

内生真菌对杉木人工林下土壤酶活性的影响

李冠军¹, 吴承祯^{2*}, 梁安洁¹, 洪滔¹, 陈灿¹, 谢安强¹, 洪伟¹, 林勇明¹, 李键^{1*}

(1. 福建农林大学林学院, 福建 福州 350002; 2. 武夷学院生态与资源工程学院, 福建 南平 354300)

摘要: 为探讨内生真菌对杉木人工林下土壤酶活性的影响, 筛选出能够提高土壤酶活性的菌株及添加方式, 以促进凋落物分解。采用 3 株杉木内生真菌 CG2 青霉菌 (*Penicillium* sp.) (A 菌)、AY13 黄色镰刀菌 (*Fusarium culmorum*) (B 菌)、AJ14 踝节霉菌 (*Talaromyces* sp.) (C 菌) 的单菌株和混菌株, 按不同方式 (菌丝、菌液) 浇施到装有杉木凋落叶和土壤的钵内, 在处理 10, 60, 120 d 后分别取样, 测定土壤酶活性和凋落叶质量的变化情况。结果表明: 多酚氧化酶活性在混菌丝处理下始终保持在较高水平, 菌丝 (液) 处理均提高了脲酶、酸性磷酸酶活性, 蔗糖酶前期 (10 d) 活性高于后期 (120 d)。菌液 C 处理下 (120 d) 纤维素酶、木质素过氧化物酶和酸性磷酸酶均与对照存在显著差异 ($P < 0.05$), 分别比对照高 58.12%, 43.79% 和 163.65%, 混菌丝 BC 处理下 (120 d) 多酚氧化酶活性与对照有显著差异, 比对照高 36.74%, 混菌丝 AB 处理下蔗糖酶活性与对照有显著差异, 比对照高 162.89%; 混菌液 AC 处理下 (120 d) 脲酶活性与对照有显著差异, 比对照高 69.78%, 凋落叶质量损失率在多种酶共同作用下提高。综上所述, 菌液 C 能够显著提高纤维素酶、过氧化物酶和酸性磷酸酶活性, 混菌丝 BC 和 AB 分别对提高多酚氧化酶和蔗糖酶活性有显著作用, 混菌液 AC 则能显著提高脲酶活性。

关键词: 杉木凋落叶; 内生真菌; 土壤酶活性; 质量损失率

中图分类号: Q 938.1+3

文献标志码: A

土壤酶是土壤生态系统的重要组成部分, 能够参与森林凋落物降解、腐殖质和有机化合物的合成与分解^[1], 是评价土壤环境质量优劣和肥力高低的生物指标^[2], 它主要来源于植物残体、根系分泌和土壤微生物活动分泌^[3], 其活性与放线菌、细菌以及真菌类群有着密切关

收稿日期: 2018-08-17 **录用日期:** 2018-11-26

基金项目: 国家自然科学基金 (31400533); 福建农林大学科技创新专项基金 (CXZX2016055); 福建农林大学林学院林学高峰学科优秀博硕士培养工程 (71201800781)

***通信作者:** hmilycau@163.com(李键); fjwcz@126.com(吴承祯)

系^[4-5]。青霉菌(*Penicillium*)在降解木质素过程中会分泌大量漆酶^[6]，踝节霉菌(*Talaromyces*)的某些化学成分可以抑制单胺氧化酶活性^[7]，黄色镰刀菌(*Fusarium culmorum*)侵染寄主植物时，受侵染组织中的几丁质酶、超氧化物歧化酶和 β -1,3-葡聚糖酶等酶活性都呈现出不同程度的上升^[8]。

杉木(*Cunninghamia lanceolata*)是中国南方地区特有的树种，具有速生、干直和耐腐蚀等特点，是中国南方林业生产发展的关键。然而杉木人工林面临着一系列的问题，随着杉木纯林林龄的增加，土壤磷酸酶、过氧化氢酶、脲酶和蛋白酶的活性减少，二代杉木林土壤酶活性低于一代杉木林^[9]，二、三代杉木林表层土壤微生物数量低于一代杉木林，硝化作用、氨化作用、纤维素分解和固氮作用强度都显著下降^[10]，连栽后土壤微生物数量减少、土壤有关酶类活性降低，影响了土壤养分的转化速度和有效含量^[11]。为此，学者们开展了有关土壤酶活性变化的研究，在华北落叶松人工林内开展施氮、磷肥研究时发现土壤脲酶、磷酸酶和蔗糖酶活性显著提高^[12]，成向荣等^[13]研究表明间伐对土壤酶活性具有复杂的影响，土壤酶活性的变化与间伐后微生物发育有关。间伐、施肥虽然能够对林下土壤酶活性产生积极影响，但间伐工程量大，而长期单一施肥会降低肥料利用率、土壤理化性质恶化、微生物数量减少，破坏自然生态过程^[14-15]。前人研究表明，某些内生真菌离开宿主后在土壤中依然存在一定活性^[16]，单独或与其它微生物共同作用下可以对土壤酶活性产生影响^[17-18]，能够降解木质素、纤维素等大分子有机物。所以找寻有较强分解能力和能提高土壤酶活性的内生真菌，将其浇施到林下，对土壤进行生态修复，可能对克服林木连栽障碍有一定帮助。课题组前期已证实3株内生真菌CG2青霉菌(A菌)、AY13黄色镰刀菌(B菌)和AJ14踝节霉菌(C菌)能够促进凋落叶分解^[19]，但内生真菌促进凋落叶分解的机制尚不明确，对添加内生真菌后土壤酶活性变化，不同菌株和不同添加方式是否均可以提高土壤酶活性还不清楚。因此，本研究以杉木凋落叶、林下土壤为材料，通过比较不同处理方式下(单菌、混菌、菌丝和菌液)土壤纤维素酶(EC:3.2.1.4)、蔗糖酶(EC:2.4.1.5)、多酚氧化酶(EC:1.10.3.2)、木质素过氧化物酶(EC:1.11.1.7)、脲酶(EC:3.5.1.5)以及酸性磷酸酶(EC:3.1.3.2)的活性，筛选出能显著提高土壤酶活性的菌株及添加方式，以缓解杉木连栽障碍，促进杉木人工林可持续经营，同时为植物内生真菌与土壤酶关系研究积累数据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

实验在福建农林大学森林生态研究所进行，试验地为 118°08'~120°31' E，25°15'~26°39' N，亚热带海洋性湿润气候，气候湿润，多年平均气温 19.6 °C，年平均日照时长为 1700~1980 h，年平均降雨量为 1342.5 mm，年平均相对湿度约 77% [20]。

1.2 供试土壤与凋落叶

采用 5 点取样法获得实验用土，在福建省福州市宦溪国有林场 15 a 杉木纯林地内（海拔高度 400 m、坡度 20°~27°、土层 100 cm 以上），随机设置小样方 10 个（1.5 m×1.5 m），清理地表杂物，取腐质层以下 0~20 cm 土壤，运回实验室后混匀过筛（2 mm），自然风干后，用于实验。实验土壤基本理化性质如下，有机质 2.78 g/kg、全氮 0.17 g/kg、全磷 0.11 g/kg、全钾 3.46 g/kg、速效磷 12.83 mg/kg、水解氮 58 mg/kg、速效钾 78 mg/kg、pH=3.5。实验所用杉木凋落叶在宦溪国有林场 15 a 杉木人工林下收集所得，实验采用自然光照、降水。

1.3 供试菌株制备

内生真菌 CG2 青霉菌（A 菌）、AY13 黄色镰刀菌（B 菌）和 AJ14 踝节霉菌（C 菌）均由福建省高校森林生态过程与经营重点实验室从杉木植株根、茎和叶材料分离试验获得并保存。

菌丝和菌液制备：把 PDA（马铃薯葡萄糖固体）培养基斜面上的 3 株真菌转接到新鲜的 PDA 培养基中，培养 7 d（恒温 28 °C）后倒入无菌水，用接种针将菌丝刮起转移到 PDB（马铃薯葡萄糖液体）培养基中，三角瓶（500 mL）装入 200 mL PDB 培养基，培养 4 d（恒温 28 °C、160 r/min）后，用 4 层纱布过滤三角瓶中的发酵产物，获得菌丝，用去离子水冲洗直到洗液澄清，作为实验菌丝。菌株代谢产物发酵液高温高压除菌后，作为实验菌液。

1.4 实验方法

参照胡云飞^[21]和陈晏^[22]的实验方法，实验分为两个周期进行，每个周期有两个月，于每周期开始的当天施菌（3 月 25 日和 5 月 26 日）。供试土壤分为 3 组，每组设置 13 个处理，真菌处理包括 A、B、C、AB、AC 和 BC 菌的菌丝处理（湿菌丝 10 g+蒸馏水 500 mL）和 A、B、C、AB、AC 和 BC 菌的菌液处理（灭菌发酵液 500 mL），对照处理为未添加内生真菌的空白（CK）对照（蒸馏水 500 mL），每个处理 3 个重复，每个重复装土量 4 kg，凋落物分解袋 1 袋。用尼龙网分解袋装 10 g 杉木凋落叶埋入实验盆钵（直径 25 cm，高 28 cm，可以排水）土壤 5 cm 处。分别于第 10（第 1 组）、60（第 2 组）、120 d（第 3 组）取不同处理下土壤、凋落叶样品。取对应盆钵内 0-10 cm 土壤 500 g 自然风干后过钢筛（2 mm），装袋

保存用于测定酶活性，取对应盆钵内分解袋中的凋落叶，将其清洗干净晾干后放入烘箱（65℃）烘干至恒重后粉碎、过筛，装袋保存用于测定凋落叶质量。

1.5 测定方法与数据处理

采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定土壤纤维素酶和蔗糖酶活性，以 2, 2'-连氨基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)简称 ABTS 为底物，用分光光度计法测多酚氧化酶活性，采用藜芦醇法、苯酚钠比色法、磷酸苯二钠比色法分别测定木质素过氧化物酶、脲酶和酸性磷酸酶活性^[23-24]。

凋落叶质量损失率=[(凋落叶的初始干重-凋落叶处理后的干重)/凋落叶初始的干重]×100%。

采用软件 Excel 2007 进行数据统计，SPSS 17.0 软件对不同真菌处理下土壤酶活性进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)，用多因素方差分析(Multiple factor ANOVA)检验内生真菌、分解时间和不同添加方式及其交互作用对土壤酶活性和凋落叶质量损失率的影响。

2 结果与分析

2.1 不同内生真菌对土壤纤维素酶和蔗糖酶活性的影响

对不同处理的土壤纤维素酶活性测定结果表明：菌丝处理下，纤维素酶活性变化基本一致，在 120 d 时达到最大值，AC、BC 与 B 处理与对照有显著差异（表 1），与对照相比，分别提高 9.01%、24.83%和降低 9.06%。菌液处理下，A、B 处理酶活性在 10~60 d 降低，60~120 d 上升，其余处理酶活性随时间延长提高且最大值在 120 d，C、B 处理与对照有显著差异，分别比对照高 56.46%和低 37.46%。除菌株 AC 在不同添加方式（菌丝、菌液）下对土壤酶活性的影响无显著差异外，其它菌株均受不同添加方式影响而使得酶活性有显著差异。

不同真菌处理下蔗糖酶活性变化趋势相似，在 10~60 d 酶活性降低，60~120 d 上升。各处理在 10 d 时酶活性最高（表 2），菌丝 A（10 d）处理下酶活性在实验期内最高，与对照有显著差异，比对照高 199.76%。菌株 AB 处理下酶活性在实验期内始终保持在较高水平，与对照有显著差异，菌丝 AB 处理分别比对照高 175.42%（10 d）、153.16%（60 d）和 162.90%（120 d）。酶活性在后期（120 d）降低，但仍高于对照，不同真菌添加方式对酶活性同样存在影响，大部分菌丝处理高于菌液处理，如菌丝 AB 处理（120 d）显著高于菌液 AB 处理，这可能是丝状菌株在凋落叶上定殖生存，分泌了大量的蔗糖酶，使得酶活性提高^[25]。

表 1 不同处理方式下土壤纤维素酶活性的差异

Tab. 1 Differences in soil cellulase activity under different treatments (mg · g⁻¹ · d⁻¹)

不同处理	菌丝			菌液		
	10 d	60 d	120 d	10 d	60d	120 d
A	18.95±2.65abc	21.98±0.90Ab	24.15±1.42Ab	18.81±1.45a	15.62±2.04Ba	16.81±1.99Ba
B	16.34±2.13Aa	19.16±2.00.Aa	21.39±2.84Aa	23.50±1.11Bb	13.58±2.57Ba	14.71±2.27Ba
C	21.43±1.35bc	21.52±0.70Aab	23.22±0.73Aab	23.26±1.94b	31.53±2.72Bd	36.80±1.70Bd
AB	22.01±2.10bc	22.54±0.55Ab	25.64±0.17Ab	19.53±1.70a	27.44±1.53Bc	32.32±2.84Bc
AC	23.16±2.38c	25.88±1.50c	29.36±1.28c	18.64±2.95a	25.21±1.44bc	28.29±1.67bc
BC	18.99±2.79abc	25.39±0.54c	29.10±0.20Ac	21.21±1.94ab	22.80±3.22b	25.15±2.66Bb
CK	18.43±2.29ab	21.69±1.86b	23.52±2.25ab	18.43±2.29a	21.69±1.86b	23.52±2.25b

注：小写字母代表相同时期不同菌种间的差异显著(Duncan test, $P < 0.05$), 大写字母代表相同时期同一菌种菌丝和菌液间的差异显著 (Duncan test, $P < 0.05$), 下图表同。

表 2 不同处理方式下土壤蔗糖酶活性的差异

Tab. 2 Differences in soil sucrose activity under different treatments (mg · g⁻¹ · d⁻¹)

不同处理	菌丝			菌液		
	10 d	60 d	120 d	10 d	60 d	120 d
A	12.32±0.39Ad	5.57±0.97Ac	6.17±1.28Ab	4.90±0.55Bb	3.52±0.56Ba	3.92±0.55Ba
B	5.49±1.08b	3.52±0.27ab	3.89±0.28Aa	3.58±0.78a	3.09±0.10a	3.50±0.09Ba
C	3.99±0.91a	3.35±0.21ab	3.78±0.21a	4.42±0.22ab	3.60±0.53a	4.14±0.65a
AB	11.32±0.62d	8.00±0.64Ad	9.07±0.52Ac	11.04±0.65d	6.19±0.73Bb	7.28±1.00Bb
AC	8.71±0.58c	4.41±1.05b	4.35±1.09a	8.26±0.98c	3.44±0.47a	3.97±0.61a
BC	5.70±0.94Ab	3.29±0.25ab	3.61±0.37Aa	3.44±0.23Ba	3.71±0.77a	4.18±0.94Ba
CK	4.11±0.70a	3.16±0.07a	3.45±0.18a	4.11±0.70ab	3.16±0.07a	3.45±0.18a

2.2 不同内生真菌对土壤多酚氧化酶和木质素过氧化物酶活性的影响

对不同处理的多酚氧化酶活性测定结果表明：混菌处理下酶活性高于单菌、对照处理，酶活性显著提高。菌丝（AB、AC 和 BC）和菌液（AB、AC 和 BC）在 120 d 时均与对照有显著差异（表 3），与对照相比，依次分别提高 27.3%、30.75%、36.75%、29.2%、29.37% 和 24.24%，单菌丝（B、C）处理（120 d）同样与对照有显著差异，但比对照分别低 19.43% 和 29.82%。不同添加方式对多酚氧化酶活性有显著差异的处理主要表现在菌株 B（10 d）、菌株 C（60 和 120 d）和菌株 BC（60 和 120 d）。

不同处理对土壤木质素过氧化物酶活性影响不同，菌丝（A、C 和 AC）和菌液（AB 和 AC）（10 d）、菌液 A（10~120 d）和菌丝 AC（60 和 120 d）酶活性低于对照，仅菌丝 C（10 d）、菌丝 C、AC 和菌液 BC（60 d）、菌丝 AC 和菌液 BC（120 d）与对照无显著差异（表 4）。

120 d 时, 各处理的酶活性皆达到最大值, 菌丝 (B、AB) 和菌液 (C、AB) 与对照有显著差异, 分别比对照高 25.22%、23.63%、43.97% 和 37.84%。除菌株 B 处理下酶活性对不同添加方式 (菌丝、菌液) 无显著响应外, 其余真菌处理均受到添加方式的影响, 使得不同添加方式间酶活性存在显著差异, 如菌液 AB 处理的酶活性显著高于菌丝 AB (120 d), 说明了不同真菌添加方式对过氧化物酶活性存在影响。

表 3 不同处理方式下土壤多酚氧化酶活性的差异

Tab. 3 Differences in soil polyphenol oxidase activity under different treatments (nmol · g⁻¹ · min⁻¹)

不同处理	菌丝			菌液		
	10 d	60 d	120 d	10 d	60 d	120 d
A	171.00±5.12c	149.44±10.76b	157.91±11.61bc	150.6±21.04ab	136.25±14.93a	155.76±23.27ab
B	145.83±4.86Aa	126.66±15.59a	137.29±18.14ab	176.91±11.36Bc	122.16±18.71a	140.63±26.47a
C	164.89±10.50bc	113.74±4.46Aa	119.57±3.78Aa	173.97±6.87bc	166.15±1.58Bb	183.83±6.69Bb
AB	172.62±10.84c	189.54±6.23c	216.92±19.97d	152.93±15.76ab	124.27±0.55c	220.17±2.35c
AC	175.96±5.72c	195.42±1.75c	222.79±11.25d	160.98±11.47bc	195.09±3.67c	220.45±8.13c
BC	150.49±17.04ab	197.52±2.85Ac	233.03±1.50Ad	141.23±11.30a	190.11±2.49Bc	211.70±8.49Bc
CK	145.00±2.29a	159.70±3.95b	170.40±7.47c	145.00±2.29a	159.70±3.95b	170.40±7.47b

表 4 不同处理方式下土壤木质素过氧化物酶活性的差异

Tab. 4 Differences in soil lignin peroxidase activity under different treatments (nmol · g⁻¹ · min⁻¹)

不同处理	菌丝			菌液		
	10 d	60 d	120 d	10 d	60 d	120 d
A	921.27±55.99a	1537.75±79.50Ac	1639.79±75.68Ab	922.99±20.57a	1193.44±45.54Ba	1298.09±42.24Ba
B	1327.58±28.14Ac	1629.28±72.80a	1734.48±163.54b	1608.00±50.14Bd	1543.20±19.18c	1722.46±86.52c
C	1195.97±87.11Ab	1354.82±16.97b	1553.30±28.94Ab	1576.32±60.1Bd	1719.83±13.15Bd	1994.31±33.96Bd
AB	1391.23±49.63Ad	1508.23±64.57c	1712.55±10.05Ab	982.35±28.13Ba	1569.29±36.70c	1909.37±106.46Bd
AC	1001.56±71.66a	1230.40±26.63Aa	1320.04±70.99Aa	962.28±13.28a	1523.01±77.58Bc	1735.16±101.63Bc
BC	1410.44±26.78Ad	1501.34±85.15Ac	1618.30±14.19Ab	1486.43±14.21Bc	1300.88±72.29Bb	1472.36±12.62Bb
CK	1234.60±55.24bc	1282.96±33.43ab	1385.19±47.91a	1234.60±55.24b	1282.96±33.43b	1385.19±47.91b

2.3 不同内生真菌对土壤脲酶和酸性磷酸酶活性的影响

不同处理下脲酶活性变化基本一致, 酶活性随分解时间延长提高, 在 120 d 时达到最大值 (图 1(a))。真菌处理下酶活性皆高于对照, 仅菌液 BC 与对照无显著差异。不同处理下脲酶活性高低不同, 菌液 AC 处理下脲酶一直保持着较高活性, 与对照有显著差异, 比对照高 69.78% (120 d)。120 d 时, 仅菌株 BC 受不同真菌添加方式影响, 使得菌丝、菌液处理间存在显著差异, 菌丝 BC 处理下酶活性高于菌液 BC 处理, 说明脲酶后期活性对不同添加方式 (菌丝、菌液) 的响应不明显。

对不同处理下酸性磷酸酶活性测定结果表明,与对照相比,真菌处理下酶活性有着不同程度的提高。菌丝(A、AC)和菌液(C、AC、BC)处理下酶活性在实验期内始终保持着较高水平。在60和120d时,各处理与对照均有显著差异(图1(b)),如菌液C(60和120d)分别比对照高185.36%和163.65%。菌株C、BC(120d)受不同添加方式影响酶活性表现出显著差异,且菌液处理的酶活性高于菌丝处理。总的来说,3株内生真菌均能够提高酸性磷酸酶活性,菌液C处理提高酶活性优于其它处理。

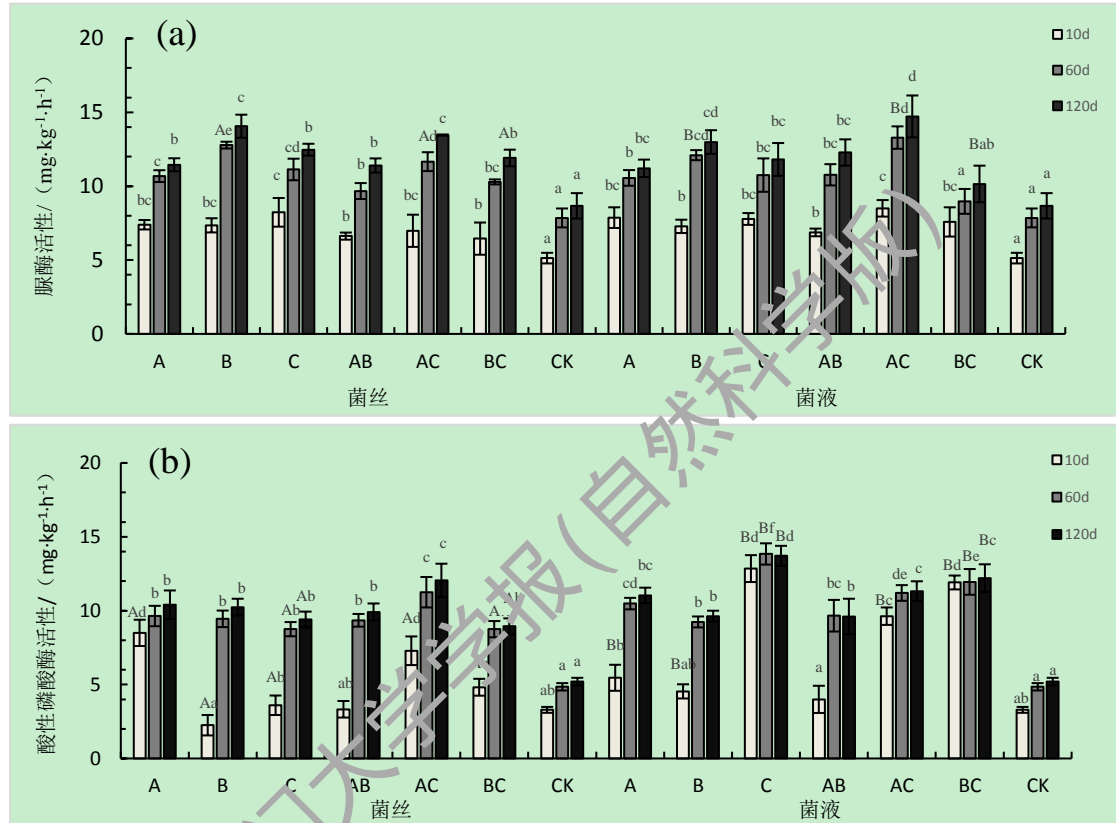


图1 不同处理下土壤脲酶活性(a)和酸性磷酸酶活性(b)的差异
Fig.1 Differences in Urease activity (a) and acid phosphatase activity (b) under different treatments

2.4 不同内生真菌对杉木凋落叶质量损失率的影响

不同处理下杉木凋落叶质量损失率变化趋势基本一致,凋落叶损失率最大值均在120d,不同处理下质量损失率存在差异(图2)。分解120d,菌丝C、AB、AC和菌液C都与对照有显著差异,菌丝C和菌液A分别比对照高9.92%、11.62%。凋落叶质量损失率随分解时间延长提高,与纤维素酶、脲酶、酸性磷酸酶、过氧化物酶、混菌处理的多酚氧化酶活性变化趋势相似。

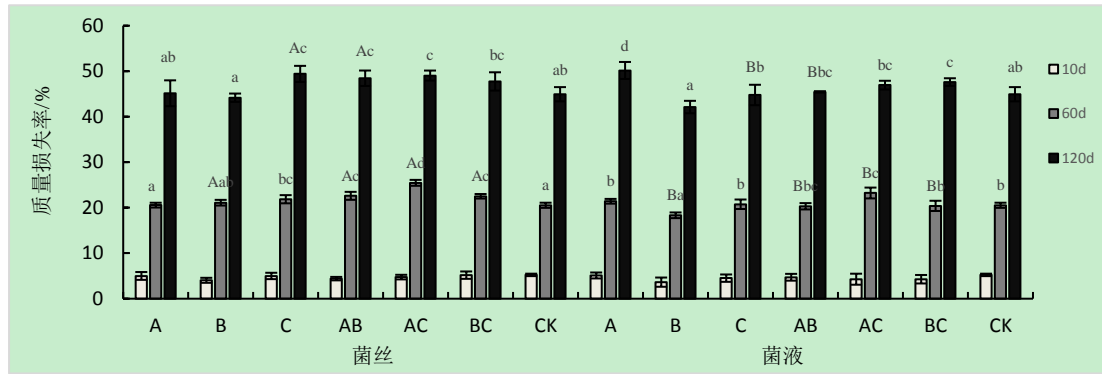


图2 不同处理方式下调落叶质量损失率变化及差异

Fig.2 Variation and difference of loss rate in leaf litter under different treatments

2.5 不同土壤酶活性和凋落叶质量损失率多因素方差分析

以不同菌株、添加方式和分解时间为处理因子,对土壤纤维素酶、蔗糖酶、多酚氧化酶、木质素过氧化物酶、脲酶和酸性磷酸酶活性和凋落叶质量损失率进行多因素方差分析,结果见表5。不同菌株和分解时间对各类酶活性都有极显著作用($P < 0.01$),除蔗糖酶和多酚氧化酶对添加方式无显著响应外,其它酶活性都受添加方式的影响。不同菌株、添加方式和分解时间的两两交互作用都对酶活性和凋落叶质量损失率都有显著作用,而三者交互作用仅对酶活性有极显著作用,对凋落叶质量损失率无显著作用($P > 0.05$)。

表5 内生真菌和分解时间对土壤酶活性和凋落叶质量损失率影响的多因素分析

Tab. 5 Multi-factor analysis of the effects of endophytic fungi and decomposition time on soil enzyme activity and loss quality of litter

土壤酶种类	F						
	菌株	方式	时间	菌株×方式	方式×时间	菌株×时间	方式×时间×菌株
纤维素酶	36.55**	8.95**	96.55**	5.59**	4.99**	8.27**	8.59**
蔗糖酶	162.50**	0.70	160.34**	41.84**	122.84**	33.55**	9.70**
多酚氧化酶	29.05**	0.33	35.01**	9.50**	3.16*	25.92**	4.93**
过氧化物酶	96.14**	30.37**	1361.45**	22.76**	71.72**	43.51**	34.65**
脲酶	15.16**	25.18**	238.01**	5.48**	9.62**	7.95**	3.74**
酸性磷酸酶	113.67**	605.13**	242.03**	92.07**	57.27**	16.10**	12.40**
质量损失率	22.66**	40.19**	2261.21**	3.11*	5.33**	6.31**	1.08

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

土壤酶是具有催化功能的活性物质,能够降解有机物和促进土壤有机体代谢^[26],其活性高低直接影响着凋落物分解速率^[27]。不同的土壤酶有其特定的功能,如纤维素酶和过氧化物酶表征着微生物降解活性的高低;而脲酶功能极为专一,能够水解土壤中的尿素,产生

二氧化碳、氨和水；蔗糖酶参与有机质的代谢过程，影响着土壤碳循环过程；磷酸酶参与土壤有机磷的活化，影响着土壤中有机磷的分解转化及其生物有效能；漆酶能够影响子实体发育，降解木质素、芳香胺和酚类物质等^[28]。

相关研究表明，不同微生物种群释放的酶种类不同^[29]，特定的土壤酶活性与微生物（真菌、细菌）类群关系密切，担子菌纲（*Polyporaceae*）真菌可以释放木质素过氧化物酶、Mn-过氧化物酶、漆酶等^[30-31]，木霉属（*Trichoderma*）和腐霉属（*Pythium*）真菌能够提高砂壤土的酶活性（酸性和碱性磷酸酶、脲酶、纤维素分解）^[32]，土壤微生物数量增加提高了土壤酶活性，土壤酶活性（脲酶、磷酸酶和纤维素酶）与土壤微生物数量正相关^[33-34]。这与本研究结果一致，大部分真菌处理下土壤酶活性高于对照，不同真菌对各种酶活性影响不同，如 B 菌株处理下纤维素酶和漆酶活性降低，过氧化物酶、脲酶、蔗糖酶和酸性磷酸酶活性提高，则表明 B 菌株处理能够诱导分泌出更多的过氧化物酶、脲酶等相关酶类，其具体响应方式需要通过分子手段对微生物产酶机制作进一步研究。

土壤酶活性与降解底物关系密切，凋落叶分解会释放叶细胞中的酶类进入土壤^[35]，引发酶催化底物改变，激发土壤酶活性和诱导酶种类发生改变^[36]。外部环境也会对酶活性产生重要影响，如土壤温度、湿度、pH 等环境因素差异会影响土壤微生物群落功能及其碳代谢强度，进而对土壤酶活性产生影响^[37-38]。前期研究成果表明，真菌处理下凋落叶碳、磷元素含量随分解时间降低，氮素含量增加，碳氮比、碳磷比低于对照^[19]。本研究中大部分真菌处理下纤维素酶、木质素过氧化物酶、脲酶、酸性磷酸酶、多酚氧化酶活性与凋落叶质量损失率变化趋势相同，最大且在 120 d，部分真菌处理下酶活性低于对照。由于蔗糖酶主要参与前期易溶性物质的分解，难以参与后期难分解物质的分解，导致蔗糖酶活性最高值在 10 d，与凋落叶质量损失率、其它酶类活性变化趋势不同^[39]。此外，本研究模拟自然降解环境，实验期内气温、降水差异大，微生物活性受环境影响，也会造成酶活性高低差异及最高值出现时间不同。综上，真菌的添加改变了酶活性，在酶类本身性质和外界环境的综合影响下，真菌处理的酶活性与对照有高低差异，不同酶类在实验期内有不同的变化，但在多种酶的共同作用下，凋落叶养分元素转化速率加快，凋落叶质量损失率提高，而真菌通过吸收周围环境中的营养元素不断生长分泌酶，造成酶活性提高。

大量实验数据已经证实多种微生物间（两种或两种以上）存在着协同或拮抗作用，能够影响代谢过程以及阻碍或抑制代谢物质产生，进而影响混合微生物发挥作用（提高酶活性、促进植物生长和凋落物分解等）^[40-41]，白腐菌（*White-rot fungi*）和黑曲霉（*Aspergillus niger*）两菌混合发酵固态稻草粉产纤维素酶的活力明显低于白腐菌、黑曲霉和絮凝酵母

(*Saccharomyces cerevisiae*) 三菌混合^[42], 尖孢镰孢 (*Fusarium oxysporum*) 和啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 共同发酵培养下小麦秸秆乙醇产量高于单一啤酒酵母发酵^[43], 丝状真菌 (*Alternaria* sp) 和外生菌根真菌 (*Xerocomus Pulverulentus*&*Clitocybe maxima*) 混合处理下红松凋落物后期纤维素酶活性提高, 单菌处理下漆酶活性却高于混菌处理^[44], 本研究中, 混合菌丝 AC (120 d) 处理下脲酶活性显著高于单菌丝 A、C 处理, 这可能是 A 菌株与 C 菌株混合时产生了协同效应, 使得酶活性提高, 其具体协同机制有待进一步研究。另外菌丝 AC 处理下脲酶活性低于菌液 AC 处理, 原因是菌丝难以在宿主以外的环境中长期定殖, 受外部复杂环境影响易死亡, 而菌液富含营养能够满足内生真菌和其它土壤微生物生长的需要, 土壤微生物得以生长和繁殖, 微生物活动增加使得酶活性提高^[22]。

综上, 3 株内生真菌及不同处理对不同土壤酶活性影响不一致, 其中, 踝节霉菌菌液 (C 菌液) 处理下纤维素酶、木质素过氧化物酶和酸性磷酸酶活性显著提高, 黄色镰刀属和踝节霉菌混菌丝 (BC 菌丝) 处理下漆酶活性显著提高, 青霉菌和踝节霉菌混合菌液 (AC 菌液) 则能显著提高脲酶活性, 而青霉菌和黄色镰刀菌混合菌丝 (AB 菌丝) 对提高蔗糖酶活性效果明显, 说明 CG2 青霉菌 (*Penicillium* sp.)、AY15 黄色镰刀菌 (*Fusarium culmorum* sp.)、AJ14 踝节霉菌 (*Talaromyces*) 对提高土壤酶活性和促进凋落叶分解, 改善土壤微环境具有一定参考意义。在自然环境下, 土壤微生物更加多样, 酶活性会受到多种因素的影响, 在研究土壤酶活性时, 最好采用鲜土进行土壤酶活性测定, 对于已经产生连栽障碍的杉木人工林, 内生真菌能否缓解障碍还有待深入研究, 本课题组下一步将开展田野实验和内生真菌施用剂量实验, 为菌剂的开发积累基础。

参考文献:

- [1] 曾小龙. 桉树林地土壤酶特性研究进展[J]. 广东教育学院学报, 2009, 29(5): 97-103.
- [2] GARCIA R R, OCHOA V, HINOJOS M B, et al. Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems[J]. Soil Biol and Bioch, 2008, 40: 2137-2145.
- [3] 刘善江, 夏雪, 陈桂梅, 等. 土壤酶的研究进展[J]. 中国农学报, 2011, 27(21): 1-7.
- [4] DARI K, BECHET M, BLONDEAUR. Isolation of soil *streptomyces* strains capable of degrading humic acid sand analysis of their peroxidase activity[J]. Fems Micro Ecol, 1995, 16: 115-122.
- [5] MAGNUSO M, CRAWFOR D L. Comparison of extracellular peroxidase and esterase deficient mutants of *Streptomyces* *ridosporus* T7A[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58: 1070-1072.
- [6] 卢庆华, 邢孟兰, 蔡禄. 青霉菌产漆酶的研究及在木质素降解中的应用[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(10): 2379-2382.
- [7] 彭程, 杨中锋. 一株雷公藤内生真菌的化学成分及单胺氧化酶抑制活性研究[J]. 中药材, 2016, 39(3): 540-543.

-
- [8] 付瑶, 史丽娟, 孙美丽, 等. 受黄色镰刀菌侵染的马铃薯薯块的抗氧化酶、细胞壁防御酶及 *StLTPa1* 基因的表达特性[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(03): 388-395.
- [9] 舒洪岚. 杉木人工林土壤理化性质及酶活性的变化规律[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(9): 81-83, 87.
- [10] 杨玉盛, 邱仁辉, 俞新妥, 黄宝龙. 杉木连栽土壤微生物及生化特性的研究[J]. 生物多样性, 1999(01): 1-7.
- [11] 陈龙池, 汪思龙, 陈楚莹. 杉木人工林衰退机理探讨[J]. 应用生态学报, 2004, 15(10): 1953-1957.
- [12] 马亚娟, 徐福利, 王渭玲, 等. 氮磷提高华北落叶松人工林地土壤养分和酶活性的作用[J]. 植物营养与肥料学报, 2015, 21(03): 664-674.
- [13] 成向荣, 袁健军, 刘佳, 等. 间伐对杉木人工林土壤酶和活性有机碳的短期影响[J]. 中国农学通报, 2014, 30(4): 17-22.
- [14] 周丽萍, 戚瑞生. 不合理施肥对土壤性质的影响及其防治措施探讨[J]. 甘肃农业科技, 2017(1): 74-78.
- [15] 李艳鹏, 贺同鑫, 王清奎. 施肥对杉木林土壤酶和活性有机碳的影响[J]. 生态学杂志, 2016, 35(10): 2722-2731.
- [16] OLIVEIRA A L M, CANUTO E L, SILVA E E, et al. Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture level[J]. Brazilian J Microbiology, 2004, 35: 295-299.
- [17] 许秀兰, 杨春琳, 田莎, 等. 华山松凋落叶上的真菌多样性及 4 株真菌的纤维素分解能力[J]. 林业科学, 2016, 52(1): 80-88.
- [18] KOIDE K, OSONO TAKED H. Fungal succession and decomposition of *Camellia japonica* leaf litter[J]. Ecological Research, 2005, 20: 599-609.
- [19] 李冠军, 梁安洁, 洪滔, 林勇明, 吴承祯, 洪伟, 林晗, 李键. 内生真菌对杉木凋落叶质量损失和养分含量的影响 [J/OL]. 应用与环境生物学报: 1-15. [2018-11-02]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1482.Q.20180601.1149.013.html>.
- [20] 叶宝鉴, 兰思仁, 李明河, 等. 福建农林大学校园植物区系特征[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2013, 42(1): 51-56.
- [21] 胡云飞, 李荣林, 杨亦扬, 等. 内生真菌短密木霉对茶树修剪叶降解及土壤真菌的影响[J]. 生态学杂志, 2015, 34(3): 820-825.
- [22] 陈晏, 戴传超, 王兴祥, 等. 施加内生真菌拟茎点霉(*Phomopsis* sp.)对茅苍术凋落物降解及土壤降解酶活性的影响[J]. 土壤学报, 2010, 47(3): 537-544.
- [23] 林先贵. 土壤微生物研究原理与方法[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010.
- [24] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986, 290-294.
- [25] 柴小粉, 张林, 覃芷源, 等. 玉米从枝菌根真菌根外菌丝表面定殖细菌解磷功能鉴定[J]. 植物营养与肥料学报, 2016, 22(4): 1031-1038.
- [26] DICK W A, TABAI M A. Significance and potential uses of soil enzymes. In: Meeting FB[J]. Soil microbial ecology, 1992: 95-127.
- [27] KANG H, FREEMAN C. Soil enzyme analysis for leaf decomposition in global wetlands[J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2009, 40(21/22): 3323-3334.
- [28] 王理德, 王方琳, 郭春秀, 等. 土壤酶学研究进展[J]. 土壤, 2016, 48(1): 12-21.
- [29] 徐雁, 向成华, 李贤伟. 土壤酶的研究概况[J]. 四川林业科技, 2010, 31(2): 14-20.
- [30] GLENN J K, GOLD M H. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycetes, *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Arch Biochem Biophys, 1985, 242: 329-341.
- [31] SARIASLANI F S. Microbial enzymes for oxidation of organic molecules[J]. Crit Rev Biotechnol, 1989, 9: 171-257.
- [32] NASEBY D C, PASCUAL J A, LYNCH J M. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities[J]. J Applied

Microbiology, 2000, 88: 161-169.

- [33] 唐万鹏, 李吉跃, 胡兴宜, 等. 江汉平原杨树人工林连栽对林地土壤质量的影响[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(6): 750-755.
- [34] 郭继勋, 姜世成, 林海俊, 等. 不同草原植被碱化草甸土的酶活性[J]. 应用生态学报, 1997, 8(4): 412-416.
- [35] 南丽丽, 郁继华, 郭全恩. 荒漠灌区不同种植年限苜蓿地土壤酶活性的变化研究[J]. 干旱地区农业研究, 2015, 33(6): 71-76, 92.
- [36] 吴旺旺, 张丽丽, 林达, 等. 氮沉降对凋落叶分解前期土壤酶活性的影响[J]. 森林与环境学报, 2017, 37(2): 174-180.
- [37] 陈法霖, 郑华, 阳柏苏, 等. 中亚热带几种针、阔叶树种凋落物混合分解对土壤微生物群落碳代谢多样性的影响[J]. 生态学报, 2011, 31(11): 3027-3035.
- [38] PRIETZEL J. Arylsulfatase activities in soils of the Black Forest/ Germany-seasonal variation and effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fertilization[J]. Soil Biol Biochem, 2001, 33: 1317-1328.
- [39] 赵方杰. 洛桑试验站的长期定位试验:简介及体会[J].南京农业大学学报, 2012, 35(05): 147-153.
- [40] HOLGUIN G, BASHAN Y. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium(*Staphylococcus* sp)[J]. Soil Biol&Biochem, 1996, 28(12): 1651-1660.
- [41] VAZQUEZ M M, CESAR S, AZCON R, et al. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi other microbial inoculants(*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*), and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants[J]. Applied Soil Ecology, 2000, 15: 261-272
- [42] 蔡晶晶, 段学辉, 谢亮, 等. 三菌混合固态发酵产纤维素酶研究[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(7): 57-63.
- [43] PASCHOSA T, XIROSB C, CHRISTAKOPOULOS P. Simultaneous saccharification and fermentation by co-cultures of *Fusarium oxysporum* and *Saccharomyces cerevisiae* enhances ethanol production from liquefied wheat straw at high solid content[J]. Industrial and Products, 2015, 76(12): 793-802.
- [44] 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.

Effects of endophytic fungi on soil enzyme activities under Chinese fir plantation

LI Guanjun¹, WU Chengzhen^{2*}, LIANG Anjie¹, HONG Tao¹, CHEN Can,

XIE Anqiang, HONG Wei¹, LIN Yongming¹, LI Jian^{1*}

(1.College of Forestry,Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2.College of Ecology and Resource Engineering,Wuyi University, Nanping 354300, China)

Abstract: The effects of endophytic fungi on soil enzyme activities under Chinese fir plantation were investigated. The strains and methods of adding soil enzyme activities were screened to

promote the decomposition of Chinese fir litter. Single strains and mixed strains of three endophytic fungi of *Cunninghamia lanceolata*(CG2*Penicillium* sp(A), AY13*Fusarium culmorum*(B), AJ14*Talaromyces* sp(C)), which was poured into the experimental pots in two ways(hyphae and bacteria), sampling at 10, 60, and 120 d for determination of changes in soil enzyme activity and litter quality. The results showed that The laccase activity was always maintained at a high level under the treatment of mixed mycelium. The activities of urease and acid phosphatase were improved under Both mycelial and sterilized fermentation broth treatment. The activity of pre-sucrose (10 d) was higher than that in the later stage (120 d). The enzyme activity was higher than the control. Cellulase, lignin peroxidase and acid phosphatase were significantly different from the control under the treatment of bacterial liquid C (120 d) ($P<0.05$), which were 58.12%, 43.79% and 163.65% higher than the control, respectively. The laccase activity was significantly worse than that of the control under BC treatment (120 d), 36.74% higher than the control. The sucrase activity of mycelium treated with AB was significantly different from the control, 162.89% higher than the control; urease activity of AC mixed bacterial solution was significantly different from that of the control, which was 69.78% higher than the control (120d), increased loss rate of litter under the action of various enzymes. The results showed that the bacterial liquid C could significantly increase the activities of cellulase, peroxidase and acid phosphatase, The mixed mycelium BC and AB could increase the activity of laccase and sucrase, and the mixed solution AC could increase the urease activity significantly.

Keywords: *Cunninghamia lanceolata*; endogenous fungi; soil enzyme activity; leaf mass loss rate