

研究报告

采收期松茸菌塘土壤理化特性及对细菌多样性的影响

李小林¹ 李强^{1,2} 金鑫¹ 陈诚^{1,3} 熊川^{1,2} 戢林³ 李廷轩³ 郑林用^{1,2*}

(1. 四川省农业科学院土壤肥料研究所 四川 成都 610066)

(2. 四川大学生命科学学院 四川 成都 610065)

(3. 四川农业大学资源学院 四川 成都 611130)

摘 要:【目的】探讨四川松茸菌塘土壤理化因素对细菌多样性的影响。【方法】应用 DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术分析和比较四川省小金、雅江、木里、盐源及盐边县松茸主产区的松茸菌塘土壤与对照土壤在松茸采收期的细菌多样性,并结合不同样品土壤理化因子的差异,采用主成分分析(PCA)和多元回归树分析(MRT)方法研究土壤理化因子对细菌多样性的影响。【结果】不同样品土壤理化性质之间差异明显,菌塘土壤的总体肥力水平明显高于非菌塘土壤;不同县域之间土壤微生物多样性指数有着明显差异,且同一地区内的对照土壤微生物多样性指数与菌塘土壤之间并没有相关性;MRT 结果表明,当有效铜含量为 $0.296\ 7\text{ mg/kg} \leq \text{Cu} < 0.651\ 7\text{ mg/kg}$ 时,有机质在此限量内($136.5\text{ g/kg} \leq \text{OM} \leq 257.1\text{ g/kg}$)含量越大、速效氮在该范围内($151.2\text{ mg/kg} \leq \text{AN} \leq 277.0\text{ mg/kg}$)含量越高,松茸菌塘土壤细菌多样性越大;而当 $\text{Cu} \geq 0.651\ 7\text{ mg/kg}$ 时,pH 在该范围内($4.800 < \text{pH} < 6.028$)越小、有效铜在此限量内($0.651\ 7\text{ mg/kg} \leq \text{Cu} < 2.040\ 0\text{ mg/kg}$)含量越小、交换性钙在该限量内($9.697\text{ cmol/kg} \leq \text{Ca} < 23.300\text{ cmol/kg}$)含量越大、速效钾在该限量内($243.0\text{ mg/kg} \leq \text{AK} < 296.7\text{ mg/kg}$)含量越大,松茸菌塘土壤细菌多样性越大。【结论】有效铜、有机质、pH、速效氮、交换性钙及速效钾 6 个因子对菌塘土壤细菌多样性影响最大。

关键词: 土壤理化因素, 松茸, 细菌, 多样性, 多元回归树

Foundation item: Key Technology R&D Program of Sichuan (No. 2013NZ0029, 2014FZ0004); Youth Foundation Program of the Financial & Innovational Capacity Building Project of Sichuan (No. 2014CXSF-030)

***Corresponding author:** Tel/Fax: 86-28-84504965; E-mail: zly6559@126.com

Received: May 26, 2015; **Accepted:** July 01, 2015; **Published online** (www.cnki.net): December 04, 2015

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(No. 2013NZ0029, 2014FZ0004); 四川省财政创新能力提升工程青年项目(No. 2014CXSF-030)

***通讯作者:** Tel/Fax: 86-28-84504965; E-mail: zly6559@126.com

收稿日期: 2015-05-26; **接受日期:** 2015-07-01; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-12-04

Effect of soil physical and chemical properties on bacterial diversity in *Tricholoma matsutake* shiroes at harvest

LI Xiao-Lin¹ LI Qiang^{1,2} JIN Xin¹ CHEN Cheng^{1,3} XIONG Chuan^{1,2} JI Lin³
LI Ting-Xuan³ ZHENG Lin-Yong^{1,2*}

(1. Soil and Fertilizer Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu, Sichuan 610066, China)

(2. School of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

(3. College of Resources, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of physical and chemical properties on the diversity of bacteria of *Tricholoma matsutake* shiroes. [Methods] Soil from *T. matsutake* shiroes and control treatments were collected at the *T. matsutake*'s harvest time in the main producing areas Xiaojin, Yajiang, Muli, Yanyuan, and Yanbian in Sichuan denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was used to analyze the bacterial diversity in shiroes. Physical and chemical properties of soil samples were analyzed. Data analysis was done using principal component analysis (PCA) and multiple regression tree analysis (MRT). [Results] The physical and chemical properties of shiro soils were significantly different. The fertility level was significantly higher in shiro soils than in control treatments. The diversity indices in different counties were significantly different. However, bacterial diversity in the control soils was not necessarily lower than in shiro soils from the same area. MRT showed that higher organic matter (OM, $136.5 \text{ g/kg} \leq \text{OM} \leq 257.1 \text{ g/kg}$) and higher available nitrogen (AN, $151.2 \text{ mg/kg} \leq \text{AN} \leq 277.0 \text{ mg/kg}$) increased the bacterial diversity of shiro soils when the concentration of available copper (Cu) was higher than or equal to 0.296 mg/kg and less than 0.651 mg/kg . Whereas, lower pH ($4.800 < \text{pH} < 6.028$), lower available copper ($0.651 \text{ mg/kg} \leq \text{Cu} < 2.040 \text{ mg/kg}$), higher exchangeable calcium (Ca, $9.697 \text{ cmol/kg} \leq \text{Ca} \leq 23.300 \text{ cmol/kg}$) and higher available potassium ($243.0 \text{ mg/kg} \leq \text{AK} < 296.7 \text{ mg/kg}$) increased the bacterial diversity of shiro soils when the concentration of available copper higher or equal 0.651 mg/kg . [Conclusion] Available copper, organic matter, pH, available nitrogen, exchangeable calcium and available potassium were the major physical and chemical properties affecting the bacterial diversity of *T. matsutake* shiroes.

Keywords: Physical and chemical properties, *Tricholoma matsutake*, Bacteria, Diversity, Multiple regression tree

松茸 *Tricholoma matsutake* (Ito et Imai) Singer 是一种名贵的外生菌根真菌, 至今还无法进行人工栽培^[1]。究其原因, 一方面是松茸整个生长过程较为缓慢, 一般为 5–6 年甚至 10 年以上; 另一方面是松茸对其生长环境要求极为苛刻^[2]。菌塘是松茸和寄主植物共同组成的土壤环境系统, 是松茸生长发育的重要场所, 对松茸的生长和发育起着至关重要的作用^[3]。而菌塘微生物的活动作为物质循环和能量转换的重要参与者, 在该系统中起着特别重要的作用。因为微生物可以通过其活动来改变菌塘的营养分循环、矿物分解及团粒结构等, 进而影响松茸的生长。因此, 研究松茸菌塘微生物的群落结构对于松茸的人工抚育甚至是人工栽培均有重要作用。

对于松茸菌塘微生物的了解, 前人研究取得了一定的进展。杨民和等^[4]通过可培养方法对松茸菌塘土壤研究发现, 深紫被孢霉(*Mortierella vinacea*)是绝对的优势菌, 而其它土壤微生物数量则相对较少。刘培贵等^[5]研究发现, 松茸菌塘的细菌和放线菌的“消失”与松茸地下菌丝的活动有着密切的联系。也有研究认为, 存在于松茸菌塘内的地下菌丝和菌根每年向外进行扩展的过程中能释放某些物质进而抑制该区域内的细菌和放线菌的生长, 以降低寄主根部受病原菌的侵染^[6]。而姜华等^[7]则认为松茸菌塘土壤可培养细菌的多样性较为丰富。但这些研究更多的是以可培养的传统方式来进行, 由于自然界中绝大多数微生物无法进行纯培养^[8], 因此

以分子为基础的免培养能很好地补充菌塘微生物的群落结构信息。张俊^[9]通过 DGGE 技术研究了四川雅江松茸生长地的微生物,很好地了解了当地微生物的多样性和群落结构,但由于样品仅局限于松茸林地,因而仍然无法很好地获得松茸菌塘的微生物信息。目前为止,对松茸菌塘微生物的研究仍然甚少,尤其是结合环境生态因子探讨其对松茸菌塘细菌多样性的影响尚未见报道。

本文以四川 5 个松茸主产区的 25 个松茸菌塘及 5 个非菌塘土壤为研究对象,采用 DGGE 方法研究了菌塘细菌多样性,并测定了土壤理化性质,同时分析了土壤理化因子对细菌多样性和群落结构的影响,以期对松茸的人工抚育甚至是人工栽培提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

于 2013 年 8 月,分别在具有代表性的小金(XJ)、雅江(YJ)、木里(ML)、盐源(YY)及盐边(YB)各县随机选择 5 个松茸菌塘样方,并在大致相同的地形因子条件下,每个大的主产区选取 1 个不产松茸的空白对照土壤样方,土壤采集均设置 3 次重复,重复均按照“三角形法”进行布设^[10]。去掉枯枝落叶等杂物后取 0–10 cm 深度的土壤,将样品装入无菌袋,带回实验室低温保存,去除样品中石块、动植物残体后将样品过 2 mm 尼龙网筛,装入无菌塑料袋,其中一份置于–20 °C 保存用于提取总 DNA,而另一份经自然风干后研磨过筛,用于土壤理化性质的测定。

1.2 土壤理化分析

菌塘土壤 pH 采用 pH 计测定(土水比 1:2.5),有机质采用重铬酸钾外加热容量法,全氮采用凯氏蒸馏法,速效氮采用碱解扩散法,速效磷采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法,速效钾采用乙酸铵提取-火焰光度法,有效铁、有效锰和有效铜采用二乙三胺五乙酸(Diethylene triamine pentacetate acid, DTPA)浸提-原子吸收分光光度法测定,交换性钙及交换性

镁均采用乙酸铵交换-原子吸收分光光度计法^[11]。

1.3 土壤样品总 DNA 提取

所有土壤样品总 DNA 的提取用 Fast DNA SPN Kit for Soil (Bio-Rad Co., 美国)试剂盒参照说明书进行,纯化用 UNIQ-10 DNA 纯化试剂盒(上海生工,中国)进行,然后于–20 °C 保存备用。

1.4 DGGE 分析

1.4.1 PCR 扩增:细菌 16S rRNA 基因的扩增采用引物 F338GC (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 R518 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'),其中 F338GC 前端经 GC 夹板修饰(5'-CGCCCGCCGC GCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGG GG-3')^[12]。反应体系(50 μ L): 2 \times PCR mix (0.1 U/ μ L Taq 酶, 500 μ mol/L dNTP each, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 100 mmol/L KCl 和 3 mmol/L MgCl₂) 25 μ L; 正反向引物(25 pmol/L)各 0.5 μ L; 模板 DNA (30–50 μ g/L) 2.0 μ L; 无菌 ddH₂O 补足至 50 μ L。扩增程序采用 Touch-down PCR 程序: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 65–55 °C 50 s (每个循环温度降低 0.5 °C), 72 °C 1.5 min, 20 个循环; 94 °C 1 min, 55 °C 50 s, 72 °C 1.5 min, 15 个循环; 72 °C 7 min; 12 °C 恒温保存。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,并用 UNIQ-10 DNA 纯化试剂盒(上海生工,中国)进行纯化,–20 °C 保存备用。

1.4.2 变性梯度凝胶电泳(DGGE):取扩增纯化后的 PCR 产物 15–20 μ L,加 2–5 μ L 溴酚蓝进行 DGGE 分析。细菌采用变性梯度为 25%–55%的 10%的聚丙烯酰胺凝胶(100%的变性剂为尿素 7 mol/L 和 40%的去离子甲酰胺)。使用 1 \times TAE 缓冲液,50 V 50 min 进胶,再在 160 V、60 °C 电泳 5 h。电泳后采用改进的硝酸银染色法对凝胶进行染色^[13]。用数码相机拍照保存。

1.4.3 DGGE 数据分析:DGGE 指纹图谱用 Bio-Rad 公司的 Quantity One 4.1.1 分析软件进行分析。细菌群落丰富度、多样性、优势度和均匀度分别由马格利夫指数(Margalef's richness)、香农-威纳指数(Shannon-Wiener index)、辛普森指数

(Simpson's diversity index) 和皮卢指数(Pielou's evenness index)表示。

1.5 统计分析

实验数据的方差分析采用 SPSS 17.0, 主成分分析(Principal component analysis, PCA)采用 CANOCO for Windows 4.5 软件进行, 多元回归树分析(Multivariate regression tree, MRT)采 R 语言中 mvpart 程序包的 mvpart 函数。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质分析

各样点菌塘土壤和对照土壤的理化性质测定结果见表 1。从整体上看, 所有样品间的理化性质存在一定的差异。但各个县域之间松茸菌塘土壤理化性质存在差异, 同县域之间松茸菌塘土壤理化性质虽存在一定差异, 但很多并未达到显著水平, 同时菌塘土壤与对照土壤的理化性质也存在相同情况。参照土壤肥力分组标准, 所有松茸菌塘土壤及对照土壤的肥力水平处于中上水平, 而对照土壤肥力则总体低于菌塘土壤。由此可初步看出, 在四川松茸产区更肥沃的土壤更适于松茸的生长。

2.2 基于土壤理化的主成分分析

松茸菌塘土壤及对照土壤 PCA 结果如图 1 所示。其中, 第 1 个主成分的方差贡献率为 52.6%, 第 2 主成分的方差贡献率为 26.3%, 前两个主成分的累积方差贡献率为 78.9%, 在一定程度上能代表土壤肥力系统的变异信息。由表 2 可知, 主成分 1 主要与土壤有效锌、速效钾、总氮、有效铁、速效磷、有机质、有效锰有关, 说明它主要反映了土壤发生的自然因素影响; 主成分 2 则主要与交换性钙和交换性镁有关, 说明它主要反映了土壤母质类型的影响; 主成分 3 主要与土壤有效铜、速效氮、速效磷有关, 说明主要反映了矿化分解因素的影响。因此, 主成分 1 可命名为土壤发生自然因素, 主成分 2 可命名为土壤母质类型, 主成分 3 可命名为土壤矿化分解作用。

所有样品大致可分为 5 个相对独立的群。其中,

绝大多数样品聚集在同一群内(群 I), 而 XJ2 与 YYCK 单独成群(群 II 和群 V)。究其原因, 样品 XJ2 和样品 YYCK 主要理化性质较为特殊。样品 XJ2 总体肥力最高, 其中 pH (6.9)、速效氮(280.7 mg/kg)、速效钾(386.0 mg/kg)及交换性镁(1.36 cmol/kg)指标最高; 而样品 YYCK 总体肥力水平较低, 其中, 速效磷(1.1 mg/kg)、有效铁(30.78 mg/kg)及交换性钙(4.42 cmol/kg)指标为所有样品中最低。木里对照土壤(MLCK)与 3 个松茸菌塘土壤样品聚为群 III, 而小金对照土壤(XJCK)及盐边对照土壤(YBCK)聚为群 IV。可以发现, 除了盐源对照土壤(YYCK)与大部分样品距离较近外, 其余所有对照样品均与大部分松茸菌塘样品距离较远, 显示了对照土壤的理化特性与菌塘土壤发生了一定程度的分化。

2.3 菌塘土壤细菌群落结构多样性

根据 DGGE 图谱的条带数量、迁移率及灰度(图 2), 分别计算了样品的细菌多样性指数(表 3)。不同县域之间多样性指数有着明显差异, 木里和盐边菌塘土壤细菌多样性较高, 而小金则较低。同一地区内, 对照土壤细菌多样性指数也并不一定完全低于或高于菌塘土壤。例如, 小金对照土壤 XJCK 的马格利夫指数、香农-威纳指数、皮卢指数及辛普森指数高于另 3 个小金松茸菌塘土壤样品; 而雅江对照土壤 YJCK 的香农-威纳指数显著低于雅江松茸土壤($P<0.05$)。

2.4 土壤因子对菌塘细菌多样性影响

土壤理化因子对松茸菌塘细菌多样性的影响如多元回归树(图 3), 该树整体能解释总离差平方和的 92.1%, 树的复杂性参数值(Complexity parameter, CP)为 0.01, 其交叉验证误差和交叉验证标准误分别为 1.210 和 0.299, 能较好地反映土壤理化因子与菌塘土壤细菌多样性之间的相关关系。在所有选择的 12 个土壤因子中, 有效铜、有机质、pH、速效氮、交换性钙及速效钾 6 个因子参与了多元回归树的构建。

多元回归树第一次分割以有效铜 0.651 7 mg/kg

为节点, 将所有 30 个样方分为两组, 该次的分解能解释总离差平方和的 43.8%。在有效铜 $<0.651\ 7\ \text{mg/kg}$ 的 10 个样品中, 有机质是影响其多样性的主要因素, 其次是速效氮, 节点分别为

136.5 g/kg 及 151.2 mg/kg。该组结果显示, 当有效铜 $\geq 0.296\ 7\ \text{mg/kg}$ 且 $<0.651\ 7\ \text{mg/kg}$ 时, 有机质 ($136.5\ \text{g/kg} \leq \text{OM} \leq 257.1\ \text{g/kg}$) 含量越大、速效氮 ($151.2\ \text{mg/kg} \leq \text{AN} \leq 277.0\ \text{mg/kg}$) 越大细菌多样性越

表 1 不同样点土壤理化性质($n=3$)
Table 1 Soil physicochemical properties of different soil samples ($n=3$)

样品 Sample	pH	有机质 OM (g/kg)	全氮 TN (g/kg)	速效氮 AN (mg/kg)	速效磷 AP (mg/kg)	速效钾 AK (mg/kg)	有效铁 Fe (mg/kg)	有效锰 Mn (mg/kg)	有效铜 Cu (mg/kg)	有效锌 Zn (mg/kg)	交换性钙 Ca (cmol/kg)	交换性镁 Mg (cmol/kg)
XJ1	6.41 ^{ab}	168.9 ^b	5.07 ^{ab}	277.0 ^{ab}	13.4 ^{cd}	186.7 ^{bc}	42.85 ^{bc}	26.39 ^{bc}	0.59 ^d	1.84 ^{bc}	36.08 ^{ab}	1.14 ^{ab}
XJ2	6.90 ^a	124.6 ^b	6.72 ^{ab}	280.7 ^a	9.0 ^{cd}	386.0 ^a	38.40 ^{cd}	27.91 ^{bc}	0.86 ^{cd}	2.28 ^{bc}	37.58 ^{ab}	1.36 ^a
XJ3	6.26 ^{ab}	91.6 ^b	1.73 ^b	206.0 ^{ab}	6.1 ^{cd}	277.3 ^{ab}	40.42 ^{bc}	23.82 ^{bc}	0.78 ^d	1.66 ^{bc}	27.43 ^{bc}	0.93 ^{ab}
XJ4	6.11 ^{ab}	329.0 ^a	2.65 ^b	214.0 ^{ab}	5.2 ^{cd}	287.0 ^{ab}	43.01 ^{bc}	26.57 ^{bc}	0.70 ^d	1.58 ^{bc}	31.40 ^b	0.81 ^b
XJ5	6.41 ^{ab}	272.4 ^{ab}	4.95 ^{ab}	158.0 ^b	9.0 ^{cd}	221.7 ^{bc}	39.90 ^{cd}	21.81 ^{bc}	0.98 ^{cd}	1.61 ^{bc}	44.54 ^a	1.33 ^a
XJCK	6.85 ^{ab}	94.3 ^b	3.87 ^b	241.0 ^{ab}	7.7 ^{cd}	77.7 ^c	39.18 ^{cd}	19.49 ^c	0.59 ^d	0.74 ^c	27.68 ^{bc}	0.85 ^{ab}
YJ1	4.98 ^b	208.1 ^{ab}	6.46 ^{ab}	154.0 ^b	23.8 ^{bc}	280.3 ^{ab}	55.50 ^{ab}	25.01 ^{bc}	0.59 ^d	4.67 ^a	13.60 ^{cd}	0.66 ^{bc}
YJ2	5.72 ^{ab}	200.6 ^b	4.58 ^{ab}	154.0 ^b	20.2 ^{bc}	267.7 ^{ab}	63.85 ^a	20.89 ^c	0.34 ^d	1.49 ^{bc}	12.25 ^{cd}	0.59 ^{bc}
YJ3	5.54 ^b	228.5 ^{ab}	6.26 ^{ab}	206.0 ^{ab}	31.0 ^b	300.7 ^{ab}	48.91 ^{bc}	27.95 ^{bc}	0.62 ^d	3.34 ^{ab}	23.31 ^{bc}	0.52 ^{bc}
YJ4	5.04 ^b	257.1 ^{ab}	5.13 ^{ab}	128.3 ^{bc}	19.8 ^{bc}	257.0 ^b	49.53 ^{bc}	27.78 ^{bc}	0.38 ^d	2.77 ^b	14.00 ^{cd}	0.43 ^{bc}
YJ5	4.84 ^b	151.2 ^b	3.17 ^b	128.7 ^{bc}	14.1 ^{cd}	241.0 ^{bc}	50.52 ^{bc}	23.67 ^{bc}	0.30 ^d	2.14 ^{bc}	11.50 ^{cd}	0.49 ^{bc}
YJCK	5.71 ^{ab}	138.5 ^b	4.65 ^{ab}	148.3 ^{bc}	12.0 ^{cd}	278.7 ^{ab}	33.31 ^{cd}	29.27 ^{ab}	0.31 ^d	0.66 ^c	16.04 ^{cd}	0.49 ^{bc}
YB1	5.06 ^b	218.9 ^{ab}	4.38 ^{ab}	199.3 ^{ab}	13.9 ^{cd}	239.3 ^{bc}	41.33 ^{bc}	29.25 ^{ab}	3.86 ^a	3.28 ^{ab}	11.71 ^{cd}	0.37 ^{bc}
YB2	5.48 ^b	159.5 ^b	3.63 ^b	225.3 ^{ab}	6.1 ^{cd}	178.3 ^{bc}	41.49 ^{bc}	25.28 ^{bc}	3.36 ^{ab}	2.25 ^{bc}	10.71 ^d	0.28 ^c
YB3	5.36 ^b	177.2 ^b	4.71 ^{ab}	137.0 ^{bc}	7.6 ^{cd}	262.3 ^b	45.05 ^{bc}	30.00 ^{ab}	2.57 ^b	2.71 ^b	14.52 ^{cd}	0.38 ^{bc}
YB4	5.16 ^b	194.4 ^b	4.07 ^b	189.0 ^b	5.2 ^{cd}	246.7 ^b	43.36 ^{bc}	28.31 ^b	2.40 ^{bc}	2.77 ^b	9.72 ^d	0.28 ^c
YB5	5.17 ^b	226.1 ^{ab}	7.13 ^a	222.7 ^{ab}	13.4 ^{cd}	296.7 ^{ab}	51.04 ^b	22.91 ^{bc}	3.69 ^{ab}	3.91 ^{ab}	24.77 ^{bc}	0.63 ^{bc}
YBCK	5.12 ^b	96.5 ^b	1.79 ^b	183.3 ^b	1.5 ^d	104.7 ^c	29.20 ^d	9.86 ^d	1.68 ^c	0.28 ^c	12.93 ^{cd}	0.29 ^{bc}
ML1	5.15 ^b	209.6 ^{ab}	5.54 ^{ab}	185.0 ^b	9.8 ^{cd}	277.7 ^{ab}	49.19 ^{bc}	31.69 ^{ab}	0.46 ^d	4.26 ^{ab}	20.21 ^{cd}	0.94 ^{ab}
ML2	5.73 ^{ab}	234.2 ^{ab}	5.54 ^{ab}	186.7 ^b	43.5 ^{ab}	349.0 ^{ab}	49.61 ^{bc}	31.47 ^{ab}	0.69 ^d	3.82 ^{ab}	15.82 ^{cd}	1.14 ^{ab}
ML3	4.98 ^b	187.0 ^b	4.54 ^{ab}	182.7 ^b	14.6 ^c	267.0 ^{ab}	38.75 ^{cd}	28.98 ^{ab}	1.12 ^{cd}	1.34 ^{bc}	21.14 ^c	1.12 ^{ab}
ML4	5.34 ^b	136.6 ^b	2.98 ^b	157.7 ^b	38.4 ^{ab}	342.0 ^{ab}	47.33 ^{bc}	30.73 ^{ab}	0.69 ^d	2.05 ^{bc}	16.29 ^{cd}	0.59 ^{bc}
ML5	5.15 ^b	240.0 ^{ab}	5.20 ^{ab}	213.7 ^{ab}	45.2 ^a	289.7 ^{ab}	45.96 ^{bc}	29.50 ^{ab}	0.74 ^d	3.85 ^{ab}	17.94 ^{cd}	0.89 ^{ab}
MLCK	4.92 ^b	134.6 ^b	2.26 ^b	239.7 ^{ab}	6.1 ^{cd}	198.3 ^{bc}	20.06 ^d	27.47 ^{bc}	0.37 ^d	0.51 ^c	17.84 ^{cd}	0.67 ^{bc}
YY1	5.63 ^b	151.3 ^b	2.55 ^b	121.3 ^{bc}	11.4 ^{cd}	230.0 ^{bc}	56.79 ^{ab}	35.91 ^a	1.24 ^{cd}	2.78 ^b	8.13 ^d	0.43 ^{bc}
YY2	5.09 ^b	243.0 ^{ab}	6.58 ^{ab}	163.3 ^b	7.4 ^{cd}	281.0 ^{ab}	47.88 ^{bc}	31.35 ^{ab}	1.03 ^{cd}	3.83 ^{ab}	14.17 ^{cd}	0.65 ^{bc}
YY3	5.94 ^{ab}	174.4 ^b	4.05 ^b	120.0 ^{bc}	11.5 ^{cd}	277.0 ^{ab}	49.27 ^{bc}	31.10 ^{ab}	0.80 ^d	2.87 ^b	14.34 ^{cd}	0.53 ^{bc}
YY4	5.95 ^{ab}	219.7 ^{ab}	4.98 ^{ab}	140.0 ^{bc}	5.7 ^{cd}	277.0 ^{ab}	44.97 ^{bc}	30.50 ^{ab}	1.36 ^{cd}	2.61 ^{bc}	11.26 ^d	0.62 ^{bc}
YY5	5.15 ^b	197.2 ^b	5.90 ^{ab}	168.0 ^b	11.1 ^{cd}	286.3 ^{ab}	45.02 ^{bc}	30.25 ^{ab}	0.78 ^d	2.84 ^c	11.28 ^d	0.53 ^{bc}
YYCK	5.56 ^b	167.6 ^b	1.79 ^b	62.0 ^c	1.1 ^d	120.3 ^c	30.78 ^{cd}	17.66 ^c	0.74 ^d	0.46 ^c	4.42 ^d	0.41 ^{bc}

注：表中数值为 3 次重复的算术平均值, 在同一列中不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: The arithmetic mean of three replicates is shown with its arithmetic standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

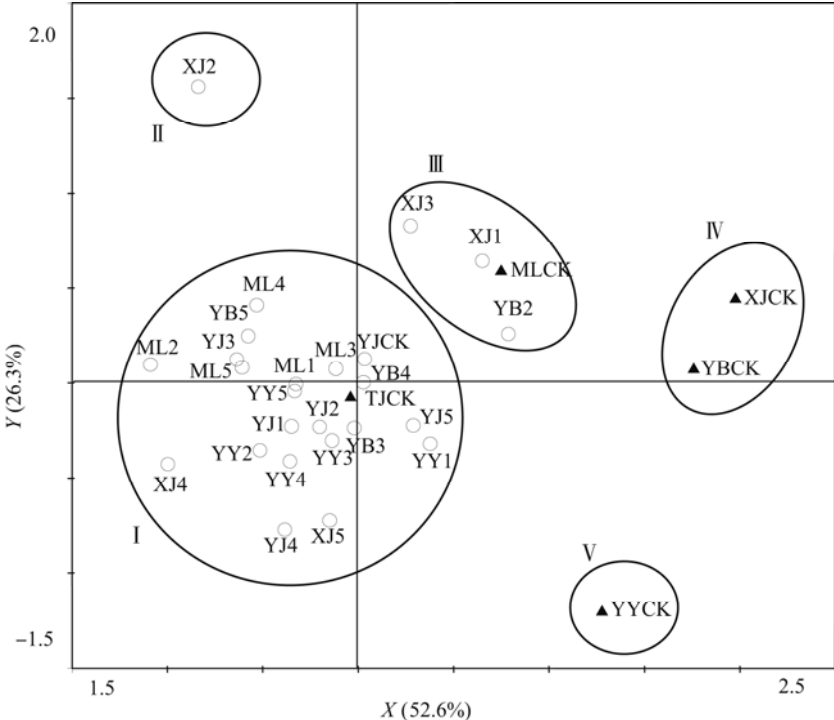


图 1 基于土壤理化的主成分分析图
Figure 1 The PCA plot of soil physical and chemical properties

表 2 各测定项目的主成分得分 Table 2 Component score of the tested indexes			
指标 Index	成分 Component		
	1	2	3
pH	-0.048	0.259	-0.069
有机质 OM	0.161	-0.011	0.085
总氮 TN	0.198	0.071	0.218
速效氮 AN	0.005	0.233	0.354
速效磷 AP	0.169	0.005	-0.248
速效钾 AK	0.211	0.048	-0.092
有效铁 Fe	0.184	-0.075	-0.103
有效锰 Mn	0.177	-0.032	-0.079
有效铜 Cu	-0.003	-0.103	0.644
有效锌 Zn	0.228	-0.067	0.176
交换性钙 Ca	0.011	0.318	0.089
交换性镁 Mg	0.063	0.298	-0.112

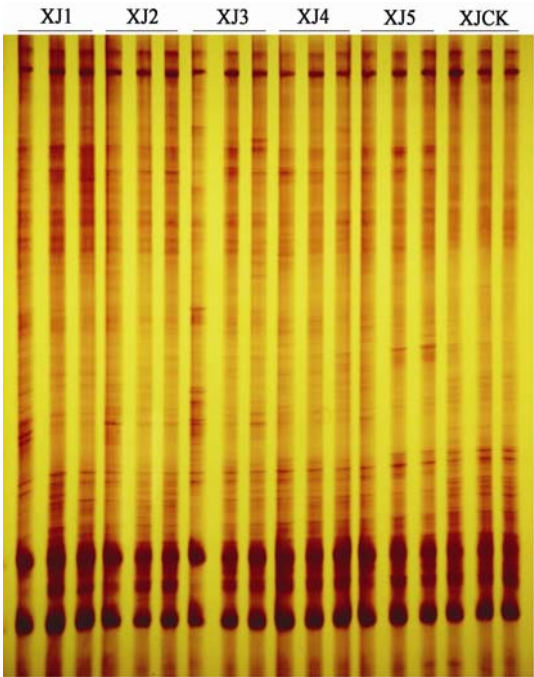


图 2 土壤细菌 DGGE 指纹图谱
Figure 2 DGGE profile of bacterial communities of the soil

表 3 不同土壤细菌群落多样性指数($n=3$)
Table 3 The bacterial diversity index of different soil samples ($n=3$)

样点编号 Sampling No.	马格利夫指数 Margalef index	香农-威纳指数 Shannon-Wiener index	皮卢指数 Pielou's evenness index	辛普森指数 Simpson's diversity index
XJ1	3.71 ^c	3.42 ^c	0.997 ^{ab}	0.967 ^c
XJ2	3.33 ^c	3.33 ^c	0.998 ^{ab}	0.964 ^c
XJ3	3.53 ^c	3.40 ^c	0.999 ^{ab}	0.966 ^c
XJ4	3.78 ^c	3.48 ^c	0.999 ^{ab}	0.969 ^{bc}
XJ5	4.26 ^{bc}	3.61 ^{bc}	0.999 ^{ab}	0.973 ^{bc}
XJCK	4.23 ^{bc}	3.59 ^{bc}	0.999 ^{ab}	0.972 ^{bc}
YJ1	3.69 ^c	3.48 ^{bc}	0.999 ^a	0.969 ^{bc}
YJ2	3.23 ^{cd}	3.32 ^c	0.995 ^b	0.963 ^c
YJ3	3.44 ^c	3.38 ^c	0.993 ^b	0.966 ^c
YJ4	3.09 ^{cd}	3.29 ^c	0.999 ^{ab}	0.963 ^c
YJ5	3.12 ^{cd}	3.29 ^c	0.999 ^a	0.962 ^c
YJCK	2.31 ^d	2.97 ^d	0.998 ^{ab}	0.948 ^c
ML1	3.38 ^c	3.37 ^c	0.999 ^{ab}	0.965 ^c
ML2	5.05 ^b	3.82 ^{ab}	0.999 ^a	0.978 ^a
ML3	5.14 ^a	3.83 ^{ab}	0.999 ^a	0.978 ^{ab}
ML4	4.96 ^b	3.77 ^{ab}	0.999 ^{ab}	0.976 ^a
ML5	4.35 ^{bc}	3.65 ^{bc}	0.999 ^a	0.974 ^{bc}
MLCK	4.66 ^{bc}	3.72 ^{bc}	0.999 ^a	0.975 ^a
YY1	4.11 ^{bc}	3.59 ^{bc}	0.997 ^{ab}	0.972 ^{bc}
YY2	5.04 ^b	3.79 ^{ab}	0.996 ^{ab}	0.977 ^a
YY3	5.12 ^a	3.81 ^{ab}	0.995 ^b	0.977 ^a
YY4	4.73 ^{bc}	3.73 ^b	0.996 ^{ab}	0.976 ^a
YY5	4.68 ^{bc}	3.72 ^{bc}	0.996 ^{ab}	0.976 ^a
YYCK	4.65 ^{bc}	3.71 ^{bc}	0.996 ^{ab}	0.975 ^b
YB1	4.85 ^b	3.77 ^{ab}	0.998 ^{ab}	0.977 ^a
YB2	4.73 ^{bc}	3.70 ^{bc}	0.997 ^{ab}	0.974 ^{bc}
YB3	5.93 ^a	3.99 ^{ab}	0.998 ^{ab}	0.981 ^{ab}
YB4	6.01 ^a	4.00 ^a	0.997 ^{ab}	0.981 ^a
YB5	5.83 ^a	3.97 ^{ab}	0.997 ^{ab}	0.981 ^{ab}
YBCK	5.08 ^a	3.81 ^{ab}	0.996 ^{ab}	0.977 ^a

注：表中数值为 3 次重复的算术平均值，在同一列中不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: The arithmetic mean of three replicates is shown with its arithmetic standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

高。在有效铜 ≥ 0.6517 mg/kg 的 20 个样品中，pH、有效铜、交换性钙及速效钾是影响土壤细菌多样性的主要因素。在一定范围内，pH ($4.800 < \text{pH} < 6.028$) 越小、有效铜($0.6517 \text{ mg/kg} \leq \text{Cu} < 2.0400 \text{ mg/kg}$)含量越小、交换性钙($9.697 \text{ cmol/kg} \leq \text{Ca} < 23.300 \text{ cmol/kg}$)

含量越大，速效钾($243.0 \text{ mg/kg} \leq \text{AK} < 296.7 \text{ mg/kg}$)含量越大，松茸菌塘土壤细菌多样性越大。

在此次多元回归树的构建过程中，共有 6 个所选环境因子没有出现在回归树中，分别为总氮、速效磷、速效铁、速效锰、有效锌及交换性镁，该

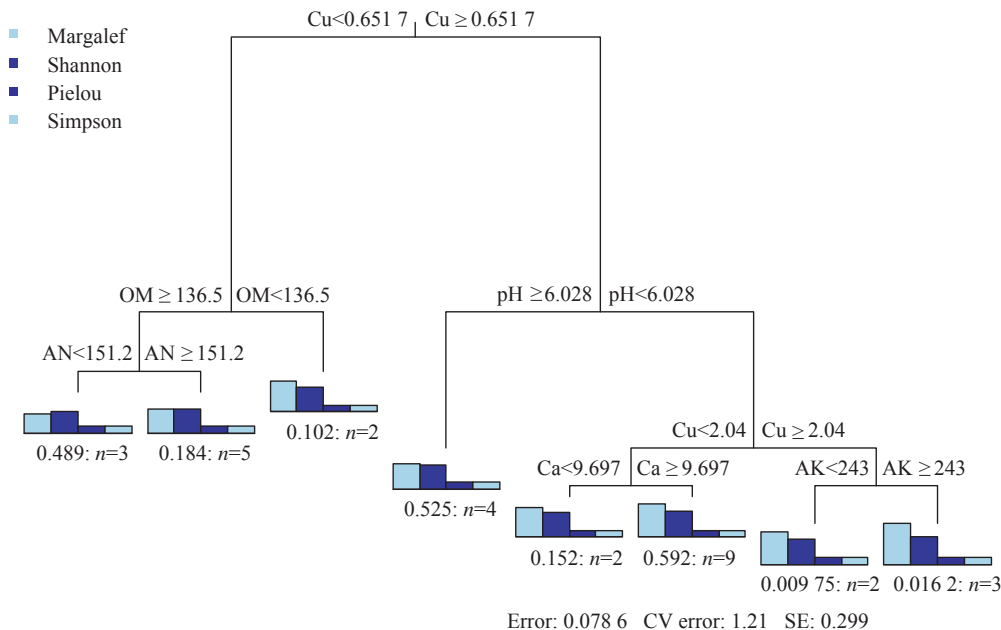


图3 菌塘细菌多样性与土壤因子的多元回归树分析

Figure 3 Multivariate regression tree of diversity of shiro associated with soil factors

注: Cu: 有效铜; OM: 有机质; AN: 速效氮; Ca: 交换性钙; AK: 速效钾; Error: 相对误差; CV error: 交叉验证误差; SE: 交叉验证标准误差。

Note: Cu: Available copper; OM: Organic matter; AN: Available nitrogen; Ca: Exchangeable calcium; AK: Available potassium; Error: Relative error; CV error: Cross-validation error; SE: Cross-validation standard error.

6个土壤理化因子对松茸菌塘细菌多样性的影响并不是特别大。

3 讨论

土壤是松茸及其寄主植物的生长载体,同时也为松茸的生长提供必要的营养元素。松茸生长地土壤的质量对松茸的发生起着较为关键的作用。廖树云等^[14]研究发现松茸菌丝主要分布在寄主根比较集中的真土层中,土壤含水量低、通透性好、偏酸性、有机质、全氮、有效氮及微量元素含量较丰富的土壤有利于松茸的发生。傅伟杰等^[15]通过对松茸发生地土壤的理化性质进行分析研究认为,土壤因子与气候、地形、生物等因子共同存在对松茸起着综合性的影响,理化适宜的土壤是松茸生长发育良好的基地。孟珍贵等^[16]研究表明,松茸菌塘土与非菌塘土理化性质差异明显,松茸的生长吸收大量的营养成分而导致菌塘土肥力较弱。而本研究发现松茸菌塘土壤理化性质之间存在一定差异,菌塘土的

总体肥力水平高于非菌塘土壤,但并未达到显著水平。这在一定程度上表明,肥沃的土壤可能更适宜于四川松茸的生长。

珍稀食药菌生长的森林环境变化和人类活动都会影响菌塘土壤中的细菌多样性和群落结构。随着子实体的生长、发育,菌塘土壤理化性质必然引起变化,进而其细菌多样性及群落组成也会有所不同。清源等^[17]研究发现土壤容重、粉粒含量、pH值、全氮含量、交换性钙镁含量是中国西南地区印度块菌生长的主要限制因子。同时笔者前期研究也发现,生态环境因子中一些因子能显著影响松茸菌塘土壤微生物活性和生物量^[18]。本研究所选择的12个土壤理化因子中,有效铜、有机质、pH、速效氮、交换性钙及速效钾6个因子对菌塘土壤细菌多样性影响较大,而总氮、速效磷、速效铁、速效锰、有效锌及交换性镁则影响较弱。多元回归树不仅修剪出了客观的模型,而且在一定程度上指示了

关键技术参数。当然,不同地区由于气候、光照、种类等相差巨大,关键的土壤因子也往往有所不同。

目前,对于松茸菌塘微生物的研究仍然较少,细菌多样性及群落结构与松茸生长发育之间的关系也仍然是个待解之谜。但有一点可以肯定的是,松茸的生长是严格受制于菌塘微生物和土壤肥力的。如果能够研究清楚松茸菌塘微生物群落结构、土壤理化性质以及它们与松茸生长之间的关系,对于松茸的病害防治、品质外观改善,甚至是松茸的人工抚育、人工栽培都有着重大意义。本文研究为了解松茸菌塘理化特性及影响细菌多样性的土壤因子提供了一个可行的思路,但离揭示其中的“秘密”仍然差距甚远。因此,在未来的研究中应选择一种更为科学和全面的方法,深入探究菌塘细菌、放线菌、真菌甚至是古菌的多样性及群落结构,结合土壤理化性质,分析两者之间相互关系和动态变化,进而联系松茸的生长发育,寻找到影响松茸人工栽培的关键因子。

参 考 文 献

- [1] Lian CL, Narimatsu M, Nara K, et al. *Tricholoma matsutake* in a natural *Pinus densiflora* forest: correspondence between above- and below-ground genets, association with multiple host trees and alteration of existing ectomycorrhizal communities[J]. *New Phytologist*, 2006, 171(4): 825-836
- [2] Vaario LM, Heinonsalo J, Spetz P, et al. The ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake* is a facultative saprotroph *in vitro*[J]. *Mycorrhiza*, 2012, 22(6): 409-418
- [3] Ogawa M. Microbial ecology of “shiro” in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. and its allied species. V. *Tricholoma matsutake* in *Tsuga sieboldii* forests[J]. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 1977, 18(1): 34-36
- [4] Yang MH, Yang XM, Chen LG. Studies on the relationship between *Tricholoma matsutake* and other rhizosphere microorganisms[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 1997, 19(4): 76-80 (in Chinese)
杨民和, 杨新美, 陈立国. 松茸与宿主根际微生物相互关系研究[J]. *江西农业大学学报*, 1997, 19(4): 76-80
- [5] Liu PG, Yuan MS, Wang XH, et al. Notes on the resources of Matsutake group and their reasonable utilization as well as effective conservation in China[J]. *Journal of Natural Resources*, 1999, 14(3): 245-252 (in Chinese)
刘培贵, 袁明生, 王向华, 等. 松茸群生物资源及其合理利用与有效保护[J]. *自然资源学报*, 1999, 14(3): 245-252
- [6] Ohara H, Hamada M. Disappearance of bacteria from the zone of active mycorrhizas in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Singer[J]. *Nature*, 1967, 213(5075): 528-529
- [7] Jiang H, He CG, Yu FQ, et al. Bacterial diversity cultured from shirooms of *Tricholoma matsutake*[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2015, 34(1): 150-156 (in Chinese)
姜华, 何承刚, 于富强, 等. 松口蘑(*Tricholoma matsutake*)菌塘土壤可培养细菌多样性[J]. *生态学杂志*, 2015, 34(1): 150-156
- [8] Torsvik V, Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5(3): 240-245
- [9] Zhang J. Microbial diversity of *Tricholoma matsutake* growth soils in Yajiang, Sichuan, China[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2010 (in Chinese)
张俊. 四川省雅江县松茸生长地土壤微生物多样性研究[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2010
- [10] Webster R, Oliver MA. *Statistical Methods in Soil and Land Resource Survey*[M]. Oxford: Oxford University Press, 1990
- [11] Lu RK. *Soil and Agricultural Chemistry Analysis*[M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2000 (in Chinese)
鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000
- [12] Lane D. 16S/23S rRNA sequencing[A]//Stackebrandt E, Goodfellow M. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*[M]. New York: John Wiley & Sons, 1991: 115-175
- [13] Li XL, Gu YF, Zhang XP, et al. Nitrobacteria community and diversity in the rhizosphere soil of mature tobacco[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(12): 2462-2468 (in Chinese)
李小林, 辜运富, 张小平, 等. 烟草成熟期根际硝化细菌种群的结构及其多样性[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(12): 2462-2468
- [14] Liao SY, Leng HQ, Liu B. The special ecological environment of Matsutake mushroom in Sichuan[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 1991, 9(2): 297-302 (in Chinese)
廖树云, 冷怀琼, 刘彬. 四川松茸的特殊生态研究[J]. *四川农业大学学报*, 1991, 9(2): 297-302
- [15] Fu WJ, Xu GB, Yang SR, et al. Study of soil conditions in *Tricholoma matsutake* producing areas[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 1997, 28(6): 280-282 (in Chinese)
傅伟杰, 许广波, 杨淑荣, 等. 松茸发生地土壤条件的研究[J]. *土壤通报*, 1997, 28(6): 280-282
- [16] Meng ZG, Li Y, Zhao Q, et al. Ecological factors associated with *Tricholoma matsutake* shirooms in Northwest Yunnan Province[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2011, 18(1): 12-17 (in Chinese)
孟珍贵, 李永, 赵琪, 等. 滇西北松口蘑菌塘的生态因子调查[J]. *食用菌学报*, 2011, 18(1): 12-17
- [17] Qing Y, Ji L, Li TX, et al. Topographical and pedological factors adapted to the growth of domestic truffles (*Tuber indicum*)[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, 26(6): 1793-1800 (in Chinese)
清源, 戢林, 李廷轩, 等. 适宜印度块菌生长的地形和土壤因子[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(6): 1793-1800
- [18] Li XL, Jin X, Li Q, et al. Effects of ecological environment factors on soil microorganisms of *Tricholoma matsutake* shiro in Sichuan Province[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2015, 21(1): 164-169 (in Chinese)
李小林, 金鑫, 李强, 等. 生态环境因子对四川松茸菌塘土壤微生物的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2015, 21(1): 164-169