

基于高通量测序分析的土层与间伐强度对辽东山区红松人工林真菌群落的影响

刘晴, 徐阳, 张妍, 李虹谕, 潘丕克*

(辽宁省森林经营研究所, 辽宁 丹东 118002; 辽宁辽东半岛森林生态系统国家定位观测研究站, 辽宁 丹东 118002)

摘要:【目的】为探究不同土层和间伐强度对辽东山区红松人工林林下土壤真菌的影响,【方法】采用 Illumina-Miseq 高通量测序技术分别测定不同间伐程度林地表层 (0~10 cm) 和亚表层 (10~20 cm) 土壤进行对比分析。【结果】共获得 572932 条高质量 ITS 序列, 在 97% 序列相似性基础上可划分为 9329 个 OTUs; 优势菌门有担子菌门 (Basidiomycota)、子囊菌门 (Ascomycota)、被孢霉门 (Mortierellomycota)、罗茨菌门 (Rozellomycota)、毛霉门 (Mucoromycota)、壶菌门 (Chytridiomycota)、球囊菌门 (Glomeromycota) 和分类不明确的门。排名前 10 的优势菌属有蜡壳耳属 (*Sebacina*)、被孢霉属 (*Mortierella*)、红菇属 (*Russula*)、乳牛肝菌属 (*Suillus*)、*Geminibasidium*、白环蘑属 (*Leucoagaricus*)、角孢革菌属 (*Tylospora*)、鹅膏菌属 (*Amanita*)、*Delastria*、口蘑属 (*Tricholoma*)。表层真菌丰富度大于亚表层; 不同间伐强度的土壤真菌种群丰富度表现为极强度区 > 弱度区 > 对照组 > 强度区 > 中度区; 方差分析结果显示, 不同土层和间伐强度在门水平上相对丰度均无显著差异, 在属水平上, 不同土层在白环蘑属 (*Leucoagaricus*) 和角孢革菌属 (*Tylospora*) 的相对丰度间存在显著差异, 不同间伐强度在白环蘑属 (*Leucoagaricus*)、鹅膏菌属 (*Amanita*) 和口蘑属 (*Tricholoma*) 的相对丰度间均存在显著差异; 表层与亚表层、极强与弱度区真菌物种组成相近, 极强与弱度区和对对照组相近程度高于中度和强度区。【结论】在辽东山区红松人工林中, 间伐强度及土层可在一定程度上影响林下土壤真菌在丰富度、多样性和物种组成。

关键词: 红松人工林; 抚育间伐; 高通量测序; 真菌丰富度; 优势真菌

中图分类号:

文献标志码: A

文章编号:

【研究意义】我国人工林位居世界首位, 其中红松 (*Pinus koraiensis*) 是我国东北部东部林区主要的人工造林树种之一, 具有较高的经济和生态价值。辽宁省森林经营研究所实验林场拥有自 1949 年营造的新中国第一处红松人工林, 迄今林龄达 73 年, 作为红松人工林具有代表性^[1]。间伐是人工林的主要抚育措施和提高生态系统生产力的重要手段^[2], 对人工林的结构影响较大。而相对于天然林, 人工林结构单一, 抵抗力稳定性差, 因此分析人工林抚育间伐措施效益, 对人工林森林培育有着重要意义。

土壤是森林重要组成成分, 土壤微生物以其作为活动场所完成全部或部分生活史。其中, 土壤真菌可以作为评价土壤生态状况的重要生物指标, 植物物种及其根系分泌物均可影响真菌群落结构^[3-5]。部分土壤真菌在维持植物生长方面发挥作用, 同时也可提高植物的抗逆性^[6-8]。了解土壤真菌群落结构对评价人工林生态系统功能、探寻植物繁育机制、病害防治和维护生态系统多样性及稳定性等方面尤为重要^[9]。在土壤微生物多样性研究中, 传统分离鉴定土壤微生物方法只能区分微生物种类中的 0.1~10%^[10], 而高通量测序技术具有准确性高、灵敏度好、样本量大等优点, 被认为是研究土壤微生物多样性较好的方法^[11,12], 广泛运用在土壤微生物多样性的研究中,【前人研究进展】周玉杰等^[13]运用高通量测序方法全面分析了海南大丰农场橡胶林土壤真菌群落状况, 浦滇等^[14]通过高通量绝对定量技术探究了不同树龄茶树土壤细菌多样性, 得出高通量绝对定量能够研究不同样本微生物群落的结论。许姗姗^[15]等通过高通量测序的方法分析了云南昭通不同栽培模式苹果园根际土壤微生物种群的特征, 发现不同栽培模式影响根际土壤微生物种群, 汪其同等^[16]运用高通量测序的方法分析杨树人工林根际土壤真菌群落结构。

【本研究切入点】本试验通过对不同间伐强度的辽东山区红松人工林林下土壤真菌进行 Illumina-Miseq 高通量测序分析, 分析表层和亚表层及 5 种间伐强度对大径材培育目标下红松人工林土壤真菌的短期影响,

【拟解决的关键问题】旨在了解不同土层和间伐强度土壤真菌的结构特征，进而对营林措施加以评价，以期为辽东山区红松人工林土壤肥力维护、大径材人工林经营和多功能效益提供理论依据。

1.材料与方法

1.1 研究区概况

研究地点的实验林场位于辽宁省本溪市本溪满族自治县草河口镇（40°53'N，123°51'E），属于大陆性季风性气候，年均降水量 926.3 mm，土壤为山地棕色森林土，pH 值为 5.3~6.3，保水性差，平均海拔约 645 m，气温低，年均气温 6.5 ℃。植被以红松人工林为主，其下植物稀疏，仅有少量铁线莲（*Clematis florida* Thunb）、大叶樟（*Cinnamomum parthenoxylon*(Jack) Nees）、天南星（*Arisaema erubescens* (Wall) Schott）等^[16]。

抚育间伐强度以保留株数为指标划分了弱度区 1、中度区 2、强度区 3、极强度区 4 及对照 0（不间伐）5 个处理，各处理面积均为 0.1hm²，分别在 1959 年、1967 年、1987 年、1994 年、2005 年、2012 年进行了 6 次抚育间伐。经 2019 年调查平均胸径，采样地基本特征见表 1^[1]。

表 1 样地基本特征

Tab.1 Basic characteristics of the plot

采伐强度	林龄/a	海拔/m	坡位	坡向	密度 株/hm ²	平均胸径/cm
Thinning intensity	Forest age	Altitude	Slope position	Aspect	Density	Mean breast diameter
0	70	530	中	NE	1100	23.52
1	70	530	中	NE	470	30.36
2	70	530	中	NE	310	36.34
3	70	530	中	NE	210	38.27
4	70	530	中	NE	160	41.56

1.2样品采集

采集时间为 2021 年 10 月。取 4 块不同砍伐程度和对照组（未间伐）的实验林标准地，不同土层差异分析选用第 2 组中度间伐土样。在标准地内随机选择靠近红松根系，具有稳定土壤发育条件的空地，每块标准地分别选取地下表层（0~10 cm），亚表层（10~20 cm）的样品，采取五点取样法选取土样混合均匀，用灭菌锡纸将新鲜土样保存于液氮罐中，送回实验室去除腐殖质、植物根系等杂质，放置-80 ℃冰箱中，用于微生物多样性高通量测序。

1.3DNA提取及高通量测序分析

利用 OMEGA 试剂盒提取基因组 DNA（E.Z.N.A™ Mag-Bind Soil DNA Kit），琼脂糖凝胶检测 DNA 完整性，Qubit 定量检测 DNA 样本浓度。利用 Qubit3.0 DNA 检测试剂盒对基因组 DNA 精确定量后进行 PCR 扩增，扩增引物为 ITS1F（5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'）^[17]，ITS2R（5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'）^[18]扩增片段长度为 300bp。通过 2%琼脂糖凝胶电泳检测文库大小，使用 Qubit3.0 荧光定量仪（Invitrogen 公司）进行文库浓度测定。土壤样品委托生工生物工程（上海）股份有限公司进行 DNA 提取和高通量测序。

1.4 数据处理与分析

按照相应比例混合后进行 Miseq 文库构建、拼接质控、OTU 聚类、数据分析与信息挖掘^[19]。真菌群落多样性均采用 SPSS17.0 进行分析。

2 结果与分析

2.1样品稀释曲线分析

以 Alpha 多样性指数值为纵轴，随机抽取的数据量为横轴绘制曲线。由图 1 可知，样品稀释曲线呈现平稳趋势，说明结果存在较高的客观土壤环境真菌群落构成置信度，能科学体现样品各自真菌群落。虽存在少量部分未发现微生物的可能性，但测序结果仍可反应样品绝大多数真菌信息。

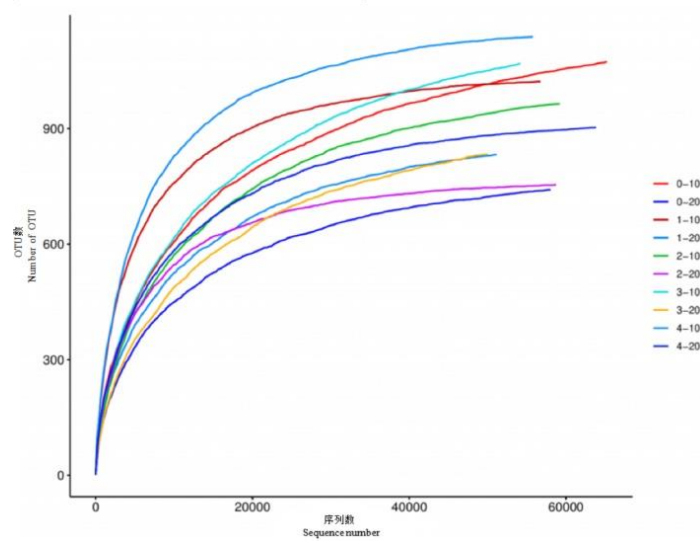


图 1. 土壤真菌群落稀数曲线

Fig. 2 Rarefaction curves of fungal under different plantation forests Relative

2.2不同间伐强度及土层土壤真菌多样性分析

共获得 572932 条高质量 ITS 序列，在 97%序列相似性基础上可划分为 9329 个 OTUs。各土壤样品真菌覆盖度指数介于 99.60~99.92%，说明测序数据量合理，测序基本覆盖了红松人工林土壤中所有真菌类群，能够体现真实的红松人工林真菌特征。

从表 1 可知，不同土层土壤真菌群落 Ace 指数变化范围为 770.16~1213.04，Chao 指数变化范围为 775.38~1207.68，Shannon 指数变化范围为 3.29~4.82，Simpson 指数变化范围为 0.03~0.11。不同土层 ITS 序列数、OTUs、Ace、Chao 和 Shannnon 指数均表现为表层>亚表层；Simpson 指数表现为表层<亚表层。表明与亚表层土壤相比，表层土壤真菌更丰富。但方差结果显示，二者各指数间的差异不显著（ $P>0.05$ ，下同），即二者真菌多样性相近。

表 2 表层与亚表层土壤真菌序列统计及多样性指数

Tab.2Sequence statistics and diversity indexes of soil fungi under Surface and subsurface

样品名称 Sample name	序列数 Reads	OTU 数 OTUs	Ace 指数 Ace index	Chao 指数 Chao index	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	覆盖度指数 (%) Coverage index (%)
0-10	65220	1022	1182.43	1174.32	3.98	0.06	99.72
0-20	58034	832	817.94	815.76	3.72	0.10	99.79
1-10	56733	1069	1160.42	1160.1	4.55	0.04	99.92
1-20	51162	833	937.66	945.01	3.45	0.11	99.74
2-10	59222	964	1045.20	1045.67	3.97	0.04	99.75
2-20	58739	754	770.16	775.38	3.53	0.15	99.92
3-10	54157	1073	1036.7	1038.59	4.28	0.07	99.60
3-20	50062	741	909.92	899.55	3.29	0.10	99.63
4-10	63822	1138	1213.04	1207.67	4.82	0.03	99.88
4-20	55781	903	962.51	967.81	4.18	0.05	99.87

从表 2 可知，不同间伐强度土壤真菌群落 Ace 指数变化范围为 907.68~1087.78，Chao 指数的变化范围为 910.53~1087.74，Shannon 指数变化范围为 3.75~4.50，Simpson 指数变化范围为 0.04~0.10。不同间伐强度 ITS 序列数表现为 0>4>2>1>3；OTUs、Ace 指数、Chao 指数和 Shannnon 指数表现为 4>1>0>

3>2; Simpson 指数表现为 2>3>0>1>4。表明在不同间伐强度的土壤中，极强度区真菌种群最丰富，而中度区土壤真菌丰富度最低。方差结果显示，不同间伐强度间各指数差异不显著。

表 3 不同间伐强度土壤真菌序列统计及多样性指数

Tab. 3 Sequence statistics and diversity index of soil fungi at different thinning intensities							
样品名	序列	OTU	Ace 指	Chao	Shannon	Simpson 指	覆盖度指数%
称	数	数	数	指数	指数	数	Coverage index
Sample	Reads	OTUs	Ace	Chao	Shannon	Simpson	
name			index	index	index	index	
0	61627	927	1000.18	995.04	3.85	0.08	99.76
1	53948	951	1049.04	1052.56	4.00	0.08	99.83
2	58981	859	907.68	910.53	3.75	0.10	99.83
3	52110	907	973.35	969.07	3.78	0.08	99.61
4	59802	1021	1087.78	1087.74	4.50	0.04	99.87

2.3不同土层土壤优势真菌群落结构组成特征

选用 2 组中度间伐强度的表层（0~10 cm），亚表层（10~20 cm）进行不同土层差异分析。利用统计学分析方法，得到样本在不同分类水平上的群落结构特征，主要以门和属分类水平进行分析，样本中丰度占比均大于一定比例（1%）的物种作为优势物种。

2.3.1不同土层土壤优势真菌群落在门水平上的丰富度分析

如图 2 所示，在表层和亚表层两个土层中优势真菌群落在门水平上包括:担子菌门（Basidiomycota）、子囊菌门（Ascomycota）、被孢霉门（Mortierellomycota）、罗茨菌门（Rozellomycota）、毛霉门（Mucoromycota）、壶菌门（Chytridiomycota）、球囊菌门（Glomeromycota）和分类不明确门。在表层占比分别为 48.26%、26.51%、10.78%、1.15%、0.93%、0.79%、0.58%和 10.57%，在亚表层占比分别为 57.18%、24.88%、9.17%、0.79%、0.69%、0.36%、0.20%和 6.34%。方差分析结果显示，门水平上的表层和亚表层不同菌门相对丰度均无显著差异，说明两个土层门水平上未改变土壤真菌群落的相对丰度。

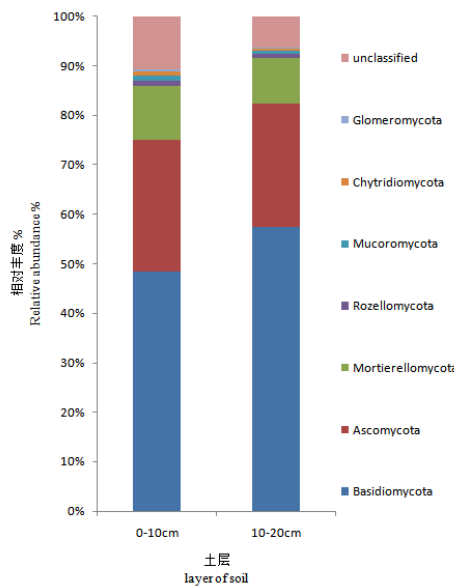


图 2. 不同土层土壤真菌群落门水平相对丰度

Fig. 2 Relative abundance of Fungi Community in different soil layers at phylum level

2.3.2不同土层土壤优势真菌群落在属水平上的丰富度分析

图 3 所示，在表层和亚表层两个土层中属水平上排名前 10 的优势真菌群落包括：蜡壳耳属（*Sebacina*）、被孢霉菌属（*Mortierella*）、红菇属（*Russula*）、乳牛肝菌属（*Suillus*）、*Geminibasidium*、白环蘑属（*Leucoagaricus*）、角孢革菌属（*Tylospora*）、鹅膏菌属（*Amanita*）、*Delastria* 和口蘑属（*Tricholoma*）。在表层占比分别为 14.90%、10.77%、5.96%、4.55%、5.83%、0.30%、0.89%、1.93%、2.71%和 0.28%，在亚表层占比分别为 13.04%、9.15%、6.53%、4.81%、2.49%、7.22%、4.90%、3.84%、2.88%和 0.64%。方差分析结果显示，属水平上，两个土层土壤真菌群落在白环蘑属和角孢革菌属的相对丰度间均存在显著差异($P<0.05$ ，下同)，其他类群菌属相对丰度间差异不显著。

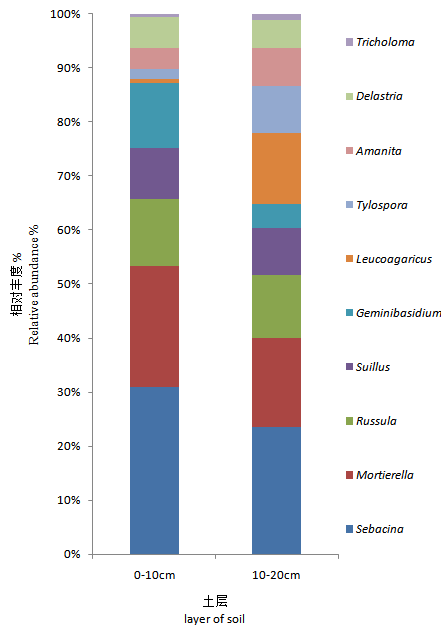


图 3. 不同土层土壤真菌群落属水平相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of Fungi Community in different soil layers at genus level

2.4不同间伐强度土壤真菌群落结构组成特征

2.4.1不同间伐强度土壤优势真菌群落在门水平上的丰富度分析

如图 4 所示，在 5 个间伐强度中优势真菌群落在门水平上包括：担子菌门（*Basidiomycota*）、子囊菌门（*Ascomycota*）、被孢霉门（*Mortierellomycota*）、罗茨菌门（*Rozellomycota*）、毛霉门（*Mucoromycota*）、壶菌门（*Chytridiomycota*）、球囊菌门（*Glomeromycota*）和分类不明确门。0 组中占比分别为 56.82%、29.63%、6.08%、0.88%、1.26%、0.20%、0.20%和 4.55%，1 组中占比分别为 47.06%、31.14%、9.58%、0.52%、0.81%、0.32%、0.63%和 9.65%，2 组中占比分别为 52.57%、21.20%、16.33%、1.33%、0.52%、0.68%、0.23%和 6.83%，3 组中占比分别为 62.64%、20.56%、4.71%、1.28%、0.56%、0.52%、0.22%和 8.96%，4 组中占比分别为 44.51%、25.94%、13.20%、0.86%、0.92%、1.17%、0.67%和 12.40%。方差分析结果显示，门水平不同间伐强度土壤菌门的相对丰度均无显著差异，说明间伐强度门水平上未改变土壤真菌群落的相对丰度。

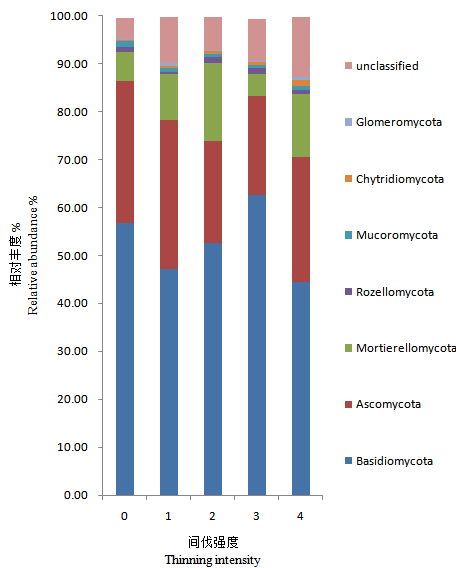


图 4. 不同间伐强度土壤真菌群落门水平相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of Fungi Community in different thinning intensities at phylum level

2.4.2不同间伐强度土壤优势真菌群落在属水平上的丰富度分析

图 5 所示，在 5 个间伐强度中的属水平上排名前 10 的优势真菌群落包括：蜡壳耳属 (*Sebacina*)、被孢霉菌属 (*Mortierella*)、红菇属 (*Russula*)、乳牛肝菌属 (*Suillus*)、*Geminibasidium*、白环蘑属 (*Leucoagaricus*)、角孢革菌属 (*Tylospora*)、鹅膏菌属 (*Amanita*)、*Delastria* 和口蘑属 (*Tricholoma*)。0 组中占比分别为 2.67%、6.07%、14.68%、9.15%、7.39%、0%、12.07%、0%、0%和 0%，1 组中占比分别为 4.28%、9.58%、4.30%、0.82%、1.67%、18.28%、0.21%、0%、12.50%和 0%，2 组中占比分别为 22.24%、16.24%、2.22%、5.79%、5.88%、0.05%、0.78%、0.01%、0.06%和 0.24%，3 组中占比分别为 32.33%、4.70%、4.41%、6.70%、3.81%、0.48%、0.72%、0.45%、0.02%和 0%，4 组中占比分别为 8.32%、13.19%、5.64%、0.94%、2.07%、0%、0.68%、13.98%、1.40%和 2.06%。方差分析结果显示，不同间伐强度土壤真菌群落在白环蘑属、鹅膏菌属和口蘑属的相对丰度间均存在显著差异。

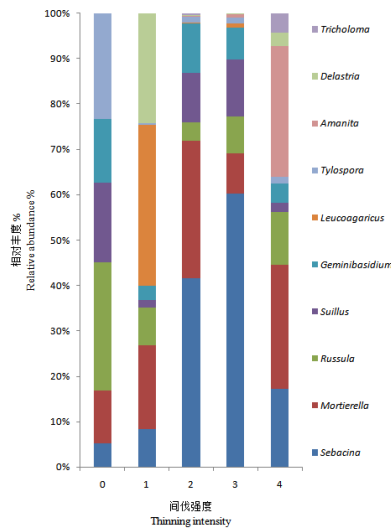


图 5. 不同间伐强度土壤真菌群落属水平相对丰度

Fig. 5 Relative abundance of Fungi Community in different thinning intensities at genus level

2.5土壤微生物主成分分析结果

主成分分析 (PCA) 通过分析不同样本群落组成，表明不同处理间土壤真菌群落存在差异^[20]。坐标

轴选择能最大反映样品间差异的两个特征值, 样本物种组成越相似表现为在图中距离越相近。由图 6 可知, 土壤真菌群落中主成分 1 (PC1) 和成分 2 (PC2) 差异解释度分别为 23.29%和 19.51%。同一间伐强度下表层和亚表层距离相近, 说明相同间伐强度下两层土壤间物种组成较相似。1 与 4 组距离相近, 说明极强与弱度区物种组成相近; 1 和 4 组与 0 组距离较 2 和 3 组近, 说明极强和弱度区与对照组物种组成较中和强度区更相似。

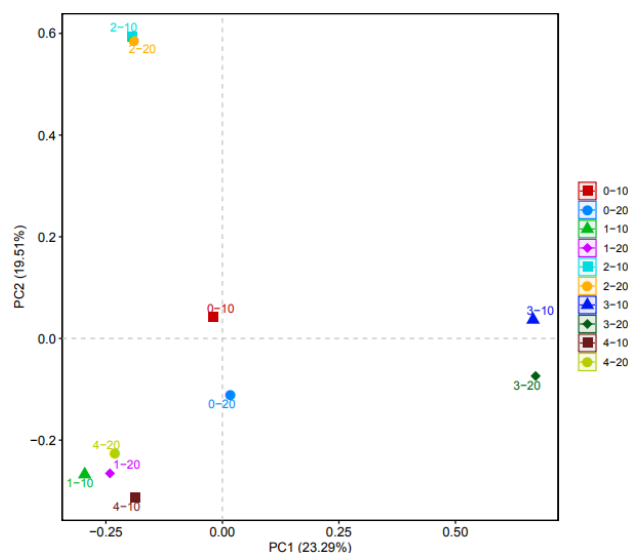


图 6.土壤真菌 PCA 分析图

Fig. 6 PCA diagram of Soil fungi

3 讨论

通过对不同间伐强度表层和亚表层土壤进行高通量测序结果进行分析, 发现土壤真菌生物量和 Ace 指数等 4 个多样性指数总体上表现为表层大于亚表层土壤。说明土壤真菌多样性在表层更高, 这与韩世忠^[21]研究结果一致, 同时微生物和酶活之间关系密切, 在同等条件下, 该土层试验结果与酶活土层试验^[1]结果一致。

在不同间伐强度土壤真菌多样性中, 表现为极强大于弱度区, 均大于对照组, 中小于强度区, 均小于对照组。不同间伐强度间土壤真菌多样性差异不显著, 也有研究发现^[22]在 11 年后油松林土壤微生物群落中, 土壤真菌群落多样性在不同间伐处理间差异不显著。目前关于间伐对土壤微生物的影响并无一致性结论^[23]。在本试验红松人工林中表现为极强度区真菌种群更丰富, 这可能是由于极强度区林分郁闭度低, 阳光充, 且随着间伐强度增加, 林下草本植被生物量有明显增加的趋势^[24], 进而导致真菌多样性高。中度区土壤真菌丰富度最低, 但中度区对红松大径材培育效益较好, 这可能是由于中度区存在对红松生长有积极影响的真菌和外生菌根真菌, 在竞争者占据主导地位, 进而导致其他菌群丰富度较低。

不同土层和间伐强度中土壤真菌在门分类水平上有担子菌门、子囊菌纲、被孢霉门、罗茨菌门等 8 个门占优势地位, 这与邓娇娇等^[25]研究辽东山区两种针叶人工林土壤真菌生物群组成相似。各个处理间在门水平上均无显著性差异, 说明红松人工林不同处理间在门水平丰富度上相似度较大。不同土层土壤真菌在属分类水平上, 只有白环蘑属和角孢革菌属相对丰度间均存在显著差。其中白环蘑属可与林木形成外生菌根, 冯欢^[26]的接种试验表明其可影响青杨雌、雄的铅耐受性。高婷婷^[27]在红松外生菌根真菌群落随时间尺度的动态变化及影响因素试验中发现红松土壤中的 EcMF 优势属主要有角孢革菌属。不同间伐土壤真菌在属分类水平上, 白环蘑属、鹅膏菌属和口蘑属的相对丰度间均存在显著差异。鹅膏菌属是常见的外生菌根, 物种多样性非常丰富的同时还是一类有毒的大型真菌, 且毒性价值被广泛深入研究^[28]。口蘑属作为美食被大家熟知, 徐洋^[29]在中国东北地区松茸栖息地土壤微生物多样性研究中, 发现样地 B 在松茸子实体发育期 (HTB, 8-9 月份) 的优势属口蘑属占比 42.16%, 张元霞等^[30]在辽宁东部山区珍贵野生食用菌中介绍口蘑属中的棕灰口蘑 (*Tricholoma terreum*) 产地为辽东山区落叶松林内或针阔

混交林中。

3 结论

在辽东山区红松人工林不同间伐土壤真菌物种的组成中发现, 极强与弱度区物种组成相近, 极强和弱度区与对照组相近程度高于中度和强度区。间伐处理可使红松人工林林下土壤真菌物种组成产生差异, 间伐在一定程度上影响了真菌物种组成。间伐处理及不同土层可使红松人工林林下土壤真菌在丰富度、多样性和物种组成产生差异, 在一定程度上影响了林下土壤真菌群落的结构。

Effects of soil layer and thinning intensity on the fungal community of *Pinus koraiensis* Plantation in Liaodong mountain area based on high-throughput sequencing

LIU Qing, XU Yang, ZHANG Yan, LI Hong-yu, PAN Pi-ke*

(Forest Management Research Institute of Liaoning Province, Dandong Liaoning 118002; Liaoning Liaodong Peninsula National Forest Ecosystem Research Station, Dandong Liaoning 118002)

Abstract: 【Objective】 In order to explore the effects of different soil layers and tending and thinning intensities on soil fungi under *Pinus koraiensis* Plantation in Liaodong mountain area, 【Method】 illumina miseq high-throughput sequencing technology was used to determine the soil surface layer (0~10 cm) and sub surface layer (10~20 cm) of different thinning degrees. 【Result】 A total of 572932 high-quality its sequences were obtained, which can be divided into 9329 OTUs on the basis of 97% sequence similarity; The dominant phyla include Basidiomycota、Ascomycota、Mortierellomycota、 Rozellomycota、Mucoromycota、Chytridiomycota、Glomeromycota and the phyla with unclear classification. The top 10 dominant bacterial genera are *Sebacina*、*Mortierella*、*Russula*、*Suillus*、*Geminibasidium*、*Leucoagaricus*、*Tylospora*、*Amanita*、*Delastria*、*richoloma*; The abundance of fungi on the surface layer was higher than that on the sub surface layer; The richness of soil fungal population with different thinning intensities showed that the extreme intensity area > the weak intensity area > the control group > the intensity area > the medium area; The results of variance analysis showed that there was no significant difference in relative abundance between different soil layers and different thinning intensities at the gate level. At the genus level, there were significant differences in the relative abundance of *Leucoagaricus* *Tylospora* in the two soil layers, and there were significant differences in the relative abundance of *Leucoagaricus*、*Amanita* and *Tricholoma* in different thinning intensities; The species composition of fungi in the surface layer and sub surface layer, the extremely strong and weak regions and the control group were similar, and the similarity between the extremely strong and weak regions and the control group was higher than that in the moderate and strong regions. 【Conclusion】 In *Pinus koraiensis* Plantation in Liaodong mountain area, thinning intensity and soil layer can affect the richness, diversity and species composition of soil fungi under the forest to a certain extent.

key words: *Pinus koraiensis*; tending thinning; high-throughput sequencing; fungal richness; dominant fungi