环境科学

ENVIRONMENTAL SCIENCE

ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV
HUANJING KEXUE

■ 主办 中国科学院生态环境研究中心
■ 出版 科学出版社

2020
Vol.41 No.5
第41卷 第5期

环境科学
(HUANJING KEXUE)
ENVIRONMENTAL SCIENCE
第41卷 第5期
2020年5月15日

目 次

Eco-Environmental Knowledge Web
环 境 科 学
Environmental Science
第41卷第5期 2020年5月
Vol.41, No.5 May, 2020

模拟酸雨对毛竹阔叶林过渡带土壤真菌结构及其多样性的影响

王楠[1,2], 潘小承[2*], 王传宽[1], 白尚斌[2]
(1. 东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040; 2. 浙江农林大学浙江省森林生态系统碳循环与固碳减排重点实验室, 杭州 311300)

摘要: 为探究酸雨对毛竹扩张形成的竹阔混交林土壤真菌群落的影响程度,于 2017 ~ 2018 年在浙江省杭州临安天目山国家级自然保护区开展酸雨模拟实验,选取 T1 (pH = 4.0) 和 T2 (pH = 2.5) 两个模拟酸雨梯度,并以 CK (pH = 5.5) 对照,利用 Illumina MiSeq 高通量测序技术,分析不同强度酸雨胁迫下,土壤真菌群落多样性变化及影响因素. 结果表明与对照相比,T1 处理显著提高了真菌群落的 OTU 数量、Chao1 指数和 Ace 指数($P < 0.05$). 竹阔混交林土壤主要由 13 个门类群的菌群组成,优势菌群包括子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、被孢霉门(Mortierellomycota)和毛霉门(Mucoromycota). 主坐标(PCoA)分析和相似性检验结果表明模拟酸雨改变了土壤真菌结构. *Bifiguratu* 属、*Geminibasidium* 属、*Purpureocillium* 属和 *Oidiodendron* 属相对丰度变化显著,可作为酸雨胁迫下土壤真菌群落结构变化的指示种. 冗余分析(RDA)和相关性分析表明,土壤 pH 和全氮对土壤真菌群落结构影响显著($P < 0.05$). 综上所述,酸雨提高了真菌群落多样性指数,改变土壤真菌群落结构. 该研究结果有助于了解森林生态系统中的真菌群落,以及土壤真菌作为影响因子在预测环境变异中的作用.

关键词:酸雨; 毛竹阔叶林; 真菌多样性; 群落结构; 高通量测序
中图分类号: X172 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2020)05-2476-09 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.201910180

Effects of Simulated Acid Rain on Soil Fungi Diversity in the Transition Zone of Moso Bamboo and Broadleaf Forest

WANG Nan[1,2], PAN Xiao-cheng[2*], WANG Chuan-kuan[1], BAI Shang-bin[2]
(1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Carbon Cycling in Forest Ecosystems and Carbon Sequestration, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China)

Abstract: Acid rain is an important phenomenon in the context of global climate change, and can strongly influence forest ecology. There have been many studies on the response of plants to acid rain. However, the effect of acid rain on soil microbial communities is still largely unknown. Studying the effects of acid rain on soil microbial community structure is of great significance for predicting the interactive effects of multiple climate factors on forest ecosystems in the future. Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) is often cultivated not only for its delicious shoots and versatile culms, but also as an important biomass resource in southern China. However, with its robust growth and strong rhizomes, Moso bamboo populations have been expanding rapidly into adjacent forests. Different perturbation regimes, including disturbance caused by simulated acid rain, can have significant effects on a soil fungal community in response to Moso bamboo invasion into native broadleaf forest. To explore the effect of acid rain on a mixed forest of Moso bamboo and broadleaf soil fungi diversity, and to understand the relationship between fungal community structure and acid rain stress, a mixed forest of Moso bamboo and broadleaf (transition forest) in Zhejiang Tianmu Mountain Nature Reserve was taken as the study site, and simulated acid rain was set at different acidity according to the acid rain component of Linan in recent years. The experiment consisted of three different treatments. Three gradients of simulated acid rain treatment [pH 2.5, 4.0, and CK (lake water)] were designed to determine the effects of simulated acid rain on soil bacterial community diversity in transition forest. Soil DNA was extracted from the soils for polymerase chain reaction amplification and high-throughput sequencing to study the effects of acid rain on the fungal communities of the mixed forest of Moso bamboo and broadleaf soil. We obtained 601 287 sequences across the three types of sampling sites. Sequences were affiliated to 13 different phyla throughout the dataset. The dominant fungal groups were Ascomycota, Basidiomycota, Mortierellomycota, and Mucoromycota. Simulated acid significantly increased the number of operational taxonomic units, Ace index, and Chao1 index of fungal communities ($P < 0.05$). The results of principal coordinates analysis (PCoA) also revealed that acid rain significantly modified the structure. The changes in soil fungal community structure were mainly related to the abundance of genera *Bifiguratu*, *Geminibasidium*, *Purpureocillium*, and *Oidiodendron*, which could be utilized as indicator species to determine changes in soil fungal community structure. Redundancy and correlation analysis showed that changes in basic physicochemical factors in the soil, such as soil pH and total nitrogen, can significantly influence the composition of the fungal community ($P < 0.05$).

Key words: acid rain; Moso bamboo and broadleaved forest; fungal diversity; community structure; high-throughput sequencing

收稿日期: 2019-10-23; **修订日期**: 2019-12-15
基金项目: 国家自然科学基金项目(31770680);浙江省自然科学基金项目(LQ19C160013)
作者简介: 王楠(1981 ~),女,博士研究生,讲师,主要研究方向为土壤与环境微生物,E-mail: wangnan198110@163.com
* 通信作者,E-mail: pxc_zafu@163.com

自 20 世纪以来，随着氮氧化物、硫化物等排放急剧增加，酸雨污染已成为当今世界重要的环境问题之一，且影响面积呈现不断扩大的趋势[1,2]. 我国作为酸雨污染最为严重的国家之一，亚热带地区尤为严重. 酸雨沉降到地表，导致土壤酸化，危害植物的生长发育，对森林生态系统造成持续性的伤害[3]. 作为分解者的森林土壤微生物，积极参与生态系统的物质循环和能量流动，对生态系统的稳定性和功能多样性的维持具有十分重要意义[4]. 当生态系统被自然因素或人为因素扰动时，其土壤微生物多样性[5]、生物量[6]、群落组成结构与功能等均随之发生改变[7,8]. 土壤真菌的群落结构与组成对外界环境变化极为敏感，酸雨发生时，将会进行快速而灵敏的应答反应，淘汰不适生土壤真菌，为新的土壤真菌提供进化起点[9]. 土壤真菌还能够与植物紧密地相互作用，成为病原体和共生体，为植物的生长提供所需的营养元素，影响植物的生长、发育和进化[10]. 尽管酸雨对生态环境的影响已被人们广泛关注，但酸雨是如何影响森林生态系统中土壤微生物群落多样性仍然不明确，特别是关于特殊森林生态系统在酸雨胁迫下土壤真菌多样性和群落结构组成的研究鲜有报道.

毛竹（*Phyllostachys edulis*）入侵常绿阔叶林形成的竹阔混交林是我国亚热带地区近年来出现的一种特殊森林类型. 亚热带地区的地带性植被常绿阔叶林在遭受持续干扰的情况下，很容易逆行演替毛竹林[11]. 毛竹是我国亚热带地区普遍存在的竹种[12]. 毛竹利用其强大的地下竹鞭不断地向邻近异质生境延伸，以实现种群向周围常绿阔叶林地扩张的需求，并通过改变入侵地土壤养分、水分、土壤酶活性以及土壤微生物群落结构来增加自身的生长优势，降低了生态系统多样性[13]. 酸雨胁迫下竹阔混交林土壤真菌群落将会做出怎样的响应变化目前尚不清楚. 本研究在浙江省天目山自然保护区毛竹扩张形成的竹阔混交林，设置 2 种酸雨胁迫模式（pH = 2.5、pH = 4.0）及喷洒天然湖水作为对照 CK（pH = 5.5），通过比较 3 种处理对毛竹入侵阔叶树过渡带土壤真菌群落结构的差异，以及与土壤理化性质的关系，了解我国亚热带地区竹阔混交林受酸雨胁迫引起的土壤真菌多样性的变化及其作用关系. 这对探讨我国酸雨背景下森林生态系统微生物群落及功能的研究具有重要的现实意义及生态意义，以期为进一步评价毛竹入侵对生态功能的影响提供理论依据，并为我国亚热带地区森林生态系统科学经营提供参考.

1　材料与方法

1.1　研究地区概况

本实验地位于浙江省杭州临安天目山国家级自然保护区（30°18′30″ ~ 30°21′37″N，119°24′11″ ~ 119°27′11″ E），总面积为4 300 hm^2，属于中型野生植物类型自然保护区. 海拔一般在 300 ~ 1 500 m之间，中亚热带向北亚热带过渡型气候，最冷月气温 2.6 ~ 3.4℃，极端最低气温 −20.2℃，最热月气温 19.2 ~ 28.1℃，极端最高气温 29.1 ~ 38.2℃. 多年平均降雨量为1 400 mm，多年平均无霜期 209 ~ 235 d. 保护区内林冠层的主要树种有青冈（*Cyclobalanopsis glance*）、木荷（*Schima superba*）和毛竹（*phyllostachys edulis*）等；灌木层有毛花连蕊茶（*Camellia fraternal*）、山矾（*Symplocos caudate*）和山胡椒（*Linder glauce*）等；草本层有菊科（Compositae）、禾本科（Gramineae）和鳞毛蕨科（Dryopteridaceae）等植物[14].

1.2　样地的设计与土壤样品的采集

本实验于 2017 年 3 月在浙江省杭州临安天目山国家级自然保护区选取典型的竹阔界面，海拔 350 ~ 400 m，坡度 20° ~ 25°. 在毛竹林和阔叶林之间的毛竹阔叶林过渡带沿水平扩张区域布设 3 块实验样地，每个样地宽 5 m，长 25 m. 采用随机区组设计，在每块样地内各设置 3 个 5 m × 5 m 的样方. 在同一样地中的 3 个样方分别对应 3 种处理，样方间距离 5 m，并用 0.5 cm 厚、30 cm 高的 PVC 板隔开，防止各个小区之间进行水和营养物质的交换，共计 9 个模拟酸雨实验样方. 在样方离地高度 2 m 处设置透明聚氯乙烯遮雨棚，减少自然降雨对样地的影响. 根据临安市近期酸雨特征按照 H_2SO_4 : HNO_3 = 8:1的摩尔比配置模拟酸雨母液[15]，再用母液与去离子水配成相应 pH 值的模拟酸雨. 设置对照 CK、T1（pH = 4.0）和 T2（pH = 2.5）这 3 个处理，其中对照为当地的天然湖水，pH 为 5.5. 根据临安市历年年均酸沉降量，计算出每个样方每次喷淋酸雨 10 L[16]，按照实验设计将配置好的模拟酸雨，每 10 d 一次均匀喷洒在相应的样地上，同时于对照样地喷等量天然湖水.

于 2018 年 6 月，土壤微生物活跃且生物量较大时进行土样采集. 根据不同处理分别使用无菌土钻按照 5 点采样法取土壤表层（约 0 ~ 10 cm）的土壤样品 0.2 kg，分成两份，1 份装入无菌自封袋中并置于保鲜恒温（4℃）箱中，用于测定土壤理化性质，9 个样方共计 45 份土壤样品. 将同一样方的其余 5 份土样混合均匀，除杂过 2 mm 筛网后装入无菌自封

样品袋中,置于 -80℃的干冰保温箱中储存备用,以提取土壤真菌 DNA,共 9 个样品.

1.3 土壤理化性质的测定

采用电位法(土水比为 1∶2.5)测定土壤 pH 值;使用碳氮自动分析仪(Vario MAX CN, Elementar,德国)测定土壤全氮(TN);使用总有机碳分析仪(TOC-VCPH,SHIMADZ,日本)测定土壤总有机碳(TOC);水溶性有机碳(DOC)含量的测定是用高纯度去离子水对土壤样品浸提,取上清液过 0.45 μm 滤膜后使用 TOC-VCPH 进行测定;采用碱性水解扩散法测定碱解氮(AN);采用氯仿熏蒸-K_2SO_4 浸提法测定微生物生物量氮(MBN)、碳(MBC)[17].

1.4 土壤真菌 DNA 提取与测序

土壤真菌基因组 DNA 的抽提是使用 E.Z.N.A.® Soil DNA 提取试剂盒(Omega Bio-tek, Norcross, GA, 美国)按照说明书操作,然后使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA 后,进行 PCR 扩增,将带有条形码的特异引物嵌入土壤真菌 ITS 的特定区域. PCR 扩增引物及序列为 ITS1F (5′-barcode-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3′) 204 和 3R (5′-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3′)[18]. PCR 反应体系 20 μL: 5 × FastPfu Buffer 4 μL, 2.5 mmol·L^{-1} dNTPs 2 μL, Forward Primer(5 μmol·L^{-1}) 0.8 μL, Reverse Primer(5 μmol·L^{-1})0.8 μL, FastPfu Polymerase 0.4 μL. PCR 反应参数:98℃预变性持续 1 min, 98℃的变性持续 10 s,进行 30 s 50℃ 的退火,在 72℃条件下延伸 60 s(30 个循环), 72℃终末延伸 5 min. 保存在 4℃环境,使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,用试剂盒(Thermo Scientific)进行纯化,并构建 ITS 文库,于上海美吉生物医药科技有限公司 Illumina MiSeq 平台完成高通量测序.

1.5 生物信息统计与分析

使用 QIIME(V1.9.1,http://qiime.org)[19]进行序列拆分和质量控制. 利用 FLASH (V1.2.11, http://ccb.jhu.edu)软件,对质控序列进行双端拼接. 利用 RDP Classifier (V2.11, http://sourceforge.net)对有效序列信息进行分类注释. 使用 USEARCH 软件(V7.0, http://diver5.com),在 97% 相似度水平下对序列进行 OTU(operational taxonomic unit)主成分分析.

用 MOTHUR 软件(V1.30.2, http://mothur.org)计算 α 多样性(Shannon、Simpson、Chao1 和 ACE 指数). 利用 R 语言 Venn Diagram 包绘制 Venn 图,用于统计 3 种处理样本中所共有和独有的 OTU 数目. 使用 R 语言 vegan 包,基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)检验不同处理对土壤真菌群落的影响. 使用 Canoco 4.5 软件对土壤环境因子和真菌群落进行冗余分析(redundancy analysis, RDA). 使用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析(one-way analysis)和多重比较分析(LSD),显著性水平设为 $P<0.05$. 用 Pearson 相关分析检验土壤真菌群落 α 多样性与理化性质之间的相关性. 真菌相对丰度和土壤理化性质间的相关性采用 Spearman 法进行,使用 LEfSe(LDA Effect Size)分析寻找组间差异物种.

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质

如表 1 所示,模拟酸雨显著降低了土壤 pH 值($P<0.05$),T1 处理(pH 4.0)的土壤平均 pH 值比 CK 处理(pH 5.5)低 13.77%, T2 处理(pH 2.5)的土壤平均 pH 值比 CK 处理低 31.36%;全氮、土壤有机碳和碱解氮含量均随着酸雨强度的增加而显著升高($P<0.05$),其中 T2 和 T1 处理全氮分别比 CK 处理增加 68% 和 38%,土壤有机碳分别增加 73% 和 40%,碱解氮分别增加 40% 和 21%. T1 处理土壤的碳氮比、可溶性有机碳、微生物量碳和微生物量氮的含量分别是 CK 处理土壤的 0.57 倍、0.81 倍、0.96 倍和 0.84 倍,T2 处理土壤的碳氮比、可溶性有机碳、微生物量碳和微生物量氮的含量分别是 CK 处理土壤的 0.42 倍、0.50 倍、0.90 倍和 0.68 倍. 由此可见,酸雨胁迫对毛竹阔叶混交林土壤理化性质和微生物量具有显著的影响($P<0.05$).

表 1 不同处理对土壤理化性质和微生物量的影响1)

Table 1 Effect of different treatments on soil physicochemical properties and microbial biomass

处理	pH	TN /g·kg^{-1}	C/N	SOC /g·kg^{-1}	DOC /mg·kg^{-1}	AN /mg·kg^{-1}	MBC /mg·kg^{-1}	MBN /mg·kg^{-1}
T1	4.07 ± 0.08b	3.11 ± 0.03b	11.13 ± 1.05b	21.46 ± 1.35b	118.93 ± 4.23b	214.60 ± 8.60b	548.10 ± 7.76b	95.63 ± 3.82b
T2	3.24 ± 0.09c	3.78 ± 0.09a	8.24 ± 0.82c	26.60 ± 1.13a	73.20 ± 6.85c	247.50 ± 8.49a	511.40 ± 8.30c	77.80 ± 6.42c
CK	4.72 ± 0.12a	2.25 ± 0.07c	19.46 ± 0.80a	15.35 ± 1.23c	146.13 ± 10.00a	176.73 ± 11.09c	569.10 ± 6.03a	113.93 ± 3.51a

1)同列数据后不同字母表示差异显著($P<0.05$);TN 为全氮,C/N 为碳氮比,SOC 为有机碳,DOC 为可溶性有机碳,AN 为碱解氮,MBC 为微生物量碳,MBN 为微生物量氮

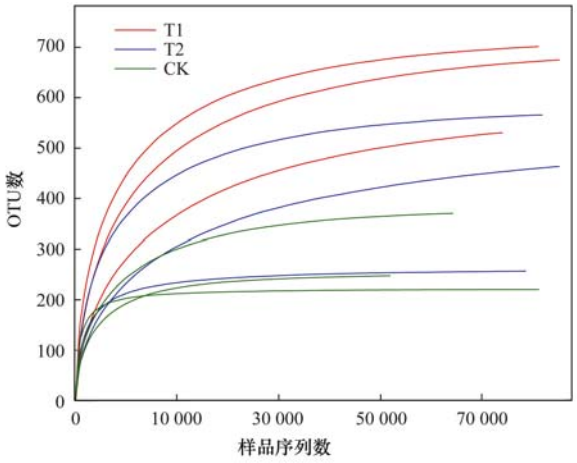
2.2　高通量测序数据分析

经过质量控制后，总共得到601 287条高质量序列（与原始序列相同）（表 2），总碱基数为141 139 271，碱基的平均长度为 235.61 bp，其中长度位于 160 ~ 340 bp 的碱基数占总序列数的99.95%. 利用样品序列数与其所代表的 OTU 数目构建稀释性曲线如图 1 所示，全部土壤样品的稀释性曲线均趋于平坦，测序数据合理，T1 处理土壤样品所检测出的 OTU 数目显著高于 CK 处理.

2.3　OTU 分布与多样性分析

在 97% 的相似水平上进行统计如图 2 所示，共获得2 052个真菌 OTU，这些 OTU 归属于 13 个门，38 个纲，90 个目，193 个科和 339 个属. 其中 3 个样地共有的 OTU 为 64 个，约占 3.12%. T2 处理样地土壤独有的真菌 OTU 分布数目最少，约占全部的20.18%；T1 处理样地土壤独有的真菌 OTU 分布数目最多，约占全部 32.89%；CK 处理样地土壤独有的真菌 OTU 分布数目为 466 个，约占全部的 22.71%. T2 与 T1 样地土壤共有的真菌 OTU 分布数目仅为425；T2 与 CK 样地土壤共有的真菌 OTU 分布数目为 86；T1 与 CK 样地土壤共有的真菌 OTU 分布数目为 114. 由此可以看出 T2 与 CK 样地之间土壤真菌的 OTU 分布差异最显著.

3 种处理土壤真菌群落 α 多样性分析结果（表3），竹阔混交林土壤真菌的丰富度在不同处理间存在一定差异. Ace 指数和 Chao1 指数分析表明，T1 处理土壤真菌丰富度显著高于 CK（$P < 0.05$）. 利用 Bray-Curtis 距离算法进行主坐标分析显示（图 3），第一轴解释了 29.94% 的贡献率，第二轴解释了16.23% 的贡献率，前两轴合计总方差贡献率为46.17%. CK 处理聚集在第一轴的负半轴，而 T1 处理和 T2 处理聚集在第一轴的正半轴. 同时，T1 处理聚集在第二轴的负半轴，T2 处理聚集在第二轴的正半轴. 采用 ANOSIM 和 ADONIS 的方法对不同处理的土壤真菌群落进行相似性分析，得出模拟酸雨使土壤真菌群落结构发生了显著变化.



不同颜色的曲线代表不同样方；相似水平为 97%

图 1　不同处理条件下土壤真菌 OTU 的稀释曲线

Fig. 1　Rarefaction curves showing the OTU detection under different treatment conditions

表 2　测序数据统计

Table 2　Sequencing data statistics

项目	序列数	碱基数	平均长度/bp	短序列长度/bp	长序列长度/bp
T1-1	68 138	18 064 841	265.12	174	437
T1-2	71 203	16 362 959	229.81	162	436
T1-3	73 988	16 381 245	221.40	160	434
T2-1	73 641	14 771 354	200.59	165	383
T2-2	68 042	16 694 486	245.36	175	415
T2-3	70 972	16 761 359	236.17	160	432
CK-1	47558	11 525 518	242.35	166	410
CK-2	57 642	14 108 633	244.76	163	407
CK-3	70 103	16 468 876	234.92	168	443

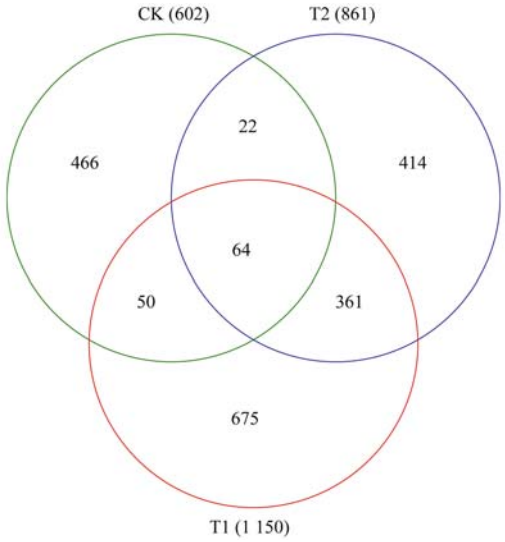


图 2　不同处理条件下土壤样品中独有和共有真菌 OTU 数量的文氏图

Fig. 2　Venn diagram showing the number of shared and exclusive fungal OTU under different treatment conditions

2.4　土壤真菌群落结构

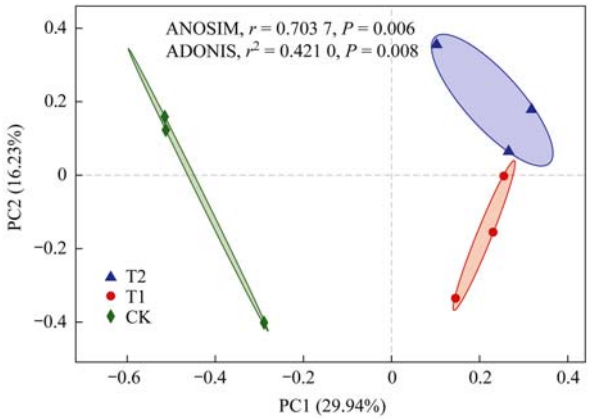
由土壤真菌OTU分类学分析可知［图4（a）］，

表 3 不同处理条件下土壤真菌群落 α 多样性指数[1)]

Table 3 Soil fungal community α-diversity indexes under different treatment conditions

处理	Ace 指数	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	覆盖率
T1	657.85 ± 76.19a	652.56 ± 78.62a	3.44 ± 0.80a	0.108 4 ± 0.061 7a	0.99 ± 0.000 1a
T2	445.90 ± 167.33ab	446.09 ± 167.01ab	3.06 ± 0.82a	0.161 8 ± 0.142 9a	0.99 ± 0.000 3a
CK	276.46 ± 83.20b	279.93 ± 83.16b	3.14 ± 0.75a	0.152 5 ± 0.129 9a	0.99 ± 0.000 9a

1)同列数据后不同字母表示差异显著($P<0.05$)



ANOSIM 表示相似性分析;ADONIS 表示多元方差分析

图 3 不同处理条件下土壤真菌群落结构

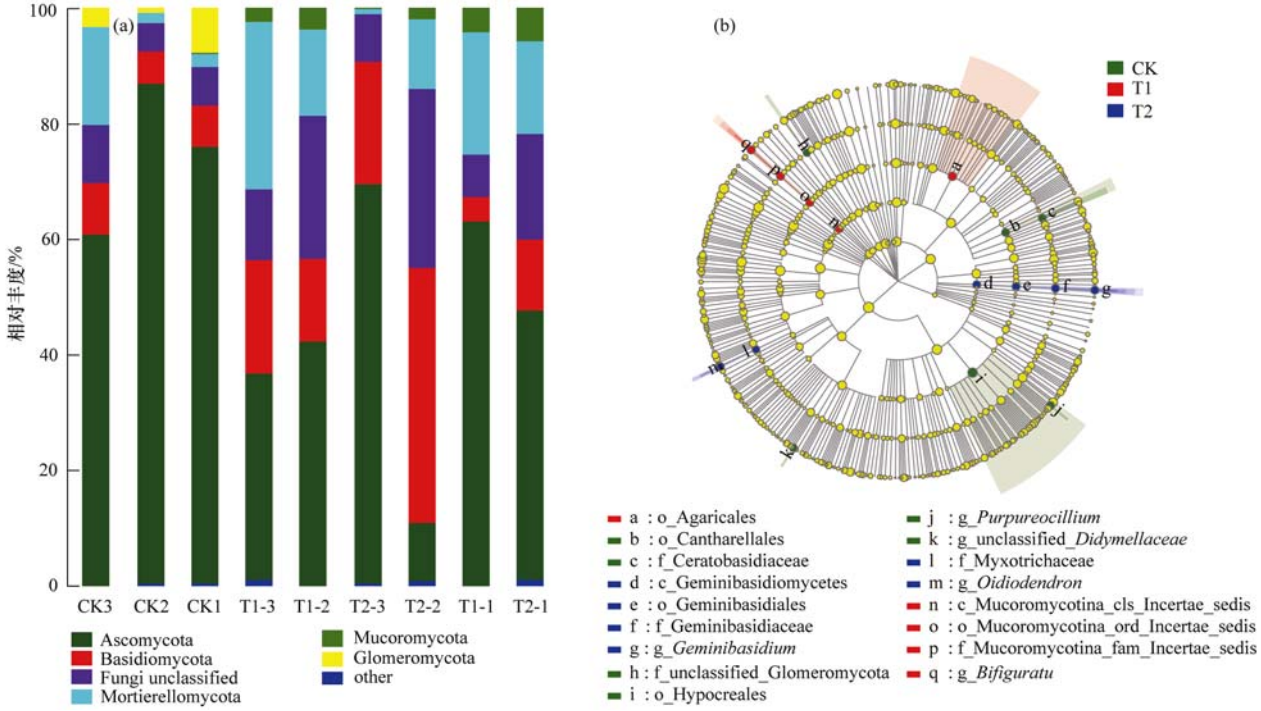
Fig. 3 Soil fungal community structure under different treatment conditions

9 个土壤样品分属 13 个已知的菌门. 其中,子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、被孢霉门(Mortierellomycota)和毛霉门(Mucoromycota)为 3 种处理共有的优势菌门(相对丰度 >1%). 模拟酸雨增加了担子菌门(Basidiomycota)、被孢霉门(Mortierellomycota)和毛霉门(Mucoromycota)的相对丰度.

图 4(b)显示了 LDA 阈值 4.0 不同处理下土壤真菌群落系统发育树. 从中可知,在 LDA 的分值 4.0 显著差异水平上,毛霉门 *Bifiguratu* 属、担子菌门 *Geminibasidium* 属、子囊菌门 *Purpureocillium* 属和 *Oidiodendron* 属相对丰度变化显著,其中 *Purpureocillium* 属相对丰度在 CK 处理中最高,*Oidiodendron* 属和 *Geminibasidium* 属相对丰度在 T2 处理时最高,*Bifiguratu* 属相对丰度在 T1 处理时最高.

2.5 环境因子对真菌群落响应

相关性分析结果表明(表 4),土壤 pH 与 Ace 指数($r=-0.876$)和 Chao1 指数($r=-0.881$)呈极显著负相关($P<0.01$),土壤全氮与 Ace 指数($r=0.765$)和 Chao1 指数($r=0.769$)呈显著正相关($P<0.05$). 以上结果表明随着酸雨强度的增加,土壤



(a)群落组成;(b)系统发育树,其中黄色显示物种丰度无显著差异,有显著变化的类群按照不同处理进行着色,丰度大小与圆圈的直径大小相称

图 4 不同处理条件下土壤真菌门水平的群落组成和系统发育树(LAD 阈值 4.0)

Fig. 4 Composition of phylum level and cladogram of soil fungi community under different treatment conditions(LAD score = 4.0)

表 4　土壤真菌群落 α 多样性与理化性质、微生物量间的相关分析[1)]

Table 4　Correlation coefficients between soil fungal community α-diversity indices and soil physicochemical properties, microbial biomass

指数	pH	TN	C/N	SOC	DOC	AN	MBC	MBN
Ace	−0.876 **	0.765 *	0.667 *	−0.624 *	−0.505	0.632 *	−0.519	−0.600
Chao1	−0.881 **	0.769 *	0.672 *	−0.629 *	−0.511	0.638 *	−0.527	−0.605
Shannon	0.062	0.047	−0.028	0.002	0.073	0.087	0.111	0.097
Simpson	−0.018	−0.051	0.063	−0.001	−0.053	−0.097	−0.116	0.075

1) * 表示 $P<0.05$, * * 表示 $P<0.01$

全氮含量升高，土壤 pH 随之下降，而真菌 α 多样性有不断增加的趋势.

通过对竹阔混交林土壤真菌群落结构与土壤因子的 RDA 分析(图 5)，结果显示第一轴和第二轴累积解释变异量达到 90.71%，说明这两个轴大部分能反映土壤环境因子对土壤真菌群落结构的影响. 置换检验的结果显示，在不同处理下，土壤 pH($R^2=0.65$, $P=0.038$)和土壤 TN($R^2=0.63$, $P=0.041$)为主导真菌群落变化的主要因子. 相关性分析表明(表 5)，土壤 pH 与 Ascomycota ($r=0.783$)、Glomeromycota ($r=0.670$) 和 Chytridiomycota ($r=0.749$)呈显著正相关($P<0.05$)，与 Basidiomycota ($r=-0.750$)、unclassified_k_Fungi ($r=-0.733$)、Mortierellomycota ($r=-0.670$)、Rozellomycota ($r=-0.711$)和 GS19 ($r=-0.746$)呈显著负相关($P<0.05$)，土壤 TN 与 unclassified_k_Fungi ($r=0.717$)和 Mortierellomycota ($r=0.683$)呈显著正相关($P<0.05$)，与 Glomeromycota ($r=-0.792$) 和 Chytridiomycota ($r=-0.730$)呈显著负相关($P<0.05$).

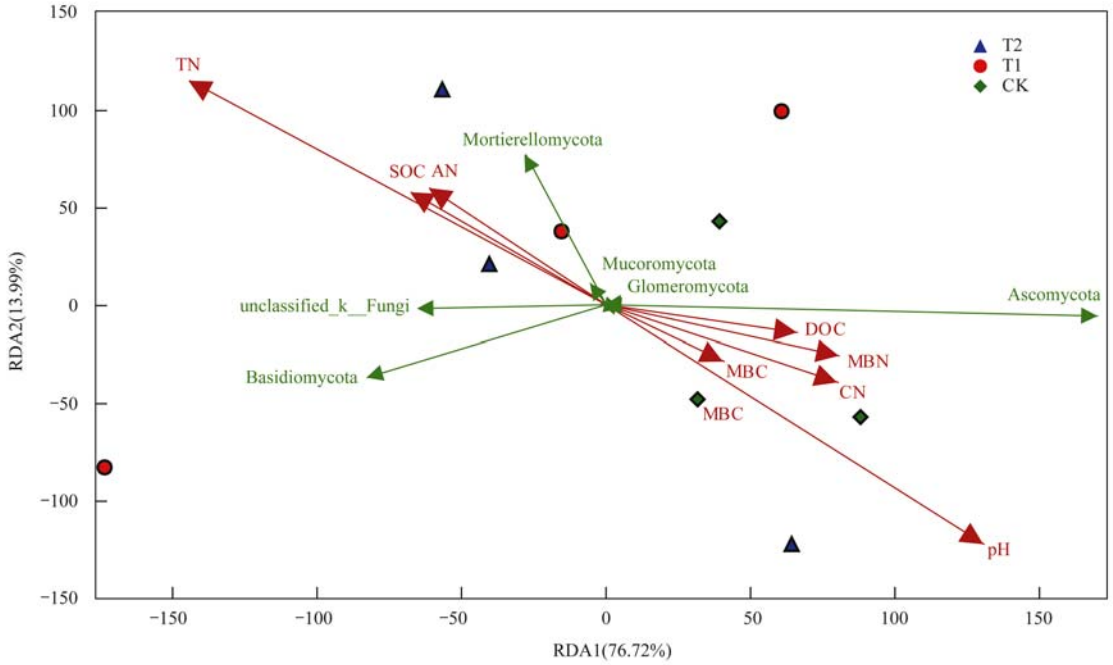


图 5　土壤真菌群落结构特征对环境因素响应的冗余分析

Fig. 5　RDA of both soil fungal community and environmental factors

表 5　土壤真菌门水平与理化性质间的相关性分析

Table 5　Correlation analysis between physicochemical properties and fungal community on phylum level

项目	pH	TN	C/N	SOC	DOC	AN	MBC	MBN
Ascomycota	0.783 *	−0.255	0.150	−0.217	0.233	−0.233	0.183	0.300
Basidiomycota	−0.750 *	0.450	−0.433	0.500	−0.783 *	0.417	−0.467	−0.700 *
unclassified_k__Fungi	−0.733 *	0.717 *	−0.383	0.383	−0.583	0.367	−0.450	−0.550
Mortierellomycota	−0.670 *	0.683 *	−0.083	0.300	−0.083	0.267	−0.167	−0.250
Mucoromycota	−0.512	0.583	−0.650	0.600	−0.417	0.650	−0.633	−0.433
Glomeromycota	0.670 *	−0.792 *	0.757 *	−0.652	0.749 *	−0.705 *	0.740 *	0.766 *
Rozellomycota	−0.711 *	0.500	−0.417	0.517	−0.633	0.500	−0.350	−0.600
Chytridiomycota	0.749 *	−0.730 *	0.758 *	−0.840 **	0.785 *	−0.895 **	0.840 **	0.785 *
GS19	−0.746 *	0.450	−0.029	0.168	−0.317	0.168	−0.030	−0.297

3 讨论

3.1 不同酸雨处理土壤真菌多样性及群落结构差异

通过对 3 个不同处理的土壤真菌群落结构多样性分析可知,酸雨处理能够显著提高土壤真菌群落的 Ace 指数和 Chao1 指数(表 3),与 T1 处理相比,T2 处理下,土壤真菌多样性指数出现回落. 这与王丹等[20]的研究结果相似. 然而,张萍华等[21]的研究表明,中药植株土壤真菌的数量随酸雨 pH 的降低呈先升高后下降的趋势. 王晓彤等[22]在稻田土壤中施用酸雨后,真菌 α 多样性先增加后降低. 本研究中主坐标分析显示对照处理与 T1 和 T2 处理的土壤真菌群落结构沿第一轴分开(图 3),说明喷施酸雨会引起土壤真菌群落 β 多样性发生明显改变.

高通量测序结果表明,竹阔混交林土壤真菌的优势菌群为子囊菌门和担子菌门居多,这和以往森林土壤真菌群落分析结果一致[23]. 这两个门的真菌群落是土壤中主要的分解者[24],作为土壤中关键分解群落,子囊菌门能够分解环境中木质素和角质素等难降解的有机质,是养分循环和能量流动的主要驱动力[25]. He 等[26]的研究发现,在高肥力的土壤环境中子囊菌门具有较高的适生性,随着氮肥的施用其相对丰度显著升高,与本研究结果不尽相同. 本研究发现酸雨增加了土壤总氮含量,却降低了子囊菌门相对丰度[图 4(a)],可能由于相比土壤氮含量,土壤 pH 对子囊菌门的影响更显著. 担子菌门相对丰度随着酸雨强度增加而显著升高($P<0.05$),可能其对酸性环境适应性较好,在土壤中具有较高的竞争力,提高了其丰度[27].

采用 LEfSe 方法,在属水平上对真菌群落组成进行差异物种分析[图 4(b)],找出不同处理间差异指示种,在一定程度上可以反映出不同处理土壤的基本特征. 本研究中,在 LDA 的分值 4.0 显著差异水平上,毛霉门 *Bifiguratu* 属、担子菌门 *Geminibasidium* 属、子囊菌门 *Purpureocillium* 属和 *Oidiodendron* 属的相对丰度发生显著变化,可根据图 4(b)中的圆圈直径大小得出这些菌属的相对丰度相应较高. 意味着不同处理下,*Bifiguratu* 属、*Geminibasidium* 属、*Purpureocillium* 属和 *Oidiodendron* 属可作为土壤真菌群落结构变化指示种. 有研究表明 *Oidiodendron* 属是菌根真菌,可以利用土壤中的无机氮和有机氮,有效提高氮源的吸收利用[28]. 在本研究中,*Oidiodendron* 属相对丰度在 T2 处理时最高,酸雨处理后其相对丰度增加,因而可推测模拟酸雨可能会促进土壤氮循环.

3.2 不同酸雨处理土壤真菌多样性与影响因子

土壤理化性质是土壤真菌多样性及群落结构变化的关键影响因子. Romanowicz 等[29]对美国密歇根州北部阔叶林的真菌群落结构的研究表明,土壤 pH 值是影响土壤真菌的最主要的环境因子. Liu 等[30]对西南地区土壤真菌多样性研究认为,pH 值是影响土壤真菌多样性的最主要因素,与真菌多样性呈现出极显著的负相关性,说明了真菌喜欢在偏酸性的环境中生长. 乔沙沙等[31]的研究表明,土壤 pH 是决定真菌多样性和群落组成的关键因素. 本研究发现土壤 pH 与土壤真菌 Ace 指数($r=-0.876$)和 Chao1 指数($r=-0.881$)呈显著负相关($P<0.05$)(表 4). 土壤 pH 下降刺激嗜酸性真菌的大量生长[32],从而导致真菌 α 多样性升高. 从 RDA 和相关性分析(图 5 和表 5)可以看出一些菌群 Basidiomycota($r=-0.750$)、unclassified_k_Fungi($r=-0.733$)、Mortierellomycota($r=-0.670$)、Rozellomycota($r=-0.711$)和 GS19($r=-0.746$)的分布与 pH 呈显著负相关($P<0.05$),这些结果说明真菌喜好酸性环境[33],进一步表明酸雨改变土壤真菌群落多样性.

作为微生物的生存载体,土壤养分元素可引起森林土壤中微生物产生快速变化[34],单一营养成分发生变化即可导致土壤微生物的群落结构随之改变[35]. 有研究表明,氮素的添加影响了微生物氮循环的过程,导致土壤真菌群落组成的变化[36]. 冗余分析和相关性分析表明土壤全氮对真菌群落结构影响显著(图 5 和表 5)与前人的研究[37]基本一致. 上述研究表明,土壤真菌的多样性及群落结构受土壤理化性质的显著影响,从而可为预测森林生态系统中微生物对环境变化的响应提供依据. 酸雨对生态系统的影响是一个漫长而复杂的过程,诸多不确定影响因素存在其中,要掌握酸雨对森林生态系统各组分影响的累积效应还需要进一步长时间追踪研究.

4 结论

(1)模拟酸雨处理提高了毛竹阔叶混交林土壤真菌群落的 Ace 指数和 Chao1 指数,改变了土壤真菌群落结构.

(2)竹阔混交林土壤真菌主要包括 13 个门类菌群,其中相对丰度变化显著的 4 个菌门(担子菌门、子囊菌门、毛霉门和被孢霉门)是 3 种处理条件下的共优菌门. *Bifiguratu* 属、*Geminibasidium* 属、*Purpureocillium* 属和 *Oidiodendron* 属可作为酸雨胁迫下土壤真菌群落结构变化的指示种.

(3)酸雨胁迫下土壤真菌群落组成受土壤 pH 和土壤全氮的显著影响.

参考文献：

[1] Wu J P, Liang G H, Hui D F, *et al*. Prolonged acid rain facilitates soil organic carbon accumulation in a mature forest in Southern China[J]. Science of the Total Environment, 2016, **544**: 94-102.

[2] Liu M H, Yi L T, Yu S Q, *et al*. Chlorophyll fluorescence characteristics and the growth response of *Elaeocarpus glabripetalus* to simulated acid rain[J]. Photosynthetica, 2015, **53**(1): 23-28.

[3] Ramlall C, Varghese B, Ramdhani S, *et al*. Effects of simulated acid rain on germination, seedling growth and oxidative metabolism of recalcitrant-seeded *Trichilia dregeana* grown in its natural seed bank[J]. Physiologia Plantarum, 2015, **153**(1): 149-160.

[4] 姚兰, 胡立煌, 张焕朝, 等. 黄山土壤细菌群落和酶活性海拔分布特征[J]. 环境科学, 2019, **40**(2): 859-868.
Yao L, Hu L H, Zhang H C, *et al*. Elevational distribution characteristics of soil bacterial community and enzyme activities in Mount Huangshan[J]. Environmental Science, 2019, **40**(2): 859-868.

[5] Chen Y L, Xu T L, Veresoglou S D, *et al*. Plant diversity represents the prevalent determinant of soil fungal community structure across temperate grasslands in Northern China[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2017, **110**: 12-21.

[6] 李宗明, 沈菊培, 张丽梅, 等. 模拟氮沉降对干旱半干旱温带草原土壤细菌群落结构的影响[J]. 环境科学, 2018, **39**(12): 5665-5671.
Li Z M, Shen J P, Zhang L M, *et al*. Effects of stimulated nitrogen deposition on the bacterial community structure of semiarid temperate grassland[J]. Environmental Science, 2018, **39**(12): 5665-5671.

[7] Xiong Q L, Pan K W, Zhang L, *et al*. Warming and nitrogen deposition are interactive in shaping surface soil microbial communities near the alpine timberline zone on the eastern Qinghai-Tibet, Plateau, southwestern China[J]. Applied Soil Ecology, 2016, **101**: 72-83.

[8] Chu H Y, Sun H B, Tripathi B M, *et al*. Bacterial community dissimilarity between the surface and subsurface soils equals horizontal differences over several kilometers in the western Tibetan Plateau[J]. Environmental Microbiology, 2016, **18**(5): 1523-1533.

[9] Wan X H, Huang Z Q, He Z M, *et al*. Soil C:N ratio is the major determinant of soil microbial community structure in subtropical coniferous and broadleaf forest plantations[J]. Plant and Soil, 2015, **387**(1-2): 103-116.

[10] He H, Chen X J, Hou F J, *et al*. Bacterial and fungal community structures in loess plateau grasslands with different grazing intensities[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, **8**: 606.

[11] 童冉, 周本智, 姜丽娜, 等. 毛竹入侵对森林植物和土壤的影响研究进展[J]. 生态学报, 2019, **39**(11): 3808-3815.
Tong R, Zhou B Z, Jiang L N, *et al*. Influence of Moso bamboo invasion on forest plants and soil: a review[J]. Acta Ecologica Sinica, 2019, **39**(11): 3808-3815.

[12] Wu C S, Mo Q F, Wang H K, *et al*. Moso bamboo (*Phyllostachys edulis* (Carrière) J. Houzeau) invasion affects soil phosphorus dynamics in adjacent coniferous forests in subtropical China[J]. Annals of Forest Science, 2018, **75**: 24.

[13] Li Z Z, Zhang L, Deng B L, *et al*. Effects of Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) invasions on soil nitrogen cycles depend on invasion stage and warming[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, **24**(32): 24989-24999.

[14] 李伟成, 盛海燕, 陈伟杰, 等. 毛竹入侵马尾松林的土壤菌群多样性变化[J]. 应用生态学报, 2018, **29**(12): 3969-3976.
Li W C, Sheng H Y, Chen W J, *et al*. Variation of soil bacterial diversity after the invasion of *Phyllostachys edulis* into *Pinus massoniana* forest[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2018, **29**(12): 3969-3976.

[15] 李正泉, 马浩, 毛欲定, 等. 临安本底站酸雨长期观测特征分析[J]. 环境科学, 2014, **35**(2): 481-489.
Li Z Q, Ma H, Mao Y D, *et al*. Analysis of acid rain characteristics of Lin'an regional background station using long-term observation data[J]. Environmental Science, 2014, **35**(2): 481-489.

[16] 赵伟, 康丽莉, 林惠娟, 等. 临安大气本底站酸雨污染变化特征与影响因素分析[J]. 中国环境监测, 2012, **28**(4): 9-14.
Zhao W, Kang L L, Lin H J, *et al*. Characteristics and affecting factors analysis of acid rain at Lin'an atmosphere watch regional station[J]. Environmental Monitoring in China, 2012, **28**(4): 9-14.

[17] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.

[18] Adams R I, Miletto M, Taylor J W, *et al*. Dispersal in microbes: fungi in indoor air are dominated by outdoor air and show dispersal limitation at short distances[J]. The ISME Journal, 2013, **7**(7): 1262-1273.

[19] Fadrosh D W, Ma B, Gajer P, *et al*. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform[J]. Microbiome, 2014, **2**: 6.

[20] 王丹, 马元丹, 郭慧媛, 等. 模拟酸雨胁迫与柳杉凋落物对土壤养分及微生物的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2015, **32**(2): 195-203.
Wang D, Ma Y D, Guo H Y, *et al*. Soil nutrients and microorganisms with simulated acid rain stress and *Cryptomeria fortunei* litter[J]. Journal of Zhejiang A & F University, 2015, **32**(2): 195-203.

[21] 张萍华, 申秀英, 许晓路, 等. 模拟酸雨对中药基质土壤微生物的影响[J]. 农业环境科学学报, 2004, **23**(2): 28-283.
Zhang P H, Shen X Y, Xu X L, *et al*. Influence of simulated acid rain on the biomass of soil microbes in Chinese medicine base[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2004, **23**(2): 28-283.

[22] 王晓彤, 许旭萍, 王维奇. 模拟酸雨对福州平原稻田土壤真菌群落结构及多样性影响[J]. 环境科学学报, 2019, **39**(7): 2249-2259.
Wang X T, Xu X P, Wang W Q. Effects of simulated acid rain on paddy soils fungi community structure and diversity in Fuzhou plain[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2019, **39**(7): 2249-2259.

[23] 隋心, 张荣涛, 许楠, 等. 三江平原不同退化阶段小叶章湿地土壤真菌群落结构组成变化[J]. 环境科学, 2016, **37**(9): 3598-3605.
Sui X, Zhang R T, Xu N, *et al*. Fungal community structure of different degeneration *Deyeuxia angustifolia* wetlands in Sanjiang plain[J]. Environmental Science, 2016, **37**(9): 3598-3605.

[24] Ma A Z, Zhuang X L, Wu J M, *et al*. Ascomycota members dominate fungal communities during straw residue decomposition

in arable soil[J]. PLoS One, 2013, **8**(6): e66146.

[25] Beimforde C, Feldberg K, Nylinder S, *et al*. Estimating the phanerozoic history of the ascomycota lineages: combining fossil and molecular data[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2014, **78**: 386-398.

[26] He D, Xiang X J, He J S, *et al*. Composition of the soil fungal community is more sensitive to phosphorus than nitrogen addition in the alpine meadow on the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. Biology and Fertility of Soils, 2016, **52**(8): 1059-1072.

[27] 陈香碧, 苏以荣, 何寻阳, 等. 亚热带两种森林土壤担子菌漆酶基因多样性比较[J]. 应用生态学报, 2011, **22**(10): 2699-2704.
Chen X B, Su Y R, He X Y, *et al*. Basidiomycetous laccase gene diversity in two subtropical forest soils[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2011, **22**(10): 2699-2704.

[28] 刘雯雯, 喻理飞, 严令斌, 等. 喀斯特石漠化区植被恢复不同阶段土壤真菌群落组成分析[J]. 生态环境学报, 2019, **28**(4): 669-675.
Liu W W, Yu L F, Yan L B, *et al*. Composition of soil fungi communities in different stages of vegetation restoration in Karst rocky desertification area [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2019, **28**(4): 669-675.

[29] Romanowicz K J, Freedman Z B, Upchurch R A, *et al*. Active microorganisms in forest soils differ from the total community yet are shaped by the same environmental factors: The influence of pH and soil moisture[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2016, **92**(10): fiw149.

[30] Liu D, Liu G H, Chen L, *et al*. Soil pH determines fungal diversity along an elevation gradient in southwestern China[J]. Science China Life Sciences, 2018, **61**(6): 718-726.

[31] 乔沙沙, 周永娜, 柴宝峰, 等. 关帝山森林土壤真菌群落结构与遗传多样性特征[J]. 环境科学, 2017, **38**(6): 2502-2512.
Qiao S S, Zhou Y N, Chai B F, *et al*. Characteristics of fungi community structure and genetic diversity of forests in Guandi Mountains[J]. Environmental Science, 2017, **38**(6): 2502-2512.

[32] 季凌飞, 倪康, 马立锋, 等. 不同施肥方式对酸性茶园土壤真菌群落的影响[J]. 生态学报, 2018, **38**(22): 8158-8166.
Ji L F, Ni K, Ma L F, *et al*. Effect of different fertilizer regimes on the fungal community of acidic tea-garden soil [J]. Acta Ecologica Sinica, 2018, **38**(22): 8158-8166.

[33] Zhang W H, Sun R B, Xu L, *et al*. Effects of micro-/nano-hydroxyapatite and phytoremediation on fungal community structure in copper contaminated soil [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, **174**: 100-109.

[34] 马垒, 赵文慧, 郭志彬, 等. 长期不同磷肥施用量对砂姜黑土真菌多样性、群落组成和种间关系的影响[J]. 生态学报, 2019, **39**(11): 4158-4167.
Ma L, Zhao W H, Guo Z B, *et al*. Effects of long-term application of phosphorus fertilizer on fungal community diversity, composition, and intraspecific interactions and variation with application rate in a lime concretion black soil [J]. Acta Ecologica Sinica, 2019, **39**(11): 4158-4167.

[35] Liu M, Liu J, Chen X F, *et al*. Shifts in bacterial and fungal diversity in a paddy soil faced with phosphorus surplus [J]. Biology and Fertility of Soils, 2018, **54**(2): 259-267.

[36] Wang M, Shi S, Lin F, *et al*. Response of the soil fungal community to multi-factor environmental changes in a temperate forest[J]. Applied Soil Ecology, 2014, **81**: 45-56.

[37] Kivlin S N, Hawkes C V. Tree species, spatial heterogeneity, and seasonality drive soil fungal abundance, richness, and composition in Neotropical rainforests [J]. Environmental Microbiology, 2016, **18**(12): 4662-4673.

HUANJING K0EXUE Vol. 41 No. 5
Environmental Science (monthly) May 15, 2020

CONTENTS