Specificity, sensitivity and discrimination of primers for PCR-RFLP of larger basidiomycetes and their applicability to identification of ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* forests and plantations. Mycological Research, 2001, 105(2): 138-149
- [11] Viaud M, Pasquier A, Brygoo Y. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. Mycological Research, 2000, 104(9): 1027-1032
- [12] 蒋景纯, 杨殿林. 呼伦贝尔草地产草量和营养物质含量动态研究. 中国草地学报, 1993, 2: 32-35
- [13] Ni J, Zhang X S. Climate variability, ecological gradient and the Northeast China Transect (NECT). Journal of Arid Environments, 2000, 46(3): 313-325
- [14] 鲍士旦. 土壤农化分析. 北京: 中国农业出版社, 2000: 30-83
- [15] 李正国, 付晓红, 邓伟, 等. 传统分离培养结合DGGE法检测榨菜腌制过程的细菌多样性. 微生物学通报, 2009, 36(3): 371-376
- [16] Anderson I C, Carney J W G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. Environmental Microbiology, 2004, 6(8): 769-779
- [17] Ranjard L, Poly F, Lata J C, et al. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(10): 4479-4487
- [18] 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. 草业学报, 2010, 16(2): 124-132