

## 研究报告



## 杉木叶片内生真菌定殖对凋落物分解及其微生物活性的影响

陈明蓉<sup>1</sup> 林永慧<sup>1</sup> 何兴兵<sup>\*1</sup> 韩国民<sup>2</sup>

1 吉首大学生物资源与环境科学学院 湖南 吉首 416000

2 安徽农业大学生命科学学院 安徽 合肥 230036

**摘要:**【背景】植物内生真菌在植物组织由衰亡转入腐生过程中发挥重要的作用,但这种作用可能因植物及其内生真菌种类不同而具有差异。【目的】分析不同优势度种类内生真菌定殖对于凋落物分解及其相应微生物活性的影响。【方法】采用凋落物分解袋法,选取优势树种杉木凋落叶作为分解底物。【结果】不同优势度类型的内生真菌单菌或组合定殖在分解过程前期几乎均显著加速了凋落物分解,而在分解后期,除了 *Irpex lacteus* 和 *Colletotrichum* sp., 这种加速效应几乎均在减弱,甚至抑制了解过程。微生物活性各变量对内生真菌定殖处理的响应与失重率并不完全一致,这依赖于分解时期。CO<sub>2</sub> 释放速率在前期与失重率相关性不强,而后期则密切相关;分解前期羧甲基纤维素酶(carboxymethyl cellulase, Cx 酶)对失重率贡献较大,然而后期漆酶与过氧化物酶对失重率的贡献升高。总之,内生真菌定殖对凋落物分解及相应的微生物活性均产生了较大影响。【结论】对内生真菌定殖效应的研究有助于人们对森林生态系统土壤碳库平衡和养分循环维持机制的理解,同时对于贫瘠人工林土壤肥力的恢复研究也具有重要的意义。

**关键词:** 杉木, 内生真菌分离与鉴定, 凋落物失重率, 定殖, 纤维素酶与木质素酶活性, CO<sub>2</sub> 释放量

Effects of colonization by endophytic fungi of *Cunninghamia lanceolata* leaves on litter decomposition and associating microbial activitiesCHEN Ming-Rong<sup>1</sup> LIN Yong-Hui<sup>1</sup> HE Xing-Bing<sup>\*1</sup> HAN Guo-Min<sup>2</sup>

1 College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou, Hunan 416000, China

2 School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China

**Abstract:** [Background] Plant endophytic fungi begin to play an important role in litter decomposition with the death of plant tissues into the saprophytic process. However, this effect may vary with plant species and endophytic fungi species. [Objective] In order to analyze the effects of endophytic fungi with different dominance on litter decomposition and associating microbial activity. [Methods] Leaf litters of

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31560205, 31670624); Graduate Research and Innovation Projects of Jishou University (Jdy19048)

**\*Corresponding author:** E-mail: hexb@jsu.edu.cn

**Received:** 28-10-2019; **Accepted:** 02-03-2020; **Published online:** 11-03-2020

**基金项目:** 国家自然科学基金(31560205, 31670624); 吉首大学研究生校级科研创新项目(Jdy19048)

**\*通信作者:** E-mail: hexb@jsu.edu.cn

**收稿日期:** 2019-10-28; **接受日期:** 2020-03-02; **网络首发日期:** 2020-03-11

*Cunninghamia lanceolata* were selected in this study as the decomposition substrate with litterbag method.

**[Results]** The colonization of endophytic fungi or their combinations almost significantly accelerated litter decomposition at the former stage of decomposition process, but at the later stage this acceleration effect was weakened, and even their colonization inhibited the decomposition process except *Irpex lacteus* and *Colletotrichum* sp. The responses of each variable of microbial activity to endophytic colonization were not completely consistent with the mass loss, and these responses depended on decomposition stage. CO<sub>2</sub> releasing showed a poor correlation to mass loss at the former stage of decomposition, but a close correlation at the later stage. Carboxymethyl cellulose (Cx enzyme) greatly contributed to mass loss at the former stage of decomposition, but the contributions of laccase and peroxidase to mass loss were improved at the later stage. In a word, the colonization of endophytic fungi had a great influence on litter decomposition and associating microbial activities. **[Conclusion]** The colonization effect of endophytic fungi will contribute to the understanding of the mechanism on supporting soil carbon pool balance and nutrient cycle of forest ecosystem, and is of great significance for studying the restoration of soil fertility in barren plantation.

**Keywords:** *Cunninghamia lanceolata*, Isolation and identification of endophytic fungi, Mass loss rate of litters, Colonization, Cellulolytic enzymes and ligninolytic enzymes activity, CO<sub>2</sub> release

植物内生真菌是指在植物生命周期的一定阶段或全部阶段, 在植物内部组织中定居而不会对宿主造成明显伤害的一类真菌<sup>[1-3]</sup>, 其广泛分布于植物的根、茎、叶、花、果实等各个部位<sup>[4]</sup>。近几十年来, 内生真菌与植物的共生关系被广泛研究<sup>[5-7]</sup>, 内生菌以植物为栖息场所并从植物组织获取营养, 作为交换条件, 内生菌通过内共生联合固氮、分泌生长素等生物学途径影响宿主植物, 并为宿主植物提供可能的病菌及病虫害的防御机制<sup>[6,8-9]</sup>。

然而, 随着植物组织的衰亡, 这些组织以凋落物的形式进入腐生过程, 与其共生的内生真菌并随之转入腐生系统, 但截至目前, 人们对于内生真菌参与腐生过程的作用机理及其生态学意义却知之甚少。研究表明, 内生真菌参与了凋落物分解过程<sup>[10]</sup>, 内生真菌作为一种先锋菌群可以优先定殖于凋落物, 可以直接分解凋落物中的有机成分。某些内生真菌作为先锋定殖者可以利用可溶性糖和淀粉等化合物并迅速繁殖, 而当这些化合物耗尽时, 它们也会迅速消失或撤退<sup>[11]</sup>; 而其他一些内生真菌还具有分解木质素和高分子碳水化合物的能力, 并凭借其较强的分解能力长期主导基质材料<sup>[12-14]</sup>。

另外, 内生真菌还可以通过改变凋落物基质化学性质、微生物间的拮抗和资源竞争以及菌丝间的直接作用, 影响后续分解者的群落构建, 进而间接影响凋落物分解过程<sup>[15-19]</sup>。因此, 内生真菌凭借天然的定殖优势, 快速扩展其生物量并优先占据了凋落物基质有利的空间生态位, 并且可充分利用占据的资源影响后续的微生物群落构建, 并进一步影响后续的凋落物分解过程以及相关的微生物活性。

然而不同植物来源以及不同种类的内生真菌对分解过程的影响程度各不相同, 这可能主要依赖于真菌自身的生物学特性。通常情况下, 陆地生态系统内生真菌会降低草本凋落物的分解速率<sup>[20-21]</sup>, 也有研究显示内生真菌降低了叶凋落物的分解速率<sup>[22-25]</sup>。而另外一些研究显示内生真菌定殖对凋落物分解过程具有一定的加速效应, 并提高了微生物活性<sup>[26-29]</sup>, 如 Lin 等对香樟内生真菌的研究显示在野外生境下其定殖加速了香樟凋落叶的分解速率和微生物分解酶活性<sup>[29]</sup>。Osono 等发现木霉菌对茶花凋落物的优先分解促进了后续分解过程<sup>[30]</sup>。陈晏等也发现内生真菌在富含茅苍术凋落物的土壤中明显加快了纤维素和木质素的降解<sup>[31]</sup>。不同种类的内生真菌, 由于自身的生

生物学特性差异,其在微生物群落中的优势程度也不尽相同,在进入腐生系统后对资源的占据能力以及与后续定殖菌群之间的作用关系也存在差异性,因此不同优势度的内生真菌种类对分解过程的贡献也会存在一定的差异<sup>[29]</sup>。一般认为优势菌可以高效地利用有效资源快速扩展自身的生物量,所产生的群落构建历史可能对生态系统的功能影响较大,而稀有种具有较低的利用资源的能力,其构建历史所产生的功能效应可能较弱<sup>[21,32]</sup>。在此基础上,我们提出假设:内生真菌的定殖对凋落物分解过程会产生显著的影响,影响程度依赖于内生真菌的生物学特性。

杉木(*Cunninghamia lanceolata*)是我国南方特有的优质速生用材树种之一<sup>[33]</sup>,其地理分布遍及整个亚热带地区。杉木林在维护山地生态系统和发展林区经济中起着重要的作用,同时由于其巨大的碳储量,对于维持区域生态系统地-气碳平衡过程具有重要的作用。因此,影响生态系统碳释过程的因素也将对这一平衡过程产生重要影响。越来越多的研究显示,许多内生真菌介入凋落物分解过程并对该过程产生了重要的影响<sup>[26-29]</sup>,以前的研究显示某些阔叶树种(如香樟)内生真菌定殖对凋落物分解过程具有一定的促进作用<sup>[29]</sup>,那么含有较高木质素含量的针叶(杉木)凋落物<sup>[10]</sup>内生真菌定殖对分解过程的作用是否有别于阔叶树种,这也是本研究的目的之一。对于杉木内生真菌影响凋落物分解过程的研究,可以为区域碳平衡过程的准确预测提供重要的依据,同时对于杉木人工林的管理以及土壤肥力的保持也具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器及培养基

水杨酸苄、3,5-二硝基水杨酸,上海金穗生物科技有限公司;冰醋酸,湖南汇虹试剂有限公司;Zymo BIOMICS DNA Miniprep Kit, Zymo Research 公司。真空干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;

紫外可见分光光度计,上海舜宇恒平科学仪器有限公司。

土豆琼脂培养基(PDA):每 1 000 mL 培养基中包含琼脂 20 g,葡萄糖 10 g,土豆(200 g)煮出液;土豆液体培养基(PDB):每 1 000 mL 培养基中包含土豆(200 g)煮出液,葡萄糖 10 g;虎红培养基:36.6 g 虎红琼脂溶于 1 000 mL 蒸馏水。

### 1.2 研究样地与取样

试验样地位于湖南省吉首市郊区杉木人工林(28°17'N, 109°43'E; 平均海拔 258 m; 面积约 1 000 m<sup>2</sup>),林下土壤具有一定的酸化特征。该地区处于亚热带季风湿润气候区,年均气温 16–17 °C,最热月(6月)和最冷月(1月)平均温度分别为 29.2 °C 和 5.2 °C;年均相对湿度 80%,年均降水量 1 400–1 800 mm,土壤为石灰岩母质发育的黄红壤。

2017 年 10 月收集衰老的杉木叶(与嫩叶、成熟叶相比,衰老叶片中的内生真菌更有可能进入凋落物分解过程<sup>[34-36]</sup>),设置 5 个 10×10 m 的样方,同一样方随机选取 3 个样点进行采样,戴无菌手套采集杉木衰老叶并装于已灭菌的离心管中。样品立即带回实验室进行表面消毒,之后进行内生真菌分离;另收集一些新凋落杉木叶带回实验室置于 45 °C 烘箱干燥至恒重,用于后续凋落物分解实验。

### 1.3 内生真菌分离与鉴定

将取回的杉木叶样品进行表面消毒<sup>[29]</sup>:先用 75%酒精浸洗 3 min,然后在 0.1% HgCl 中浸泡 15 min,后用 75%酒精浸洗 30 s,之后叶片用无菌水冲洗 5 次。将表面消毒后的叶片切成 3 mm 宽的小块置于土豆琼脂培养基培养 5–7 d,待大多数切口长出菌丝后将每个切口长出的菌丝,接种于虎红培养基中培养 5 d,观察菌落形态,根据菌丝颜色、生长速率及外观形态等确定形态型。每个形态型选择 3 个代表性菌株,用 Zymo BIOMICS DNA Miniprep Kit 提取基因组 DNA,采用真菌通

用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增 ITS 序列(核糖体 DNA 内转录间隔区 1 和 2), 扩增长度为 600 bp 左右。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 正、反向引物(10  $\mu$ mol/L)各 2.5  $\mu$ L, DNA 模板(20 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, 2 $\times$ PCR *BesTaq* MasterMix 25  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 18  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 45 s, 55  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物纯化后, 送成都罗宁生物科技有限公司进行 ITS 测序和菌种鉴定。

1.4 单菌及混合菌定殖后对分解过程的影响

根据菌种的相对丰度与相对定殖频率确定物种的相对优势度(表 1), 物种的相对优势度=(相对丰度+相对定殖频率)/2。同时对 9 种真菌间的 Bray-Curtis 相异系数矩阵(表 2)进行计算, 公式如下:

$$d_{jk} = \frac{\sum_{i=1}^s |x_{ij} - x_{ik}|}{\sum_{i=1}^s (x_{ij} + x_{ik})} \tag{1}$$

$d_{jk}$  表示两真菌物种间的相异系数,  $x_{ij}$  和  $x_{ik}$  分别代表第  $j$  个和  $k$  个菌种在样本  $i$  中的观测值(频数),  $s$  表示样本数量。

从分离获得的真菌中选择 *Colletotrichum gloeosporioides*、*Colletotrichum* sp.、*Phyllosticta capitalensis* 和 *Irpex lacteus* 4 种代表不同优势度级别的菌种, 利用这些单菌及其组合进行定殖实验, 探究杉木叶内生真菌单菌及其混合菌定殖对于后续杉木凋落物分解的影响。

单菌种定殖实验: 单菌接种于 PDB 培养基, 28  $^{\circ}$ C、120 r/min 振荡培养 7 d, 形成菌丝球之后用大量无菌水冲洗菌丝球, 直至没有土豆残渣, 将冲洗干净的菌丝球于无菌水中用灭菌玻璃棒打碎,

表 1 内生真菌优势度分布表

Table 1 Distribution of the dominance of endophytic fungi

形态型编号	鉴定菌种名	相对丰度	相对定殖频率	相对优势度
Morphotype No.	Identified fungi species	Relative abundance (%)	Relative colonization frequency (%)	Relative dominance (%)
CL01, CL04, CL13	<i>Bjerkandera</i> sp.	34.0	26.5	30.25
CL02, CL11, CL12	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	32.0	29.4	30.70
CL03	<i>Irpex lacteus</i>	1.9	2.9	2.40
CL05	<i>Trametes hirsuta</i>	3.8	5.9	4.85
CL06	Fungal sp. HS-1	5.7	2.9	4.30
CL07	<i>Penicillium citrinum</i>	1.9	2.9	2.40
CL08	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	3.8	5.9	4.85
CL09	Fungal sp. HS-2	5.7	8.8	7.25
CL10	<i>Colletotrichum</i> sp.	11.3	14.7	13.00

表 2 内生真菌分布的 Bray-Curtis 相异系数矩阵

Table 2 Bray-Curtis dissimilarity indices matrix of distribution of endophytic fungi

Fungal species	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>P. capitalensis</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>Bjerkandera</i> sp.	<i>T. hirsuta</i>	Fungal sp. HS-1	<i>P. citrinum</i>
<i>Colletotrichum</i> sp.	0.62	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. capitalensis</i>	0.83	0.69	—	—	—	—	—	—
<i>I. lacteus</i>	0.83	0.69	0.40	—	—	—	—	—
<i>Bjerkandera</i> sp.	0.56	0.81	0.64	0.64	—	—	—	—
<i>T. hirsuta</i>	0.85	0.75	0.38	0.38	0.61	—	—	—
Fungal sp. HS-1	0.86	0.78	0.60	0.33	0.64	0.33	—	—
<i>P. citrinum</i>	0.85	0.76	0.43	0.43	0.63	0.29	0.26	—
Fungal sp. HS-2	0.73	0.50	0.65	0.53	0.71	0.40	0.36	0.24

注: —: 对角线右上部分与左下部分数值相同。

Note: —: The upper right of the diagonal is the same as the lower left.

然后将菌种过量接种(实验中以 3 g 干重叶片接种 30 mL 为准)于已用 22 kGy 辐射灭菌的待分解杉木叶片(叶片提前装入灭菌的 150 mL 三角瓶中)上,实验室培养箱 28 °C 培养 5 d,待菌丝长出后将杉木叶装入尼龙网袋中置于杉木林凋落物层进行分解(田间试验)。两两菌种混合定殖实验:取菌种按上述单菌一半的菌量与另一菌混合,混合菌种同样过量接种于分解底物,其他操作与单菌种定殖实验过程相同。

### 1.5 测定指标与方法

整个凋落物分解周期为 1 年,每 6 个月为一次抽样期,每次抽取 6 袋凋落物,置于 4 °C 冰箱中暂时保存,以便于测定凋落物干湿重及相应的微生物活性。

失重率的测定:仔细清理取回样品中的 3 袋凋落物表面的沙粒及根系,以便于进行湿重称量,然后将其置于 45 °C 烘箱中烘干至恒重,再称量每袋杉木样品中凋落物的干重,用于凋落物失重率的计算<sup>[37]</sup>。

CO<sub>2</sub> 释放量的测定:称取 0.5 g 杉木凋落叶置于已灭菌的离心管中,将其置于装有 10 mL 0.5 mol/L NaOH 溶液的无菌锥形瓶中并密封瓶口,放置在 25 °C 黑暗条件下培养 48 h,然后用 0.05 mol/L HCl 进行滴定,其结果表示为  $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{干重凋落物}\cdot\text{d})$ <sup>[37]</sup>。

凋落物分解酶活性采用先提取粗酶液后用紫外可见分光光度计测定酶活性,纤维素酶活性分析采用二硝基水杨酸法测定<sup>[38-40]</sup>,酶活性表示为  $\mu\text{mol}\cdot\text{葡萄糖}/(\text{g}\cdot\text{干重凋落物}\cdot\text{h})$ 。木质素酶活性分析采用邻联甲苯胺法测定<sup>[41]</sup>,酶活性表示为  $\mu\text{mol o}\cdot\text{邻联甲苯胺}/(\text{g}\cdot\text{干重凋落物}\cdot\text{h})$ 。

### 1.6 数据处理

采用 Microsoft Excel 2003 对实验数据进行统计作表,数据表示为平均值 $\pm$ 标准误。为确定不同菌种定殖处理对于后续凋落物分解的影响,采用混合效应模型(mixed-model ANOVA, SPSS 16.0)对

固定效应以及样方的随机效应进行分析。如果固定效应或交互作用显著,则分别对凋落物分解前、后两时期不同菌种定殖处理之间的变量进行方差分析,采用 Duncan 多重比较法分析菌种定殖效应之间的差异性,显著性水平设定为  $\alpha=0.05$ 。方差分析之前要进行方差齐性检验,方差不齐要进行数据转换(失重率数据采用反正弦转换、微生物活性数据采用对数转换)。为深入探讨不同菌种定殖对后续凋落物分解过程的影响,运用 R 程序(3.2.2)中的 Vegan 包进行影响因素与响应变量关系的主成分分析(principal component analysis, PCA)<sup>[29]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生菌分离与鉴定结果

从 120 片衰老杉木叶共分离获得 13 种形态型菌株,合并鉴定后为 9 种真菌(图 1 和表 1)。

### 2.2 失重率分析

混合线性模型分析结果表明,在考虑样方随机效应显著的前提下,杉木凋落物的失重率在不同菌种定殖处理间仍表现出差异显著,并且在分解时期与定殖处理间的交互作用也显著(表 3、4,  $P<0.05$ )。内生真菌不同菌种或组合定殖对于杉木凋落物分解的影响在两个时期(2018 年 1 月–2018 年 6 月为分解前期,2018 年 7 月–2019 年 1 月为分解后期)均表现出显著性差异。在凋落物分解前期,与对照组相比,4 种单菌定殖(Pc、Il、Cs 和 Cg)及多数菌种组合处理均显著增加了杉木凋落物失重率(图 2A,  $P<0.05$ );而在凋落物分解后期,除了 Cs、Pc+Cs 两个处理组外,其他大多数处理均显著抑制了凋落物分解(图 2B,  $P<0.05$ )。

### 2.3 CO<sub>2</sub> 释放量

混合线性模型分析结果显示,在考虑样方随机效应显著的前提下,杉木凋落物分解过程中 CO<sub>2</sub> 释放量在分解期与菌种定殖处理间存在显著交互作用(表 3、4,  $P<0.05$ )。

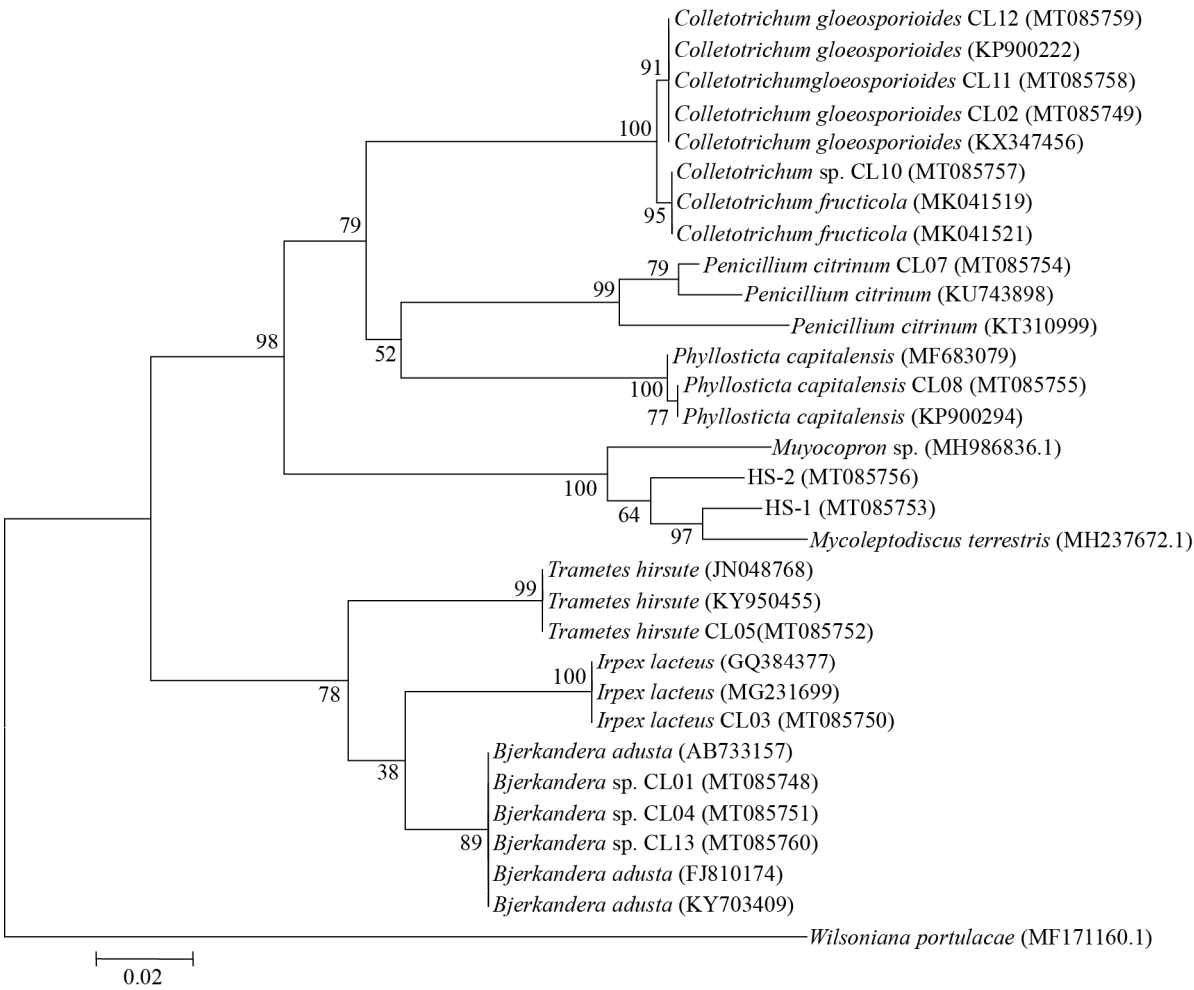


图 1 衰老杉木叶内生真菌基于 ITS 序列的系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree based on ITS sequences of the endophytic fungi from senescent leaves of *Cunninghamia lanceolata*

注：括号中的序号代表菌株的 GenBank 登录号；分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类到一起的几率；标尺刻度 0.02 代表 2% 的序列差异。

Note: The sequence number in the bracket means the GenBank accession number of the strain; The number at the node means the percentage of occurrence in 1 000 bootstrap trees; The scale bar 0.02 means 2% sequence difference.

表 3 杉木凋落物分解过程中不同菌种定殖处理固定效应的分析结果

Table 3 The test of fixed effects for colonization treatment by different endophytic fungi during litter decomposition of *C. lanceolata*

来源	失重率		CO <sub>2</sub> 释放量		C1 酶		Cx 酶		β-葡萄糖苷酶		漆酶		过氧化物酶	
Sources	Mass loss		CO <sub>2</sub> release		Exo-1,4-β-glucanase		Carboxymethyl cellulase		β-glucosidase		Laccase		Peroxidase	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
截距 Intercept	1 635	<0.01	1541	<0.01	1 046.00	<0.01	564.32	<0.01	105.15	<0.01	619.25	<0.01	380.13	<0.01
处理 Treatment	2.68	<0.05	1.49	0.176	175.98	<0.01	7.63	<0.01	4.25	<0.01	20.97	<0.01	6.37	<0.01
时间 Time	1 126.46	<0.01	253.61	<0.01	77.72	<0.01	45.44	<0.01	15.95	<0.01	6.69	<0.05	6.63	<0.05
处理×时间	3.01	<0.01	0.95	<0.01	228.70	<0.01	5.45	<0.01	5.88	<0.01	27.11	<0.01	6.09	<0.01
Treatment×Time														

表 4 杉木凋落物分解过程中不同菌种定殖处理样方随机效应的分析结果  
Table 4 The test of plot random effect for colonization treatment by different endophytic fungi during litter decomposition of *C. lanceola*

参数	失重率	CO <sub>2</sub> 释放量	C1 酶	Cx 酶	β-葡萄糖苷酶	漆酶	过氧化物酶
Parameters	Mass loss	CO <sub>2</sub> release	Exo-1,4-β-glucanase	Carboxymethyl cellulase	β-glucosidase	Laccase	Peroxidase
估计值 Estimates	49.07	6 802.33	0.05	14.20	43.88	28.42	114.90
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

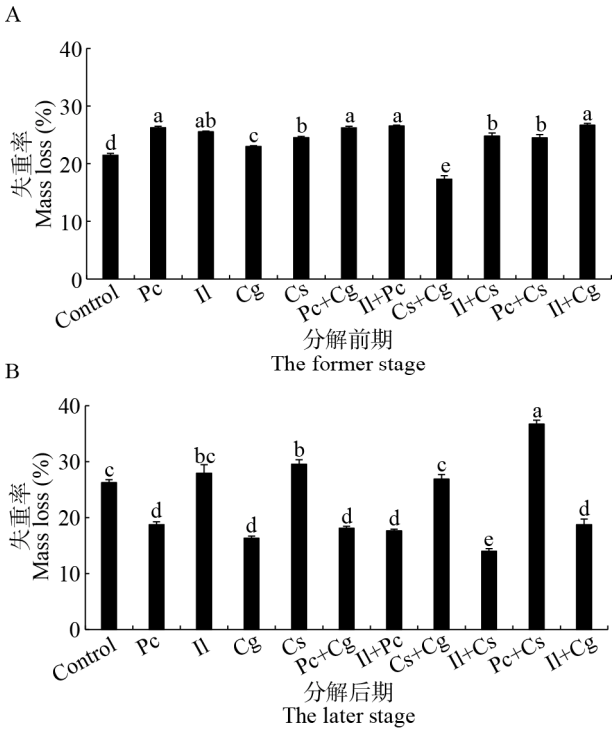


图 2 单菌及混合菌优先定殖对杉木凋落物失重率的影响

Figure 2 Effects of priority colonization by single and mixed fungi on mass loss of *C. lanceolata* litters

注: A: 失重率分解前期; B: 失重率分解后期. Pc: *P. capitalensis*; Il: *I. lacteus*; Cg: *C. gloeosporioides*; Cs: *Colletotrichum* sp.; 图中标记相同小写字母表示处理之间无显著性差异.

Note: A: The former stage of mass loss; B: The later stage of mass loss. Pc: *P. capitalensis*; Il: *I. lacteus*; Cg: *C. gloeosporioides*; Cs: *Colletotrichum* sp.; The same lower letters in the figure indicate that there is no significant difference between the treatments.

CO<sub>2</sub> 释放量在一定程度上反映了分解者呼吸代谢的状态。在凋落物分解前期, 单菌与组合处理在多数情况下抑制了杉木凋落物的 CO<sub>2</sub> 释放量; 在分解后期, Cs 单菌、Pc+Cg 以及 Pc+Cs 组合处理显著增加了凋落物的 CO<sub>2</sub> 释放量(图 3B,  $P<0.05$ )。

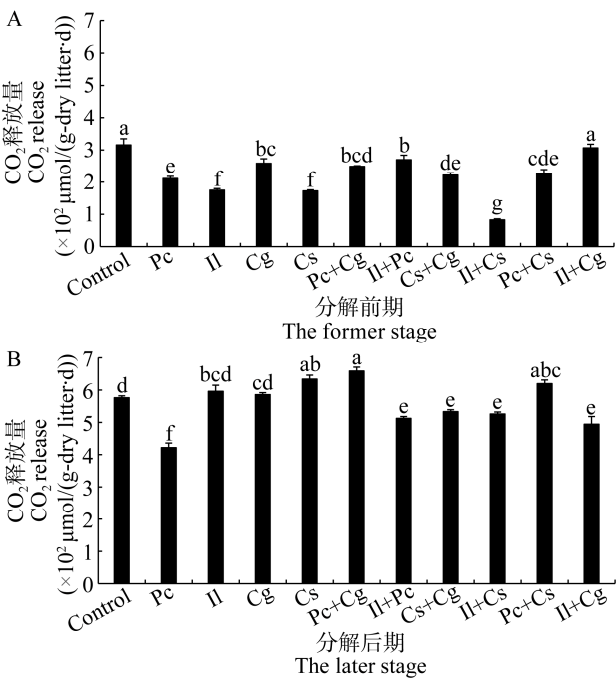


图 3 单菌及混合菌优先定殖对杉木凋落物 CO<sub>2</sub> 释放量的影响

Figure 3 Effects of priority colonization by single and mixed fungi on CO<sub>2</sub> release in degrading litters of *C. lanceolata*

注: A: CO<sub>2</sub> 释放量分解前期; B: CO<sub>2</sub> 释放量分解后期. Pc: *P. capitalensis*; Il: *I. lacteus*; Cg: *C. gloeosporioides*; Cs: *Colletotrichum* sp.; 图中标记相同小写字母表示处理之间无显著性差异.

Note: A: The former stage of CO<sub>2</sub> release; B: The later stage of CO<sub>2</sub> release. Pc: *P. capitalensis*; Il: *I. lacteus*; Cg: *C. gloeosporioides*; Cs: *Colletotrichum* sp.; The same lower letters in the figure indicate that there is no significant difference between the treatments.

2.4 酶活性测定

在考虑样方随机效应的前提下, 固定效应分析结果显示, 5 种分解酶在不同菌种定殖处理间的差异均具有统计学意义( $P<0.05$ ), 且交互作用显著(表 3、4), 因此需要对不同分解期各酶活在不同菌

种定殖处理之间的差异显著性进行分析。

纤维素是凋落物的主要有机组分之一, 其主要降解酶包括 Exo-1,4- $\beta$ -glucanase (C1 酶)、羧甲基纤维素酶(carboxymethyl cellulase, Cx 酶)及  $\beta$ -葡萄糖苷酶。图 4–7 显示了单菌及混合菌优先定殖对后续凋落物分解过程中纤维素分解酶和木质素分解酶的变化情况: 不同菌种的优先定殖对凋落物分解的影响因分解期不同而出现差异。在凋

落物分解前期, 单菌及组合处理引起了凋落物分解 Exo-1,4- $\beta$ -glucanase (C1 酶)的降低(图 4A,  $P<0.05$ ), 而在绝大多数情况下显著提高了羧甲基纤维素酶(carboxymethyl cellulase, Cx 酶)的活性(图 5A,  $P<0.05$ ); 在凋落物分解后期, 真菌定殖多数情况下提高了羧甲基纤维素酶(carboxymethyl cellulase, Cx 酶)、 $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性(图 5B 和图 6B)。

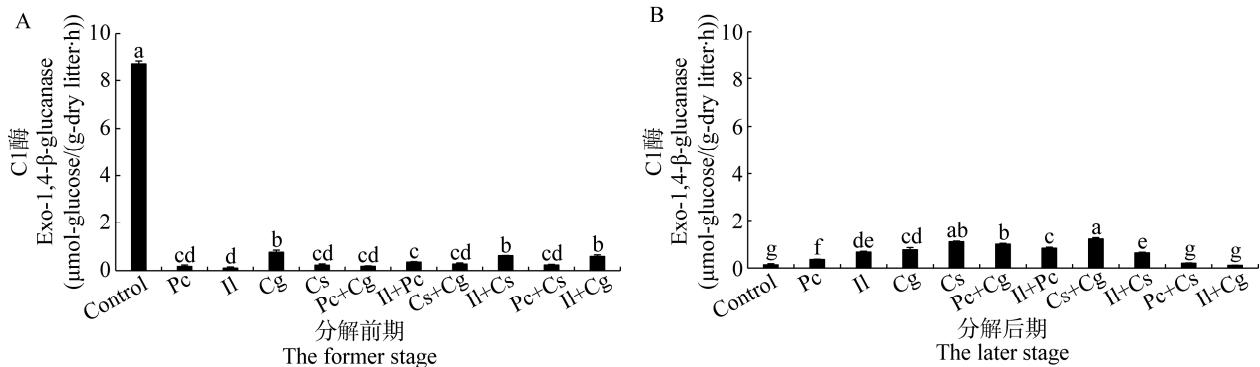


图 4 单菌及混合菌优先定殖对杉木 C1 酶的影响

**Figure 4** Effects of single and mixed fungi priority colonization on the exo-1,4- $\beta$ -glucanase in degrading litters of *C. lanceolata*

注: A: C1 酶分解前期; B: C1 酶分解后期; Pc: *P. capitalensis*; Il: *I. lacteus*; Cg: *C. gloeosporioides*; Cs: *Colletotrichum* sp.; 图中标记相同小写字母表示处理之间无显著性差异。

Note: A: The former stage of exo-1,4- $\beta$ -glucanase; B: The later stage of exo-1,4- $\beta$ -glucanase; Pc: *P. capitalensis*; Il: *I. lacteus*; Cg: *C. gloeosporioides*; Cs: *Colletotrichum* sp.; The same lower letters in the figure indicate that there is no significant difference between the treatments.

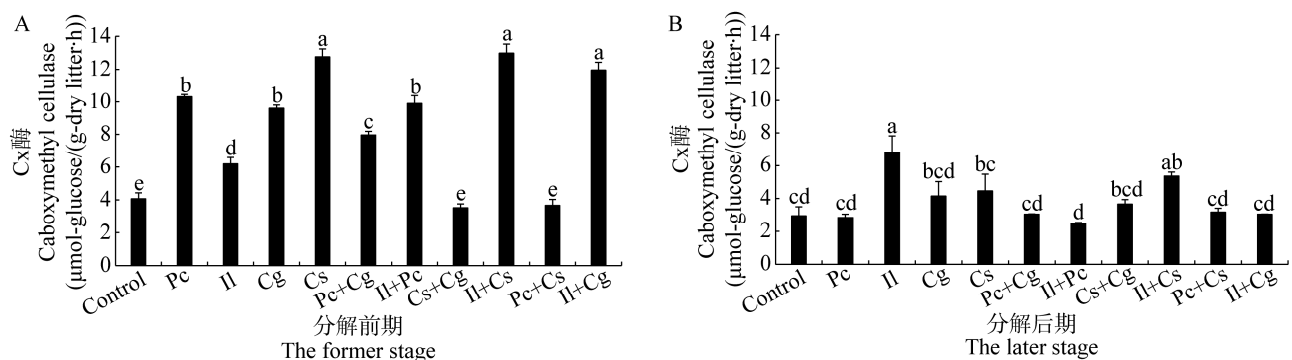


图 5 单菌及混合菌优先定殖对杉木 Cx 酶的影响

**Figure 5** Effects of single and mixed fungi priority colonization on the carboxymethyl cellulase in degrading litters of *C. lanceolata*

注: A: Cx 酶分解前期; B: Cx 酶分解后期; Pc: *P. capitalensis*; Il: *I. lacteus*; Cg: *C. gloeosporioides*; Cs: *Colletotrichum* sp.; 图中标记相同小写字母表示处理之间无显著性差异。

Note: A: The former stage of carboxymethyl cellulase; B: The later stage of carboxymethyl cellulase; Pc: *P. capitalensis*; Il: *I. lacteus*; Cg: *C. gloeosporioides*; Cs: *Colletotrichum* sp.; The same lower letters in the figure indicate that there is no significant difference between the treatments.



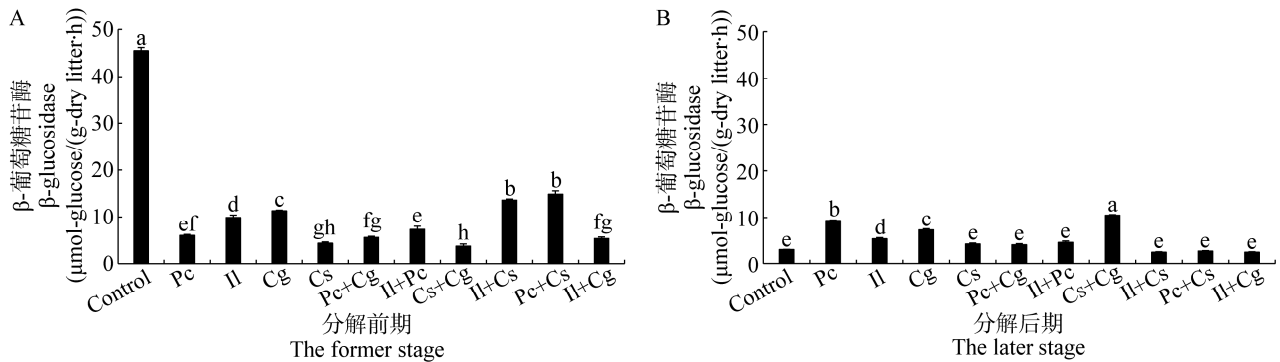


图6 单菌及混合菌优先定殖对杉木β-葡萄糖苷酶的影响

**Figure 6** Effects of single and mixed fungi priority colonization on the activities of β-glucosidase in degrading litters of *C. lanceolata*

注: A: β-葡萄糖苷酶分解前期; B: β-葡萄糖苷酶分解后期; Pc: *P. capitalensis*; Il: *I. lacteus*; Cg: *C. gloeosporioides*; Cs: *Colletotrichum* sp.; 图中标记相同小写字母表示处理之间无显著性差异。

Note: A: The former stage of β-glucosidase; B: The later stage of β-glucosidase; Pc: *P. capitalensis*; Il: *I. lacteus*; Cg: *C. gloeosporioides*; Cs: *Colletotrichum* sp.; The same lower letters in the figure indicate that there is no significant difference between the treatments.

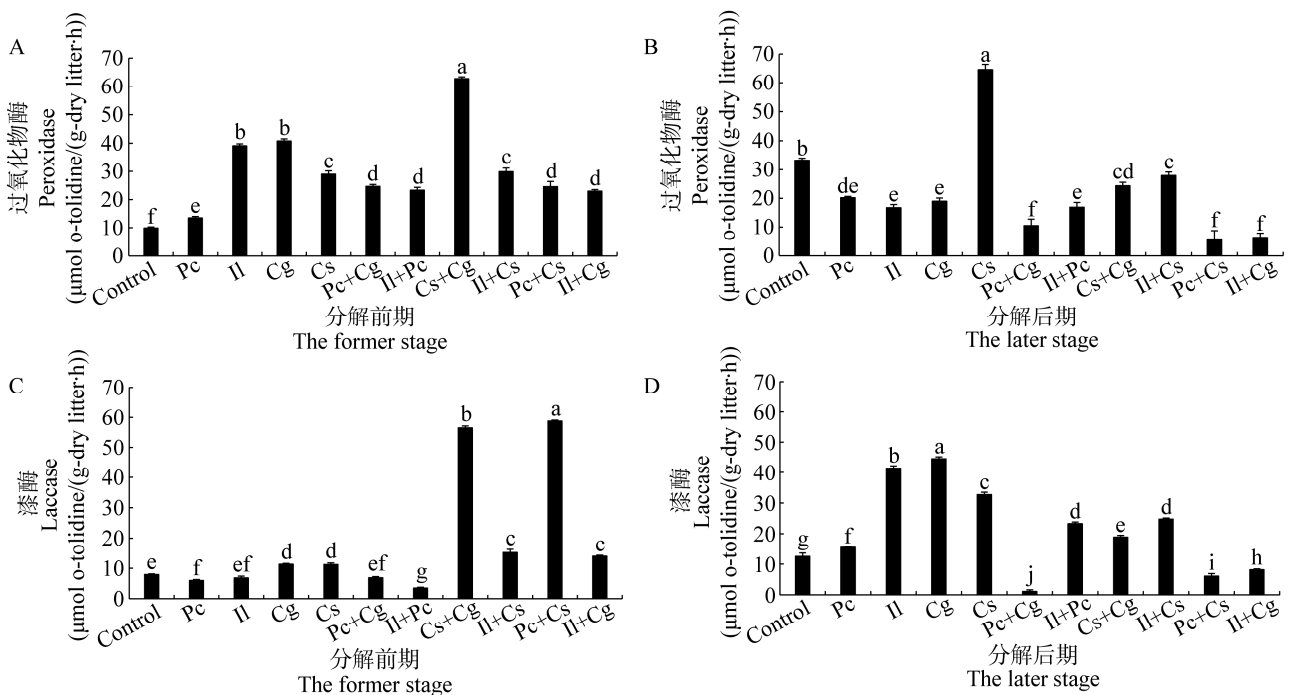


图7 单菌及混合菌优先定殖对杉木凋落物木质素分解酶的影响

**Figure 7** Effects of priority colonization by single and mixed fungi on the activities of ligninolytic enzymes in degrading litters of *C. lanceolata*

注: A: 过氧化物酶分解前期; B: 过氧化物酶分解后期; C: 漆酶分解前期; D: 漆酶分解后期; Pc: *P. capitalensis*; Il: *I. lacteus*; Cg: *C. gloeosporioides*; Cs: *Colletotrichum* sp.; 图中标记相同小写字母表示处理之间无显著性差异。

Note: A: The former stage of peroxidase; B: The later stage of peroxidase; C: The former stage of laccase; D: The later stage of laccase; Pc: *P. capitalensis*; Il: *I. lacteus*; Cg: *C. gloeosporioides*; Cs: *Colletotrichum* sp.; The same lower letters in the figure indicate that there is no significant difference between the treatments.

木质素在凋落物分解过程中与失重率密切相关, 通常被看作是影响凋落物分解的关键因素之一, 其主要降解酶包括漆酶和过氧化物酶。从图 7 中可以看出, 在凋落物分解前期, 与对照组相比, 内生真菌定殖均提高了过氧化物酶活性, 以 Cs+Cg 混合菌定殖最为突出(图 7A,  $P<0.05$ ); 在分解后期, 除了 Cs 单菌定殖处, 其他处理几乎均降低了过氧化物酶活性(图 7B); 然而对于漆酶, 多数情况下内生真菌的定殖提高了其活性(图 7D)。

## 2.5 主成分分析

为进一步分析凋落物分解过程中各响应变量与内生真菌定殖处理之间的关系, 采用 PCA 法进行分析, 结果显示在杉木凋落物分解前期和后期, PC1 分析分别解释了 39.6%和 33.67%的总方差, PC2 分别解释了 36.11%和 24.16%的总方差(图 8)。

在分解前期, 与失重率结果一致, PCA 分析中除 Cs+Cg 处理外, 其他绝大多数内生真菌定殖处理均对失重率影响较大: Cx 酶显示出与失重率较好的关联性, 表明前期该酶对失重率贡献较大, 而  $\text{CO}_2$  释放量与失重率关联性相对较小, 显示可能还有其他因素对失重率产生了影响。分解后期, Pc+Cs、Cs 和 II 相较于对照对失重率产生

了正面影响, 而其他大多数则产生了负面影响, 后期  $\text{CO}_2$  释放量与失重率关联性较为密切, 表明微生物活动在后期对失重率作用较大。

## 3 讨论与结论

植物内生真菌在凋落物分解之初, 通过植物组织的自然衰亡而获得优先于其他腐生真菌的定殖优势<sup>[42]</sup>, 它们可以直接降解凋落物, 也可以通过拮抗、资源竞争等方式与后定殖的腐生菌相互作用, 从而间接影响凋落物分解速率<sup>[15,17,27]</sup>。本研究中, 在凋落物分解前期, 4 种内生真菌 *Colletotrichum* sp.、*C. gloeosporioides*、*I. lacteus* 和 *P. capitalensis* 及其两两联合定殖几乎均显著增加了杉木凋落物的失重率, 显示出内生真菌具有明显的定殖加速效应, 这与我们的假设一致。Andersson 等<sup>[43]</sup>认为这种定殖加速效应可能与内生真菌对资源的优先占据有关, 也有其他研究者认为内生真菌自身的分解能力以及内生真菌与随后的定殖者之间形成的群落构建也会增强这一效应<sup>[21,27,32]</sup>。然而, Cs+Cg 联合定殖却对分解产生了显著的抑制效应, 这可能是由于二者同属于 *Colletotrichum* 属(表 2), 具有相似的资源生态位, 导致了二者在分解过程中产生了对有效资源的竞争, 但在分解后期二菌组合产生的失重率与对照

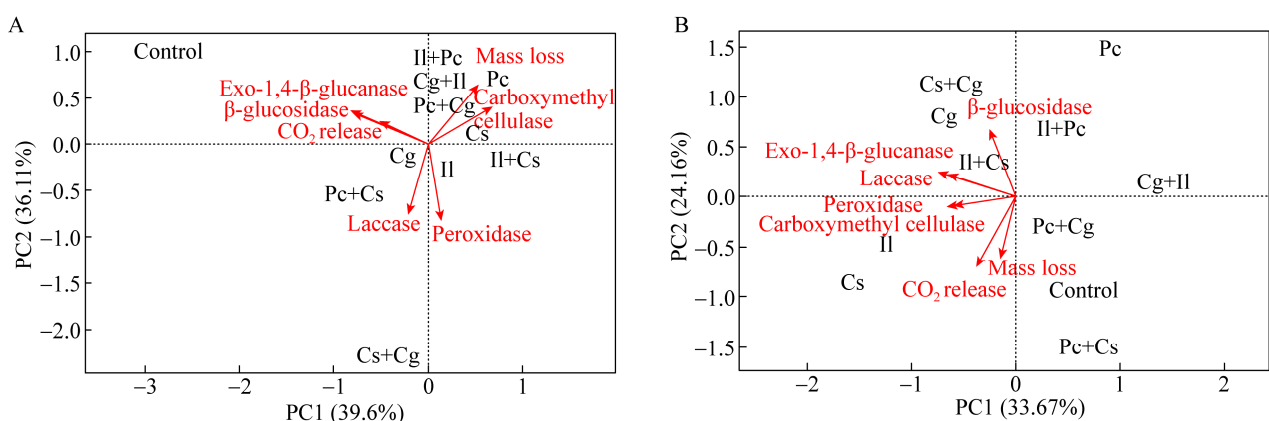


图 8 内生真菌定殖后杉木凋落物在分解前期(A)和后期(B)失重率及微生物活性的主成分分析

Figure 8 Principal component analysis (PCA) of mass loss and associated microbial activities in degrading *C. lanceolata* litters colonized by endophytic fungi

组基本相似,这可能是竞争使二者对分解过程的影响发生了分化,从二者单菌在分解后期对分解过程的影响可以推断 Cs 可能在两者竞争分化之后主导了凋落物分解进程。然而,随着凋落物分解时期的推移,内生真菌定殖的加速效应在后期却表现出减弱的趋势,甚至许多定殖处理表现出明显的减速效应。参与凋落物分解的内生真菌大多数被认为限制在分解的初始阶段,因为大多数内生真菌明显依赖于易获得的有效糖类或者容易分解的化合物(包括淀粉、纤维素)等<sup>[44]</sup>,但分解后期这些有机成分消耗殆尽,而木质素含量增加,增加了利用难度,同时由于这些内生真菌在分解前期的生物量扩展也消弱了木质素分解功能菌群的繁殖,这些潜在因素均有可能降低凋落物后期的分解速率。当然,仍然存在一些内生真菌由于具有潜在分解木质素的能力,其可以持续作用至凋落物分解末期<sup>[45]</sup>。例如, Pc 单菌定殖使凋落物分解速率降低,但 Pc+Cs 组合处理使分解过程呈现出加速效应,这显示出 Cs 菌对分解过程的作用可以持续至分解后期; II 真菌是比较典型的白腐真菌,具有高效的木质素分解能力<sup>[46]</sup>,然而 II+Cs 组合处理却显示出较强的分解抑制效应,表明两者可能竞争木质素底物资源。

与已有的一些研究中有关内生真菌的先殖效应一致,本研究中的 4 种内生真菌,无论是高优势菌(Cg 和 Cs)还是低优势菌(II 和 Pc),对凋落物分解前期均产生了显著的促进效应,但似乎内生真菌定殖引起的失重率在不同真菌种类之间分化并不明显,这与我们的初始假设相反,4 种内生真菌引起的失重率约 23%–26% (促进效应)。凋落物分解前期容易利用的碳源较为充足,可以满足不同类型真菌的快速繁殖,一般情况下微生物倾向于优先利用易消化的有机物,因此,易于分解的碳源可能贡献了失重率的主要部分。然而分解后期 4 种内生真菌引起的失重率明显开始分化, Pc 和 Cg 引起的失重率约 36%–39% (抑制效应),而 II 和 Cs 引

起的失重率约为 53%–54% (促进效应)。随着分解时间的延长,易利用的碳源已消耗完毕,难分解的木质素等成为凋落物的主要成分<sup>[47]</sup>。根据前述 II 和 Cs 具有潜在利用木质素的能力,可以在分解后期高效主导凋落物分解进程;而 Pc 和 Cg 均没有展示出这种潜力,从而导致了后期失重率在定殖真菌不同种类之间的分化,即使是同属真菌 Cs 和 Cg 之间也具有显著的差异。微生物是凋落物分解过程的主要贡献者,其呼吸速率可以指示凋落物分解过程<sup>[48]</sup>,然而本研究中 PCA 结果显示分解前期杉木凋落物失重率与 CO<sub>2</sub> 释放速率并不密切相关,这可能是由于前期凋落物存在一些易分解的可溶性有机质,由于淋溶以及原生动物的采食等因素减少了微生物对失重率的贡献<sup>[44]</sup>。另外,分解酶也是微生物活性的重要指标之一,是凋落物分解的最直接驱动力<sup>[49–51]</sup>。然而多数情况下,分解酶活性的差异规律并不与失重率的差异规律一致,这可能是由于不同的酶对失重率的贡献并不完全一致。本研究中,分解前期 Cx 酶对凋落物失重率贡献最为显著,而后期木质素分解酶开始显示出与失重率较为密切的关联性,这符合分解过程中微生物对底物资源利用的变化规律。在分解前期 Cs+Cg 组合处理下尽管木质素分解酶在所有处理中几乎均达到最高值,但由于前期对失重率贡献大的分解酶是 Cx 酶而不是木质素分解酶,因而其较低的 Cx 酶活性也相应减缓了凋落物分解过程。II 真菌定殖引起了较高的漆酶活性,但过氧化物酶却并没有展现与失重率相匹配的活性;Cs 真菌定殖引起的两种木质素分解酶活性同时升高;Cg 和 Pc 真菌虽然引起了较高的漆酶活性,但却降低了过氧化物酶活性,使之对分解过程的贡献减少。

以往有关内生真菌的研究主要集中于内生真菌与植物的共生关系,然而随着研究范围的拓展,目前有些研究开始关注植物化学跨生态系统边界的“后生命效应”<sup>[52]</sup>,那么与之关联的植物内生真菌

随植物组织死亡后进入腐生系统的生态效应也随之成为关注的对象,但是对于内生真菌在腐生系统中养分与碳循环的生态学意义并不了解。有的研究在生态系统尺度,甚至在区域尺度上显示了优势内生真菌对碳库动态的“冷点”或“热点”效应<sup>[25,29]</sup>,表明内生真菌在大尺度上对碳库动态具有潜在的确定性作用。同时大多数有关内生真菌参与凋落物分解过程的研究显示,内生真菌不论是优势菌还是稀有菌均会对碳动态产生不同的影响,因此内生真菌对于凋落物分解过程的作用可能并不存在严格意义上的功能冗余<sup>[53]</sup>。每一种进入凋落物分解过程的内生真菌都可能具有不同的功能作用,我们的研究也显示在凋落物分解过程中无论是单一菌还是混合菌,绝大多数情况下均展示出明显的促进或抑制分解的作用,这一研究对于内生真菌植物生长以及群落更新等方面均具有重要的生态学意义,同时也为人工林管理以及土壤肥力的恢复提供一定的理论依据。

## REFERENCES

- [1] Wang ZW, Ji YL, Chen YG, et al. Endophytic fungi resources and species diversity in grass family[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(17): 4771-4781 (in Chinese)  
王志伟, 纪燕玲, 陈永敢, 等. 禾本科植物内生真菌资源及其物种多样性[J]. *生态学报*, 2010, 30(17): 4771-4781
- [2] Xing Y, Zhang X, Hao ZP, et al. Biodiversity of endophytes in tobacco plants and their potential application-a mini review[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(2): 411-419 (in Chinese)  
邢颖, 张莘, 郝志鹏, 等. 烟草内生菌资源及其应用研究进展[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(2): 411-419
- [3] Jin J, Zhao Q, Zhang XM, et al. Research progress on bioactive products from endophytes[J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 38(3): 103-113 (in Chinese)  
靳锦, 赵庆, 张晓梅, 等. 植物内生菌活性代谢产物最新研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2018, 38(3): 103-113
- [4] Yao LA, Hu ZB, Wang LL, et al. Research development of the relationship between plant endophyte and host[J]. *Ecology and Environment*, 2010, 19(7): 1750-1754 (in Chinese)  
姚领爱, 胡之璧, 王莉莉, 等. 植物内生菌与宿主关系研究进展[J]. *生态环境学报*, 2010, 19(7): 1750-1754
- [5] Yi T, Miao YX, Feng YJ. Plant-endophyte Interaction: Growth-promoting effect of endophytes and their biofilm formation[J]. *Microbiology China*, 2008, 35(11): 1774-1780 (in Chinese)  
易婷, 缪煜轩, 冯永君. 内生菌与植物的相互作用: 促生与生物薄膜的形成[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(11): 1774-1780
- [6] Shi JY, Chen WX, Liu AY. Advances in the study of endophytes and their effects on control of plant diseases[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(7): 2395-2401 (in Chinese)  
石晶盈, 陈维信, 刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展[J]. *生态学报*, 2006, 26(7): 2395-2401
- [7] Wen CY, Wu YH, Tian XL. Recent advances and issues on the endophyte[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2004, 23(2): 86-91 (in Chinese)  
文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题[J]. *生态学杂志*, 2004, 23(2): 86-91
- [8] Yang B, Chen Y, Li X, et al. Research progress on endophyte-promoted plant nitrogen assimilation and metabolism[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(9): 2656-2664 (in Chinese)  
杨波, 陈晏, 李霞, 等. 植物内生菌促进宿主氮吸收与代谢研究进展[J]. *生态学报*, 2013, 33(9): 2656-2664
- [9] Yang Z, Cao J. Research progress of endophytic fungi and their secondary metabolites[J]. *Journal of Microbiology*, 2016, 36(4): 1-6 (in Chinese)  
杨镇, 曹君. 植物内生菌及其次级代谢产物的研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2016, 36(4): 1-6
- [10] Müller MM, Valjakka R, Suokko A, et al. Diversity of endophytic fungi of single Norway spruce needles and their role as pioneer decomposers[J]. *Molecular Ecology*, 2001, 10(7): 1801-1810
- [11] Sieber-Canavesi F, Petrini O, Sieber TN. Endophytic *Leptostroma* species on *Picea abies*, *Abies alba*, and *Abies balsamea*: a cultural, biochemical, and numerical study[J]. *Mycologia*, 1991, 83(1): 89-96
- [12] Osono T, Takeda H. Effects of organic chemical quality and mineral nitrogen addition on lignin and holocellulose decomposition of beech leaf litter by *Xylaria* sp.[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2001, 37(1): 17-23
- [13] Osono T. Phyllosphere fungi on leaf litter of *Fagus crenata*: occurrence, colonization, and succession[J]. *Canadian Journal of Botany*, 2002, 80(5): 460-469
- [14] Koide K, Osono T, Takeda H. Colonization and lignin decomposition of *Camellia japonica* leaf litter by endophytic fungi[J]. *Mycoscience*, 2005, 46(5): 280-286
- [15] Fryar SC, Yuen TK, Hyde KD, et al. The influence of competition between tropical fungi on wood colonization in streams[J]. *Microbial Ecology*, 2001, 41(3): 245-251
- [16] Fukasawa Y, Osono T, Takeda H. Fungal decomposition of woody debris of *Castanopsis sieboldii* in a subtropical old-growth forest[J]. *Ecological Research*, 2012, 27(1):

211-218

- [17] Terekhova VA, Semenova TA. The structure of micromycete communities and their synecologic interactions with basidiomycetes during plant debris decomposition[J]. Microbiology, 2005, 74(1): 91-96
- [18] Korkama-Rajala T, Müller MM, Pennanen T. Decomposition and fungi of needle litter from slow-and fast-growing Norway spruce (*Picea abies*) clones[J]. Microbial Ecology, 2008, 56(1): 76-89
- [19] Promptutha I, Hyde KD, McKenzie EH, et al. Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes?[J]. Fungal Diversity, 2010, 41(1): 89-99
- [20] Siegrist JA, McCulley RL, Bush LP, et al. Alkaloids may not be responsible for endophyte-associated reductions in tall fescue decomposition rates[J]. Functional Ecology, 2010, 24(2): 460-468
- [21] Dickie IA, Fukami T, Wilkie JP, et al. Do assembly history effects attenuate from species to ecosystem properties? A field test with wood-inhabiting fungi[J]. Ecology Letters, 2012, 15(2): 133-141
- [22] Omacini M, Chaneton EJ, Ghersa CM, et al. Do foliar endophytes affect grass litter decomposition? A microcosm approach using *Lolium multiflorum*[J]. Oikos, 2004, 104(3): 581-590
- [23] Lemons A, Clay K, Rudgers JA. Connecting plant-microbial interactions above and belowground: a fungal endophyte affects decomposition[J]. Oecologia, 2005, 145(4): 595-604
- [24] Rudgers JA, Clay K. Endophyte symbiosis with tall fescue: how strong are the impacts on communities and ecosystems?[J]. Fungal Biology Reviews, 2007, 21(2/3): 107-124
- [25] LeROY CJ, Fischer DG, Halstead K, et al. A fungal endophyte slows litter decomposition in streams[J]. Freshwater Biology, 2011, 56(7): 1426-1433
- [26] Dai CC, Chen Y, Tian LS, et al. Correlation between invasion by endophytic fungus *Phomopsis* sp. and enzyme production[J]. African Journal of Agricultural Research, 2010, 5(11): 1324-1340
- [27] He XB, Han GM, Lin YH, et al. Diversity and decomposition potential of endophytes in leaves of a *Cinnamomum camphora* plantation in China[J]. Ecological Research, 2012, 27(2): 273-284
- [28] Chen Y, Wang HW, Li L, et al. The potential application of the endophyte *Phomopsis liquidambari* to the ecological remediation of long-term cropping soil[J]. Applied Soil Ecology, 2013, 67: 20-26
- [29] Lin YH, He XB, Ma TW, et al. Priority colonization of *Cinnamomum camphora* litter by endophytes affects decomposition rate, fungal community and microbial activities under field conditions[J]. Pedobiologia, 2015, 58(5/6): 177-185
- [30] Osono T, Hirose D. Effects of prior decomposition of *Camellia japonica* leaf litter by an endophytic fungus on the subsequent decomposition by fungal colonizers[J]. Mycoscience, 2009, 50(1): 52-55
- [31] Chen Y, Dai CC, Wang XX, et al. Effects of endophytic fungus (*Phomopsis* sp.) on decomposition of plant (*Atractylodes lancea* (Thunb)DC) litters and activity of degrading enzymes in soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2010, 47(3): 537-544 (in Chinese)
- 陈晏, 戴传超, 王兴祥, 等. 施加内生真菌拟茎点霉 (*Phomopsis* sp.)对茅苍术凋落物降解及土壤降解酶活性的影响[J]. 土壤学报, 2010, 47(3): 537-544
- [32] Fukami T, Dickie IA, Wilkie JP, et al. Assembly history dictates ecosystem functioning: evidence from wood decomposer communities[J]. Ecology Letters, 2010, 13(6): 675-684
- [33] Zou XH, Liu LQ, Liu QQ, et al. Influence of organic acids derived from litters to the availability of soil phosphorus in Chinese fir plantations[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2017, 48(5): 1154-1161 (in Chinese)
- 邹显花, 刘露奇, 刘青青, 等. 杉木凋落物源有机酸对土壤磷有效性的影响[J]. 土壤通报, 2017, 48(5): 1154-1161
- [34] Rajagopal R, Suryanarayanan TS. Isolation of endophytic fungi from leaves of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.)[J]. Current Science, 2000, 78(11): 1375-1378
- [35] Kumaresan V, Suryanarayanan TS. Endophyte assemblages in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation[J]. Fungal Diversity, 2002, 9: 81-91
- [36] Suryanarayanan TS, Thennarasan S. Temporal variation in endophyte assemblages of *Plumeria rubra* leaves[J]. Fungal Diversity, 2004, 15: 197-204
- [37] Fioretto A, Papa S, Sorrentino G, et al. Decomposition of *Cistus incanus* leaf litter in a Mediterranean maquis ecosystem: mass loss, microbial enzyme activities and nutrient changes[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(3): 311-321
- [38] Ghose TK. Measurement of cellulase activities[J]. Pure and Applied Chemistry, 1987, 59(2): 257-268.
- [39] Bernfeld P. Enzymes of starch degradation and synthesis[A]//Nord FF. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology[M]. New York: Wiley, 1951: 379-428
- [40] Bernfeld P. Amylases, alpha and beta[A]//Colowick SP, Kaplan NO. Methods in Enzymology[M]. New York: Academic Press, 1955: 149-158
- [41] Ander P, Eriksson KE. The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*[J]. Archives of Microbiology, 1976, 109(1/2): 1-8
- [42] Thormann MN, Currah RS, Bayley SE. Succession of microfungial assemblages in decomposing peatland plants[J]. Plant and Soil, 2003, 250(2): 323-333
- [43] Andersson MGI, Berga M, Lindström ES, et al. The spatial

- structure of bacterial communities is influenced by historical environmental conditions[J]. *Ecology*, 2014, 95(5): 1134-1140
- [44] Carroll G, Petrini O. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage[J]. *Mycologia*, 1983, 75(1): 53-63
- [45] Osono T, Takeda H. Decomposing ability of interior and surface fungal colonizers of beech leaves with reference to lignin decomposition[J]. *European Journal of Soil Biology*, 1999, 35(2): 51-56
- [46] Novotný Č, Cajthaml T, Svobodová K, et al. *Irpex lacteus*, a white-rot fungus with biotechnological potential-review[J]. *Folia Microbiologica*, 2009, 54(5): 375-390
- [47] Song FQ, Tian XJ, Hao JJ, et al. Decomposing ability of filamentous fungi on leaf litter in *Quercus variabilis* forest[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(1): 89-95 (in Chinese)  
宋福强, 田兴军, 郝杰杰, 等. 栓皮栎林下主要丝状真菌的分解能力[J]. *生态学报*, 2005, 25(1): 89-95
- [48] Matulich KL, Martiny JBH. Microbial composition alters the response of litter decomposition to environmental change[J]. *Ecology*, 2015, 96(1): 154-163
- [49] Ji XY, Jiang H, Hong JH, et al. The influence of acid rain on leaf litter decomposition and enzyme activity of three trees in the subtropical forests[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(7): 2027-2035 (in Chinese)  
季晓燕, 江洪, 洪江华, 等. 模拟酸雨对亚热带三个树种凋落叶分解速率及分解酶活性的影响[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(7): 2027-2035
- [50] Law BE, Thornton PE, Irvine J, et al. Carbon storage and fluxes in ponderosa pine forests at different developmental stages[J]. *Global Change Biology*, 2001, 7(7): 755-777
- [51] He XB, Lin YH, Han GM, et al. The effect of temperature on decomposition of leaf litter from two tropical forests by a microcosm experiment[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2010, 46(3/4): 200-207
- [52] Kominoski JS, Marczak LB, Richardson JS. Riparian forest composition affects stream litter decomposition despite similar microbial and invertebrate communities[J]. *Ecology*, 2011, 92(1): 151-159
- [53] Delgado-Baquerizo M, Giaramida L, Reich PB, et al. Lack of functional redundancy in the relationship between microbial diversity and ecosystem functioning[J]. *Journal of Ecology*, 2016, 104(4): 936-946