

DOI: 10.5846/stxb201308292172

李月蛟, 朱利英, 尹华军, 刘庆, 蒋先敏, 赵春章. 连续三年夜间增温和施氮对云杉外生菌根及菌根真菌多样性的影响. 生态学报, 2015, 35(9): 2967-2977.

Li Y J, Zhu L Y, Yin H J, Liu Q, Jiang X M, Zhao C Z. Effects of 3-year continuous night-time warming and nitrogen fertilization on ectomycorrhizae of *Picea asperata* and the ectomycorrhizal fungal diversity. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(9): 2967-2977.

连续三年夜间增温和施氮对云杉外生菌根及菌根真菌多样性的影响

李月蛟^{1,2,3}, 朱利英^{1,3}, 尹华军¹, 刘庆¹, 蒋先敏⁴, 赵春章^{1,*}

1 中国科学院成都生物研究所, 中国科学院山地生态恢复与生物资源利用重点实验室, 生态恢复与生物多样性保育四川省重点实验室, 成都 610041

2 四川大学生命科学学院, 成都 610044

3 中国科学院大学, 北京 100049

4 四川省阿坝州川西林业局, 阿坝州 623102

摘要:以西南亚高山针叶林建群种粗枝云杉(*Picea asperata*)为研究对象,采用红外加热模拟增温结合外施氮肥(NH_4NO_3 25 g N $\text{m}^{-2} \text{a}^{-1}$)的方法,研究连续 3a 夜间增温和施肥对云杉幼苗外生菌根侵染率、土壤外生菌根真菌生物量及其群落多样性的影响。结果表明:夜间增温对云杉外生菌根侵染率的影响具有季节性及根级差异。夜间增温对春季(2011 年 5 月)云杉 1 级根,夏季(2011 年 7 月)和秋季(2010 年 10 月)云杉 2 级根侵染率影响显著。除 2011 年 7 月 1 级根外,施氮对云杉 1、2 级根侵染率无显著影响。夜间增温对土壤中外生菌根真菌的生物量和群落多样性无显著影响,施氮及增温与施氮联合处理使土壤中外生菌根真菌生物量显著降低,但却提高了外生菌根真菌群落的多样性。这说明云杉幼苗外生菌根侵染率对温度较敏感,土壤外生菌根真菌生物量及其群落多样性对施氮较敏感。这为进一步研究该区域亚高山针叶林地下过程对全球气候变化的响应机制提供了科学依据。

关键词:云杉; 外生菌根; 侵染率; 群落多样性

Effects of 3-year continuous night-time warming and nitrogen fertilization on ectomycorrhizae of *Picea asperata* and the ectomycorrhizal fungal diversity

LI Yuejiao^{1,2,3}, ZHU Liying^{1,3}, YIN Huajun¹, LIU Qing¹, JIANG Xianmin⁴, ZHAO Chunzhang^{1,*}

1 Key Laboratory of Mountain Ecological Restoration and Bioresource Utilization & Ecological Restoration Biodiversity Conservation Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Science, Chengdu 610041, China

2 College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610044, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

4 West Sichuan Forestry Bureau of Aba Tibetan and the Qiang People Autonomous Prefecture, Aba Prefecture, Sichuan 623102, China

Abstract: Global climate changes have become hot topics in ecological research filed in last decade. *Picea asperata*, the constructive species of the Southwest subalpine coniferous forest which is well known for its sensitivity to climate changes in China, is a typical ectomycorrhizal species. Ectomycorrhizal fungi play an important role in the forest system by enhancing the ability of host trees which form ectomycorrhizal symbionts with them to uptake nutrient and water, promoting seedling establishment and improving nutrient cycling in the forest by the mycorrhizal networks belowground. Many scientists have

基金项目:国家自然科学基金青年项目(31100446)

收稿日期:2013-08-29; 网络出版日期:2014-08-01

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhaozh04@126.com

already studied the effects of warming and nitrogen deposition on *Picea asperata*'s physiology and phenological phenomenon. But how ectomycorrhizal symbionts and ectomycorrhizal fungal community associated with *Picea asperata* respond to warming and nitrogen deposition in this area is lack of research. To simulate the effects of warming and nitrogen deposition, we conducted an experiment with the infrared radiator and NH_4NO_3 $25 \text{ g N m}^{-2} \text{ a}^{-1}$ fertilizing. And we evaluated the effects of 3-year continuous night-time warming and nitrogen fertilization on the ectomycorrhizal colonization rate of *Picea asperata* seedlings, soil ectomycorrhizal fungal biomass and the diversity of soil ectomycorrhizal fungal community. The experimental results clearly showed that the effects of night-time warming on the ectomycorrhizal colonization rate were varied seasonally in different root orders. In spring (May, 2011) night-time warming significantly affected the ectomycorrhizal colonization of first-order roots, however, in summer (July, 2011) and autumn (Oct, 2010) the ectomycorrhizal colonization rate of second-order roots were changed significantly. Nitrogen fertilization didn't dramatically affect the ectomycorrhizal colonization rate of first-order and second-order roots except for the colonization rate of first-order roots in July 2011. There were no significant effects of night-time warming on soil ectomycorrhizal fungal biomass and the diversity of ectomycorrhizal fungal community. But we found that nitrogen fertilization and the interaction of the two treatments affected them significantly: the soil ectomycorrhizal fungal biomass was decreased while the diversity of ectomycorrhizal fungal community was increased. These results indicated that the ectomycorrhizal colonization rate of *Picea asperata* seedlings was sensitive to warming, however, the soil ectomycorrhizal fungal biomass and the diversity of ectomycorrhizal fungal community was sensitive to nitrogen fertilization. The primary effect of night-time warming was to increase the ectomycorrhizal colonization rate, but there was negligible or insignificant effect on diversity of soil ectomycorrhizal fungal community. On the contrary, nitrogen fertilization directly and significantly affected the diversity of soil ectomycorrhizal fungal community rather than the ectomycorrhizal colonization rate of *Picea asperata* seedlings. The different response of different ectomycorrhizal fungus to the global climate change and long-term experiments simulated natural climate change will be considered in the following studies. The findings of our research provide the scientific basis for further studying the response mechanism of below-ground of southwest subalpine coniferous forest to global climate changes in this region.

Key Words: *Picea asperata*; ectomycorrhizal fungi; colonization rate; community diversity

菌根 (Mycorrhiza) 是植物根系与土壤中菌根真菌形成的互惠共生体, 大约 90% 陆地植物能形成菌根^[1], 宿主植物将约 20% 的净初级生产力传递给菌根共生体^[2]。菌根真菌作为土壤微生物的重要成员, 在生态系统中扮演重要的角色^[3]。它们增加了宿主植物对 N、P 等营养物质的吸收能力, 对病原菌的抵抗能力和对诸如重金属、干旱等恶劣环境的耐受能力^[4-6]; 同时作为生态系统中的分解者, 也在一定程度上促进了生态系统中 C、N、P 等养分循环^[7]。菌根真菌群落多样性对于维持植物多样性、生态系统的稳定及发展具有重要的作用^[8]。外生菌根 (Ectomycorrhizae, ECM) 是森林生态系统的重要组成部分, 温带森林中外生菌根真菌生物量约占土壤微生物总生物量的 30%^[9]。

外生菌根真菌是影响植物对全球变化响应的重要因素^[10]。随着全球气候变化的加剧, 外生菌根真菌对气候变化的响应成为了当下研究热点之一。目前, 对气候变化下菌根的研究主要集中在外生菌根共生体中的侵染状况及外生菌根真菌群落多样性等方面, 多采用增温、施氮、人为增加 CO_2 浓度等方式对自然界气候变化进行实验模拟^[2, 8, 11-12]。然而, 由于菌根共生体的复杂性、研究地点的特异性、研究手段的多样性和研究期限的不同等原因, 气候变暖、大气 N 沉降等气候变化对外生菌根及菌根真菌群落影响的研究结果并不一致^[13-17]。例如, Rillig 等人^[18]研究发现增温对总的外生菌根侵染率无显著影响; 而 Kasai 等^[19]研究却表明, 增温处理使白天平均气温超过 30°C 时, 外生菌根侵染率显著下降; 同时, Swaty 等^[20]研究证明温度更高的煤矿土壤中外生菌根侵染率更高。18a 温室增温研究结果发现北极优势灌丛物种矮桦 (*Betula nana*) 外生菌根真菌多样性增加^[13], 但开顶式气室 (Open-top chamber) 装置增温 5—7a 并没有使北极柳 (*Salix arctica*) 外生菌根

真菌群落的群落组成、丰富度、均匀度发生显著变化^[14]。此外,全球气候变暖引起的昼夜温度变化不同,夜间最低温增幅大于白天最高温增幅^[21-22],已有的昼夜增温的对比研究表明,夜间增温能提高根系的干质量和根冠比^[23],显著改变土壤中菌根真菌在土壤微生物群落中所占比例^[24]。但是,有关夜间增温对植物外生菌根侵染率及菌根真菌多样性产生的影响研究并不多见。有关氮沉降的模拟实验也因施用氮肥的浓度和时间的不同而对外生菌根产生不同的影响,例如,外生菌根侵染率不变^[1, 15]或显著降低^[25],外生菌根真菌物种数量不变^[18]或物种丰富度显著降低^[16]等。总之,气候变化对不同生态系统及不同植物物种外生菌根侵染率及菌根真菌群落多样性的影响研究尽管已有很多,但并没有得出较一致的结论,而未来很多区域气候变暖必将伴随着严重氮沉降,二者联合作用对外生菌根的影响则会更加复杂,很难从已有的单独增温或单独施氮的研究结果中推测出来。

西南亚高山针叶林,主要分布于对全球气候变化十分敏感的青藏高原东南部的川西、滇西北和藏东南一带^[26],是我国长江上游的重要“生态屏障(Ecological barrier)”,对水土保持、水源涵养起着巨大的作用^[27-28]。云杉(*Picea asperata*)作为川西亚高山针叶林优势树种^[29],是典型的外生菌根共生森林树种^[30]。云杉的生长、发育和对气候变化的响应与其共生的外生菌根真菌密切相关。研究对气候变化敏感的川西亚高山针叶林中外生菌根侵染率及菌根真菌多样性对气候变暖、氮沉降的响应具有十分重要的意义。本研究基于前期所作研究^[4, 31-33]通过红外线辐射加热器(infrared radiators)夜间增温和人工施氮的方法模拟气候变暖和氮沉降,研究夜间增温、施氮及两者的联合效应对云杉外生菌根侵染率及土壤中外生菌根真菌多样性的影响,旨在为进一步研究全球变化背景下外生菌根真菌对川西亚高山森林中植物群落的发展和演替提供基础资料,以预测全球变化背景下云杉的进化和适应及亚高山森林生态系统的响应,对亚高山森林生态系统可持续发展具有重要价值。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

研究区域位于四川省阿坝州中国科学院成都生物研究所茂县山地生态系统定位研究站,海拔 1820 m,地理位置为 31°41'N, 103°53'E,地处青藏高原东缘和横断山系北段岷江上游地区生态环境十分脆弱的高山峡谷地带。属暖温带亚高山季风气候,冬季寒冷干燥、夏季湿润多雨。年平均温度 8.9℃,年积温 2690.8℃,年降雨量 919.5 mm,年蒸发量 795.8 mm,年均日照时数为 1139.8 h^[32-34]。该区土壤 pH 5.8—6.0,主要是淋溶褐土和棕壤土(0—30 cm)。地形相对高差最高达 3000 m 以上,植被主要为人工林和次生灌丛,海拔从低到高依次为耐旱次生灌丛、针阔混交林和次生灌丛、亚高山针叶林和残留的常绿阔叶灌丛、高山灌丛草甸。

1.2 试验材料与设计

供试植物为株高、基径和生长状况一致的 4 年生云杉幼苗,由米亚罗 301 林场苗圃提供,并于 2008 年 3 月移栽入试验样地。供试土壤为茂县生态站附近的针叶林表层土,过筛混匀后用客土法替换试验样地上层 50 cm 原位土壤。供试土壤基本理化性质为 pH 5.55;全氮 4.54 g/kg;有机碳 78.04 g/kg;C/N 17.19;容重 0.89 g/cm³^[31, 33]。

试验采用裂区设计^[35],在增温中嵌套施氮处理。设 5 对 2 m×2 m 的试验小区。每对小区中,一个为增温小区,另一个为对照小区。再将每个小区分为 2 个 1 m×2 m 的副区,一个进行施肥,另一个为对照。增温小区中于采用 165 cm×15 cm 的红外线辐射加热器(Kalglo Electronics Inc., Bethlehem, PA, USA)悬挂于距地面 1.5 m 处,从当日 19:00 到次日 07:00 进行夜间 12 h 连续增温。为模拟红外线辐射加热器的遮阴影响,在对照小区中采用与红外线辐射加热器同等大小的虚拟加热器悬挂于距地面 1.5 m 处。施氮处理则根据已有的相似研究^[4, 13-14],每周用手提式喷壶向每个施氮副区土壤表面均匀喷洒 10L 溶解有 2.8 g NH₄NO₃的溶液(即 25 g N m⁻² a⁻¹)。同时,对照副区内喷施等量的水。为了避免氮肥污染,施氮副区与对照副区间用隔水塑料挡板和砖墙间隔。增温和施氮试验始于 2008 年 3 月,具体参照陈智等^[32, 34]。试验设计 4 个处理,1) W0N0:不

增温+不施氮;2) W0N1: 不增温+施氮;3) W1N0: 增温+不施氮;4) W1N1: 增温+施氮。试验中,以保持各处理小区内条件基本一致,定期清除样地内新生杂草,并不定期的对增温小区进行水分供给。

实验通过温度自动监测装置对各小区内 2010 年 9 月—2011 年 8 月地面 20cm 处空气温度、空气湿度及 5 cm 深土壤温度进行监测,具体实验方法参照前期研究^[4, 32-34];2008 年 5 月—12 月表层 0—10cm 土壤含水量数据的获得参见 Zhao 等^[4, 33]。增温条件下地面 20cm 处平均气温和 5cm 深土壤平均温度比对照提高了 2.13℃ 和 2.61℃,增温小区内空气相对湿度比对照小区显著($P<0.01$)降低了 13.36%,增温对土壤含水量无显著影响(图 1)。

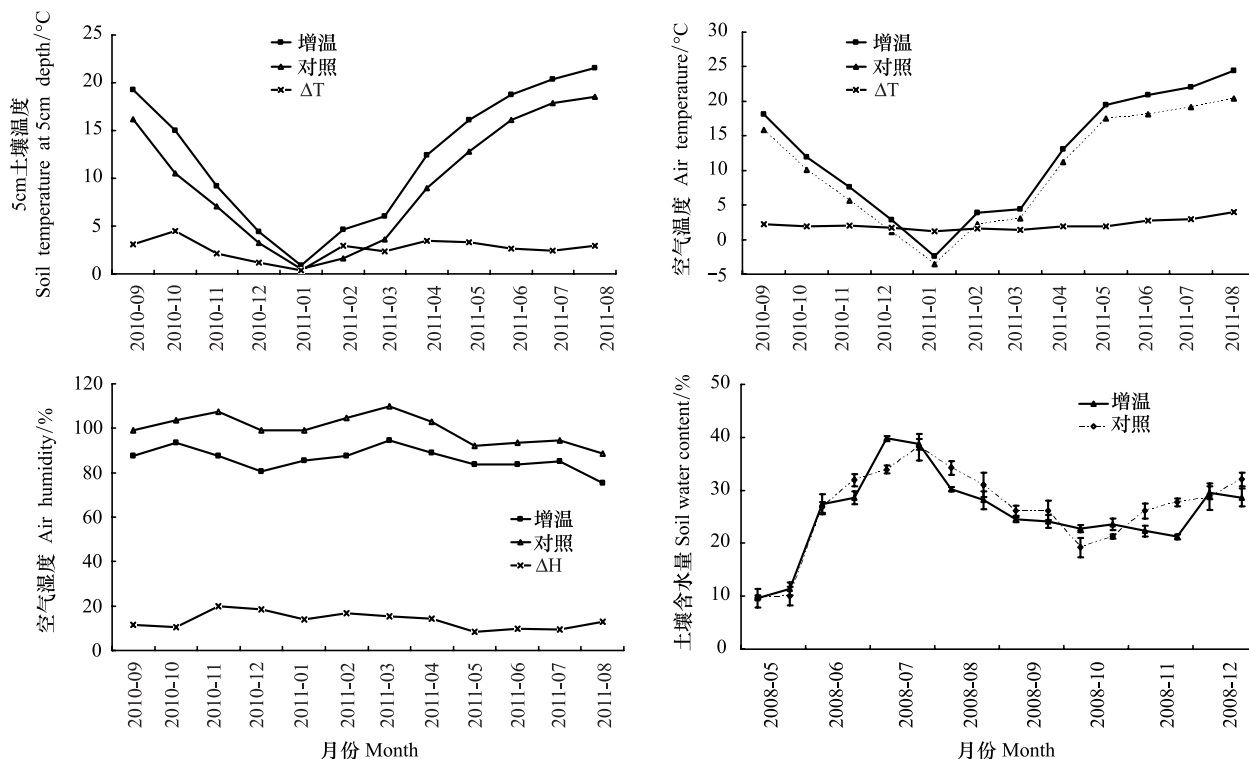


图 1 5 cm 土壤温度、空气温度、空气湿度和土壤含水量月动态变化

Fig.1 Monthly dynamic changes of soil temperature at 5 cm depth, air temperature, air humidity and soil water content

1.3 试验方法

1.3.1 根样采集

2010 年 10 月 15 日、2011 年 5 月 15 日、7 月 15 日分别在 4 个不同处理的副区中随机选择 3 株云杉,小心挖取其根系,并挑选出含有完整 5 级根序的根样。自来水漂洗,去除根系粘附的土壤后,将根样放入装有 FAA 固定液的塑料瓶中,贴上标签,带回实验室保存在 4℃ 冰箱中,并于 1 周内进行外生菌根侵染率测定。

1.3.2 土样采集

2011 年 5 月 15 日分别在 4 个不同处理的副区中进行“S”型随机取样,去除表面植被后用土钻(高 15 cm,内径 7 cm)钻取云杉根系周围 0—15 cm 表层土,每个副区中 4 次重复取样混合为 1 个土样,过 2 mm 筛,人工去除可见的植物细根后装入密封袋中,保存在装有冰袋的冰盒里带回实验室。将土样分成两份,1 份保存于 4℃ 冰箱中用于土壤含水量测定和土壤微生物总 DNA 提取;1 份-80℃ 冰箱中冷冻保存,1 周内进行土壤微生物磷脂脂肪酸(PLFAs)的提取分析。

1.3.3 侵染率测定

外生菌根真菌侵染率的测定采用统计计算法^[36]。从 FAA 固定液中随机取出根样,用超纯水漂洗干净。根据 Pregitzer^[37] 的根序分级法,剪取根样尖端包含完整 2 级根序的 1 cm 长根段,每个处理随机选取 15 段,在

体式显微镜下观察、统计每 1 cm 根段上 1 级根、2 级根的总数和形成外生菌根的 1、2 级根数量,计算每一级根的菌根侵染率。菌根侵染率=(各级根形成菌根数量/各级根镜检总数) $\times 100\%$ [20, 36]。

1.3.4 外生菌根真菌生物量测定

PLFA 的提取和测定参考 Frostegard [38] 方法。8g 鲜土经提取、层析、甲酯化后,溶于正己烷的磷脂用 N_2 吹干, -20°C 保存。样品用 100 μL 2.5 mg/100 ml 甲酯化 C 19:0 溶液溶解,并于 Agilent 6890 气相色谱仪进行 PLFAs 的鉴定和量化。其中色谱柱为 Agilent 19091B-102E (25 m $\times$ 0.33 $\mu\text{m}\times$ 0.20mm),载气为 H_2 。进样量为 2 μL ,分流比 100:1。进样口温度 250°C ,检测器温度 300°C 。二阶升温程序如下:起始温度 170°C ,以 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 260°C ,再以 $40^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 310°C 。气相色谱全过程由 MIDI 软件 (MIDI Microbial ID, Inc., Newark, DE, USA) 自动控制,其中 Sherlock 6.0 (MIDI Inc.) 用于磷脂脂肪酸鉴定。用峰面积和内标曲线法定量测定磷脂脂肪酸,PLFAs 含量用 nmol/g 表示。其中,土壤中外生菌根真菌生物量用其特异性 PLFA 18:2 ω 6,9 的含量来表示 [8-9, 27]。

1.3.5 土壤外生菌根真菌群落结构分析

土壤外生菌根真菌群落结构分析采用 PCR-DGGE 法。用试剂盒 (MOBIO Ultraclean Soil DNA Isolation Kit; 12088-50) 按说明提取土样中的总 DNA。提取的 DNA 采用菌根真菌特异性引物对 ITS1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') 和 ITS4B (5'-CAG GAG ACT TGT ACA CGG TCC AG-3') [39] 进行 PCR 扩增,扩增产物片段长约 700bp。PCR 反应体系 (50 μL) 为:10 $\times$ buffer (不含 Mg^{2+}) 5 μL , 25 mmol/L $MgCl_2$ 5 μL , dNTP Mix (各 2 mmol/L) 5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 1 μL , DNA 模板 1 μL , Taq 酶 0.5 μL , dd H_2O 31.5 μL 。运行的 PCR 程序为: 94°C 预变性 3 min, 94°C 变性 1 min, 50°C 退火 1 min, 72°C 延伸 2 min, 共计 35 个循环, 72°C 延伸 10 min。PCR 产物在基因突变检测仪 (Bio-Rad, Dcode, USA) 中进行变性梯度凝胶电泳。将 PCR 产物与上样缓冲液 5:1 混合后的样品 30 μL 加入变性梯度为 20%—50%、浓度为 8% 的聚丙烯酰胺凝胶点样孔中, 120V 恒压、 60°C 恒温电泳 12h。电泳完成后,将凝胶浸泡于 EB 中染色 30min。染色的凝胶用凝胶成像分析仪 (Bio-Rad, ChemiDoc XRS, USA) 进行分析,并观察每个样品的电泳条带进行拍照。

1.4 数据分析

采用 SPSS 17.0 对所有数据进行统计分析。选用两因素方差分析 (Two-way ANOVA) 检验增温、施氮及其交互作用对外生菌根真菌侵染率、生物量的影响。不同处理 (W0N0、W0N1、W1N0、W1N1) 间所测指标多重比较采用 Duncan 法进行检验, 1、2 级根侵染率的差异显著性采用 t 检验。用 Quantity One 4.6.2 软件分析外生菌根真菌的 DGGE 图谱,并使用 Microsoft Excel 03 插件 Biotools 进行多样性分析。所有图均采用 Microsoft Excel 绘制。

2 结果与分析

2.1 侵染率

夜间增温对云杉 2011 年 5 月 1 级根、2010 年 10 月和 2011 年 7 月云杉 2 级根外生菌根侵染率产生显著影响 ($P<0.05$),与对照相比,增温处理分别使 2010 年 10 月和 2011 年 5 月云杉 1 级根外生菌根侵染率增加 26.83% 和 18.64%, 2 级根 3 个月份外生菌根侵染率分别增加 1.98 倍、1.38 倍和 1.26 倍。但是在温度最高的 2011 年 7 月,单独增温使云杉 1 级根外生菌根侵染率降低了 9.06%。2010 年 10 月和 2011 年 5 月,施氮对云杉 1、2 级根外生菌根侵染率均无显著影响 ($P>0.05$)。2011 年 7 月,施氮对云杉 1 级根外生菌根侵染率影响显著 ($P<0.01$),外生菌根侵染率增加 15.69%。在增温与施氮的联合处理下,云杉 1、2 级根在不同季节的侵染率均增加,但仅在 2010 年 10 月 1 级根侵染率出现显著的交互作用 ($P<0.01$) (表 1)。

云杉外生菌根侵染率具有显著 ($P<0.001$) 的季节变化。总体上 (图 2),不同根级侵染率的季节变化不同,但在生长季中期 (2011 年 7 月) 均达到了最大值。2010 年 10 月 1 级根的侵染率最低,2011 年 7 月最高; 2011 年 7 月 2 级根的侵染率最大,最小值却出现在 2011 年 5 月。如图 2 所示,除 2010 年 10 月,1 级根的侵染

率均显著大于 2 级根 ($P<0.05$),但在不同时间差异程度不同。此外,不同处理对 1 级根侵染率的季节变化趋势影响并不相同,夜间增温及增温与施氮联合处理使生长季初期(2011 年 5 月)1 级根侵染率增幅明显但是生长季中期增幅减弱甚至有降低趋势,而施氮处理对 1 级根侵染率的季节动态并没有显著影响。

表 1 增温与施氮对外生菌根真菌侵染的影响(平均值 $\pm$ 标准误, $n=15$)

Table 1 Effects of warming and nitrogen fertilization on ectomycorrhizal fungal infection (means $\pm$ SE, $n=15$)

根级 Root orders	时间 Time	处理 Treatments						
		W0N0	W1N0	W0N1	W1N1	W	N	W $\times$ N
1 级根 First-order root	2010-10	28.54 $\pm$ 8.29 b	55.37 $\pm$ 6.70 a	42.44 $\pm$ 3.46 ab	32.61 $\pm$ 5.76 b	NS	NS	* *
	2011-05	61.12 $\pm$ 7.61 b	79.76 $\pm$ 4.61 ab	66.82 $\pm$ 8.47 ab	83.14 $\pm$ 3.73 a	*	NS	NS
	2011-07	82.87 $\pm$ 7.62 ab	73.81 $\pm$ 9.75 b	98.56 $\pm$ 0.99 a	94.29 $\pm$ 5.71 a	NS	* *	NS
2 级根 Second-order root	2010-10	9.61 $\pm$ 3.76 b	28.61 $\pm$ 4.28 a	11.78 $\pm$ 3.51 b	21.64 $\pm$ 6.89 ab	* *	NS	NS
	2011-05	2.81 $\pm$ 1.92 a	6.70 $\pm$ 3.05 a	7.65 $\pm$ 3.00 a	6.00 $\pm$ 3.32 a	NS	NS	NS
	2011-07	16.62 $\pm$ 5.23 b	37.60 $\pm$ 11.33 ab	32.57 $\pm$ 10.31 ab	58.91 $\pm$ 9.56 a	*	NS	NS

同一行中不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$);最后三列表示两因素的显著影响及其交互作用;W0N0,不增温+不施氮;W1N0: 增温+不施氮;W0N1: 不增温+施氮;W1N1: 增温+施氮;W: 增温效应;N: 施氮效应;W $\times$ N: 增温与施氮交互效应;NS: 没有显著差异; * $P<0.05$; * * $P<0.01$

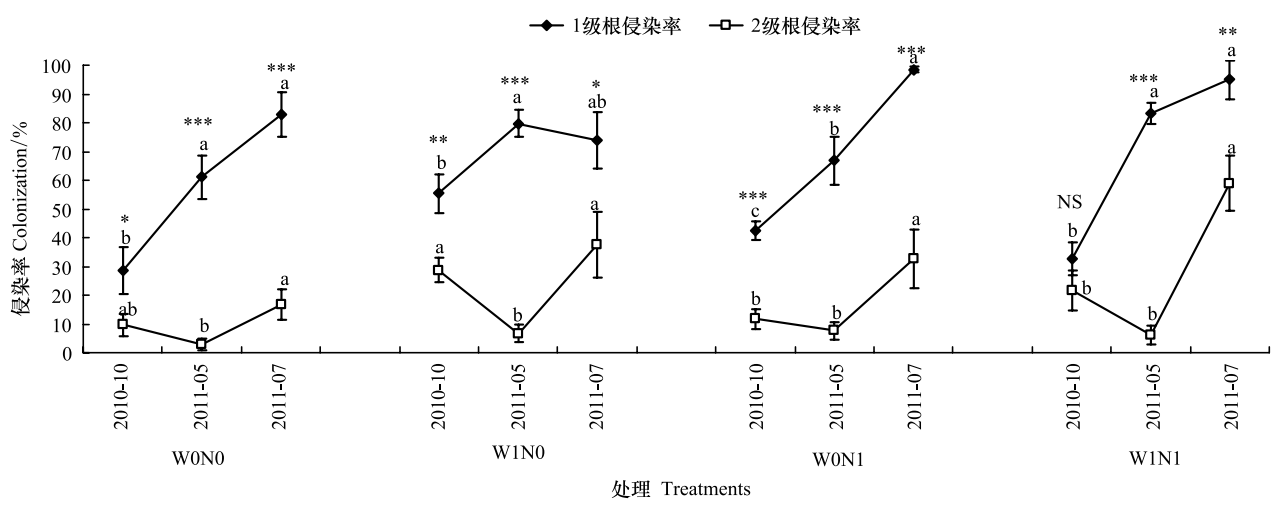


图 2 侵染率的季节性变化及根级差异

Fig.2 The seasonal changes of colonization and the differences in colonization between first-order root and second-order root

图中不同字母表示季节差异显著($P<0.05$); NS、*、* *、* * * 表示根级间不同程度的差异;NS, 差异不显著; * $P<0.05$; * * $P<0.01$; * * * $P<0.001$

2.2 外生菌根真菌生物量

用土壤中特异性磷脂脂肪酸 18:2 ω 6,9 的含量计算外生菌根真菌的生物量。单独夜间增温对土壤中外生菌根真菌生物量无显著影响,施氮显著降低了外生菌根真菌生物量。增温和施氮表现出显著的交互作用($P<0.05$),使外生菌根真菌生物量降低,如图 3 所示,但是在增温条件下,不施氮小区外生菌根真菌生物量是施氮小区的 2.07 倍。

2.3 外生菌根真菌群落多样性

DGGE 电泳图谱和泳道/条带识别图(图 4)表明,不同处理样品的带谱差异比较明显。对照处理和单独增温处理中条带较少,分别为 14 和 15 条;而单独施氮处理和增温施氮联合处理条带分别为 19 和 20 条。表明对照处理和单独增温处理中外生菌根真菌物种数量较少。4 个样品中具有相同条带(25 和 30),但条带强度不一样,说明 4 个样品中存在相似的真菌类型,但数量不同。

非加权成对算术平均法聚类分析的结果如图 5。夜间增温、施氮和增温与施氮联合处理聚为一大族群,3 个处理与对照之间具有差异。夜间增温和增温与施氮联合处理样品中外生菌根真菌菌群结构相似性最高,但仅达到 59%。

多样性指数计算结果(表 2)显示,施氮及增温施氮联合处理均增加了土壤中外生菌根真菌群落多样性。另一方面,单独施氮处理样品中外生菌根真菌群落均匀度指数最高为 0.976, Simpson's Dominance 指数最小为 0.057;对照处理中 Simpson's Dominance 指数最大为 0.091,但均匀度指数(0.951)高于单独增温处理(0.945)。说明单独施氮处理样品中外生菌根真菌群落的复杂程度高,物种最多但分布最均匀,且优势物种的主导作用最小,而对照处理中外生菌根真菌群落结构相对较简单。

3 讨论

3.1 夜间增温和施氮对云杉外生菌根真菌侵染率的影响

Pregitzer^[37]提出根系分级理论,并认为只有 1—3 级根受真菌侵染,郭大立等^[40]对 23 个温带树种的研究也发现外生菌根真菌对 4 级及以上根系侵染率为 0。本研究通过观察完整的 5 级根系侵染率发现:4 种处理中 1、2 级根均有外生菌根侵染,而仅在夜间增温、增温与施氮联合处理中观察到极少数 3 级根受侵染。因此,本研究仅针对 1、2 级根进行侵染率的分析。云杉幼苗外生菌根真菌侵染率具有显著的根级差异,1 级根侵染率显著高于 2 级根,这与不同根级的结构特征相关。1 级根具有完整的初生皮层结构,2 级根同时发育有初生和次生结构^[40]。而外生菌根形成的特征之一是真菌菌丝侵入根初生皮层细胞间隙内形成“哈蒂氏网(Harting net)”^[41],因此 1 级根侵染率高于 2 级根。此外,外生菌根侵染率呈现季节性差异,1、2 级根夏季侵染率最高。因为与植物共生的外生菌根真菌的生长依赖于根系的生理代谢活动,而根系随着温度的变化呈现季节性生长^[42]。适宜的温度对外生菌根真菌的生长极为重要^[41],夏季气温适宜,植物生长旺盛,对水分和养分的需求最大,根系生长最快,较多的光合产物分配给根系,供给外生菌根真菌的碳水化合物较春秋多,外生菌根真菌侵染率最高^[20]。

增温对外生菌根真菌侵染率的影响取决于外生菌根真菌和植物对特定温度的适应性^[10]。本研究发现,除 2011 年 7 月 1 级根外,夜间增温使外生菌根真菌侵染率增加。这与 Swaty 等^[14]的研究结果一致:温度高的

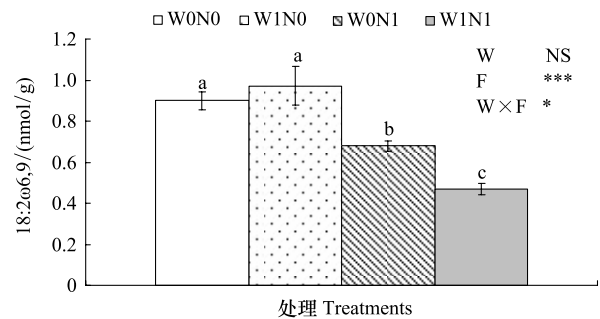


图 3 增温和施氮对土壤中外生菌根真菌生物量(18:2ω6,9)的影响

Fig.3 Effects of warming and nitrogen fertilization on ectomycorrhizal fungal biomass in the soil

图中不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$); * $P < 0.05$; * * * $P < 0.001$

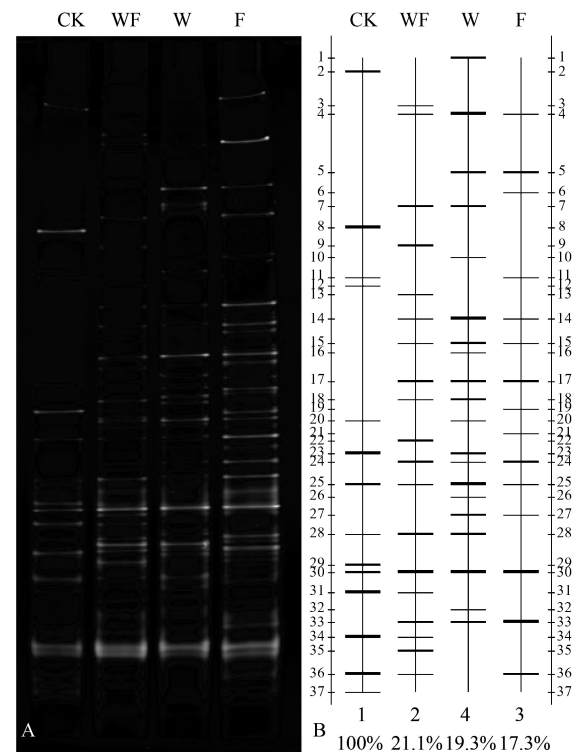


图 4 土壤中外生菌根真菌群落 DGGE 电泳图谱(A)和泳道/条带识别图(B)

Fig. 4 DGGE fingerprint of soil ectomycorrhizal fungal community (A) and Lane compare (B)

表 2 土壤中外生菌根真菌群落多样性指数

Table 2 The diversity indices of soil ectomycorrhizal fungal community

处理 Treatments	Shannon-Wiener 指数 Shannon-Wiener index	Simpson 多样性 Simpson's Diversity (1/Dominance)	Simpson 优势度 Simpson's Dominance	Margalef 指数 Margalef's index	均匀度 Evenness	丰富度 Richness
W0N0	2.510	10.954	0.091	1.593	0.951	14
W1N0	2.559	11.267	0.089	1.702	0.945	15
W0N1	2.923	17.420	0.057	2.127	0.976	20
W1N1	2.862	16.001	0.062	2.167	0.972	19

煤矿土壤样地中石松外生菌根真菌的侵染率显著高于温度较低的沙质土壤。已有研究认为侵染率的增加和植物地下部分 C 分配量的增加相关^[12, 43]。Rillig 等^[44]用红外线加热装置进行增温的研究也发现,增温小区内丛枝菌根真菌的侵染率显著增加,并认为增温使植物光合速率增加,更多的光合产物分配给菌根真菌,因此促使菌根真菌侵染率增加。本样地的前期研究结果显示,夜间增温使云杉细根生物量增加^[7];此外,还发现夜间增温使云杉中 N 含量降低^[45],根、茎中的 N 含量下降显著,云杉趋向于将更多的 C 分配给与其共生的外生菌根真菌以获得更多生长所需的 N,因此外生菌根侵染率增加^[46]。然而,2011 年 7 月夜间增温对 1 级根侵染

率没有显著影响。对 5cm 深土壤温度进一步分析发现,2011 年 7 月增温样地中温度为 20.27℃,而对照样地中也达到了 17.90℃,均比 2010 年 10 月(15.02℃)和 2011 年 5 月(16.13℃)增温样地中温度高。很有可能是因为 7 月对照样地中土壤温度已达到了外生菌根真菌形成的最适温度(如点柄乳牛肝菌(*Suillus granulatus*) 在土壤中形成菌根的最适温度为 16℃^[47]),夜间增温所引起的增温幅度已经不能引起云杉外生菌根侵染率的变化,因此夜间增温对侵染率影响不显著。

此外,两因素方差分析结果表明不同季节夜间增温对侵染率的具体影响具有根级差异:春季(2011 年 5 月)夜间增温对云杉 1 级根侵染率影响显著,夏季(2011 年 7 月)和秋季(2010 年 10 月)夜间增温却对云杉 2 级根侵染率产生显著和极显著的影响。产生这种变化的原因与根系生物量的季节性变化^[48-49]及 1 级根的生长发育优先于 2 级根相关^[50]。增温条件下,春季细根生物量增加量与夏季相比显著提高^[48-49],春季 1 级根侵染率显著增加。随着根系生长规律的变化,春季 1 级根在夏、秋季逐渐发育为 2 级根。因此,增温条件下 2 级根的侵染率在夏季和秋季显著地增加。

氮是外生菌根真菌和宿主植物生长不可或缺的营养元素之一。氮的含量,特别是土壤中有效氮的含量对外生菌根的形成起重要作用^[41]。孙玥等^[25]通过对落叶松人工林样地连续 3a 施用 10 g N m⁻² a⁻¹ 硝酸铵的实验发现,落叶松 1 级根侵染率显著降低,并认为土壤 N 有效性的增加降低了落叶松根系对外生菌根真菌的依赖性,根系供应给菌根真菌的碳水化合物减少,因此侵染率降低。与上述研究结果不同,本实验施用 NH₄NO₃ 25 g N m⁻² a⁻¹使云杉幼苗侵染率有略微增加的趋势,但是经方差检验并没有显著影响。与本研究类似, Van Dijk 等^[1]在 7 个月施用 4.8 g N m⁻² a⁻¹后不同松树树种的侵染率没有显著变化。连续 2a 硫酸铵施用量为 50—60 g N m⁻² a⁻¹的实验也表明,挪威云杉菌根侵染率无显著变化,并发现一些外生菌根真菌物种子实体产量增加^[15]。Kårén 等推测其原因可能是:短期施氮改变了土壤中外生菌根真菌群落结构,改变了土壤中不同外生菌根真菌物种的种间竞争力以及对根系的侵染能力,但土壤中群落结构的显著变化尚未引起侵染率的显

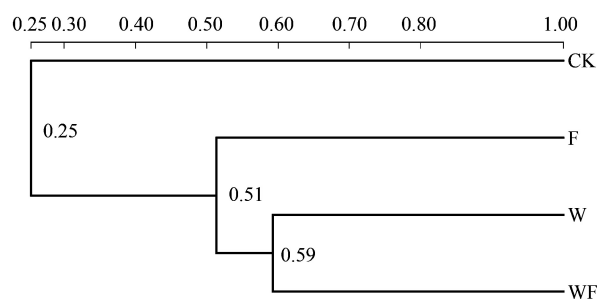


图 5 土壤中外生菌根真菌群落 UPMGA 聚类分析图

Fig.5 Cluster analysis of soil ectomycorrhizal fungal community by the unweighted pairwise grouping method with mathematical averages (UPMGA)

著变化^[15]。

3.2 夜间增温、施氮对土壤中外生菌根真菌群落的影响

磷脂脂肪酸和 PCR-DGGE 是常用的土壤微生物群落分析方法。磷脂脂肪酸法通常用于定量分析土壤微生物群落的组成^[51],并且大量研究表明^[8-9, 27],土壤中特异性磷脂脂肪酸 18:2 ω 6,9 的含量可作为土壤中外生菌根真菌生物量的指标;而 PCR-DGGE 常用于分析土壤微生物群落组成差异性^[52]。本文结合两种方法,对云杉根围土壤中外生菌根真菌群落进行了研究。研究结果显示,夜间增温对土壤中外生菌根真菌生物量、多样性、均匀度和优势度均无显著影响;这与 Fujimura 等人^[14]的研究结果相似。但是,Deslippe 等^[13]的增温实验却发现北极矮桦林下外生菌根真菌多样性显著增加。推测产生这种差异的原因可能是:(1)增温的时间及方式不同:OTC 5—7a 增温及本研究中 3 年红外辐射夜间增温对多样性没有显著变化,而温室增温 18a 多样性显著增加;(2)研究的宿主植物不同,不同植物对增温的响应不同^[14];增温使北极柳地下部分 C 分配量增加,同样本样地中夜间增温使云杉更多的生物量分配给细根^[7],二者均没有引起外生菌根多样性的显著变化;增温降低了北极矮桦地下部分的 C 分配量,但改变了外生菌根真菌群落的组成及多样性,增强了外生菌根真菌群落对土壤有机质的分解。此外,聚类分析结果显示夜间增温使土壤中外生菌根真菌群落与对照相似性低,说明外生菌根真菌群落中物种组成发生了一定的变化,只是尚未引起多样性的显著变化。

大量研究表明^[17, 53-54],施氮降低了土壤中真菌生物量。本研究得到相同的结果,施氮、夜间增温与施氮的联合处理使外生菌根真菌生物量降低,且达到极显著水平。同样,Nilsson 和 Wallander^[8]发现施氮使挪威云杉林下土壤中外生菌根真菌菌丝生物量降低。外生菌根真菌生物量的降低被认为是外生菌根真菌对环境高无机 N 含量的适应^[55]。对 DGGE 图谱分析结果显示,施氮、夜间增温与施氮的联合处理使土壤中外生菌根真菌群落的物种丰富度、多样性和均匀度大于对照,而优势度小于对照,这可能是施氮减少了可形成丰富菌丝的外生菌根真菌物种的数量,但却使具有短菌丝或不具外延菌丝的外生菌根真菌物种丰富度增加^[8],这使土壤中总的菌根真菌生物量降低而群落多样性却增高。已有研究也认为^[8, 16, 55],施氮限制了原土壤外生菌根真菌群落中占优势的俱 N 外生菌根真菌的生存,提高了亚优势种群喜 N 外生菌根真菌的生存竞争力,亚优势种群物种数目增加从而导致多样性增加。因此,施氮主要改变土壤中外生菌根真菌群落结构,改变了群落的优势格局。但是,施氮对土壤中外生菌根真菌群落结构影响的机理尚需在物种水平上进行深入研究。

总之,连续 3a 夜间增温和施氮对云杉外生菌根及菌根真菌群落多样性产生不同程度的影响;比较而言,夜间增温主要增加外生菌根的侵染率,而对土壤中外生菌根真菌群落多样性影响不明显;施氮、增温与施氮联合处理则直接对土壤中外生菌根真菌生物量及群落多样性产生较大的影响。本实验仅在群落整体水平上进行了 3a 夜间增温和施氮对云杉外生菌根及菌根真菌多样性影响的研究,尚需在物种水平上进行外生菌根真菌对长期夜间增温和施氮响应的研究,以深入探究以外生菌根为核心的地下生态过程对全球变化的响应机制。

参考文献 (References):

- [1] Van Dijk H F G, De Louw M H J, Roelofs J G M, Verburgh J J. Impact of artificial, ammonium-enriched rainwater on soils and young coniferous trees in a greenhouse. Part II—effects on the trees. *Environmental pollution*, 1990, 63(1): 41-59.
- [2] Kainulainen P, Holopainen J, Palomäki V, Holopainen T. Effects of nitrogen fertilization on secondary chemistry and ectomycorrhizal state of Scots pine seedlings and on growth of grey pine aphid. *Journal of Chemical Ecology*, 1996, 22(4): 617-636.
- [3] Termorshuizen A J, Schaffers A P. Occurrence of carpophores of ectomycorrhizal fungi in selected stands of *Pinus sylvestris* in the Netherlands in relation to stand vitality and air pollution. *Plant and Soil*, 1987, 104(2): 209-217.
- [4] Zhao C Z, Liu Q. Growth and physiological responses of *Picea asperata* seedlings to elevated temperature and to nitrogen fertilization. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2009, 31(1): 163-173.
- [5] Read D J. Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia*, 1991, 47(4): 376-391.
- [6] Parke E L, Linderman R G, Black C H. The role of ectomycorrhizas in drought tolerance of Douglas-fir seedlings. *New Phytologist*, 1983, 95(1): 83-95.

- [7] Liu Q, Yin H J, Chen J S, Zhao C Z, Cheng X Y, Wei Y Y, Lin B. Belowground responses of *Picea asperata* seedlings to warming and nitrogen fertilization in the eastern Tibetan Plateau. *Ecological Research*, 2011, 26(3): 637-648.
- [8] Nilsson L O, Wallander H. Production of external mycelium by ectomycorrhizal fungi in a Norway spruce forest was reduced in response to nitrogen fertilization. *New Phytologist*, 2003, 158(2): 409-416.
- [9] Olsson P A. Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29(4): 303-310.
- [10] Compant S, Van Der Heijden M G A, Sessitsch A. Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 73(2): 197-214.
- [11] Parrent J L, Morris W F, Vilgalys R. CO₂-enrichment and nutrient availability alter ectomycorrhizal fungal communities. *Ecology*, 2006, 87(9): 2278-2287.
- [12] Clemmensen K E, Michelsen A, Jonasson S, Shaver G R. Increased ectomycorrhizal fungal abundance after long-term fertilization and warming of two arctic tundra ecosystems. *New Phytologist*, 2006, 171(2): 391-404.
- [13] Deslippe J R, Hartmann M, Mohn W W, Simard S W. Long-term experimental manipulation of climate alters the ectomycorrhizal community of *Betula nana* in Arctic tundra. *Global Change Biology*, 2011, 17(4): 1625-1636.
- [14] Fujimura K E, Egger K N, Henry G H R. The effect of experimental warming on the root-associated fungal community of *Salix arctica*. *The ISME Journal*, 2008, 2(1): 105-114.
- [15] Kårén O, Nylund J E. Effects of ammonium sulphate on the community structure and biomass of ectomycorrhizal fungi in a Norway spruce stand in southwestern Sweden. *Canadian Journal of Botany*, 1997, 75(10): 1628-1642.
- [16] Lilleskov E A, Fahey T J, Horton T R, Lovett G M. Belowground ectomycorrhizal fungal community change over a nitrogen deposition gradient in Alaska. *Ecology*, 2002, 83(1): 104-115.
- [17] Kjoller R, Nilsson L O, Hansen K, Schmidt I K, Vesterdal L, Gundersen P. Dramatic changes in ectomycorrhizal community composition, root tip abundance and mycelial production along a stand-scale nitrogen deposition gradient. *New Phytologist*, 2012, 194(1): 278-286.
- [18] Rillig M C, Treseder K K, Allen M F. Global change and mycorrhizal fungi // van der Heijden M F A, Sanders I R. *Mycorrhizal Ecology: Ecological Studies*. Berlin: Springer-Verlag, 2003: 135-160.
- [19] Kasai K, Usami T, Lee J, Ishikawa S I, Oikawa T. Responses of ectomycorrhizal colonization and morphotype assemblage of *Quercus myrsinaefolia* seedlings to elevated air temperature and elevated atmospheric CO₂. *Microbes and Environments*, 2000, 15(4): 197-207.
- [20] Swaty R L, Gehring C A, Van Ert M, Theimer T C, Keim P, Whitham T G. Temporal variation in temperature and rainfall differentially affects ectomycorrhizal colonization at two contrasting sites. *New Phytologist*, 1998, 139(4): 733-739.
- [21] IPCC. *Climate change 2007: The Physical Science Basis*. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.
- [22] Xia J Y, Chen S P, Wan S Q. Impacts of day versus night warming on soil microclimate: Results from a semiarid temperate steppe. *Science of the Total Environment*, 2010, 408(14): 2807-2816.
- [23] 张明乾, 陈金, 郭嘉, 田云录, 杨世佳, 张丽, 杨冰, 张卫建. 夜间增温对冬小麦根系生长和土壤养分有效性的影响. *应用生态学报*, 2013, 24(2): 445-450.
- [24] Zhang N L, Xia J Y, Yu X J, Ma K P, Wan S Q. Soil microbial community changes and their linkages with ecosystem carbon exchange under asymmetrically diurnal warming. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(10): 2053-2059.
- [25] 孙玥, 全先奎, 贾淑霞, 谷加存, 郭大立, 王政权. 施用氮肥对落叶松人工林一级根外生菌根侵染及形态的影响. *应用生态学报*, 2007, 18(8): 1727-1732.
- [26] 刘庆. 亚高山针叶林生态学研究. 成都: 四川大学出版社, 2002.
- [27] Wallander H, Nilsson L O, Hagerberg D, Bååth E. Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New Phytologist*, 2001, 151(3): 753-760.
- [28] Kaiser C, Frank A, Wild B, Koranda M, Richter A. Negligible contribution from roots to soil-borne phospholipid fatty acid fungal biomarkers 18:2 ω 6,9 and 18:1 ω 9. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(9): 1650-1652.
- [29] Wallander H, Nylund J E. Effects of excess nitrogen and phosphorus starvation on the extramatrical mycelium of ectomycorrhizas of *Pinus sylvestris* L. *New Phytologist*, 1992, 120(4): 495-503.
- [30] Hart S C, Classen A T, Wright R J. Long-term interval burning alters fine root and mycorrhizal dynamics in a ponderosa pine forest. *Journal of Applied Ecology*, 2005, 42(4): 752-761.
- [31] 卫云燕, 尹华军, 刘庆, 黎云祥. 夜间增温和施肥对川西亚高山针叶林两种树苗根际效应的影响. *生态学报*, 2011, 31(3): 698-708.
- [32] 陈智, 尹华军, 卫云燕, 刘庆. 夜间增温和施氮对川西亚高山针叶林土壤有效氮和微生物特性的短期影响. *植物生态学报*, 2010, 34(11): 1254-1264.

- [33] Yin H J, Xu Z F, Chen Z, Wei Y Y, Liu Q. Nitrogen transformation in the rhizospheres of two subalpine coniferous species under experimental warming. *Applied Soil Ecology*, 2012, 59: 60-67.
- [34] 唐正, 尹华军, 周晓波, 卫云燕, 刘庆. 夜间增温和施肥对亚高山针叶林土壤呼吸的短期影响. *应用与环境生物学报*, 2012, 18(5): 713-721.
- [35] Wan S, Luo Y, Wallace L. Changes in microclimate induced by experimental warming and clipping in tallgrass prairie. *Global Change Biology*, 2002, 8(8): 754-768.
- [36] 刘润进, 陈应龙. 菌根学. 北京: 科学出版社, 2007.
- [37] Pregitzer K S, De Forest J L, Burton A J, Allen M F, Ruess R W, Hendrick R L. Fine root architecture of nine North American trees. *Ecological Monographs*, 2002, 72(2): 293-309.
- [38] Frostegård Å, Bååth E, Tunlio A. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 1993, 25(6): 723-730.
- [39] Gardes M, Bruns T D. Its primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 1993, 2(2): 113-118.
- [40] Guo D L, Xia M X, Wei X, Chang W J, Liu Y, Wang Z Q. Anatomical traits associated with absorption and mycorrhizal colonization are linked to root branch order in twenty-three Chinese temperate tree species. *New Phytologist*, 2008, 180(3): 673-683.
- [41] 弓明钦, 陈应龙, 仲崇禄. 菌根研究及应用. 北京: 中国林业出版社, 1997.
- [42] Pregitzer K S, King J S, Burton A J, Brown S E. Responses of tree fine roots to temperature. *New Phytologist*, 2000, 147(1): 105-115.
- [43] Urcelay C, Bret-Harte M S, Díaz S, Chapin III F S. Mycorrhizal colonization mediated by species interactions in arctic tundra. *Oecologia*, 2003, 137(3): 399-404.
- [44] Rillig M C, Wright S F, Shaw M R, Field C B. Artificial climate warming positively affects arbuscular mycorrhizae but decreases soil aggregate water stability in an annual grassland. *Oikos*, 2002, 97(1): 52-58.
- [45] 赵春章. 川西亚高山两种针叶树幼苗对增温和施氮的响应 [D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2009.
- [46] Fellbaum C R, Gachomo E W, Beesetty Y, Choudhari S, Strahan G D, Pfeffer P E, Kiers E T, Bücking H. Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(7): 2666-2671.
- [47] 贺小香, 谭周进, 肖启明, 陈力力. 外生菌根的功能及与环境因子的关系. *中国生态农业学报*, 2007, 15(2): 201-204.
- [48] Hendrick R L, Pregitzer K S. The dynamics of fine root length, biomass, and nitrogen content in two northern hardwood ecosystems. *Canadian Journal of Forest Research*, 1993, 23(12): 2507-2520.
- [49] Hendrick R L, Pregitzer K S. Temporal and depth-related patterns of fine root dynamics in northern hardwood forests. *Journal of Ecology*, 1996, 84(2): 167-176.
- [50] Wang X R, Wang Z Q, Han Y Z, Gu J C, Guo D L, Mei L. Variations of fine root diameter with root order in Manchurian ash and Dahurian larch plantations. *Frontiers of Forestry in China*, 2007, 2(1): 34-39.
- [51] Wiemken V, Iaczo E, Ineichen K, Boller T. Effects of elevated carbon dioxide and nitrogen fertilization on mycorrhizal fine roots and the soil microbial community in beech-spruce ecosystems on siliceous and calcareous soil. *Microbial Ecology*, 2001, 42(2): 126-135.
- [52] Van Elsland J D, Duarte G F, Keijzer-Wolters A, Smit E. 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(2): 133-151.
- [53] Bowden R D, Davidson E, Savage K, Arabia C, Steudler P. Chronic nitrogen additions reduce total soil respiration and microbial respiration in temperate forest soils at the Harvard Forest. *Forest Ecology and Management*, 2004, 196(1): 43-56.
- [54] Bardgett R D, Mawdsley J L, Edwards S, Hobbs P J, Rodwell J S, Davies W J. Plant species and nitrogen effects on soil biological properties of temperate upland grasslands. *Functional Ecology*, 1999, 13(5): 650-660.
- [55] Wallenda T, Kottke I. Nitrogen deposition and ectomycorrhizas. *New Phytologist*, 1998, 139(1): 169-187.