# 东北师范大学生命科学学院 2010 级野外实习自主研究性学习报告





论文题目: 撂荒人参地恢复演替初期土壤中丛枝菌根真菌

孢子种类和组成变化的初步研究

组 别: 生态六组

组 长: 柳孜俐

组 员:郭晓庆、郝 芳、刘志爽、张明岳、解明姝、张 雪、

于海川、母振炜

指导教师: 巴 雷

# 撂荒人参地恢复演替初期土壤中丛枝菌根 真菌孢子种类和组成变化的初步研究

[摘 要]: 大兴安岭的长白山是我国人参栽培的主要地区。由于人参栽培不能连作的特点,因此严重影响了该地区森林生态系统的稳定与可持续发展。本文分别以撂荒四年和六年的人参地,以及附近次生针阔混交林土壤中丛枝菌根真菌为研究对象,采用湿筛倾倒和蔗糖-密度梯度离心方法提取分离丛枝菌根真菌孢子,并根据形态学特征进行种类鉴定和分种计数,以研究人参撂荒地恢复演替过程中,丛枝菌根真菌群落的孢子组成和数量变化。实验中共分离得到菌根孢子种类共计 19 种,其中地球囊霉为优势种,孢子相对多度及孢子密度均随撂荒地年限的增加而降低。本实验结果不仅能够为长白山区丛枝菌根真菌的研究提供基础数据,同时能够为该地区人参撂荒地的恢复与重建提供理论基础和技术支持。

[关键词]: 丛枝菌根真菌; 人参撂荒地; 针阔混交林

[中**图**分类号]: Q145 [文献标志码]: A

## 1 引言

菌根是由土壤中某些特定真菌的菌丝体侵入到宿主植物根系表面、皮层细胞间或细胞内而形成的共生体,能形成菌根的真菌称为菌根真菌。目前,经调查所得自然界中的菌根主要分为以下七种类型:丛枝菌根,外生菌根,内外生菌根,浆果鹃类菌根,水晶兰类菌根,欧石楠类菌根和兰科菌根,其中丛枝菌根在自然界分布最广,具有重要的生态系统功能<sup>[1]</sup>。丛枝根菌是由专性营养共生的丛枝菌根真菌和约80%的陆生植物形成的内生菌根。其对保持生态平衡、稳定和提高生态系统生产力具有重要作用。丛枝菌根真菌能够有效地促进植物对各种矿物质的吸收,同时能够增强植物的抗逆抗病等生理作用;在生态系统尺度上,丛枝菌根真菌是自然生态系统的重要组成部分,具有十分丰富的物种多样性、遗传多样性和功能多样性,在植物群落的发生、演替和区系组成等方面都起着重要作用<sup>[1-2]</sup>。

我国有关丛植菌根真菌和其生态功能的研究已经成为生态学领域研究的热点,但是,在长白山地区的研究工作尚需开展与完善。对于长白山地区的森林土壤,曾多次有学者对其森林土壤真菌区系进行详细调查,也编写了较为详细的名录。沈阳农大的学者曾对长白山自然保护区的不同海拔、林型土壤剖面的森林土壤进行分类鉴定,为森林资源管理提供科学依据<sup>[3]</sup>。吉林农大菌物研究所学者对长白山自然保护区针阔混交林大型真菌作了较为详细的调查,编写了长白山针阔混交林带大型真菌多样性名录<sup>[4]</sup>。尽管有关长白山地区土壤真菌的研究一直进行着,但对其土壤的丛枝菌根真菌的研究相对较少。目前中国科学院沈阳应用生态研究所对长白山不同海拔生境下3种赤杨共生丛枝菌根真菌的多样性进行检测分析。结果表明,该地区赤杨属东北赤杨、西伯利亚赤杨及色赤杨共生丛枝菌根真菌在科乃至种的水平上并未随宿主的变化表

现出丰富的多样性,但在种的水平上表现出不相关于宿主海拔高度的某种相互选择性。杨秀丽(2010)在 大兴安岭的兴安落叶松林的实验,共分离出 5 个属的共 36 种丛枝菌根真菌,其中以无梗囊霉属和球囊霉 属为优势属,分别有 15 种。尽管长白山地区开展了一些有关丛枝菌根真菌的研究,但是从退化森林系统 角度,探讨丛枝菌根真菌生态系统功能的研究未见报道<sup>[5]</sup>。

长白山地区是中国人参的主要产地,吉林省内人参种植地的分布面积大约十几万公顷。人参栽培过程中会消耗大量的土壤养分、改变土壤理化性质,甚至严重影响土壤微生物群落组成,使得大量荒弃的人参地进入自然恢复状态<sup>[6]</sup>。加速撂荒人参地的自然恢复进程对于维持当地森林生态系统平衡和经济发展具有重要意义。本实验通过调查比较撂荒不同年限的人参地和长白山地区针阔混交林土壤中丛枝菌根真菌的种类和组成,探讨人参撂荒地恢复演替过程中,丛枝菌根真菌群落的孢子组成和数量变化。本研究不仅能够为长白山区丛枝菌根真菌的研究提供基础数据,同时能够为该地区干扰和退化的森林生态系统的恢复与重建提供理论基础与技术支持。

## 2 材料与方法

### 2.1 研究地区概况

露水河地区位于长白山北部(127°29′E至128°29′E,42°24′N至42°29′N),属北温带东亚季风气候。年平均气温3.3℃,七、八月份气温最高可达32.2℃,一、二月份温度最低可达-44.1℃。该地区的森林植被带主要以针阔混交林为主,物种丰富,群落层次分明,土壤为暗棕色森林土。实验选择撂荒四年的人参撂荒地(127°50.746′E 42°29.723′N)以一年生和两年生的草本植物为主,其优势种为拂子茅(Calamagrostis epigeios (Linn.) Roth),宽叶苔草(Carex siderosticta Hance),灯芯草(Juncus concinnus D. Don);撂荒六年的人参撂荒地(127°50.106′E 42°30.000′N)草本植物的优势种为剪股颖(Agrostis clavata Trin.),灯芯草(Juncus concinnus D. Don);针阔混交林(127°50.106′E 42°30.000′N)草本植物优势种为宽叶苔草(Carex siderosticta Hance);木本植物的优势种为红松(Pinus koraiensis Siebold et Zuccarini),水曲柳(Fraxinus mandshurica Rupr)。

#### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 样地选择与样品采集

在撂荒四年和六年的人参地以及针阔混交林内部,地势比较平坦区域分别设立 50 cm×50 cm 临时采样标准地。在标准地内部随机设定 5 个 5m×5m 的样方,并且在样方内选择 3 个取样点。首先,清理土壤表层的枯枝落叶和腐殖质层,用规格为内径 35mm 的土钻钻取土壤表面至 20 cm 的土层,并将 3 个样点的土壤(大约 200 g)混合均匀,装入封口袋中,编号后带回实验室保存备用。

## 2.2.2 丛枝菌根真菌孢子提取和鉴定(湿筛倾倒-密度梯度离心方法)

解离采集的土壤样品,再利用湿筛法筛取孢子,分别以甘油,PVLG 为浮载剂制片,在光学显微镜下观察记录并拍照,根据最新的孢子分类标准及信息鉴定孢子种类并进行计数。

### (1) 土壤的解离

- ① 配制六偏磷酸钠溶液:用电子天平称取 50g 六偏磷酸钠固体并加水定容到 1000ml (注:可根据实验需要适当增减六偏磷酸钠的用量,以达到更好解离土壤的目的。同时由于实验中的六偏磷酸钠溶液用量大,因此可一次性配制 4-5L):
- ② 称取 25g 土样倒入规格 250ml 锥形瓶中,再加入六偏磷酸钠溶液至 250ml;

- ③ 将样品放在摇床上以 170r/min 的速度摇晃 20min 左右。
- (2) 利用湿筛法和蔗糖密度梯度离心法分离土壤中的孢子:
- ① 将解离好的样品转移到 1000ml 的烧杯中,不断用清水冲洗锥形瓶,并回收样品,减少实验过程中样品的损失。继续加水到 1000ml,用玻璃棒搅拌 4-5s,静止 10-15s;
- ② 准备一个40目和一个400目的筛子,将40目的筛子置于400目筛子的上面;
- ③ 将静止完成的样品缓慢倾倒入筛子中;
- ④ 当烧杯内剩余 300-400ml 样品时,停止倾倒,向烧杯中加清水至 1000ml,重复①-④,至溶液澄清即可;
- ⑤ 将留于 400 目筛子的样品用水清洗,并不断用手揉搓 4-5min,将残余样品转移到锥形瓶中。
- ⑥ 将锥形瓶内的物质转移到离心管中,配平后以3000r/min 的速度离心3min,离心后弃上清,留沉淀;
- ⑦ 配制糖度为 40%-50%的蔗糖溶液,加入到上述两个离心管中,并摇晃离心管使沉淀悬起,配平后 3000r 离心 1min,将离心后的上清液倒入 400 目的筛子中,得蔗糖溶液并回收,用清水冲洗 10-15min,再将其转移至锥形瓶中:
- ⑧ 将锥形瓶中的液体倒入培养皿中,在实体显微镜镜下从孢子混合物中分离出孢子。
- (3)制片:将每块样地所采集的四份样品编号,1号和2号样品采用明胶制片,3号和4号采用PVLG制片:
- (4) 在 20 倍或 40 倍的显微镜下,对每一类孢子进行观察鉴定并分类计数(孢子的鉴定参考最新的分类标准和信息)。

### 2.2.3 统计分析

(1) 群落的丰富度和多样性指数

Simpson 多样性指数:

根据公式计算 Margalef 丰富度指数和 Simpson 多样性指数。公式如下:

Margalef 丰富度指数 (1958): dMa=(S-1)/lnN

$$D = \frac{N(N-1)}{\sum_{n_i} (n_i - 1)}$$
 (i \(\frac{1}{2}\) 1, 2, 3, \(\text{m}\)

说明: S 为物种数目,N 为所有物种的个体数目,Ni /N 为第 i 物种第一次被抽中的概率,(Ni -1) /(N-1) 为第 i 物种第二次被抽中的概率。

(2) 优势度

算术优势度:

其中, C'、F'、H'、D'分别表示相对盖度、相对频度、相对高度和相对密度,某物种在整个样地内的平均优势度为该物种在该样地内所有样方内的优势度之算术平均值。

$$\sum_{i=1}^{r} \sum_{j=1}^{m} \left( y_{ij} - \overline{y} \right)$$

(3) 方差分析方差: ST=

其中: i 为因子 A 的水平,i=1, 2, ······,r; j 为在每一水平下进行的重复试验,j=1, 2, ······,m;  $y_{ii}$  为因子 A 第 i 个水平下第 j 次重复试验结果; y 表示所有试验结果(r·m 个数据)的平均值。

## 3 结果与分析

3.1 撂荒参地与针阔混交林丛枝菌根真菌孢子种类组成的比较

在四年、六年人参撂荒地和次生针阔混交林的土壤样品中共获得孢子 40000 余颗。根据形态特征,共鉴定出 19 种丛枝菌根真菌孢子,分属于球囊霉属和无梗囊霉 2 个属,在四年人参撂荒地、六年人参撂荒地、针阔混交林各有 18 种。三个样地的共有 16 种丛枝菌根真菌,包括地球囊霉、地表球囊霉、幼套球囊霉、摩西球囊霉、双型球囊霉、方竹球囊霉、瑞士无梗囊霉、聚生球囊霉、近明球囊霉、草莓球囊霉、明球囊霉、透光球囊霉、大果球囊霉、小果球囊霉、未知种 2、未知种 4;四年人参撂荒地中没有未知种 1,六年人参撂荒地中没有未知种 5,针阔混交林中没有未知种 3。四年、六年人参撂荒地土壤中丛枝菌根真菌孢子种类组成无显著差异,而且球囊霉属的地球囊霉在撂荒地中是优势种,四年人参撂荒地和六年人参撂荒地的亚优势种为球囊霉属的幼套球囊霉,针阔混交林的亚优势种为无梗球囊霉属的瑞士无梗囊霉(表1)。

土壤中丛枝菌根真菌的孢子的相对多度在三个类型植物群落中存在差异。优势种地球囊霉的相对多度 随人参撂荒地年限的增加而降低;而双型球囊霉、明球囊霉和未知种一的相对多度随人参撂荒地年限增加 而增加;地表球囊霉、幼套球囊霉、摩西球囊霉、聚生球囊霉、近明球囊霉、大果球囊霉、小果球囊霉、 未知种 2 和 3 的相对多度随人参撂荒地年限增加而降低;方竹球囊霉、瑞士无梗囊霉、草莓球囊霉、透光 球囊霉、未知种 4 和 5 的相对多度呈现六年人参撂荒地低于四年人参撂荒地和针阔混交林的状态。

表 1 撂荒参地与针阔混交林丛枝菌根真菌孢子种类组成

			四年人参撂荒地			六年人参撂荒地			针阔混交林		
中文名	拉丁文名	相对频度	相对 多度	相对 优势度	相对频度	相对 多度	相对 优势度	相对频度	相对 多度	相对 优势度	
地球囊霉	Glomus. geosporum (Nicol. & Gerd.) Walker	1.0000	0.8100	0.9050	1.0000	0.7640	0.8820	1.0000	0.7530	0.8765	
地表球囊霉	Glomus. versiforme Berch	1.0000	0.0184	0.5092	1.0000	0.0496	0.5248	0.7500	0.0100	0.3800	
幼套球囊霉	Glomus. etunicatum Becker & Gerdemann	1.0000	0.0440	0.5220	1.0000	0.0650	0.5325	1.0000	0.0240	0.5120	
摩西球囊霉	Glomus. mosseae (Nicol. & Gerd.) Gerdemann & Trappe	1.0000	0.0258	0.5129	1.0000	0.0450	0.5225	1.0000	0.0210	0.5105	
双型球囊霉	Glomus. ambisporum Smith & Schenck	1.0000	0.0040	0.5020	1.0000	0.0100	0.5050	1.0000	0.0270	0.5135	
方竹球囊霉	Glomus. chimonobambusae Wu & Liu	0.2500	0.0020	0.1260	0.5000	0.0010	0.2505	0.2500	0.0050	0.1275	
瑞氏无梗囊霉	Acaulospora. rehmii Sieverding & Toro	0.7500	0.0110	0.3805	1.0000	0.0070	0.5035	1.0000	0.0570	0.5285	
聚生球囊霉	Glomus. fasciculatum (Thaxter) Gerdemann & Trappe	0.5000	0.0080	0.2540	0.7500	0.0120	0.3810	0.7500	0.0070	0.3785	
近明球囊霉	Glomus. claroideum Trappe & Gerdemann	1.0000	0.0162	0.5081	1.0000	0.0210	0.5105	1.0000	0.0200	0.5100	
草莓球囊霉		0.5000	0.0070	0.2535	0.5000	0.0020	0.2510	0.5000	0.0090	0.2545	
明球囊霉	Glomus. clarum Nicolson & Gerdemann	0.2500	0.0003	0.1252	0.5000	0.0006	0.2503	0.2500	0.0050	0.1275	
透光球囊霉	Glomus. diaphanum Morton & Walker	0.2500	0.0240	0.1370	0.2500	0.0006	0.1253	0.7500	0.0110	0.3805	
大果球囊霉	Glomus. macrocarpum Tul. & Tul.	0.2500	0.0010	0.1255	0.5000	0.0030	0.2515	0.2500	0.0020	0.1260	
小果球囊霉	Glomus. microcarpum Tul. & Tul.	0.2500	0.0010	0.1255	0.2500	0.0040	0.1270	0.2500	0.0010	0.1255	
未知种10		0.0000	0.0000	0.0000	0.2500	0.0003	0.1252	0.5000	0.0060	0.2530	
未知种 20		0.5000	0.0070	0.2535	0.7500	0.0010	0.3755	0.2500	0.0010	0.1255	
未知种 3®		0.2500	0.0020	0.1260	0.2500	0.0003	0.1252	0.0000	0.0000	0.0000	
未知种 4章		1.0000	0.0180	0.5090	1.0000	0.0135	0.5068	1.0000	0.0330	0.5165	
未知种 5◎		0.2500	0.0003	0.1252	0.0000	0.0000	0.0000	0.2500	0.0070	0.1285	

注: ① 圆形或椭圆形、淡绿色、表面有凹陷 ② 球形、颜色透明、表面密布凹陷 ③ 球形、红色、表面具有小刺状突起 ④ 梭形或哑铃形、黑色 ⑤ 两个萌发管

#### 3.2 撂荒参地与针阔混交林丛枝菌根真菌孢子密度的比较

针阔混交林土壤中丛枝菌根真菌的孢子密度明显低于撂荒人参地(图 1),而且不同种类孢子的密度变化趋势存在差异。地球囊霉、未知种 2、未知种 3、未知种 4 这四类孢子密度随人参撂荒地年限的增加而降低; 地表球囊霉、幼套球囊霉、摩西球囊霉、聚生球囊霉、近明球囊霉、小果球囊霉、大果球囊霉等七种的孢子密度为六年人参撂荒地、四年人参撂荒地、针阔混交林依次降低;明球囊霉和未知种 1 的孢子密度随着人参撂荒地年限的增加而逐渐降低;透光球囊霉、草莓球囊霉和方竹球囊霉的孢子密度为四年人参撂荒地、针阔混交林、六年人参撂荒地依次降低;瑞士无梗囊霉和未知种 5 的孢子密度为四年人参撂荒地、针阔混交林、六年人参撂荒地、针阔混交林、次年人参撂荒地、针阔混交林、次年人参撂荒地依次降低。其中优势种地球囊霉对孢子总密度有较大的影响,推测未知种 2、未知种 3、未知种 4 对孢子总密度具有指向作用。

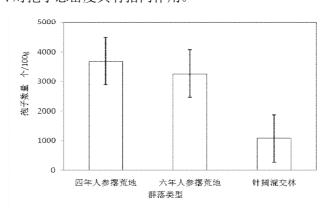


图 1 人参撂荒地和针阔混交林真菌孢子密度比较

#### 3.3 撂荒参地与针阔混交林丛枝菌根真菌孢子多样性的比较

孢子丰富度指数反映该生境中物种数目的多寡,有人认为只有这个指标才是唯一真正客观的多样性指标。多样性指数则是反映丰富度和均匀度的综合指标。丛枝菌根真菌孢子种类丰富度和多样性指数分别在撂荒人参地和针阔混交林之间没有显著的差异,但是却呈现随撂荒年限的增加,多样性随着增加的趋势(图 2 和图 3)。

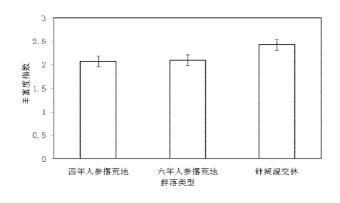


图 2 人参撂荒地与针阔混交林丛枝菌根真菌孢子丰富度指数

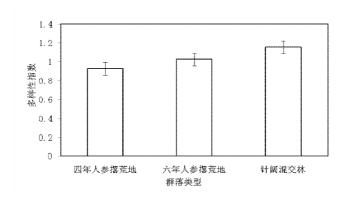


图 3 人参撂荒地与针阔混交林丛枝菌根真菌孢子多样性指数

## 4 结论与讨论

通过对长白山露水河地区不同年限人参撂荒地及针阔混交林丛枝菌根真菌的研究,我们分离得到 19 种不同种类的丛枝菌根真菌孢子。其中,确定种类有 14 种,未鉴定种类为 5 种。四年和六年撂荒地,以及针阔混交林土壤中均以球囊霉属的地球囊霉为优势丛枝菌根真菌 (相对优势度值介于 0.87-0.9), 幼套球囊霉是四年和六年撂荒地的亚优势种,瑞氏无梗囊霉是针阔混交林的亚优势种。目前国内己分离得到丛枝菌根真菌 7 属 113 种,其中森林生态系统中发现有 86 种<sup>[2]</sup>,分布在不同的森林生态系统中。长白山的落叶松林地区,共分离出 36 种丛枝菌根真菌孢子,其中 15 种属于球囊霉属,15 种属于无梗囊霉,并且孢子多样性随海拔的升高而降低<sup>[5]</sup>。在秦岭主峰太白山的调查结果发现 5 个属的 45 种孢子,其中球囊霉属有 27 种,并且以地球囊霉为优势种。由此可见,丛枝菌根真菌在森林生态系统中有广泛的分布,与大多数的高等植物能够形成共生态,而且球囊霉属中的地球囊霉是多个生态系统的优势种。不同生态系统中丛枝菌根真菌种类的差异应该主要取决不同生态系统的物种组成和气候条件的变化。

人参撂荒地和针阔混交林的孢子密度在 1080-3677 个/100g 土之间变动。与其他生态系统(例如草原生态系统和荒漠生态系统)相比较,森林生态系统通常具有较高的丛枝菌根真菌的孢子密度;例如热带雨林土壤中丛枝菌根真菌的孢子密度在每 100g 土壤 116-1560 个之间,平均 478 个[7-9];吉林西部草甸草原土壤中丛枝菌根真菌的密度为 64-1000 个/100g [10];在三个取样地点的土壤中丛枝菌根真菌孢子密度之间没有显著差异,但是以草本植物为主的撂荒人参地土壤中丛枝菌根真菌孢子的密度为 3470 个/100g,要明显的高于森林群落土壤中丛枝菌根真菌的孢子密度 1080 个/100g;即在人参撂荒地植被恢复的进程中,孢子的总体密度呈下降趋势。但是,草原生态系统中丛枝菌根真菌的多样性却与土壤演替的等级成正相关。包玉英等通过对内蒙古草原、荒漠、沙地三个典型区域丛枝根菌多样性的研究发现;草原、荒漠和草原带沙地丛枝根菌真菌多样性依次降低[11]。本实验的研究结果与各群落中草本植物的丰富度具有很好的对应关系。在四年和六年人参撂荒地内,分别有 40 和 49 种草本植物;在红松针阔混交林的林地共调查有 32 种草本植物。丛枝菌根真菌-宿主植物间的共生关系可

能是决定孢子密度和种类的最重要因素。此外,在以草本植物为优势的撂荒人参地植物群落与环境温度的作用面较低,而森林群落与温度的作用面高,因此使草本群落温度(42.2℃)要明显的高于森林群落(38.9℃),从而利于草本植物与土壤中丛枝菌根真菌形成共生关系,进而有利于撂荒人参地枯枝落叶的分解和土壤理化性质的变化。促进退化生态系统的恢复演替进程。

长白山地区是我国生产人参的主要地区,其对经济作物的种植行为已经能够对森林生态系统的可持续健康发展产生负面影响。本实验的结果间接表明土壤中丛枝菌根真菌群落的变化确实与植被组成和土壤理化性质存在一定的关联,而且在受损生态系统的恢复演替中发挥着重要作用。但是实验结果尚可以通过(1)增加演替梯度上时间序列(即增加调查群落的数量);(2)增加取样时间序列(5-9月份进行月季取样);(3)在取回土壤样品后,进行富集培养,甚至(4)应用分子生物学技术对丛枝菌根真菌进行生物学研究等途径提高实验的准确度和结果的可信度,并且与地上植被和土壤理化因素相结合,对长白山地区人参撂荒地的恢复演替机制和恢复途径进行深入探讨。

# [参考文献]

- [1] 刘永俊. 丛枝菌根的生理生态功能[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2008, 29(69): 54-58.
- [2] 王发园, 林先贵, 周健民. 丛枝菌根与土壤修复[J]. 土壤, 2004, 36(3): 251-257.
- [3] 杨红, 刘志恒, 吕国忠等. 长白山北坡森林土壤真菌分类鉴定与名录[J]. 江苏农业科学, 2009, 6(3), 372-374.
- [4] 图力古尔, 康国平, 范宇光等. 长白山大型真菌物种多样性调查名录IV针阔混交林带 [J]. 菌物研究, 2011, 9(1): 21-36.
- [5] 杨秀丽. 大兴安岭兴安落叶松森林生态系统菌根及其真菌多样性研究[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2010, 1-119.
- [6] 陈曦, 孙晓东, 毕思远等. 东北地区人参根际土壤直菌多样性的研究[J]. 农业科学与技术, 2010, 11(2): 132-136.
- [7] Zhao ZW, Xia YM, Qin XZ, et al. Arbuscular mycorrhizal status of plants and the spore density of arbuscular mycorrhizal fungi in the tropical rain forest of Xishuangbanna, southwest China[J]. Mycorrhiza. 2001, 11(3): 159-162.
- [8] Liu RJ, Wang FY. Selection of appropriate host plants used in trap culture of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Mycorrhiza. 2003, 13: 123-127.
- [9] Molina RJ, Trappe JM, Strickler GS. Mycorrhizal fungi associated with Festuca in western United States and Canada[J]. Can J Bot. 1978, 56: 1691-1695.

- [10] 王桂君. 吉林省西部盐碱化养草草原的充值菌根共生多样性[D]. 长春:东北师范大学, 2005.
- [11] 包玉英. 内蒙古草原和荒漠丛枝菌根共生多样性及其生态分布[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2004: 1-114.