

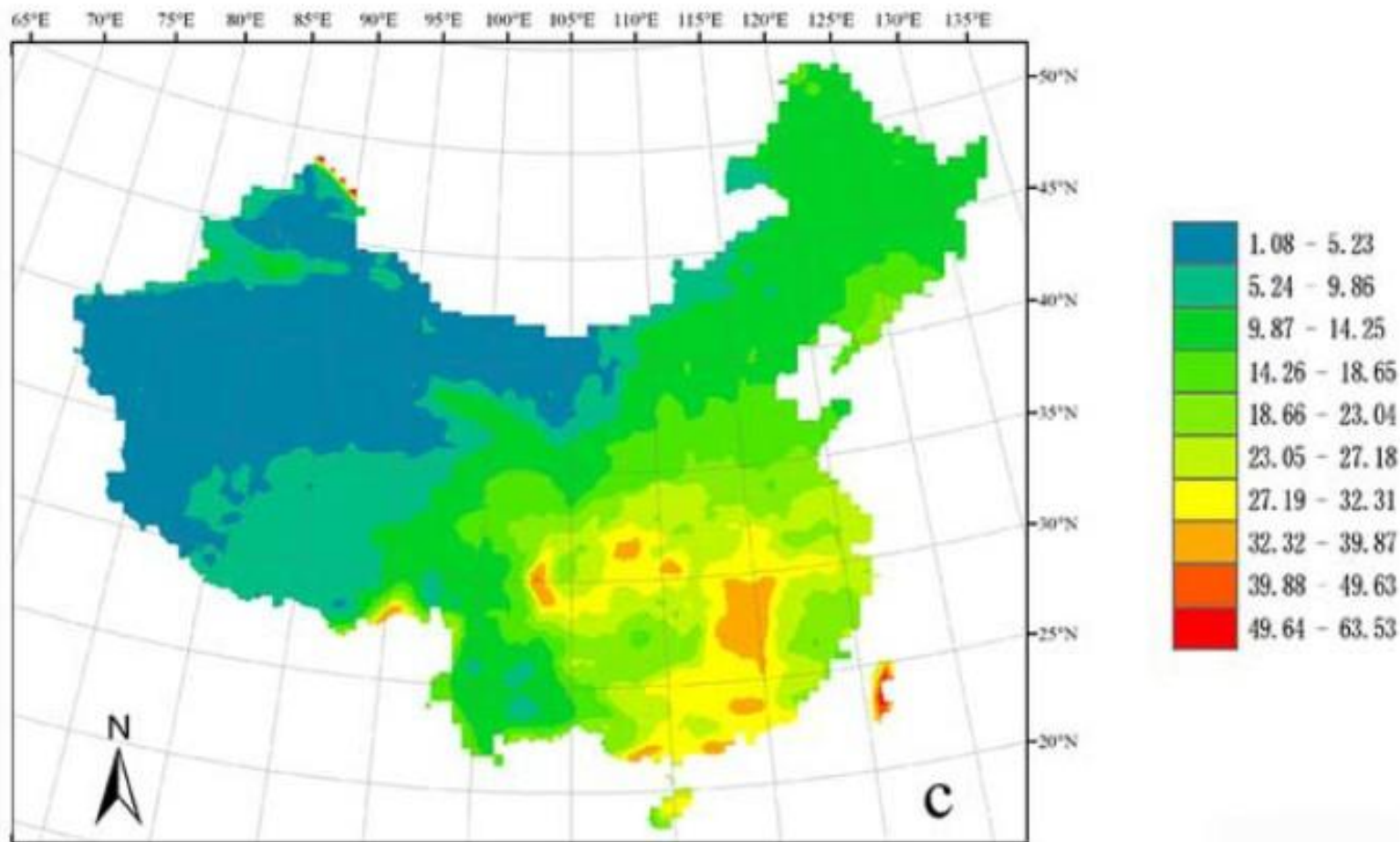


水、氮对森林土壤微生物种群结构多样性的影响

王 淼

中国科学院沈阳应用生态研究所
2011年10月

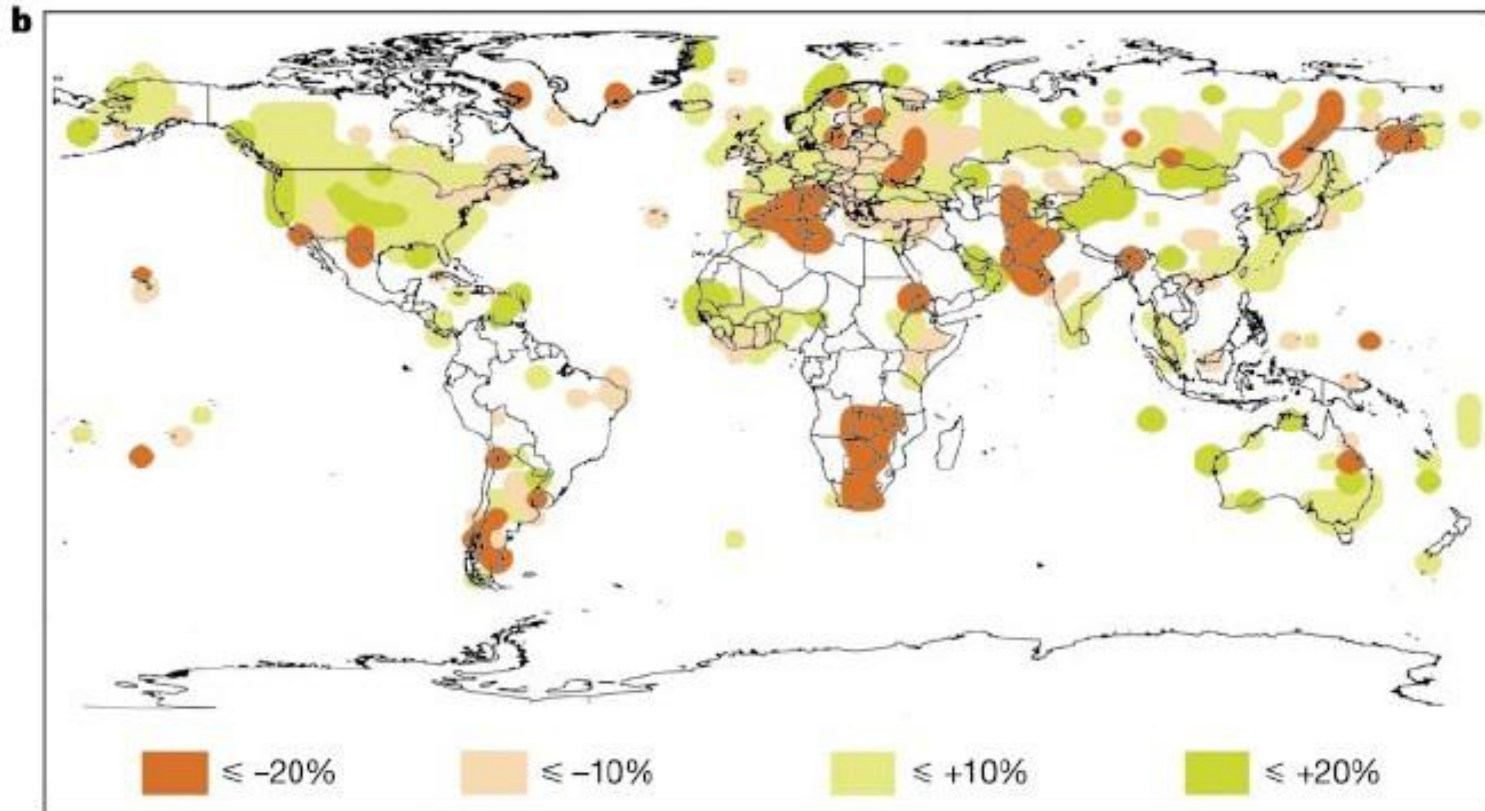
研究背景



Spatial patterns of nitrogen deposition throughout China
(the units are $\text{N ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$)

Lu and Tian et al., 2007

研究背景



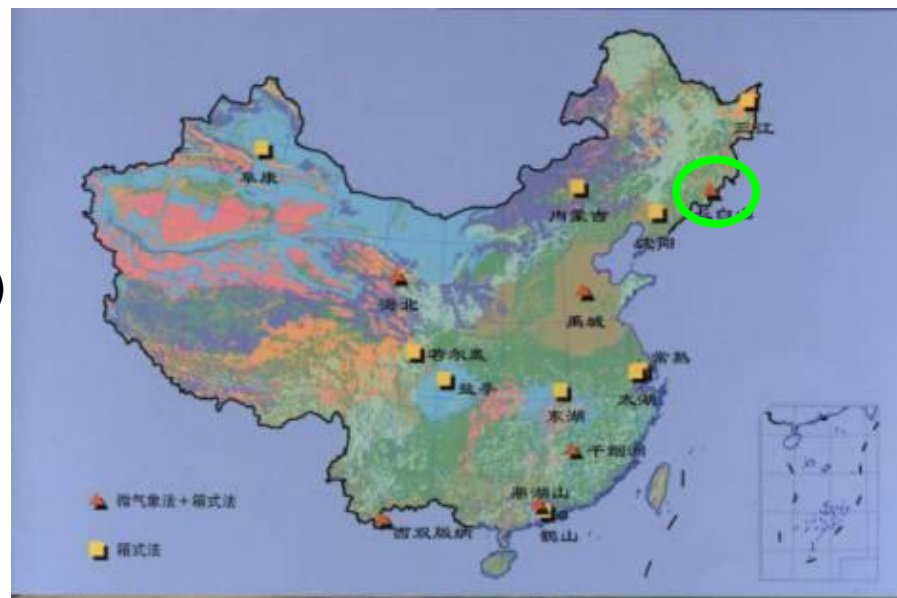
Spatial variability of annual trends in precipitation, precipitation (% per decade). Walther et al., 2002.

试验地点

观测位置：吉林省东南安图县二道白河镇
(42°24'N , 128°05'E, 海拔
761m)

林 分：天然阔叶红松林
红松(*Pinus koraiensis*)、
椴树(*Tilia amurensis*)、
蒙古栎(*Quercus mongolica*)
水曲柳(*Fraxinus
mandshurica*)、
色木(*Acer mimo*)

气 候：年平均温度为3.6℃.
年平均降水量为713mm.





实验设计

实验材料：水曲柳，红松；

处 理：3个水处理，2个氮处理，共12处理；

栽培方式：控制实验；

水氮处理：2006年5月开始，每年5月和7月分两次进行施氮处理，每次按 5 g N m^{-2} , i.e. $54.86 \text{ g NH}_4\text{NO}_3$ 施氮量进行。

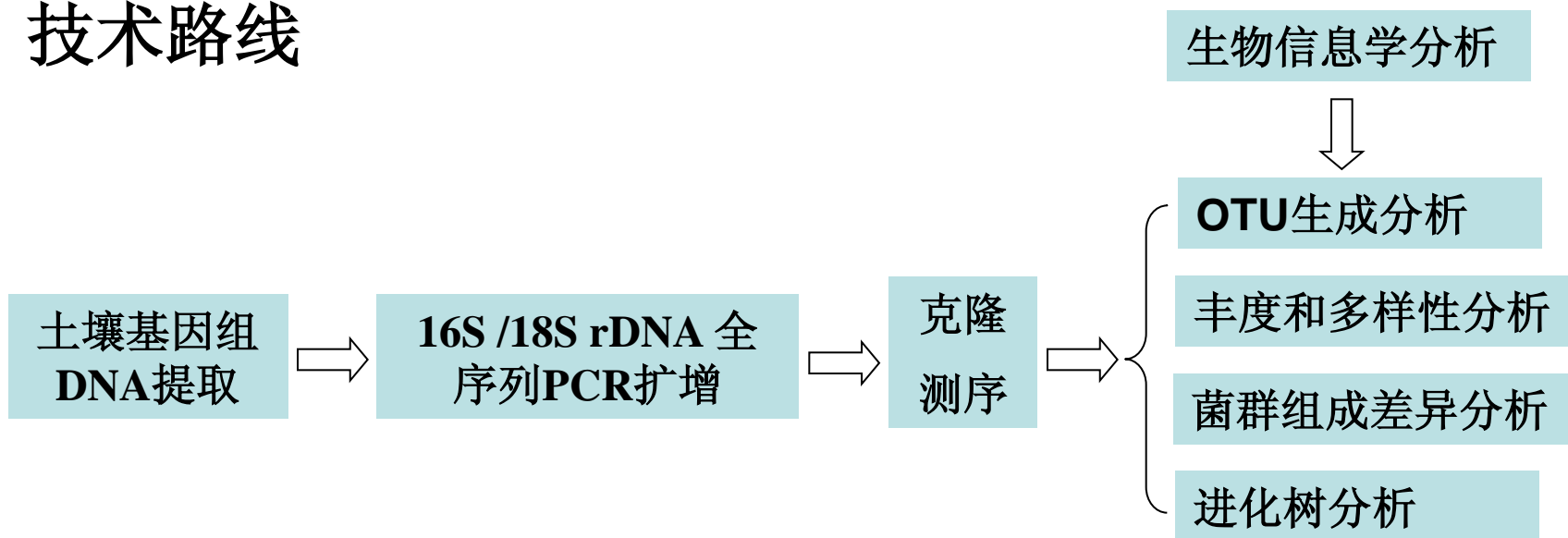
水分处理 +30%，对照，-30%；

两个海拔高度 740、1200米。



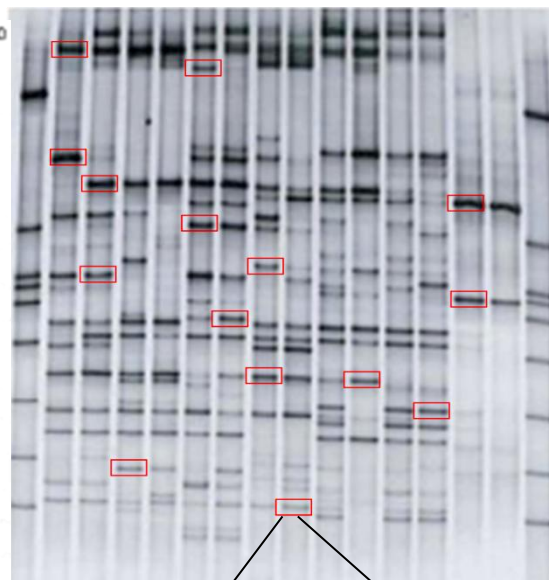
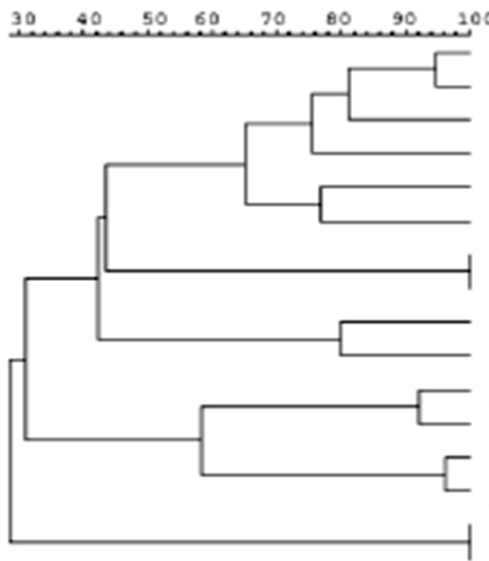
三个水分处理 +30% 对照和-30%

技术路线



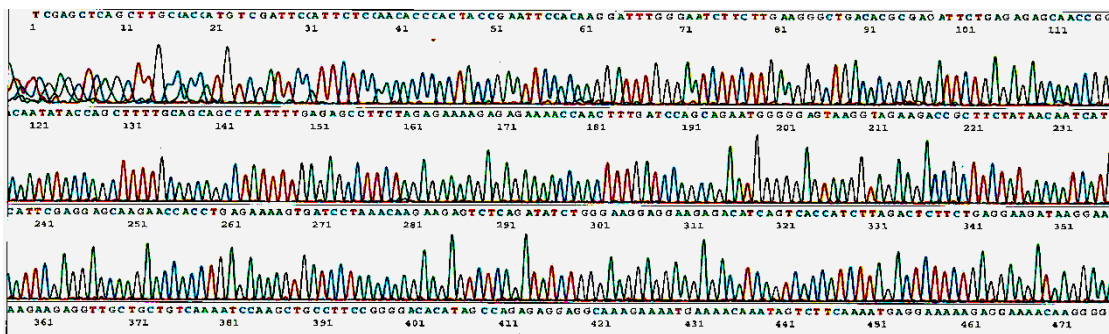
DGGE分析

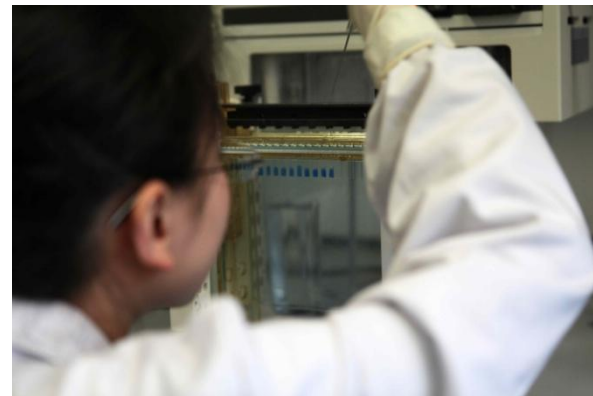
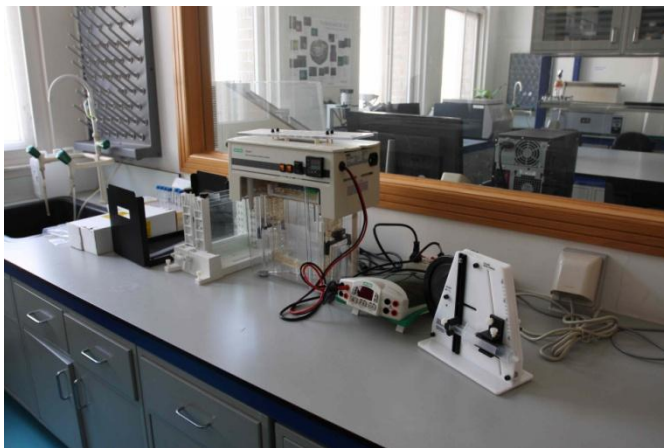
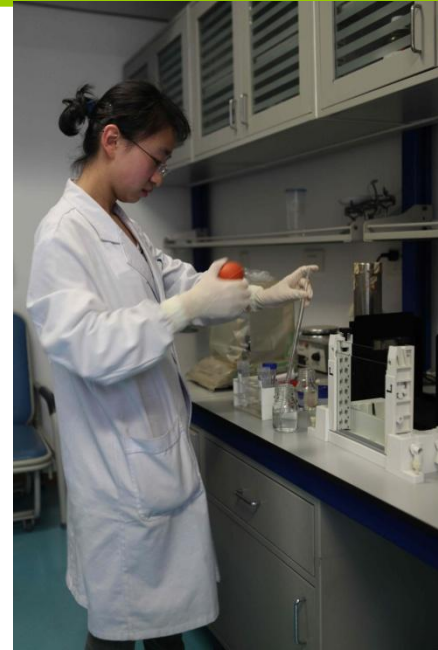
提取土壤总DNA

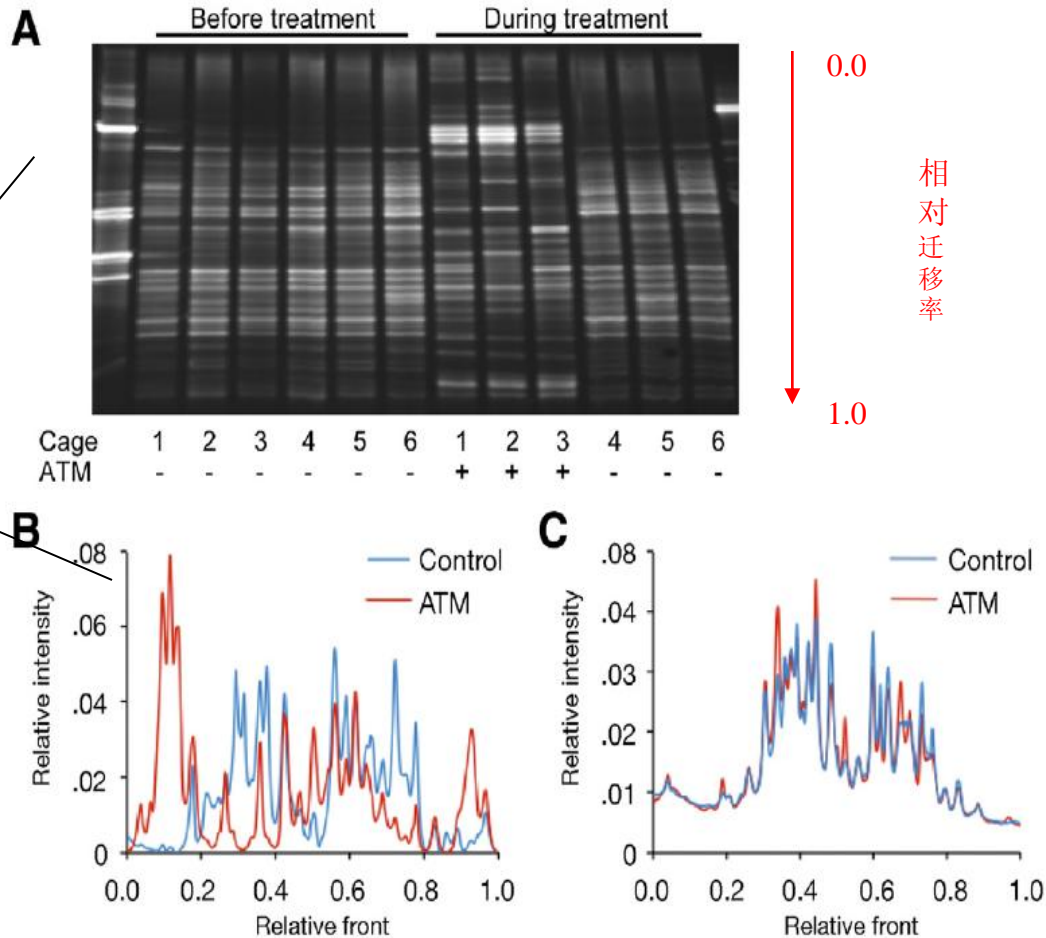


土壤微生物生态结构
组成研究方法

切胶测序确定真菌或细菌种类







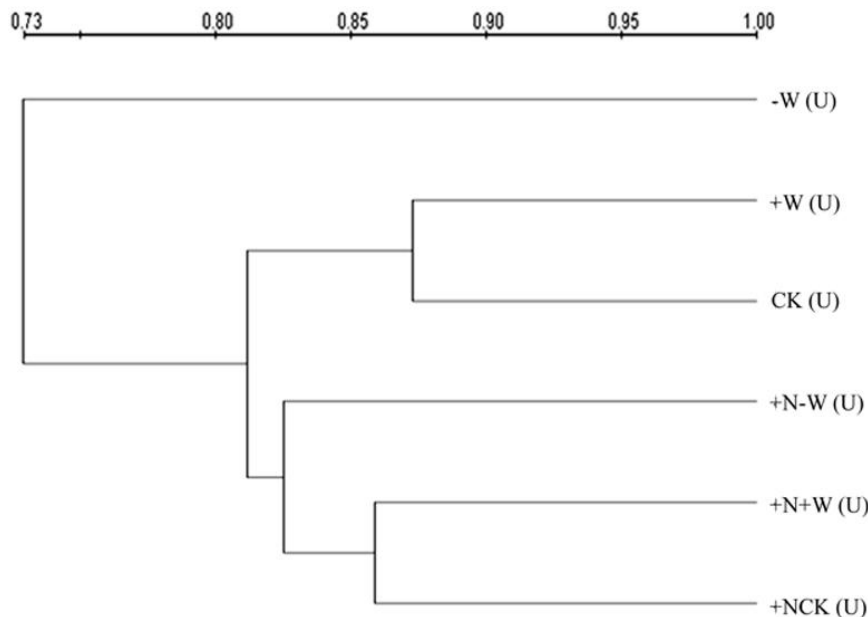
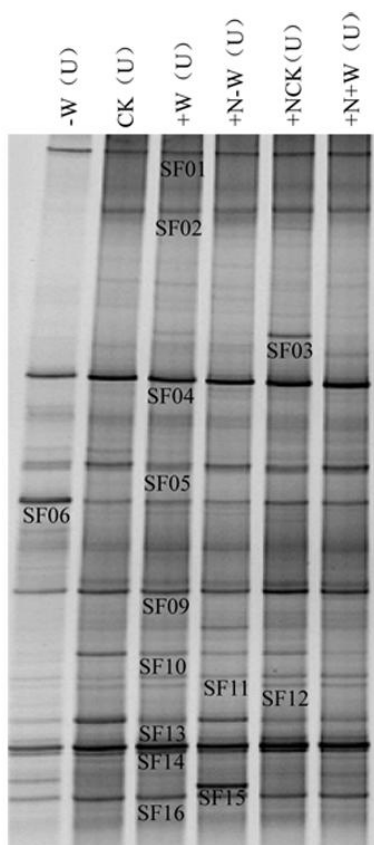
A图中每条带的相对丰度在B图中用一个点的数值表示

该图中用的是每组中每条带的平均值

应用QuantityOne软件对DGGE条带灰度定量分析，确定土壤真菌种群组成(丰度)的改变。Y轴真菌种群相对丰度以DGGE条带占该泳道(群体)总灰度的百分率表示，X轴相对迁移率表示每条带迁移距离，即相对位置。

(一) 水、氮对水曲柳根际土壤真菌菌群的影响

山上地区(1200 m)



加水(+W):

87%相似性
影响较小

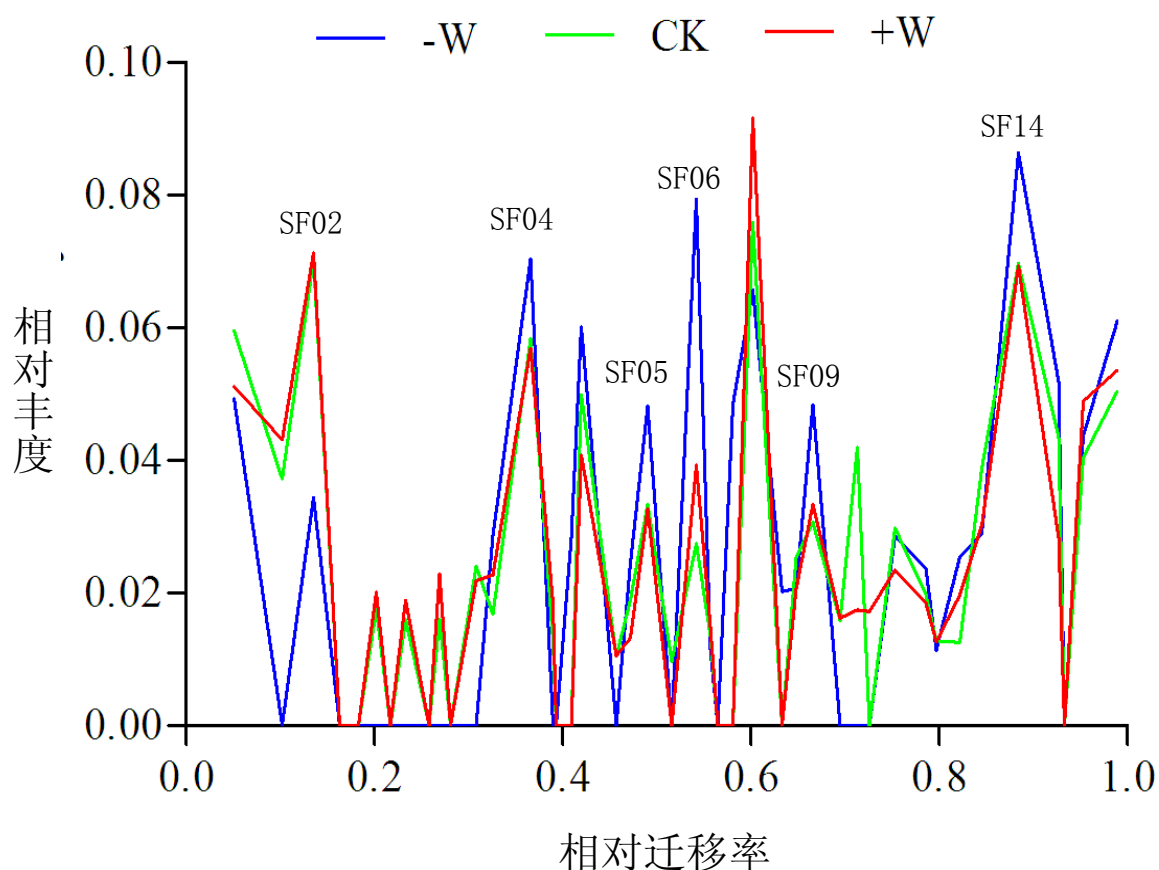
减水(-W):

真菌多样性明显降低

加氮(+N):

真菌多样性有增加
部分抵消减水的影响

单独水处理土壤真菌组成改变



减水(-W)

真菌群体组成变化明显
多种优势真菌丰度明显改变

增加:

接合糖酵母菌 (SF04)
小孢蛙粪霉菌 (SF05)
库氏克鲁维酵母菌 (SF06)
小皮伞菌 (SF09)
漆斑菌 (SF14)

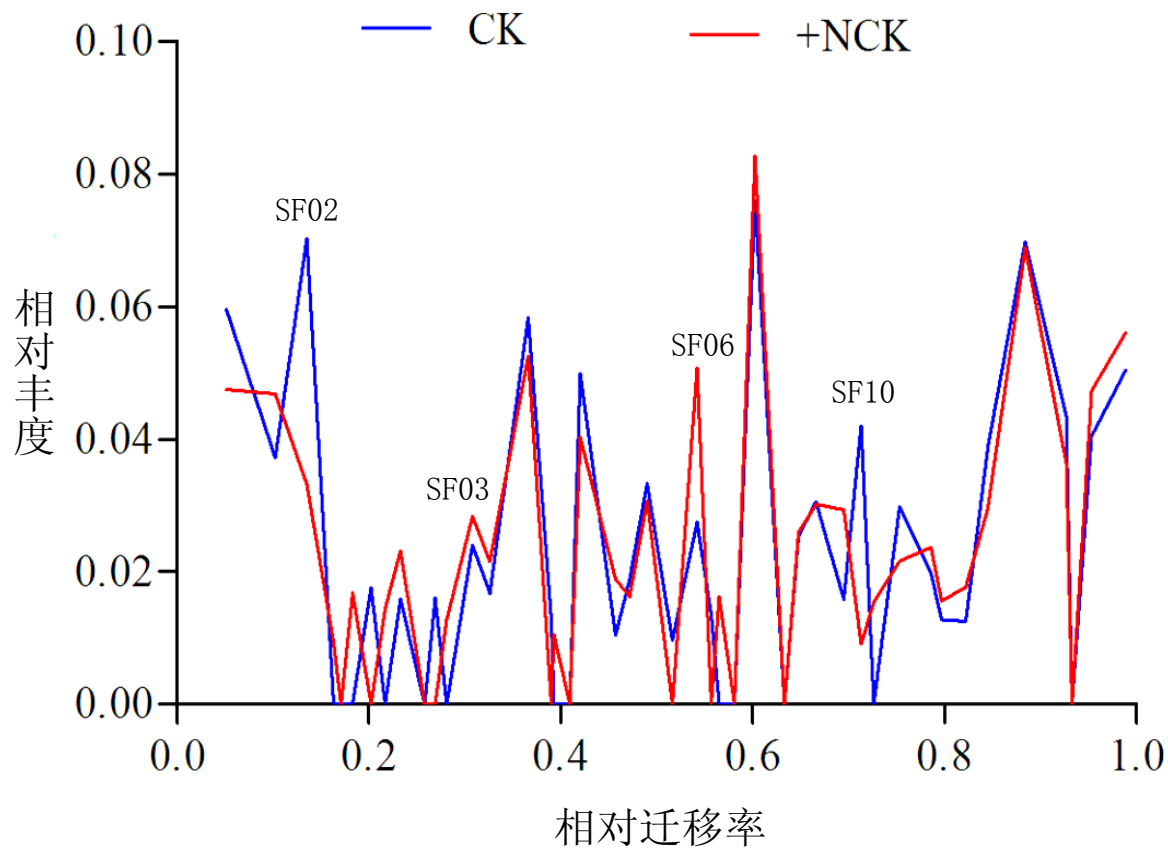
减少:

耳霉菌 (SF02)

加水(+W)

红色和绿色线条几乎重叠
真菌群体组成变化较小
真菌丰度无明显改变

施氮处理土壤真菌丰度改变



施氮处理(+NCK)

真菌群体组成变化明显
多种优势真菌发生改变

增加:

木霉菌(SF03)

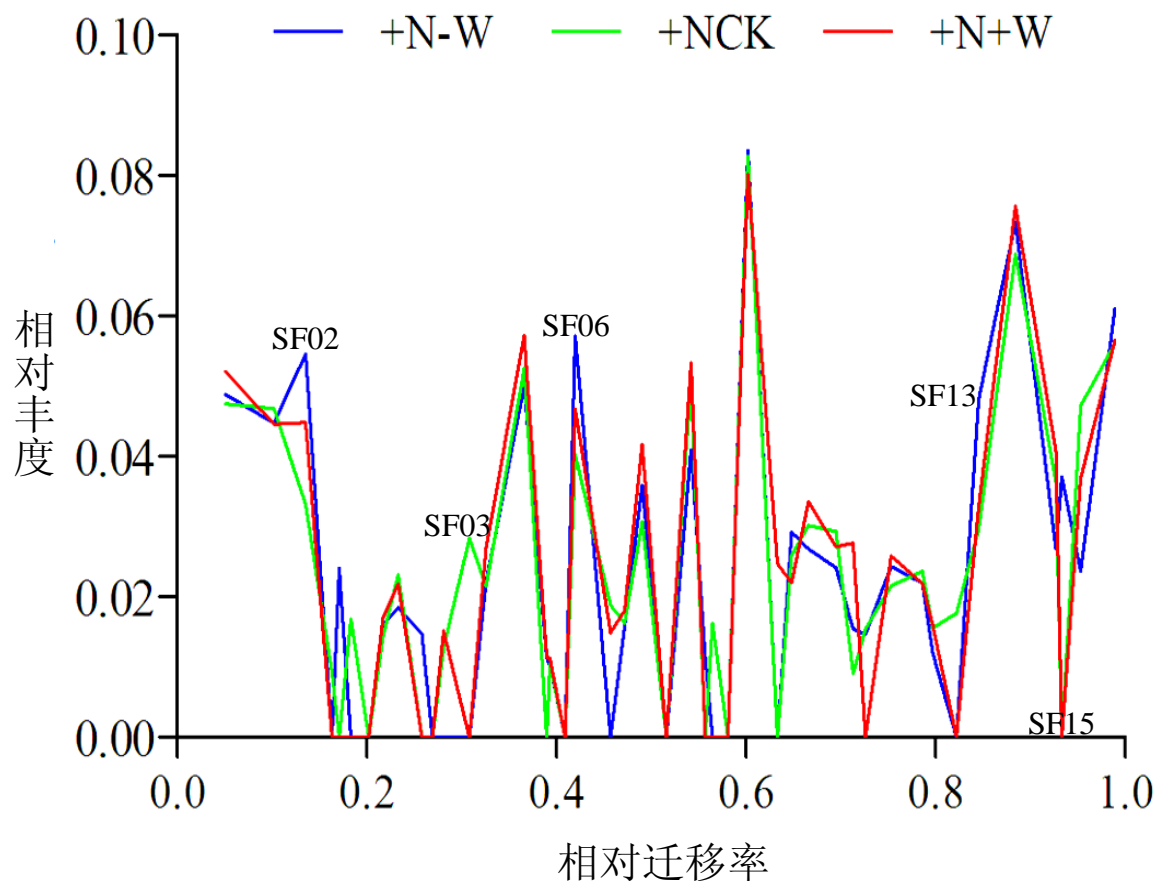
库氏克鲁维酵母菌(SF06)

减少:

耳霉菌(SF02)

粪壳菌(SF10)

氮、水分联合处理土壤真菌变化



加氮减水(+N-W):

多种优势真菌丰度改变

增加:

耳霉菌 (SF02)

库氏克鲁维酵母菌 (SF06)

娄德罗菌 (SF13)

灰葡萄孢霉 (SF15)

减少:

木霉菌 (SF03)

加氮增水(+N+W):

变化不明显

木霉菌 (SF03) 丰度降低

山下水曲柳根际土壤真菌DGGE

山下地区(740 m)

加水(+W):

相似性82%

影响较小

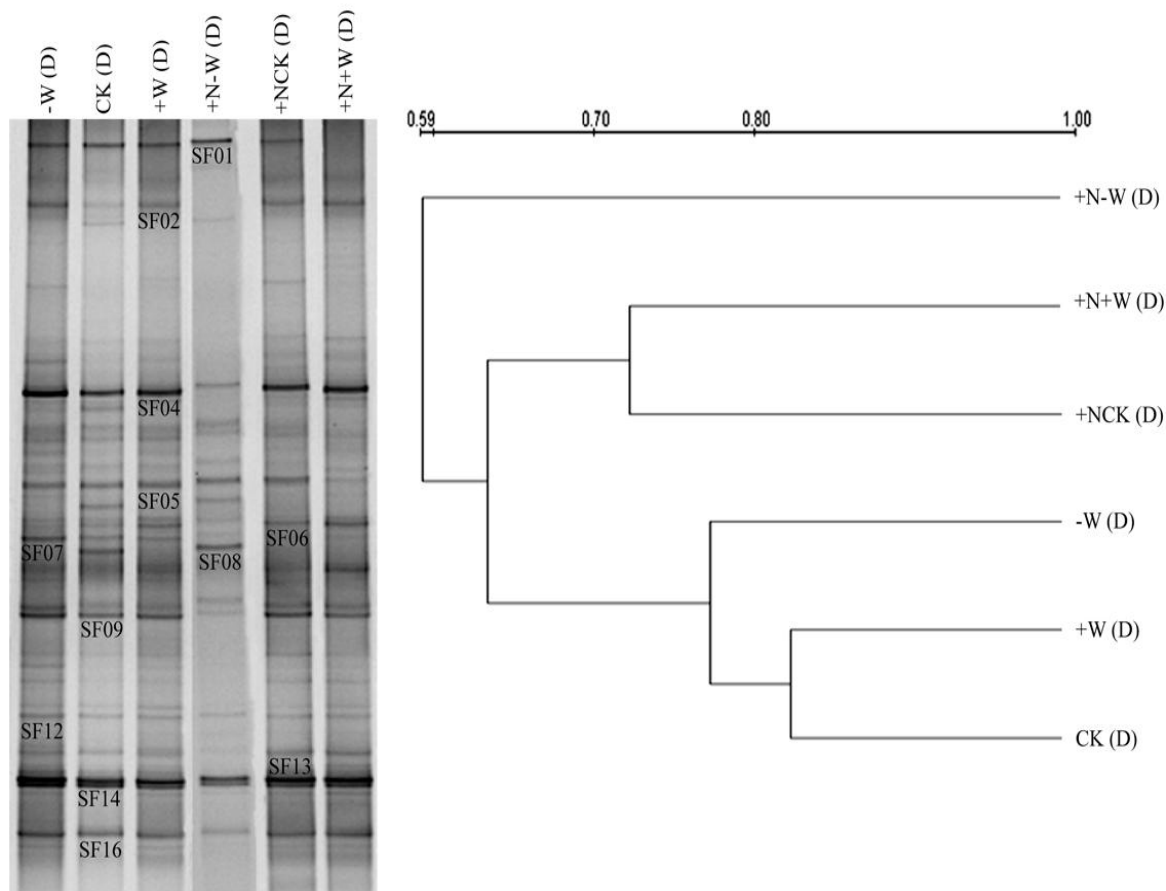
减水(-W):

真菌多样性降低

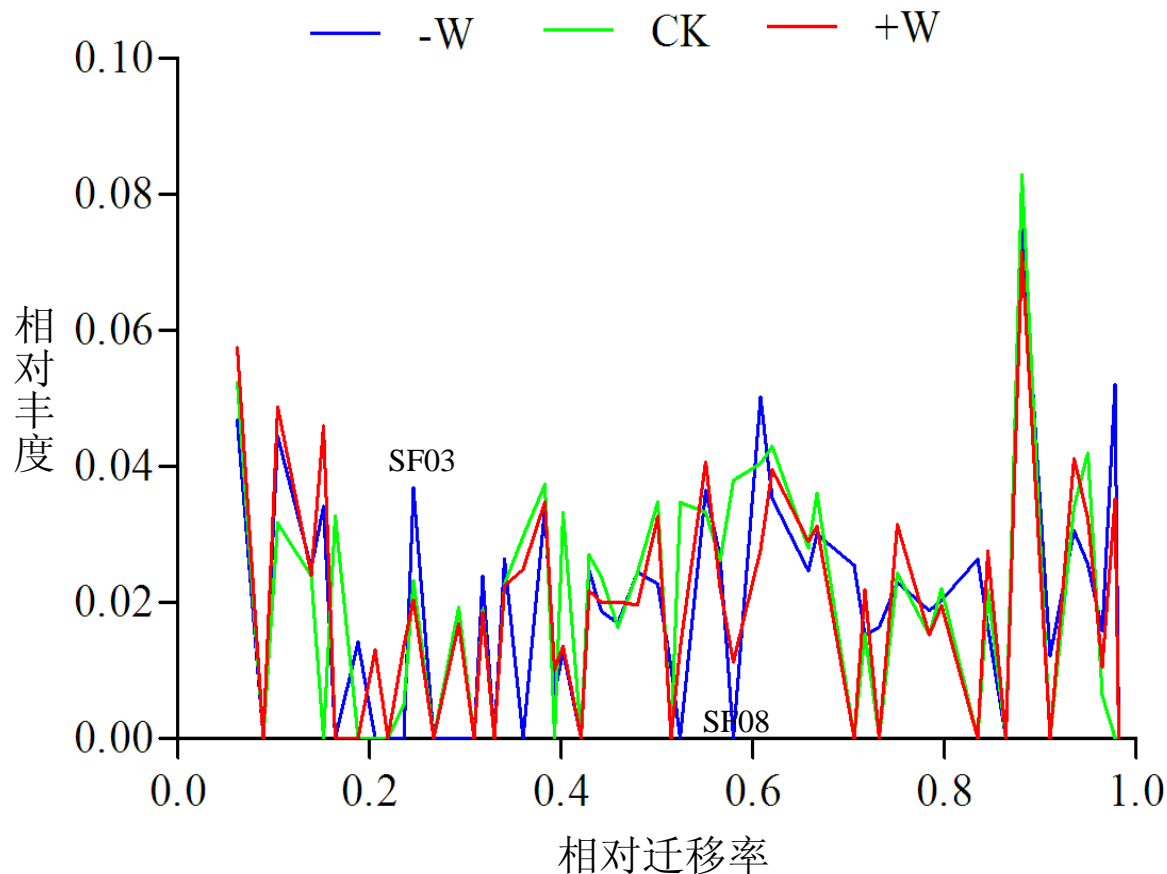
加氮减水(+N-W):

相似性59%

对真菌菌群影响大



山下单独水处理土壤真菌组成变化



减水(-W)

真菌群体组成发生改变
优势真菌丰度明显改变

增加:

木霉菌(SF03)

减少:

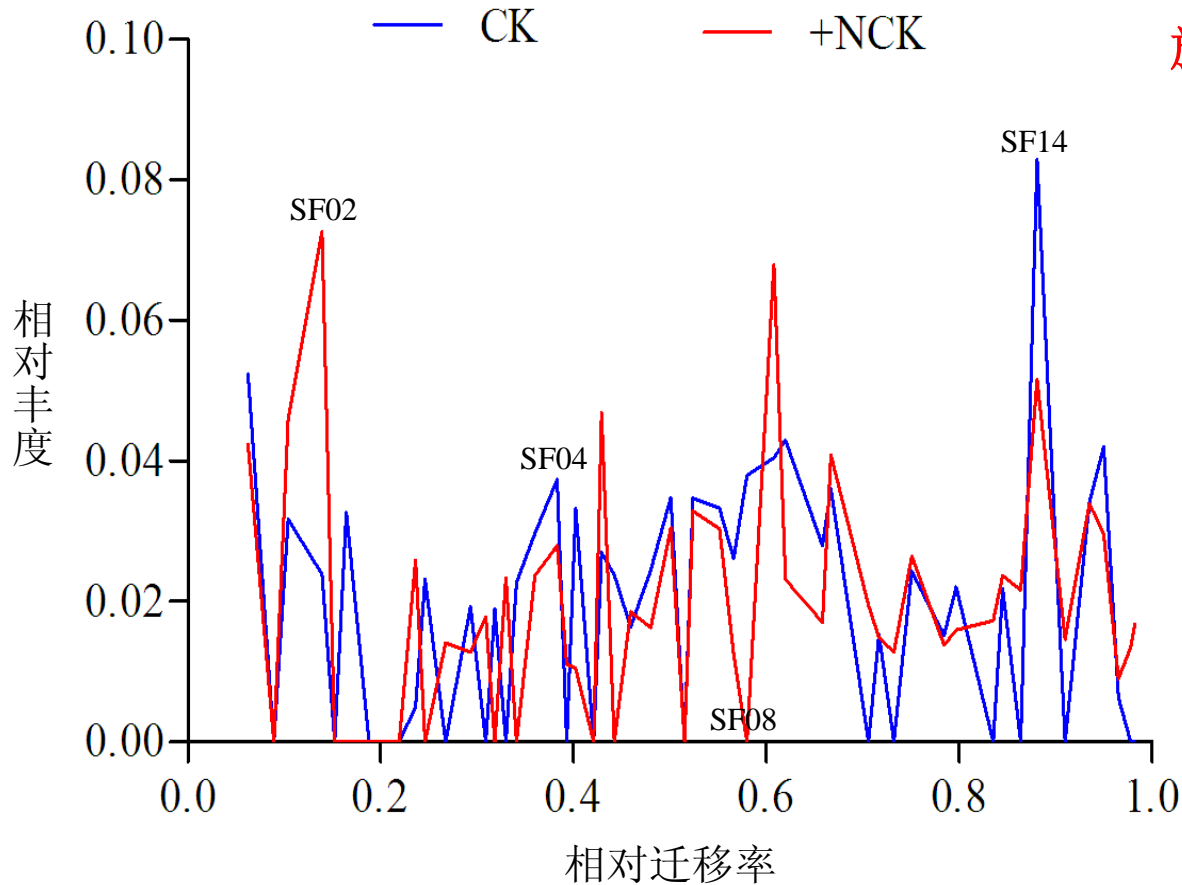
马尔菲青霉菌(SF08)

加水(+W)

与山上结果相似

真菌丰度无明显改变

山下加氮处理土壤真菌丰度改变



施氮处理(+NCK)

真菌群体组成明显改变
4种优势真菌丰度明显改变

增加:

耳霉菌 (SF02)

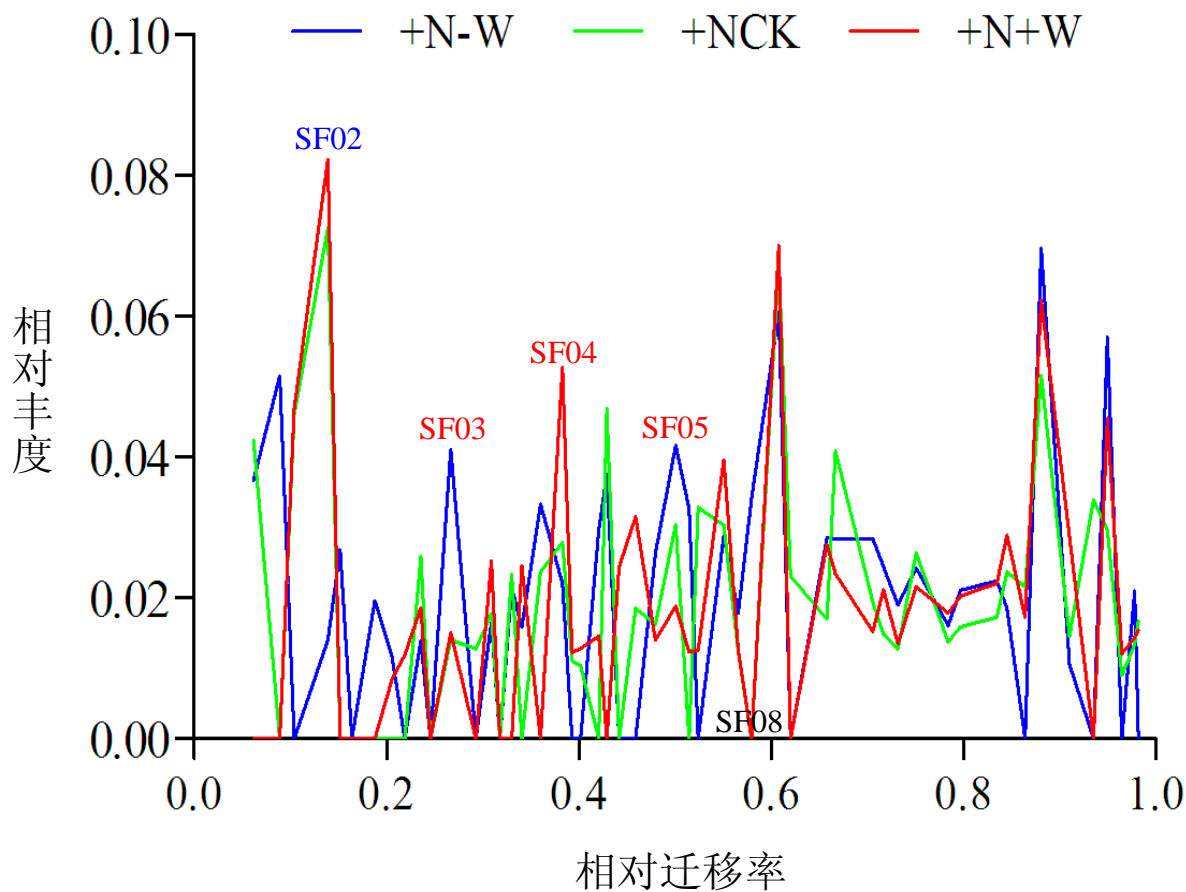
减少:

漆斑菌 (SF14)

接合糖酵母菌 (SF04)

马尔菲青霉菌 (SF08)

氮、水分联合处理山下土壤真菌改变



加氮减水(+N-W)

多种优势真菌丰度改变

增加:

小孢蛙粪霉菌(SF05)

马尔菲青霉菌(SF08)

减少:

耳霉菌(SF02)

加氮增水(+N+W)

变化不明显

增加:

接合糖酵母菌(SF04)

DNA测序/BLAST确定优势真菌种类

Clone	Species	Strain	Genbank accession	Similarity(%)
SF01	<i>Rhizophlyctis rosea</i>	JEL 318	NG_017175	96
SF02	<i>Conidiobolus lamprauges</i>	BLDCL-03	GQ478281	97
SF03	<i>Trichoderma reesei</i>	QM6a	AAIL02000032	99
SF04	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	NRRL Y-229	AY046251	97
SF05	<i>Basidiobolus microsporus</i>	ARSEF265	AF368505	97
SF06	<i>Lachancea kluyveri</i>	NRRL Y-12651	AACE03000034	97
SF07	<i>Kluyveromyces aestuarii</i>	ATCC 18862	AEAS01000266	99
SF08	<i>Penicillium marneffei</i>	ATCC 18224	ABAR01000103	98
SF09	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	DIS71	AY916739	98
SF10	<i>Sordaria fimicola</i>	MUCL 937	X69851	96
SF11	<i>Chaetomium globosum</i>	IFO 6310	AB048285	97
SF12	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	CBS 110109	EU754076	98
SF13	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	G3	EF120591	99
SF14	<i>Myrothecium cinctum</i>	ATCC 22270	AY489678	97
SF15	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	AFTOL-ID 59	AY544695	98
SF16	<i>Verticillium dahliae</i>	CA9	AB585938	97

DNA测序聚类分析结果

16个优势条带测序

Ascomycota(子囊菌纲): 12

Pezizomycotina: 6

Saccharomycotina: 6

Basidiomycota (担子菌纲): 2

其它: 2

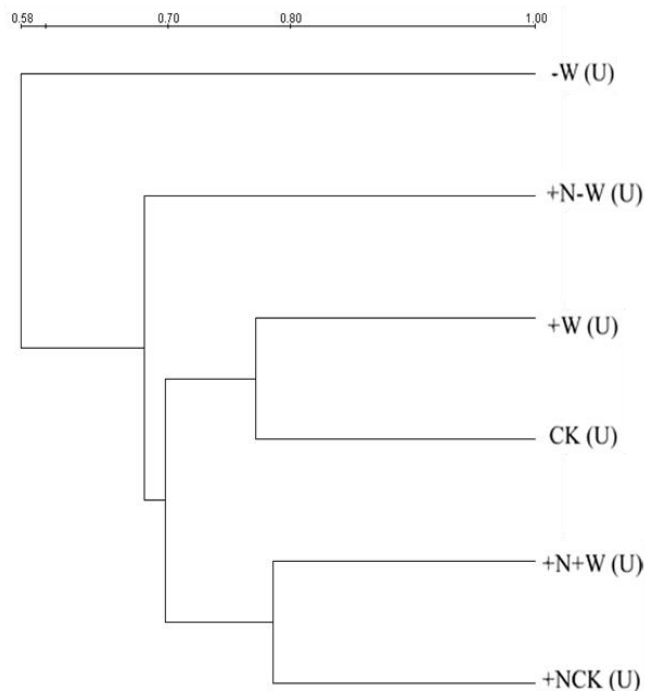
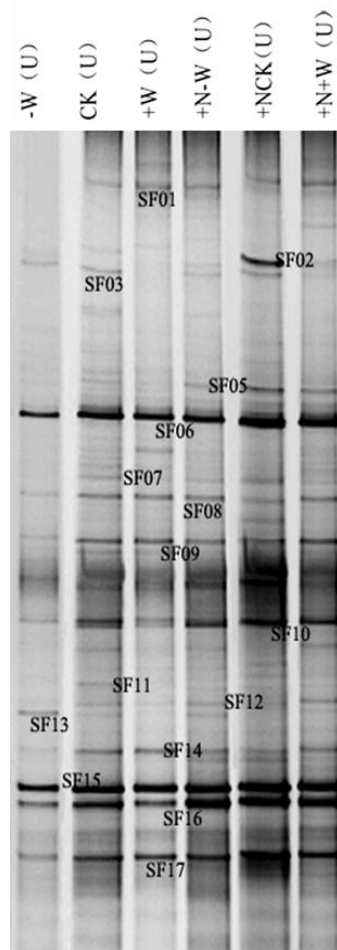


结论

- 土壤水分减少（减水）可降低水曲柳根际土壤真菌多样性，可明显改变真菌菌群结构组成
- 土壤水分增加对土壤真菌群体影响不大（相似性>80%）
- 加氮处理对土壤真菌多样性无明显影响，但可改变土壤优势真菌的丰度（含量）
- 不同海拔土壤真菌群体对加氮处理的响应不同，发生改变的优势真菌种类不同
 - 山上变化种类：木霉菌、库氏克鲁维酵母菌、耳霉菌、粪壳菌
 - 山下变化种类：耳霉菌、漆斑菌、接合糖酵母菌、马尔菲青霉菌
- 土壤温度可能为影响土壤真菌结构的又一重要因子
- 与单独施N处理相比，增水处理（增水加氮联合）不加重氮对土壤真菌的改变作用
- 减水加氮对真菌菌群影响最为显著

(二) 红松根际土壤真菌菌群变化

山上红松根际土壤真菌DGGE图谱



加水(+W):

相似性77%

减水(-W):

真菌多样性明显降低
相似性仅56%

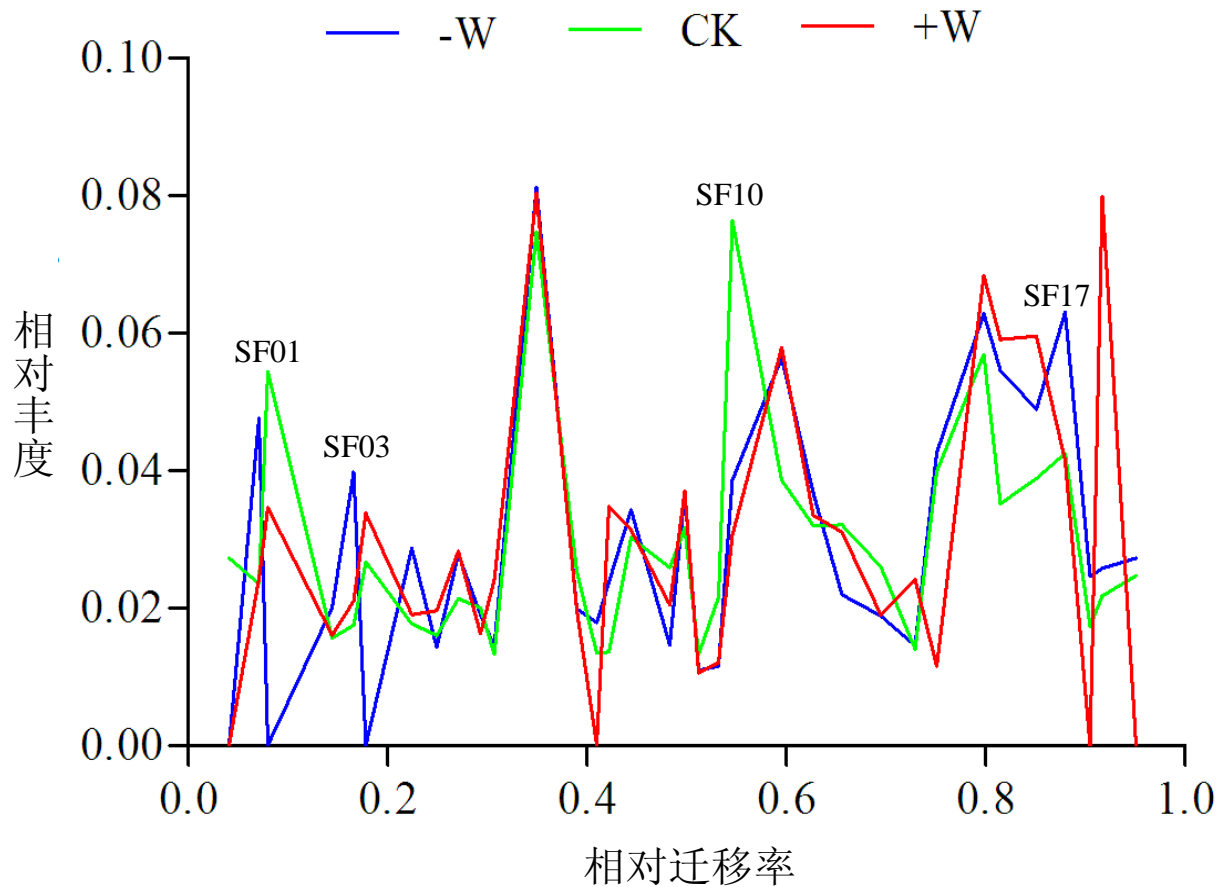
加氮(+N):

真菌多样性有增加
部分抵消减水的影响

水、氮处理对土壤真菌菌群作用:

与山上水曲柳结果相似

水处理红松土壤真菌组成变化



减水处理(-W)

对真菌菌群影响较大

丰度增加:

多孢壶菌(SF03)

丰度降低:

小皮伞菌(SF10)

哈德壶菌(SF01)

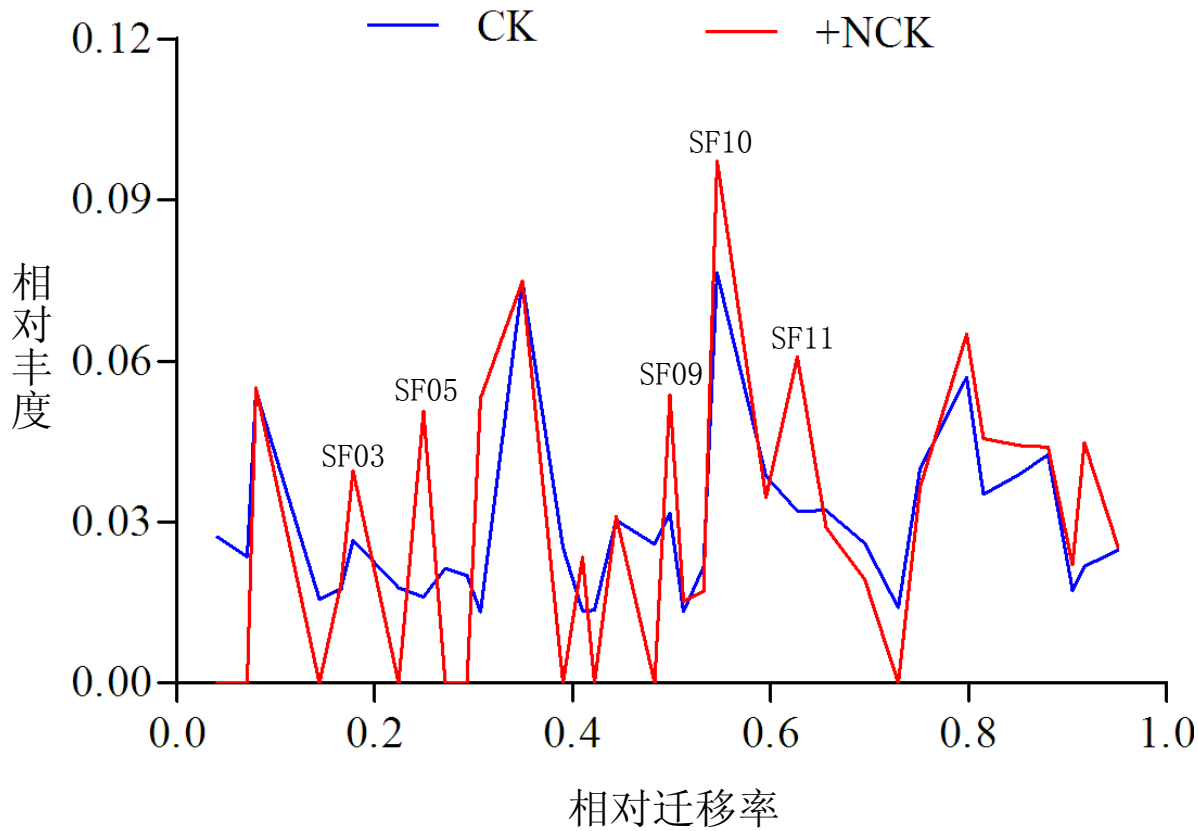
轮枝孢菌(SF17)

加水(+W)

与水曲柳结果相似

真菌丰度变化较小

氮添加处理作用



加氮(+NCK)

真菌群体组成明显改变
5种真菌丰度明显增加
包括:

多孢壶菌(SF03)

被孢霉菌(SF05)

库氏克鲁维酵母菌(SF09)

小皮伞菌(SF10)

粪壳菌(SF11)

氮、水分联合处理土壤真菌丰度改变

加氮减水 (+N-W)

多种优势真菌丰度改变

增加:

- 被孢霉 (SF02)
- 小皮伞菌 (SF10)
- 黑毛菌 (SF12)
- 诺得子囊菌 (SF13)
- 轮枝孢菌 (SF17)

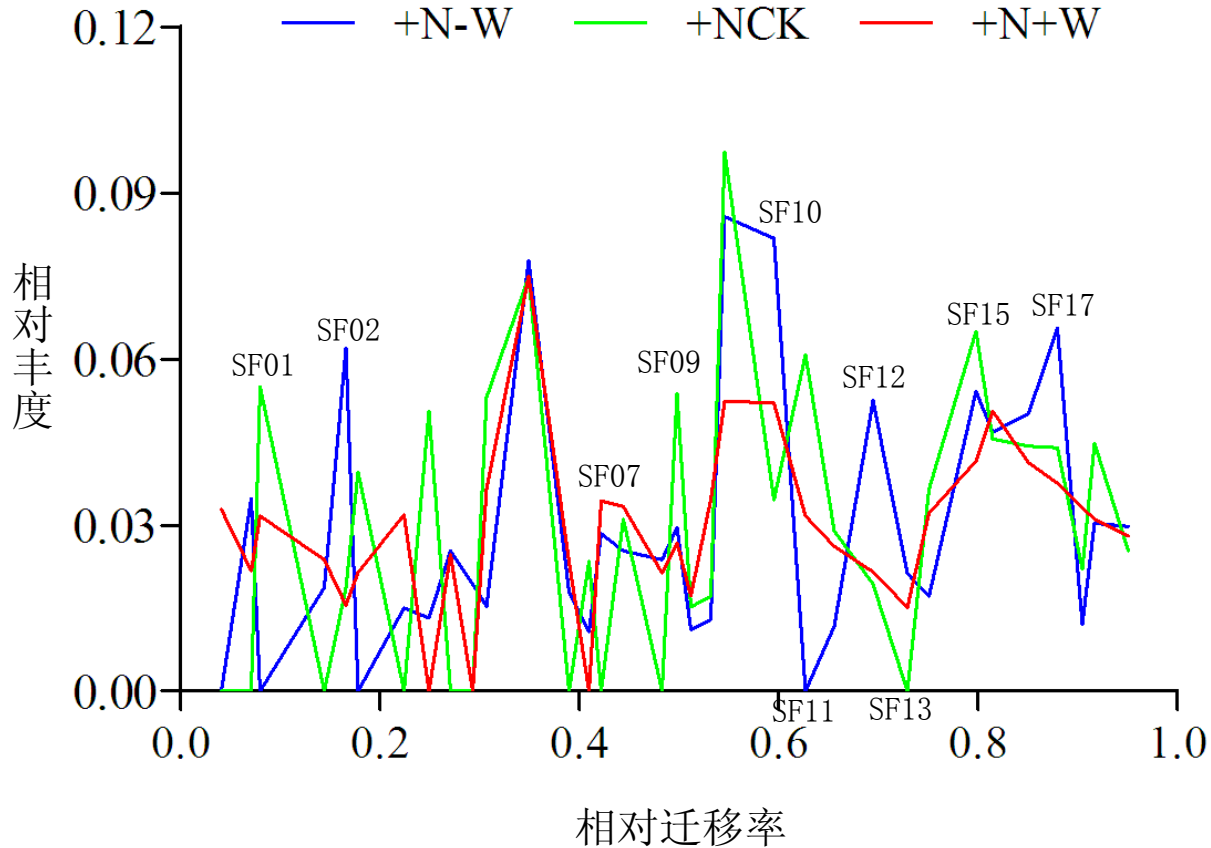
减少:

- 哈德壶菌 (SF01)
- 库氏克鲁维酵母菌 (SF09)
- 粪壳菌 (SF11)
- 漆斑菌 (SF15)

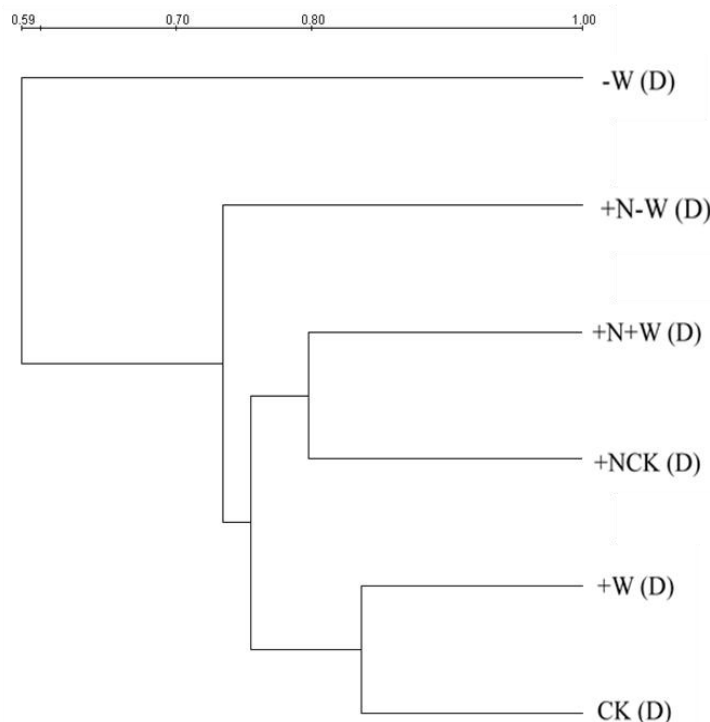
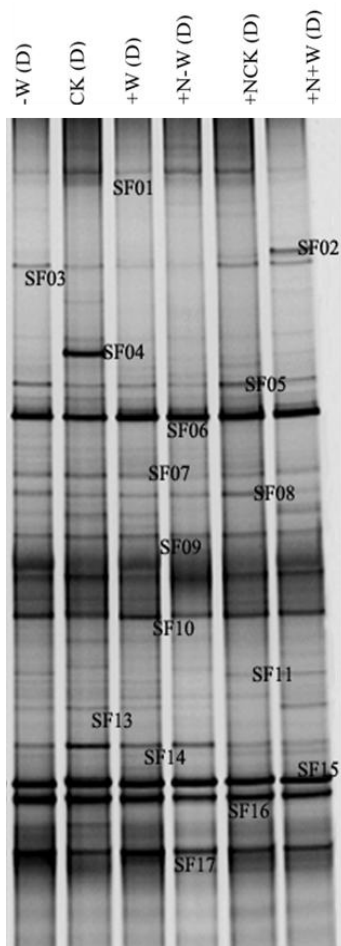
加氮增水 (+N+W)

变化不明显

- 赤霉菌 (SF07) 和子囊菌 (SF13)
- 丰度增加



山下红松根际土壤真菌DGGE分析



加水(+W):

相似性82%

减水(-W):

真菌多样性稍有降低
菌群结构变化最大
相似性仅56%

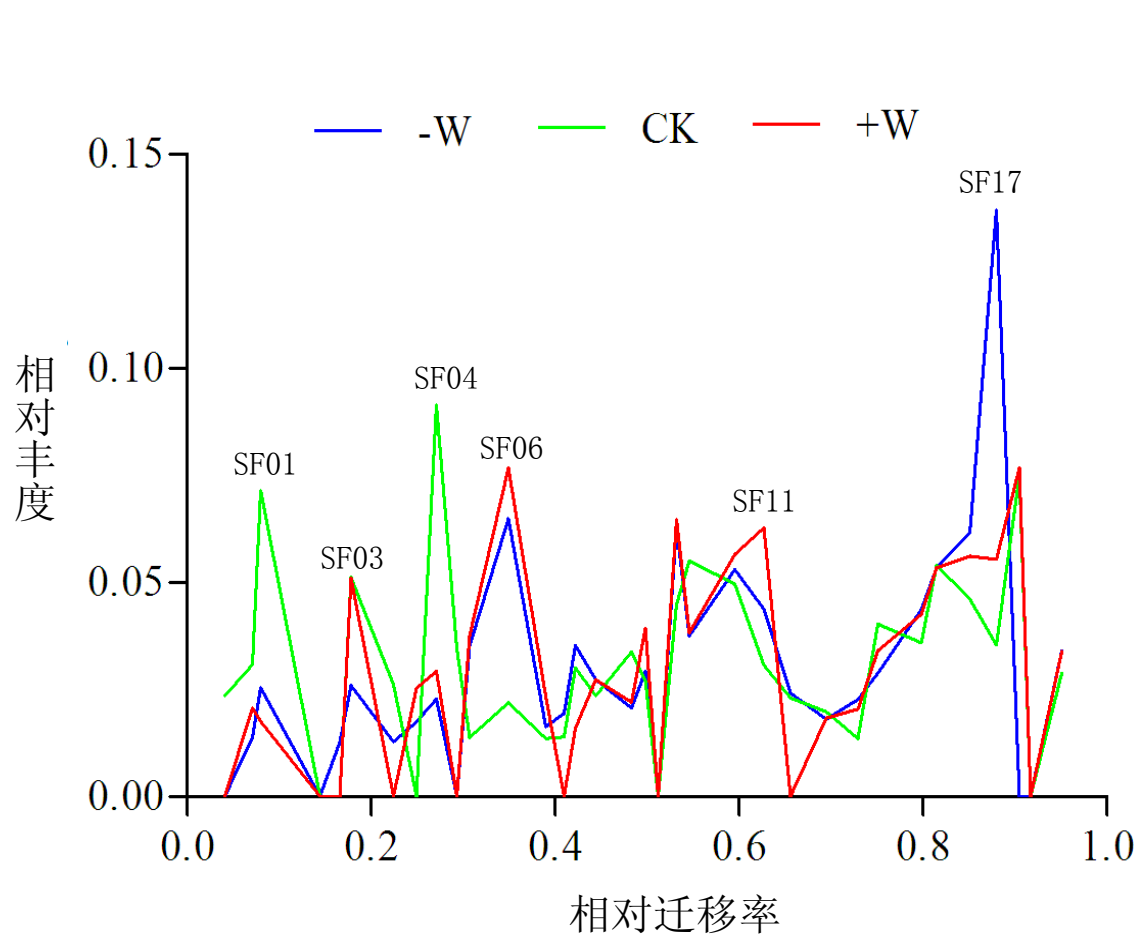
加氮(+N):

真菌多样性有增加
部分抵消减水的影响

水、氮处理对土壤真菌菌群作用:

与山下水曲柳结果基本一致

水处理对山下红松根际土壤真菌组成的影响



減水处理(-W)

菌群组成明显改变

增加:

轮枝孢菌 (SF17)

接合糖酵母菌 (SF06)

粪壳菌 (SF11)

减少:

哈德壶菌 (SF01)

多孢壶菌 (SF03)

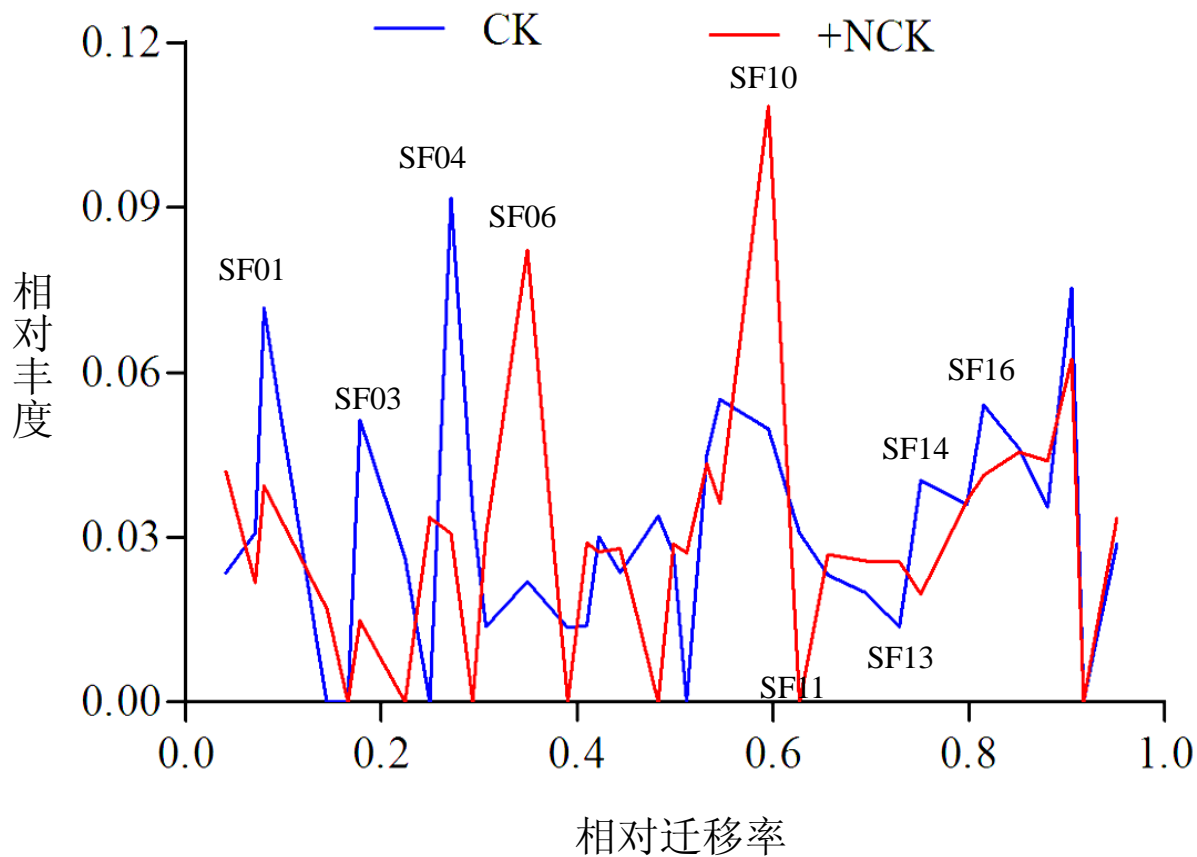
木霉菌 (SF04)

加水(+W)

与山上结果相似

真菌丰度无明显改变

N添加山下红松根际土壤真菌组成的改变



加氮(+NCK)

真菌菌群结构明显改变

增加:

接合糖酵母菌(SF06)

小皮伞菌(SF10)

诺得子囊菌(SF13)

减少:

哈德壶菌(SF01)

多孢壶菌(SF03)

木霉菌(SF04)

粪壳菌(SF11)

娄德罗菌(SF14)

氮、水耦合作用对红松根际真菌组成的影响

加氮减水(+N-W)

多种优势真菌丰度改变

增加:

多孢壶菌(SF03)

粪壳菌(SF11)

减少:

小皮伞菌(SF10)

加氮增水(+N+W):

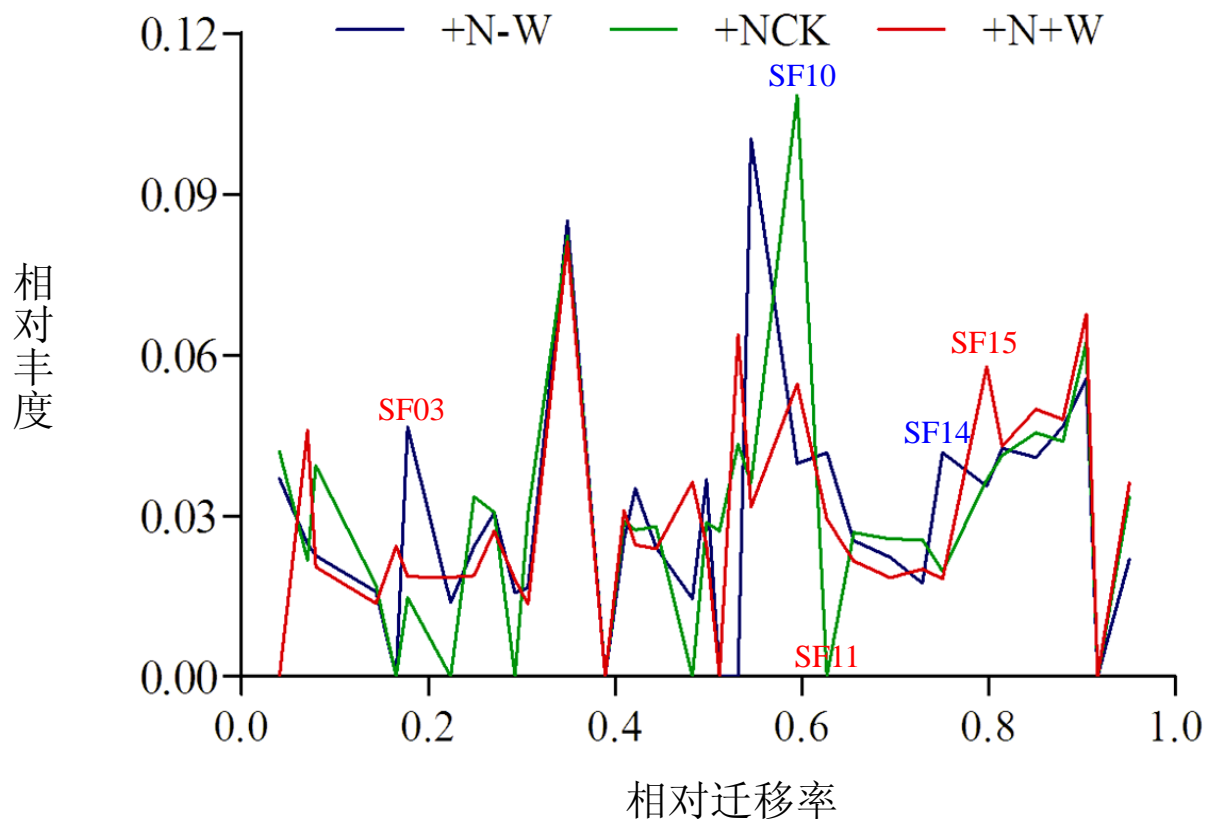
增加:

漆斑菌(SF15)

减少:

小皮伞菌(SF10)

其他真菌无显著改变



红松根际土壤优势真菌18S rDNA测序结果

Clone	Species	Strain	Genbank accession	Similarity(%)
SF01	<i>Rhizophlyctis rosea</i>	JEL 318	NG_017175	96
SF02	<i>Mortierella sp.</i>	CO-21	AB521052	96
SF03	<i>Chytridium polysiphoniae</i>	Pyl IR	AY032608	96
SF04	<i>Trichoderma reesei</i>	QM6a	AAIL02000032	99
SF05	<i>Mortierella chlamydospora</i>	NRRL2769	AF157143	97
SF06	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	NRRL Y-229	AY046251	97
SF07	<i>Gibberella pulcaris</i>	ICMP15495	EU490257	98
SF08	<i>Basidiobolus microsporus</i>	ARSEF265	AF368505	97
SF09	<i>Lachancea kluyveri</i>	NRRL Y-12651	AACE03000034	97
SF10	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	DIS71	AY916739	98
SF11	<i>Sordaria fimicola</i>	MUCL 937	X69851	96
SF12	<i>Chaetomium globosum</i>	IFO 6310	AB048285	97
SF13	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	CBS 110109	EU754076	98
SF14	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	G3	EF120591	99
SF15	<i>Myrothecium cinctum</i>	ATCC 22270	AY489678	97
SF16	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	AFTOL-ID 59	AY544695	98
SF17	<i>Verticillium dahliae</i>	CA9	AB585938	97

红松土壤真菌DNA测序聚类分析结果

17个优势条带测序

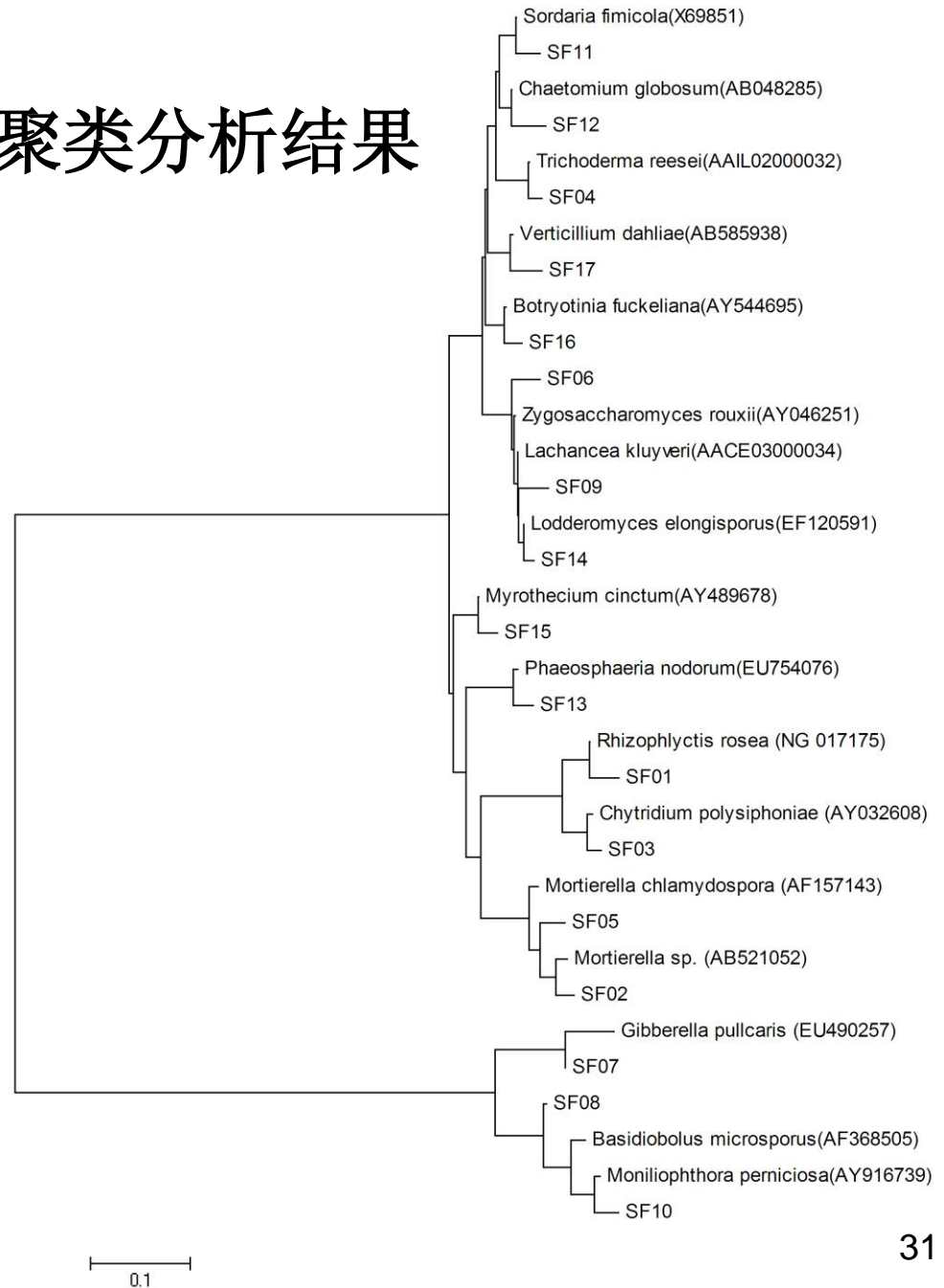
Ascomycota(子囊菌纲): 10

Pezizomycotina: 5

Saccharomycotina: 5

Basidiomycota (担子菌纲): 3

其它: 4



结 论

- 与水曲柳相似，减水可降低红松土壤真菌多样性(山上尤为明显)，同时明显改变真菌菌群结构组成
- 土壤水分增加对土壤真菌群体影响不大（相似性>77%）
- 加氮处理对土壤真菌多样性无明显影响，但可改变土壤优势真菌的丰度（含量）
- 不同海拔土壤真菌群体对加氮处理的响应不同，发生改变的优势真菌种类不同
 - 山上变化种类：多孢壶菌、被孢霉菌、库氏克鲁维酵母菌、小皮伞菌、粪壳菌
 - 山下变化种类：接合糖酵母菌、小皮伞菌、诺得子囊菌、哈德壶菌、多孢壶菌、木霉菌、粪壳菌、娄德罗菌
- 水氮联合处理，红松土壤真菌群体变化趋势与水曲柳根际土壤基本一致，但变化的真菌种类不同，可能与不同树种土壤真菌结构差异有关



谢谢