

DOI: 10.11766/trxb202208050430

杨天杰, 王孝芳, 胡红菊, 杨健, 藕继旺, 王晓祥, 郝宝锋, 王中华, 董彩霞, 徐阳春. 梨树枝条粉碎覆盖对梨园土壤养分和微生物组的影响[J]. 土壤学报, 2024, 61 (2): 549–561.

YANG Tianjie, WANG Xiaofang, HU Hongju, YANG Jian, OU Jiwang, WANG Xiaoxiang, HAO Baofeng, WANG Zhonghua, DONG Caixia, XU Yangchun. Effects of Pear Pruning Branches Mulching on Soil Nutrition and Microbial Community Structures[J]. Acta Pedologica Sinica, 2024, 61 (2): 549–561.

## 梨树枝条粉碎覆盖对梨园土壤养分和微生物组的影响\*

杨天杰<sup>1</sup>, 王孝芳<sup>1</sup>, 胡红菊<sup>2</sup>, 杨健<sup>3</sup>, 藕继旺<sup>4</sup>, 王晓祥<sup>5</sup>, 郝宝锋<sup>6</sup>,  
王中华<sup>7†</sup>, 董彩霞<sup>1†</sup>, 徐阳春<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学资源与环境科学学院/江苏省有机废弃物资源化高技术研究重点实验室/江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心/资源节约型肥料教育部工程研究中心/国家有机类肥料工程技术研究中心, 南京 210095; 2. 湖北省农业科学院果树茶叶研究所, 武汉 430209; 3. 中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009; 4. 贵阳小河区金海农业科技开发有限公司, 贵阳 550000; 5. 黑龙江省农业科学院园艺分院, 哈尔滨 150069; 6. 河北省农林科学院昌黎果树研究所, 河北昌黎 066600; 7. 江苏省农业科学院果树研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 南京 210014)

**摘要:** 梨树整形修剪枝条是一类重要的生物质资源, 将其粉碎后覆盖于树下土壤是资源化利用的有效途径。为了科学评估梨树枝条粉碎覆盖对土壤理化性状及微生物群落结构的影响, 采集了贵州毕节、河北昌黎、黑龙江哈尔滨、湖北枝江和河南许昌 5 个不同纬度梨典型种植区梨园枝条覆盖 1~2 年后的土壤样品, 检测了土壤基础理化特性及土壤细菌、真菌和原生生物群落。结果发现, 与不覆盖枝条的对照相比, 总体而言覆盖能有效提高土壤有机质和有效磷含量, 土壤细菌、真菌和原生生物群落结构也发生了显著变化, 但对群落多样性无显著影响; 覆盖处理显著富集了土壤细菌中的变形菌门、酸杆菌门和真菌中的担子菌门以及原生生物中的孔虫界和囊泡虫类等类群的相对丰度。进一步利用随机森林模型挖掘了不同采样点枝条覆盖后的关键物种, 模型预测准确率高达 94.44%, 关键物种以细菌为主, 包括 *Acidibacter*、*Xanthobacteraceae*、*Nitrosomonadaceae* 等与有机残体降解有关的微生物, 还发现土壤有效磷含量是土壤微生物群落结构差异的主要驱动因子。相关研究结果初步评估了梨树枝条覆盖对土壤养分和微生物组的影响, 挖掘了潜在的关键微生物。

**关键词:** 梨修剪枝条; 覆盖; 土壤理化性状; 微生物组; 关键物种

中图分类号: S661.2 文献标志码: A

## Effects of Pear Pruning Branches Mulching on Soil Nutrition and Microbial Community Structures

YANG Tianjie<sup>1</sup>, WANG Xiaofang<sup>1</sup>, HU Hongju<sup>2</sup>, YANG Jian<sup>3</sup>, OU Jiwang<sup>4</sup>, WANG Xiaoxiang<sup>5</sup>, HAO Baofeng<sup>6</sup>,

\* 国家梨产业技术体系岗位专家经费项目 (CARS-28)、中国博士后科学基金项目 (2019M650116) 和江苏省博士后科研资助计划项目 (2018K200C) 资助 Supported by the Earmarked Fund for CARS (No. CARS-28), the Postdoctoral Science Foundation of China (No. 2019M650116) and the Postdoctoral Research Funding Program of Jiangsu Province, China (No. 2018K200C)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: cxdong@njau.edu.cn; wzh925@163.com

作者简介: 杨天杰 (1990—), 女, 江苏南京人, 博士, 副教授, 主要从事果树微生态与根际健康研究。E-mail: tjyang@njau.edu.cn

收稿日期: 2022-08-05; 收到修改稿日期: 2023-03-14; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2023-05-29

WANG Zhonghua<sup>7†</sup>, DONG Caixia<sup>1</sup>, XU Yangchun<sup>1</sup>

(1. College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University/Jiangsu Key Laboratory for Organic Solid Waste Utilization/Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Resource Utilization/Educational Ministry Engineering Center of Resource-saving fertilizers/National Engineering Research Center for Organic-based Fertilizers, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Fruit and Tea, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430209, China; 3. Zhengzhou Fruit Research Institute, CAAS, Zhengzhou 450009, China; 4. Guizhou Xiaohe District Jinhai Agricultural Science and Technology Development Co., Ltd., Guiyang 550000, China; 5. Horticulture Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, China; 6. Changli Institute of Pomology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Changli, Hebei 066600, China; 7. Institute of Pomology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** [ Objective ]As a by-product of fruit tree shaping and pruning, pear branches are important biomass resources. The use of crushed branches for soil mulch under trees is one of the effective ways to utilize waste resources, which is conducive to increasing soil organic matter and improving soil fertility in pear orchards. [ Method ] In order to assess the effects of short-term pear branch mulching on soil properties and structure of microbial community, soil samples were collected from five pear orchards in different latitudes (Bijie City of Guizhou Province, Changli City of Hebei Province, Harbin City of Heilongjiang Province, Zhijiang City of Hubei Province and Xuchang City of Henan Province) after 1-2 years of mulching. Soil basic physiochemical characteristics of the soil and the bacterial, fungal and protist communities were detected. [ Result ] Results showed that the soil organic matter and available phosphorus content were significantly increased in pear branches mulching treatment in general, and the soil bacterial, fungal and protists community structure also changed significantly. Specifically, the mulching of pear branches significantly enriched the relative abundance of taxa such as *Proteobacteria* and *Acidobacteria* in bacteria, *Basidiomycota* in fungi, and *Rhizaria* and *Alveolata* in protists. The model prediction accuracy was as high as 94.44%, and the key species were mainly bacteria, including *Acidibacter*, *Xanthobacteraceae*, *Nitrosomonadaceae* and other microorganisms related to the degradation of organic residues. Soil-available phosphorus content was found to be the main driver of variations in soil microbial community structure. [ Conclusion ] The study preliminarily assessed the effect of pear tree branch mulching on soil nutrients and microbiome and excavated potential key microorganisms. The findings can serve as a reference for managing the health and fertility of orchard soils.

**Key words:** Pear pruning branches; Mulching; Soil physicochemical properties; Microbial community; Keystone taxa

梨是我国仅次于苹果、柑橘的第三大栽培果树, 根据联合国粮农组织 2019 年 1 月的最新统计数据显示, 截至 2017 年底我国梨栽培面积约 96 万  $\text{hm}^2$ <sup>[1]</sup>。枝条修剪整形是梨树栽培和管理的重要技术手段, 保证了树体营养的合理分配、果实产量和品质的提升<sup>[2]</sup>。据估算, 我国梨园每年修剪产生的枝条约 161 万~242 万  $\text{t}$ <sup>[2]</sup>, 其体积庞大, 收集、运输、处理等费工费时。随意弃置或焚烧等传统处理方式易污染环境。梨树修剪枝条含有丰富的纤维素、木质素、糖类、脂肪及各种无机养分<sup>[2]</sup>, 是重要的农业资源。修剪枝条的资源化利用已成为梨园生产管理的重要内容之一。尽管果树枝条与菌剂、畜禽粪便等混合堆肥技术不断发展<sup>[3]</sup>, 但堆肥需要特定的处理场所, 堆置时间长、占用空间大, 且枝条离田费工, 在一定程度上限制了其大规模推广应用。而将枝条粉碎后直接覆盖还田成本低、操作简单, 且可减少梨园

杂草生长, 改善梨园土壤质量<sup>[4]</sup>。

土壤表层覆盖果树枝条能够阻止阳光直射, 降低地表温度, 减少水分蒸发, 同时枝条腐解后的有机碳等其他物质可增加土壤有机质和矿质养分, 对提升土壤质量具有重要意义<sup>[5-6]</sup>。研究表明, 苹果枝条夏季直接覆盖还田、冬季将枝条成段埋土覆盖还田均有利于增加土壤有机质和矿质养分含量, 提高土壤酶活性<sup>[7]</sup>; 冬季适量梨枝条粉碎覆盖还田能显著提高梨园土壤矿质元素和有机质含量, 有效改善土壤酸化状况, 增加土壤真菌数量及其相关土壤酶活性, 提高果实品质<sup>[8]</sup>。但果树枝条覆盖是否调控了土壤中关键的微生物类群尚不得知。此外, 研究表明土壤中的原生物(以原生动物为主)在影响土壤微生物群落结构和养分转化上发挥关键作用<sup>[9]</sup>, 是衡量土壤质量的重要生物指标之一<sup>[10]</sup>。但果树枝条覆盖是否调控了土壤中微生物群落(包括原生物)

尚未可知，土壤养分是否驱动了土壤微生物组结构的变化也有待进一步研究。

本研究选择国家梨产业技术体系 5 个示范县典型梨园（贵州毕节、河北昌黎、黑龙江哈尔滨、湖北枝江和河南许昌），研究不同地区梨树修剪枝条直接覆盖对土壤微生物群落及土壤养分的影响，探究梨树枝条覆盖对土壤微生物的影响是否存在普遍规律，为枝条覆盖还田提供科学依据。本研究预期可为调控梨园土壤微生态环境的土壤管理体系提供理论指导。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品采集

2019 年 9 月 9 日—9 月 30 日，分别对国家梨产业技术体系 5 个示范县的梨园土壤进行采样，地点信息如下：贵州毕节（27°11' N, 105°17' E）、河北昌黎（39°42' N, 119°5' E）、黑龙江哈尔滨（45°72' N,

126°57' E）、湖北枝江（30°17' N, 114°7' E）和河南许昌（33°54' N, 113°42' E）。5 个地区梨园土壤理化性质如表 1 所示。梨树品种均为当地的主栽品种，冬剪时将梨树修剪枝条粉碎成 2~3 cm 的小段，直接覆盖于梨树行间，覆盖量为 7 500 kg·hm<sup>-2</sup>，枝条修剪时叶片已凋落，枝条覆盖年限为：毕节，2 年；昌黎，2 年；哈尔滨，2 年；枝江，1 年；许昌，1 年。以不覆盖枝条为对照。每个梨园的枝条覆盖较为均匀，管理方式较为一致，所以每个地点随机选择 3 行覆盖和 3 行未覆盖枝条的树下采集土壤样品。采集 0~5 cm 和 5~20 cm 土层土样考察覆盖对不同深度土壤的影响。采样时先去除地表覆盖物，多点采集不同土层土样，共获得 60 个土样，每个土样 500 g。采集的土样分为 3 份，一份直接保存于-80 °C 冰箱用于提取土壤 DNA，检测土壤微生物组结构；一份用于直接测定土壤 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 含量；一份风干磨细后测定土壤 pH、有机质、有效磷、速效钾含量和土壤脲酶、蔗糖酶活性。

表 1 梨园土壤理化性质

Table 1 Soil physicochemical properties in peach orchards

地点 Site	OM / (g·kg <sup>-1</sup> )	pH	EC / (mS·m <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N / (mg·kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N / (mg·kg <sup>-1</sup> )	AP / (mg·kg <sup>-1</sup> )	AK / (mg·kg <sup>-1</sup> )
贵州毕节 <sup>①</sup>	64.60	7.01	65.68	0.03	1.67	4.13	377.5
河北昌黎 <sup>②</sup>	13.09	6.81	48.98	0.06	1.99	52.20	164.9
黑龙江哈尔滨 <sup>③</sup>	42.67	7.21	55.71	0.06	1.60	48.41	559.3
湖北枝江 <sup>④</sup>	18.77	6.15	72.28	0.50	2.37	59.09	395.0
河南许昌 <sup>⑤</sup>	17.70	7.29	102.5	0.02	3.76	45.52	201.1

注：OM：有机质，EC：电导率，NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N：铵态氮，NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N：硝态氮，AP：有效磷，AK：有效钾，下同。Note：①Bijie City, Guizhou Province, ②Changli City, Hebei Province, ③Harbin city, Heilongjiang Province, ④Zhijiang city, Hubei Province, ⑤Xuchang city, Henan Province. OM: Organic matters, EC: Electrical conductivity, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N: Ammonium nitrogen, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N: Nitrate nitrogen, AP: Available phosphorus, AK: Available potassium. The same below.

### 1.2 土壤理化特性检测

土壤 pH 利用混合电极 pH 计测定（PE-10, Sartorius, 德国）；土壤有机质采用油浴加热—重铬酸钾容量法测定；土壤铵态氮和硝态氮利用流动分析仪（Auto Analyzer 3, 德国）测定；土壤有效磷采用钼锑抗比色法测定；土壤速效钾利用 NH<sub>4</sub>OAc 浸提—火焰光度法测定。

### 1.3 土壤酶活性测定

土壤脲酶和蔗糖酶活性测定方法分别参照微量

法土壤脲酶（S-UE）活性检测试剂盒和蔗糖酶（S-SC）活性检测试剂盒（Solarbio, 北京）中说明书。

### 1.4 土壤 DNA 提取及扩增子测序

参照 PowerSoil DNA 提取试剂盒（Mo Bio, Carlsbad, CA, 美国）说明书提取土壤 DNA，用 NanoDrop（ThermoScientific, Wilmington, DE, 美国）检测 DNA 的质量（A260/A280）和浓度。采用引物 515F（5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTA A-3'）和 806R（5'-GGACTA CHVGGGTWTCTAAT -3'）对

细菌 16S rRNA 基因 V4 区进行 PCR 扩增<sup>[11]</sup>。采用引物 ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') 扩增真菌的 ITS 区域<sup>[12-13]</sup>。采用引物 V4\_1f (CCAGC ASCYGC GGTAATWCC) 和 TAREukREV3 (ACTTT CGTTCTTGATYRA) 对原生生物 18S rRNA 基因 V4 区进行 PCR 扩增<sup>[14-15]</sup>。最终扩增用的上游引物包括合适的 Illumina 接头、pad linker 及基因特异性引物, 下游引物包括 Illumina 接头、pad linker、基因特异性引物及 6 nt barcode。PCR 包含 35 个循环, 扩增条件为: 98℃ 1 min 预变性, 98℃ 变性 10 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 72℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物使用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, 德国) 纯化, 并使用 Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, 美国) 对纯化产物定量, 样品采用 Illumina MiSeq 平台进行测序(凌恩生物信息技术有限公司, 上海)。

### 1.5 序列处理

扩增子测序结果采用 UPARSE 标准处理流程降噪, 利用 Mothur 软件对 UPARSE 处理获得的代表序列和可操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 表进行后续分析, 具体方法参照 Gu 等<sup>[16]</sup>。测序深度统一至序列数最少的样品的测序量。16S rRNA OTU 的分类经 RDP 16SrRNA classifier 比对获得<sup>[17]</sup>, ITS OTU 分类利用 UNITE 真菌数据库进行注释<sup>[18]</sup>, 18S rRNA OTU 的分类经 PR2 数据库比对获得<sup>[17]</sup>, 确定分类地位, 置信度阈值设为 80%。

### 1.6 数据分析

基于归一化的种水平物种丰度表, 利用 R 4.0.3 中 vegan 包进行基于 Bray-Curtis 相似性矩阵的主坐标轴分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA); 对土壤微生物群落结构进行置换多元方差分析 (permutational multivariate analysis of variance, PMANOVA), 以评估覆盖与未覆盖处理土壤微生物群落结构的差异。为挖掘枝条覆盖土壤中的潜在关键微生物, 采用 R 包 RandomForest 构建随机森林模型<sup>[19]</sup>。从本试验 60 个土壤样品中随机选择 42 个样品建立模型选择丰度分别为前 200 的细菌、真菌和原生生物的 OTU 组成一个新的矩阵, 在 OTU 水平上建立判别模型。其余 18 个样品用于验证模型的准确性。用十倍交叉验证并重复三次以评估土壤微生物对于判定样品分

类的准确性。试验数据采用 Microsoft Excel 2013、R 4.0.3 进行 ANOVA 方差分析、邓肯多重检验 (Duncan's multiple range test,  $P \leq 0.05$ ) 的分析。

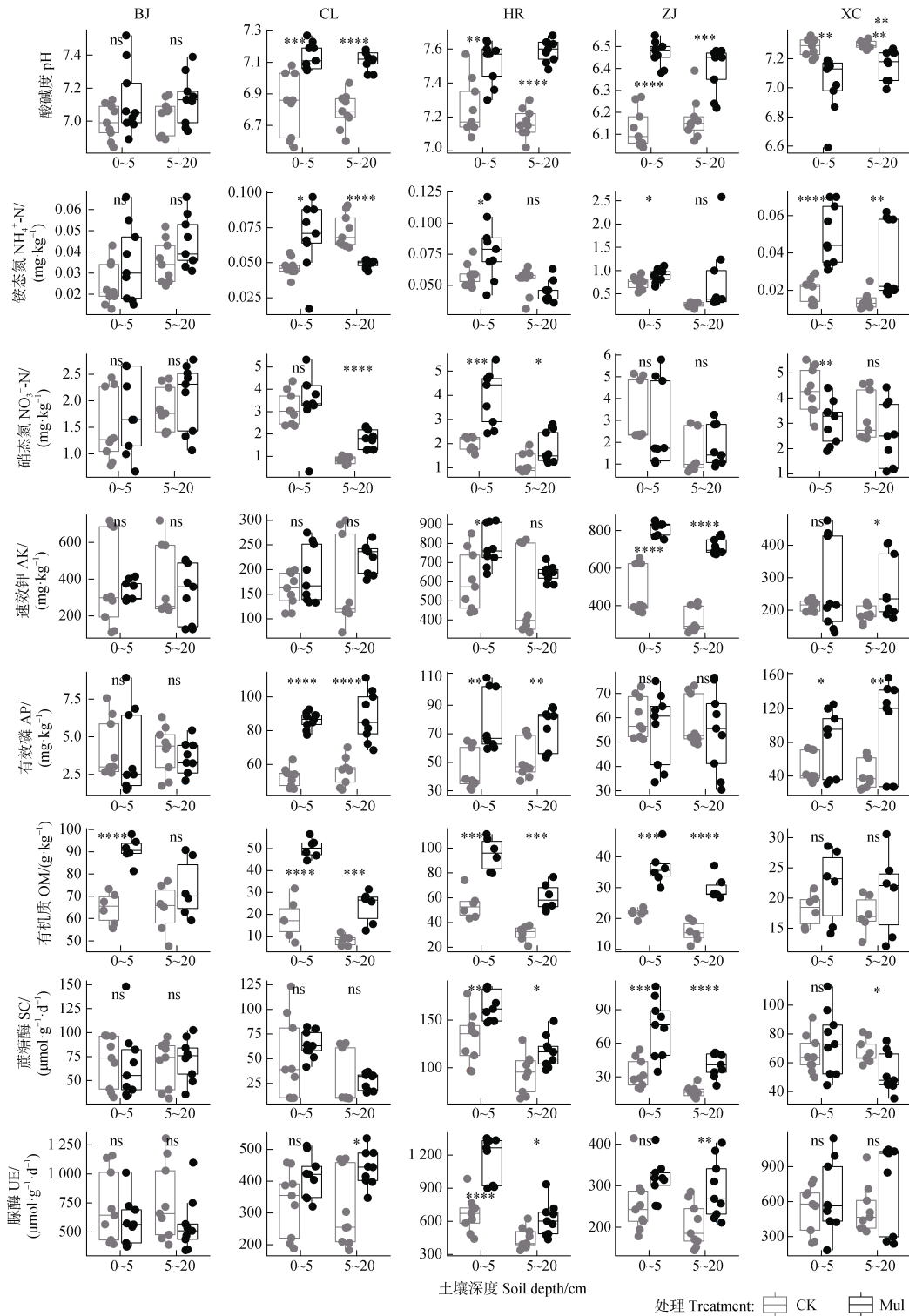
## 2 结果与讨论

### 2.1 梨树枝条粉碎覆盖对土壤养分及酶活性的影响

本研究首先比较了梨树修剪枝条粉碎覆盖与对照处理不同土层的土壤 pH、铵态氮、硝态氮、速效钾、有效磷、有机质以及蔗糖酶和脲酶活性等理化特性, 结果如图 1 所示。梨树修剪枝条覆盖对土壤理化特性的影响存在地区差异, 如昌黎、哈尔滨和枝江点的土壤 pH 在覆盖处理中更高, 但毕节点处理之间无显著差异, 许昌点则呈现相反趋势。总体而言, 枝条覆盖可提高土壤有机质含量, 昌黎、哈尔滨、枝江点差异显著; 提高土壤有效磷含量, 昌黎、哈尔滨和许昌点差异显著; 显著提高枝江点速效钾含量。覆盖后哈尔滨和枝江点土壤蔗糖酶和脲酶活性均显著提高。不同深度土层相比较, 0~5 cm 土层中硝态氮、有机质、蔗糖酶较高。大量研究表明土壤表层的有机覆盖物经微生物分解后直接进入土壤, 从而增加土壤有机碳的固存<sup>[20]</sup>。矿质养分在地区间、土层间及覆盖处理间无一致变化趋势与修剪枝条生长年限、矿质养分含量和木质素含量有关, 也与覆盖年限、当地气候条件有关。研究表明, 梨树剪枝中的氮、磷、钾含量均随枝条生长年限的增加而降低<sup>[2]</sup>。同时, 不同地区特殊的气候, 如温度、降水等影响枝条降解速率<sup>[21-22]</sup>。因此, 为了更有效利用修剪枝条以提升果园土壤的肥力, 仍需要评估不同生长年限枝条、不同覆盖量以及不同环境因素对梨树枝条覆盖后土壤理化性状的影响。

### 2.2 梨树枝条粉碎覆盖对土壤微生物群落结构和多样性的影响

为了探究枝条覆盖对土壤微生物群落的影响, 采用扩增子测序对土壤细菌、真菌及原生生物群落进行研究。首先分析土壤细菌、真菌及原生生物群落的结构 (PCoA 分析), 结果如图 2 所示。相较于对照处理, 覆盖枝条后显著影响土壤细菌、真菌和原生生物群落结构, 且 5 个采样点基本呈现一致趋势。覆盖梨树枝条后, 哈尔滨地区不同土层土壤的细菌群落、毕节和枝江不同土层土壤的原生生物群



注：ns 表示差异不显著；\*、\*\*、\*\*\*和\*\*\*\*分别表示在  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$  和  $P < 0.0001$  的水平上有显著差异； $n=9$ 。图中的缩写如下：BJ，毕节；CL，昌黎；HR，哈尔滨；ZJ，枝江；XC，许昌；SC：蔗糖酶，UE：脲酶；CK：对照（不覆盖枝条），Mul：枝条覆盖处理。下同。Note: ns, no significant; \*, \*\*, \*\*\* and \*\*\*\* indicate statistical significance at  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$  and  $P < 0.0001$  levels;  $n=9$  (Duncan's Multiple Range Test); BJ for Bijie City, CL for Changli City, HR for Harbin City, ZH for Zhijiang City, XC for Xuchang City. SC: Saccharase, UE: urease. CK: control (no mulching), Mul: mulching. The same below.

图 1 梨树枝条粉碎覆盖对不同土层的土壤理化特性和土壤酶活性的影响

Fig. 1 Effects of pear pruning branches mulching to the physicochemical properties and soil enzyme activities at different soil depths

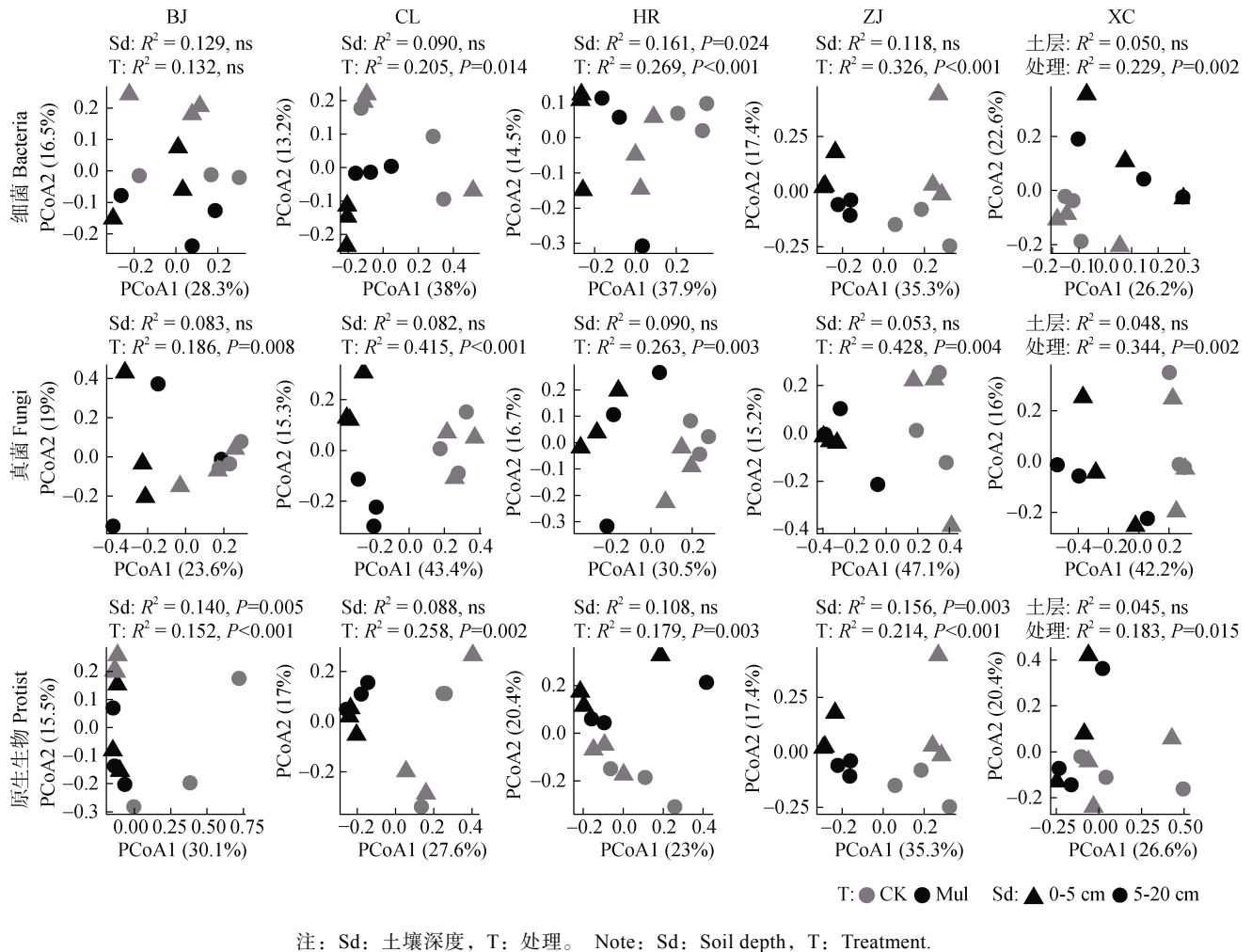


图 2 梨树枝条粉碎覆盖对土壤微生物群落结构的影响 (主坐标分析 (PCoA))

Fig. 2 Effects of pear pruning branches mulching to the structure of soil microbial communities (principal co-ordinates analysis, PCoA)

落在统计学上有显著差异。本研究还比较了同一果园不同土层中土壤微生物群落的差异,结果发现0~5 cm和5~20 cm之间无显著差异,未来研究可关注覆盖后结合秋施基肥对中下层土壤(20 cm以下)的影响,因为表层土壤和底层土壤中的微生物对土壤生态系统的功能同等重要<sup>[23-24]</sup>。

以香农指数为例,比较不同地点覆盖梨树枝条对土壤微生物群落 $\alpha$ 多样性的影响,如图3所示,覆盖梨树枝条对土壤细菌、真菌和原生生物群落多样性的影响无一致趋势,如显著增加了枝江地区的细菌群落、毕节和枝江地区的原生生物群落的香农指数;降低了许昌地区的细菌群落、哈尔滨地区的真菌群落和昌黎地区的原生生物群落的香农指数;但对大多数采样点的细菌、真菌和原生生物群落无显著影响。说明梨树枝条覆盖尚未对土壤微生物群

落多样性形成明显的影响,可能与覆盖的年限较短(1~2年)以及不同地区特定的环境气候有关。土壤中丰富的微生物参与了覆盖枝条的分解转化,与土壤质量和肥力密切相关<sup>[25]</sup>。本研究发现覆盖枝条显著改变了土壤微生物群落结构,但对大部分地区微生物多样性无显著影响(图3)。这可能是由于枝条富集了具有分解木质纤维素能力的微生物类群,使土壤中的微生物趋同。

### 2.3 梨树枝条粉碎覆盖对土壤微生物群落物种组成的影响

对5个采样点梨树枝条覆盖与对照处理土壤细菌、真菌和原生生物在门水平的物种组成进行了差异比较。细菌群落中,以变形菌门为优势物种,其丰度在不同处理中波动变化,但总体上梨树枝条覆盖处理中变形菌门的相对丰度高于对照处理;酸杆

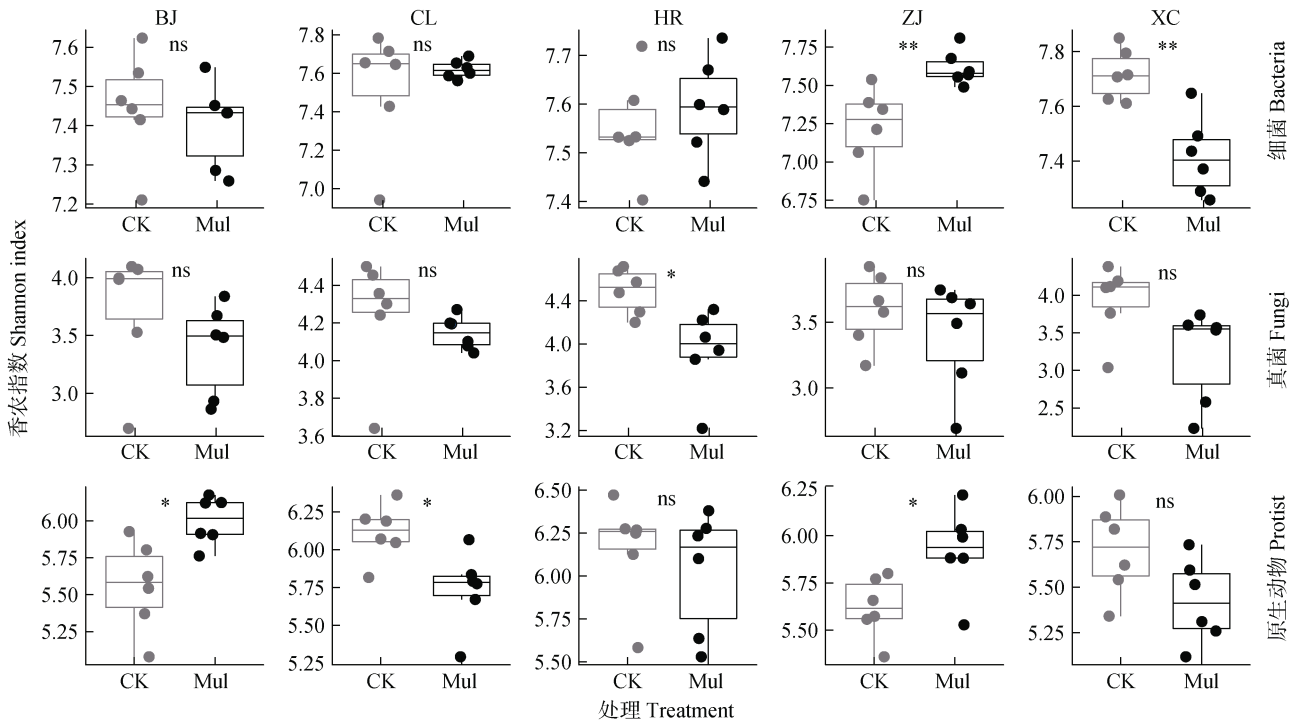


图 3 梨树枝条粉碎覆盖对土壤微生物群落多样性的影响

Fig. 3 Effects of pear pruning branches mulching on the diversity of soil microbial communities

菌门和放线菌门为次优势物种，除了 HE 和 XC 两个地区，其他三个地区中酸杆菌门在覆盖处理中的相对丰度高于对照，而放线菌门在对照处理中更高(图 4a)。真菌群落中，以子囊菌门为绝对的优势菌门，除了枝江点，其他 4 个采样点的覆盖处理中的子囊菌门相对丰度均低于对照处理；其次为担子菌门，同样除了枝江地区，其他 4 个采样点的覆盖处理中担子菌门的相对丰度均高于对照处理(图 4b)。原生生物群落中，后鞭毛生物为优势物种，对照处理略高于覆盖处理；其次为有孔虫界和囊泡虫类，二者在梨树枝条覆盖处理中的相对丰度略高于对照处理(图 4c)。本研究发现同一采样点梨树枝条覆盖与对照处理间土壤微生物群落结构和组成的差异小于不同采样点间的差异(图 4)。这可能是由于不同地区复杂的生物和非生物因素共同塑造了特定的土壤微生物群落。综上所述，梨树枝条覆盖影响了 4 个地区的土壤微生物群落组成，以及其中一些物种(门水平)的相对丰度，进而可能影响土壤养分转化和利用效率。

#### 2.4 基于物种组成的随机森林分析模型精准预测梨树枝条覆盖处理的微生物群落

为了探究能否利用土壤微生物作为生物标记菌

预测样品来自枝条覆盖还是对照处理，利用机器学习的随机森林方法分析两组处理的土壤微生物组。从交叉验证误差曲线可以看出，当使用 60 个 OTU 时，模型曲线的错误率趋于稳定，故选择对模型重要性最高的前 60 个 OTU 作为生物标记菌(图 5a)。如图 5b 所示，展示了重要性前 30 的物种，这些生物标记菌中以细菌和真菌为主，具体分类信息见表 2。30 个关键物种中有 20 个物种在梨树枝条覆盖处理中的丰度显著高于对照，8 个显著低于对照，2 个无显著差异。细菌以变形菌门为主(13 个)，且属于变形菌门的所有物种在覆盖处理中的丰度均显著高于对照，包括 *Acidibacter*、*Xanthobacteraceae*、*Nitrosomonadaceae* 等，说明这些菌株受梨树枝条覆盖的正向驱动，这些细菌可能是降解枝条的潜在微生物。Fu 等<sup>[26]</sup>发现 *Acidibacter* 在施用菜籽饼和绿肥的土壤中显著富集，促进了秸秆的降解，指示了土壤养分变化。有研究表明在秸秆还田土壤中 *Xanthobacteraceae* 和 *Nitrosomonadaceae* 丰度与土壤有机碳含量呈正相关<sup>[27]</sup>；而 *Nitrosomonadaceae* 可促进铵态氮向硝态氮转化，加速秸秆分解<sup>[28]</sup>。与前人研究中发现秸秆类有机物的降解过程以真菌为主导<sup>[29-30]</sup>不同，本研究挖掘了一些与枝条降

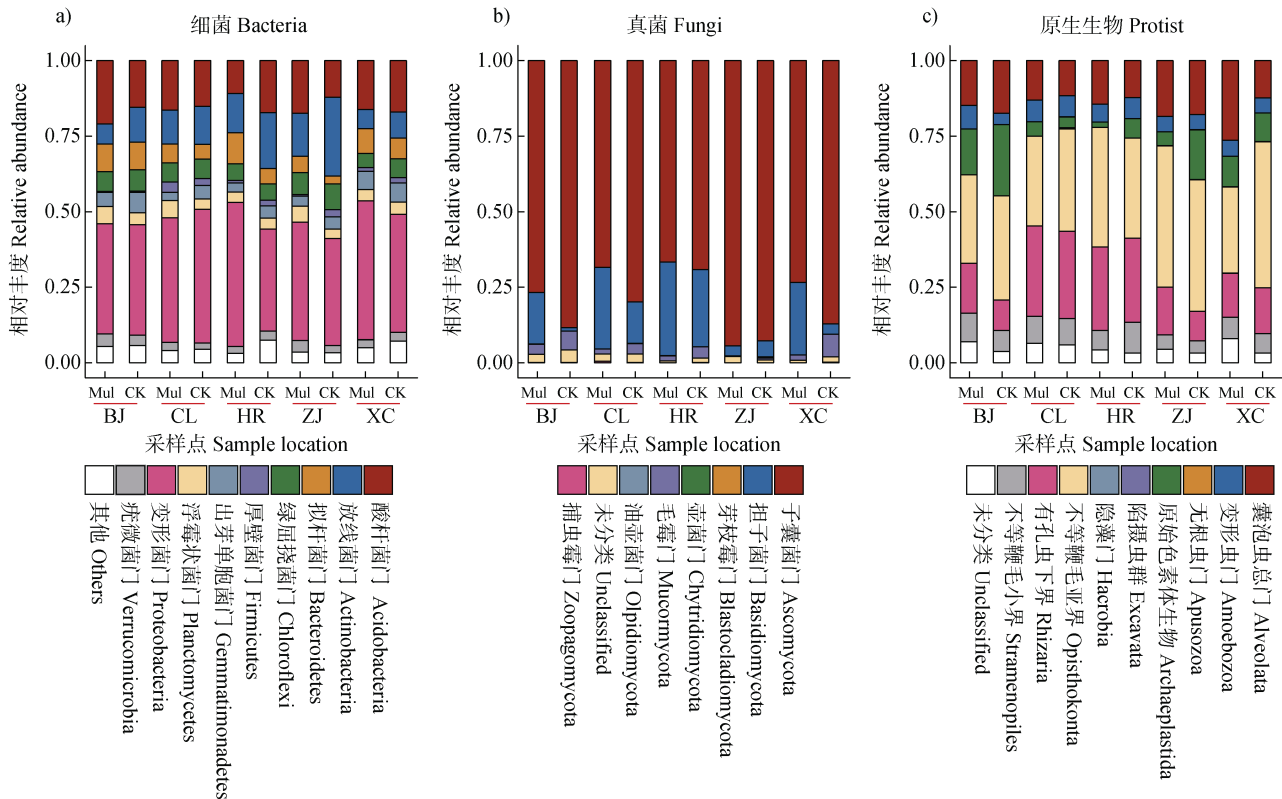


图 4 梨树枝条粉碎覆盖对土壤微生物群落门水平物种组成的影响 (a. 细菌群落物种组成, 展示了丰度前 9 的细菌门的相对丰度; b. 真菌群落物种组成, 展示了丰度前 8 的真菌门的相对丰度; c. 原生物物种组成, 展示了丰度前 9 的原生物门的相对丰度)

Fig. 4 Effects of pear pruning branches mulching on the composition of soil microbial communities at the phyla level (a. relative abundances of top 9 bacterial phyla; b. relative abundances of top 8 fungal phyla; c. relative abundances of top 9 protist phyla)

解有关的细菌资源, 未来有望应用于梨树枝条堆肥的研究中。真菌以子囊菌门为主 (8 个), 包括 *Gibellulopsis*、*Phialophora*、*Podospira* 等, 但不同处理中的丰度无一致变化。在该模型中, 原生物的贡献相对较小, 说明短期的梨树枝条覆盖对土壤原生物的影响不明显。

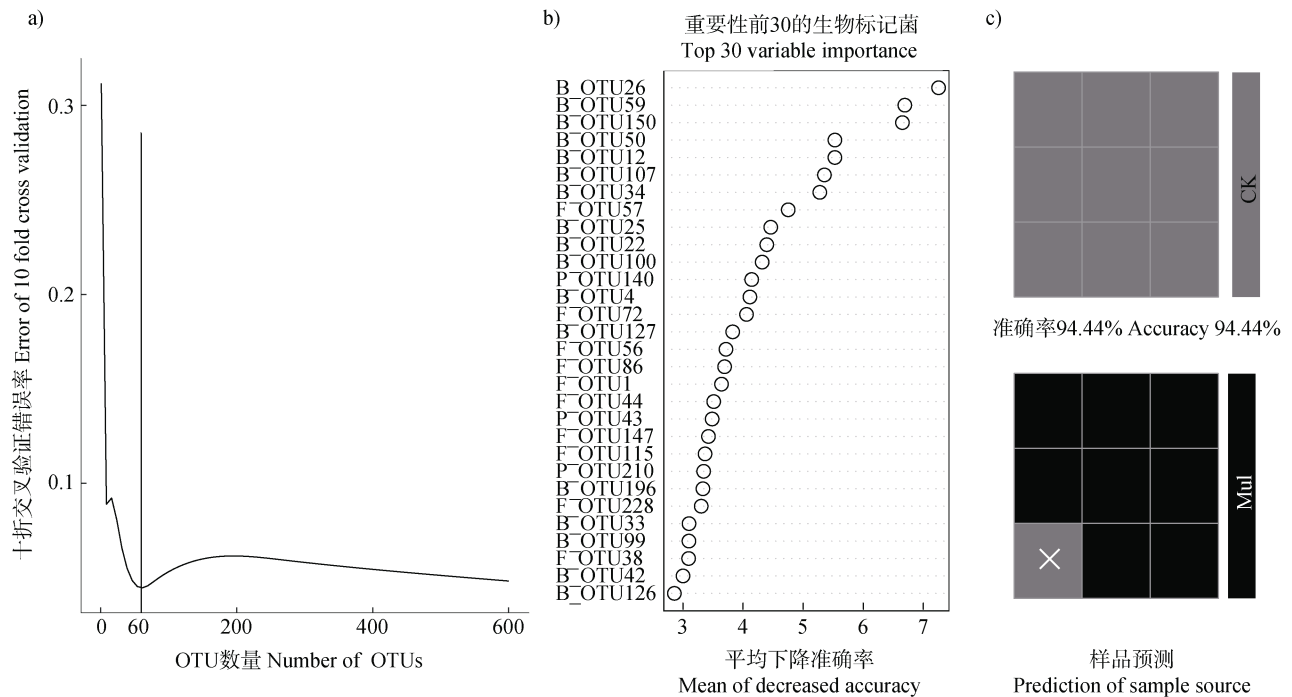
随机森林根据自助采样方法, 对于每个决策树大约三分之二的样本用于训练, 另外三分之一的样本作为袋外数据用于性能评估和计算袋外数据误差。经优化后的袋外预测误差 (out-of-bag estimate of error rate) 减小至 2.38%, 说明显示分类器模型的精准度很高, 可有效识别两类分组。用建模之外的 18 个样品验证模型的准确性 (图 5c), 其中来自对照处理的 9 个样品均被准确预测, 而覆盖处理的 9 个样品仅有 1 个预测错误, 准确率高达 94.44%。利用该分类模型可较为精准地根据关键物种的丰度预测样品来自覆盖还是对照处理, 说明梨树枝条覆盖后

的土壤中一些重要的生物标记菌在不同采样点具有较高的一致性。

## 2.5 土壤理化特性对土壤微生物群落组成的影响

冗余分析 (redundancy analysis, RDA) 发现土壤理化特性和土壤酶活等因子均显著影响细菌、真菌和原生物的群落结构 (图 6, 置换检验,  $P = 0.001$ )。细菌群落的第一和第二轴分别解释了 39.13% 和 23.72% 的变异度, 真菌群落的第一和第二轴分别解释了 32.07% 和 27.23% 的变异度, 原生物群落的第一和第二轴分别解释了 37.60% 和 18.61% 的变异度。从图中可以看出, 不同采样点和覆盖处理微生物群落之间有明显的聚类, 说明采样点和枝条覆盖均显著影响了土壤的细菌、真菌和原生物群落结构。进一步分析土壤理化因子对土壤细菌、真菌和原生物群落的影响, 结果发现不同采样点有不同的主导因素, 如毕节梨园的细菌和原生物群落主要受土壤有机质含量的影响, 枝江梨





注：对梨树枝条覆盖和不覆盖下土壤微生物组（共 60 个样品）在 OTU 水平进行了分类。a. 十折交叉验证错误率；b. 随机森林分类模型中生物标记菌按照对模型准确度的重要性由高到低排序，展示重要性排名前 30 的生物标记菌；c. 利用随机森林分类模型对覆盖与不覆盖做分类预测。该模型基于土壤微生物组成判断样品的来源，上方样品（灰色方块）为对照组，下方样品为枝条覆盖处理，其中灰色表示样品来源被预测为对照土壤，黑色则是预测为枝条覆盖处理的土壤。Note: The soil microbiome (60 samples in total) with or without mulching pear branches was classified at the OTU level. a. error of 10 fold cross validation. b. the biomarkers in the random forest classification model were sorted in order of importance to the accuracy of the model, and the top 30 biomarkers were displayed. c. the random forest classification model was used to make classification predictions for mulching and no mulching treatments. The model determines the source of the sample based on the soil microbial composition. The upper samples (square in grey) are the control (without mulching). The lower samples are mulching treatment, of which the grey color indicates that the sample is predicted to be the control soil, and the black color indicates that the sample is predicted to be the mulched soil.

图 5 基于土壤微生物组的随机森林分类模型精准预测梨树枝条粉碎覆盖下土壤微生物的关键物种

Fig. 5 Random-forest classification model precisely predicted the keystones in soil microbial communities under pear pruning branches mulching

表 2 梨树枝条粉碎覆盖后土壤中微生物的关键物种信息

Table 2 Information of the keystones in soil microbial communities under pear pruning branches mulching

OTU	分类	门	科属	丰度变化（与对照相比）
	Class	Phylum	Family/Genus	Abundance change (compared to control)
B_OTU26	细菌	Proteobacteria	Myxococcales	↑
B_OTU59	细菌	Proteobacteria	Nitrosomonadaceae	↑
B_OTU150	细菌	Proteobacteria	<i>Acidibacter</i>	↑
B_OTU50	细菌	Proteobacteria	Xanthobacteraceae	↑
B_OTU12	细菌	Proteobacteria	Nitrosomonadaceae	↑
B_OTU107	细菌	Proteobacteria	<i>Acidibacter</i>	↑
B_OTU34	细菌	Bacteroidetes	Microscillaceae	↑
F_OTU57	真菌	Ascomycota	<i>Gibellulopsis</i>	↓
B_OTU25	细菌	Nitrospirae	<i>Nitrospira</i>	↓

续表

OTU	分类 Class	门 Phylum	科属 Family/Genus	丰度变化 (与对照相比) Abundance change (compared to control)
B_OTU22	细菌	Proteobacteria	<i>Acidibacter</i>	↑
B_OTU100	细菌	Proteobacteria	<i>Haliangium</i>	↑
P_OTU140	原生生物	Opisthokonta	<i>Chaetomium</i>	↑
B_OTU4	细菌	Proteobacteria	No rank	↑
F_OTU72	真菌	Ascomycota	<i>Phialophora</i>	↑
B_OTU127	细菌	Proteobacteria	<i>Altererythrobacter</i>	↑
F_OTU56	真菌	Ascomycota	<i>Gibellulopsis</i>	↓
F_OTU86	真菌	Ascomycota	<i>Podospora</i>	↓
F_OTU1	真菌	Ascomycota	<i>Phialophora</i>	↑
F_OTU44	真菌	Ascomycota	<i>Pyrenochaetopsis</i>	ns
P_OTU43	原生生物	Opisthokonta	Sordariomycetes	↑
F_OTU147	真菌	Ascomycota	<i>Gibellulopsis</i>	↓
F_OTU115	真菌	Ascomycota	<i>Phialophora</i>	↑
P_OTU210	原生生物	Chlorophyta	<i>Protosiphon</i>	↓
B_OTU196	细菌	Actinobacteria	<i>Nocardioides</i>	↓
F_OTU228	真菌	Mucoromycota	<i>Mortierella</i>	↓
B_OTU33	细菌	Proteobacteria	No rank	↑
B_OTU99	细菌	Acidobacteria	No rank	↑
F_OTU38	真菌	Basidiomycota	<i>Coprinopsis</i>	ns
B_OTU42	细菌	Proteobacteria	<i>Acidibacter</i>	↑
B_OTU126	细菌	Proteobacteria	Myxococcales	↑

注: ↑、↓、ns: 表示该物种的丰度在覆盖处理中显著高于、低于对照处理以及二者之间无显著差异。Note: Up-arrow and down-arrow denote to the relative abundance of microbial taxa under mulching condition was significantly higher or lower than no mulching, respectively. ns denotes no significance.

园的细菌和真菌群落主要受铵态氮影响。整体而言, pH 和有效磷 (AP) 是影响不同梨园土壤细菌群落的 2 个主导因子 (pH:  $F = 10.98$ ,  $P < 0.001$ ; 有效磷:  $F = 8.73$ ,  $P < 0.001$ ); 有效磷 (AP) 和速效钾 (AK) 是影响土壤真菌群落的 2 个主导因子 (有效磷:  $F = 10.97$ ,  $P < 0.001$ ; 速效钾:  $F = 7.70$ ,  $P < 0.001$ ); 有效磷 (AP) 和 pH 是影响土壤原生生物群落的 2 个主导因子 (有效磷:  $F = 9.61$ ,  $P < 0.001$ ; pH:  $F = 5.21$ ,  $P < 0.001$ )。而梨树枝条覆盖处理显著增加了土壤有机质、有效磷、速效钾等养分的含量, 可能进一步影响了覆盖土壤中的微生物群落组成和结构。

结果还发现土壤速效磷对土壤微生物群落的影响最显著 (图 6)。研究表明相较于其他覆盖物, 果树枝条覆盖可减少土壤磷的流失<sup>[31]</sup>, 土壤有效磷含

量增加<sup>[32]</sup>。本研究也发现 3 个采样点 (昌黎、哈尔滨、许昌) 中覆盖梨树枝条后显著提高了土壤有效磷的含量 (图 1), 土壤中活化的磷可能进一步影响了梨园土壤的微生物群落。前人研究表明土壤中添加磷可增加土壤微生物生物量, 改变土壤微生物群落组成<sup>[33-34]</sup>, 与本文结果一致。土壤中磷的可利用性也可改变土壤真菌结构及其与木质纤维素降解相关酶的活性<sup>[35]</sup>, 该部分结果有待进一步探究。

进一步通过斯皮尔曼相关性分析探究梨粉碎枝条处理中, 富集的土壤微生物类群 (OTU 水平) 与土壤理化特性之间的相关性, 相关性系数  $r > 0$  (正相关) 且  $P < 0.05$  的结果如图 7 所示。结果表明, 土壤有机质含量与细菌 B\_OTU34 (*Microscillaceae* 属,  $r = 0.62$ ) 和真菌 F\_OTU38 (*Coprinopsis* 属,  $r = 0.60$ )

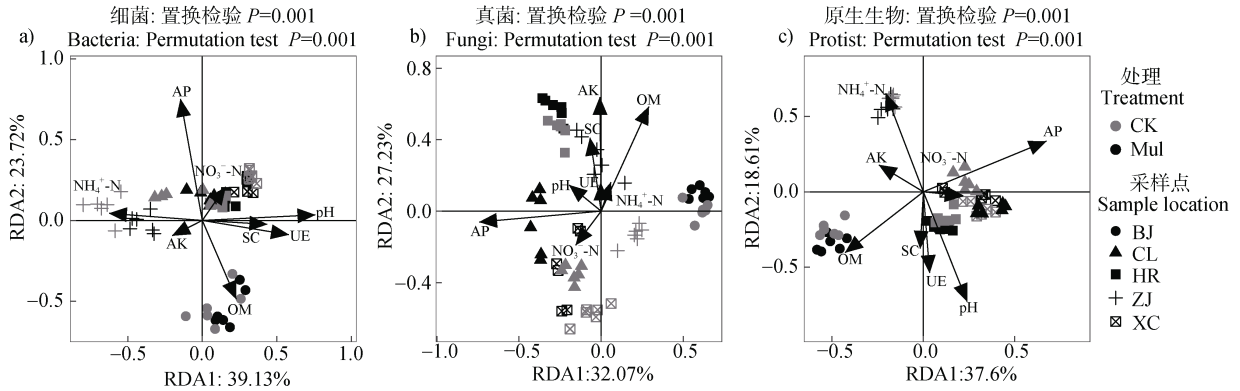


图 6 土壤微生物群落与土壤理化特性的冗余分析 (RDA) (a. 细菌群落; b. 真菌群落; c. 原生生物群落)

Fig. 6 Redundancy analysis (RDA) of the microbial communities and soil physicochemical properties (a. bacterial community; b. fungal community; c. protist community)

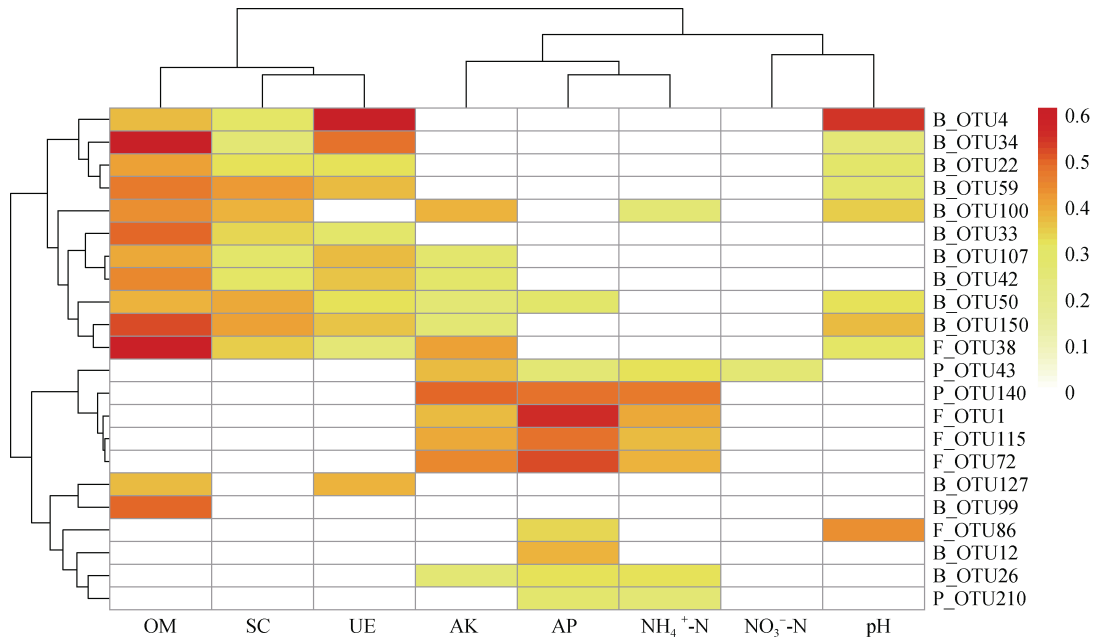


图 7 梨树枝条粉碎覆盖处理下土壤微生物群落 (OTU 水平) 与土壤理化特性的斯皮尔曼相关性

Fig. 7 Spearman correlations between soil microbial community (OTU level) and physicochemical properties under pear pruning branches mulching

相对丰度相关性较强, 土壤 pH 和土壤脲酶活性与细菌 B\_OTU4 (Proteobacteria 门,  $r = 0.55$  和  $0.61$ ) 相对丰度相关性较强, 而土壤有效磷含量与真菌 F\_OTU1 (*Phialophora* 属,  $r = 0.56$ ) 相对丰度具有较好的相关性。土壤有机质含量与细菌 B\_OTU34 相关性最强。

### 3 结论

本研究初步评估了梨树枝条覆盖对土壤的影响, 发现覆盖在土壤表层的粉碎梨树枝条增加了土

壤有机质含量; 由于覆盖时间较短, 对土壤微生物群落多样性无显著影响, 但改变了细菌和真菌群落结构, 土壤有机质与 *Microscillaceae* 属类群细菌的相关性最强。未来还需增加样品采集数量和覆盖地区, 进一步评估不同地区梨树枝条覆盖对土壤物理、化学、生物等性质影响的规律。此外, 覆盖枝条对果实产量和品质的影响还有待随覆盖年限递增持续追踪, 其影响的机制也有待进一步探究。总体而言, 本研究解析了参与梨树枝条降解和养分转化一些重要的潜在关键细菌和真菌类群, 为未来筛选高效降解梨树枝条的微生物菌株提供了方向理论依据。

## 参考文献 (References)

- [ 1 ] Zhang S L, Xie Z H. Current status, trends, main problems and the suggestions on development of pear industry in China[J]. *Journal of Fruit Science*, 2019, 36 ( 8 ): 1067—1072. [张绍铃, 谢智华. 我国梨产业发展现状、趋势、存在问题与对策建议[J]. *果树学报*, 2019, 36 ( 8 ): 1067—1072.]
- [ 2 ] Zhang N W, Dong C X, Xu Y C. Nutrient amounts removed by the pruning branches and the fruit harvest from the pear tree[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2013, 36 ( 4 ): 37—42. [张乃文, 董彩霞, 徐阳春. 梨树修剪枝和果实从树体移走的养分研究[J]. *南京农业大学学报*, 2013, 36 ( 4 ): 37—42.]
- [ 3 ] Li X, Wang Y P, Wang Y F, et al. Study on the best composting parameters and fertilization effect of branch organic fertilizer[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2022, 38 ( 6 ): 63—68 [李祥, 王永平, 王耀凤, 等. 枝条有机肥最佳堆肥参数及施用效果研究[J]. *中国农学通报*, 2022, 38 ( 6 ): 63—68]
- [ 4 ] Zhao P. Effects of straw returning and branch composting on soil properties and fruit quality of pear orchard[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015. [赵鹏. 秸秆还田和枝条堆肥对梨园土壤性状及梨果品质的影响研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.]
- [ 5 ] Li X S, Qu C Y, Li Y U, et al. Long-term effects of straw mulching coupled with n application on soil organic carbon sequestration and soil aggregation in a winter wheat monoculture system[J]. *Agronomy Journal*, 2021, 113 ( 2 ): 2118—2131.
- [ 6 ] Wang H H, Guo Q C, Li X, et al. Effects of long-term no-tillage with different straw mulching frequencies on soil microbial community and the abundances of two soil-borne pathogens[J]. *Applied Soil Ecology*, 2020, 148: 103488.
- [ 7 ] Zhou J T, Cheng C G, Zhao D Y, et al. Effects of different apple branches mulching patterns on soil physical-chemical properties of apple orchard[J]. *Northern Horticulture*, 2019 ( 11 ): 39—44 [周江涛, 程存刚, 赵德英, 等. 苹果枝条不同覆盖方式对果园土壤理化性质的影响[J]. *北方园艺*, 2019 ( 11 ): 39—44]
- [ 8 ] Liu L, Shi H, Luan X L, et al. Effects of returning discarded and crushed pear tree branches to field on soil physicochemical properties and pear growth in pear orchard[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, 41 ( 6 ): 1019—1027. [刘莉, 史昊, 栾晓龙, 等. 梨树弃枝粉碎还田对梨园土壤理化性质和梨生长的影响[J]. *西北植物学报*, 2021, 41 ( 6 ): 1019—1027.]
- [ 9 ] Gao Z L, Karlsson I, Geisen S, et al. Protists: Puppet Masters of the rhizosphere microbiome[J]. *Trends in Plant Science*, 2019, 24 ( 2 ): 165—176.
- [ 10 ] Geisen S, Mitchell E A D, Adl S, et al. Soil protists: A fertile frontier in soil biology research[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2018, 42 ( 3 ): 293—323.
- [ 11 ] Cardenas E, Wu W M, Leigh M B, et al. Significant association between sulfate-reducing bacteria and uranium-reducing microbial communities as revealed by a combined massively parallel sequencing-indicator species approach[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 ( 20 ): 6778—6786.
- [ 12 ] Gardes M, Bruns T D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. *Molecular Ecology*, 1993, 2 ( 2 ): 113—118.
- [ 13 ] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics// Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J W T. PCR protocols : a guide to methods and applications[M]. New York: Academic Press, 1990: 315—322 .
- [ 14 ] Bass D, Silberman J D, Brown M W, et al. Coprophilic amoebae and flagellates, including *Guttulinopsis*, *Rosculus* and *Helkesimastix*, characterise a divergent and diverse rhizarian radiation and contribute to a large diversity of faecal-associated protists[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18 ( 5 ): 1604—1619.
- [ 15 ] Xiong W, Song Y Q, Yang K M, et al. Rhizosphere protists are key determinants of plant health[J]. *Microbiome*, 2020, 8 ( 1 ): 27.
- [ 16 ] Gu Y A, Banerjee S, Dini-Andreote F, et al. Small changes in rhizosphere microbiome composition predict disease outcomes earlier than pathogen density variations[J]. *The ISME Journal*, 2022, 16 ( 10 ): 2448—2456.
- [ 17 ] Guillou L, Bachar D, Audic S, et al. The Protist Ribosomal Reference database ( PR2 ): A catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41 ( D1 ): D597—D604.
- [ 18 ] Abarenkov K, Tedersoo L, Nilsson R, et al. PlutoF—a web based workbench for ecological and taxonomic research, with an online implementation for fungal ITS sequences[J]. *Evolutionary Bioinformatics*, 2010, 6: DOI: 10.4137/EBO.S6271.
- [ 19 ] Liaw A, Wiener M. Classification and regression by randomforest[J]. *R News*, 2002, 2/3: 18—22.
- [ 20 ] Zhang Z L, Kaye J P, Bradley B A, et al. Cover crop functional types differentially alter the content and composition of soil organic carbon in particulate and mineral-associated fractions[J]. *Global Change Biology*, 2022, 28 ( 19 ): 5831—5848.
- [ 21 ] Wahdan S F M, Ji L, Schädler M, et al. Future climate conditions accelerate wheat straw decomposition alongside altered microbial community composition, assembly patterns, and interaction networks[J]. *The ISME Journal*, 2023, 17 ( 2 ): 238—251.

- [ 22 ] Liski J, Nissinen A, Erhard M, et al. Climatic effects on litter decomposition from Arctic tundra to tropical rainforest[J]. *Global Change Biology*, 2003, 9 ( 4 ): 575—584.
- [ 23 ] Rchiad Z, Dai M, Hamel C, et al. Soil depth significantly shifted microbial community structures and functions in a semiarid prairie agroecosystem[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 815890.
- [ 24 ] Will C, Thürmer A, Wollherr A, et al. Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 ( 20 ): 6751—6759.
- [ 25 ] Kim N, Zabaloy M C, Guan K Y, et al. Do cover crops benefit soil microbiome? A meta-analysis of current research[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 142 ( 7 ): 107701.
- [ 26 ] Fu H P, Li H, Yin P, et al. Integrated application of rapeseed cake and green manure enhances soil nutrients and microbial communities in tea garden soil[J]. *Sustainability*, 2021, 13 ( 5 ): 2967.
- [ 27 ] Duan Y, Chen L, Li Y M, et al. N, P and straw return influence the accrual of organic carbon fractions and microbial traits in a Mollisol[J]. *Geoderma*, 2021, 403: 115373.
- [ 28 ] Cheng J B, Chen Y C, He T B, et al. Soil nitrogen leaching decreases as biogas slurry DOC/N ratio increases[J]. *Applied Soil Ecology*, 2017, 111: 105—113.
- [ 29 ] Zheng H, Yang T, Bao Y, et al. Network analysis and subsequent culturing reveal keystone taxa involved in microbial litter decomposition dynamics[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2021, 157: 108230.
- [ 30 ] Wang C, Xiao R, Guo Y T, et al. Changes in soil microbial community composition during *Phragmites australis* straw decomposition in salt marshes with freshwater pumping[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 762: 143996.
- [ 31 ] Wang J, Huang J, Zhao X N, et al. Simulated study on effects of ground managements on soil water and available nutrients in jujube orchards[J]. *Land Degradation and Development*, 2016, 27 ( 1 ): 35—42.
- [ 32 ] Zhou J T, Lv D G, Qin S J. Effects of different organic matter mulching on water content, temperature, and available nutrients of apple orchard soil in a cold region[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25 ( 9 ): 2551—2556. [周江涛, 吕德国, 秦嗣军. 不同有机物覆盖对冷凉地区苹果园土壤水温环境及速效养分的影响[J]. *应用生态学报*, 2014, 25 ( 9 ): 2551—2556.]
- [ 33 ] Li J, Li Z A, Wang F M, et al. Effects of nitrogen and phosphorus addition on soil microbial community in a secondary tropical forest of china[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2015, 51 ( 2 ): 207—215.
- [ 34 ] Liu L, Gundersen P, Zhang T, et al. Effects of phosphorus addition on soil microbial biomass and community composition in three forest types in tropical China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 44 ( 1 ): 31—38.
- [ 35 ] Chen H, Yin C, Fan X P, et al. Effect of P availability on straw-induced priming effect was mainly regulated by fungi in croplands[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105 ( 24 ): 9403—9418.

( 责任编辑: 陈荣府 )