

研究报告

海南濒危树种保育圃白木香与降香黄檀幼苗根部真菌谱系与生态型多样性比较

张琪¹ 杨思琪¹ 何书奋² 罗金环² 任丹丹¹ 丁琼^{1*}

(1. 海南大学热带农林学院 海南 海口 570100)

(2. 三亚市林业科学研究院 海南 三亚 572023)

摘要:【背景】根部真菌是影响植物幼苗存活、定植和生长的重要因子之一，但是苗圃培育的幼苗根部真菌物种组成与生态学特性尚不清楚。【目的】研究苗圃培育的白木香(*Aquilaria sinensis*)与降香黄檀(*Dalbergia odorifera*)幼苗根部真菌群落谱系与生态型多样性，以及宿主植物对根部真菌群落结构的影响。【方法】采集幼苗根尖样品提取基因组 DNA，用真菌通用引物与丛枝菌根真菌(AMF)特异性引物扩增真菌 rDNA-ITS 区，经克隆、测序、序列分析鉴定真菌。通过基于核酸与 Metadata 数据关联分析的 FUNGuild 软件，划分根部真菌的营养型和共位群。采用非公制多维尺度分析法(NMDS)研究幼苗根部真菌群落物种组成差异与宿主植物物种及形态指标的关系。【结果】白木香与降香黄檀幼苗根部真菌物种丰富，达 51 个 OTU；谱系多样性较高，涉及毛霉菌门(Mucoromycota, 51%)、子囊菌门(Ascomycota, 43%)以及担子菌门(Basidiomycota, 6%)。这些根部真菌涉及不同的营养型与共位群，包括共生型真菌 29 种，频度较高的如 *Glomeromycetes* sp. 2、*Rhizophagus irregularis* 等，二者均属于 AMF 共位群；腐生营养型真菌 5 种，如 *Talaromyces pinophilus*、*Rhizopycnis vagum* 等；病原型真菌 2 种，是 *Mycoleptodiscus* sp.和 *Fusarium phaseoli*；还有 15 种其生态类型不确定。NMDS 分析结果表明，宿主植物物种、株高、地径、叶面积对根部真菌群落物种组成的影响不显著。然而，株高对 AMF 群落的物种组成有较弱的影响。【结论】本苗圃条件下，土壤中本土性根部真菌繁殖体较为充足，白木香与降香黄檀幼苗根部真菌群落谱系多样性较高，多种营养型与共位群的根部真菌共存；此外，采用真菌通用引物对 ITS1F/ITS4 研究根部真菌群落物种多样性时，AMF 多样性可能会被极度低估。

关键词: 根部真菌，珍贵乡土树种，谱系，生态型，幼苗

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31360107)

***Corresponding author:** Tel: 86-898-66273591; E-mail: dingqiong@hainu.edu.cn

Received: July 17, 2017; **Accepted:** November 07, 2017; **Published online** (www.cnki.net): December 27, 2017
基金项目: 国家自然科学基金(31360107)

***通信作者:** Tel: 86-898-66273591; E-mail: dingqiong@hainu.edu.cn

收稿日期: 2017-07-17; **接受日期:** 2017-11-07; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2017-12-27

Comparison of phylogenetic diversity and ecological types of root-associated fungi on *Aquilaria sinensis* and *Dalbergia odorifera* seedlings in an endangered plant restoration nursery of Hainan Island

ZHANG Qi¹ YANG Si-Qi¹ HE Shu-Fen² LUO Jin-Huan²
REN Dan-Dan¹ DING Qiong^{1*}

(1. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570100, China)

(2. Sanya Forestry Institute, Sanya, Hainan 572023, China)

Abstract: [Background] Root-associated fungi (RAF) are essential for seedling survival, establishment and growth. However, little is known about the identity and ecological characteristics of RAF naturally established on seedling roots. [Objective] To reveal phylogenetic diversities and ecological types of RAF naturally established on nursery grown seedling of *Aquilaria sinensis* and *Dalbergia odorifera* and to evaluate the host effects on RAF community structuring. [Methods] Root samples were collected to extract DNA, from which fungal ITS region was amplified, cloned and sequenced by using both universal and specific fungal primer pairs. Phylogenetic placements of fungi were inferred by ITS sequence analysis. The putative trophic modes and guilds of RAF were assigned by functional analysis with the FUNGuild software. Effects of plant species, height, basal diameter and leaf area on root-associated fungal species composition were determined by non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis. [Results] *A. sinensis* and *D. odorifera* seedlings grown in nurseries were naturally colonized by a highly diverse suite of RAF, including Mucoromycota (51%), Ascomycota (43%) and Basidiomycota (6%). These RAF can be assigned to multiple trophic modes and guilds including symbiotroph (29 species) representing by *Glomeromycetes* sp. 2, *Rhizophagus irregularis*, and saprotroph (5 species) representing by *Talaromyces pinophilus* and *Rhizopycnis vagum*. In addition, two fungal species, *Mycoleptodiscus* sp. and *Fusarium phaseoli* were assigned to pathotroph, while ecological characteristics of 15 species are unclear. NMDS analysis indicated that the effects of host plant species, plant height, basal diameter and leaf area of seedling on root-associated fungi were not significant. However weak effect of plant height was found in Arbuscular mycorrhiza fungi fungal community. [Conclusion] The RAF inoculum is high in culture media of this nursery that seedlings were associated with phylogenetically distant and multiple trophic modes and guilds of fungi. Diversity of AMF might be underrepresented when universal primers such as ITS1F/ITS4 were applied to investigate the diversity of RAF community.

Keywords: Root-associated fungi, Valuable indigenous tree species, Phylogeny, Ecological type, Seedling

根部真菌(Root-associated fungi ,RAF)是指生长在植物根系组织内部、根表、根外的真菌总称,该类真菌能直接或间接对植物产生中性、有益或有害的效应^[1]。RAF 按其营养特性可分为共生型、腐生型和病原型真菌。共生型 RAF 主要包括菌根真菌和内生真菌。丛枝菌根真菌(Arbuscular mycorrhiza fungi ,AMF)是最普遍的共生型 RAF ,最新分类系统将其分类地位由原来的球囊菌门(Glomeromycota)降为球囊菌亚门(Glomeromycotina) ,并划归到毛霉菌

门(Mucoromycota)^[2]。AMF 能与 90%以上的有花植物共生,促进植物对土壤养分尤其是磷的吸收,进而调节植物生长及抗逆性^[3]。内生真菌是共生型 RAF 的又一大类群,生活在植物组织内,不引起植物组织产生明显病症,能产生具有生理活性的物质,促进或抑制植物生长^[4]。腐生真菌也是 RAF 中的重要类群,它能分解根系的老废及死亡组织供植物利用,并对幼苗期的病原型真菌有拮抗作用^[5]。病原型 RAF 在苗圃幼苗根部被频繁检测到,它不仅影

响幼苗在苗圃中的死亡率,也极大地影响幼苗出圃后的存活率^[6]。真菌是异养生物,依赖植物的光合产物提供营养。因此,真菌的生长繁殖和植物之间关系非常密切^[7],尤其是对共生型的菌根真菌而言,宿主植物物种是真菌群落构建的主要驱动因子^[8]。

真菌核糖体内转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)是综合性能较为优越的真菌 DNA 条形码序列,适合真菌群落物种多样性研究^[9]。真菌通用引物 ITS1F/ITS4 及其改良的系列引物能扩增多类真菌,如子囊菌、担子菌以及 AMF,被广泛应用于环境真菌检测。然而,采用真菌通用引物检测到的 RAF 群落中,AMF 的物种数偏低,如蔷薇属植物群落检测到的 31 种 RAF 中,AMF 仅有 5 种^[10];日本温带森林 31 种非外生菌根植物检测到的 268 种 RAF 中,仅有 10 种为 AMF^[11]。采用 AMF 特异性引物的研究却显示,根部 AMF 多样性极高,如泰国热带橡胶园中仅从橡胶树和木薯根系上检测到的 AMF 分别可达 95 种和 87 种,单株上检测到的 AMF 平均物种数分别为 18 种和 23 种^[12]。因此,通用引物虽然能更全面地揭示根部真菌的谱系组成,但却可能会低估 RAF 群落中的 AMF 多样性。

瑞香科植物白木香(*Aquilaria sinensis*)和豆科植物降香黄檀(*Dalbergia odorifera*)均为海南珍贵乡土树种,为满足市场对珍贵乡土树种的需求,海南大力开展珍贵乡土树种的人工育苗工作,每年培育的白木香和降香黄檀幼苗分别约 1 000 万株和 1 500 万株。苗期是植物生长最脆弱的阶段,有研究者发现接种菌根真菌能有效促进幼苗的生长^[13]。然而有研究表明,幼苗出圃移栽后,在新环境因子的驱动下,人工接种的真菌会随时间迁移逐渐被本土性真菌取代^[14]。因此,本土性真菌繁殖体是苗圃幼苗可持续的侵染源。当前尚不清楚苗圃条件下,未接种真菌的土壤介质中是否有真菌繁殖体侵染幼苗根系,以及不同宿主植物幼苗的根部真菌群落物种组成是否存在差异。本研究采用真菌通用引物与 AMF 特异性引物进行研究来揭示三亚苗圃白木香和降香黄檀幼苗 RAF 谱系多样性,并应用基于

Metadata 关联的方法研究 RAF 的生态学特性,以及非公制多维尺度分析(Non-metric multidimensional scaling, NMDS)研究宿主植物对 RAF 群落物种组成的影响。此外还探讨引物选择、测序深度对揭示 RAF 群落物种多样性的潜在影响。研究结果对热带地区珍贵乡土树种育苗、种群恢复、资源保护与利用有重要的理论与实践意义。

1 材料与方法

1.1 试验地及基本情况

海南濒危树种保育圃是三亚林业科学研究院的科研苗圃,位于海南省三亚市南部的天涯区凤凰片区内(E113°02', N28°06'),占地约 46 hm²,为海南岛最大的热带珍稀濒危树种种质资源库。本苗圃地处热带海洋季风性气候区,年平均气温为 25.4 °C,气温最高月为 7 月,平均气温为 28.4 °C;气温最低月为 1 月,平均气温为 21.0 °C。极端气温最高 35.9 °C,最低 5.1 °C。全年日照时数达 2 563 h,光照充足,全年有 300 d 以上艳阳高照。年降雨量在 600–2 000 mm,6–10 月为雨季,降水量约占全年的 90%,11 月至翌年 4 月为旱季。本区母岩为花岗岩,土壤属沙壤性砖红壤,土层深厚。苗圃内地势平坦,平均海拔 5–8 m。本研究中白木香与降香黄檀的育苗介质为排水良好的砂质土壤,其土壤 pH 为 7.2–7.4,养分含量为 铵态氮 16.33±6.30 mg/kg,速效磷 19.85±2.38 mg/kg,速效钾 19.53±4.05 mg/kg,有机质 10.50±0.40 g/kg。

1.2 主要试剂和仪器

Taq 聚合酶、DNA 纯化试剂盒,北京艾德莱生物科技有限公司; *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞、pMD19-T 载体,宝生物工程(大连)有限公司。高通量多样品组织研磨仪,南京先欧仪器制造有限公司; PCR 扩增仪,力康生物医疗科技控股有限公司;电泳仪,北京君意东方电泳仪器设备有限公司;紫外凝胶成像系统,北京五洲东方科技发展有限公司。

CTAB 缓冲液配方 :0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0 ;

0.02 mol/L EDTA ,pH 8.0 ;1.4 mol/L NaCl ,2% CTAB (质量体积比)。

1.3 样品采集与处理

试验所用白木香与降香黄檀幼苗为 2015 年播种于育苗钵的,苗龄 1.5 年,外观健康,叶色浓绿、无明显病虫害。幼苗株高、地径、叶面积等形态学指标见表 1。沿苗圃东西方向以 200 m 以上间隔距离取白木香与降香黄檀幼苗各 3 株,去除根围育苗介质,取出完整的根系,用流水洗净根系表面附着的土壤等杂质,再以无菌水清洗 2 遍。以每株幼苗根颈部为中心,沿根系的 10 个不同方向各剪下 2 段长约 1 cm 的最末一级侧根的根段,再以无菌水清洗 2 遍,置于灭菌的滤纸上吸干多余的水分,将每个方向的根尖转移到一个 2 mL 离心管中,向管中加入 50 μ L CTAB 提取缓冲液,放置于-80 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 真菌分子检测

1.4.1 DNA 提取

取出冷冻的 60 份根尖样品(单份根尖样品重量为 6.25 ± 0.85 mg),参考黄彩微等的方法提取根系总 DNA^[15]。具体步骤如下:用高通量组织研磨仪研磨根尖组织至匀浆状,向离心管中加入 650 μ L CTAB 提取缓冲液,置于 65 $^{\circ}$ C 水浴 1 h(每 15 min 振荡一次)。取出离心管,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1, 体积比)摇匀,室温下 12 000 r/min 离心 8 min,吸取上清液,重复操作 1 次。将上清液转移到 1.5 mL 离心管中,加入 2 倍体积的冰无水乙醇,置于-20 $^{\circ}$ C 沉淀过夜。将过夜的离心管取出,室温下 12 000 r/min 离心 8 min,弃上清液,

表 1 白木香与降香黄檀幼苗形态指标

Table 1 Morphological indices of *Aquilaria sinensis* and *Dalbergia odorifera* seedlings

形态指标	白木香	降香黄檀
Morphological indices	<i>Aquilaria sinensis</i>	<i>Dalbergia odorifera</i>
地径	0.90 \pm 0.26	0.53 \pm 0.08
Ground diameter (cm)		
株高	64.00 \pm 14.42	48.00 \pm 3.46
Plant height (cm)		
叶面积	19.69 \pm 3.69	12.84 \pm 1.47
Leaf area (cm ²)		

加 75%乙醇 500 μ L 润洗 2 次,将沉淀物放入 60 $^{\circ}$ C 烘箱烘干,最后向 DNA 沉淀中加 20 μ L 无菌双蒸水溶解,置-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4.2 ITS 扩增

以真菌通用引物 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTA GAGGAAGTAA-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT GATATGC-3')扩增真菌的 ITS 区。PCR 反应体系:模板 DNA (15-110 ng/ μ L) 1 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, ITS1F 与 ITS4 引物 (10 μ mol/L)各 1 μ L, 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶, ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 55 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。对于 AMF,采用 Nested PCR 法扩增 AMF 的 ITS 区,即第一轮 PCR 采用 AMF 特异性引物 SSUmAf (5'-TGGGTAATCTTTTGAAACTTYA-3'; 5'-TGGGTAATCTTRTGAAACTTCA-3')和 LSUMAr (5'-TCGCTCTTCAACGAGGAATC-3'; 5'-TATTGT TCTTCAACGAGGAATC-3'; 5'-TATTGCTCTTNA ACGAGGAATC-3'),扩增区域涵盖 28S 大亚基 (LSU) rDNA 部分区域、完整的 ITS 区以及 18S 小亚基 (SSU) rDNA 的部分区域。这套引物可以扩增当前已知的 AMF 所有类群^[16]。PCR 反应体系:模板 DNA (15-110 ng/ μ L) 1 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, SSUmAf 与 LSUMAr 引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶, ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 40 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 15 min。再以本轮 PCR 的扩增子为模板,用真菌通用引物对 ITS1F/ITS4 进行第二轮扩增,得到 AMF 的 ITS 区扩增产物。最后分别将 PCR 产物在 1.5%的琼脂糖凝胶上电泳,用凝胶成像仪观察、拍照。

1.4.3 PCR 产物克隆及测序

每株幼苗独立扩增 10 份样品,所获 PCR 产物混合后切胶纯化。将回收的 PCR 产物作为外源 DNA 克隆到 pMD19-T 载体,在 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,用 *E. coli* DH5 α 感受态细胞进行转化。6 株幼苗、2 类引物共构建 12 个克隆文库,从每个真菌克隆

文库中随机挑选 48 个呈白斑的克隆, 用引物对 ITS1F/ITS4 扩增; PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳检测。电泳检测呈阳性的 PCR 产物委托生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.5 真菌 ITS 序列分析

在 Bioedit (Version 7.2.5) 中对真菌的 ITS1-5.8S-ITS2 全序列进行编辑, 使用 ClustalX (Version 2.1.0) 进行比对, 用 Mothur (Version 1.0.0) 划分真菌 OTU。AMF 的 ITS 序列一致性 (Identity) $\geq 92\%$ 的真菌被视为同一个分类单元 (Operational taxonomical unit, OTU)^[17-18], AMF 以外的真菌 ITS 序列一致性 $\geq 97\%$ 视为同一 OTU^[19-20], 在 NCBI 数据库中检索与 OTU 代表序列亲缘关系最近的真菌序列, 推断真菌的分类地位。所有 OTU 代表序列提交 NCBI, 已添加至 GenBank 数据库中, 序列号为 KY965393-KY965443。

1.6 数据分析

采用基于核酸与 Metadata 数据关联分析的 FUNGuild 软件^[21], 将 2 种植物的 RAF 划到不同的营养型 (Trophic mode) 和共位群 (Guild)。营养型包括共生型 (Symbiotroph)、腐生型 (Saprotroph)、病原型 (Pathotroph) 以及介于 2 种或几种营养型的过渡型; 共位群包括杜鹃花菌根真菌、外生菌根真菌、丛枝菌根真菌、兰科植物菌根真菌、内生真菌、病原真菌、腐生真菌^[22]。构建真菌-植物相互作用的 0,1 矩阵, 对 2 种宿主植物与 2 种引物组合的克隆文库中真菌的谱系进行聚类以比较其谱系组成差异。采用 NMDS 的方法研究幼苗 RAF 群落物种组成差异 (Bray-Curtis distance) 与宿主植物物种、形态学指标 (株高、地径、叶面积) 的关系。

2 结果与分析

2.1 白木香与降香黄檀幼苗根部真菌的谱系与生态类型

2 种引物的扩增子构建的 RAF 克隆文库共 12 个, 从中筛选出 576 个克隆用于测序。其中, 真菌通用引物对应的克隆文库获得 79 条有效真菌序列和 165 条

植物序列, 划分为 28 个真菌 OTU; AMF 特异性引物对应的克隆文库获得 256 条有效真菌序列, 划分为 24 个 OTU (表 2)。从白木香幼苗检测到的 RAF 有 4 类, 分别为球囊霉纲 (Glomeromycetes)、粪壳菌纲 (Sordariomycetes)、座囊菌纲 (Dothideomycetes) 和伞菌纲 (Agaricomycetes)。物种最丰富的是球囊霉纲, 共 14 种 (54%); 其次为粪壳菌纲 6 种 (23%)。在目水平上, 球囊霉目 (Glomerales) 物种最丰富, 占 38%; 其次为格孢腔菌目 (Pleosporales), 占 12% (图 1)。降香黄檀幼苗 RAF 有 5 类, 物种数由高到低依次为球囊霉纲 14 种 (52%)、粪壳菌纲 10 种 (37%)、座囊菌纲 1 种 (4%)、伞菌纲 1 种 (4%) 及散囊菌纲 (Eurotiomycetes) 1 种 (4%); 在目水平上, 球囊霉目 (Glomerales) 的真菌物种最丰富, 占 22%; 其次为格孢腔菌目 (Pleosporales), 占 7% (图 1)。白木香与降香黄檀幼苗的共有真菌仅 2 种, *Glomeromycetes* sp. 2 和 *Rhizophagus irregularis*。其中, *Glomeromycetes* sp. 2 被检测到的频度最高, 在 83% 幼苗根部均被检测到; *R. irregularis* 在 33% 幼苗根部被检测到。仅在白木香或降香黄檀幼苗根部检测到的真菌分别为 24 与 25 种 (图 2)。

采用 FUNGuild 软件分析 RAF 的生态类型, 结果表明, 2 种植物幼苗的 RAF 群落中, 物种最丰富的是共生型真菌, 主要包括球囊菌纲的 26 种真菌以及伞菌纲的 3 种真菌, 前者是公认的 AMF, 后 3 种真菌 (*Ceratobasidium* sp. 1、*Ceratobasidium* sp. 2 和 *Ceratobasidium* sp. 3) 被确定为外生菌根真菌; 腐生真菌是 2 种幼苗 RAF 群落中第二大类群, 共 5 种, 分别为 *Conlarium* sp.、*Rhizopycnis vagum*、*Talaromyces pinophilus*、*Thielavia terricola*、*Trichoderma virens*; 此外, 还有 2 种真菌分别被确定为病原型真菌 (*Mycoleptodiscus* sp.) 和病原-腐生过渡型真菌 (*Fusarium phaseoli*) (表 2)。白木香幼苗 RAF 至少包括 2 种生态类型: 共生型和腐生型, 各占 62% 和 8%; 降香黄檀幼苗 RAF 至少包括 4 种生态类型: 共生型、腐生型、病原型、病原-腐生过渡型, 各占 56%、11%、4% 和 4% (图 3)。

表 2 白木香与降香黄檀幼苗根系共生真菌的谱系与生态学特性

Table 2 Taxonomic affinities and ecological characteristics of root-associated fungi of *Aquilaria sinensis* and *Dalbergia odorifera* seedlings

分类单元 OTUs	鉴定名 Fungal name	BLAST 最接近比对 Closest BLAST match	一致性 Identity	扩增引物		真菌生态学特性		
				Primer pairs		Ecological characteristic of fungi		
				真菌通用引物 Fungal universal	AMF 特异性 引物 AMF specific	营养型 Trophic Mode	共位群 Guild	可靠度 Confidence Ranking
1	<i>Ceratobasidium</i> sp. 1	<i>Ceratobasidium</i> sp. (KJ573103)	652/657(99%)	+	-	Symbiotroph	Ectomycorrhizal	Possible
2	<i>Ceratobasidium</i> sp. 2	<i>Ceratobasidium</i> sp. (DQ102438)	673/695(97%)	+	-	Symbiotroph	Ectomycorrhizal	Possible
3	<i>Ceratobasidium</i> sp. 3	<i>Ceratobasidium</i> sp. (KC782943)	654/663(99%)	+	-	Symbiotroph	Ectomycorrhizal	Possible
4	Chaetomiaceae sp.	<i>Zopfiella</i> sp. (KX347480)	505/528(95%)	+	-	Unidentified	Unidentified	Unidentified
5	<i>Codinaea acaciae</i>	<i>Codinaea acaciae</i> . (KR476732)	555/564(98%)	+	-	Unidentified	Unidentified	Unidentified
6	<i>Conlarium</i> sp.	<i>Conlarium</i> sp. (AB847000)	517/533(97%)	+	-	Saprotroph	Undefined Saprotroph	Probable
7	Dothideomycetes sp.	Dothideomycetes sp. (KRR18855)	542/557(97%)	+	-	Unidentified	Unidentified	Unidentified
8	<i>Fusarium phaseoli</i>	<i>Fusarium phaseoli</i> (KR012896)	565/570(99%)	+	-	Pathotroph-Saprotroph	Plant Pathogen-Soil or Wood Saprotroph	Probable
9	Glomeraceae sp. 1	<i>Glomus</i> sp. (KF849694)	552/608(91%)	-	+	Symbiotroph	Arbuscular Mycorrhizal	Highly Probable
10	Glomeraceae sp. 2	<i>Dominikia</i> sp. (KM056662)	328/378(87%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
11	Glomeraceae sp. 3	<i>Glomus</i> sp. (KF836969)	323/375(86%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
12	Glomeraceae sp. 4	<i>Glomus</i> sp. (KF836907)	513/577(89%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
13	Glomerates sp.	<i>Glomus macrocarpum</i> (FR750542)	495/608(82%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
14	Glomeromycetes sp. 1	Glomeromycetes sp. (JQ272369)	494/538(92%)	+	-	Symbiotroph	AM	Highly Probable
15	Glomeromycetes sp. 2	Glomeromycetes sp. (JQ272369)	513/560(92%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
16	Glomeromycetes sp. 3	Glomeromycetes sp. (JQ272369)	502/558(90%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
17	Glomeromycetes sp. 4	Glomeromycetes sp. (JQ272369)	506/565(90%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
18	Glomeromycetes sp. 5	Glomeromycetes sp. (JQ272369)	525/558(94%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
19	Glomeromycetes sp. 6	Glomeromycetes sp. (JQ272369)	481/559(86%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
20	Glomeromycetes sp. 7	Glomeromycetes sp. (KF359634)	508/582(87%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
21	Glomeromycetes sp. 8	Glomeromycota sp. (KJ484689)	555/572(97%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
22	Glomeromycetes sp. 9	Glomeromycota sp. (KT378077)	553/598(92%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
23	Glomeromycetes sp. 10	Glomeromycota sp. (KM208238)	315/355(89%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable

(待续)

(续表 2)

24	<i>Glomus</i> sp. 1	<i>Glomus</i> sp. (JN195694)	571/587(97%)	+	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
25	<i>Glomus</i> sp. 2	<i>Glomus</i> sp. (KF836923)	601/631(95%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
26	<i>Glomus</i> sp. 3	<i>Glomus</i> sp. (AY842565)	558/593(94%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
27	<i>Glomus</i> sp. 4	<i>Glomus</i> sp. (KF836922)	548/573(96%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
28	<i>Glomus</i> sp. 5	<i>Glomus</i> sp. (KF836977)	456/485(94%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
29	<i>Glomus</i> sp. 6	<i>Glomus</i> sp. (KF836907)	538/570(94%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
30	<i>Glomus</i> sp. 7	<i>Glomus</i> sp. (AM076603)	602/629(96%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
31	<i>Glomus</i> sp. 8	<i>Glomus</i> sp. (KM041891)	561/567(99%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
32	<i>Glomus</i> sp. 9	<i>Glomus</i> sp. (KF836922)	454/473(96%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
33	Lasiosphaeriaceae sp.	<i>Podospira intestinacea</i> (AY999121)	502/541(93%)	+	-	Unidentified	Unidentified	Unidentified
34	Lophiostomataceae sp.	<i>Lophiostoma</i> cf. (KF850378)	438/488(90%)	+	-	Unidentified	Unidentified	Unidentified
35	<i>Mycoleptodiscus</i> sp.	<i>Mycoleptodiscus</i> sp. (KU512714)	547/557(98%)	+	-	Pathotroph	Plant Pathogen	Probable
36	<i>Paraglomus brasiliatum</i>	<i>Paraglomus brasiliatum</i> (FR750048)	590/606(97%)	+	-	Symbiotroph	AM	Highly Probable
37	Pleosporales sp. 1	Pleosporales sp. (AB986463)	541/611(89%)	+	-	Unidentified	Unidentified	Unidentified
38	Pleosporales sp. 2	<i>Preussia</i> sp. (FN386290)	498/580(86%)	+	-	Unidentified	Unidentified	Unidentified
39	<i>Rhizophagus irregularis</i>	<i>Rhizophagus irregularis</i> (HF968920)	582/585(99%)	-	+	Symbiotroph	AM	Highly Probable
40	<i>Rhizopycnis vagum</i>	<i>Rhizopycnis vagum</i> (AF022786)	537/542(99%)	+	-	Saprotroph	Undefined Saprotroph	Probable
41	Sordariomycetes sp. 1	Microascus cirrosus (KX272862)	342/417(82%)	+	-	Unidentified	Unidentified	Unidentified
42	Sordariomycetes sp. 2	Sordariomycetes sp. (AB846990)	532/646(82%)	+	-	Unidentified	Unidentified	Unidentified
43	Sordariomycetes sp. 3	Sordariomycetes sp. (KR818859)	553/639(87%)	+	-	Unidentified	Unidentified	Unidentified
44	Sordariomycetes sp. 4	Sordariomycetes sp. (KR818859)	588/624(94%)	+	-	Unidentified	Unidentified	Unidentified
45	Sordariomycetes sp. 5	<i>Conlarium</i> sp. (AB847000)	485/532(91%)	+	-	Unidentified	Unidentified	Unidentified
46	Sordariomycetes sp. 6	<i>Lasiosphaeria glabrata</i> (AY587914)	510/606(84%)	+	-	Unidentified	Unidentified	Unidentified
47	Sordariomycetes sp. 7	<i>Stachybotrys chartarum</i> (KC305280)	329/405(81%)	+	-	Unidentified	Unidentified	Unidentified
48	Sordariomycetes sp. 8	Ascomycota sp. (HQ649984)	563/605(93%)	+	-	Unidentified	Unidentified	Unidentified
49	<i>Talaromyces pinophilus</i>	<i>Talaromyces pinophilus</i> (KX527875)	570/581(98%)	+	-	Saprotroph	Undefined Saprotroph	Probable
50	<i>Thielavia terricola</i>	<i>Thielavia terricola</i> (GU966509)	561/565(99%)	+	-	Saprotroph	Undefined Saprotroph	Highly Probable
51	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Trichoderma virens</i> (KP263634)	600/601(99%)	+	-	Saprotroph	Wood Saprotroph	Highly Probable

注: “+”和“-”分别代表 PCR 产物电泳检测呈阳性和阴性。

Note: “+” and “-” represent positive and negative PCR amplifications, respectively.

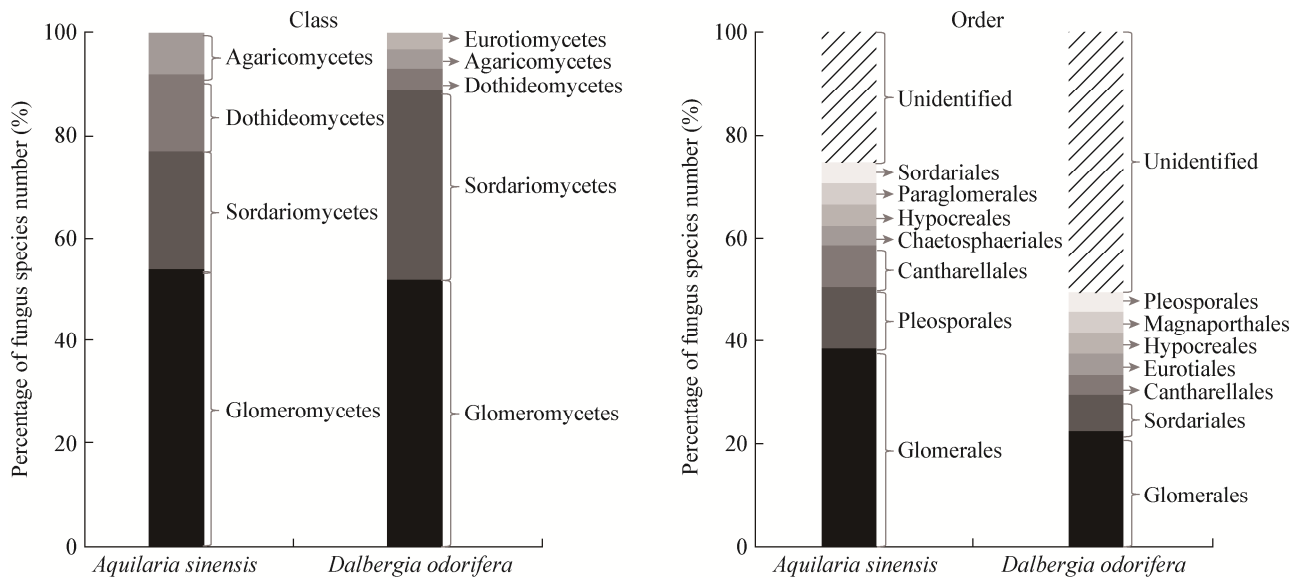


图 1 白木香与降香黄檀幼苗根部真菌类群在纲、目水平上的组成比较

Figure 1 Compositional differences of root-associated fungi grouped by Class or Order between *Aquilaria sinensis* and *Dalbergia odorifera* seedlings

2.2 宿主植物对幼苗根部真菌群落物种组成的影响

采用 NMDS 分析的结果表明,对于整个 RAF 群落而言,宿主植物的物种、叶面积、株高、地径均对真菌群落的物种组成没有明显的影响(表 3)。对于 AMF 群落而言,虽然宿主植物的物种、叶面积、地径对 AMF 群落的物种组成也没有明显的影响,但是群落的物种组成沿 NMDS1 与 NMDS2 轴的变异量中,有 79% 的变异量可以通过幼苗株高的差异解释,只是这一效应相对较弱(NMDS, $P=0.082$) (表 3, 图 4)。

2.3 引物与测序深度对揭示植物根部真菌群落的影响

真菌通用引物既能检测到子囊菌门真菌(22 种),又能检测到担子菌门真菌和 AMF (各 3 种),而 AMF 特异性引物仅能检测到毛霉菌门真菌,但物种数多达 24 种,并且真菌通用引物与 AMF 特异性引物检测到的共有 AMF 仅有 1 种(*Glomus* sp. 1)相同(图 5)。

基于克隆数的 RAF 物种累积曲线显示,采用真菌通用引物在单株幼苗根部检测到的真菌物种数介于 3–7 种,当检测到的 RAF 序列克隆数达到

40 个以上时,真菌物种数增加的趋势变平缓;而 AMF 特异性引物在单株幼苗根部检测到的真菌物种数介于 4–7 种,当检测到的 RAF 测序克隆数达到 30 个以上时,真菌物种数增加的趋势即变平缓(图 6)。

3 讨论与结论

根部真菌是影响植物幼苗存活、定植和生长的重要因子之一^[23]。因此,揭示苗圃育苗的土壤介质中本土性的 RAF 谱系与功能多样性,对热带地区珍贵乡土树种育苗、种群恢复、资源保护与利用有重要的理论和实践意义。

3.1 苗圃白木香与降香黄檀幼苗 RAF 谱系和功能多样性

从 2 种植物幼苗根部检测到的 RAF 谱系多样性高,包括担子菌门、子囊菌门、毛霉菌门真菌,并且这些真菌的生态类型较丰富,有腐生型也有共生型,这一结果表明,海南濒危树种保育圃育苗中普遍采用的土壤介质中存在较多的本土性真菌接种源。以 AMF 为代表的共生型真菌是白木香与降香黄檀幼苗 RAF 群落中物种最丰富的类群,

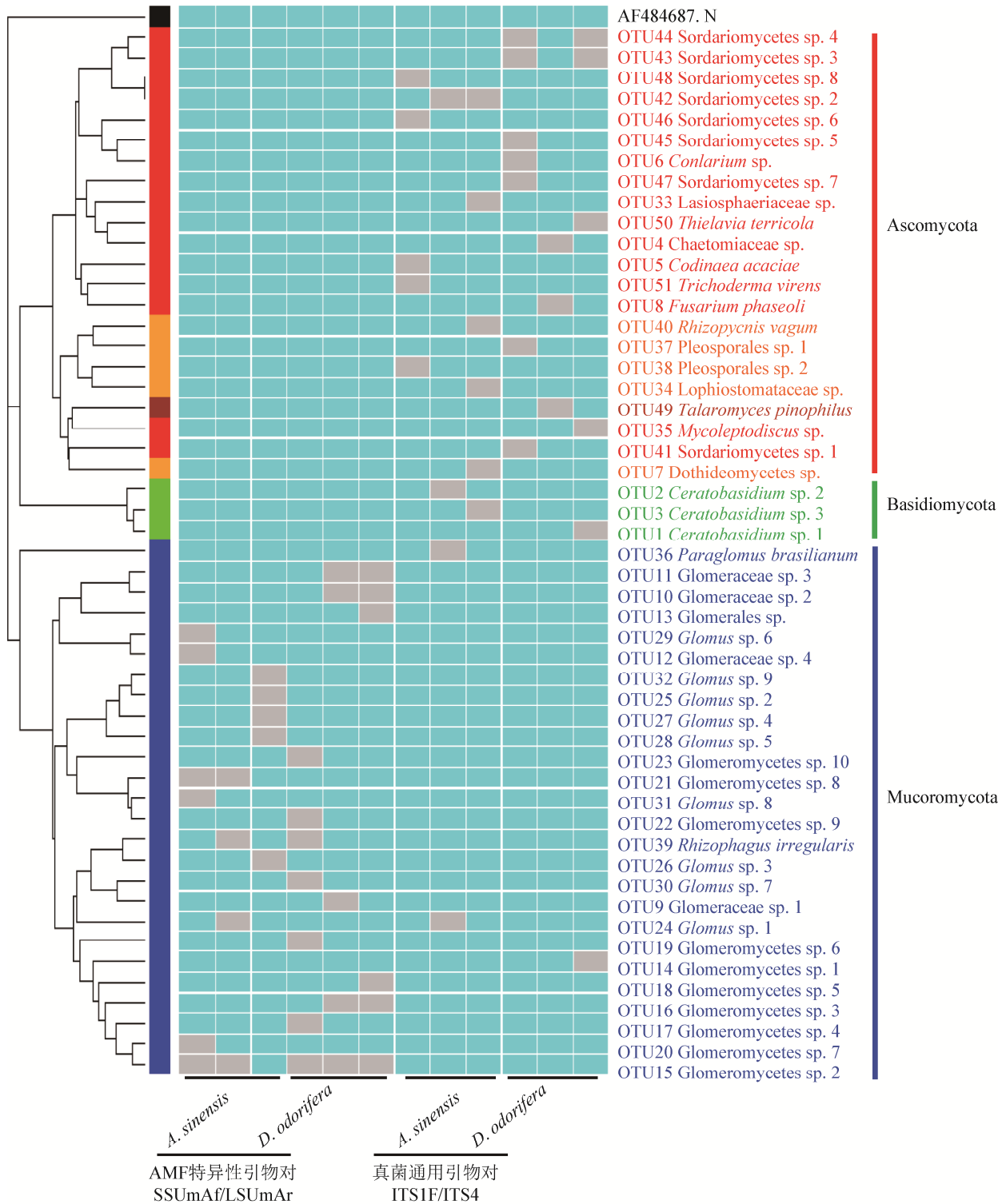


图 2 丛枝菌根真菌专性与真菌通用引物扩增的白木香与降香黄檀幼苗根部真菌谱系组成聚类图

Figure 2 Phylogenetic clustering of root-associated fungi of *Aquilaria sinensis* and *Dalbergia odorifera* seedlings revealed by AMF specific and fungal universal primer pairs

注：灰色与天蓝色分别对应相互作用的有/无(1/0).

Note : Grey and sky blue represent presence and absence (1/0) of interaction between plant and fungus.

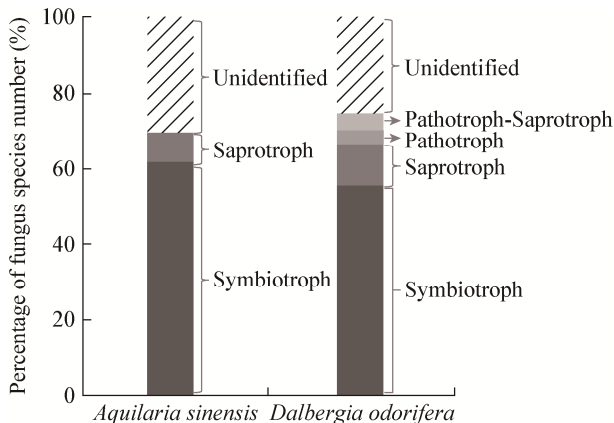


图3 白木香与降香黄檀幼苗根部真菌生态类型组成比较
Figure 3 Comparison of ecological types of root-associated fungi associated with *Aquilaria sinensis* and *Dalbergia odorifera*

如 *Glomus* sp. 1 和 *Rhizophagus irregularis* 等, 这类菌根真菌可能促进这 2 种植物幼苗的营养吸收与环境适应性^[3]。以子囊菌门为主的腐生型真菌在白木香与降香黄檀幼苗 RAF 群落中也较常见, 如 *Trichoderma virens* 与 *Talaromyces pinophilus*。这 2 种真菌分别在瑞典森林苗圃与埃及农田中被检测到, 并且前者对病害可能有拮抗作用^[5], 后者能产生 β -葡萄糖苷水解酶促进有机质分解^[24]。本研究中, 83% 以上的幼苗根部同时检测到共生型与腐生型真菌。有研究表明人工接种腐生真菌有效地促进了 *Pinus radiata* 幼苗生长, 而且同时接种腐生真菌与菌根真菌效果更好^[25]。因此, 本研究中同株幼苗根部 2 种生态类型的真菌共存可能对幼苗养分吸收有积极的作用。本研究从降香黄檀幼苗根系检测到少量的病原型真菌, 如子囊菌门的

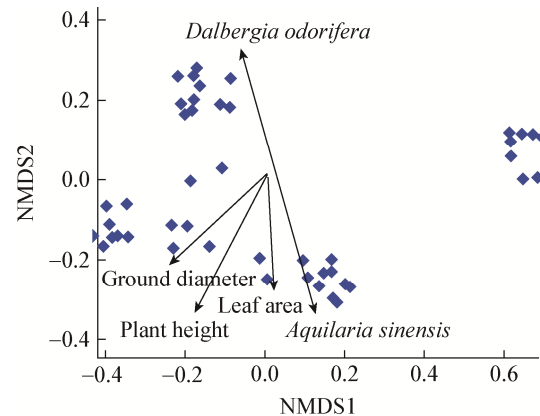


图4 植物物种、地径、株高、叶面积对丛枝菌根真菌群落影响的非公制多维尺度分析排序图

Figure 4 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination biplot based on the occurrences of AMF, plant species, basal diameter, height and leaf area

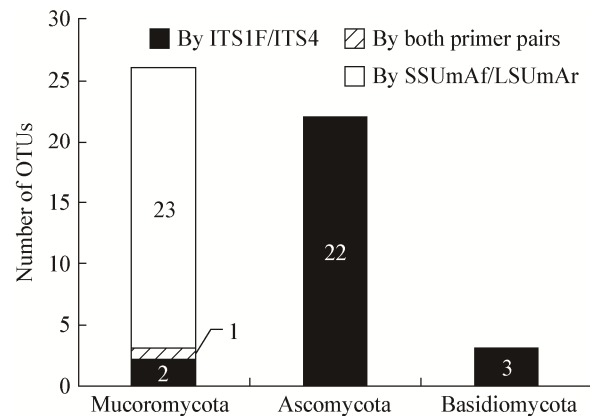


图5 真菌通用引物与丛枝菌根真菌特异性引物检测到的各类真菌物种丰富度比较

Figure 5 Comparison of species richness of different fungal groups detected by using universal and AMF specific primer pairs

表3 宿主植物物种与形态指标对根部真菌群落结构影响的非公制多维尺度分析

Table 3 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) of effects of plant species and morphological characters on root-associated fungi community structures

形态指标 Morphological characters	Community by fungal universal primer				Community by AMF specific primer			
	NMDS1	NMDS2	R ²	P	NMDS1	NMDS2	R ²	P
地径 Ground diameter	-0.516	0.856	0.52	0.385	-0.747	-0.664	0.56	0.254
株高 Plant height	-0.842	0.539	0.10	0.857	-0.464	-0.885	0.79	0.082
叶面积 Leaf area	-0.653	-0.757	0.42	0.571	-0.095	-0.995	0.39	0.491
植物物种 Plant identity	-0.985	-0.171	0.66	0.613	0.182	-0.983	0.14	0.805

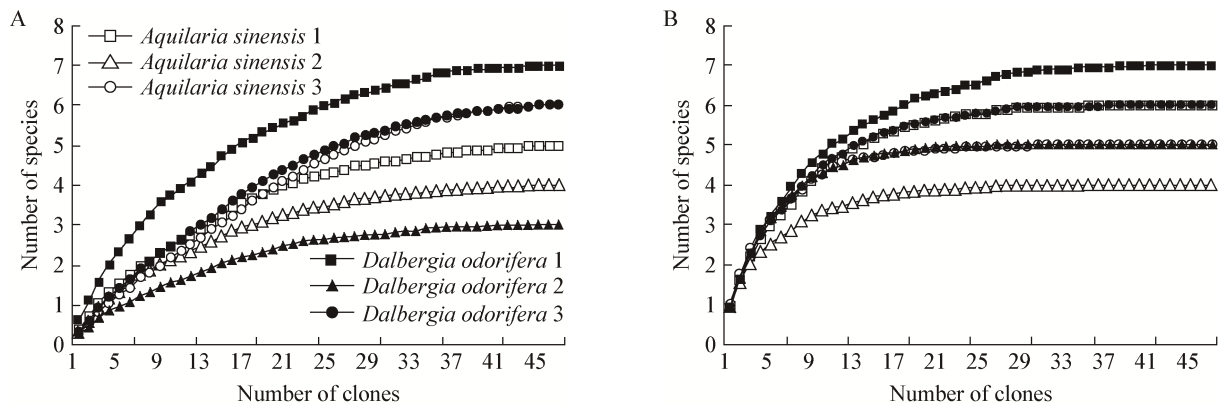


图 6 基于克隆数的单株幼苗根部真菌物种累积曲线

Figure 6 Accumulation curves of fungal species based on the number of clones of root-associated fungi of individual seedling

注: A: 真菌通用引物扩增; B: 丛枝菌根真菌特异性引物扩增。

Note: A: Amplified by fungal universal primers; B: Amplified by AMF specific primers.

Mycoleptodiscus sp.和 *Fusarium phaseoli*。虽然在热带森林中病原真菌对植物群落的密度制约是维持热带森林生态系统物种多样性的重要机制之一^[26],但是对于苗圃育苗而言,病原型的 RAF 具有致幼苗生长不良或死亡的风险,并且会影响树苗的移栽成活率^[6]。热带地区雨季高温高湿,容易导致病害盛行,因此有必要在幼苗移栽前对根部病原真菌进行监测。

当土壤中真菌繁殖体不足时,人工接种根部真菌成为培育健康优质苗木的技术措施之一^[13,27],然而人工接种的真菌会随着时间迁移逐渐被本土性真菌取代,如将担子菌门真菌接种到幼苗,后期生长中检测到的真菌却以子囊菌为主^[14]。因此,苗圃土壤介质中本土性真菌繁殖体才是幼苗的可持续侵染源^[3]。在幼苗出圃前对其根部真菌状况进行全面监测,将有助于形成完善的育苗技术体系,并采取合理的育苗管理措施。

3.2 宿主植物对 RAF 群落物种组成的影响

有较多的研究表明,宿主植物物种与环境因子共同驱动 RAF 群落的物种组成^[7-8],但是本研究 NMDS 分析的结果表明,宿主植物物种、株高、地径、叶面积对 RAF 群落物种组成的影响不显著,真菌群落物种组成的变异(Variance)在宿主种间与

种内均较大。这一结果可能是由于本苗圃条件下,真菌繁殖体分布的空间异质性造成。值得注意的是,当仅考虑 AMF 群落时,宿主植物幼苗的株高对 AMF 群落的物种组成有轻度影响。可能是由于 AMF 为专性共生,对宿主植物的依赖相对于其它类群的真菌更大^[8]。真菌群落的物种组成是一系列环境因子驱动的结果,气候^[22]、土壤有机质和养分含量^[28-29]均会影响真菌群落的组配。因此,幼苗移栽后,在新环境因子的驱动下 RAF 群落将如何变化,值得进一步研究。

3.3 引物和测序深度对揭示 RAF 群落多样性的影响

自然生态系统中,AMF 与 90%以上的有花植物共生,采用 AMF 专性引物的研究发现,仅单株植物根系上就能检测到 20 种以上的 AMF^[12,30],然而使用真菌通用引物检测植物 RAF 群落组成时,AMF 物种数所占比例极低^[10-11]。本研究通过对 AMF 专性引物与真菌通用引物的比较研究证实,真菌通用引物虽然能更全面地揭示根部真菌的谱系组成,却可能低估 RAF 群落中的 AMF 多样性。这一结果的可能原因是:(1) AMF 的 DNA 模板与真菌通用引物序列的匹配性差。然而,本研究中以 AMF 特异性引物的第一轮扩增子为模板,真菌通用

引物扩增到的 AMF 种类极为丰富。因此,模板与引物的匹配性不是导致这一现象的原因。(2) 特定真菌的基因组 DNA 在总 DNA 中的相对浓度,决定其竞争性地与引物结合的能力^[15]。从根系提取的总 DNA 中,AMF 基因组 DNA 相对浓度较低,即使采用 AMF 专性引物,第一轮的扩增子量不足以在电泳中被检测到^[16]。本研究采用 Nested PCR 法,将 AMF 特异性引物与通用引物相结合进行扩增,获得了多样性的 AMF、担子菌和子囊菌。因此,根部真菌研究中,若同时采用真菌通用引物与 AMF 特异性引物扩增 RAF,能更全面地揭示 RAF 群落物种组成。

克隆文库中,被测序的克隆数是影响真菌群落物种组成能否被完全反映的重要因素之一^[31]。本研究中,根部真菌的物种累积曲线显示,检测 48 个真菌克隆即能较全面地反映 2 种植物的单株幼苗 RAF 克隆文库的物种组成。

REFERENCES

- [1] Vandenkoornhuyse P, Baldauf SL, Leyval C, et al. Extensive fungal diversity in plant roots[J]. *Science*, 2002, 295(5562): 2051
- [2] Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, et al. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data[J]. *Mycologia*, 2016, 108(5): 1028-1046
- [3] Smith SE, Read DJ. *Mycorrhizal Symbiosis*[M]. 3rd ed. London: Academic Press, 2008: 558-581
- [4] Stone JK, Bacon CW, White JF. An overview of endophytic microbes: endophytism defined[A]//Bacon CW, White Jr JF. *Microbial Endophytes*[M]. New York: Marcel Dekker, 2000: 29-33
- [5] Hohmann P, Jones EE, Hill RA, et al. Understanding *Trichoderma* in the root system of *Pinus radiata*: associations between rhizosphere colonisation and growth promotion for commercially grown seedlings[J]. *Fungal Biology*, 2011, 115(8): 759-767
- [6] Fillion M, Hamelin RC, Bernier L, et al. Molecular profiling of rhizosphere microbial communities associated with healthy and diseased black spruce (*Picea mariana*) seedlings grown in a nursery[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(6): 3541-3551
- [7] Fujimura KE, Egger KN. Host plant and environment influence community assembly of high Arctic root-associated fungal communities[J]. *Fungal Ecology*, 2012, 5(4): 409-418
- [8] Martínez-García LB, Richardson SJ, Tylianakis JM, et al. Host identity is a dominant driver of mycorrhizal fungal community composition during ecosystem development[J]. *New Phytologist*, 2015, 205(4): 1565-1576
- [9] Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(16): 6241-6246
- [10] Menkis A, Ihrmark K, Stenlid J, et al. Root-associated fungi of *Rosa rugosa* grown on the frontal dunes of the Baltic Sea Coast in Lithuania[J]. *Microbial Ecology*, 2014, 67(4): 769-774
- [11] Toju H, Sato H, Yamamoto S, et al. How are plant and fungal communities linked to each other in belowground ecosystems? A massively parallel pyrosequencing analysis of the association specificity of root-associated fungi and their host plants[J]. *Ecology and Evolution*, 2013, 3(9): 3112-3124
- [12] Herrmann L, Lesueur D, Bräu L, et al. Diversity of root-associated arbuscular mycorrhizal fungal communities in a rubber tree plantation chronosequence in Northeast Thailand[J]. *Mycorrhiza*, 2016, 26(8): 863-877
- [13] He YJ, Zhong ZC, Liu JM, et al. Growth response of *Broussonetia papyrifera* seedlings to VA mycorrhizal fungi inoculation[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(10): 2209-2213 (in Chinese)
何跃军, 钟章成, 刘济明, 等. 构树幼苗对接种丛枝菌根真菌的生长响应[J]. *应用生态学报*, 2007, 18(10): 2209-2213
- [14] Muthukumar T, Udaiyan K. Growth of nursery-grown bamboo inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria in two tropical soil types with and without fertilizer application[J]. *New Forests*, 2006, 31(3): 469-485
- [15] Huang CW, Liao YH, Ding Q. Two sample pooling strategies revealed different root-associated fungal diversity of *Rhododendron* species[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(4): 571-581 (in Chinese)
黄彩微, 廖映辉, 丁琼. 两种混合样品策略对揭示杜鹃花根部真菌多样性的影响[J]. *微生物学报*, 2017, 57(4): 571-581
- [16] Krüger M, Stockinger H, Krüger C, et al. DNA-based species level detection of *Glomeromycota*: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *New Phytologist*, 2009, 183(1): 212-223
- [17] Stockinger H, Krüger M, Schübler A. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *New Phytologist*, 2010, 187(2): 461-474
- [18] Börstler B, Renker C, Kahmen A, et al. Species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in two mountain meadows with differing management types and levels of plant biodiversity[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2006, 42(4): 286-298
- [19] O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, et al. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(9): 5544-5550
- [20] Smith ME, Douhan GW, Rizzo DM. Intra-specific and intra-sporocarp ITS variation of ectomycorrhizal fungi as assessed by rDNA sequencing of sporocarps and pooled ectomycorrhizal roots from a *Quercus* woodland[J]. *Mycorrhiza*, 2007, 18(1): 15-22
- [21] Nguyen NH, Song ZW, Bates ST, et al. FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild[J]. *Fungal Ecology*, 2016, 20: 241-248
- [22] Tedersoo L, Bahram M, Pöhlme S, et al. Global diversity and

- geography of soil fungi[J]. Science, 2014, 346(6213): 1256688
- [23] Devine WD, Harrington CA, Leonard LP. Post-planting treatments increase growth of Oregon white oak (*Quercus garryana* Dougl. ex Hook.) seedlings[J]. Restoration Ecology, 2007, 15(2): 212-222
- [24] El-Naggar NEA, Haroun SA, Oweis EA, et al. Identification of newly isolated *Talaromyces pinophilus* and statistical optimization of β -Glucosidase production under solid-state fermentation[J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2015, 45(7): 712-729
- [25] Chávez D, Pereira G, Machuca Á. Stimulation of *Pinus radiata* seedling growth using ectomycorrhizal and saprophytic fungi as biofertilizers[J]. Bosque, 2014, 35(1): 57-63
- [26] van der Putten WH. Pathogen-driven forest diversity[J]. Nature, 2000, 404(6775): 232-233
- [27] Southworth D, Carrington EM, Frank JL, et al. Mycorrhizas on nursery and field seedlings of *Quercus garryana*[J]. Mycorrhiza, 2009, 19(3): 149-158
- [28] Aguilar R, Carreón-Abud Y, López-Carmona D, et al. Organic fertilizers alter the composition of pathogens and arbuscular mycorrhizal fungi in maize roots[J]. Journal of Phytopathology, 2017, 165(7/8): 448-454
- [29] Grant C, Bittman S, Montreal M, et al. Soil and fertilizer phosphorus: effects on plant P supply and mycorrhizal development[J]. Canadian Journal of Plant Science, 2005, 85(1): 3-14
- [30] Li LF, Li T, Zhang Y, et al. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their distribution patterns related to host-plants and habitats in a hot and arid ecosystem, southwest China[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 71(3): 418-427
- [31] Taylor DL, Herriott IC, Long J, et al. TOPO TA is A-OK: a test of phylogenetic bias in fungal environmental clone library construction[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(5): 1329-1334

(上接 p.1026)

征 稿 简 则

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

4 特别说明

4.1 关于测序类论文: 凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权: (1) 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的(即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。(4) 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表: (1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登录我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登录我刊系统上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>