

5 种优势腐生真菌降解华山松针叶的酶活测定

文自兰 许秀兰 杨春琳 田莎 刘应高*

(四川农业大学 林学院 四川 雅安 625014)

摘要:【目的】分析腐生真菌降解华山松落针过程中各种酶活性变化与酶间关系,探索真菌对华山松落针的降解能力。【方法】通过形态学观察和转录间隔区 ITS 序列分析,鉴定分离自华山松凋落物的 5 种优势菌株。以此为供试菌株,华山松落针为底物,通过发酵纯培养方法,测定底物总有机物质(Total organic matter, TOM)质量损失率及在发酵过程中产生的内切葡聚糖酶(Endoglucanase, EG)、木聚糖酶(Xylanase, Xyl)、木质素过氧化物酶(Lignin peroxidase, LiP)、锰过氧化物酶(Manganese peroxidase, MnP)和酸性磷酸酶(Acid phosphatase, AP)活性。【结果】5 种菌株分别为 *Mucor* sp.、*Pestalotiopsis* sp.、*Allantophomopsis* sp.、*Phoma* sp.和 *Hypocrea* sp.。5 种菌引起的针叶 TOM 质量损失率在 6.63%–15.77%之间, *Pestalotiopsis* sp.具有最高的 AP 酶活性,且 EG 酶、Xyl 酶和 LiP 酶 3 种酶活性较高。*Allantophomopsis* sp.的 LiP 酶活性最高,并具有很高的 MnP 酶活。*Hypocrea* sp.分泌的 EG 酶、Xyl 酶活性低,但能产生 LiP 酶且有较高的 AP 酶活。相关性分析表明菌株分泌的 AP 酶活性与 TOM 质量损失率负相关,EG 酶、Xyl 酶及 AP 酶 3 种酶之间存在协同作用,特别是 EG 与 AP 之间。【结论】5 种腐生真菌对华山松针叶均有降解作用,降解能力: *Pestalotiopsis* sp.>*Allantophomopsis* sp.>*Hypocrea* sp.>*Phoma* sp.>*Mucor* sp.。酶活大小及酶协同作用共同影响针叶降解, *Pestalotiopsis* sp.、*Allantophomopsis* sp.和 *Hypocrea* sp.能产生木质纤维素降解酶并能引起较高的质量损失率,因此这 3 株菌为木质纤维素降解真菌。

关键词: 真菌降解, 华山松, 木质纤维素酶, 木聚糖酶, 酸性磷酸酶

Enzyme activities on decomposing needle litter of *Pinus armandii* by five dominant saprophytic fungi

WEN Zi-Lan XU Xiu-Lan YANG Chun-Lin TIAN Sha LIU Ying-Gao*

(College of Forestry, Sichuan Agriculture University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: [Objective] The purpose of this research was to analyze the changes of enzyme activities and relationships among enzymes on decomposing needle litter of *Pinus armandii* by saprophytic fungi and explore fungal decomposition capacities of the litter. [Methods] Basing on morphological characteristics and sequence alignment analysis of rDNA-ITS region, five dominant strains isolated from *Pinus armandii* needle litter from Erlang Mount were identified. These five isolates were used as

基金项目: 四川省教育厅重点项目(No. 09ZA068)

*通讯作者: ✉: lyg927@263.net

收稿日期: 2014-08-08; 接受日期: 2014-10-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-10-16

the fungal strains and the needle litter was used as the natural substrate. The fungi abilities to degrade the needle in terms of the loss in total organic matter (TOM) and the enzyme activities of endoglucanase (EG), xylanase (Xyl), lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) and acid phosphatase (AP) by fermentation were tested. **[Results]** The five isolates were identified as *Mucor* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Allantophomopsis* sp., *Phoma* sp. and *Hypocrea* sp., respectively. The loss in TOM caused by the five fungi was between 6.63%–15.77%. AP activity in the case of *Pestalotiopsis* sp. was the highest and the activities of EG, Xyl, LiP were relatively high. LiP activity was the highest in *Allantophomopsis* sp., which had high activity of MnP. Whereas EG and Xyl activities were low for *Hypocrea* sp. which can secrete LiP and higher AP. The results of correlation analysis showed that AP activity was negatively correlated with the loss in TOM. Moreover, there was a certain synergy between EG, Xyl and AP, especially between EG and AP. **[Conclusion]** In the present study, the five saprophytic fungi can degrade needle litter of *Pinus armandii* and the ability from highest to lowest was as followed: *Pestalotiopsis* sp., *Allantophomopsis* sp., *Hypocrea* sp., *Phoma* sp., *Mucor* sp.. Enzyme activities and enzymes synergy had an influence on decomposition of the needle litter. *Pestalotiopsis* sp., *Hypocrea* sp. and *Allantophomopsis* sp. were found to not only be capable of producing lignocelluloses-degrading enzymes but cause higher loss in TOM. These three strains were regarded as lignocelluloses-degrading fungi.

Keywords: Fungal decomposition, *Pinus armandii*, Lingo-cellulase, Xylanase, Acid phosphatase

在植物-凋落物-土壤森林生态系统的养分循环中, 植物群落作为主动因子, 从土壤中吸收养分形成有机体, 然后养分随死亡的有机体落到地表, 以此维持着土壤肥力、促进森林生态系统正常的物质循环和养分平衡^[1]。凋落物降解离不开微生物作用, 微生物降解作用的实质是酶与凋落物之间化学作用^[2]。用于纤维素降解的酶系主要有内切葡聚糖酶(EG)、外切葡聚糖酶类(CBH)、 β -葡聚糖苷酶(BG)^[3]; 用于半纤维素的降解酶系主要是木聚糖酶(Xyl)^[4]; 用于木质素降解的酶系以木质素过氧化物酶(LiP)、锰过氧化物酶(MnP)和漆酶(Lac)为主^[5]。研究木质纤维素降解的微生物除白腐菌等高等真菌^[6-10]外, 关于丝状真菌的降解能力也逐步得到重视。多种丝状真菌能够产生木质纤维素降解酶, 对樟子松、马尾松以及栓皮栎落叶有一定的降解能力, 不同真菌间可以相互促进或抑制对凋落物的降解^[11-14]。此外, 磷酸酶可以促进有机磷化合物水解成无机磷, 加速植物残体的分解, 依据磷酸酶活性的最适 pH 值, 可分为酸性磷酸酶和碱性磷酸酶^[15]。一般情况下, 在酸性土壤中, 以酸性磷酸酶为主; 在碱性或中性土壤中, 以碱性磷酸酶为主。本研究采用分离自华山松凋落物的 5 种优势丝状真菌, 测定 5 株菌在华山松落叶分解过程中内切葡聚糖酶(EG)、木

聚糖酶(Xyl)、木质素过氧化物酶(LiP)、锰过氧化物酶(MnP)和酸性磷酸酶(AP)的活性变化及质量损失情况, 旨在分析不同真菌降解华山松落针过程中各种酶活性动态, 探讨凋落物优势真菌降解松针的能力, 为松针凋落物的微生物降解提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 真菌来源

华山松落针采自泸定县二郎山林场, 按春夏秋冬 4 个季节分别分离落针上的真菌, 选择分布周期广且分离频率高的 5 种菌株 1-1、1-11、2-17、3-13、4-6 作为本次分解实验的供试菌株。各菌株保存在 PDA 斜面培养基上。

1.2 菌种鉴定

从保藏菌种的斜面培养基中挑取菌丝转接到 PDA 平板培养基(马铃薯 20 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL)中, 28 °C 培养 3–4 d, 观察菌落颜色形状等形态特征。在显微镜下观察菌丝体、孢子和孢子梗等。

取菌株于 PD 液体培养基(马铃薯 20 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1 000 mL)中, 25 °C 振荡培养 5–7 d, 收集菌丝体研磨成粉。用植物基因组 DNA 提取试剂盒(温江莱邦), 根据说明书提取 DNA。得到的

DNA 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。采取真菌通用引物 ITS1 和 ITS4, 其序列如下: ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' (19 bp); ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (20 bp)。反应总体积为 50 μL , 其中 ITS1 引物 100 $\mu\text{mol/L}$ 2 μL , ITS4 引物 100 $\mu\text{mol/L}$ 2 μL , ddH₂O 19 μL , DNA 模板 2 μL , 2 \times Taq PCR Master mix 25 μL 。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。反应终止后, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将 PCR 产物送至上海生工生物工程技术有限公司测序, 将测出的序列用 BLAST 程序搜索同源序列, 与 GenBank 数据库中已有的菌种 rDNA-ITS 序列进行相似性比较分析, 以此辅助菌株鉴定。

1.3 华山松凋落物分解试验

1.3.1 材料处理: 华山松针叶采自四川二郎山, 以此作为丝状真菌的分解底物。松针剪成 1–2 cm 针段, 蒸馏水清洗 3 次, 在 72 $^{\circ}\text{C}$ 烘 48 h, 烘干的针叶作为培养底物。将每个锥形瓶(150 mL)中装入 1.000 g 底物, 再用 5.0 mL 液体培养基(KH₂PO₄ 1.0 g, MgSO₄ 0.2 g, KCl 0.2 g, NaNO₃ 2.0 g, 酵母膏 0.2 g, 蒸馏水 1 000 mL)润湿底物, 1 \times 10⁵ Pa 高压灭菌 30 min^[16], 冷却备用。无菌条件下每个锥形瓶接种 4 片直径为 8 mm 的菌丝圆片, 接种物为取自 25 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 4–5 d 的 PDA 平板边缘菌丝生长旺盛的琼脂块。锥形瓶的瓶口用棉塞封住, 保持 90% 湿度, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 对照组不接菌处理。培养后的第 5 天第一次取样, 之后每 5 d 取样一次, 第 60 天最后一次取样。

1.3.2 酶液提取: 向取样的锥形瓶中加入 10 mL 预冷的醋酸钠缓冲液(50 mmol/L, pH 6.0), 置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 旋转摇床 180 r/min 振荡 20 min。将混合液经烘干至恒重的定性滤纸过滤, 滤液置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻离心机 10 000 \times g 离心 10 min。取上清液作为粗酶液测定酶活性, 离心管底的沉淀物与第一次的过滤残渣一同烘干至恒重(72 $^{\circ}\text{C}$)。

总有机物质质量损失率=[(样品的初始干重-样

品处理后的干重)/样品初始的干重] \times 100%

1.4 酶活测定方法

内切葡聚糖酶活测定是用 DNS 法测定 CMC-Na 释放的还原糖, 方法参照张淑彬等^[17]和许秀兰^[18]的方法并做了适当的修改。定义在测定条件下, 1 mL 酶液中每分钟纤维素水解生成 1 μmol 葡萄糖的酶量为 1 个酶活力单位 IU。

木聚糖酶活用 DNS 法测定^[19]。定义 1 mL 酶液中每分钟木聚糖水解释生成 1 μmol 木糖的酶量为 1 个酶活力单位 IU。

木质素过氧化物酶活测定采用藜芦醇法^[20]。4 mL 反应体系中含 10 mmol/L 藜芦醇 2 mL, 0.25 mol/L 酒石酸缓冲液(pH 2.5) 0.9 mL, 1 mL 酶液, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 加入 5.0 mmol/L H₂O₂ 0.1 mL 启动反应, 于 310 nm 紫外光处测其光密度。以缓冲液作为对照, 定义每分钟合成 1 $\mu\text{mol/L}$ 藜芦醛所需的酶量为 1 个酶活单位 IU。

锰过氧化物酶活测定以愈创木酚为底物, 在锰过氧化物酶和 Mn²⁺作用下愈创木酚被氧化成四邻甲氧基连酚, 在 465 nm 处可以测定有色产物四邻甲氧基连酚的形成。反应条件为: 琥珀酸钠缓冲液或乳酸钠缓冲液, pH 4.0–4.5, 0.2 mmol/L MnSO₄, 0.1 mmol/L H₂O₂, 0.4 mmol/L 愈创木酚, 测定波长为 465 nm^[21]。定义每分钟使 1 $\mu\text{mol/L}$ 四邻甲氧基连酚合成所需的酶量为 1 个酶活单位 IU。

酸性磷酸酶活测定采用对硝基酚磷酸钠法。取 1 mL 酶液, 加入 5.5 mmol/L 的对硝基苯磷酸二钠(PNPP) 1 mL, 然后加入 0.1 mol/L HAc-NaAc 缓冲液(pH 5.0) 1 mL, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 60 min 后用 3 mL 0.5 mol/L NaOH 终止反应。以缓冲液作为对照, 在波长 400 nm 紫外光处测其光密度。定义 1 mL 酶液中每分钟产生 1 nmol 对-硝基酚为 1 个酶活力单位 IU。

1.5 数据处理分析

用 MEGA 5.1 作系统发育树分析, 使用 SPSS 19.0 对实验数据进行统计分析, 采用 Pearson 相关性系数分析酶活性变化与针叶分解的关系及酶活

间关系, 表格采用 Excel 2007 制作, 作图采用 Origin 8.5。

2 结果与分析

2.1 菌株的形态学鉴定

通过平板分离, 纯化出 5 株优势菌株, 编号分别为 1-1、1-11、2-17、3-13、4-6 (表 1)。5 株菌在 PDA 上的菌落形态见图 1。菌株 1-1 初步鉴定结果为 *Mucor* sp.。1-11、2-17、3-13 及 4-6 菌株需要结合分子技术进行鉴定。

2.2 系统发育分析

5 株菌株的 rDNA-ITS PCR 扩增结果所示, 扩增片段约 500 bp。测序结果表明, 1-1、1-11、2-17、3-13、4-6 的扩增片段分别为 581、548、513、505 和 555 bp。将供试菌株与亲缘关系较近的已知真菌构建系统发育树, 进行系统发育关系分析(图 2)。

通过 BLAST 比对, 1-1 菌株与毛霉属真菌均具有较高的同源性。1-1 菌株与 *Mucor* sp. (HQ829165.1) 能聚为一族, 一致性达 98%, 与形态学鉴定的结果一致, 将 1-1 菌株鉴定为 *Mucor* sp.。

表 1 5 株菌的形态特征
Table 1 The characteristics of five fungi

菌株 Strains	1-1	1-11	2-17	3-13	4-6
形态特征 Morphological characteristics	菌落圆形, 白色, 气生菌丝发达, 呈绒毛状, 高隆起; 表面湿润, 不透明, 菌丝多无隔, 产生孢子囊及孢囊孢子	菌落白色圆形, 边缘完整, 气生菌丝稍隆起; 中央菌丝较密, 边缘菌丝疏散, 呈辐射状生长。菌丝分枝有隔且隔膜较多, 未发现产孢结构	菌落圆形, 边缘完整; 中央呈灰色; 围绕中央有白色毡状气生菌丝隆起; 新生基内菌丝多分枝无隔, 气生菌丝有隔, 无产孢结构	菌落黑色近圆形, 边缘不规则, 中央微隆, 侧面呈乳头状, 无光泽, 表面颗粒状, 干燥。有隔菌丝, 有大量的分生孢子梗, 分生孢子多, 小而圆	菌落圆形, 边缘完整至波状; 正反面颜色一致; 扁平, 有少量气生菌丝; 表面湿润半透明, 菌丝疏散生长。有隔菌丝分枝, 未发现产孢结构

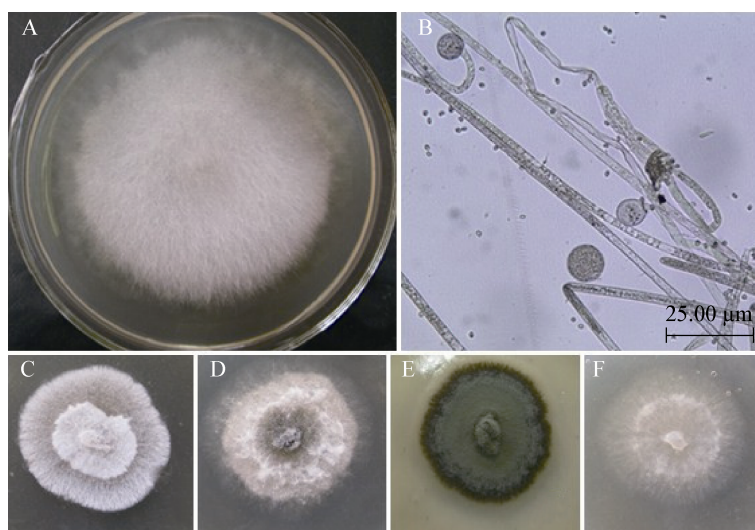


图 1 5 株菌株在 PDA 培养基上的菌落形态以及 1-1 的显微结构

Figure 1 Morphologies of five fungi on PDA and microstructure of 1-1 isolate

注: A、B 分别是 1-1 的菌落及显微结构; C-F 分别是菌株 1-11、2-17、3-13 及 4-7。

Note: A: The colony of 1-1; B: The microstructure of 1-1; C-F: The colonies of 1-11, 2-17, 3-13 and 4-7 respectively.

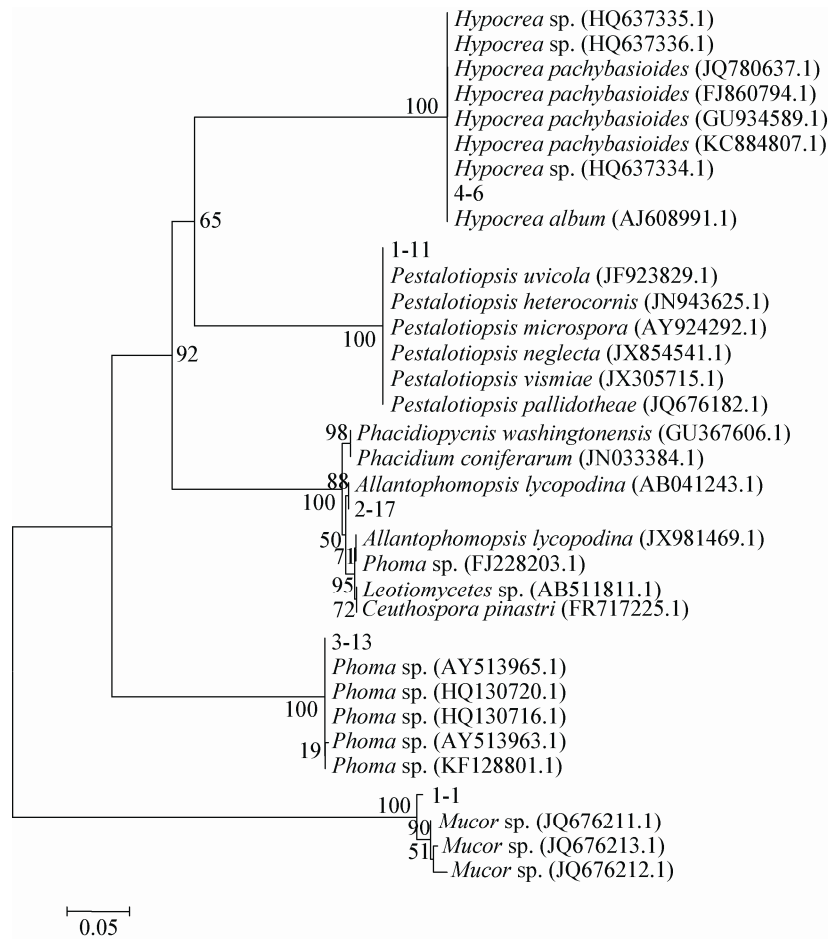


图 2 5 种真菌与其他近缘种的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic Neighbor-Joining tree based on ITS sequence of five fungi

菌株 1-11 与拟盘多毛孢属真菌均具有很高的相似性(99%–100%), 与 *Pestalotia uvicola* (JF923829.1)、*Pestalotia heterocornis* (JN943625.1)、*Pestalotiopsis microspora* (AY924292.1)、*Pestalotiopsis neglecta* (JX854541.1)、*Pestalotiopsis vismiae* (JX305715.1)、*Pestalotiopsis pallidotheae* (JQ676182.1)聚为一族, 结点可信度为 100%。经形态学鉴定及 DNA 序列分析, 将 1-11 菌株鉴定为 *Pestalotiopsis* sp.。

菌株 2-17 与 *Allantophomopsis lycopodina* (AB041243.1)在一个分支上, 一致性最高为 100%, 结点可信度为 89%, 经形态学鉴定及 DNA 序列分析, 将 2-17 鉴定为 *Allantophomopsis* sp.。3-13 菌株与 GenBank 登录号为 KF128801.1、AY513965.1 等

几种茎点霉属(*Phoma* sp.)在同一分支上, 可信度为 100%, 将其鉴定为 *Phoma* sp.; 菌株 4-6 与肉座菌属均有很高的相似性($\geq 99\%$), 形态学鉴定及 DNA 序列分析, 将 4-6 鉴定为 *Hypocrea* sp.。

2.3 总有机物质(TOM)的质量损失

5 种真菌分解针叶的 TOM 质量损失率趋势基本一致(图 3), 随着时间延长而不断增加, 到后期质量损失率趋向稳定。由图 3 可知, 60 d 内, *Pestalotiopsis* sp.引起针叶质量损失率最高, 达 15.77%; 其次是 *Allantophomopsis* sp., 为 13.33%; *Hypocrea* sp.、*Phoma* sp.、*Mucor* sp.相对较低, 分别为 11.17%、9.51%、6.63%。对照组针叶的 TOM 质量损失率在小范围内波动, 可能是高温灭菌造成了针叶少量分解。

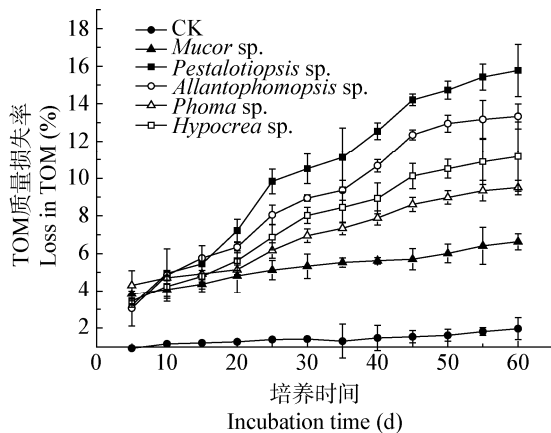


图3 针叶在5种真菌降解过程中TOM质量损失率
Figure 3 Loss in TOM during the decomposition of needle litter by five fungi

2.4 纤维素酶及半纤维素降解酶活性变化

真菌在分解针叶的过程中,不同菌分泌的内切葡聚糖酶活性不同(图4)。内切葡聚糖酶活性大小为: *Pestalotiopsis sp.* > *Allantophomopsis sp.* > *Hypocrea sp.* > *Mucor sp.* > *Phoma sp.*。5种菌均在第20天达到峰值,第40天左右再一次达到峰值。空白对照检测到少量的还原糖,可能由于针叶经高温灭菌后会释放一定量的还原糖,以此满足培养初期菌株的生长需求。

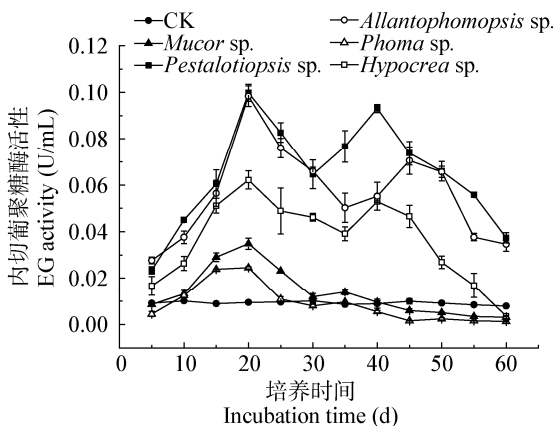


图4 5种真菌在降解过程中分泌内切葡聚糖酶活性变化
Figure 4 EG activities during the decomposition of litter by five fungi

真菌在分解针叶的过程中,不同菌分泌的木聚糖酶活性不同。*Allantophomopsis sp.*产生的木聚糖酶活性最高,其次分别是 *Pestalotiopsis sp.*、*Hypocrea sp.*、*Mucor sp.*、*Phoma sp.*。5种菌均出现两次峰值。第一次在第20天左右,第二次峰值出现在第40天左右。除 *Pestalotiopsis sp.*和 *Allantophomopsis sp.*外,其余菌株均是第一次峰值大于第二次峰值(图5)。

2.5 木质素降解酶活性变化

5种真菌中, *Mucor sp.*和 *Phoma sp.*未产生木质素过氧化物酶。*Pestalotiopsis sp.*在第40天出现峰值,为5.1613 IU,随后酶活逐渐降低,第60天降低至0.3011 IU; *Allantophomopsis sp.*在第45天达到峰值4.8387 IU; *Hypocrea sp.*在第25天测得酶活性,并在培养的第40天出现最高值5.9677 IU(图6)。

除 *Allantophomopsis sp.*外,其余4种菌没有测到MnP。*Allantophomopsis sp.*在第20天和第40天出现峰值,分别为10.9398 IU和11.4286 IU,在后期,酶活下降(图7)。

2.6 酸性磷酸酶(AP)的变化

在降解过程中,5种菌株酸性磷酸酶活性高低为: *Pestalotiopsis sp.* > *Hypocrea sp.* >

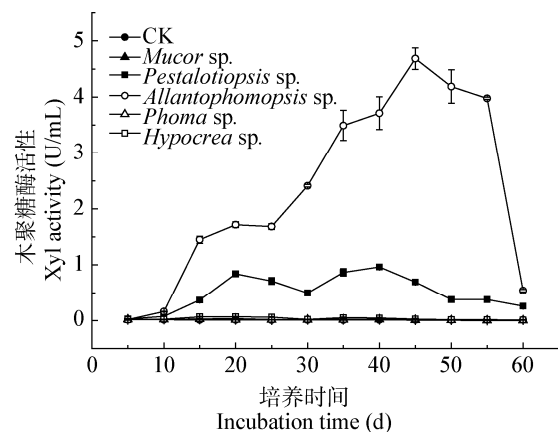


图5 5种真菌在降解过程中分泌木聚糖酶活性变化
Figure 5 Xyl activities during the decomposition of litter by five fungi

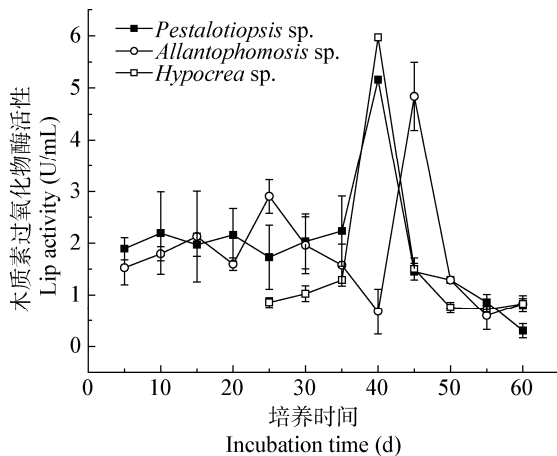


图6 3种真菌在降解过程中分泌木质素过氧化物酶活性变化

Figure 6 LiP activities during the decomposition of litter by three fungi

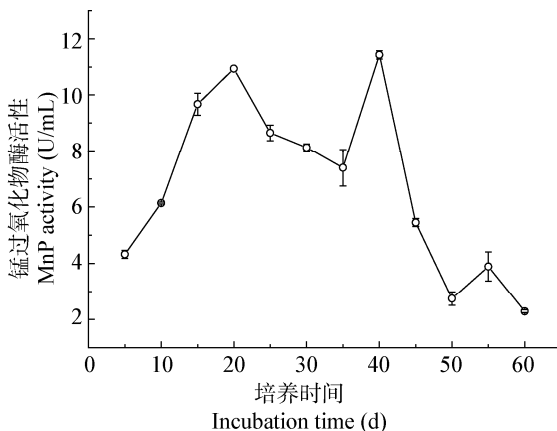


图7 *Allantophomopsis sp.*在降解过程中分泌锰过氧化物酶活性变化

Figure 7 MnP activities during the decomposition of litter by *Allantophomopsis sp.*

Allantophomopsis sp.>*Phoma sp.*>*Mucor sp.*。5株真菌均出现两次峰值,*Pestalotiopsis sp.*和*Hypocrea sp.*两株菌大大高于其余3株。在整个降解过程中,*Mucor sp.*的酸性磷酸酶活性最低,活性范围约在0.5–1.0 IU(图8)。

2.7 酶活相关性分析及酶活与TOM质量损失率相关性分析

在针叶降解的过程中,针叶质量损失与酶活关系以及酶相互间的关系均受真菌种类的影响(表

2)。*Mucor sp.*分泌的EG酶活性与Xyl($r=0.854^{**}$)和AP($r=0.750^{**}$)存在极显著的正相关关系,分泌的Xyl酶活性变化与AP显著正相关($r=0.701^{*}$),TOM质量损失率与几种酶活性之间存在一定的负相关,但相关性不显著;*Pestalotiopsis sp.*分泌的EG酶活性变化与Xyl($r=0.929^{**}$)极显著正相关,与AP显著正相关($r=0.617^{*}$),TOM与EG和Xyl酶活性变化存在一定的正相关,但相关性不显著;*Allantophomopsis sp.*引起的TOM质量损失率与分泌的Xyl酶活性变化显著正相关($r=0.703^{*}$),与EG正相关,但与其余3种酶呈不显著的负相关,该菌分泌的EG酶活性变化与AP极显著正相关($r=0.777^{**}$),LiP和MnP酶活性变化与其余酶均有一定的正相关关系;*Phoma sp.* TOM质量损失率变化与EG($r=-0.712^{**}$)和Xyl($r=-0.922^{**}$)酶呈现极显著的负相关关系,分泌的EG酶活性变化与AP极显著正相关($r=0.714^{**}$);*Hypocrea sp.*分泌的EG酶活性与Xyl($r=0.809^{**}$)极显著相关,与AP($r=0.687^{*}$)显著正相关。结果表明,菌株分泌的AP酶活性与TOM质量损失率负相关;EG酶活性与Xyl酶活性存在一定的正相关关系,且EG和Xyl两种酶活性与AP酶均存在一定的正相关关系,特别是EG与AP,正相关显著,3种酶存在协同作用;木质素降解酶之间及与AP之间有一定的协同作用。

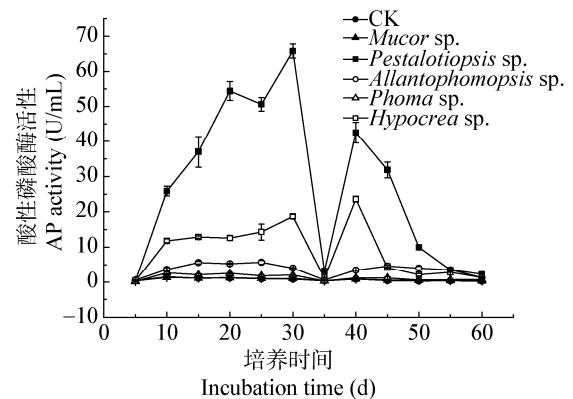


图8 5种真菌在降解过程中分泌酸性磷酸酶活性变化
Figure 8 AP activities during the decomposition of litter by five fungi

表 2 5 种真菌酶活性与 TOM 质量损失率间的相关系数
Table 2 Correlation coefficient between the loss in TOM and enzyme activities in the five fungi

菌株 Strains	指标 Indices	TOM	EG	Xyl	LiP	MnP	AP
<i>Mucor</i> sp.	TOM	1	-0.539	-0.519	-	-	-0.535
	EG	-	1	0.854**	-	-	0.750**
	Xyl	-	-	1	-	-	0.701*
	AP	-	-	-	-	-	1
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	TOM	1	0.205	0.316	-0.240	-	-0.220
	EG	-	1	0.929**	0.501	-	0.617*
	Xyl	-	-	1	0.514	-	0.459
	LiP	-	-	-	1	-	0.413
	AP	-	-	-	-	-	1
<i>Allantophomopsis</i> sp.	TOM	1	0.032	0.703*	-0.070	-0.410	-0.020
	EG	-	1	0.323	0.415	0.565	0.777**
	Xyl	-	-	1	0.187	0.012	0.190
	LiP	-	-	-	1	0.091	0.418
	MnP	-	-	-	-	1	0.477
	AP	-	-	-	-	-	1
<i>Phoma</i> sp.	TOM	1	-0.712**	-0.922**	-	-	-0.520
	EG	-	1	0.523	-	-	0.714**
	Xyl	-	-	1	-	-	0.358
	AP	-	-	-	-	-	1
<i>Hypocrea</i> sp.	TOM	1	-0.260	-0.380	0.372	-	-0.250
	EG	-	1	0.809**	0.276	-	0.687*
	Xyl	-	-	1	0.096	-	0.483
	LiP	-	-	-	1	-	0.503
	AP	-	-	-	-	-	1

Note: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

3 讨论

对分离的 5 种真菌进行形态观察和 rDNA-ITS 序列比较分析, 5 种真菌确定为 *Mucor* sp.、*Pestalotiopsis* sp.、*Allantophomopsis* sp.、*Phoma* sp. 和 *Hypocrea* sp.。除 *Mucor* sp. 为接合菌门外, 其余 4 种菌为子囊菌门。在 60 d 内, 5 种菌引起针叶质量损失率为 6.63%–15.77%。近年来, 关于真菌对凋落物的降解能力做了较多的研究(表 3)。引起松

落针病的散斑壳菌对针叶也有一定的分解能力^[22], *Lophodermium conigenum*、*L. pinastri*、*L. kumaunicum*、*L. sichuanense* 和 *L. erlangshanense* 5 种散斑壳 60 d 内引起华山松针叶质量损失率在 8.5%–11.8% 之间^[23]。一般情况下, 担子菌降解能力强于子囊菌^[24], *Collybia dryophila* 及 *Trametes versicolor* 对冷杉的降解能力远高于 *Trichoderma viride*^[25]。在 12 周内, *Gymnopus* sp.、*Rhodocollybia*

表3 落叶在真菌降解过程中的质量损失率
Table 3 Weight loss of litter decomposed by fungi

	菌株 Taxa	质量损失率 TOM (%)	降解时间 Incubation (d)	降解底物 Substrate	参考文献 Reference
担子菌 Basidiomycetes	<i>Collybia dryophila</i>	13.80	90	<i>Abies</i>	Osono 等 ^[25]
	<i>Trametes versicolor</i>	12.00	90	<i>Abies</i>	Osono 等 ^[25]
	<i>Gymnopus</i> sp.	38.00	84	<i>Quercus petraea</i>	Valášková 等 ^[26]
	<i>Rhodocollybia butyracea</i>	32.00	84	<i>Quercus petraea</i>	Valášková 等 ^[26]
	<i>Hypholoma fasciculare</i>	23.00	84	<i>Quercus petraea</i>	Valášková 等 ^[26]
子囊菌 Ascomycetes	<i>Lophodermium conigenum</i>	9.93	60	<i>Pinus armandii</i>	杨春琳等 ^[23]
	<i>L. pinastri</i>	11.80	60	<i>Pinus armandii</i>	杨春琳等 ^[23]
	<i>L. kumaunicum</i>	11.00	60	<i>Pinus armandii</i>	杨春琳等 ^[23]
	<i>L. sichuanense</i>	11.06	60	<i>Pinus armandii</i>	杨春琳等 ^[23]
	<i>L. erlangshanense</i>	8.50	60	<i>Pinus armandii</i>	杨春琳等 ^[23]
	<i>Alternaria</i> sp.	17.03	45	<i>Pinus sylvestris</i>	宋福强等 ^[12]
	<i>Penicillium</i> sp.	13.00	45	<i>Pinus sylvestris</i>	宋福强等 ^[12]
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	13.00	45	<i>Pinus sylvestris</i>	宋福强等 ^[12]
	<i>Trichoderma viride</i>	3.20	90	<i>Abies</i>	Osono 等 ^[25]
	<i>Pestalotiopsis neglecta</i>	5.10	90	<i>Larix leptolepis</i>	Osono 等 ^[27]
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	22.80	45	<i>Pinus massoniana</i>	郝杰杰等 ^[11]
	<i>Xylaria allantoidea</i>	29.60	84	<i>Dipterocarpus</i>	Osono 等 ^[28]
	<i>Pestalotiopsis neglecta</i>	7.40	90	<i>Betula</i>	Osono 等 ^[25]

butyracea 及 *Hypholoma fasciculare* 3种腐生担子菌引起的栎叶质量损失分别为38%、32%和23%^[26]；90 d内，*Pestalotiopsis neglecta*对桦木降解能力高于对落叶松的降解^[25,27]。由此可见，同类型真菌降解阔叶的能力高于降解针叶的能力。在短期内真菌对针叶的降解率比较低，宋福强等用 *Alternaria* sp.、*Penicillium* sp.和 *Pestalotiopsis* sp. 3种子囊菌分别分解樟子松落叶45 d，总有机物质质量损失率在13%–17%^[12](表3)。在森林生态系统中，凋落物分解是在许多真菌群作用下完成的，受到凋落物可利用性(有机质、营养物质)和环境(温度、湿度)的影响^[27]。因此，在不同条件下，真菌引起的凋落物质量损失存在差异。

5种真菌对华山松松针都具有一定的分解能

力，菌株分泌的EG酶、Xyl酶及AP酶相互之间存在协同作用。*Pestalotiopsis* sp.分泌的EG酶活性较高，且EG酶与Xyl酶、LiP酶、AP酶之间存在协同作用；*Allantophomopsis* sp.能分泌活性相对较高的MnP酶和Xyl酶，且EG酶与其余4种酶之间存在协同作用。两种菌的针叶TOM质量损失率均与EG酶活及Xyl酶活存在正相关。木质素降解酶类的分泌及较强的酶协同作用是 *Pestalotiopsis* sp.与 *Allantophomopsis* sp.两种菌株引起质量损失率高于其他菌株的原因。*Hypocrea* sp.分泌的EG酶、Xyl酶活性低，但能产生LiP酶且有较高的AP酶活，因此引起的质量损失又要高于 *Mucor* sp.、*Phoma* sp.。在植物残体降解中，真菌分泌的酸性磷酸酶可以促进有机磷化合物水解成无机磷，其活性大小与

微生物可利用的磷含量有关^[29]。5 种菌分泌的 AP 酶活性与针叶 TOM 质量损失率存在一定的负相关, 可能是在降解过程中, 未降解针叶中无机磷的缺乏促使菌株分泌 AP 酶。*Phoma* sp. 和 *Mucor* sp. 未检测到 LiP 及 MnP 酶活, *Pestalotiopsis* sp. 和 *Hypocrea* sp. 未检测到 MnP 酶活。这可能因为这些菌不能产生相应的酶, 也有可能分泌的酶活性很低, 检测方法灵敏度不高。在降解后期 Xyl 酶、MnP 酶及 AP 酶活性升高可能是由于菌丝的自溶使原来束缚在细胞膜上相应的胞内酶释放。

根据真菌对凋落物成分的选择性将真菌分为三大类: 纤维素降解真菌、木质纤维素降解真菌和可溶性糖类真菌^[27]。*Pestalotiopsis* sp.、*Allantophomopsis* sp. 和 *Hypocrea* sp. 能产生木质纤维素降解酶并能引起较高的质量损失率, 因此这 3 株菌可视为木质纤维素降解真菌。*Lophodermium pinastri* (Rhytismatales) 也属于此类^[30]。有些真菌无去木质化作用, 只能降解纤维素, 为纤维素降解真菌, 如 *Pestalotiopsis neglecta*^[25,27]、*Trichoderma virid*^[25]。由于针叶可溶性糖含量未知, 因此不能对另外两株菌下明确的结论。据报道, 接合菌对针叶的分解能力较弱, 引起的针叶质量损失率很小, 如 *Umbelopsis ramanniana*、*Mortierella alpina*^[25] 和 *Mucor hiemalis*^[31]。本文中 *Mucor* sp. 也存在同样的情况, 这些可能是可溶性糖类真菌。

参 考 文 献

- [1] Luo J. Decomposition rate of the litter of artificial forest of *Liquidambar formosana* and its effects of soil nutrient[D]. Changsha: Master's Thesis of Central South University of Forestry & Technology, 2009 (in Chinese)
罗佳. 枫香人工林凋落物分解速率及其对土壤养分的影响[D]. 长沙: 中南林业科技大学硕士学位论文, 2009
- [2] Waring BG. Exploring relationships between enzyme activities and leaf litter decomposition in a wet tropical forest[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2013, 64: 89-95
- [3] Pan H. Fungi diversity in the rhizosphere of *Rhizophora stylosa* and construction a composite microbial system with efficient cellulose degradation[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2012 (in Chinese)
潘虎. 红海榄根际真菌多样性研究及纤维素降解复合菌群的构建[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2012
- [4] Sun ZT, Zhao XY, Liu JJ, et al. Microbial xylanase and their industrial application[J]. Biotechnology, 2007, 17(2): 93-97 (in Chinese)
孙振涛, 赵祥颖, 刘建军, 等. 微生物木聚糖酶及其应用[J]. 生物技术, 2007, 17(2): 93-97
- [5] Sugiura M, Hirai H, Nishida T. Purification and characterization of a novel lignin peroxidase from white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 224(2): 285-290
- [6] Yan HB, Chi YJ. Detection on laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase in ligninolytic enzymes of *Pleurotus djamor*[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2009(12): 154-158 (in Chinese)
闫洪波, 池玉杰. 红平菇木质素降解酶系统漆酶、锰过氧化物酶及木质素过氧化物酶的检测[J]. 林业科学, 2009(12): 154-158
- [7] Zhou SQ, Lin YQ. Advances of investigation on the degradation of the ligin and cellulose by white rot fungi[J]. Environmental Technology, 2003(4): 29-33 (in Chinese)
周少奇, 林云琴. 白腐菌降解纤维素和木质素的研究进展[J]. 环境技术, 2003(4): 29-33
- [8] Jiang XJ, Wang CH, Peng YX, et al. Detection of the laccase and MCMASE activities of *Agrocybe cylindracea* during its growth[J]. Northern Horticulture, 2013(11): 149-151 (in Chinese)
姜性坚, 王春晖, 彭运祥, 等. 白色茶树菇生长发育中漆酶与纤维素酶活力的测定[J]. 北方园艺, 2013(11): 149-151
- [9] Xie J, Ren L, Zhang YZ. Production of lignocellulolytic enzymes and wheat straw degradation of *Pleurotus*[J]. Journal of Lanzhou University (Natural Science Edition), 2002, 38(2): 121-126 (in Chinese)
谢君, 任路, 张义正. 侧耳菌产生木质纤维素酶及其降解植物生物物质的研究[J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2002, 38(2): 121-126
- [10] Du HP, Song RQ, Wang YQ. Comparative study on the lignocellulolytic enzymes produced by fungi[J]. Forestry Science & Technology, 2006, 31(4): 20-24 (in Chinese)
杜海萍, 宋瑞清, 王钰祺. 几种真菌产木质素降解酶的比较研究[J]. 林业科技, 2006, 31(4): 20-24
- [11] Hao JJ, Song FQ, Tian XJ, et al. Decomposition of *Pinus massoniana* needle driven by deuteromycetes—dynamics of lignocellulolytic enzymes[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2006, 42(11): 69-75 (in Chinese)
郝杰杰, 宋福强, 田兴军, 等. 几株半知菌对马尾松落叶的分解——木质纤维素酶的活性动力学[J]. 林业科学, 2006, 42(11): 69-75
- [12] Song FQ, Fan XX, Zhang XX, et al. Activies of enzymes during the litter of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* degradation by three strains of mycelial Fungi[J]. Microbiology China, 2009, 36(5): 635-639 (in Chinese)
宋福强, 范晓旭, 张星星, 等. 三株丝状真菌分解樟子松凋落物酶活性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(5): 635-639
- [13] Song FQ, Tian XJ, Hao JJ, et al. Decomposing ability of filamentous fungi on leaf litter in *Quercus variabilis* forest[J]. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(1): 89-95 (in Chinese)
宋福强, 田兴军, 郝杰杰, 等. 栓皮栎林下主要丝状真菌的分解能力[J]. 生态学报, 2005, 25(1): 89-95
- [14] Feng L, Song FQ. The impacts of combination of

- ectomycorrhizal fungi with filamentous fungi on decomposition of Korean-pine litterfall[J]. Ecological Science, 2011, 30(3): 315-320 (in Chinese)
冯乐, 宋福强. 外生菌根真菌与丝状真菌混合对红松凋落物降解效能的影响[J]. 生态科学, 2011, 30(3): 315-320
- [15] Criquet S, Ferre E, Farnet AM. Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter: influence of biotic and abiotic factors[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36(7): 1111-1118
- [16] Arora DS, Chander M, Gill PK. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2002, 50(2): 115-120
- [17] Zhang SB, Wang YS, Zou GY. Comparison of cellulase activity of different cellulose-decomposing microbes[J]. Beijing Agriculture, 2010(36): 47-49 (in Chinese)
张淑彬, 王幼珊, 邹国元. 不同纤维素分解菌纤维素酶活性比较试验[J]. 北京农业, 2010(36): 47-49
- [18] Xu XL. Preliminary studies on fungal degradation and litters of *P. armandii* located in erlang mountain[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2013 (in Chinese)
许秀兰. 二郎山华山松凋落针叶及真菌降解作用的初步研究[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2013
- [19] Li CX, Liu SC, Fang GG. Study on measuring methods of xylanase activity[J]. Journal of Northwest University of Light Industry, 2002, 20(6): 95-96 (in Chinese)
李彩霞, 刘书钊, 房桂干. 木聚糖酶酶活测定方法的探讨[J]. 西北轻工业学院学报, 2002, 20(6): 95-96
- [20] Tien M, Kirk TK. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984, 81(8): 2280-2284
- [21] Zhou JY, Zhang FQ, Shu YC. The determination of MnP activity by using guaiacol as substrate[J]. Journal of Cellulose Science and Technology, 1993, 1(1): 34-37 (in Chinese)
周金燕, 张发群, 舒远才. 愈创木酚法测定锰过氧化物酶活力[J]. 纤维素科学与技术, 1993, 1(1): 34-37
- [22] Shi GK, Luo JT, Hou CL. Species of the Rhytismataceae on *Pinus armandii*[J]. Mycosystema, 2010, 29(2): 159-163 (in Chinese)
师光开, 罗建堂, 侯成林. 华山松上的斑痣盘菌[J]. 菌物学报, 2010, 29(2): 159-163
- [23] Yang CL, Xu XL, Tian S, et al. Laboratory decomposition research of Lophodermium on the litter needles from *Pinus armandii*[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition), 2014, 38(2): 77-82 (in Chinese)
杨春琳, 许秀兰, 田莎, 等. 散斑壳菌对华山松凋落针叶的室内分解[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2014, 38(3): 77-82
- [24] Fukasawa Y, Osono T, Takeda H. Wood decomposing abilities of diverse lignicolous fungi on nondecayed and decayed beech wood[J]. Mycologia, 2011, 103(3): 474-482
- [25] Osono T, Takeda H. Fungal decomposition of Abies needle and Betula leaf litter[J]. Mycologia, 2006, 98(2): 172-179
- [26] Valášková V, Šnajdr J, Bittner B, et al. Production of lignocellulose-degrading enzymes and degradation of leaf litter by saprotrophic basidiomycetes isolated from a *Quercus petraea* forest[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(10): 2651-2660
- [27] Osono T, Fukasawa Y, Takeda H. Roles of diverse fungi in larch needle-litter decomposition[J]. Mycologia, 2003, 95(5): 820-826
- [28] Osono T, To-Anun C, Hagiwara Y, et al. Decomposition of wood, petiole and leaf litter by Xylaria species from northern Thailand[J]. Fungal Ecology, 2011, 4(3): 210-218
- [29] Luo Z. Influence of arbuscular mycorrhizal fungus inoculation on plant residue degradation[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2013 (in Chinese)
罗珍. 接种丛枝菌根真菌对植物残体降解的影响[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2013
- [30] Boberg JB, Ihrmark K, Lindahl BD. Decomposing capacity of fungi commonly detected in *Pinus sylvestris* needle litter[J]. Fungal Ecology, 2011, 1(4): 110-114
- [31] Osono T, Takeda H. Comparison of litter decomposing ability among diverse fungi in a cool temperate deciduous forest in Japan[J]. Mycologia, 2002, 94(3): 421-427