

云南高黎贡山土壤可培养降解纤维素真菌的多样性

杨 涛^{1,2,3}, 周 慧^{1,2,5}, 张于光¹, 高必达⁴, 李迪强^{1,*}

(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. 长沙理工大学化学与生物工程学院, 长沙 410076; 3. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 长沙 410004;

4. 湖南农业大学生物安全科学与技术学院, 长沙 410128; 5. 中山大学环境科学与工程学院, 广州 510275)

摘要: 云南高黎贡山是中国生物多样性保护具有全球意义的关键区域, 研究该地区土壤中降解纤维素真菌 (cellulose-decomposing fungi, CDF) 多样性及分布状况对筛选高效 CDF 和相关功能基因研究具有重要意义。利用羧甲基纤维素 (CMC) 刚果红平板和 PDA 平板, 分离培养了高黎贡山海拔 960 ~ 2900m 之间 0 ~ 20cm 深度的土壤样品的好氧 CDF, 通过液体发酵鉴定其纤维素酶活力, 并对其 rDNA 内转录间隔区 (ITS) 序列进行分析, 用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。结果发现中低海拔地区土壤 CDF 数量高于高海拔地区, 且数量与样地海拔、土壤含水量、温度、有机质和全氮含量呈显著相关 ($P < 0.05$); CDF 在样地内多样性与土壤有机质、全氮、含水量显著相关 ($P < 0.05$); 植被类型和人为干扰对 CDF 的数量和分布都有一定影响。在 10 个样地中共筛选到 35 株具有较高降解纤维素类物质能力的真菌, 其 96h 液体发酵测量 CMC 酶活力范围在 79.6 (菌株 6) ~ 228.9 IU (菌株 3)。这些菌株分属 15 个属, 其中曲霉属 (*Aspergillus*)、青霉属 (*Penicillium*)、葡萄状穗霉属 (*Stachybotrys*)、毛壳霉属 (*Chaetomium*) 的真菌共计 20 株, 占总分离菌株数的 57.1%, 是高黎贡山土壤中 CDF 的优势菌群。

关键词: 高黎贡山; 土壤; 多样性; 降解纤维素真菌

文章编号: 1000-0933(2009)04-1971-09 中图分类号: Q939 文献标识码: A

Phylogenetic diversity of culturable cellulose-decomposing fungi in forest soil of Gaoligongshan Mountain, Yunnan

YANG Tao^{1,2,3}, ZHOU Hui^{1,2,5}, ZHANG Yu-Guang¹, GAO Bi-Da⁴, LI Di-Qiang^{1,*}

1 Institute of Forestry Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China

2 College of Chemistry and Bioengineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410076, China

3 College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

4 College of Biosafety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

5 College of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(4): 1971 ~ 1979.

Abstract: In order to understand the diversity of culturable cellulose-decomposing fungi (CCDF), ten surface (0–20 cm) soil samples collected at the altitude ranging from 960 m to 2900 m, in Gaoligongshan Mountain, where are the key areas for biodiversity protection in the world, were studied. Cellulose-decomposing aerobic fungal isolates were obtained using both Carboxymethyl cellulose-congo red (CMC-CR) plates and potato dextrose agar (PDA) plates from the soils. Polysaccharide hydrolase (Endoglucanase) activities of the isolates were determined by liquid fermentation. The plate counting results showed that the numbers of the cellulose-decomposing fungi ($1.1 \times 10^3 - 1.4 \times 10^4$ CFU/g) from lower altitude soils were higher than those from higher altitude soils. The correlation analysis showed that the correlation is varied among culturable cellulose-decomposing fungi and the ecological factors. The quantity and diversity of culturable cellulose-decomposing fungi in these soils are significantly correlated with organic matter, total nitrogen and water content. In addition, the quantity of them are significantly correlated with temperature and altitude. Different plant community and human disturbance have

基金项目: 国家科技部科技基础条件平台建设资助项目 (2005DKA21404); 中央公益型科研院所基本科研业务费专项资金资助项目 (CAFRIF200713)

收稿日期: 2007-12-27; 修订日期: 2009-02-12

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: lidq@caf.ac.cn

effected on the quantities and diversity of CCDF. A total of thirty five independent isolates belonging to 15 fungal genera were identified by both morphological characteristics and rDNA ITS sequencing analyses. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Stachybotrys*, and *Chaetomium* were the four dominant genera, to which the isolates belong. These results will be important to the further studies of diversity, genetics of cellulose-decomposing fungi in Gaoligongshan Mountain areas.

Key Words: Gaoligongshan Mountain; soil; diversity; cellulose-decomposing fungi

纤维素类物质是组成植物细胞壁的主要成分,纤维素类物质的降解在碳素循环中占有重要位置^[1]。在自然界,纤维素类物质在多种微生物的共同作用下被分解进入地球的碳素循环,有一部分细菌、放线菌和真菌能诱导产生纤维素酶,进行纤维素类物质的分解,真菌是其中酶系最全的纤维素降解菌^[2]。高黎贡山位于滇西北中缅边境的横断山区,具有高山、亚高山生物气候垂直带谱自然景观和异常丰富的生物多样性,是中国生物多样性保护具有全球意义的关键区域,被喻为“世界物种基因库”。在这个具有如此丰富生物多样性的宝库中,土壤中纤维素类降解菌种资源一直尚待挖掘。本研究旨在利用平板稀释培养法和 rDNA ITS 序列分析手段,对高黎贡山不同海拔梯度植被类型土壤中降解纤维素真菌数量、多样性及系统发育进行研究,揭示该地区降解纤维素真菌群落组成及产酶能力,期待获得一些新的菌株和基因。

1 材料与方法

1.1 研究地概况与采样

研究地点(98°42'24"~98°49'42"E,25°16'08"~25°17'57"N)位于云南省高黎贡山国家级自然保护区。综合考虑海拔高度、植被类型、土壤类型等因素的多样性,依次选取 5 个海拔梯度,在每个海拔梯度选取 2 个样地,共计 10 个样地进行取样。海拔范围 960~2878m,样地大小为 20m×20m,样地位置、海拔、植被类型等情况见表 1。每一处理标准地 3 块作为 3 次重复,在各标准地中以“S”形布点采取 0~20cm 混合土样。将取好的土壤样品迅速装入灭菌封口聚乙烯袋置于冰块上运至实验室,同时测量地温。土壤运至实验室后立刻进行土壤微生物数量测定。取样时间为 2006 年 11 月初。

1.2 培养基与主要试剂和仪器

羧甲基纤维素(CMC)刚果红初筛培养基^[3],液体产酶鉴定培养基^[4],马铃薯固体培养基(PDA)。PCR 扩增仪为美国 ABI 公司 GeneAmp PCR System 9700, *Taq* DNA Polymerase 等扩增所用试剂均为 Promega 产品。

1.3 菌种分离、纯化和酶活力测定

称取土壤样品制成浓度梯度悬浊液,均匀涂布于刚果红平板初筛培养基上。28℃ 恒温倒置培养 5~7d,计数平板上的菌落数。挑取菌落接种到 PDA 培养基并通过反复划线接种并培养单菌落来获得纯菌。用 Leica6000B 显微镜观察其菌丝结构和孢子形态^[5]。接种纯菌于液体产酶鉴定培养基,28℃ 200 r/min 振荡培养 96h 测定培养液中的 CMC 酶活(内切葡聚糖酶活)^[15]。

1.4 ITS 序列扩增及分析

(1)PCR 扩增真菌 ITS 部分序列并测序 根据文献^[6]提取真菌基因组 DNA,PCR 扩增 ITS 部分序列扩增。引物 ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',EF3R:5'-CAAACCTTGGTCATTAGAGGA-3'。PCR 扩增反应体系为 50μL,含有 10×缓冲液(Mg²⁺ 20 mM),dNTPs 0.2 mmol/L,引物 1μmol/L, *Taq* 酶 5 U,模板约 50 ng。95℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 45 s,53℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,进行 35 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。扩增产物(约 600bp)经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,DNA 胶回收试剂盒纯化目的片段,对回收产物进行双向测序,测序由上海生物工程技术服务有限公司完成。

(2)ITS 部分序列分析 将测定得到的 ITS 部分序列用 DNAsp 4.0 version 确定单倍型数目,并与 GenBank 数据库中的核苷酸序列进行 BLAST 分析,从中获取相近的 ITS 序列,用 MEGA 3.0 version 中的 Kimura-2 计算核苷酸差异值,并用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树,自展数(bootstrap)为 1000。

表 1 样地基本情况

Table 1 The basic information of study sites

样地编号 Site No.	地理位置 Geographic location	植被亚型 Vegetation subtype	主要植物种类 Main plant species	海拔(m) Altitude	土壤类型 Soil type
1	98°49'42" 25°16'08"	干热河谷稀疏灌丛	柯子,余甘子	960	褐红壤
2	98°49'17" 25°16'32"	干热河谷稀疏灌丛	青冈,柯子,余甘子	1182	褐红壤
3	98°48'25" 25°17'26"	玉米地	玉米	1374	褐红壤
4	98°48'05" 25°17'18"	咖啡纯林	咖啡	1381	褐红壤
5	98°47'39" 25°17'57"	半湿润常绿阔叶林	圆叶米饭花, 佹山栲, 小叶青冈	1987	褐棕壤
6	98°47'14" 25°17'49"	中山湿性常绿阔叶林	佹山栲, 栓皮栎, 红木荷	2021	黄褐壤
7	98°45'24" 25°18'03"	中山湿性常绿阔叶林	白穗石栎林、华南石栎, 云南金叶子	2486	棕壤
8	98°42'24" 25°17'16"	中山湿性常绿阔叶林	栓皮栎, 高山栲	2511	黄棕壤
9	98°43'45" 25°17'35"	中山混性常绿阔叶林	白穗石栎林, 高山栲	2860	黄棕壤
10	98°44'35" 25°17'26"	温凉性针阔混交林	云南铁杉、滇藏钓樟, 多脉茵芋	2878	灰棕壤

干热河谷稀疏灌丛 dry-hot valley sparse scrub; 玉米农地 maize field; 咖啡地 coffea forest; 半湿润常绿阔叶林 semihumid evergreen broad-leaved forest; 中山湿性常绿阔叶林 mid-montane humid evergreen broad-leaved forest; 中山混性常绿阔叶林 mid-montane mixed evergreen broad-leaved forest; 温凉性针阔混交林 cool-temperate coniferous and broad-leaf forest; 柯子 *Terminalia chebula*; 余甘子 *Phyllanthus emblica*; 青冈 *C. glauca*; 咖啡 *Coffea*; 玉米 *zea mays*; 圆叶米饭花 *Lyonia ovalifolia*; 佹山栲 *Castanopsis ceratocantha*; 小叶青冈 *Cyclobalanopsis myrsinaefolia*; 栓皮栎 *Quercus variabilis*; 红木荷 *Schima wallichii*; 白穗石栎 *Lithocarpus leucostachyus*; 华南石栎 *L. fenestratus*; 云南金叶子 *Craibiodendron yunnanensis*; 高山栲 *C. delavayi*; 多脉茵芋 *Skimmia inulinervia*; 云南铁杉 *Tsuga dumosa*; 滇藏钓樟 *Lindera obtusiloba*; 褐红壤 drab-red soil; 褐棕壤 drab-brown soils; 棕壤 brown soil; 黄褐壤 yellow-drab soil; 黄棕壤 yellow-brown soil; 灰棕壤 grey-brown soil

1.5 多样性分析与相关性分析

根据筛选得到的菌株在样地中的分布,用 Biodiversity Professional (version 2) 软件计算 Shannon-Weaver index (H') 多样性指数,应用 Jaccard 距离计算方法对 10 个样地进行聚类分析。用 SPSS (version 13.0) 进行显著性检验及相关性分析。

2 结果与分析

2.1 样品基本特性

样地的地温、土壤 pH 值、含水量、N、P、K 及有机质见表 2。地温依海拔升高而降低,垂直递减为 $0.62^{\circ}\text{C}/100\text{m}$ 。土壤 pH 值 $4.64 \sim 7.62$,低海拔土壤中偏碱性,高海拔偏酸性。土壤含水量 $14.8\% \sim 47.5\%$,低海拔较高海拔干燥。土壤中总氮含量为 $1.02 \sim 9.02 \text{ g/kg}$,总氮量最高值出现在海拔 2000m 的原始森林,高海拔地区总氮量高于低海拔地区。土壤全磷含量分别为 $0.51 \sim 1.74 \text{ g/kg}$,农地全磷含量最高,海拔 2000m 的原始森林次之,高海拔的原始森林样地 15 全磷含量最低;土壤全钾含量 $3.19 \sim 21.80 \text{ g/kg}$,海拔 2000m 以下的样地除样地 9 外,全钾含量较高,尽管样地 9 全钾含量很低但其速效钾含量却最高,土壤有机质含量为 $16.07 \sim 212.10 \text{ g/kg}$,高海拔原始森林土壤有机质含量明显高于低海拔的农地、咖啡林和灌丛。高黎贡山土壤全氮、全磷、全钾、有机质在多样地差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 可培养降解纤维素真菌的筛选和分离

利用 CMC 刚果红平板对 10 个样地表层土壤中的好氧性降解纤维素真菌进行培养并计数(表 2),结果发现不同海拔样地中降解纤维素真菌数差异显著 ($P < 0.01$),范围从 $1.1 \times 10^3 \sim 1.4 \times 10^4 \text{ CFU/g}$ 干土。中、低海拔地区可培养的纤维素类真菌数略高于高海拔地区。将可培养降解纤维素真菌数与土壤环境因子进行相关性分析(表 3),发现其与样地海拔高度、土壤含水量、土壤温度、有机质及全氮显著相关 ($P < 0.05$),与土壤

pH 值相关性较大 ($R=0.547$), 与土壤全磷 ($R=0.030$)、全钾 ($R=0.321$) 含量相关性较小。

表 2 样地特性及降解纤维素真菌数量

Table 2 Characteristics of soil samples and quantities of the cellulose-decomposing fungi

样地号 Site No.	含水量 (%) Water content	pH 值 pH value	地温 (°C) Ground temp.	有机质 (g/kg) Organic matter	全氮 (g/kg) Total N	全磷 (g/kg) Total P	全钾 (g/kg) Total K	降解纤维素真菌数 (CFU/g) cellulose-decomposing fungi
1	14.8	7.62	22.45	16.07	1.02	0.96	10.10	1.0×10^4
2	22.4	7.06	20.7	18.33	1.20	0.78	4.92	1.4×10^4
3	21.1	5.03	18.95	36.56	2.11	1.74	21.51	5.9×10^3
4	22.7	4.86	18.73	32.07	2.02	0.97	21.80	1.1×10^4
5	31.0	5.31	16.55	74.31	4.17	0.99	12.63	7.9×10^3
6	34.3	4.86	16.75	312.10	9.02	1.34	5.67	5.5×10^3
7	46.8	4.73	12.73	123.54	6.81	0.56	3.19	1.1×10^3
8	42.2	4.97	12.81	83.81	5.87	0.98	5.34	9.3×10^3
9	47.5	4.64	10.75	192.69	8.04	1.00	5.05	1.7×10^3
10	34.3	5.11	10.48	74.20	2.51	0.51	5.79	1.6×10^3

表 3 高黎贡山降解纤维素真菌数及其多样性与环境因子的相关系数

Table 3 Correlation coefficient of the number and diversity (H') of cellulose-decomposing fungi (CDF) and the environmental factors

项目 Item	海拔 Altitude	含水量 Water content	pH 值 pH value	地温 Ground temp.	有机质 Organic matter	全氮 Total N	全磷 Total P	全钾 Total K	CDF	H'
CDF	-0.721 *	-0.663 *	0.547	0.770 **	-0.697 *	-0.697 *	0.030	0.321	1	-0.219
H'	0.389	0.695 *	-0.540	-0.328	0.784 **	0.784 **	0.267	-0.584	-0.219	1

CMC 刚果红平板上的菌落颜色多样, 主要有白色, 黑色, 绿色, 棕色等。10 个样地根据形态特征共挑取 342 个菌落进行纯化培养, 记录各纯菌的生长特性并在显微镜下观察其形态, 结合液体发酵结果, 对这些菌落进行筛选, 共得到 104 株液体发酵能产酶的降解纤维素真菌, 这说明有大部分真菌能降解纤维素进行生长但并不产酶。通过对这些菌株进行 ITS 序列分析, 共得到 35 条差异序列。结合形态特征, 鉴定这 104 株菌共有 35 种菌, 说明部分菌株属于相同种。其中部分菌株为多个样地所共有, 个别菌株为单个样地所特有。

液体产酶发酵结果显示, 发酵 96h 时发酵液中 CMC 酶活力 (表 4): 35 株菌 CMC 酶活力范围 79.6 IU (菌株 6) ~ 228.9 IU (菌株 3), 各菌株差异非常大。部分菌株酶活力相当低, 如菌株 6 (79.6 IU), 菌株 33 (88.5 IU), 菌株 29 (96.5 IU), 也有相当一部分菌株表现出了良好的酶活力, 其中以菌株 3 酶活力最高 (228.9 IU)。筛选得到的这 35 株菌在 PDA 培养基 (90mm 平皿) 上生长速度 (表 4) 差异很大, 平均为 0.15 mm/h (菌株 1) ~ 0.95 mm/h (菌株 33)。部分菌株生长极为缓慢, 如菌株 1, 而一些菌株生长极为迅速, 特别是菌株 33 仅 4d 就能长满整个平皿。菌株的生长速度与产酶能力无相关性, 产酶能力强的菌株有可能生长速度缓慢, 而生长迅速的菌株可能产酶量很低, 如菌株 10 酶活力达 207.1 IU, 而生长速度仅为 0.26 mm/h; 菌株 33 生长速度达 0.95 mm/h, 而酶活力仅为 88.5 IU; 菌株 3 不仅产酶活力最高而且生长良好 (0.65 mm/h)。

2.3 系统发育分析

刮取少量纯菌落的菌丝, 从中提取真菌基因组 DNA, PCR 扩增 ITS 序列, 得到片段大小约为 600bp 的目的产物 (图 1)。对 PCR 产物回收测序, 共得到 35 条有效序列 (GenBank accession No. EU301633-663, EF577235-238)。经 ITS 序列相似性分析发现 (表 4), 从 10 个样地共分离到 15 个属的降解纤维素真菌。分别与 NCBI 数据库中已知序

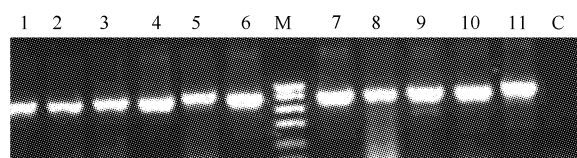


图 1 ITS 序列 PCR 产物

Fig. 1 The PCR products of ITS gene

M 为分子量标记 Marker I, C 为空白对照, 1 ~ 11 为不同真菌 DNA 的 ITS 扩增产物 M represented molecular weight Marker I, C was the control, 1 ~ 11 were the products of PCR

列进行比对,表 4 为与这些菌株最匹配菌株的信息,与最匹配序列相似性为 97% ~ 100%。其中曲霉 (*Aspergillus*)、青霉 (*Penicillium*)、葡萄状穗霉 (*Stachybotrys*) 在多样地中分布最广,为高黎贡山土壤中降解纤维素真菌的优势菌群。

表 4 分离菌株 rDNA ITS 序列相似性分析

Table 4 Phylogenetic affiliations of fungal isolates from the soil of Gaoligongshan Mountain

菌种 Isolate ID	分类 Taxon	登录号 Accession number	最相似菌株 Closest identified relative	相似度 Identify(%)	分离数 Frequency isolated	酶活力 Enzyme activity(IU)	生长速度 Growth speed (mm/h)
1	<i>Penicillium</i>	EU301662	Uncultured fungus(DQ178937)	98	6	128.3	0.15
2	<i>Ceriporia</i>	EU301634	<i>Ceriporia lacerata</i> (DQ912694)	100	2	105.7	0.17
3	<i>Penicillium</i>	EU301633	<i>Penicillium expansum</i> (DQ267827)	99	9	228.9	0.65
4	<i>Aspergillus</i>	EU301635	<i>Aspergillus sydowii</i> (AY373868.1)	100	5	152.7	0.18
5	<i>Penicillium</i>	EU301636	Uncultured soil(DQ421263)	97	5	158.8	0.22
6	<i>Myrothecium</i>	EU301637	<i>Myrothecium roridum</i> (AJ301994)	99	2	79.6	0.23
7	<i>Aspergillus</i>	EU301638	<i>Aspergillus oryzae</i> (AP007173)	99	2	125.1	0.24
8	<i>Chaetomium</i>	EU301639	<i>Chaetomium globosum</i> (DQ234257)	99	1	129.6	0.26
9	<i>Chaetomium</i>	EU301663	<i>Chaetomium</i> sp. (AJ279466)	98	3	154.2	0.26
10	<i>Doratomyces</i>	EU301640	<i>Doratomyces stemonitis</i> (EF029213)	99	2	207.1	0.26
11	<i>Penicillium</i>	EU301641	<i>Penicillium chrysogenum</i> (DQ249212)	99	4	138.2	0.27
12	<i>Stachybotrys</i>	EU301642	<i>Stachybotrys echinata</i> (AF081470)	99	2	175.3	0.34
13	<i>Irpex</i>	EU301643	Basidiomycete from a bamboo(U65607)	99	1	217.2	0.35
14	<i>Emericella</i>	EU301644	<i>Emericella rugulosa</i> (AB249002)	100	2	225.5	0.36
15	<i>Stachybotrys</i>	EU301645	<i>Stachybotrys echinata</i> (AF205450)	100	1	186.4	0.39
16	<i>Fusarium</i>	EU301646	<i>Fusarium proliferatum</i> (EF577235)	99	3	152.6	0.40
17	<i>Emericella</i>	EU301647	<i>Emericella rugulosa</i> (AB249002)	99	4	217.2	0.43
18	<i>Stachybotrys</i>	EU301648	<i>Stachybotrys echinata</i> (AF205448)	99	1	165.1	0.44
19	<i>Cordyceps</i>	EU301649	<i>Cordyceps memorabilis</i> (AJ488276)	100	2	176.8	0.45
20	<i>Ceriporia</i>	EU301650	<i>Ceriporia lacerata</i> (DQ912694)	100	3	201.1	0.47
21	<i>Stachybotrys</i>	EU301651	<i>Stachybotrys chartarum</i> (AF081469)	100	2	172.7	0.55
22	<i>Stachybotrys</i>	EU301652	<i>Stachybotrys chartarum</i> (AF081469)	99	1	152.6	0.56
23	<i>Stachybotrys</i>	EU301653	<i>Stachybotrys echinata</i> (AF205450)	99	3	139.7	0.58
24	<i>Stachybotrys</i>	EU301654	<i>Stachybotrys echinata</i> (AF205450)	99	2	146.7	0.64
25	<i>Stachybotrys</i>	EU301655	<i>Stachybotrys chartarum</i> (AF081469)	99	2	165.1	0.68
26	<i>Stachybotrys</i>	EU301656	<i>Stachybotrys chartarum</i> (AF081469)	100	1	146.7	0.68
27	<i>Stachybotrys</i>	EU301657	<i>Stachybotrys chartarum</i> (AF081468)	99	4	217.2	0.69
28	<i>Emericella</i>	EU301658	<i>Emericella rugulosa</i> (AB249002)	100	2	152.6	0.76
29	<i>Coprinus</i>	EU301659	<i>Coprinus radians</i> (AF345822)	99	2	96.5	0.77
30	<i>Aspergillus</i>	EU301660	<i>Aspergillus niger</i> (NW 001594105)	100	7	158.8	0.77
31	<i>Fusarium</i>	EF577235	<i>Gibberella moniliformis</i> (AY533376)	99	6	132.2	0.78
32	<i>Cladosporium</i>	EF577236	<i>Cladosporium</i> sp. (AJ971409)	99	2	198.7	0.79
33	<i>Acremonium</i>	EF577237	<i>Cephalosporium lanoso-niveum</i> (AJ292396)	98	2	88.5	0.95
34	<i>Acremonium</i>	EF577238	<i>Fungal</i> (AJ608962)	99	3	133.4	0.94
35	<i>Aspergillus</i>	EU301661	<i>Aspergillus oryzae</i> (AP007173)	99	5	158.7	0.94

ITS 序列的系统发育分析结果(图 2)表明,所得的 35 条有效序列聚为两大簇,其中一簇为 31 株菌(簇 A),另一簇有 4 株菌(簇 B)。

簇 A 由两个簇组成,其中一簇为 12 株菌,它们分属于青霉属 (*Penicillium*),曲霉属 (*Aspergillus*),裸孢壳属 (*Emericella*) 和枝孢属 (*Cladosporium*) 4 个属:其中青霉属的 4 株菌分别与 4 种不同青霉菌株聚在一起,相似性

为 97% ~ 99%。青霉属菌株 3 的 CMC 酶活最高,它与扩展青霉(*P. expansum*, DQ267827)相似性为 99%。曲霉属的 4 株菌分别与 3 种曲霉菌聚在一起,其中菌株 7 和菌株 35 与米曲霉(*A. oryzae*)的相似性均为 99%,菌株 30 与黑曲霉(*A. niger*, NW001594105)、菌株 4 与聚多曲霉(*A. sydowii*, AY373868)的相似性均为 100%。裸孢壳属的 3 株菌(菌株 14、17、28)与 *E. dentate* (AB248999) 和 *E. rugulosa* (AB249002) 的相似性为 99%。枝孢属仅分离到一种菌,其与枝孢属菌株(AJ971409)最高相似性为 99%。另一簇有 19 株菌,其中有 10 株(菌株 12、15、18、21、22、23、24、25、26、27)为葡萄状穗霉属(*Stachybotrys*),它们与多株 *S. chartarum* 和 *S. echinata* 相似性为 99% ~ 100%,另外 9 株菌分别与 7 个属的菌株亲缘关系相近,相似性为 98% ~ 100%。其中菌株 34 与一株来自埋在地下的聚氯乙烯垃圾中分离出的真菌(AJ608962)相似性最高(99%),与植物根内寄生真菌墙粘鞭霉(*Gliomastix murorum*, EF495243)相似性为 97%。菌株 31 和菌株 16 与串珠赤霉(*Gibberella moniliformis*, AY533376)相似性为 99%,串珠赤霉的无性阶段为串珠镰孢(*Fusarium verticillioide*),它是在全球范围内广泛分布于自然环境中的重要产毒真菌,主要污染谷物,产生多种真菌毒素。菌株 6 与一种露湿漆斑菌(*Myrothecium roridum*, AJ301994)有 99% 相似性。菌株 8 和 9 与毛壳霉(*Chaetomium*)的两菌株(AJ279466 和 DQ682568)有较高相似性。

簇 B 的 4 株菌都属于伞菌纲(Agaricomycetes),其中菌株 13 与一株从竹子中分离来的担子菌(U65607)和白囊耙齿菌(*Irpex lacteus*, AB079265)的相似性均为 99%,白囊耙齿菌是木材腐朽真菌的一种。而菌株 2 和菌株 20 与另一种木腐菌裂片蜡质菌(*Ceriporia lacerate*, DQ912694)相似性分别为 100% 和 99%。菌株 29 与辐毛鬼伞(*Coprinus radians*, AF345822)相似性为 99%。

2.4 多样性分析与聚类分析

通过多样性指数 H' 表征样地内降解纤维素真菌多样性,通过 Jaccard 距离聚类法表征样地间降解纤维素真菌多样性。根据筛选得到的 104 株菌(35 种菌)在样地间的分布计算各样地的 H' 值(表 5)。原始森林样地除样地 10 外,样地 6、7、8、9 的多样性指数均较高,低海拔样地 1、3 和 4 则较低。多样性指数与环境因子的相关性分析表明(表 3):降解纤维素真菌多样性与土壤含水量、有机质和全氮相关性均达显著水平($P < 0.01$),与土壤 pH 值($R = -0.540$)和全钾($R = -0.584$)相关性较大,与土壤全磷($R = 0.267$)和 CDF 菌数量($R =$

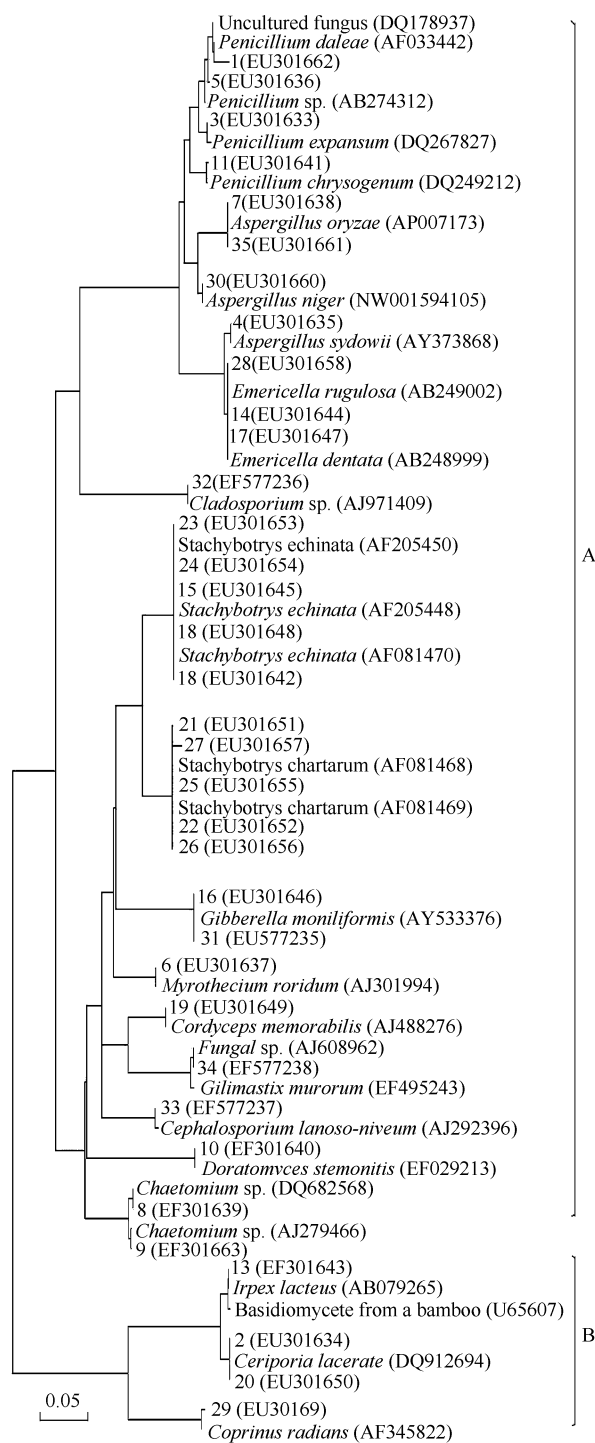


图2 Neighbor-joining 法构建的降解纤维素真菌系统发育树

Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree based on rDNA-ITS sequences of cultured cellulose-decomposing fungi from Gaoligongshan mountain

-0.219)相关性较小。Jaccard 距离聚类结果(图 3)表明:降解纤维素真菌在样地间的分布基本遵循地理距离和植物群落而分布。相临或相同海拔的样地间的菌株相似性较高,容易聚在一起;植被类型相近的样地聚在一起。

表 5 10 个样地的降解纤维素真菌分离株数及多样性

Table 5 The isolated strains and the diversity within ten sampling sites

菌种 Isolate ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1					2	1	3			
2					1			1		
3				1	1	3	1	1	1	1
4	2	1	2		1					
5			1	1	1	1		1		
6		1	1							
7			1		1					
8						1				
9				2	1					
10		1		1						
11	1		1		1	1				
12	1	1								
13					1					
14							1		1	
15							1			
16									1	2
17								1	1	2
18										1
19				1					1	
20							1	1	1	
21									1	
22									1	
23					1		1		1	
24									1	
25							1	1		
26								1		
27						2		2		
28								1		1
29							1	1		
30						1				
31	1	2		1			1			1
32		1				1				
33	1	1								
34	1	1					1			
35					2	3				
总分离数 *	7	9	6	7	13	14	12	11	10	8
H'	0.76	0.89	0.68	0.76	0.90	1.02	0.96	0.99	1.00	0.75

* 总分离数 Totall isolates; H' :Shannon-Weaver diveristy index

3 讨论

本研究采用分离培养方法对高黎贡山垂直海拔梯度的 10 个样地土壤中降解纤维素真菌多样性进行了初步研究。在对纤维素类真菌数量进行研究时发现不同海拔、不同植被类型的样地中降解纤维素真菌数有明显差异,中、低海拔地区土壤中可培养的纤维素降解类真菌数略高于高海拔地区,灌丛和纯林土壤中的可培养的

降解纤维素真菌数高于农地和森林土壤。与环境因子相关性分析表明降解纤维素真菌数与样地海拔高度、土壤含水量、有机质及全氮含量显著负相关 ($P < 0.01$), 与土壤温度显著正相关 ($P < 0.01$)。这可能是由于(1)低海拔样地气候温暖干燥, 适合真菌的繁殖;(2)纯林植被枯落物单一、腐殖少可能促进了某些好气性降解纤维素真菌类群的繁殖。张萍等^[7]在 1999 年研究高黎贡山微生物数量与生态分布时也发现, 不同海拔, 不同林型微生物的数量和生态分布不同。

样地土壤降解纤维素真菌数量多并不代表其酶活力高或物种多样性高。对筛选得到的高酶活菌株多样性研究表明, 植被类型相近的样地聚在一起, 多数森林样地中的纤维素类物质降解菌的多样性要高于农地或灌丛。

这可能跟植物群落的复杂程度有关, 森林样地植被类型多样化造成了纤维素类物质种类和结构的多样性, 由于纤维素酶是一个复合酶系, 需要酶系中多组成成分共同作用也能将纤维素类物质降解为终产物的, 而且酶对底物高度特异性, 这就需要多种菌的多种酶的协同作用。Kubartová 等^[8]在研究不同森林植被下纤维素类降解微生物多样性时发现, 优势植物种类的变化对降解菌群中微生物种类没有显著影响, 但菌群组成会有明显不同, 而温度和湿度变化对真菌群落影响显著。

在纤维素降解菌筛选方法上, 李振红等^[3]发现以滤纸为碳源时, 其上可生长的微生物种类繁多, 细菌、真菌、放线菌均有所生长, 而以 CMC 为碳源时, 生长的微生物较少, 且绝大部分是真菌类。本研究发现单纯用 CMC 平板不利于真菌计数, 利用 CMC 为唯一碳源制成的 CMC 刚果红平板作为初筛方法, 不仅弥补了这一缺陷而且可以通过直接观察菌落在此平板上形成的透明圈大小对其 CMC 酶活力进行初步判断。

目前报道具有纤维素降解能力的真菌主要有以下一些菌: 曲霉 (*Aspergillus*)^[9~11]、青霉 (*Penicillium*)^[12]、葡萄状穗霉 (*Stachybotrys*)^[13,14]、毛壳霉 (*Chaetomium*)^[15,16]、木霉 (*Trichoderma*)^[17]、葡萄孢霉 (*Botrytis*)^[18]、白腐菌 (white rot fungi) 和褐腐菌 (brown-rot fungi)^[19,20] 等。本研究共分离到 15 个属 35 株真菌, 其中曲霉 (*Aspergillus*)、青霉 (*Penicillium*)、葡萄状穗霉 (*Stachybotrys*)、毛壳霉属 (*Chaetomium*) 的真菌共计 20 株, 占总分离菌株数的 57.1%, 它们是高黎贡山土壤中降解纤维素真菌的优势菌群。CMC 酶活力最高的是青霉属菌株 3, 它与一株具有高产葡萄糖苷酶活的扩展青霉 (*Penicillium expansum*, DQ267827) 相似性为 99%, 菌株 3 在酶系和对底物利用都有突出特点, 对其酶学性质及发酵条件等方面进行了深入的研究。

微生物分离培养方法与分子生物学技术相结合, 在环境微生物的鉴定中得到广泛使用^[21]。本研究采用传统微生物分离培养方法结合真菌 ITS 序列分析技术, 不仅在一定程度上揭示了高黎贡山可培养降解纤维素真菌的多样性, 丰富了降解纤维素真菌的种质资源, 所得 ITS 序列丰富了真菌基因鉴定数据库, 并且为基因芯片等新技术应用于降解纤维素菌多样性研究提供了数据基础。

References:

- [1] Nowak J, Nowak D, Chevallier P. Analysis of composite structure and primordial wood remains in petrified wood. *Appl Spectrosc*, 2007, 61 (8): 889—895.
- [2] Karboune S, Geraert P A, Kermasha S. Characterization of selected cellulolytic activities of multi-enzymatic complex system from *Penicillium funiculosum*. *J Agric Food Chem*, 2008, 56 (3): 903—909.
- [3] Li Z H, Lu Y T. Screening on the cellulose-decomposing microorganisms. *Environmental Pollution & Control*, 2003, 25(3): 133—135.
- [4] Yang T, Ma M H. Testing methods on the activity of biomass-degrading enzyme. *China Brewing*, 2006, 11: 67—69.
- [5] Wei J C. Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi. Shanghai: Shanghai Science & Technology Press, 1979.

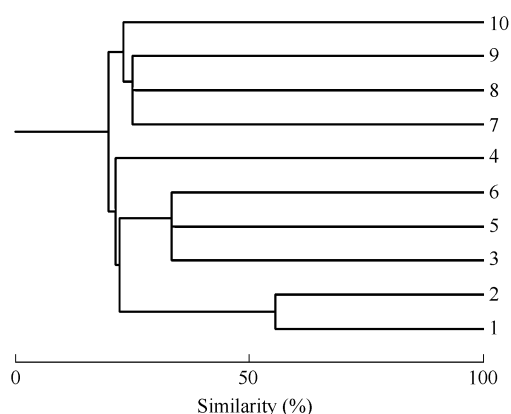


图 3 10 个样地基于 Jaccard 法的聚类图

Fig. 3 The dendrogram of ten sampling sites based on Jaccard method

- [6] Zhou X L, SHEN W, Rao Z M. A Rapid Method for Preparation of Fungal Chromosomal DNA. *Microbiology*, 2004, 31 (4) : 89 — 92.
- [7] Zhang P, Guo H J, Dao Z L. A study on quantity and diversity of soil microorganism in Gaoligong Mountains. *Chinese Biodiversity*, 1999, 7 (4) : 297 — 302.
- [8] Kubartov A, Moukouri J, B guiristain T. Microbial diversity during cellulose decomposition in different forest stands I. microbial communities and environmental conditions. *Microb Ecol.*, 2007, 54 (3) : 393 — 405.
- [9] Kim K H, Brown K M, Harris P V. A proteomics strategy to discover beta-glucosidases from *Aspergillus fumigatus* with two-dimensional page in-gel activity assay and tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2007, 6 (12) : 4749 — 4757.
- [10] Shah M, Nagee A, Kunjadia P. Identification of an anonymous RFLP DNA probe through multiple arbitrary amplicon profiling and its use for strain differentiation in a field isolate of cellulose-degrading *Aspergillus niger*. *Bioresour Technol*, 2006, 97 (18) : 2335 — 2339.
- [11] Puchart V, Vrsanska M, Svoboda P, Pohl J. Purification and characterization of two forms of endo-beta-1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1674 (3) : 239 — 250.
- [12] Karboune S, Geraert P A, Kermasha S. Characterization of selected cellulolytic activities of multi-enzymatic complex system from *Penicillium funiculosum*. *J Agric Food Chem*, 2008, 56 (3) : 903 — 909.
- [13] Saibi W, Amouri B, Gargouri A. Purification and biochemical characterization of a transglucosylating beta-glucosidase of *Stachybotrys* strain. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77 (2) : 293 — 300.
- [14] Saibi W, Amouri B, Gargouri A. Purification and biochemical characterization of a transglucosylating beta-glucosidase of *Stachybotrys* strain. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77 (2) : 293 — 300.
- [15] Li Y L, Li D C, Teng F C. Purification and characterization of a cellobiohydrolase from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilus* CT2. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2006, 46 (1) : 143 — 146.
- [16] Karapetyan K N, Fedorova T V, Vasil'chenko L G. Properties of neutral cellobiose dehydrogenase from the ascomycete *Chaetomium* sp. INBI 2-26 (-) and comparison with basidiomycetous cellobiose dehydrogenases. *J Biotechnol*, 2006, 121 (1) : 34 — 48.
- [17] Fujii K, Takeshi K. *Penicillium* strains as dominant degraders in soil for coffee residue, a biological waste unsuitable for fertilization. *J Appl Microbiol*, 2007, 103 (6) : 2713 — 2720.
- [18] White G J, Traquair J A. Necrotrophic mycoparasitism of *Botrytis cinerea* by cellulolytic and ligninocellulolytic Basidiomycetes. *Can J Microbiol*, 2006, 52 (6) : 508 — 518.
- [19] Yoon J J, Cha C J, Kim Y S. The brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* has the endo-glucanases capable of degrading microcrystalline cellulose. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, 17 (5) : 800 — 805.
- [20] Wang W, Gao P J. Study on lignocellulose degradation mechanism of brown-rot fungi. *Microbiology Bulletin*, 2002, 29 (3) : 90 — 93.
- [21] Ghosh A, Maity B, Chakrabarti K. Bacterial diversity of East Calcutta Wet land area: possible identification of potential bacterial population for different biotechnological uses. *Microb Ecol*, 2007, 54 (3) : 452 — 459.

参考文献:

- [3] 李振红, 陆贻通. 高效纤维素降解菌的筛选. *环境污染与防治*, 2003, 25 (3) : 133 ~ 135.
- [4] 杨涛, 马美湖. 生物质降解酶活性的测定方法. *中国酿造*, 2006, 11 : 67 ~ 69.
- [5] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科技出版社, 1979.
- [6] 周小玲, 沈微, 饶志明, 等. 一种快速提取真菌染色体 DNA 的方法. *微生物学通报*, 2004, 31 (4) : 89 ~ 92.
- [7] 张萍, 郭辉军. 高黎贡山土壤微生物的数量和多样性. *生物多样性*, 1999, 7 (4) : 297 ~ 302.
- [20] 王蔚, 高培基. 褐腐真菌木质纤维素降解机制的研究进展. *微生物学通报*, 2002, 29 (3) : 90 ~ 93.