

研究报告

甘肃省野生羊肚菌根际细菌群落与土壤环境因子相关性研究

赵玉卉¹, 路等学^{*1}, 金辉², 杨阿丽¹, 秦鹏¹, 魏甲乾¹, 郭瑞¹, 张文齐¹

1 甘肃省科学院生物研究所, 甘肃 兰州 730000

2 中国科学院兰州化学物理研究所 中国科学院西北特色植物资源化学重点实验室, 甘肃 兰州 730000

赵玉卉, 路等学, 金辉, 杨阿丽, 秦鹏, 魏甲乾, 郭瑞, 张文齐. 甘肃省野生羊肚菌根际细菌群落与土壤环境因子相关性研究[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 514-528

Zhao Yuhui, Lu Dengxue, Jin Hui, Yang Ali, Qin Peng, Wei Jiaqian, Guo Rui, Zhang Wenqi. Relationship between the bacterial community and environmental factors in the rhizosphere soil of wild morels in Gansu[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 514-528

摘要:【背景】羊肚菌是全球广泛分布的物种, 具有重要的经济和科研价值, 其根际微生态系统各要素间的相关性研究相对较少。【目的】探究甘肃省不同地区野生羊肚菌根际土壤中细菌群落-土壤理化性质及细菌群落-酶活性相关性。【方法】采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术, 对细菌群落组成进行测量, 进而分析其多样性, 最终揭示细菌群落-土壤理化性质及细菌群落-酶活性相互关系。【结果】根际土壤 pH 值随海拔升高而降低, 然而土壤中大量元素含量、微量元素含量及酶活性随采样点呈现无规则变化。变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)在所有的采样点中都属于羊肚菌根际的优势细菌类群。LX 采样点的细菌 OTU 数量和 Shannon 多样性指数均高于其他 8 个采样点。冗余分析(redundancy analysis, RDA)表明, 变形菌门、拟杆菌门和疣微菌门与土壤含水量、养分和海拔呈正相关, 与 pH 值、Ca、Mg 含量呈负相关; 放线菌门、酸杆菌门、扁平菌门与 Mg 含量、土壤脲酶和芳基硫酸酯酶呈正相关, 与 Fe、Se、速效钾含量、土壤脱氢酶和碱性磷酸酶呈负相关; 芽单胞菌门和绿弯菌门与土壤 pH 值、Ca 含量呈正相关; 厚壁菌门与 Fe、Se 含量呈正相关。【结论】揭示了甘肃羊肚菌根际微生态系统各要素间的相互关

基金项目: 国家自然科学基金(31560037); 甘肃省自然科学基金(21JR1RA348); 甘肃省科学院应用研究与开发项目(2017JK-05, 2018JK-06); 甘肃省科学院农牧废弃物生物资源化创新团队项目(2019CX004-01); 甘肃省科学院产业化项目(2019CY01)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31560037); Natural Science Foundation of Gansu Province (21JR1RA348); Applied Research and Development Project of Gansu Academy of Sciences (2017JK-05, 2018JK-06); Agricultural and Animal Husbandry Waste Bioresource Innovation Team Project of Gansu Academy of Sciences (2019CX004-01); Industrialization Project of Gansu Academy of Sciences (2019CY01)

*Corresponding author: E-mail: ludengxue@126.com

Received: 2021-07-02; Accepted: 2021-09-17; Published online: 2021-11-26

系, 为羊肚菌的高效种植提供了理论指导。

关键词: 野生羊肚菌; 根际土壤; 环境因子; 细菌群落; 高通量测序

Relationship between the bacterial community and environmental factors in the rhizosphere soil of wild morels in Gansu

ZHAO Yuhui¹, LU Dengxue^{*1}, JIN Hui², YANG Ali¹, QIN Peng¹, WEI Jiaqian¹, GUO Rui¹, ZHANG Wenqi¹

1 Institute of Biology, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China

2 Key Laboratory of Chemistry of Northwestern Plant Resources of Chinese Academy of Sciences, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China

Abstract: [Background] Morel (*Morchella* spp.), a worldwide species, has important scientific and economic value. However, there are few studies on the correlation among elements of its rhizosphere microecosystem. [Objective] We explored bacterial community-soil physico-chemical property and bacterial community-enzyme activity relationships in rhizosphere soil of wild morels in different areas of Gansu Province. [Methods] With Illumina MiSeq technology, the bacterial community structure in the rhizosphere soil was measured and then bacterial diversity was analyzed. On this basis, the above relationships were elucidated. [Results] The pH of rhizosphere soil decreased with the rise of elevation, but the major and minor elements and enzyme activity varied irregularly with sampling site. *Proteobacteria* and *Actinobacteria* dominated at all the sampling sites. The bacterial operational taxonomic units (OTUs) and Shannon's diversity index at LX were more higher than those at other sites. Redundancy analysis (RDA) showed that *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Verrucomicrobia* were positively correlated with soil nutrients, soil water content, and elevation, but negatively correlated with soil pH and content of Ca and Mg. *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, and *Planctomycetes* were in positive correlation with Mg content, soil urease, and arylsulfatase, but in negative correlation with the content of Fe, Se, and available potassium, soil dehydrogenase, and alkaline phosphatase. *Gemmatimonadetes* and *Chloroflexi* were positively correlated with soil pH and Ca content, whereas *Firmicutes* showed positive correlation with the content of Fe and Se. [Conclusion] We clarified the correlation among elements in the rhizosphere soil microecosystem of wild morels in Gansu, laying a theoretical foundation for efficient cultivation of morel.

Keywords: wild morels; rhizosphere soil; environmental factors; bacterial community; high-throughput sequencing

羊肚菌 (*Morchella* spp.) 隶属于子囊菌门 (*Ascomycota*) 盘菌纲 (*Pezizomycetes*) 盘菌目 (*Pezizales*) 羊肚菌科 (*Moecellaceae*) 羊肚菌属

(*Morchella*)^[1-2]。羊肚菌肉质脆嫩、味道鲜美, 富含蛋白质、大量人体必需氨基酸、多种维生素及高含量的铁和锌等多种矿质元素^[3-5], 营养和

药用价值极高, 位居世界四大野生名菌之首。在羊肚菌属已知的 61 个物种中, 东亚或中国分布有 30 种, 是该属的现代物种多样性中心^[6]。羊肚菌具有生态多样性, 在该属中既有腐生菌物种, 也有共生菌物种, 甚至还有腐生-共生兼性的物种。2012 年之前, 羊肚菌主要靠野外采集, 2012 年后随着外援营养袋的使用及易出菇菌株的获得, 我国羊肚菌大田种植技术在全国范围内得到推广。然而, 出菇不稳定、不出菇、产量不高等问题普遍存在, 究其原因是对羊肚菌出菇原理的研究不够。

羊肚菌是一种土生菌, 不覆土羊肚菌无法出菇, 可见土壤中含有特定刺激其结实的有益因子^[7]。土壤中除了营养物质, 丰富的土壤微生物对其生长也有一定的影响。沈洪等^[8]采用 PCR-DGGE 技术对云南羊肚菌内生细菌多样性的研究表明, 内生细菌中主要有拟杆菌门、变形菌门和厚壁菌门, 这些细菌可能与羊肚菌的生长关系密切。熊川等^[9]对采集的 8 个野生羊肚菌发生地的菌塘土样和 2 个非菌塘土样进行分析, 结果表明羊肚菌菌塘土壤细菌多样性指数和丰度比非菌塘土壤高。张相锋等^[10]采用 Biolog-EC 法, 分析不同深度羊肚菌根际土壤微生物多样性, 结果表明羊肚菌根际土壤微生物多样性随土层加深而减小, 上层具有较高的多样性。杨晓绒等^[11]采用高通量测序技术测定了昭苏县野生羊肚菌不同土层深度的细菌类群, 结果显示 10–20 cm 土层微生物多样性较高, 含有丰富的固氮菌。

关于羊肚菌根际土壤理化性质方面的研究报道很少, 主要集中于羊肚菌野生生境的调查, 重点关注适合羊肚菌菌丝生长的土壤理化性质^[12–15]。土壤酶主要来源于土壤微生物, 但又影响土壤微生物的数量及群落结构, 是土壤物质运动和能量交换中最活跃的因素, 也是衡

量土壤肥力、土壤养分吸收及转化的重要指标之一^[16–17]。赵苗等^[18]测定了羊肚菌生长过程中的土壤酶活变化规律, 结果表明羊肚菌大田播种以后, 蔗糖酶与纤维素酶活性均呈先升高后降低的变化趋势, 淀粉酶活性则呈先降低再升高后降低的变化趋势, 过氧化氢酶的变化趋势却与淀粉酶相反。羊肚菌根际土壤细菌群落与土壤理化性质及酶活性之间相互关系的研究相对匮乏, 该方面的研究亟需加强。

甘肃省是横跨南北最长的省份, 具有独特的地理位置, 研究显示甘肃省的野生羊肚菌资源物种丰富^[19–22], 为本研究的开展提供了理想的地理条件。本文采用高通量测序技术, 对甘肃省不同地区羊肚菌根际土壤细菌群落组成、多样性等结构特征进行系统研究, 并结合土壤理化性质和酶活性, 分析羊肚菌根际微生态各要素之间的相互关系, 以期揭示根际微生态系统对羊肚菌生态适应的内在机制, 并为羊肚菌的人工种植及生态功能研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品信息

根据羊肚菌在甘肃省不同区域的分布情况设置 9 个采样地点, 具体信息见表 1。每个样点内设置 3 个 10 m×10 m 样方作为平行重复, 每个样方内选取长势良好的羊肚菌, 用干净的铁铲采集子实体及其周围半径 5 cm、深度 0–5 cm 的土壤, 从距离羊肚菌根际最近的位置用无菌毛刷收集土壤, 混合土样, 低温带回实验室, 放入–80 °C 冷冻备用。

紫外分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 高频红外碳硫测定仪, 德阳市科瑞仪器设备厂; 自动定氮仪, 上海晟声自动化分析仪器有限公司; 电感耦合等离子体直读光谱仪、原子荧光光谱仪, 赛默飞世尔科技有限公司; 离子

表 1 野生羊肚菌采样点信息、根际土壤理化性质及酶活性

Table 1 Sites information and general soil characteristics of rhizosphere soil of wild morels

Item	DS	DC	TB	LC	LK	ZQ	DB	LQ	LX
Altitude (m)	1 269	1 263	1 208	1 283	1 317	2 263	3 101	3 294	2 280
Latitude	N36°14'46"	N36°14'46"	N36°04'05"	N35°53'25"	N35°53'52"	N33°53'31"	N34°06'44"	N35°36'18"	N35°24'46"
Longitude	E108°26'50"	E108°26'50"	E108°36'38"	E108°22'46"	E108°23'39"	E103°54'25"	E103°9'15"	E102°45'01"	E102°59'32"
ST (°C)	13.57±0.31a	12.77±0.85a	13.50±0.30a	13.40±0.30a	13.50±0.30a	12.87±0.75a	10.53±0.31b	10.60±0.30b	13.20±0.62a
pH	7.93±0.03b	8.19±0.15a	7.68±0.07d	7.80±0.03c	7.47±0.06e	6.50±0.08g	6.46±0.08g	6.53±0.08g	6.99±0.09f
OM (g/kg)	33.40±1.13i	14.30±0.45h	56.80±2.72g	63.50±1.17f	104.00±3.60e	95.10±0.92d	344.00±7.54c	185.00±2.00b	87.00±1.53a
TN (g/kg)	1.76±0.05f	0.93±0.03g	3.03±0.06e	3.13±0.05e	4.84±0.05c	4.84±0.02c	12.00±0.12a	8.36±0.19 b	4.43±0.05d
TC (%)	3.59±0.06h	2.41±0.06i	4.47±0.05g	5.25±0.05f	7.78±0.03c	6.10±0.03d	21.22±0.08a	12.09±0.09b	5.66±0.03e
AN (mg/kg)	14.18±0.20h	11.65±0.09i	15.20±0.06g	17.22±0.12f	19.25±0.10e	27.35±0.26c	36.47±0.13a	27.86±0.17b	25.33±0.09d
N (mg/kg)	15.90±0.10h	5.50±0.15g	26.90±0.30f	25.60±0.50f	82.80±0.40b	30.80±0.31e	115.00±5.00a	64.60±0.30c	43.30±0.36d
AP (mg/kg)	3.45±0.10g	3.49±0.11g	7.04±0.08f	6.69±0.09f	11.72±0.06d	21.90±0.45b	25.35±0.32a	8.21±0.14e	13.18±0.16c
QAP (mg/kg)	309±1.00h	238±2.64i	386±6.24e	480±1.00c	628±6.00b	349±3.60g	751±5.57a	430±4.36d	374±5.29f
Se (mg/kg)	0.21±0.01e	0.14±0.01f	0.28±0.02c	0.25±0.02c	0.38±0.01b	1.00±0.02a	0.24±0.01d	0.23±0.01d	0.40±0.01b
Fe (%)	3.26±0.05b	3.28±0.10b	2.82±0.13d	2.89±0.08cd	2.89±0.07cd	4.63±0.11a	1.91±0.09e	3.01±0.06c	3.37±0.07b
Ca (%)	6.19±0.09a	6.07±0.06b	4.21±0.04e	5.38±0.08d	5.50±0.08c	0.56±0.04i	2.33±0.04f	1.52±0.08g	1.14±0.04h
Mg (%)	1.47±0.04a	1.50±0.04a	1.19±0.07bc	1.25±0.05b	1.26±0.04b	0.99±0.07d	0.75±0.05e	0.96±0.07d	1.11±0.05c
SH (%)	53.26±0.89e	65.92±2.91b	42.94±1.41f	63.71±2.51b	56.81±1.91d	60.64±1.43c	77.89±0.91a	66.52±1.54b	78.96±1.00a
PPO (mg/(d·g))	93.10±0.63a	93.67±1.31a	96.85±0.99a	93.80±0.15a	90.26±0.55a	56.50±0.15b	51.22±0.11b	57.51±0.27b	61.44±0.62b
β-GC (μmol/(d·g))	38.15±0.19b	43.46±0.87b	39.35±0.76b	18.19±0.47b	54.84±0.90b	50.91±0.19b	123.03±0.64a	57.01±0.65b	17.89±0.67b
POD (mg/(d·g))	123.80±0.59a	113.88±0.68a	125.19±0.36a	128.73±0.94a	112.75±0.51b	76.68±0.64b	45.37±0.92c	59.43±0.24c	73.67±0.49b
UE (μg/(d·g))	1 407.75±5.24a	1 398.72±13.99a	933.75±5.26d	909.28±40.82d	1 365.22±42.69a	1 077.38±1.60bc	1 091.66±6.87b	1 049.12±12.49bc	987.65±13.15cd
GLS (nmol/(min·g))	1 184.33±51.11a	1 195.45±8.25a	1 182.89±4.04a	1 183.04±7.73a	1 187.05±6.82a	1 172.45±25.81a	1 198.86±8.25a	1 206.19±16.17a	1 205.67±16.91a
DHA (μg/(d·g))	44.17±0.05c	56.33±0.90c	419.02±3.01b	400.70±0.18b	863.07±0.44a	888.82±4.16a	879.50±7.02a	542.24±7.09b	410.18±0.84b
ASF (μmol/(d·g))	34.64±0.97a	34.88±0.09a	34.51±0.47a	25.47±0.79c	23.01±0.47d	22.69±0.05d	20.73±0.16e	29.51±0.18b	20.74±0.13e
AKP (μmol/(d·g))	10.69±0.41b	5.28±0.16c	12.35±0.33ab	13.15±0.72ab	13.31±0.92ab	13.53±0.36a	14.00±0.08a	14.46±0.39a	12.91±0.93ab

注: 样本重复数 $n=3$, 同一列中不同的小写字母表示 0.05 水平差异显著性。ST: 土壤温度; OM: 有机质; TN: 全氮; TC: 全碳; AN: 氨态氮; N: 硝态氮; AP: 有效磷; QAP: 速效钾; SH: 含水率; PPO: 多酚氧化酶; β-GC: β-葡萄糖苷酶; POD: 过氧化物酶; UE: 脲酶; GLS: 谷氨酰胺酶; DHA: 脱氢酶; ASF: 芳基硫酸酯酶; AKP: 土壤碱性磷酸酶

Note: The number of sample repetitions $n=3$, and different lowercase letters in the same column indicate the significance of the difference at the 0.05 level. ST: Soil temperature; OM: Organic material; TN: Total nitrogen; TC: Total carbon; AN: Ammonia nitrogen; N: Nitrate; AP: Available phosphorus; QAP: Quick-acting potassium; SH: Soil humidity; PPO: Polyphenol oxidase; β-GC: β-glucosidase; POD: Peroxidase; UE: Urease; GLS: Glutaminase; DHA: Delyhydrogenase; ASF: Arylsulfatase; AKP: Alkaline phosphatase.

色谱仪、火焰原子吸收仪, 日立公司。

1.2 土壤理化性质及酶活性测定

土壤 pH 值采用酸度计测定, 以去除 CO₂ 的纯水为浸提剂, 水:土的体积质量比为 2.5:1; 土壤全氮采用自动定氮仪法测定; 全碳使用元素分析仪测定; 有机质采用重铬酸钾容量法测定; 铵态氮采用自动定氮仪测定; 硝态氮采用离子色谱仪测定; 有效磷采用紫外-可见分光光度计测定; 速效钾采用火焰原子吸收仪测定; 土壤微量元素(Fe、Ca、Mg)含量采用电感耦合等离子体直读光谱仪测定; Se 测定采用原子荧光仪测定。土壤含水率的测定: 用 0.1 g 精度的天平称取土样的重量, 记作土样的湿重 *M*, 在 105 °C 的烘箱内将土样烘 6–8 h 至恒重, 然后测定烘干土样, 记作土样的干重 *M_s*。土壤含水量=(烘干前铝盒及土样质量-烘干后铝盒及土样质量)/(烘干后铝盒及土样质量-烘干空铝盒质量)×100%。

土壤多酚氧化酶活性采用没食子素比色法测定; 土壤过氧化物酶活性采用邻苯三酚比色法测定; 土壤脲酶活性采用靛酚蓝比色法测定; 脱氢酶活性采用三苯基四氮唑氯化物(triphenyltetrazolium chloride, TTC)比色法测定; 土壤碱性磷酸酶活性采用磷酸苯二钠比色法测定; 芳基硫酸酯酶活性、β-葡萄糖苷酶活性采用对硝基苯酚比色法测定; 谷氨酰胺酶活性采用氨比色法测定。

1.3 土壤样品总 DNA 提取与 MiSeq 测序

对采集的羊肚菌根际土壤样品, 利用 Omega 公司的土壤 DNA 提取试剂盒 E.Z.N.ATM Mag-Bind Soil DNA Kit 对土壤总基因组 DNA 进行提取, 采用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度。PCR 引物采用细菌 16S rRNA 基因的

V3–V4 可变区通用引物 341F (5'-CCTACGGGN GGCWGCAG-3')和 805R (5'-GACTACTACHVG GGTATCTAATCCG-3')^[23]。第一轮 PCR 反应体系: 2×*Taq* Master Mix 15 μL, Bar-PCR primer F (10 μmol/L) 1 μL, primer R (10 μmol/L) 1 μL, Genomic DNA 10–20 ng, 加 ddH₂O 补足至 30 μL。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 45 °C 20 s, 65 °C 30 s, 5 个循环; 94 °C 20 s, 55 °C 20 s, 72 °C 30 s, 20 个循环; 72 °C 5 min。第二轮扩增引入 Illumina 桥式 PCR 兼容引物。PCR 反应体系: 2×*Taq* Master Mix 15 μL, Bar-PCR primer F (10 μmol/L) 1 μL, primer R (10 μmol/L) 1 μL, 上一轮 PCR 产物 20 ng, 加 ddH₂O 补足至 30 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 94 °C 20 s, 55 °C 20 s, 72 °C 30 s, 5 个循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后回收纯化, 应用 Illumina MiSeq 2×300 bp 平台进行宏基因组测序。测序服务和生物信息分析工作由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.4 生物信息学分析

Illumina MiSeqTM得到的原始图像数据文件经 CASAVA 碱基识别(base calling)分析转化为原始测序序列(sequenced read), 称为 raw data 或 raw read。测序序列中含有 barcode 序列和测序时加入的引物和接头序列, 首先需去除引物和接头序列, 再根据 PE read 之间的 overlap 关系, 将成对的 read 拼接成一条序列, 然后按照 barcode 标签序列识别并区分样品得到各样本数据, 最后对各样本数据的质量进行质控过滤, 得到各样本有效数据(clean read)。用 USEARCH 5.2.236 软件对所有样品的全部 clean read 序列进行 OTU 聚类(97%的一致

性)^[24]。用 QIIME 中的 BLAST 方法与 RDP 数据库进行物种注释分析, OTU 的丰度初步表明样品的物种丰富度^[25]。获得的数据提交 GenBank, 获得登录号为: DS (SRR11887800、SRR11887811、SRR11887812), DC (SRR11887790、SRR11887791、SRR11887792), TB (SRR11887787、SRR11887788、SRR11887789), LC (SRR11887786、SRR11887810、SRR11887809), LK (SRR11887806、SRR11887807、SRR11887808), ZQ (SRR11887803、SRR11887804、SRR11887805), DB (SRR11887799、SRR11887801、SRR11887802), LQ (SRR11887796、SRR11887797、SRR11887798), LX (SRR11887793、SRR11887794、SRR11887795)。

1.5 数据分析

采用 QIIME 计算的指数, 利用软件 R 进行稀释度曲线绘制; 利用 Mothur 软件进行单个样品的 α 多样性分析, 基于 OTU 的结果, 计算 Shannon 指数、Chao1 指数进行生物多样性分析。用 RDP Classifier 分析方法, 基于 Bergey's taxonomy, 采用 Naïve Bayesian assignment 算法对每条序列在不同层级水平上计算其分配到此 rank 中的概率值。用 QIIME 中的 BLAST 方法与 Unite 数据库进行物种注释分析, 各组样品在不同水平上的分类比较柱形图、单个样品的群落分布柱形图使用 R 软件获得。为了分析土壤环境因子对羊肚菌根际土壤细菌多样性的影响, 以细菌群落在门水平(取前 10 个门)的相对丰度数据作为物种数据, 土壤的理化性质及酶活性作为土壤的环境变量, 通过软件 Canoco 4.5 进行冗余分析(redundancy analysis, RDA), 对各样品土壤细菌类群与土壤环境因子的相关关系进行分析。用 SigmaPlot 12.5 软件中的 one-way analysis of variance (ANOVA)分析不同采样点细菌群落在属水平的显著性差异, 当 $P < 0.05$ 时, 认为具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 羊肚菌根际土壤理化性质及酶活性

由表 1 可知, ZQ、DB、LQ、LX 采样点羊肚菌根际土壤呈酸性, DS、DC、TB、LC、LK 采样点羊肚菌根际土壤呈碱性, 采样点的 pH 值为 6.46–8.19。大量元素随海拔升高呈逐渐增加的趋势, DB 采样点的大量元素含量最高, DC 采样点的大量元素含量最低, 各采样点微量元素的变化各异。9 个采样点中, 土壤多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)、过氧化物酶(oxidase, POD)、脲酶(urease, UE)、芳基硫酸酯酶(arylsulfatase, ASF)随海拔升高呈现降低的趋势; 而 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, β -GC)、脱氢酶(dehydrogenase, DHA)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)随着海拔升高呈升高趋势; β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, β -GC)的活性在 DB 采样点显著高于其他采样点; 谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS)在各采样点变化不大。

2.2 羊肚菌根际土壤细菌群落丰度

羊肚菌根际土壤的 9 个样品, 以大于 97% 相似性聚类得到 43 262 个细菌 OTU, 统计结果见表 2。各样品测序覆盖度在 93% 以上, 样品稀释曲线(图 1)显示, 随着测序样品数目的增加, 9 个样品的 OTU 稀释曲线趋于平缓, 表明本实验测序的数据量渐进合理, 能较全面地反映测序样品的细菌群落组成, 数据量的增多对发现新的 OTU 数目的贡献变小。

2.3 羊肚菌根际土壤细菌组成、多样性分析

不同地区羊肚菌根际土壤在门水平上的物种组成结果显示, 9 个样点中共检测到 27 个门的细菌(图 2A), 在 DS、DC、TB、LK、DB、LQ、LX 采样点的优势细菌类群为变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和酸

表 2 不同样点野生羊肚菌根际土壤测序结果及 α 多样性分析

Table 2 Sequencing results and alpha diversity analysis in rhizosphere soil of wild morels in different sampling sites

Samples	Total number of sequences	OTU	Shannon index (97%)	ACE index (97%)	Chao1 index (97%)	Coverage (%)
DB	43 670	4 645	6.77±0.12c	9 969.37±375.91a	7 781.55±225.13ab	94.95
DC	40 593	4 769	6.93±0.03b	7 922.41±928.43c	7 213.81±273.46bc	94.99
DS	40 224	4 901	6.97±0.08b	9 612.06±555.33ab	7 669.99±497.88abc	94.65
LC	39 018	4 959	6.81±0.04c	10 197.12±248.16a	7 938.61±173.02ab	94.22
LK	40 737	4 986	6.91±0.08b	10 070.90±202.33a	8 034.40±286.41a	94.49
LQ	34 080	4 892	7.13±0.04a	9 719.70±189.71ab	7 735.63±199.19abc	93.57
LX	35 613	5 015	7.18±0.01a	9 745.99±716.28ab	7 937.96±595.65ab	93.75
TB	36 186	4 635	6.61±0.02d	10 206.65±410.47a	7 818.71±172.85ab	93.73
ZQ	39 198	4 460	6.46±0.02e	8 848.21±593.42b	7 007.58±742.71c	94.62

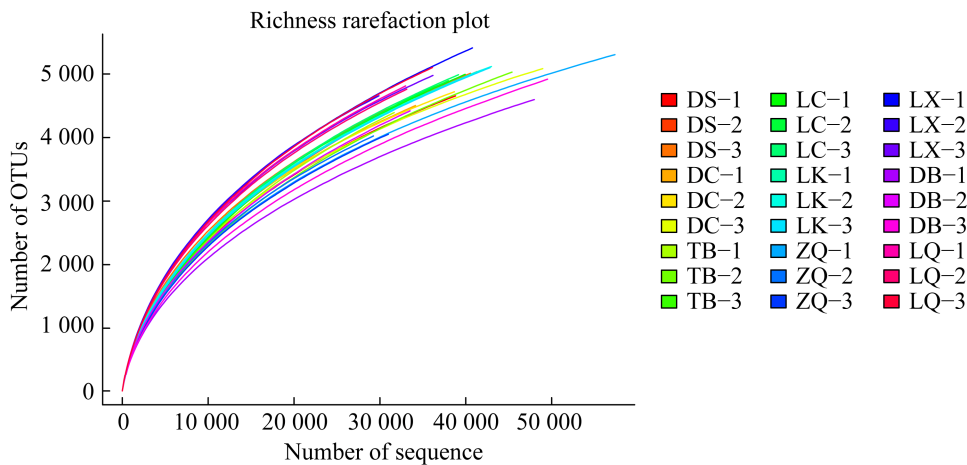
注: 样本重复数 $n=3$, 同一列中的不同的小写字母表示 0.05 水平差异显著性Note: The number of sample repetitions $n=3$, and different lowercase in the same column indicate the significance of the difference at the 0.05 level.

图 1 野生羊肚菌根际土壤细菌 OTU 稀疏度曲线图

Figure 1 Curve of bacterial OTU thinning in rhizosphere soil of wild morels.

杆菌门(*Acidobacteria*), 分别占细菌总序列数的 41.59%、22.51%和 12.56%, 占总丰度的 76.66%。在 LC、ZQ 采样点优势菌门为变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)。

在科水平上, 9 个根际土壤样品共注释到了 202 个细菌类群(图 2B), 鞘藻科(*Sphingomonadaceae*) (19.35%)、酸性细菌_Gp6_

未分类(*Acidobacteria_Gp6_unclassified*) (6.85%)、扁平菌科(*Planctomycetaceae*) (4.99%)、杆菌科 1 (*Bacillaceae* 1) (14.12%)为优势菌科, 占总序列数目的 35.31%。DS、LK 样点, 鞘藻科(*Sphingomonadaceae*)、酸性细菌_Gp6_未分类(*Acidobacteria_Gp6_unclassified*)和杆菌科(*Bacillaceae*) 1 是优势菌科; DC 采样点, 鞘藻科(*Sphingomonadaceae*)、扁平菌科(*Planctomycetaceae*)

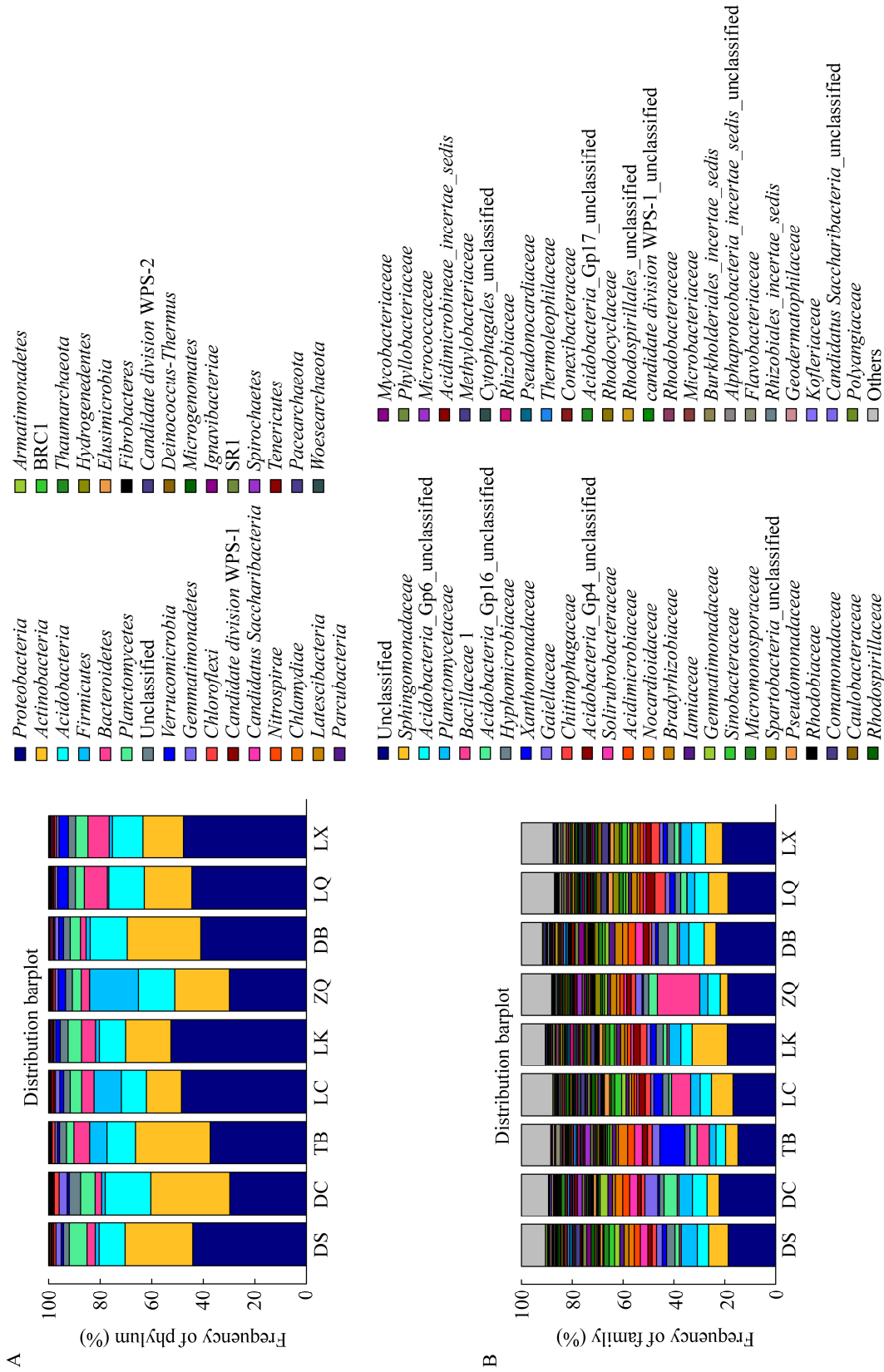


图 2 野生羊肚菌根际土壤细菌在门(A)、科(B)水平上的分类比较

Figure 2 Taxonomic comparison of bacteria in rhizosphere soil of wild morels at phylum (A) and family (B) level.

和杆菌科(*Bacillaceae*) 1 是优势菌科; TB、LC 采样点, 鞘藻科(*Sphingomonadaceae*)、*Acidobacteria_Gp6_unclassified* 和 *Acidobacteria_Gp16_unclassified* 为优势菌科; ZQ、DB、LQ、LX 采样点, 鞘藻科(*Sphingomonadaceae*)、*Acidobacteria_Gp16_unclassified*、扁平菌科(*Planctomycetaceae*)为优势菌科。

9 个样点羊肚菌根际土壤细菌 α 分析结果见表 2, Shannon 指数分析结果表明: LX>LQ>DS>DC>LK>LC>DB>TB>ZQ; Chao1 指数分析结果为 LK>LC>LX>TB>DB>LQ>DS>DC>ZQ; 采样点 ZQ 的羊肚菌根际土壤的细菌多样性和丰富度在 9 个样点中最低; 采样点 LX、LQ 的根际土壤细菌多样性最丰富, Shannon 指数分别为 7.18 和 7.13, 样品 LK、LC、LX 根际土壤细菌丰富度最高, Chao1 指数分别为 8 034.40、7 938.61 和 7 937.96。

2.4 羊肚菌根际土壤群落结构聚类分析

根据 9 个样地样品在属水平上的物种注释及相对丰度数据, 通过最大值排序方法, 选择相对丰度排名前 50 的细菌属, 绘制羊肚菌根际土壤细菌聚类分析热图(图 3)。9 个样地中, 鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、GP6、GP16、*Gaiella* 相对丰度均较高, 在 TB、ZQ 采样点中嗜热芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*)相对丰度较其他 7 个采样点高, 在 DS、TB、DC、DB 采样点中单核杆菌属(*Solirubrobacter*)相对丰度较其他 5 个采样点高, 发光杆菌属(*Ilumatobacter*)在 LC 采样点的丰度较其他 8 个采样点低; 芽孢杆菌属(*Bacillus*)在 LC、TB 采样点相对丰度较高, 在 LQ、DB 采样点丰度很低; *Gemmatimonas* 在 LC、DS、DC、DB 相对丰度较其他 5 个采样点高; 诺卡氏菌属(*Nocardioides*)在 DS、TB、DC 和 DB 采样点的相对丰度较其他 5 个采样点高; 窄食单胞菌属(*Stenotrophomonas*)

高于其他采样点; 新鞘脂菌属(*Novosphingobium*) 在 LK 采样点的物种丰度最高。

2.5 羊肚菌土壤细菌群落结构与土壤环境因子相互关系

对 9 个采样点野生羊肚菌根际土壤细菌群落进行主成分分析, 结果见图 4, 细菌群落受主坐标成分 PCA1 与 PCA2 的影响分别达到 95% 与 2%。DB、DC 采样地细菌群落与 PCA1 轴相距较近, 与 PCA2 轴相距较远, 因此该地细菌群落受主成分 PCA1 的影响较大; DS、LC、LK、LQ、LX 采样点均表现为受主成分 PCA1、PCA2 的相互影响, 并且上述 7 个样地在图中相聚较近, 表明 7 个样地细菌群落结构相似; TB 和 ZQ 采样点与其他 7 个采样点相距较远, 而且彼此相距也较远, 说明这两地的细菌群落结构与上述 7 个采样点差异较大, 而 ZQ 样地的细菌群落结构与其他 8 个采样点的差异最大。进一步在属水平上对细菌群落组成进行成对比较, 结果见表 3。LQ 和 LX 样地的细菌群落组成与样地 DS、DC、TB、ZQ 和 DB 间存在显著或极显著的差异; 样地 DC 的细菌群落组成与 LC、LK、TB、LQ 这 4 个样地存在显著差异; 而样地 LC 的细菌群落组成则与样地 ZQ 和 DB 存在显著差异; 样地 LK 与 DB 之间的细菌在属水平上也存在显著差异。

通过 RDA 分析, 探明土壤环境因子与羊肚菌根际土壤细菌群落的相关关系, 结果见图 5。第一、二排序轴累计解释率分别为 55.6% 和 25.7%, 累计解释率达到 81.3%, 说明第一、二排序轴能较好地反映出细菌群落与土壤理化性质及酶活性之间的相关关系。主要的细菌类群中, 变形菌门、拟杆菌门和疣微菌门与土壤含水量、硝态氮、全氮、速效钾、全碳、有机质、铵态氮和海拔箭头方向相同, 说明细菌群落与养分、土壤含水量及海拔呈正相关, 而与

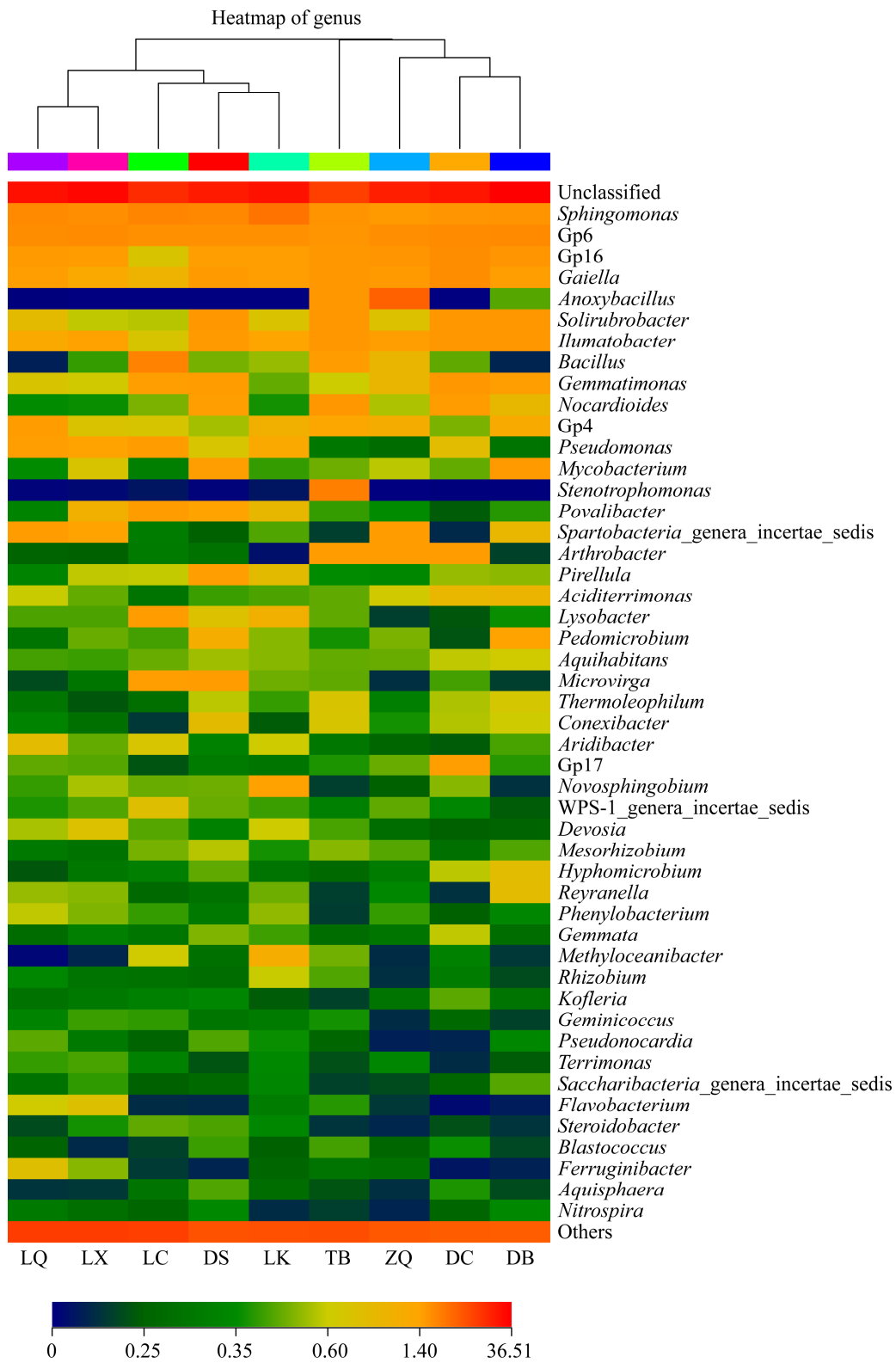


图 3 野生羊肚菌根际土壤细菌物种丰度聚类图

Figure 3 Cluster map of bacterial species abundance in rhizosphere soil of wild morels.

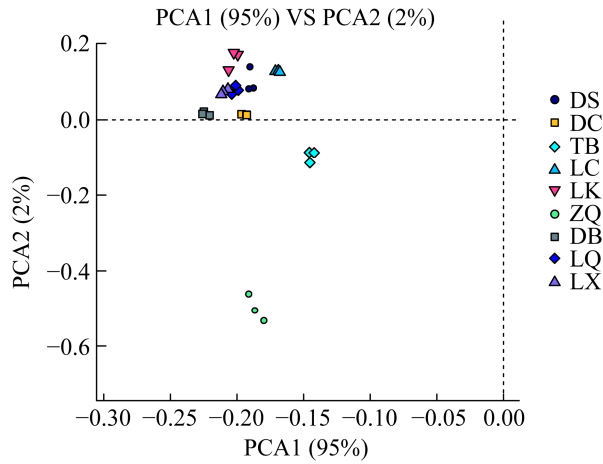


图4 野生羊肚菌土壤菌群结构 PCA 分析
Figure 4 PCA analysis of soil bacterial community structure of wild morels.

pH、Ca、Mg 含量箭头方向相反,呈负相关;放线菌门、酸杆菌门、扁平菌门与 Mg 含量、土壤脲酶和芳基硫酸酯酶箭头方向一致呈正相关,与 Fe、Se、速效钾含量、土壤脱氢酶和碱性磷酸酶箭头方向相反,呈负相关;芽单胞菌门和绿弯菌门与土壤 pH、Ca 含量呈正相关,厚

壁菌门与 Fe、Se 呈正相关。

3 讨论与结论

3.1 甘肃省羊肚菌根际土壤细菌组成多样性

在细菌门水平上,采样点 DS、TB、LC、LK、ZQ、DB、LQ、LX 的羊肚菌根际土壤细菌中变形菌门占比最高,其次为放线菌门和酸杆菌门,DC 采样点中放线菌门的占比稍高于变形菌门。杨晓绒等^[11]在新疆伊犁昭苏县羊肚菌根际土壤微生物的研究中发现根际土壤中优势菌门也为变形菌门;变形菌门在土壤中广泛分布,是土壤细菌中丰度最大的细菌之一,变形菌门细菌具有多种代谢种类,是多种化学循环过程的参与者^[26],其在羊肚菌根际土壤的化学循环中发挥一定的作用。放线菌门是荒漠类土壤的优势细菌门^[27],DC 采样点中放线菌门是其优势菌门。酸杆菌门作为土壤中参与大量关键物质循环的参与者,一些前人研究表明其受土壤 pH 的调控,与 pH 呈现负相关关系^[28];但

表3 不同采样地属水平上的细菌群落显著性分析

Table 3 Significance analysis of bacterial community in different sampling sites in genus level

Pairwise comparison	One-way ANONA		Pairwise comparison	One-way ANONA		Pairwise comparison	One-way ANONA	
	H	P		H	P		H	P
DS vs. DC	2.637	0.104	DC vs. DB	0.042	0.838	LC vs. LQ	1.216	0.270
DS vs. TB	1.018	0.313	DC vs. LQ	14.031	<0.001	LC vs. LX	1.526	0.217
DS vs. LC	2.886	0.089	DC vs. LX	14.863	<0.001	LK vs. ZQ	3.340	0.068
DS vs. LK	1.141	0.285	TB vs. LC	0.134	0.715	LK vs. DB	7.383	0.007
DS vs. ZQ	0.102	0.749	TB vs. LK	0.254	0.614	LK vs. LQ	1.040	0.308
DS vs. DB	1.253	0.263	TB vs. ZQ	3.239	0.072	LK vs. LX	1.358	0.244
DS vs. LQ	5.760	0.016	TB vs. DB	3.558	0.059	ZQ vs. DB	0.242	0.623
DS vs. LX	6.458	0.011	TB vs. LQ	4.100	0.043	ZQ vs. LQ	10.882	<0.001
DC vs. TB	5.295	0.021	TB vs. LX	4.737	0.030	ZQ vs. LX	11.695	<0.001
DC vs. LC	9.049	0.003	LC vs. LK	0.0795	0.778	DB vs. LQ	11.623	<0.001
DC vs. LK	5.878	0.015	LC vs. ZQ	6.579	0.010	DB vs. LX	12.437	<0.001
DC vs. ZQ	0.947	0.331	LC vs. DB	6.499	0.011	LQ vs. LX	0.077	0.780

注:加粗字体表示 2 个比较的采样点,属水平细菌群落有显著性差异

Note: Bold font indicates two comparative sampling points, there is a significant difference in the bacterial community of the genus level.

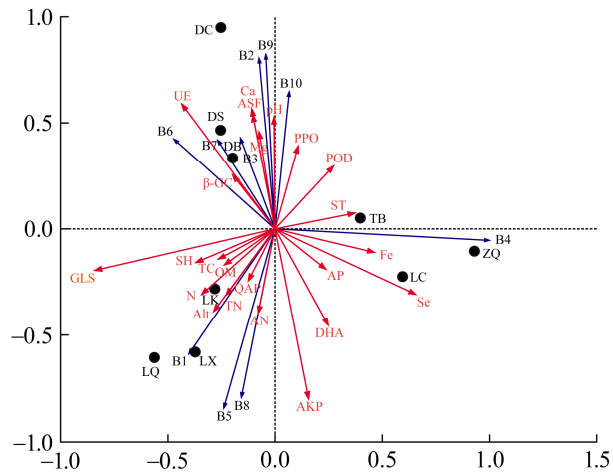


图 5 野生羊肚菌根际土壤门水平上细菌群落与环境因子的相关性 RDA 分析。红色箭头代表土壤酶活和理化性质在水平面上的相对位置, 箭头与排序轴的夹角不同, 则其余弦值不同, 即二者的相关性强度也不同。夹角越小, 相关性越大; 箭头的长度越长, 代表该环境因子发挥的作用越大; 蓝色箭头代表门水平上的物种分布, 箭头越长代表物种在样品中的影响越大; 黑色的圆点代表不同的采样地。各细菌编号代表: B1: 变形菌门; B2: 放线菌门; B3: 酸杆菌门; B4: 厚壁菌门; B5: 拟杆菌门; B6: 扁平菌门; B7: 未分类; B8: 疣微菌门; B9: 芽单胞菌门; B10: 绿弯菌门; AN: 氨态氮; AP: 有效磷; QAP: 速效钾; N: 硝态氮; SH: 含水率; ST: 土壤温度; TC: 全碳; OM: 有机质; PPO: 多酚氧化酶; POD: 过氧化物酶; UE: 脲酶; ASF: 芳基硫酸酯酶; β -GC: β -葡萄糖苷酶; DHA: 脱氢酶; AKP: 碱性磷酸酶

Figure 5 RDA analysis of the correlation between the bacterial community and environmental factors in the rhizosphere soil phylum of wild morels. B1: Proteobacteria; B2: Actinobacteria; B3: Acidobacteria; B4: Firmicutes; B5: Bacteroidetes; B6: Planctomycetes; B7: Unclassified; B8: Verrucomicrobia; B9: Gemmatimonadetes; B10: Chloroflexi; AN: Ammonia nitrogen; AP: Available phosphorus; QAP: Rapidly available potassium; N: Nitrate; SH: Soil humidity; ST: Soil temperature; TC: Total carbon; OM: Organic material; PPO: Polyphenol oxidase; POD: Peroxidase; UE: Urease; ASF: Arylsulfatase; β -GC: β -glucosidase; DHA: Dehydrogenase; AKP: Alkaline phosphatase.

也有研究表明, 酸杆菌门受 pH 的影响较小, 而受土壤理化性质的影响较多^[29]。本研究中, 除 DC 采样点外, pH 值越低酸杆菌门丰度越高。在细菌科水平上, 优势菌科为鞘藻科 (*Sphingomonadaceae*) (19.35%)、酸性细菌_Gp6_未分类 (*Acidobacteria_Gp6_unclassified*) (6.85%)、扁平菌科 (*Planctomycetaceae*) (4.99%), 其优势菌科与熊川、杨晓绒等报道的优势菌科^[9,11]有差异。从属水平来看, 其优势菌属为鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、Gp6、Gp16、盖埃拉属 (*Gaiella*)、嗜热芽孢杆菌属 (*Anoxybacillus*)、单核杆菌属 (*Solirubrobacter*)、发光杆菌属 (*Ilumatobacter*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、*Gemmatimonas*、诺卡氏菌属 (*Nocardioides*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。其优势菌属中, 鞘氨醇单胞菌、芽孢杆菌、诺卡氏菌、假单胞菌均为固氮菌, 固氮菌能够促进玉米等农作物和平菇等食用菌菌丝的生长, 固氮菌可以固定分子态氮, 能在生长过程中分泌吡啶乙酸、萘乙酸、赤霉素等生长激素及病原菌拮抗物质^[30-31]。鞘氨醇单胞菌广泛分布于土壤中, 是清理土壤中一些有毒物质的有效微生物类群之一, 能在土壤中分泌糖类营养物质, 促进羊肚菌吸收^[32-33]。研究发现, 假单胞菌属是双孢菇子实体发生所必需的环境微生物^[34], 该属的恶臭假单胞菌能促进羊肚菌菌核生成^[35], 可能对羊肚菌子实体的形成有一定影响。此外, 假单胞菌属能够抑制土壤病原菌生长, 并能降解环境中有毒有害物质^[36], 是有生物防治功能的重要的土壤细菌类群^[37]。从门、科、属中的 unclassified bacterial class 比例依次升高可见, 羊肚菌根际土壤中仍存在大量未知的细菌群落, 这与张婷等^[38]的研究一致。

3.2 土壤环境因子、酶活性与羊肚菌根际土壤细菌群落间的关系

研究表明, 土壤微生物多样性及群落组成

结构受土壤环境因子的影响显著^[39], 不同的细菌群落会受到一个或多个环境因子的影响。通过研究, 我们发现羊肚菌根际土壤细菌菌群变形菌门、拟杆菌门和疣微菌门与土壤含水量、营养、海拔呈正相关, 说明越是土壤含水量高、有机质及氮含量高的土壤, 海拔越高越有利于这些细菌群落的生长; 而 pH、Ca 和 Mg 的含量与这些细菌群落呈现负相关。野生羊肚菌每年发生的位置大体相同, 目前北方羊肚菌种植过程中存在严重的连作障碍, 羊肚菌的连作障碍机制无研究报道, 推测与土壤中微量元素失衡、病原菌增加等有关^[40]。羊肚菌种植前的土壤需要使用生石灰去灭菌土壤, 每亩地的石灰施用量多达 100 kg, 使土壤中的 pH 值升高、Ca 和 Mg 含量增加, 根据本研究的结果, pH、Ca 和 Mg 的含量升高会使变形菌门、拟杆菌门和疣微菌门的菌群数量降低, 栽培羊肚菌根际土壤中的情况需进行进一步的研究。放线菌门、酸杆菌门、扁平菌门与 Mg 含量呈正相关, 与 Fe、Se 含量呈负相关; 而厚壁菌门与 Fe、Se 含量呈正相关, 说明微量元素对根际土壤细菌群落有影响, 在一定程度上为人工种植羊肚菌过程中合理地添加一些微量元素、调节羊肚菌根际土壤中的菌群提供依据, 这与何培新等^[40]的推测一致。

土壤酶活性对环境因子的变化反应敏捷, 根际酶活性不仅受根际分泌物质的影响, 还受到微生物活动的影响。在本研究中, 我们发现放线菌门、酸杆菌门、扁平菌门与土壤脲酶和芳基硫酸酯酶呈正相关, 与土壤脱氢酶和碱性磷酸酶呈负相关, 厚壁菌门与土壤脱氢酶呈正相关。羊肚菌在生活史周期中向土壤环境中释放代谢产物, 代谢产物影响羊肚菌根际土壤中的微生物群落, 微生物群落的变化会导致土壤酶活性的变化, 并反作用于羊肚菌, 影响羊肚菌

的发生。

因此, 本研究通过羊肚菌根际土壤高通量测序, 以及环境因子和酶活性对细菌群落的相互关系研究, 揭示羊肚菌根际微生态系统各要素间的相互关系, 并为羊肚菌的科学种植提供理论指导。

REFERENCES

- [1] 贺新生, 候大斌. 世界栽培蕈菌的种类和分类系统[J]. 食用菌学报, 1997, 4(2): 54-64
He XS, Hou DB. The species and the classification system of the cultivated mushroom[J]. Acta Edulis Fungi, 1997, 4(2): 54-64 (in Chinese)
- [2] 贺新生. 现代菌物分类系统[M]. 北京: 科学出版社, 2015
He XS. Modern Fungi Classification System[M]. Beijing: Science Press, 2015 (in Chinese)
- [3] McKellar RL, Kohrman RE. Amino acid composition of the morel mushroom[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1975, 23(3): 464-467
- [4] Crisan EV, Sands A. Nutritional value[A]//The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms[M]. Amsterdam: Elsevier, 1978: 137-168
- [5] 兰进, 曹文琴, 徐锦堂. 中国羊肚菌属真菌资源[J]. 资源科学, 1999, 21(2): 56-61
Lan J, Cao WQ, Xu JT. Resources of *Morchella* fungi in China[J]. Resources Science, 1999, 21(2): 56-61 (in Chinese)
- [6] 杜习慧, 赵琪, 杨祝良. 羊肚菌的多样性、演化历史及栽培研究进展[J]. 菌物学报, 2014, 33(2): 183-197
Du XH, Zhao Q, Yang ZL. Diversity, evolutionary history and cultivation of morels: a review[J]. Mycosystema, 2014, 33(2): 183-197 (in Chinese)
- [7] 沈洪. 云南羊肚菌分类及其生长土壤微生物群落结构分析[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2007
Shen H. Classification of morels and analysis of the microorganism population within morels growth soil in Yunnan[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2007 (in Chinese)
- [8] 沈洪, 陈明杰, 赵永昌, 潘迎捷. 羊肚菌内生细菌 DGGE 鉴定[J]. 上海农业学报, 2008, 24(2): 58-60
Shen H, Chen MJ, Zhao YC, Pan YJ. PCR-DGGE identification of endophytes in morels[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2008, 24(2): 58-60 (in Chinese)
- [9] 熊川, 李小林, 李强, 郑林用. 羊肚菌菌塘土壤细菌群

- 落的结构及多样性[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2015, 41(4): 428-434
- Xiong C, Li XL, Li Q, Zheng LY. Bacteria community structure and diversity in *Morchella* colonies[J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences, 2015, 41(4): 428-434 (in Chinese)
- [10] 张相锋, 杨晓绒, 焦子伟. 伊犁野生羊肚菌根际土壤微生物功能多样性分析[J]. 微生物学杂志, 2019, 39(2): 83-89
- Zhang XF, Yang XR, Jiao ZW. Functional Diversity Analysis of Rhizosphere soil Microorganism of Wild *Morchella* in Yili[J]. Journal of Microbiology, 2019, 39(2): 83-89 (in Chinese)
- [11] 杨晓绒, 赖晓辉, 吾尔恩·阿合别尔迪, 焦子伟, 张相锋. 昭苏县野生羊肚菌根际土壤细菌多样性研究[J]. 微生物学杂志, 2020, 40(4): 24-33
- Yang XR, Lai XH, Oren Akhberdi, Jiao ZW, Zhang XF. Bacterial diversity in rhizosphere soil of wild morels in Zhaosu County[J]. Journal of Microbiology, 2020, 40(4): 24-33 (in Chinese)
- [12] 肖锋, 王得贤, 杨冬梅. 温度 pH 值光照对羊肚菌菌丝生长的影响[J]. 中国食用菌, 2000, 19(5): 13-15
- Xiao F, Wang DX, Yang DM. Effects on hyphae of *Morchella esculenta* of temperature, pH value and light intensity[J]. Edible Fungi of China, 2000, 19(5): 13-15 (in Chinese)
- [13] 伊平昌, 谢占玲, 毛成荣, 吴润. 青海省羊肚菌发生地的生态环境调查[J]. 中国食用菌, 2014, 33(2): 13-14
- Yi PC, Xie ZL, Mao CR, Wu R. Investigation of ecology environment on *Morchella* in Qinghai Province[J]. Edible Fungi of China, 2014, 33(2): 13-14 (in Chinese)
- [14] 武冬梅, 谢宗铭, 李全胜, 罗云波. 新疆伊犁野生羊肚菌种质资源调查及生境分析[J]. 中国食用菌, 2013, 32(3): 12-14
- Wu DM, Xie ZM, Li QS, Luo YB. Investigation on resources and ecological environment of wild *Morchella* in Xinjiang Yili areas[J]. Edible Fungi of China, 2013, 32(3): 12-14 (in Chinese)
- [15] 姜淑霞, 李超, 王庆华, 贾文, 聂化东, 马洪兵. 泰山羊肚菌的种类调查与研究[J]. 中国食用菌, 2008, 27(5): 12-15
- Jiang SX, Li C, Wang QH, Jia W, Nie HD, Ma HB. Species investigation of *Morchella* spp. in mt. Taishan[J]. Edible Fungi of China, 2008, 27(5): 12-15 (in Chinese)
- [16] 冯慧琳, 徐辰生, 何欢辉, 曾强, 陈楠, 李小龙, 任天宝, 姬小明, 刘国顺. 生物炭对土壤酶活和细菌群落的影响及其作用机制[J]. 环境科学, 2021, 42(1): 422-432
- Feng HL, Xu CS, He HH, Zeng Q, Chen N, Li XL, Ren TB, Ji XM, Liu GS. Effect of biochar on soil enzyme activity & the bacterial community and its mechanism[J]. Environmental Science, 2021, 42(1): 422-432 (in Chinese)
- [17] 张艳, 郭书亚, 尚赏, 卢广远, 刘亚军. 甘薯/玉米不同间作方式对土壤养分、酶活性及作物产量的影响[J]. 山西农业科学, 2020, 48(8): 1234-1238
- Zhang Y, Guo SY, Shang S, Lu GY, Liu YJ. Effects of different intercropping methods of sweet potato/corn on soil nutrients, enzyme activity and crop yield[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2020, 48(8): 1234-1238 (in Chinese)
- [18] 赵苗, 张能, 谢敬宜, 贺新生. 羊肚菌生长过程中土壤酶变化规律研究[J]. 中国食用菌, 2017, 36(2): 41-46
- Zhao M, Zhang N, Xie JY, He XS. Research on variation of soil enzyme in *Morchella* growth process[J]. Edible Fungi of China, 2017, 36(2): 41-46 (in Chinese)
- [19] 顾龙云. 甘肃甘南藏族自治州羊肚菌考察[J]. 西北植物研究, 1984, 4(1): 40-44
- Gu LY. Preliminary investigation of *Morchella* in the Tibet autonomous prefecture of south Gansu province, China[J]. Act Bot Bor Occ Sinica, 1984, 4(1): 40-44 (in Chinese)
- [20] 杨廷贤. 甘肃陇南羊肚菌资源调查[J]. 甘肃农业科技, 1992(10): 40
- Yang TX. Investigation of *Morchella* resources in Longnan of Gansu Province[J]. Gansu Agricultural Science and Technology, 1992(10): 40 (in Chinese)
- [21] 蒋长生. 甘肃连城自然保护区羊肚菌科调查初报[J]. 食用菌, 2010, 32(6): 11-12
- Jiang CS. Preliminary report on *Morchellaceae* in Liancheng nature reserve of Gansu province[J]. Edible Fungi, 2010, 32(6): 11-12 (in Chinese)
- [22] 王龙, 郭瑞, 路等学, 秦鹏, 赵玉卉. 羊肚菌物种多样性研究现状[J]. 西北农业学报, 2016, 25(4): 477-489
- Wang L, Guo R, Lu DX, Qin P, Zhao YH. Research progress of species diversity in *Morchella* spp.[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2016, 25(4): 477-489 (in Chinese)
- [23] Matsuda Y, Ozawa N, Shinozaki T, Wakabayashi KI, Suzuki K, Kawano Y, Ohtsu I, Tatebayashi Y. Ergothioneine, a metabolite of the gut bacterium *Lactobacillus reuteri*, protects against stress-induced sleep disturbances[J]. Translational Psychiatry, 2020, 10: 170
- [24] 刘雪娇, 姚艳辉, 李红亚, 张冬冬, 高同国, 朱宝成. 贝莱斯芽胞杆菌 3A3-15 菌株对盆栽大豆土壤细菌群落结构的影响[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(5): 903-910
- Liu XJ, Yao YH, Li HY, Zhang DD, Gao TG, Zhu BC.

- Effect of *Bacillus velezensis* 3A3-15 on bacterial community structure of potted soybean (*glycine max*) soil[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, 28(5): 903-910 (in Chinese)
- [25] 尹晶菊. 中重度牙周炎伴阿尔茨海默病患者龈下菌斑微生物群落分析[D]. 遵义: 遵义医科大学硕士学位论文, 2019
- Yin JJ. Analysis of subgingival plaque microorganism in chronic moderate and severe periodontitis with Alzheimer's disease patients[D]. Zunyi: Master's Thesis of Zunyi Medical University, 2019 (in Chinese)
- [26] 余炎炎, 李梦莎, 刘啸林, 尹伟平, 李国富, 穆立蕃, 崔晓阳, 程智超. 大兴安岭典型永久冻土土壤细菌群落组成和多样性[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(9): 2759-2770
- Yu YY, Li MS, Liu XL, Yin WP, Li GF, Mu LQ, Cui XY, Cheng ZC. Soil bacterial community composition and diversity of typical permafrost in Greater Khingan Mountains[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(9): 2759-2770 (in Chinese)
- [27] 王晓波. 我国北方草地土壤微生物群落的空间格局及其驱动机制[D]. 沈阳: 中科院沈阳应用生态研究所博士学位论文, 2015
- Wang XB. The spatial pattern of soil microbial communities and its driving mechanism in the grassland of Northern China[D]. Shenyang: Shenyang Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, 2015 (in Chinese)
- [28] Jones RT, Robeson MS, Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses[J]. *The ISME Journal*, 2009, 3(4): 442-453
- [29] Navarrete AA, Kuramae EE, De Hollander M, Pijl AS, Van Veen JA, Tsai SM. Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 83(3): 607-621
- [30] 葛安辉, 方萍, 熊超, 张丽梅, 贺纪正. 联合固氮菌叶面接种剂的优化及其在玉米叶际的定殖[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(6): 1303-1313
- Ge AH, Fang P, Xiong C, Zhang LM, He JZ. Optimization of liquid inoculant of a nitrogen-fixing bacterium and its colonization on maize phyllosphere[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(6): 1303-1313 (in Chinese)
- [31] 程萍. 固氮菌对平菇菌丝生长的影响[J]. *食用菌*, 1994, 16(4): 15
- Cheng P. Effect of nitrogen fixing bacteria on mycelial growth of *Pleurotus ostreatus*[J]. *Edible Fungi*, 1994, 16(4): 15 (in Chinese)
- [32] 李莹, 庄源益, 蔡宝立, 韩斌. 鞘氨醇单胞菌对土壤中溴氨酸降解作用的研究[J]. *农业环境科学学报*, 2004, 23(6): 1164-1167
- Li Y, Zhuang YY, Cai BL, Han B. Biodegradation of bromamine acid in soil at the presence of *Sphingomonas* sp.[J]. *Journal of Agro-Environmental Science*, 2004, 23(6): 1164-1167 (in Chinese)
- [33] Takeuchi M, Sakane T, Yanagi M, Yamasato K, Hamana K, Yokota A. Taxonomic study of bacteria isolated from plants: proposal of *Sphingomonas rosa* sp. nov., *Sphingomonas pruni* sp. nov., *Sphingomonas asaccharolytica* sp. nov., and *Sphingomonas mali* sp. nov.[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45(2): 334-341
- [34] Hayes WA, Randle PE, Last FT. The nature of the microbial stimulus affecting sporophore formation in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing[J]. *Annals of Applied Biology*, 1969, 64(1): 177-187
- [35] 刘伟, 张亚, 何培新. 羊肚菌生物学与栽培技术[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2017
- Liu W, Zhang Y, He PX. Morel biology and cultivation[M]. Changchun: Jilin Science & Technology Press, 2017 (in Chinese)
- [36] Piotrowska A, Wilczewski E. Effects of catch crops cultivated for green manure and mineral nitrogen fertilization on soil enzyme activities and chemical properties[J]. *Geoderma*, 2012, 189/190: 72-80
- [37] Razavi BS, Zarebanadkouki M, Blagodatskaya E, Kuzyakov Y. Rhizosphere shape of lentil and maize: spatial distribution of enzyme activities[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 96: 229-237
- [38] 张婷, 黄香媛, 徐岩岩, 李洁. 羊肚菌菌基土壤微生物群落结构和多样性研究[J]. *河北农业大学学报*, 2018, 41(6): 38-43, 57
- Zhang T, Huang XY, Xu YY, Li J. Study on microbial community structure and diversity of *Morchella* rhizosphere soil[J]. *Journal of Hebei Agricultural University*, 2018, 41(6): 38-43, 57 (in Chinese)
- [39] 李敏, 闫伟. 海拔对乌拉山油松根围真菌群落结构的影响[J]. *菌物学报*, 2019, 38(11): 1992-2006
- Li M, Yan W. Effect of altitude on rhizosphere fungal community structure of *Pinus tabulaeformis* in Wula mountain, China[J]. *Mycosystema*, 2019, 38(11): 1992-2006 (in Chinese)
- [40] 何培新, 刘伟, 郝哲. 彩图版羊肚菌实用栽培技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020
- He PX, Liu W, Hao Z. Practical cultivation techniques of *Morchella*[M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2020 (in Chinese)