

土地利用变化对土壤真菌群落结构的影响

张于光¹, 张小全¹, 曲良建¹, 肖 焱²

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林生态环境重点实验室, 北京 100091;
2. 湖南农业大学生物安全科技学院, 长沙 410128)

摘要 :应用 PCR-RFLP 和测序分析对川西亚高山米亚罗林区不同土地利用类型的土壤真菌 18S rDNA 基因进行了多样性和系统发育研究,探讨了土地利用变化对土壤真菌群落结构的影响。在 20a 龄云杉 (*Picea likiandensis* var *balfourianan*) 人工林和菜地两种类型土壤中,共得到 238 个阳性克隆,限制性内切酶 *Msp*I 和 *Rsa*I 进行 RFLP 分析后得到 56 个不同的分类操作单元 (OTUs),其中 20a 龄云杉人工林样地获得 137 个阳性克隆和 37 个 OTUs,而菜地样地获得 101 个阳性克隆和 19 个 OTUs。在两类样地中具有不同的优势种群,其中 20a 龄云杉人工林样地有 1 个明显优势种群,占总克隆数的 20.4%,菜地样地有 2 个明显优势种群,分别占总克隆数的 25.7% 和 21.8%。对 14 个克隆进行了序列测定,序列的相似性在 86% ~ 99% 之间,与 GenBank 数据库中的序列进行比对,与已知序列的相似性在 92% ~ 100% 之间。系统发育分析表明,所有的 18SrDNA 基因被分为 3 个主要的簇,其中 20a 龄云杉人工林样地的克隆都聚集在第一和第三簇中,而菜地样地的克隆都聚集在第二簇中。结果说明,两类土壤中具有较为丰富的真菌多样性,而土地利用变化引起了土壤真菌群落结构的明显变化。

关键词 土地利用变化;真菌;群落结构;18S rDNA;PCR-RFLP

文章编号:1000-0933(2007)10-4325-08 中图分类号:Q938 S154.36 文献标识码:A

The impact of land use changes on soil fungal community and structure

ZHANG Yu-Guang¹, ZHANG Xiao-Quan¹, QU Liang-Jian¹, XIAO Ye²

1 Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Forest Ecology and Environmen of State Forestry Administration, Beijing 100091, China
2 College of Biosafety Science and Technology of Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China
Acta Ecologica Sinica 2007 27 (10) 4325 ~ 4332.

Abstract :To understand the impact of land use changes on the composition and structure of fungal communities from Miyaluo county in subalpine forest area of western Sichuan, the molecular diversity of 18S rDNA genes from soil obtained at a 20-year-old spruce plantation (*Picea likiandensis* var *balfourianan*) and cropland sites were examined using a PCR-based cloning approach. DNA was directly extracted from the soil microorganisms and amplified the 18S rDNA gene fragment using PCR by the specific primers of EF-4f : 5'-GGAAGGG (A/G) TGTATTTATTAG-3' and Fung-5r : 5'-GTAAA AGTCCTGGTTCCC-3'. For the gene fragment, diverse PCR products were characterized by cloning, restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and sequencing. A total of 238 clones and 56 operational taxonomic units (OTUs) which were digested by the restriction enzymes *Msp*I and *Rsa*I were obtained from all samples. The 20-year-old spruce plantation and cropland sites were received 137 and 101 clones and 37 and 19 OTUs, respectively. There were different significant dominant groups of clones occurring in both samples and shared 6 OTUs. 20-year-old spruce plantation and

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (40271109)
收稿日期 2006-08-30;修订日期 2007-03-24
作者简介 张于光 (1976 ~),男,湖南湘乡人,博士,主要从事土壤微生物分子生态学研究. E-mail :yugzhang@yahoo.com.cn
* 通讯作者 Corresponding author. E-mail :xiaoquan@caf.ac.cn
Foundation item The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 40271109)
Received date 2006-08-30 ;**Accepted date** 2007-03-24
Biography ZHANG Yu-Guang, Ph. D., mainly engaged in soil microbial molecular ecology. E-mail :yugzhang@yahoo.com.cn

cropland sites had one and two significant dominant groups which account for 20.4% ,25.7% and 21.8% of all clones , respectively. There also were some secondary dominant groups of clones which account for 7.3%—8.9% of all clones. Fourteen 18S rDNA clones were sequenced and their nucleotide identity was from 86% to 99%. Compared the known sequences with the deposited in the data bank (www.ncbi.nlm.nih.gov) ,their level of nucleotide identity was from 92% to 100%. The phylogenetic tree was constructed by the Clustal W and Mega softwares. 14 sequences could be subdivided into 3 clusters in the phylogenetic tree. The clone sequences of 20-year-old spruce plantation site were completely clustered into the first and the third clusters , and the clone sequences of cropland site only distributed in the second cluster. Therefore ,both 20-year-old spruce plantation and cropland sites had the high fungal diversity , and land use changes significant influenced the fungal community and structure.

Key Words : land use changes ;fungi ;community and structure ;18S rDNA ;PCR-RFLP

土壤微生物作为土壤有机碳周转的驱动力 ,土壤真菌是其中主要的成员 ,在纤维素、半纤维素、木质素、果胶、还原氮、溶解磷等的分解中起重要作用 ,直接影响到土壤有机质的数量和组成^[1]。虽然真菌在陆地生态系统中有很重要的作用 ,但是人们对自然界的真菌多样性了解得还很少。由于缺少对群落中所有真菌都适应的培养条件 ,大量真菌无法被分离培养 ,迄今为止 ,被正式描述的种类只占 5% ~ 10%^[1,2]。受到全球气候变化、环境污染和人类活动等诸多因素的影响 ,自然环境中真菌的种类和数量、分布都发生了显著的变化 ,真菌多样性的研究也越来越受到人们的重视。为了克服传统培养方法的局限性 ,分子生物学方法被用于真菌研究 ,特别是以 PCR 技术为基础的核酸杂交、序列分析、DNA 指纹分析 ,如 PCR-RFLP、PCR-RAPD、PCR-AFLP、PCR-DGGE 等技术的发展为深入研究真菌多样性和群落结构提供了可能^[4~8]。这些技术使人们在对真菌的物种多样性、分布多样性和功能多样性等方面都有了新的认识。Sobek 和 Zak 利用修改的 FungiLog 法研究了 5 个随海拔高度升高的植被带和 6 个被干扰林业区的真菌群落 ,评价真菌功能多样性与土壤有机质的关系 ,进而提出植被带碳源复杂性、输入的有机物质、同一系统碳源空间和时间差异性是与土壤真菌功能多样性有潜在相关性的三个重要因素^[8]。Viaud 等通过内转录间隔区 (ITS)PCR-RFLP 分析 ,发现农田环境样品中包括子囊、担子、接合菌门和归属真菌界的卵菌门和根肿菌门真菌^[9]。

全球变化及温室气体浓度在大气中的迅速上升 ,已经成为各国政府、科学家及公众关注的热点。土地利用变化是引起温室气体浓度增加的主要原因之一 ,仅次于化石燃料燃烧。目前 ,国内外研究者就土地利用/覆盖变化影响土壤有机碳的输入、输出、贮量、组分和残留等方面进行了大量的研究^[9] ,但研究的结论差异性还较大 ,而且研究中对效应的研究较多 ,对机理的研究较少。本研究旨在应用 PCR-RFLP 和测序分析 ,通过对川西亚高山地区 20 世纪 80 年代云杉人工林和菜地的土壤真菌 18S rDNA 基因进行群落结构和多样性研究 ,探讨土地利用变化对土壤真菌群落结构的影响 ,为揭示土地利用变化对土壤有机碳的影响机理提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 研究地概况和样品采集

研究区位于四川省理县米亚罗林区 (31°24' ~ 31°55'N ,102°35' ~ 103°40'E) ,属于青藏高原东缘褶皱带最外缘部分。地形以石质山地为主 ,坡度多在 35°以上 ,海拔高差悬殊 ,处于 2200 ~ 5500m 之间。高山气候 ,年均温 6 ~ 12℃ ,极端高温 32℃ ,极端低温 - 16℃ ,≥10℃ 的积温为 1200 ~ 1400℃ ,年蒸发量为 1000 ~ 1900mm ,常年无霜期 200d ,年降水量为 600 ~ 1100mm ,具有降水次数多 ,强度小的特点^[10]。20 世纪 50 年代以来 ,该地区进行了大量的采伐和人工更新 ,形成了原始林、次生林、人工林和由原始林开垦而来的农地等多样的土地利用类型。

本研究选择 20a 龄云杉 (*Picea likiangensis* var *balfouriana*)人工林 (31°47'46" N ,102°42'03" E ,3233 m)和由原始林采伐后开垦为菜地 (31°47'48" N ,102°41'56" E ,3168 m)两种土壤为研究对象。在每种土壤类型选择 5 ~ 10 个样点 ,分别垂直取 1 ~ 10 cm 深度的土壤 ,每个点取样量大体一致 ,去除石砾、根系和土壤动物等 ,

均匀混合后取少量装入灭菌的封口聚乙烯袋 ,带回实验室 -70℃ 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 土壤 DNA 的提取

参照 Richard 等^[1]和张于光等^[2]的方法提取土壤微生物总 DNA。将溶解的 DNA 在 40 V 电压下 0.8% 琼脂糖电泳 12h ,然后用 DNA 回收试剂盒 (Bio Basic Inc. Canda)回收。

1.2.2 18S rDNA 的 PCR 扩增

利用 18S rDNA 引物对 EF-4f : 5'-GGAAGGG (A/G)TGTATTTATTAG-3' 和 Fung-5r : 5'-GTAAAA GTCCTGGTTCCCC-3' 进行真菌 18S rDNA 的基因扩增 ,该引物是在已有序列的基础上设计的 ,可以扩增出约 550bp 的片断^[3]。PCR 反应体系 (25 μl)含有 :1 × PCR Buffer ,200μmol/L 的 dNTPs 2.0 mmol/L 的 Mg²⁺ ,1 μmol/L 的正反引物 4 μg 的 BSA 和 2.0 U 的 *Taq* DNA 聚合酶。PCR 扩增具体条件为 94℃ 预变性 3 min ,94℃ 1 min ,52℃ 45 s ,72℃ 1 min ,40 个循环 ,最后 72℃ 延伸 10 min。

1.2.3 PCR 扩增产物的克隆和 RFLP 分析

利用 1.5% 琼脂糖电泳 PCR 扩增产物 ,试剂盒 (Bio Basic Inc. Canda)回收目标片断。根据厂商提供的说明书 ,用 pGEM-T Easy 载体试剂盒 (Promega Corp. ,U. S. A)对回收的目标片断克隆。挑选白斑 ,用载体 pGEM-T Easy 特异性引物 T₇-TAATACGACTCACTATAGGGAGA 和 SP₆-CATACGATTTAGGTGACACTATAG 对克隆产物进行 PCR 扩增 ,经电泳筛选有期望大小片断 (约有 700bp 大小的单一产物)的克隆。

将 T₇和 SP₆引物扩增所获得的产物用限制性内切酶 *Msp*I 和 *Rsa*I 在 37℃ 酶切 3 ~4h ,酶切后用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。最后用凝胶成像分析系统 GeneGenius 对结果进行数据统计和分析。

1.2.4 基因测序和系统发育分析

为了进一步弄清 18S rDNA 基因系统发育的多样性 ,选择部分 RFLP 谱带出现 2 次以上的克隆及部分单一克隆进行基因测序 ,测序由北京百泰克 (Bioteke)生物技术有限公司完成。利用 DNAMAN (版本 4.0)软件对测序结果进行同源性比较 ,利用 BLAST 软件 ,将测定得到的基因序列与 GenBank 数据库进行序列比对分析 ,获取相近典型菌株的 18S rDNA 基因序列。然后利用 Clustal W (版本 1.8)和 Mega (版本 3.0)中的邻接法 (Neighbor-Joining)建立 18S rDNA 基因的系统发育树。

1.2.5 核苷酸序列登录号

将测序得到的序列提交 GenBank 数据库 ,数据库登录号为 DQ834804-DQ834808 ,DQ834815 ,DQ834836-DQ834843。

2 结果与分析

2.1 18S rDNA 的克隆和 RFLP 分析

将回收的 18S rDNA 扩增片断进行连接转化克隆。从 2 个样品中共获得 238 个 18S rDNA 克隆 (表 1) ,所得到的克隆用 *Msp*I 和 *Rsa*I 限制性内切酶进行 RFLP 分析 ,通过 GeneGenius 软件分析酶切结果 ,共获得 56 个不同的 18S rDNA 可操作分类单元 (OTUs)。M-80 样地分别具有 137 个克隆数和 37 个 OTUs ,而 M-C 样地的克隆数和 OTUs 数均最少 ,分别为 101 个克隆和 19 个 OTUs。

表 1 不同样地土壤真菌 OTUs 和群落多样性指数

Table 1 The OTUs and diversity indexes of soil fungi cloning community in different sites				
样品编号 No. sample	获得克隆数 Clones	OTUs 数 OTUs	OTUs 与克隆数之比值 Ratio of OTUs to total clones	多样性指数 ^a Diversity indexes
M-80	137	37	0.27	1.37
M-C	101	19	0.19	1.03

a :根据 Shannon-Weaver 指数计算 Shannon-Weaver index

在两个样地中 ,共发现 3 个明显优势种群 (图 1) ,其中 M-80 样地有 1 个明显优势种群 ,占总克隆数的 20.4% ;M-C 样地有 2 个明显优势种群 ,分别占总克隆数的 25.7% 和 21.8%。同时 ,在两个样地中还具有不

接彩图 1

同的次要优势种群 ,分别占总克隆数的 7.3% ~8.9%。在 M-80 和 M-C 两个样地中具有 3 个或 3 个以上克隆的 OTUs 分别占据了总克隆数的 79.6% 和 88.1% ,而只有 2 个克隆或单个克隆产生的 OTUs 分别占了总 OTUs 的 51.4% 和 47.4%。因此 ,在这两个样地中很大部分的 OTUs 是由少量的克隆数产生的。

在两个样地中共发现 6 个 OTUs 是两个样地所共有的 ,其中 M-80 样地的优势种群 M-80-10 克隆与 M-C 样地的次要优势种群 M-C-02 具有相同的 RFLP 谱带型 ,而 M-80 样地的次要优势种群 M-80-73 克隆与 M-C 样地的次要优势种群 M-C-04 克隆具有相同的 RFLP 谱带型。另外 ,M-80 样地中的 M-80-20 克隆和 M-80-67 克隆与 M-C 样地中的 M-C-11 克隆和 M-C-34 克隆都具有相同的 RFLP 谱带型。而其它的共有 OTUs 均是由单克隆产生的。

2.2 18S rDNA 基因的测序结果和系统发育分析

从所有的克隆中挑选出 14 个克隆进行了测序分析。通过 DNAMAN 软件对所有序列进行了同源性比较 ,序列相似性为 86% ~99%。通过 GenBank 中的 BLAST 软件 ,将所有的序列与 GenBank 数据库中的序列进行比对 ,除了 M-80-66 和 M-80-73 克隆能在在数据库中找到完全相同的序列外 ,其它 10 个克隆序列均没有发现完全相同的序列 ,因此这些序列均是以前没有描述过的 18SrDNA 基因序列 ,可能代表了以前没有描述过的真菌种类。

在 GenBank 中选取了部分与测定序列相似性较高的 18SrDNA 基因序列 ,通过 Clustal W 软件和 Mega 软件将这些序列构建系统进化树 (图 2) ,进行系统发育分析。从系统发育树可以看出 ,大部分的序列具有高度的多样性 ,所有的 18SrDNA 基因被分为 3 个主要的簇 ,分属于多个不同的组群 ,其中绝大部分都聚集在第一和第二簇中。

从图 2 和表 2 可以看出 ,M-80 样地的克隆都分布在第一和第三簇中 ,而 M-C 样地的克隆都分布在第二簇中。所有的克隆序列都与已知的序列具有高度的相似性。其中 M-80-66 克隆与 *Truncatella angustata* 的 18S rDNA 序列具有 100% 的相似性 ,而 M-80-73 克隆与 *Hygrophorus pudorinus* 的 18S rDNA 序列具有 100% 的相似性 ,说明这两个克隆与这些已知真菌是完全相同的。同时 ,其它克隆与已知真菌序列的相似性都在 92% 以上 ,说明了这些克隆序列与已知序列可能是属于相同的属 ,甚至是相同的种。

表 2 不同样品扩增的 18S rDNA 序列特性

Table 2 Characters of 18S rDNA sequence in different soil samples				
克隆序列名 Clone No.	GenBank 登录号 GenBank No.	序列比较 Sequence comparison		最相似的已知序列 (GenBank 登录号)
		核苷酸数 ^a	相似性 ^b	
M-80-06	DQ834836	556bp	99%	<i>Clavariopsis aquatica</i> strain CCM F-10791 (AY357272)
M-80-10	DQ834837	541bp	96%	<i>Russula exalbicans</i> (AY293156)
M-80-20	DQ834838	549bp	98%	<i>Uncultured soil fungus clone Bush 4.6</i> (AY163420)
M-80-53	DQ834839	541bp	96%	<i>Chrysomphalina grossula</i> isolate AFTOL-ID 981 (AY752969)
M-80-64	DQ834840	518bp	92%	<i>Psilocybe cyanescens</i> isolate AFTOL-ID 819 (AY705949)
M-80-66	DQ834841	556bp	100%	<i>Truncatella angustata</i> (AF346560)
M-80-67	DQ834842	548bp	98%	<i>Cortinarius violaceus</i> isolate AFTOL-ID 814 (AY705950)
M-80-73	DQ834843	557bp	100%	<i>Hygrophorus pudorinus</i> isolate AFTOL-ID 1723 (DQ444861)
M-C-01	DQ834804	547bp	98%	<i>Dissophora decumbens</i> (AF157133)
M-C-12	DQ834805	548bp	98%	<i>Mortierella hyalina</i> (AY157493)
M-C-31	DQ834806	542bp	97%	<i>Mortierella parvispora</i> (AY129549)
M-C-32	DQ834807	548bp	98%	<i>Dissophora decumbens</i> (AF157133)
M-C-35	DQ834808	537bp	96%	<i>Uncultured rhizosphere zygomycete</i> (AJ506020)
M-C-58	DQ834815	545bp	97%	<i>Mortierella hyalina</i> (AY157493)

a :用于序列比较的核苷酸数 The nucleotides of sequence comparison b :与系统发育关系最近的已知序列的相似度 ;The nearly similarity with the known sequence in Genbank

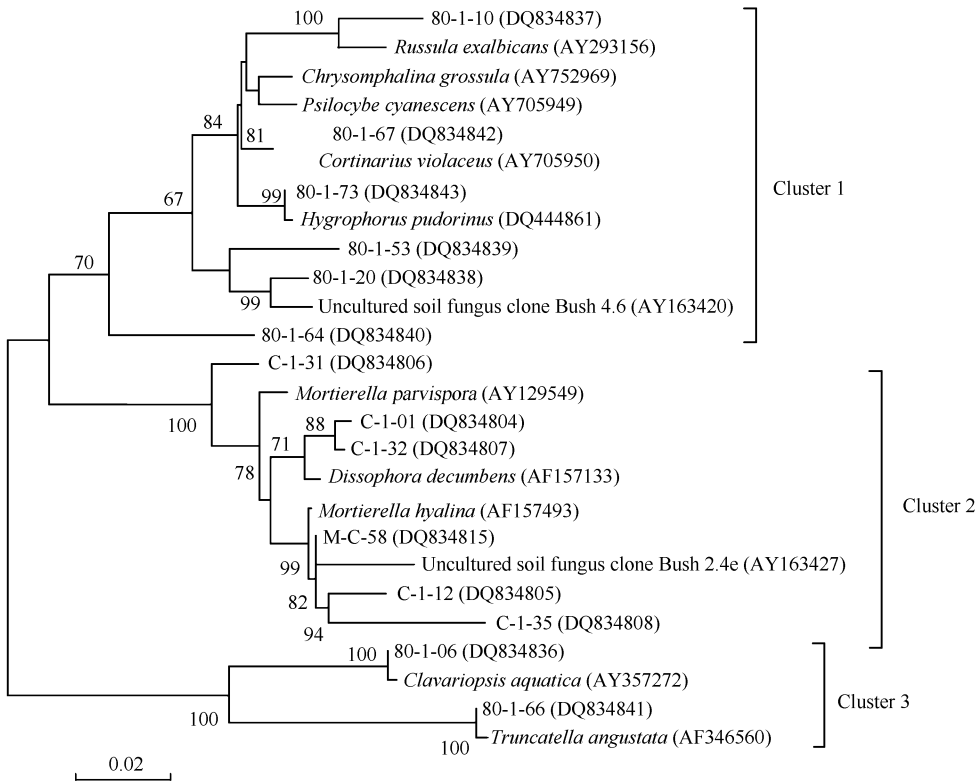


图2 根据遗传距离建立的 18S rDNA 基因系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic and molecular evolutionary analyses of 18S rDNA were conducted by genetic distance

树用邻接法构建,各枝上的数字是 1000 次 bootstrap 重抽样分析的支持百分比 The tree was constructed by Neighbor-Joining procedure in the software of Mega (3.0); The length and bootstrap confidence values of each branch are indicated above or below the branch, respectively

3 讨论

土壤中只有极少一部分微生物是可以被培养的,绝大多数因为无法培养而不为人所知。基于土壤微生物群落总 DNA 的分子方法避免了传统分离培养方法的缺点,因此,被广泛应用于土壤微生物群落结构、功能以及动态监测研究^[4]。另外,随着 DNA 的测序以及数据库的建立和发展,也促进了以 DNA 为基础的分子生物学方法用于研究环境样品中微生物种群的多样性和特异性,以及环境和种群进化的关系^[5]。18S rDNA 序列因其保守性强,并含有可变区,受环境因素影响较小,常常被用于比较不同真菌菌株间的系统发育,因此,18S rDNA 基因的研究和分析使真核生物之间的进化关系和特定环境下微生物种群的鉴定成为可能,对微生物生态和微生物种群结构的研究提供了便利^[5]。

本研究应用 PCR-RFLP 和测序分析对川西亚高山米亚罗林区 20a 龄云杉人工林和菜地土壤的真菌 18S rDNA 基因的多样性和系统发育进行了比较。结果表明,两类不同的土地利用类型具有明显不同的真菌 18S rDNA 克隆数、OTUs 数和多样性指数,在 20a 龄云杉人工林具有相对较高的 OTUs 和多样性指数,并且,两个样地间具有不同地优势种群。因此,表明 20a 龄云杉人工林具有更为丰富的真菌多样性,土地利用变化明显地影响了土壤真菌的群落结果。已有的研究也大都表明土地利用/覆盖变化对土壤真菌多样性具有明显的影响,He 等同时应用 TGGE、SSCP 和测序研究了澳大利亚天然林和与之相邻地松树人工林土壤真菌多样性,结果表明两者的真菌群落结构具有明显差异^[6]。Ranjard 等应用核糖体 RNA 基因间隔区自动分析 (ARISA) 研究不同地理起源、植被覆盖、具有理化差异地土壤真菌群落,发现不同地点土壤真菌图谱条带的数量、亮度及群落优势结构截然不同^[7],拉姆托热带地区土壤真菌 ARISA 图谱主要条带在 550bp,而其它地区在 400 ~ 800bp 之间。Buchan 等通过 ITS 区 T-RFLP 图谱分析了盐沼泽地子囊菌群落腐生真菌腐生早期和晚期群落组

成,指出其具有重要地空间同种性^[18]。

目前对土地利用变化影响土壤有机碳分解的机制还不完全清楚,土地利用变化可能通过影响土壤微生物的群落结构和功能多样性来影响土壤有机碳的分解^[19,20]。真菌参与土壤有机质的分解和腐殖质合成,直接影响土壤有机质的含量,而土壤有机质的增减也能改变土壤真菌的数量和组成^[21]。从系统发育树上可以看出,同样地具有不同的优势种群,所有序列在系统发育树上都明显的分属于不同的簇,表明两种土地利用类型中具有明显不同的真菌种群结构。因此,土地利用变化对土壤有机碳的影响机制与土壤真菌群落结构的变化可能存在一定的相关性,具体的关联度还有待深入研究。

应该说明的是,表 1 中的数值并不是样地中真菌数量的极限值,因为工作量、时间和经费等的局限性,从每个土壤样品中获得的 DNA 并没有全部被用于克隆,且获得的克隆也没有全部用于 RFLP 分析,因此,土壤中的微生物种类的数量应该比表中数值更高。

References :

[1] Hawksworth D L , Rossman A Y. Where are all the undescribed fungi. *Phytopathology* ,1997 ,87 :888 — 891.

[2] Hawksworth D L. The magnitude of fungal diversity :The 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* ,2001 ,105 :1422 — 1432.

[3] Viaud M , Pasquier A , Brygoo Y. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. *Mycological Research* ,2000 ,104 :1027 — 1032.

[4] Klammer M and Hedlund K. Fungal diversity in set-aside agricultural soil investigated using terminal-restriction fragment length polymorphism. *Soil Biology and Biochemistry* ,2004 ,36 :983 — 988.

[5] Zhao Y , Li W , Zhou Z , *et al.* Preliminary study on short-term dynamics of agricultural soil microbial community by PCR-RFLP and PCR-TGGE techniques. *Journal of Nanjing Agricultural University* ,2005 ,28 (3) :53 — 57.

[6] Muriel V , Aymeric P , Yves B. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. *Mycological Research* ,2001 ,104 (9) :1027 — 1032.

[7] Van Elsas J D , Duarte G F , Keijzer-Wolters A , *et al.* Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* ,2000 ,43 ,133 — 151.

[8] Sobek E A and Zak J C. The soil fungi Log procedure : Method and analytical approaches toward understanding fungal functional diversity. *Mycologia* ,2003 ,95 :590 — 602.

[9] Hawksworth D L. The fungal dimension biodiversity :magnitude , significance , and conservation. *Mycological Research* ,1991 ,95 :641 — 665.

[10] Liu Q , Yun H J , Wu Y. A study on the structure of *Picea asperata* community of Miyaluo subalpine in western Sichuan , China. *Journal of Mountain Science* ,2003 ,21 (6) 695 — 701.

[11] Richard A H , Qiu X , Wu L , *et al.* Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* , 2001 ,67 :4495 — 4503.

[12] Zhang Y , Wang H , Li D , *et al.* Molecular diversity and phylogenetic analysis of nitrogen-fixing (*nifH*) genes in alp prairie soil of Sanjiangyuan natural reserve. *Acta Microbiologica Sinica* ,2005 ,45 (2) :166 — 171.

[13] Smit E , Leeftang P , Glandorf B , *et al.* Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* ,1999 ,65 ,2614 — 2621.

[14] Pace N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* ,1997 ,276 :734 — 740.

[15] Hang X , Yang H , Whitby C. PCR amplification of anaerobic fungal 18S rDNA from landfill sites. *Chinese Journal of Biotechnology* ,2001 ,17 (5) :515 — 519.

[16] He J , Xu Z , Hughes J. Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA gene. *FEMS Microbiology Letters* ,2005 ,247 :91 — 100.

[17] Ranjard L , Poly F , Lata JC , *et al.* Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis

fingerprints : biological and methodological variability. *Applied Environment Microbiology* ,2001 ,67 :4479 —4487.

[18] Buchan A , Newell S Y , Moreta J I L , *et al.* Analysis of internal transcribed spacer (ITS) regions of rRNA genes in fungal communities in a southeastern U. S. salt marsh. *Microbial Ecology* ,2002 ,43 :329 —340.

[19] Steenwerth K L , Jachson L E , Calderon F J , *et al.* Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California. *Soil Biology and Biochemistry* ,2002 ,34 :1599 —1611.

[20] Anderson I C , Campbell C D , Prosser J I. Potential bias of fungal 18S and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environmental Microbiology* ,2003 ,5 :36 —47.

[21] Billings S A and Ziegler S E. Linking microbial activity and soil organic matter transformations in forest soils under elevated CO₂. *Global Change Biology* ,2005 ,11 :203 —212.

参考文献：

[5] 赵勇,李武,周志华,潘迎捷,赵立平. 应用 PCR-RFLP 及 PCR-TGGE 技术监测农田土壤微生物短期动态变化. *南京农业大学学报* ,2005 ,28 (3):53 ~57.

[10] 刘庆,尹华军,吴彦. 川西米亚罗高山地区云杉林群落结构分析. *山地学报* ,2003 ,21 (6):695 ~701.

[12] 张于光,王慧敏,李迪强,肖启明,刘学端. 三江源高寒草甸土固氮基因 (*nifH*) 的多样性和系统发育研究. *微生物学报* ,2005 ,45 (2):166 ~171.

[15] 杭晓敏,杨虹,Whiteby Come. 垃圾填埋场中厌氧真菌 18S rDNA 的 PCR 扩增及鉴定. *生物工程学报* ,2001 ,17 (5):515 ~519.

24/28/32

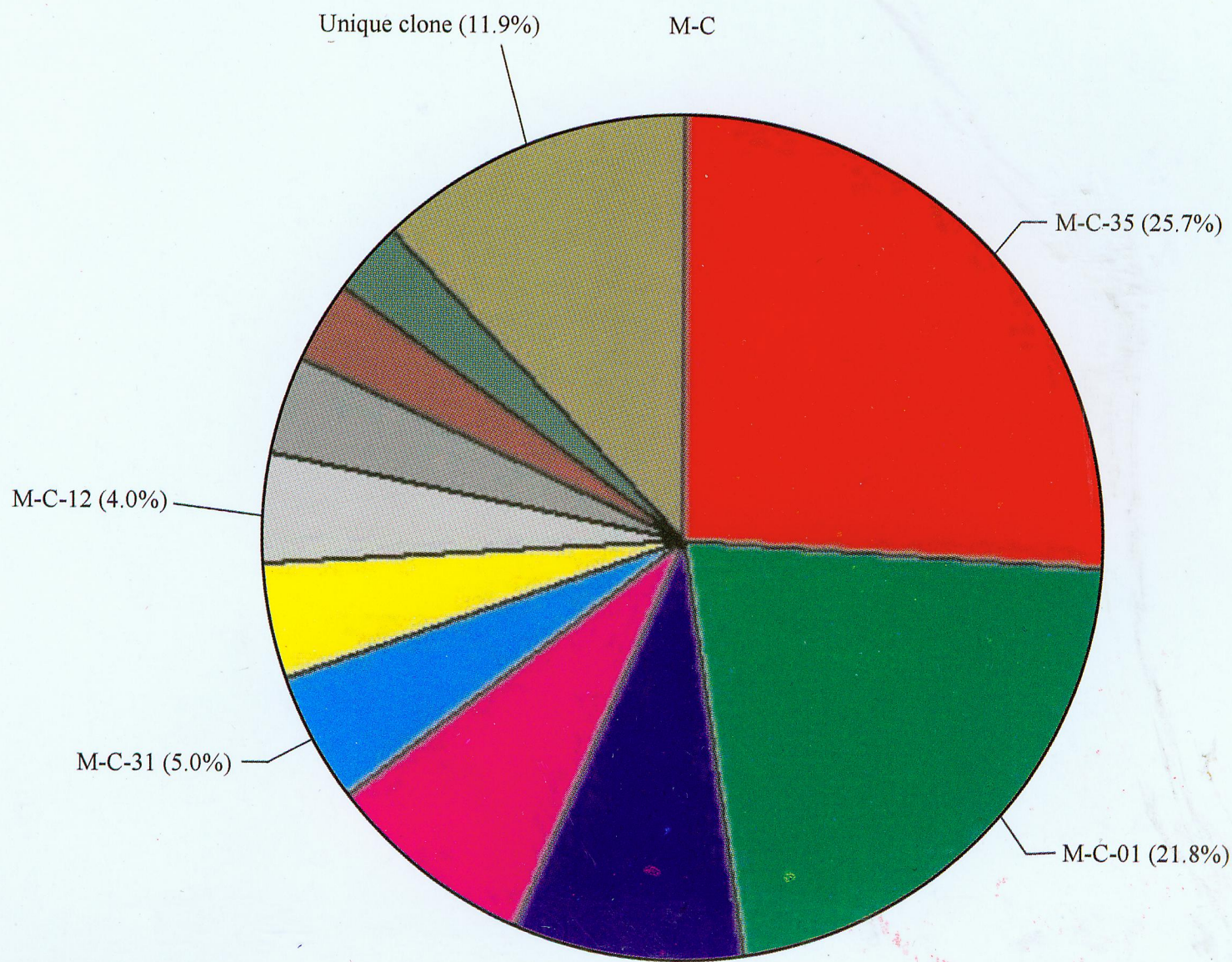
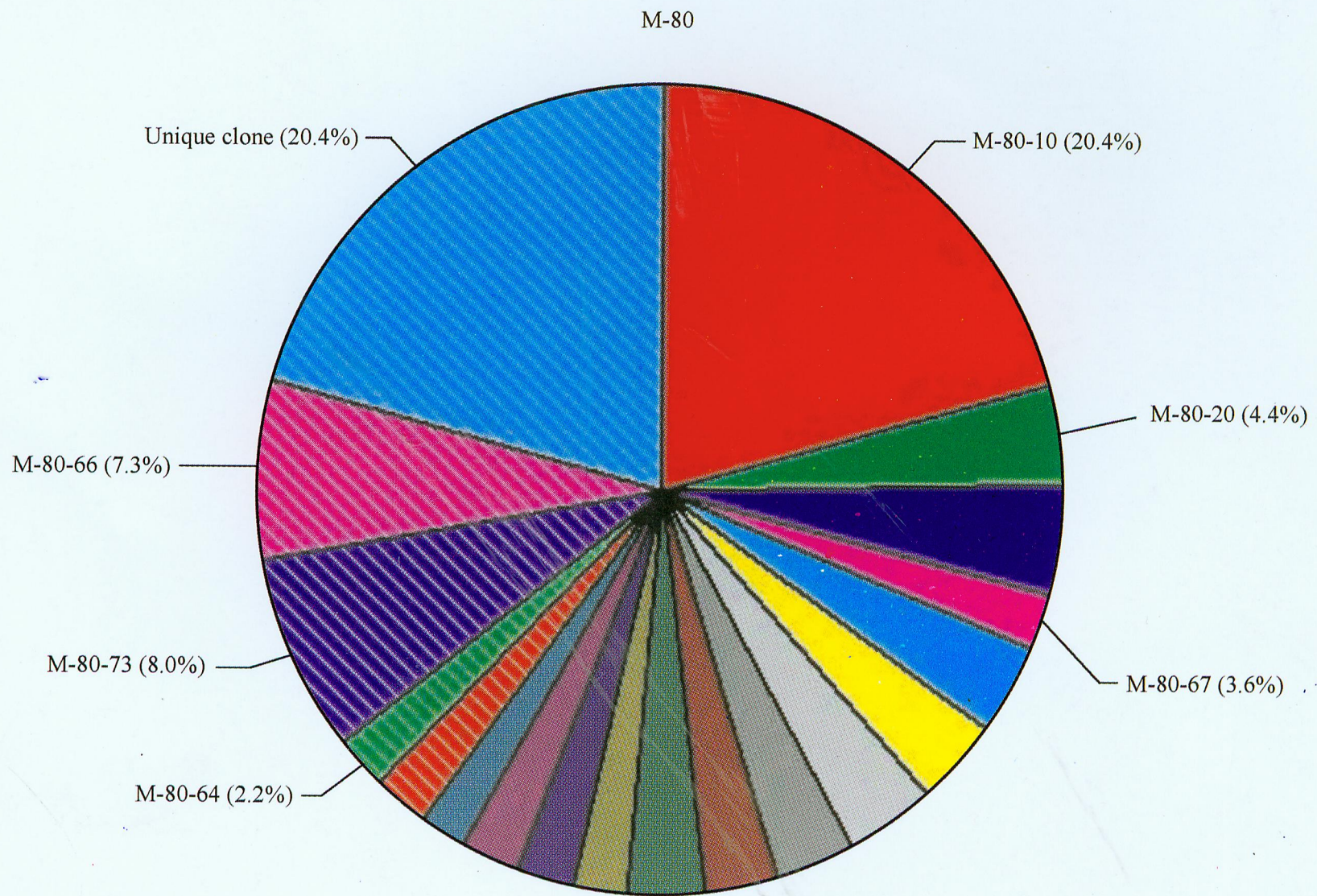


图1 18S rDNA 克隆文库中的 OTUs 多样性和所占比例
Fig.1 Distribution of OTUs and clones in clone libraries for 18S rDNA