

DOI:10.11766/trxb202401110021

孙鲁沅, 刘佳, 冯蒙蒙, 刘晗, 马婷婷, 陈晓芬, 林永新. 紫云英还田对红壤水稻土氨氧化微生物功能基因丰度的影响[J]. 土壤学报, 2024,
SUN Luyuan, LIU Jia, FENG Mengmeng, LIU Han, MA Tingting, CHEN Xiaofen, LIN Yongxin. Effects of Chinese Milk Vetch Incorporation on the Gene Abundance of Ammonia-oxidizing Microorganisms in Red Paddy Soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2024,

紫云英还田对红壤水稻土氨氧化微生物功能基因丰度的影响*

孙鲁沅^{1,2}, 刘佳^{1†}, 冯蒙蒙², 刘晗¹, 马婷婷¹, 陈晓芬¹, 林永新^{2†}

(1. 江西省农业科学院土壤肥料与资源环境研究所, 南昌 330200; 2. 福建师范大学地理科学学院, 福州 350117)

摘要: 硝化作用是氮循环的重要组成部分, 会影响土壤氮素有效性, 进而引发水体富营养化和温室气体氧化亚氮排放等生态环境问题。为研究水稻-紫云英种植模式下, 紫云英还田对红壤水稻土氨氧化微生物功能基因丰度的影响, 以不施肥处理(CK)作为对照, 分别设置紫云英还田(G)、施用100%化肥(C)、紫云英还田+100%化肥(GC), 紫云英还田+化肥减量20%(GCT20)处理。通过实时定量PCR的方法, 对各处理氨氧化古菌(AOA)、氨氧化细菌(AOB)和完全氨氧化菌(comammox *Nitrospira*)分支A(Clade A)、分支B(Clade B)功能基因丰度进行研究。结果表明: 与不施肥处理相比, 紫云英还田可提升红壤水稻土中有机碳和全氮含量, 而单施化肥对其无显著影响。土壤AOA和Clade B基因丰度在各处理间均无明显差异, 表明这两类氨氧化微生物对化肥氮和绿肥氮的响应均较弱。然而, 单施化肥或紫云英还田配施化肥均可显著提高AOB和Clade A基因丰度, 但仅紫云英还田处理对AOB和Clade A基因丰度无显著影响, 表明AOB和Clade A对化肥氮更敏感, 而对绿肥氮的响应相对较小。此外, 所有氨氧化微生物丰度均呈成熟期、孕穗期、分蘖期依次降低的趋势, 表明水稻的生长和氧气浓度是影响氨氧化微生物生长的重要因素。综上所述, 生育期是影响水稻土壤氨氧化微生物丰度的关键因素, 但在同一生育期, 紫云英还田对AOB和Clade A丰度的提升作用远低于化肥, 绿肥可能更有利于氮素的保留和稳定。

关键词: 红壤水稻土; 绿肥; 氨氧化古菌; 氨氧化细菌; 完全氨氧化菌

中图分类号: S154.36

文献标志码: A

Effects of Chinese Milk Vetch Incorporation on the Gene Abundance of Ammonia-oxidizing Microorganisms in Red Paddy Soil

SUN Luyuan^{1,2}, LIU Jia^{1†}, FENG Mengmeng², LIU Han¹, MA Tingting¹, CHEN Xiaofen¹, LIN Yongxin^{2†}

(1. Soil and Fertilizer & Resources and Environment Institute, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China; 2. School of Geographical Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China)

Abstract: 【Objective】 Nitrification, an important component of nitrogen cycling, has the potential to influence

*国家重点研发计划项目(2021YFD1700203)、国家自然科学基金项目(42267046, 32160766)和国家现代农业产业技术体系项目(CARS-22)资助 Supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2021YFD1700203), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 42267046 and 32160766), the Agriculture Research System of MOF and MARA, China (No. CARS-22)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: liujia422@126.com; yxlin@fjnu.edu.cn

作者简介: 孙鲁沅(1998—), 女, 山东菏泽人, 硕士, 主要研究方向为土壤生态学。E-mail: sunluyuan2022@163.com
收稿日期: 2024-01-11; 收到修改稿日期: 2024-05-06; 网络首发日期(www.cnki.net):

soil nitrogen availability. As a result, it will lead to ecological and environmental issues such as eutrophication, and greenhouse gas (nitrous oxide) emissions. The objective of this study was to explore the effect of Chinese milk vetch incorporation on the gene abundance of ammonia-oxidizing microorganisms in red paddy soil under a rice-Chinese milk vetch planting system. 【Method】 In a field experiment, five fertilization treatments were applied, including Chinese milk vetch incorporation (G), 100% chemical fertilizer (C), Chinese milk vetch incorporation + 100% chemical fertilizer (GC), and Chinese milk vetch incorporation + 20% chemical fertilizer reduction (GCT20), with a no fertilization treatment serving as the control (CK). Real-time quantitative PCR was used to determine the abundance of ammonia-oxidizing archaea (AOA), ammonia-oxidizing bacteria (AOB), and comammox *Nitrospira* Clade A and Clade B in each treatment. 【Result】 The results showed that Chinese milk vetch incorporation increased soil organic carbon and total nitrogen content compared with CK, while the 100% chemical fertilizer treatment showed no significant effect. There was no significant difference in AOA and Clade B abundance among all the treatments, indicating a weak response to nitrogen inputs from both chemical fertilizers and green manure. However, both the sole application of chemical fertilizer and its combination with Chinese milk vetch incorporation significantly increased the abundance of AOB and Clade A. Additionally, Chinese milk vetch incorporation alone had no significant effect on AOB and Clade A, suggesting their sensitivity to chemical fertilizer, but resistance to green manure nitrogen input. Furthermore, gene abundance of all ammonia-oxidizing microorganisms showed a similar trend across growth stages, with higher abundance observed during the mature stage followed by the booting stage and then the tillering stage. This suggests that growth stage and oxygen concentration are key factors influencing the growth of these microorganisms in paddy soils. 【Conclusion】 Growth stage is a key factor affecting the abundance of ammonia-oxidizing microorganisms in paddy soils. Additionally, Chinese milk vetch incorporation had a weaker promotion effect on AOB and Clade A abundance compared to chemical fertilizer, potentially contributing to nitrogen retention and stability in paddy soils.

Key words: Red paddy soil; Green manure; Ammonia-oxidizing archaea; Ammonia-oxidizing bacteria; Comammox *Nitrospira*

硝化作用是土壤氮循环的关键环节,传统上该过程通常由两组不同的微生物协同完成。首先,氨氧化古菌(AOA)或氨氧化细菌(AOB)通过氨氧化酶将氨(NH_3)氧化为亚硝酸盐(NO_2^-);其次,亚硝酸盐氧化菌(NO)将亚硝酸盐(NO_2^-)转化为硝酸盐(NO_3^-)^[1]。然而,近年来新发现的完全氨氧化菌(Comammox *Nitrospira*)同时具备氨氧化和亚硝酸盐氧化的功能,可直接将氨氧化为硝酸盐^[2-3]。该发现表明硝化作用可由单个细菌群体完成,从而为理解土壤氮素转化提供了新思路。Comammox *Nitrospira* 属于亚硝化螺菌谱系II,根据 *amoA* (ammonia monooxygenase) 基因的系统发育分析,其可分为分支A(Clade A)和分支B(Clade B)^[4]。相关研究发现,对氨有着高亲和力的AOA更喜爱贫营养环境,而AOB对氨的亲合力偏低,更喜好富营养环境^[5]。相比之下,尽管有研究证实完全氨氧化菌可同时存在于养分充足和贫瘠的土壤中^[6],但有关其分支Clade A和Clade B在土壤生态系统中的分布状况及生理特征尚不清楚,仍需进一步研究探明。

水稻-紫云英轮作种植被广泛应用于农田管理中,因水稻与紫云英生长周期不同,两者轮作可有效减少土壤中的养分流失和水分蒸发^[7]。紫云英(*Astragalus sinicus* L.)作为豆科绿肥,其根系可通过固氮作用或根系分泌物的方式增加土壤养分,促进植物与微生物的生长发育,进而增强农田生产可持续性^[8-9]。水稻-紫云英轮作可显著影响稻田土壤氨氧化微生物,并通过微生物-植物间的互作对土壤氨氧化微生物群落进行调控^[10-11]。先前研究表明,紫云英还田主要是通过植物和根瘤的共生过程,缓慢而持续地释放氮素,进而影响土壤氮素利用效率^[12];而化肥中以高浓度的硝酸盐或铵盐为主,施用后较易溶解并释放氮素养分,可在短时间内提升土壤氮素供给^[13]。因紫云英和化肥中氮素供应状况的差异,氨氧化微生物对二者的响应也有所不同。Gao等^[11]发现紫云英还田后水稻土AOA和AOB丰度显著提高;Xiang等^[14]研究发现尿素施用后,土壤AOA丰度下降,但AOB丰度显著提升;而Zhang等^[15]发现尿素施用后,Clade A丰度显著增加,Clade B丰度显著下降。因此,当前水稻-紫云英轮作模式下土壤氨氧化微生物功能基因丰度的研究仍相对较少,且结果尚存争议,该模式如何影响红壤水稻土氨氧化微生物功能基因丰度,尤其是完全氨氧化菌功能基因丰度仍有待探索。

江西省水稻种植区多以红壤黄泥田为主,因其土壤酸化贫瘠,水稻产量普遍较低^[16-17]。为改善该状况,江西省农业科学院于高安基地建立了水稻-紫云英轮作种植模式的试验田,以不施肥处理(CK)作为对照,分别设置紫云英还田(G)、施用 100%化肥(C)、紫云英还田+100%化肥(GC)和紫云英还田+化肥减量 20%(GCT20)处理。本研究依托于该试验样地,通过实时荧光定量 PCR 的方法,研究紫云英还田对土壤氨氧化微生物功能基因丰度的影响,以期探明红壤水稻土氨氧化微生物对绿肥氮源和化肥氮源的响应规律,进而为稻田养分管理提供理论支撑和基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验于 2016 年在江西省高安市试验基地(28°15'22.03"N, 115°07'36.83"E)进行,该地为亚热带季风气候,年均气温 17.5℃,年均降水量 1 530 mm。试验地土壤为第四纪红黏土母质发育的红黄泥。试验前,0~20 cm 土层的理化性质为:pH 5.82、有机质 23.49 g·kg⁻¹、全氮 0.99 g·kg⁻¹、全磷 0.43 g·kg⁻¹、全钾 19.71 g·kg⁻¹、碱解氮 71.88 mg·kg⁻¹、有效磷 12.51 mg·kg⁻¹、速效钾 49.78 mg·kg⁻¹。

1.2 试验设计

采用田间小区试验,各小区面积为 21 m²,小区之间用田埂覆膜隔离,并设置单独排水沟与灌排水口。种植制度为紫云英-早稻-晚稻,供试紫云英品种为“赣紫 1 号”,早稻品种为“中嘉早 17”,晚稻品种为“五丰优 T025”。试验设置 5 个处理,各处理 3 重复:1) 不施肥(CK);2) 紫云英还田(G);3) 施用 100%化肥(C);4) 紫云英还田+100%化肥(GC);5) 紫云英还田+化肥减量 20%(GCT20)。当地早稻 N、P₂O₅、K₂O 常规施用量分别为 150、75、120 kg·hm⁻²,晚稻 N、P₂O₅、K₂O 常规施用量分别为 180、75、150 kg·hm⁻²,紫云英翻压量为 22 500 kg·hm⁻²。其中,100%化肥为当地常规施肥量,减肥处理较早稻常规施肥量减少 20%(GCT20),晚稻均按当地常规用量施肥。早晚稻的磷、钾肥全部做基肥一次施用,氮肥按基肥:分蘖肥 = 6:4 分次施用。氮、磷、钾肥分别使用尿素(含 N 40%)、钙镁磷肥(含 P₂O₅ 12%)和氯化钾(含 K₂O 60%)。

1.3 土壤样品采集

分别于 2023 年 5 月 19 日、6 月 30 日、7 月 18 日采集早稻分蘖期、孕穗期和成熟期的土壤样品,取耕层(0~20 cm)土样,按照五点取样法在每小区随机取五钻混合为 1 个复合土样,混匀过 2 mm 筛,并去除石块和根茬等杂物。将样品分为两份,一份风干用于土壤基础理化性质测定,一份保存于-80℃用于土壤 DNA 提取。

1.4 土壤基础理化性质测定

土壤基础理化性质测定参照文献[18]的方法进行。土壤 pH 测定:取 5 g 风干土,以水土比 5:1 加入去离子水,振荡 30 min 后用 pH 计测定。有机碳(SOC)、全氮(TN)测定:取过筛后的风干土研磨,用锡纸包好并称重,随后利用碳氮元素分析仪(Various MAX, Elementar, 德国)测定。土壤可溶性有机碳(DOC)测定:取 10 g 鲜土,以水土比 5:1 加入去离子水,振荡、过滤后用岛津碳氮分析仪(TOC Vcph, Shimadzu, 日本)测定。土壤硝态氮(NO₃⁻)和铵态氮(NH₄⁺)测定:取相当于 5 g 干土的鲜土,以水土比 2.5:1 加入 2 mol·L⁻¹的氯化钾(KCl)溶液浸提,过滤后用连续流动分析仪(San⁺⁺ System, Skalar, 荷兰)测定。土壤有效磷(AP)含量测定:取 5 g 风干土,加入 50 mL 0.05 mol·L⁻¹ HCl 和 0.025 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 的混合液振荡 30 min 后,用钼蓝比色法测定。

1.5 土壤总 DNA 提取和实时荧光定量 PCR

使用 FastDNA® SPIN Kit for soil 试剂盒从 0.5g 新鲜土壤中提取总 DNA,提取后的 DNA 保存于-80℃ 备用。土壤中的氨氧化微生物基因丰度通过 CFX96 实时检测系统来测定。引物序列和反应条件详见表 1。标准曲线制备步骤如下^[19]:1) 扩增并克隆目标基因,获取含该基因的质粒;2) 将质粒导入大肠杆菌,恒温培养并提取质粒 DNA;3) 使用 NanoDrop ND-200 检测 DNA

浓度, 计算质粒的基因拷贝数; 4) 对质粒进行 10 倍梯度稀释, 制备标准品, 并据此绘制标准曲线以准确计算样本中的基因拷贝数。定量 PCR 反应均采用 20 μL 的反应体系, 包括 10 μL SYBR Premix, 0.2 μL 前引物, 0.2 μL 后引物, 8.6 μL 灭菌水和 1 μL DNA 模版。实验中各反应的溶解曲线均呈单峰, 扩增效率为 85%至 100%, R^2 为 0.992~0.999。

表 1 定量 PCR 引物和热循环条件

Table 1 PCR primers and thermal cycling conditions

氨氧化功能基因 <i>amoA</i> gene	引物序列 Primer sequences	片段长度 Amplicon length	热循环条件 Thermal conditions	参考文献 Reference
氨氧化古菌 Ammonia-oxidizing archaea	Arch- <i>amoA</i> F: STAATGGTCTGGCTTAGACG	635 bp	95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 40 个循环;	[20]
	Arch- <i>amoA</i> R: GCGGCCATCCATCTGTATGT		熔解曲线: 温度从 65°C 上升至 95°C, 每 5 s 增加 0.5°C	
	<i>amoA</i> -1F: GGGGTTTCTACTGGTGGT		95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 40 个循环;	
氨氧化细菌 Ammonia-oxidizing bacteria	<i>amoA</i> -2R: CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	491 bp	熔解曲线: 温度从 65°C 上升至 95°C, 每 5 s 增加 0.5°C	[20]
			95°C 预变性 3 min; 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 20 s, 72°C 延伸 15 s, 39 个循环;	
			熔解曲线: 温度从 65°C 上升至 95°C, 每 5 s 增加 0.5°C	
完全氨氧化菌分支 A Comammox <i>Nitrospira</i> Clade A	CA377f: GTGGTGGTGGTCBAAYTA	199 bp	95°C 预变性 3 min; 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 20 s, 72°C 延伸 15 s, 39 个循环;	[21]
	C576r: GAAGCCCATRTARTCNGCC		熔解曲线: 温度从 65°C 上升至 95°C, 每 5 s 增加 0.5°C	
			95°C 预变性 3 min; 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 20 s, 72°C 延伸 15 s, 39 个循环;	
完全氨氧化菌分支 B Comammox <i>Nitrospira</i> Clade B	CB377f: GTACTGGTGGGCBAAYTT	199 bp	熔解曲线: 温度从 65°C 上升至 95°C, 每 5 s 增加 0.5°C	[21]
	C576r: GAAGCCCATRTARTCNGCC			

1.6 数据分析

所有试验数据用 Excel 2010 进行处理。用 SPSS 20.0 软件对数据进行方差分析, 生育期及处理间的差异显著性用邓肯 (Duncan) 多重比较进行检验, 采用双因素方差分析检验生育期与处理的交互作用对土壤基础理化性质的影响以及化肥与绿肥的交互作用对氨氧化基因丰度的影响。利用成对样本 t 检验 (Paired samples t -test) 研究不同时期之间氨氧化微生物基因丰度的差异显著性。利用 R 语言 “vegan” 和 “dplyr” 包进行皮尔森 (Pearson) 相关性分析, 利用 “randomForest” 和 “rfPermute” 进行随机森林分析, 研究土壤基础理化性质和氨氧化微生物基因丰度间的相关性。利用 Origin 2021 作图。

2 结果

2.1 紫云英还田对不同生育期土壤基础理化性质的影响

由表 2 可知, 水稻分蘖期各处理中 pH 较 CK 均显著提升 ($P < 0.05$), 其中, GC 处理 pH 最高为 6.57; 各处理中 SOC 和 NO_3^- 含量均以 GCT20 处理最高, 分别为 $13.88 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。与 CK 处理相比, G 处理中 TN 含量显著增加, 而 NO_3^- 含量显著降低; C 处理中 NH_4^+ 和 AP 含量显著增加; GC 处理中 DOC、 NH_4^+ 和 AP 含量均为最高, 分别为 $26.48 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $31.77 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $20.60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 显著高于 CK; 与 C 处理相比, GC 和 GCT20 处理中各土壤理化指标无明显变化。水稻孕穗期, 各处理中 pH 较 CK 无明显变化; 与 CK 处理相比, G 处理中 SOC、TN 和 NH_4^+ 含

量显著增加,增幅分别为 37.92%、110.57%和 61.12%; C 和 GC 处理中 SOC、TN 和 AP 含量显著增加, NH_4^+ 含量显著降低; C 处理中 NO_3^- 含量为 $0.52 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 较 CK 显著增加了 160.84%; 与 C 处理相比, GC 处理中 TN 含量显著增加, GCT20 处理中 SOC 和 TN 含量均显著增加。水稻成熟期,各处理间 pH 无显著差异; 与 CK 处理相比, G 处理中 SOC、 NO_3^- 和 AP 含量分别显著增加了 19.21%、45.26%和 91.43%; C 处理中 NO_3^- 和 AP 含量分别显著增加了 77.47%和 257.71%; GC 处理中 SOC、 NO_3^- 和 AP 含量均为最高,分别为 $13.79 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $7.19 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $17.33 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 显著高于 CK; 与 C 处理相比, GC 处理中 SOC 含量显著增加,而 GCT20 处理中各土壤理化指标无显著变化。

此外,不同生育期对土壤 DOC、 NH_4^+ 、 NO_3^- 含量的影响达到了极显著水平 ($P < 0.001$)。其中,分蘖期的 DOC 含量显著高于孕穗期和成熟期;成熟期的 NH_4^+ 含量显著低于分蘖期和孕穗期,但 NO_3^- 含量显著高于分蘖期和孕穗期。不同处理间 SOC、TN、 NO_3^- 、AP 含量的差异达到了极显著水平 ($P < 0.001$),而不同处理间 pH、 NH_4^+ 含量也有显著差异。同时,不同生育期和处理交互作用显著影响土壤 TN、DOC、 NH_4^+ 、 NO_3^- 含量。

表 2 水稻不同生育期土壤基础理化性质

Table 2 Soil physiochemical properties at different rice growth stages

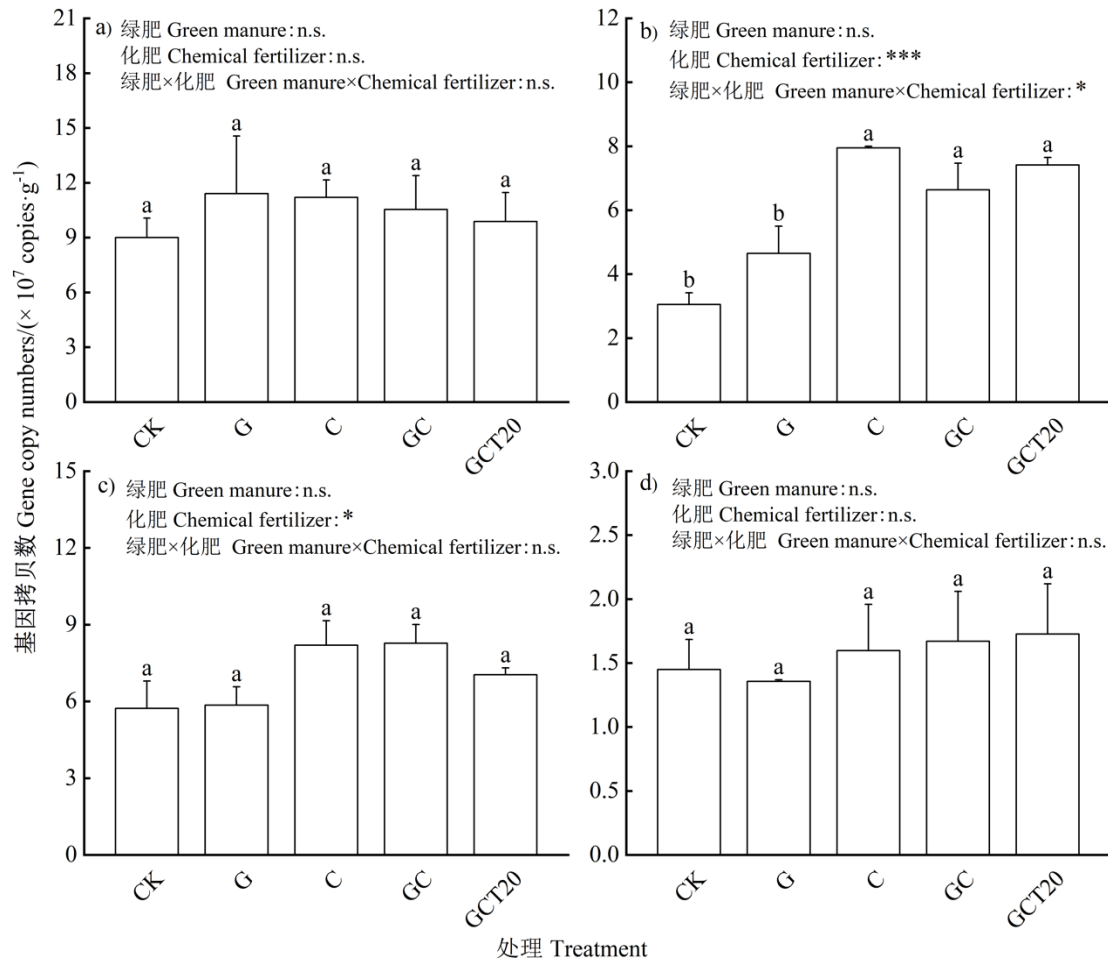
生育期 Growth stage	处理 Treatment	pH	SOC/($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	TN/($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	DOC/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	NH_4^+ /($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	NO_3^- /($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	AP/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
分蘖期	CK	$6.02 \pm 0.14\text{Ab}$	$11.34 \pm 0.31\text{Ab}$	$1.05 \pm 0.08\text{Ab}$	$12.94 \pm 1.43\text{Ab}$	$6.45 \pm 0.90\text{Ac}$	$0.54 \pm 0.19\text{Ba}$	$5.65 \pm 0.74\text{Ab}$
Tillering	G	$6.38 \pm 0.05\text{Aa}$	$13.39 \pm 0.31\text{Aab}$	$1.50 \pm 0.12\text{Aa}$	$17.02 \pm 2.03\text{Aab}$	$15.82 \pm 1.66\text{Abc}$	$0.10 \pm 0.03\text{Bb}$	$8.88 \pm 1.38\text{Ab}$
	C	$6.39 \pm 0.06\text{Aa}$	$12.40 \pm 0.63\text{Aab}$	$1.34 \pm 0.08\text{Aab}$	$16.86 \pm 3.39\text{Aab}$	$25.37 \pm 7.23\text{Aab}$	$0.35 \pm 0.11\text{Bab}$	$18.03 \pm 2.17\text{Aa}$
	GC	$6.57 \pm 0.03\text{Aa}$	$13.05 \pm 0.61\text{Aab}$	$1.32 \pm 0.05\text{Aab}$	$26.48 \pm 4.49\text{Aa}$	$31.77 \pm 3.20\text{Aa}$	$0.37 \pm 0.15\text{Bab}$	$20.60 \pm 1.59\text{Aa}$
	GCT20	$6.54 \pm 0.04\text{Aa}$	$13.88 \pm 0.99\text{Aa}$	$1.30 \pm 0.11\text{Aab}$	$19.16 \pm 2.24\text{Aab}$	$29.39 \pm 5.67\text{Aab}$	$0.55 \pm 0.03\text{Ba}$	$16.91 \pm 1.63\text{Aa}$
孕穗期	CK	$6.38 \pm 0.11\text{Aab}$	$10.70 \pm 0.31\text{Ac}$	$0.77 \pm 0.08\text{Ac}$	$13.51 \pm 3.22\text{Ba}$	$8.49 \pm 1.72\text{Bb}$	$0.20 \pm 0.06\text{Bc}$	$5.68 \pm 0.91\text{Ac}$
Booting	G	$6.24 \pm 0.03\text{Ab}$	$14.76 \pm 0.35\text{Aa}$	$1.62 \pm 0.08\text{Aa}$	$11.82 \pm 0.33\text{Ba}$	$13.68 \pm 1.64\text{Ba}$	$0.21 \pm 0.01\text{Bc}$	$9.72 \pm 1.26\text{Abc}$
	C	$6.55 \pm 0.03\text{Aa}$	$11.30 \pm 0.51\text{Abc}$	$1.11 \pm 0.07\text{Ab}$	$11.99 \pm 1.16\text{Ba}$	$3.36 \pm 0.39\text{Bc}$	$0.52 \pm 0.14\text{Bab}$	$14.24 \pm 3.55\text{Aab}$
	GC	$6.47 \pm 0.10\text{Aab}$	$13.03 \pm 0.86\text{Aab}$	$1.40 \pm 0.11\text{Aa}$	$10.31 \pm 1.13\text{Ba}$	$3.75 \pm 0.32\text{Bc}$	$0.30 \pm 0.09\text{Bbc}$	$16.54 \pm 3.57\text{Aab}$
	GCT20	$6.37 \pm 0.11\text{Aab}$	$13.27 \pm 0.68\text{Aa}$	$1.43 \pm 0.06\text{Aa}$	$12.28 \pm 0.63\text{Ba}$	$3.27 \pm 1.45\text{Bc}$	$0.61 \pm 0.02\text{Ba}$	$18.10 \pm 1.23\text{Aa}$
成熟期	CK	$6.32 \pm 0.22\text{Aa}$	$10.94 \pm 0.67\text{Ac}$	$1.21 \pm 0.10\text{Aa}$	$6.50 \pm 0.49\text{Ba}$	$1.50 \pm 0.45\text{Ca}$	$3.74 \pm 0.24\text{Ac}$	$4.16 \pm 0.28\text{Ac}$
Mature	G	$6.21 \pm 0.06\text{Aa}$	$13.05 \pm 0.16\text{Aab}$	$1.42 \pm 0.09\text{Aa}$	$9.24 \pm 1.69\text{Ba}$	$1.23 \pm 0.03\text{Ca}$	$5.44 \pm 0.37\text{Ab}$	$7.96 \pm 1.45\text{Ab}$
	C	$6.35 \pm 0.12\text{Aa}$	$12.23 \pm 0.25\text{Abc}$	$1.37 \pm 0.07\text{Aa}$	$10.30 \pm 2.87\text{Ba}$	$1.50 \pm 0.18\text{Ca}$	$6.64 \pm 0.53\text{Aa}$	$14.87 \pm 1.24\text{Aa}$
	GC	$6.38 \pm 0.04\text{Aa}$	$13.79 \pm 0.35\text{Aa}$	$1.45 \pm 0.06\text{Aa}$	$7.64 \pm 0.25\text{Ba}$	$1.39 \pm 0.17\text{Ca}$	$7.19 \pm 0.25\text{Aa}$	$17.33 \pm 1.22\text{Aa}$
	GCT20	$6.29 \pm 0.03\text{Aa}$	$13.55 \pm 0.56\text{Aab}$	$1.45 \pm 0.11\text{Aa}$	$14.83 \pm 4.41\text{Ba}$	$1.63 \pm 0.19\text{Ca}$	$6.27 \pm 0.17\text{Aab}$	$13.71 \pm 1.11\text{Aa}$
生育期 ^①		n.s.	n.s.	n.s.	***	***	***	n.s.
处理 ^②		*	***	***	n.s.	*	***	***
生育期×处理 ^③		n.s.	n.s.	*	*	***	***	n.s.

注: CK: 不施肥; G: 紫云英还田; C: 施用 100%化肥; GC: 紫云英还田+100%化肥; GCT20: 紫云英还田+化肥减量 20%。SOC: 土壤有机碳; TN: 全氮; DOC: 可溶性有机碳; NH_4^+ : 铵态氮; NO_3^- : 硝态氮; AP: 有效磷。表中数据为平均值±标准误 ($n = 3$)。同列不同大写字母表示相同处理不同生育期间差异显著 ($P < 0.05$), 同列不同小写字母表示相同生育期各处理间差异显著 ($P < 0.05$)。n.s.: 无显著差异, 下同。Note :CK: no fertilizer; G: Chinese milk vetch incorporation; C: 100% chemical fertilizer; GC: Chinese milk vetch incorporation + 100% chemical fertilizer; GCT20: Chinese milk vetch incorporation + 20% chemical fertilizer reduction. SOC: soil organic carbon; TN: total nitrogen; DOC: dissolved organic carbon; NH_4^+ : ammonium nitrogen; NO_3^- : nitrate nitrogen; AP: available phosphorus. Mean ± standard error ($n=3$). Different capital letters in the same column represent significant differences between the same treatments in the different growth stages at 0.05 level. Different lowercase letters in the same column represent significant differences between different treatments in the same

growth stages at 0.05 level. n.s.: no significance. The same as below. ①Growth stage; ②Treatment; ③Growth stage × Treatment.

2.2 紫云英还田对不同生育期土壤氨氧化微生物功能基因丰度的影响

由图 1 可以看出, 水稻分蘖期各处理间土壤 AOA、完全氨氧化菌 Clade A 和 Clade B 丰度无显著差异。与 CK 处理相比, G 处理中 AOB 丰度无显著变化, 而 C 和 GC 处理中 AOB 丰度分别显著增加了 160.26%和 117.25%。与 C 处理相比, GC 和 GCT20 处理中 AOB 丰度无显著变化 (图 1b)。双因素方差分析表明, 化肥显著影响 AOB 和 Clade A 丰度, 而紫云英还田对其无显著影响, 化肥和紫云英的交互作用显著影响 AOB 丰度, 但对 Clade A 丰度无显著影响 (图 1b, 图 1c)。



注: AOA: 氨氧化古菌; AOB: 氨氧化细菌; Clade A: 完全氨氧化古菌分支 A; Clade B: 完全氨氧化古菌分支 B。图表左上角为双因素方差分析结果。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。Note: AOA: ammonia-oxidizing archaea; AOB: ammonia-oxidizing bacteria; Clade A: Comammox *Nitrospira* Clade A; Clade B: Comammox *Nitrospira* Clade B. The top left of the figures are two-way ANOVA results. Different lowercase letters represent significant differences at 0.05 level. The same as below.

图 1 水稻分蘖期不同处理土壤氨氧化微生物功能基因丰度 (a. AOA; b. AOB; c. Clade A; d. Clade B)
Fig.1 Soil *amoA* gene abundance of ammonia-oxidizers under different treatments during the rice tillering stage (a. AOA; b. AOB; c. Clade A; d. Clade B)

水稻孕穗期各处理的氨氧化微生物功能基因丰度如图 2 所示。各处理间土壤 AOA 和完全氨氧化菌 Clade B 丰度均无显著差异 (图 2a, 图 2d)。CK 处理中 AOB 丰度为 0.43×10^8 copies g^{-1} ,

与 CK 相比, G 处理中 AOB 丰度无显著变化, 而 C 和 GC 处理则显著增加, 增幅分别为 133.6% 和 141.52%。与 C 处理相比, GC 处理中 AOB 丰度无明显变化, 而 GCT20 中 AOB 丰度显著下降了 46.88% (图 2b)。与 CK 处理相比, G 处理中完全氨氧化菌 Clade A 丰度无明显变化, 但 C 和 GC 处理中分别增加了 66.57% 和 36.59%。与 C 处理相比, GC 处理完全氨氧化菌 Clade A 丰度无明显变化, 但 GCT20 处理显著下降 37.49% (图 2c)。双因素方差分析表明, 化肥显著影响 AOB 和 Clade A 丰度, 而紫云英还田及其与化肥的交互作用对其无显著影响 (图 2b, 图 2c)。

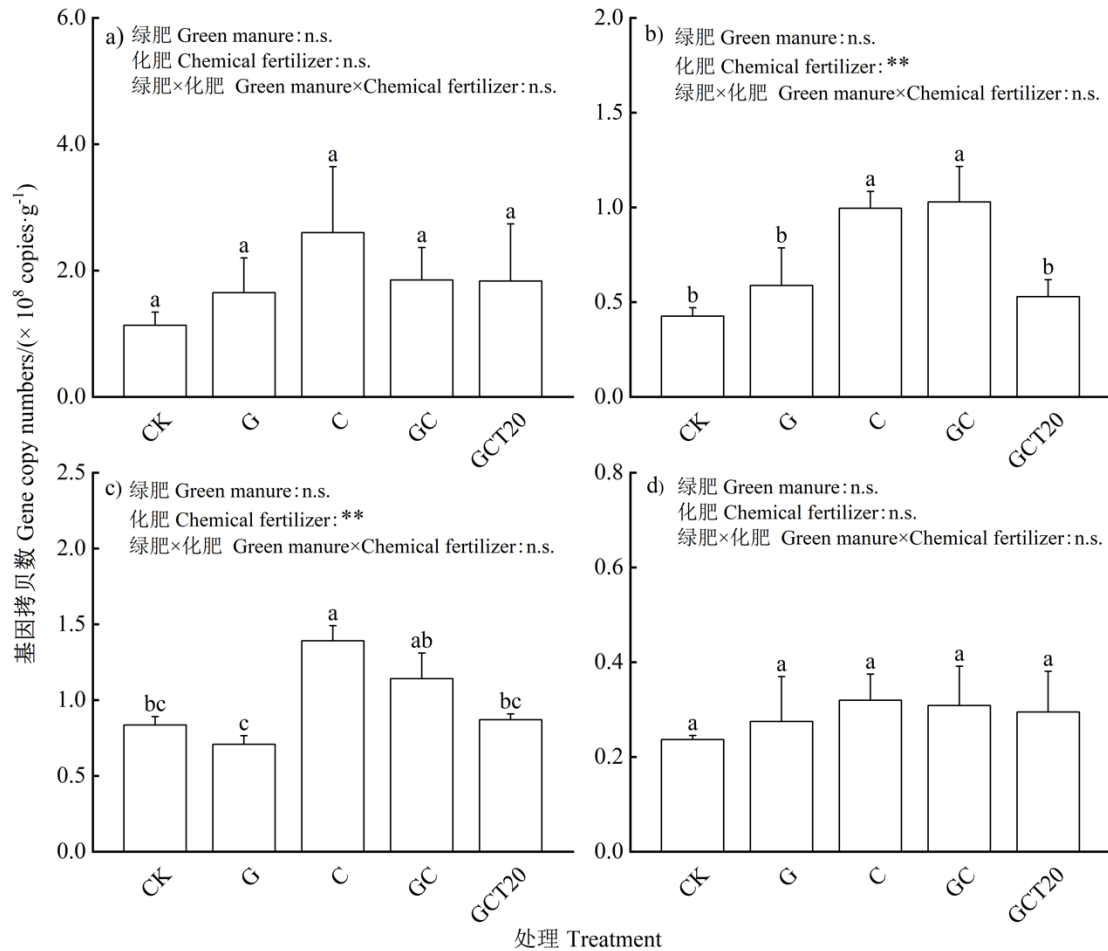


图 2 水稻孕穗期不同处理土壤氨氧化微生物功能基因丰度 (a. AOA; b. AOB; c. Clade A; d. Clade B)
Fig.2 Soil *amoA* gene abundance of ammonia-oxidizers under different treatments during the rice booting stage (a. AOA; b. AOB; c. Clade A; d. Clade B)

如图 3 所示, 水稻成熟期不同处理间土壤 AOA 和完全氨氧化菌 Clade B 丰度无显著差异。与 CK 处理相比, G 处理中 AOB 丰度无显著变化, 而 C、GC 和 GCT20 处理中 AOB 丰度分别显著增加了 138.7%、164.7%和 49.78%。与 C 处理相比, GC 处理中 AOB 丰度无明显变化, 但 GCT20 中 AOB 丰度显著下降了 37.26% (图 3b)。CK 处理中完全氨氧化菌 Clade A 丰度为 0.87×10^8 copies $\cdot g^{-1}$, 与 CK 相比, G 处理中 Clade A 丰度无显著变化, 而 C 和 GC 处理则显著增加, 增幅分别为 110.6%和 105.8%。与 C 处理相比, GC 处理中 Clade A 丰度无明显变化, 但 GCT20 中 Clade A 丰度显著下降了 45.84% (图 3c)。双因素方差分析表明, 化肥显著影响 AOB 和 Clade A 丰度, 而紫云英还田及其与化肥的交互作用对其无显著影响 (图 3b, 图 3c)。

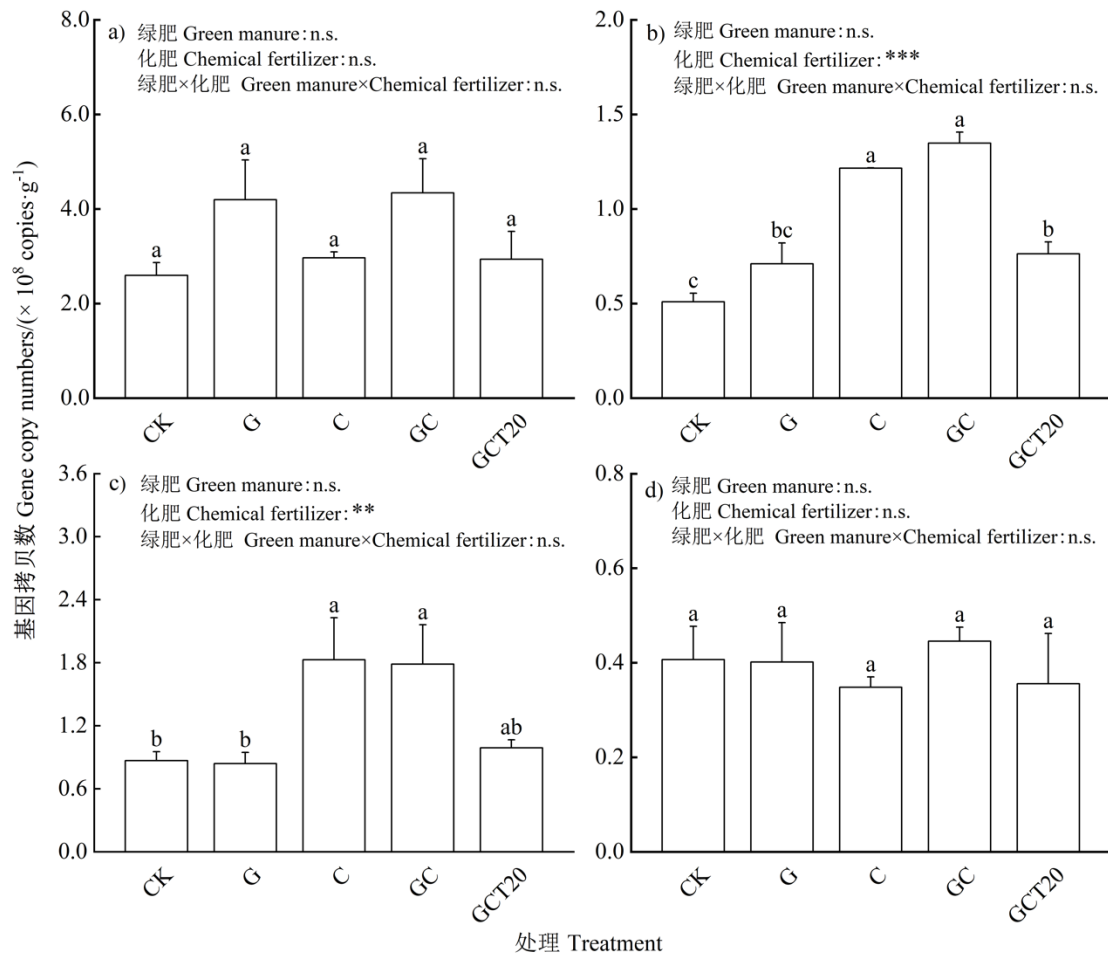
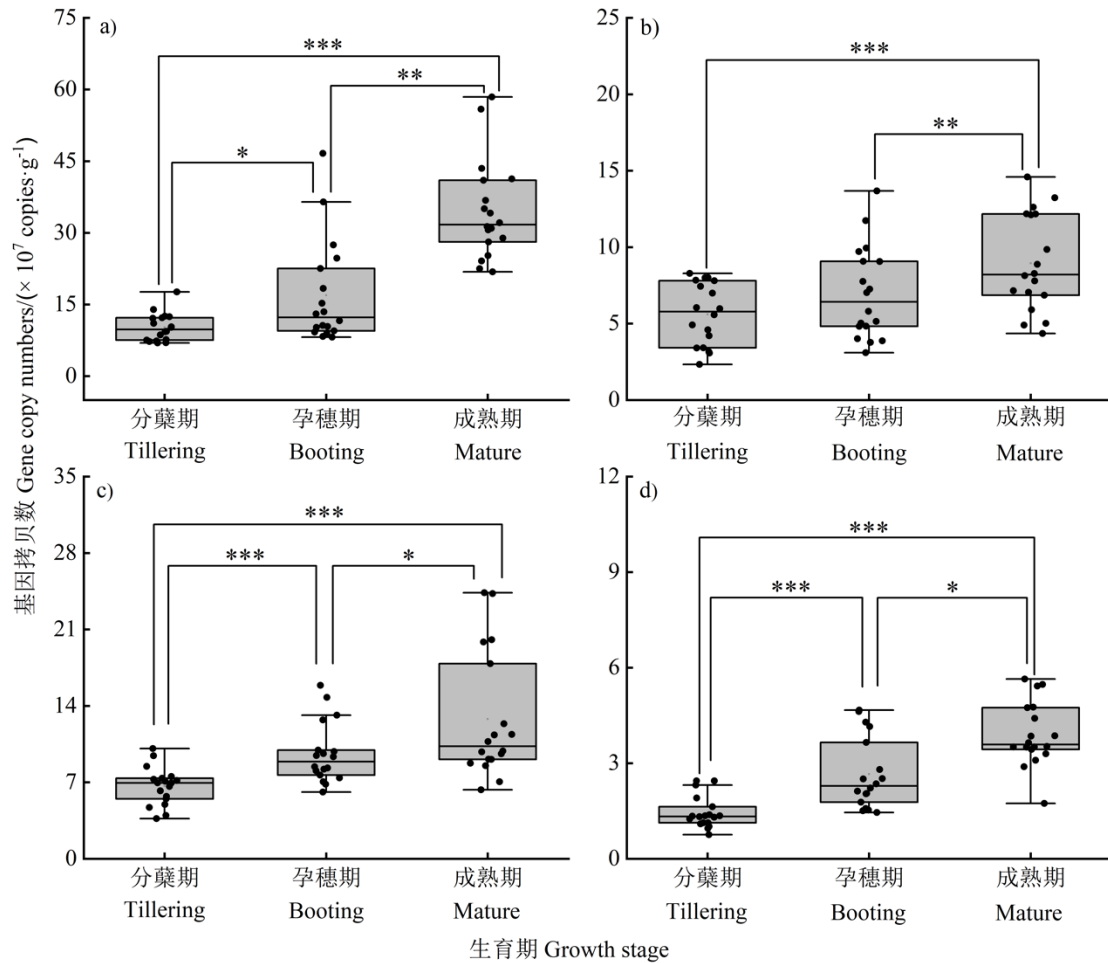


图3 水稻成熟期不同处理土壤氨氧化微生物功能基因丰度 (a. AOA; b. AOB; c. Clade A; d. Clade B)
Fig.3 Soil *amoA* gene abundance of ammonia-oxidizers under different treatments during the rice mature stage (a. AOA; b. AOB; c. Clade A; d. Clade B)

所有氨氧化微生物功能基因丰度在水稻不同生育期两两之间的差异基本均达到了显著水平 (图4)。所有氨氧化微生物功能基因丰度均表现为成熟期、孕穗期、分蘖期依次下降的趋势。



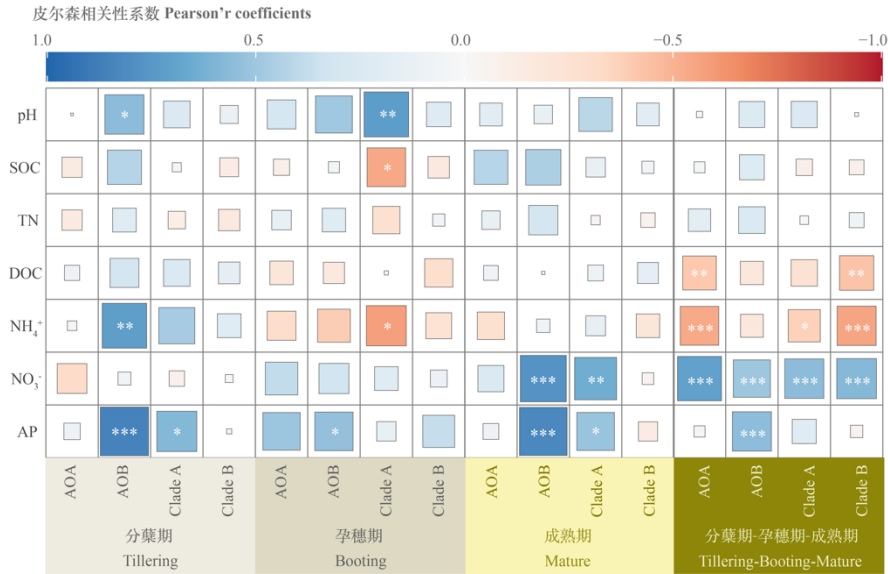
注 Note: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

图4 水稻不同生育期土壤氨氧化微生物功能基因丰度 (a. AOA; b. AOB; c. Clade A; d. Clade B)

Fig.4 Soil *amoA* gene abundance of ammonia-oxidizers under different rice growth stages (a. AOA; b. AOB; c. Clade A; d. Clade B)

2.3 土壤氨氧化微生物功能基因丰度与基础理化性质的关系

相关性分析 (图 5) 表明, 水稻分蘖期、孕穗期和成熟期, 土壤 AOA、Clade B 丰度与土壤基础理化性质均无显著相关。分蘖期, AOB 丰度与 pH、 NH_4^+ 、AP 含量显著正相关; Clade A 丰度与 AP 含量显著正相关。孕穗期, AOB 丰度与 AP 含量显著正相关; 而 Clade A 丰度与 pH 显著正相关, 与 SOC 和 NH_4^+ 含量显著负相关。成熟期, AOB 和 Clade A 丰度与 NO_3^- 、AP 含量均呈显著正相关。水稻三个生育期中, AOA 和 Clade B 丰度与 NO_3^- 含量显著正相关, 与 DOC 和 NH_4^+ 含量显著负相关。AOB 丰度与 NO_3^- 和 AP 显著正相关; 而 Clade A 丰度与 NO_3^- 含量显著正相关, 与 NH_4^+ 含量显著负相关。此外, 随机森林分析表明, NO_3^- 是预测 AOA 和 Clade B 丰度最关键的环境因子 (图 6a, 图 6d)。AP 和 NH_4^+ 分别是预测 AOB 和 Clade A 丰度最关键的环境因子 (图 6b, 图 6c)。

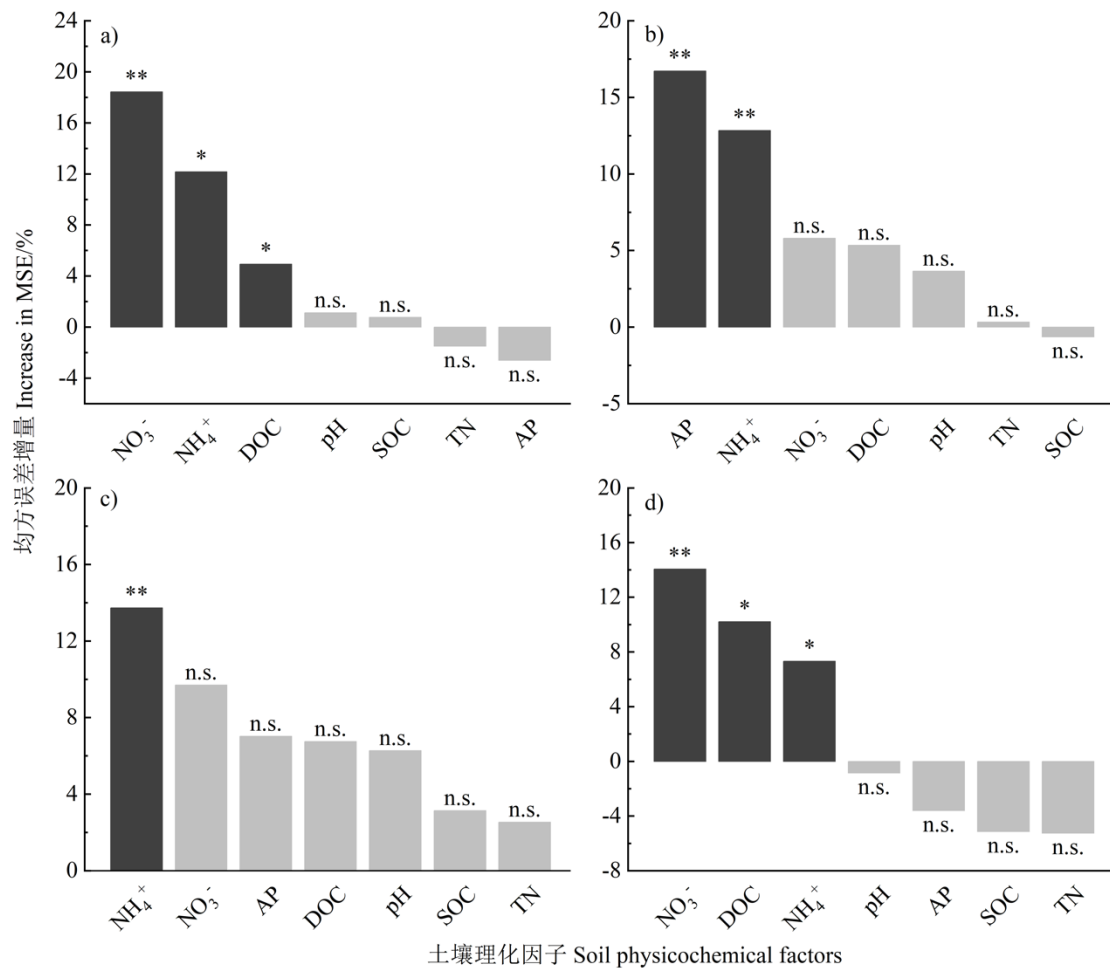


注：皮尔森相关性系数用不同颜色表示，红色代表负相关，蓝色代表正相关 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)。Note:

Pearson's coefficients are shown in different colors, red denotes negative correlation and blue denotes positive correlation (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

图5 水稻不同生育期土壤氨氧化微生物功能基因丰度与土壤理化性质间的相关性

Fig.5 Correlation analysis between soil *amoA* gene abundance of ammonia-oxidizers and soil physiochemical properties at different rice growth stages



注: MSE 代表均方差, 黑色图柱代表有显著性, 灰色图柱代表无显著性。Note: MSE represents mean square error. The black column represents a significant correlation, and the grey column represents no significant correlation.

图 6 氨氧化微生物功能基因丰度与土壤理化性质的随机森林分析 (a. AOA; b. AOB; c. Clade A; d. Clade B)

Fig.6 Random forest analysis between soil *amoA* gene abundance of ammonia-oxidizers and soil physiochemical properties (a. AOA; b. AOB; c. Clade A; d. Clade B)

3 讨论

3.1 紫云英还田后土壤基础理化性质的变化

紫云英作为豆科绿肥, 能够改善土壤酸碱性, 增加土壤肥力和养分供应, 为水稻生长提供良好的土壤环境^[8,22-23]。本研究发现, 水稻分蘖期紫云英还田后红壤水稻土的 pH 和 TN 含量显著提升; 孕穗期与成熟期紫云英还田处理的 SOC 含量较 CK 也显著提高, 增幅分别为 37.92% 和 19.21% (表 2)。这可能是因为紫云英残体分解释放的盐基离子一定程度上缓解了土壤酸化, 同时紫云英腐解及其根系的固氮作用为土壤提供外源碳氮供给, 从而提升了土壤碳氮养分含量^[24-25]。先前研究表明, 紫云英还田可减施化肥 20%~40%, 紫云英与化肥配施可减少养分流失, 其中化肥快速释放养分供水稻前期生长, 而紫云英腐解相对较慢, 可持续释放养分, 两者配施可进一步提高养分利用率^[12,22,26]。此外, 与水稻分蘖期和孕穗期相比, 水稻成熟期的土壤 NH_4^+ 含量显著下降, 而 NO_3^- 含量显著增加 (表 2)。一方面, 稻田土壤铵态氮主要来源于有机肥分解和化肥施用, 本试验水稻生长前期 40% 的化肥作为分蘖肥使用, 化肥氮易快速水解为 NH_4^+ , 同时紫云英还田腐解也会释放 NH_4^+ , 但随着水稻生长, NH_4^+ 淋溶损失、挥发、被植物吸收利用而显著下降, 因而水稻分蘖期和孕穗期土壤 NH_4^+ 含量显著高于成熟期^[27-28]。另一方面, 水稻分蘖期和孕穗期土壤处于淹水低氧条件, 微生物将 NO_3^- 异化还原为 NH_4^+ , 硝化作用则受到抑制; 而水稻成熟期土壤透气性较好, NH_4^+ 易被微生物氧化为 NO_3^- , 稻田土壤 NO_3^- 含量得以提升^[29-30]。

3.2 紫云英还田对土壤氨氧化微生物功能基因丰度的影响

紫云英还田为土壤带来大量外源碳氮养分, 可在一定程度上为氨氧化微生物的生长繁殖提供底物和能量。然而, 目前有关紫云英还田后对氨氧化微生物功能基因丰度的影响研究仍较少。由于氨氧化微生物生态位偏好的差异, 其基因丰度在不同土壤环境中存在明显的差异, 从而对紫云英还田的响应也不同^[11,14]。本研究发现, 各处理中 AOA 和 Clade B 丰度均无显著变化 (图 1, 图 2, 图 3), 这可能是因为它们更喜欢底物浓度相对较低的贫瘠土壤环境, 且具有较宽的生态位, 紫云英还田或化肥施用对其影响较小^[31-33]。值得注意的是, AOA 和 Clade B 对于氨的亲合力并非保持不变, 可能根据土壤环境中铵态氮含量进行适应性调节^[34]。Gao 等^[35]研究发现, 紫云英处理对 AOB 丰度无显著影响, 但 AOB 丰度随化学氮肥施用量的增加而增加。Zhang 等^[15]研究发现化学氮肥显著增加了水稻土 AOB 和 Clade A 丰度, 但对 AOA 和 Clade B 的影响较小。氨氧化微生物对各种形态氮源的适应能力和利用效率不同, 一些微生物可能偏好于某种形态的氮源, 对其他氮源则表现出较低的利用能力。本研究发现, 化肥氮处理显著提高了稻田土壤 AOB 和 Clade A 丰度, 而绿肥氮对其无显著影响 (图 1, 图 2, 图 3)。可能的原因是: 1) 化肥可快速释放养分直接供氨氧化微生物利用, AOB 和 Clade A 能够利用氨进行氨氧化反应, 因而施用化肥氮可促进它们的生长和繁殖, 进而增加其基因丰度^[32]。2) 绿肥氮源主要来自于植物残留物、根系分泌物及根瘤菌共生固氮, 养分释放速率较慢^[6]; 同时, 紫云英腐解过程中, 可能会释放硫化氢、氰化物、酚类化合物等有毒物质, 这些物质会影响土壤微生物的结构和功能, 抑制 AOB 和 Clade A 基因丰度, 从而抵消其腐解过程中释放的铵态氮对 AOB 和 Clade A 的促进作用^[15,35]。此外, 虽然绿肥腐解释放铵态氮, 但当尿素与铵态氮共存时, AOB 和 Clade A 可能会优先利用尿素, 对铵态氮的利用则一定程度上受到抑制^[34]。

除水稻分蘖期外, 化肥减量 20% (GCT20) 处理中 AOB 和 Clade A 基因丰度较单施化肥处理 (C) 均显著下降, 降幅为 37.26%~46.88% (图 2, 图 3))。原因可能是水稻分蘖期补施化肥, 土壤养分充足, 减施 20% 的化肥并不会影响 AOB 和 Clade A 基因丰度; 而孕穗期和成熟期, 水稻生长消耗大量养分, 此时减少化肥输入量, 土壤养分不足以供给 AOB 和 Clade A 生长繁殖。因此, AOB 和 Clade A 对化肥氮的投入更加敏感, 绿肥氮对其影响相对微弱。水稻不同生育期, 所有氨氧化微生物功能基因丰度均表现为成熟期、孕穗期、分蘖期依次降低的趋势 (图 4)。这可能是由于氨氧化微生物是好氧微生物, 随着水稻的生长, 其根系泌氧能力逐渐增强, 氧化还原电位随之增高, 有利于氨氧化微生物生长^[30,36]。在成熟期, 由于稻田排水, 氧气供应能力最好, 氨氧化微生物的丰度最高, 即便是对底物浓度更敏感的 AOB 和 Clade A 也呈现一致的规律, 尽管成熟期 NH_4^+ 浓度较分蘖期和孕穗期减少, 高强度的氧气供应也能显著提高其丰度。因此, 氧气供应能力是稻田土壤氨氧化微生物丰度变化的重要调控因子 (表 2, 图 4), 但在同一氧气供应水平, 底物浓度也会显著影响 AOB 和 Clade A 丰度。值得注意的是, 由于不同氨氧化微生物 qPCR 所选引物不同, 对 AOA、AOB、Clade A 和 Clade B 丰度之间进行比较仍存在一定局限性, 未来可通过宏基因组测序等方法获得更精确的数据, 进一步明确氨氧化微生物丰度之间的差异。

4 结 论

紫云英还田可显著提高红壤性水稻土有机碳和全氮含量, 对土壤分蘖期 pH 也有一定程度提升。所有氨氧化微生物功能基因丰度均在成熟期最高, 孕穗期次之, 分蘖期最低。紫云英还田和化肥施用对土壤 AOA 和 Clade B 丰度均无显著影响。化肥施用显著提高稻田土壤 AOB 和 Clade A 丰度, 而紫云英还田对 AOB 和 Clade A 丰度的影响较小。因此, 与化肥氮相比, 紫云英还田不会迅速提高氨氧化微生物丰度, 可能更有利于土壤氮素的保留。

参考文献 (References)

- [1] He Z Y, Sun A Q, Jiao X Y, et al. Fertilization has a greater effect than rhizosphere on community structures of comammox *Nitrospira* in an alkaline agricultural soil[J]. *Applied Soil Ecology*, 2022, 175: 104456.
- [2] Daims H, Lebedeva E V, Pjevac P, et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria[J]. *Nature*, 2015, 528(7583): 504-509.
- [3] van Kessel M A H J, Speth D R, Albertsen M, et al. Complete nitrification by a single microorganism[J]. *Nature*, 2015, 528(7583): 555-559.
- [4] Lin Y X, Ye G P, Ding W X, et al. Niche differentiation of comammox *Nitrospira* and canonical ammonia oxidizers in soil aggregate fractions following 27-year fertilizations[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2020, 304: 107147.
- [5] Lin Y X, Fan J B, Hu H W, et al. Differentiation of individual clusters of comammox *Nitrospira* in an acidic Ultisol following long-term fertilization[J]. *Applied Soil Ecology*, 2022, 170: 104267.
- [6] Li C Y, He Z Y, Hu H W, et al. Niche specialization of comammox *Nitrospira* in terrestrial ecosystems: Oligotrophic or copiotrophic?[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2023, 53(2): 161-176.
- [7] He C M, Wang F, Huang Y B, et al. Effects of chemical fertilizer reduction on rice yield and soil fertility in yellow-mud paddy field under the continuous return of milk vetch[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2023, 29(6): 1070-1081. [何春梅, 王飞, 黄毅斌, 等. 紫云英翻压条件下化肥减施对黄泥田水稻产量与土壤肥力的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2023, 29(6): 1070-1081.]
- [8] Xie X, Lu Y H, Liao Y L, et al. Effects of returning Chinese milk vetch and rice straw to replace partial fertilizers on double season rice yield and soil labile organic carbon[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2023, 56(18): 3585-3598. [谢雪, 鲁艳红, 廖育林, 等. 紫云英与稻草还田替代部分化肥对双季稻产量和土壤活性有机碳的影响[J]. *中国农业科学*, 2023, 56(18): 3585-3598.]
- [9] Wang H, Tang S, Han S, et al. Effects of long-term substitution of chemical fertilizer with Chinese milk vetch on soil phosphorus availability and leaching risk in the double rice systems of eastern China[J]. *Field Crops Research*, 2023, 302: 109047.
- [10] Zhang Z H, Wang Y, Gao S J, et al. Effects of returning Chinese milk vetch and rice straw to the field on the nitrification potential of paddy soil[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2021, 27(11): 1938-1948. [章子含, 王赞, 高嵩涓, 等. 紫云英与稻秸还田对稻田土壤硝化潜势的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2021, 27(11): 1938-1948.]
- [11] Gao S J, Cao W D, Zou C Q, et al. Ammonia-oxidizing archaea are more sensitive than ammonia-oxidizing bacteria to long-term application of green manure in red paddy soil[J]. *Applied Soil Ecology*, 2018, 124: 185-193.
- [12] Liu C Z, Chang D N, Li B Y, et al. Effects of planting and incorporation of Chinese milk vetch coupled with application of chemical fertilizer on active organic carbon and nitrogen in paddy soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2017, 54(3): 657-669. [刘春增, 常单娜, 李本银, 等. 种植翻压紫云英配施化肥对稻田土壤活性有机碳氮的影响[J]. *土壤学报*, 2017, 54(3): 657-669.]
- [13] Deng H Y, Liu Z K, Ma X Z, et al. Effect of long-term fertilization on black soil fungal community diversity and structure

- in Northeast China[J]. Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition), 2024, 40(1): 69-75. [邓慧玉, 刘子恺, 马星竹, 等. 长期施肥处理对东北黑土真菌多样性和群落结构的影响[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2024, 40(1): 69-75.]
- [14] Xiang X J, He D, He J S, et al. Ammonia-oxidizing bacteria rather than archaea respond to short-term urea amendment in an alpine grassland[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2017, 107: 218-225.
- [15] Zhang K, Sun H F, Kang Y C, et al. Comammox plays a functionally important role in the nitrification of rice paddy soil with different nitrogen fertilization levels[J]. Applied Soil Ecology, 2024, 193: 105120.
- [16] Chang D N, Wang H, Zhou G P, et al. Yield and nitrogen uptake of rice and soil nitrogen supply capacity under fertilizer reduction in a rice-rice-Chinese milk vetch rotation system, northern Jiangxi Province, China[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2023, 29(8): 1449-1460. [常单娜, 王慧, 周国朋, 等. 赣北地区稻-稻-紫云英轮作体系减施化肥对水稻产量、氮素吸收及土壤供氮能力的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2023, 29(8): 1449-1460.]
- [17] Gao S J, Cao W D, Zhou G P, et al. Bacterial communities in paddy soils changed by milk vetch as green manure: A study conducted across six provinces in South China[J]. Pedosphere, 2021, 31(4): 521-530.
- [18] Lu R K. Analytical methods for soil and agro-chemistry[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000. [鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.]
- [19] Duan C J, Wan S, Fan J B, et al. Effects of long-term pig manure applications on the abundance of comammox bacteria in an Ultisol[J]. Acta Ecologica Sinica, 2023, 43(2): 849-857. [段春健, 宛颂, 樊剑波, 等. 长期施用猪粪对红壤完全氨氧化菌基因丰度的影响[J]. 生态学报, 2023, 43(2): 849-857.]
- [20] Tang X F, Qin H, Kuang L, et al. Metagenomics based study on community characteristics of ammonia oxidizing microorganisms in acid forest soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2021, 58(5): 1311-1321. [唐修峰, 秦华, 匡璐, 等. 基于宏基因组学的酸性森林土壤氨氧化微生物群落特征研究[J]. 土壤学报, 2021, 58(5): 1311-1321.]
- [21] Jiang R, Wang J G, Zhu T, et al. Use of newly designed primers for quantification of complete ammonia-oxidizing (comammox) bacterial clades and strict nitrite oxidizers in the genus *Nitrospira*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(20): e01775-e01720.
- [22] Gao S J, Zhou G P, Cao W D. Effects of milk vetch (*Astragalus sinicus*) as winter green manure on rice yield and rate of fertilizer application in rice paddies in South China[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2020, 26(12): 2115-2126. [高嵩渭, 周国朋, 曹卫东. 南方稻田紫云英作冬绿肥的增产节肥效应与机制[J]. 植物营养与肥料学报, 2020, 26(12): 2115-2126.]
- [23] Wang H, Zhang L, Chang D N, et al. Nutrient absorption and transport characteristics of rice under different nitrogen reduction ratios in a Chinese milk vetch and rice rotation system in southern Henan Province, China[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2022, 28(7): 1194-1207. [王慧, 张琳, 常单娜, 等. 豫南紫云英水稻轮作区减施不同比例氮肥对水稻养分吸收和转运的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2022, 28(7): 1194-1207.]
- [24] Gao J S, Cao W D, Li D C, et al. Effects of long-term double-rice and green manure rotation on rice yield and soil organic matter in paddy field[J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(16): 4542-4548. [高菊生, 曹卫东, 李冬初, 等. 长期双季稻绿肥轮作对水稻产量及稻田土壤有机质的影响[J]. 生态学报, 2011, 31(16): 4542-4548.]
- [25] Xu J M, Tang C, Chen Z L. The role of plant residues in pH change of acid soils differing in initial pH[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(4): 709-719.
- [26] Wang F, Lin C, Lin X J, et al. Effects of continuous turnover of *Astragalus sinicus* on rice yield and N absorption, distribution and residue in single-cropping rice regions of Fujian Province[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2014, 20(4): 896-904. [王飞, 林诚, 林新坚, 等. 连续翻压紫云英对福建单季稻产量与化肥氮素吸收、分配及残留的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(4): 896-904.]
- [27] Zhang L, Huang J, Gao J S, et al. Effects of long-term green manure and reducing nitrogen applications on rice yield and soil nutrient content[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2020, 36(5): 106-112. [张璐, 黄晶, 高菊生, 等. 长期绿肥与氮肥减量配施对水稻产量和土壤养分含量的影响[J]. 农业工程学报, 2020, 36(5): 106-112.]
- [28] Gao J S, Xu M G, Dong C H, et al. Effects of long-term rice-rice-green manure cropping rotation on rice yield and soil fertility[J]. Acta Agronomica Sinica, 2013, 39(2): 343-349. [高菊生, 徐明岗, 董春华, 等. 长期稻-稻-绿肥轮作对水稻产量及土壤肥力的影响[J]. 作物学报, 2013, 39(2): 343-349.]
- [29] Vajrala N, Martens-Habben W, Sayavedra-Soto L A, et al. Hydroxylamine as an intermediate in ammonia oxidation by globally abundant marine archaea[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(3): 1006-1011.
- [30] Sun M, Nie S A, Long Z D, et al. Response of paddy soil anammox bacteria to rice straw returning and different tillage practices[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59(6): 1695-1703. [孙梅, 聂三安, 龙泽东, 等. 水稻土厌氧氨氧化对不同耕作方式与秸秆还田的响应[J]. 土壤学报, 2022, 59(6): 1695-1703.]
- [31] Wang Z H, Cao Y Q, Zhu-Barker X, et al. Comammox *Nitrospira* clade B contributes to nitrification in soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2019, 135: 392-395.
- [32] Ouyang Y, Evans S E, Friesen M L, et al. Effect of nitrogen fertilization on the abundance of nitrogen cycling genes in agricultural soils: A meta-analysis of field studies[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 127: 71-78.
- [33] Deng M L, Lin Y X, Ye G P, et al. Effects of forest types on the abundance of fungal denitrifiers in soil aggregates from a subtropical forest[J]. Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition), 2024, 40(1): 45-51, 68. [邓米林, 林永新, 叶桂萍, 等. 林分类型对亚热带森林土壤团聚体中真菌反硝化微生物丰度的影响[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2024, 40(1): 45-51, 68.]
- [34] Qin W, Wei S P, Zheng Y, et al. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea exhibit differential nitrogen source preferences[J]. Nature Microbiology, 2024, 9(2): 524-536.
- [35] Gao S J, Zhou G P, Liao Y L, et al. Contributions of ammonia-oxidising bacteria and archaea to nitrification under long-term application of green manure in alkaline paddy soil[J]. Geoderma, 2020, 374: 114419.
- [36] Han Y Y, Wu Y H, Li D, et al. Advancements in research on microbe-mediated greenhouse gas emissions at the rice paddy soil-water interface and agricultural mitigation strategies[J]. Research of Environmental Sciences, 2023, 36(12): 2369-2381. [韩燕云, 吴永红, 李丹, 等. 微生物介导的稻田水土界面温室气体排放及其农事减排措施研究进展[J]. 环境科学, 2023, 36(12): 2369-2381.]

(责任编辑: 陈荣府)