

DOI: 10.11766/trxb201909270130

牛小云, 孙晓梅, 陈东升, 张守攻. 不同发育阶段日本落叶松人工林枯落物层微生物群落特征[J]. 土壤学报, 2020, 57(6): 1471–1482.
NIU Xiaoyun, SUN Xiaomei, CHEN Dongsheng, ZHANG Shougong. Characteristics of Microbial Community in Litter Relative to Stand of *Larix kaempferi* Different in Development Stage[J]. Acta Pedologica Sinica, 2020, 57(6): 1471–1482.

不同发育阶段日本落叶松人工林枯落物层微生物群落特征*

牛小云^{1, 2}, 孙晓梅¹, 陈东升¹, 张守攻^{1†}

(1. 中国林业科学研究院林业研究所国家林业和草原局林木培育重点实验室, 北京 100091; 2. 河北农业大学园林与旅游学院, 河北保定 071000)

摘要: 为探寻日本落叶松人工林在中龄林或近熟林阶段地力衰退的机制, 以分子生物学实验手段与常规实验分析方法结合, 分别对不同发育阶段林分枯落物未分解层、半分解层以及全分解层微生物的数量、群落结构以及理化性质进行分析, 并采用冗余分析法探索枯落物层微生物群落结构与理化性质的相关性。结果表明: 枯落物储量及养分储量随林分发育呈倒“V”字型变化趋势, 在近熟林阶段最大, 微生物数量、均匀度指数在中龄林或近熟林最低。不同发育阶段林分优势细菌种类基本相同, 但相对含量不同; 优势真菌的种类明显不同, 尤其是在近熟林半分解层。中龄林与近熟林未、半分解层受环境因素影响较大, 主要受 pH、有效磷、碱解氮、速效钾、全钾、C/N 以及林下植被生物量影响。因此, 日本落叶松纯林在中龄林与近熟林阶段需强化植被管理, 适时开展修枝间伐等经营措施, 促进林下植被发育、改善枯落物性质, 加速养分循环, 缓解地力衰退。

关键词: 枯落物; 地力衰退; 理化性质; T-RFLP; 微生物

中图分类号: S714.3 **文献标志码:** A

Characteristics of Microbial Community in Litter Relative to Stand of *Larix kaempferi* Different in Development Stage

NIU Xiaoyun^{1, 2}, SUN Xiaomei¹, CHEN Dongsheng¹, ZHANG Shougong^{1†}

(1. Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of State Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. College of Landscape Architecture and Tourism, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 007100, China)

Abstract: 【Objective】 Japanese larch (*Larix kaempferi*) is an important fast-growing timber tree species in North China. To meet the growing demand of the country for timber, extensive areas of secondary forests have been converted into larch plantations since the 1950s. However, pure larch plantations have caused a lot of problems, including soil acidification and declining soil fertility, especially in stands of middle-aged or premature larch forests, which can be attributed to low decomposition rate of the litter and loss of balance between accumulation and mineralization of nutrients in the forest soil. Microbes are the major factors driving litter decomposition and nutrient mineralization, so this study was oriented to explore

* 国家自然科学基金重点项目(31430017) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.31430017)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: shougong.zhang@caf.ac.cn

作者简介: 牛小云(1985—), 女, 河北保定人, 博士, 讲师, 主要从事土壤微生物与土壤修复研究。E-mail: nxy850101@163.com

收稿日期: 2019-09-27; 收到修改稿日期: 2019-12-06; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2019-12-09

mechanism of soil fertility declining in middle-aged or premature larch stands from the angle of soil microbes. 【 Method 】 The techniques of real-time PCR (qPCR) and terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and the conventional experimental analysis methods were used to analyze quantity and community composition of the bacteria and fungi in and physico-chemical properties of un-decomposed litter, semi-decomposed litter layer and decomposed litter layer in the stands of young, middle-aged, premature and mature larch forests, separately. At the same time, redundancy analysis (RDA) was also performed to explore correlations between microbial community structure and physico-chemical properties in the litter layer. 【 Result 】 Results show that the reserves of litter and nutrients exhibited a trend varying with age of the stand age in the shape of an inverted “V”, and peaked in the pre-mature stand, while quantity and evenness index of the microbes were the lowest in the middle-age stand or pre-mature stand. The stands, regardless of development stage, had similar dominant groups of bacterial species, but varied in relative contents of the groups. However, they differed sharply in dominant fungal species, particularly in the semi-decomposed litter layer of the pre-mature stand. For example, Fungi T-RF 50, 277 and 276 were dominant species in the stands of young, middle-aged and mature larch forest, but not in the premature stand, while Fungi T-RF 201, 346, 349, 359 and 459 were only in the un-decomposed litter layer and semi-decomposed litter layer of the premature stand. The environmental factors affecting microbial community in litter of the young stand and mature stand were obviously different from those of the stands of middle-aged and premature larch forests. The microbial communities were mainly affected by pH, available phosphorus, available nitrogen, readily available potassium, total potassium, C/N ratio and vegetation biomass in the un-decomposed and semi-decomposed litter layers in the middle-aged and pre-mature stands, but by total nitrogen, total phosphorus and C/N ratio in the young and mature stands. The environmental factors also varied in impact on fungal and bacterial community structure diversity. 【 Conclusion 】 Changes in microbial community structure leads to slow decomposition of litter and decline of soil fertility in the stands of middle-aged and premature larch forest. Dominant microbial species, especially fungi, play an important role in litter decomposition. Understorey vegetation has an important effect on microbial composition and diversity, especially in the premature stand. Therefore, *Larix kaempferi* plantation should strengthen understorey vegetation management in middle-aged and pre-mature larch forests, like pruning, thinning and some other measures, that should be carried out timely to promote development of understorey vegetation, improve litter properties, expedite nutrient recycling and retard decline of soil fertility.

Key words: Litter; Soil fertility decline; Physico-chemical properties; T-RFLP; Microbes

落叶松是我国北方重要的速生用材林树种,大面积种植落叶松人工纯林存在潜在的地力衰退^[1-4],尤其是在中龄林与近熟林阶段^[1-5]。落叶松凋落物积累与分解的不平衡是导致地力衰退以及土壤酸化的主要原因^[1-3-4],落叶松人工林每年以凋落物形式归还的养分占其年吸收量的 61.4%,而从凋落物转移至土壤中的养分仅占养分归还量的 36.0%,占林地凋落物层元素积累量的 4.9%。微生物在枯落物分解过程中发挥着重要作用^[6],是土壤养分转化和循环的主要驱动力^[7-8],微生物对三江平原湿地枯落物分解的贡献量可高达 52%~78%^[9]。微生物的种类和数量影响枯落物的分解速率^[10-11],而枯落物的质量对微生物的生物量、多样性也有重要影响^[12-13],尤其是真菌群落^[12],这进一步影响了枯落物的分解速率。伴随日本落叶松林分发育以及抚育管理,林分郁闭度与林下植被发生变化^[5],这将如何影响枯落

物的质量以及微生物群落结构,此方面的相关研究还较少,阻碍了对日本落叶松在中龄林与近熟林阶段地力衰退机制的进一步探索。

本文以辽东山区日本落叶松人工林为研究对象,分析不同发育阶段林分未分解层、半分解层以及全分解层枯落物中微生物群落结构特征及其与枯落物理化性质的相互作用关系,揭示日本落叶松在中龄林或近熟林阶段地力衰退的微生物学作用机制,旨在为缓解日本落叶松地力衰退提出合理的经营措施。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究区位于辽宁省抚顺市大孤家林场(125°48'41"E, 52°45'21"N),该区属长白山系千山山

脉龙岗支脉北坡, 中温带季风气候, 年均气温 6 °C, 最低气温 -30 °C, 最高气温 34 °C, 全年无霜期 128 d, 年均降水量 650 mm。林地土壤为暗棕色森林土, 土层厚 50 cm, pH 6.2~6.8, 枯枝落叶层厚 3.5~6 cm, pH 4.8~5.6。

1.2 研究方法

2009 年在全面踏查此地区的落叶松人工林的基础上, 本着土壤类型、立地条件一致的原则, 在幼龄林林分(Y, 11 a)、中龄林林分(Z, 20 a)、近熟林林分(J, 34 a)与成熟林林分(C, 47 a)分别选择 9 个样地, 共计 36 个样地作为实验样地。36 个样地的林分初值密度均为 4 444 株·hm⁻², 后经抚育间伐管理。2013 年样地概况如表 1、表 2 所示。

1.3 样品采集与分析

于 2013 年 10 月在 4 个不同发育阶段林分内分别随机选择 3 个样地, 共计 12 块, 样地面积均为 0.08 hm²(28.3 m×28.3 m)。按梅花型取样方法选择 5 个样点, 每个样点设置 0.5 m×0.5 m 小样方, 分别

对样方内未分解层(W)、半分解层(B)和全分解层枯落物(Q)取样。取样分层标准^[14]: 未分解层位于枯落物的表层, 形成时间小于 1 年, 未分解、未压缩成块状; 半分解层已开始分解, 但叶片形状尚完整, 未压缩成块状; 全分解层叶片形状已不完整或已不能辨认, 通常压缩成块状, 紧挨表土层。每个小样方每层取 3 份样品, 分别用作含水量、pH、养分含量以及微生物群落结构测定。用于群落结构测定的样品用冰盒保存带回实验室, 置于 -80 °C 冰箱中待用。

样品采集后立即测定其鲜质量, 带回实验室 80 °C 烘干至恒重, 测定其干质量, 计算含水量及枯落物层贮量。2 g 风干材料在研钵中加入液氮研磨成粉末后加入到盛有 40 mL 超纯水三角瓶中, 震荡 30 min 再静置 30 min 后, 吸取上清液, 用电子 pH 计测定 pH。研磨后的枯落物, 过 10 目筛用于速效养分测定, 过 100 目筛用于全量养分测定。枯落物有机碳(LOC)采用硫酸消煮—重铬酸钾外加热法; 全

表 1 研究样地概况^①

Table 1 General situation of the sample sites for the research

林分 Stands	海拔 Elevation/m	坡度 Slope/°	密度 Density/ (trees·hm ⁻²)	胸径 Diameter/ cm	郁闭度 Canopy density	林下植被 生物量 ^② / (t·hm ⁻²)	林下植 被盖度 ^③	主要林下植被 Understorey vegetation under the stands
Y	353~421	8~15	1 638~2 225	8.8±0.45	0.6	3.14	0.8	白屈菜 ^④ 、蝙蝠葛 ^⑤ 、平榛 ^⑥
Z	313~346	2~5	1 263~1 625	13.23±0.3	0.8	3.22	0.6	白屈菜 ^④
J	436~469	8	838~1 012	19.2±0.26	0.9	2.56	0.4	白屈菜 ^④ 、莎草 ^⑦
C	252~277	8	425~625	24±1.4	0.5	5.96	0.9	白屈菜 ^② 、平榛 ^⑥ 、莎草 ^⑦ 、绣线菊 ^⑧

Y: 幼龄林 Young stand; Z: 中龄林 Middle-age stand; J: 近熟林 Pre-mature stand; C: 成熟林 Mature-stand. 下同 The same below.
①此表部分数据引自文献[5] Some data in this table is quoted from the reference[5]. ②Understorey vegetation biomass. ③Understorey vegetation coverage. ④*Chelidonium majus*. ⑤*Menispermum dauricum*. ⑥*Corylus heterophyll*. ⑦*Cyperus rotundus*. ⑧*Spiraea salicifolia*.

表 2 不同发育阶段日本落叶松林分表层土壤化学性质

Table 2 Chemical properties of topsoil relative to stand different development stage in the *Larix kaempferi* plantation

林分 Stands	pH	有机碳 SOC/ (g·kg ⁻¹)	全氮 Total N/(g·kg ⁻¹)	全磷 Total P/(g·kg ⁻¹)	全钾 Total K/(g·kg ⁻¹)	碱解氮 Alkalytic N/(mg·kg ⁻¹)	有效磷 Available P/(mg·kg ⁻¹)	速效钾 Readily available K/(g·kg ⁻¹)
Y	5.31	27.07	4.35	0.72	13.74	178.8	57.12	0.41
Z	5.25	16.49	3.26	0.55	11.94	103.1	47.9	0.23
J	5.07	22.29	3.48	0.6	12.3	152.1	31.45	0.25
C	5.16	29.67	4.16	0.65	15.27	181.7	23.62	0.35

氮(TN)采用硫酸消煮—凯氏定氮;碱解氮(AN)采用碱解扩散法;全磷(TP)采用硫酸消煮—钼锑抗比色法;有效磷(AP)采用 NaHCO₃ 浸提—钼锑抗比色法;全钾(TK)采用磷酸消煮—原子吸收分光光度计法;速效钾(AK)采用醋酸铵浸提—原子吸收分光光度计法;交换性钙离子(Ca²⁺)、交换性镁离子(Mg²⁺)采用醋酸铵交换法。具体测定方法参照《中华人民共和国林业行业标准方法》^[15]。

1.4 枯落物层微生物群落结构测定

DNA 提取:采用 MoBio Powersoil DNA 提取试剂盒(Mo Bio, CA, USA),按照说明书提取,通过琼脂糖电泳以及 Nanodrop8000 检测 DNA 质量与浓度。

微生物数量测定:采用实时荧光定量 PCR 技术(qPCR)分别扩增细菌 16SrDNA,真菌 18SrDNA 的基因拷贝数^[16-17]。分别用真菌特异性引物 FF390/FR1、细菌特异性引物 338f/518r^[5],扩增样品 DNA,PCR 产物纯化后克隆到 PMD19-T 载体中,将阳性克隆子扩增培养后提取质粒 DNA,将已知拷贝数的质粒稀释 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷,作为标准曲线的 DNA 模板。荧光定量 PCR 采用 20 μL 反应体系:2 μL 稀释模板(细菌稀释 100 倍,真菌稀释 10 倍)或者 2 μL 质粒 DNA,10 μmol·L⁻¹ 上下游引物各 0.4 μL,BSA 0.5 μL(20 mg·mL⁻¹),SYBR II 10.0 μL,Roxdye II 0.4 μL,灭菌水补足至 20 μL。qPCR 运行程序分别为:细菌 95 °C,2 min;(95 °C,5 s;60 °C,35 s;)28 cycles。真菌 95 °C,2 min;(95 °C,40 s;55 °C,40 s;72 °C,40 s)30 cycles。每个样品做 3 个重复,每次试验同时做阴性对照(NC)、标准曲线与溶解曲线。溶解曲线呈单峰说明扩增引物特异性强,16S rDNA 标准曲线为 $C_t = -3.287 \lg C_i + 37.26 (R^2 = 0.997, \text{EFF}\% = 101.5)$;18S rDNA 标准曲线为 $C_t = -3.236 \lg C_i + 36.92 (R^2 = 0.998, \text{EFF}\% = 103.724)$ 。真菌与细菌的标准曲线相关系数 r 与扩增效率 EFF 均符合要求。以上所用试剂均购自 Takara 公司。

微生物群落多样性测定:采用 PCR 扩增与末端限制性酶切片段长度多态性技术(T-RFLP)相结合的方法。分别用特异性引物 27F/1492r、ITS1/ITS4 对细菌 16S rDNA 和真菌 ITS rDNA 进行 PCR 扩增,并在上游引物的正向标记荧光物质(FAM)^[5, 18-19]。25 μL 反应体系:Extaq 0.2 μL (5 U·μL⁻¹),10×Exbuffer

2.5 μL, dNTPmix 2.0 μL (各 2.5 mmol·L⁻¹), 模版 1 μL, 10 μmol·L⁻¹ 上下游引物各 1 μL, BSA 0.5 μL (20 mg·mL⁻¹), 灭菌水补足至 25 μL。PCR 运行程序分别为:细菌:94 °C,30 s;(94 °C,30 s;54 °C,30 s;72 °C,90 s)24 cycles;72 °C,10 min。真菌:95 °C,2 min;(95 °C,30 s;55 °C,30 s;72 °C,45 s)30 cycles。每个样品取 300 ng 纯化的 PCR 产物,分别用限制性内切酶 *MSP I*、*Hinf I* 及 *Hae III*(Takara)按照说明书步骤对真菌 ITS PCR 产物、细菌 16S rDNA PCR 产物进行酶切。酶切产物脱盐后,经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,*MSP I* 对细菌、*Hinf I* 对真菌 PCR 产物酶切效果较好,送北京睿博兴科生物技术有限公司进行基因扫描,真菌使用 GS500 内标,细菌使用 GS1200Liz 内标。扫描结果用 GeneMarker V2.0 进行统计分析,剔除小于 50 bp 和大于 500 bp(细菌大于 1 000 bp)的片段,以及荧光强度小于 100 单位的峰。将 1 bp 以内的片段(T-RFs)进行合并,不同长度的 T-RFs 代表不同种微生物。以不同长度的 T-RFs 片段的峰面积占总峰面积的百分数来表征不同微生物类群的相对数量。

1.5 数据处理

微生物群落多样性指数按如下公式进行计算:

$$\text{丰富度指数}(S) = \text{物种数}$$

多样性指数采用 Shannon-Weinner 指数(H'):

$$H' = -\sum(P_i \times \ln P_i);$$

均匀度指数采用 Pielou 指数(E):

$$E = H' \cdot (\ln S)^{-1}$$

式中, P_i 为第 i 个物种的个体数(N_i)占总数的(N)的比值。

本研究中数据均用均值±标准差表示,采用 Spss V19.0 软件进行双因素方差分析,经 Shapiro-Wilk 检验,数据符合正态分布的,采用 LSD 进行多重比较,否则采用 Kruskal-Wallis 进行非参数检验, $P < 0.05$ 差异显著。主成分分析(PCA)分析不同发育阶段段林分枯落物层微生物群落结构的差异性;冗余分析(RDA)分析不同发育阶段段林分枯落物层微生物群落结构与环境变量的关系。冗余分析(RDA)与主成分分析(PCA)均在 Canoco V4.5 软件中运行。

2 结 果

2.1 枯落物理化性质及养分贮量

枯落物中碱解氮与全磷含量在中龄林与近熟林最低；有机碳、速效钾浓度以及 pH 不受林龄影响，在未分解层显著高于其他分解层。全氮、有效磷、全钾浓度以及 C/N 受林龄与分解层的共同影响，全

氮与有效磷浓度在幼龄林与中龄林较高，在成熟林较低，在未、半分解层较高，在全分解层较低，而全钾浓度呈相反趋势；C/N 在幼龄林最高，在半分解层最低(表 3)。枯落物总储量以及养分总储量均在近熟林最高。幼龄林、中龄林及近熟林枯落物储量与养分贮量主要集中在半分解层，成熟林养分主要集中在全分解层(表 4)。

表 3 不同发育阶段林分枯落物层理化性质

Table 3 Physico-chemical properties of the litter relative to stand different in development stage

	pH	LOC/ (g·kg ⁻¹)	TN/ (g·kg ⁻¹)	AN/ (mg·kg ⁻¹)	TP/ (g·kg ⁻¹)	AP/ (mg·kg ⁻¹)	TK/ (g·kg ⁻¹)	AK/ (g·kg ⁻¹)	C/N	
林龄 Stand age	Y		8.19±0.73a	542.0±64.2a	1.39±0.44a	212.8±70.3a	3.63±0.71ab		42.37±6.28b	
	Z		6.61±0.72c	381.6±62.7c	0.93±0.18b	208.5±130.1a	3.55±0.45ab		51.56±4.67a	
	J		7.44±0.64b	407.7±72.6bc	1.10±0.28b	205.8±110.3a	3.42±0.38b		49.15±4.89a	
	C		7.37±0.57b	465.5±83.9b	0.93±0.10b	101.4±33.10b	4.04±0.74a		47.99±3.28a	
分解层 Layer	W	5.39±0.21a	373.9±25.06a	7.68±0.60a		251.6±106.9a	3.41±0.58b	1.15±0.05a	48.91±5.13ab	
	B	5.18±0.21b	342.7±48.22b	7.73±0.93a		200.4±80.40a	3.35±0.34b	0.97±0.11b	44.67±6.50b	
	Q	4.85±0.15c	335.2±16.42b	6.79±0.71b		94.45±28.10b	4.22±0.48a	0.57±0.10c	49.73±4.73a	
林龄 Stand age	P	0.275	0.5	<0.001	0.001	0.011	0.046	0.043	0.084	0.003
分解层 Layer	P	<0.001	0.034	<0.001	0.997	0.438	<0.001	<0.001	<0.001	0.032
林龄×分解层	P	0.777	0.966	0.285	0.659	0.812	0.215	0.765	0.892	0.861
Stand age×Layer										

1)W: 未分解层 Un-decomposed layer; B: 半分解层 Semi-decomposed layer; Q: 全分解层 Decomposed layer; LOC: 枯落物有机碳 Litter organic carbon; TN: 全氮 Total nitrogen; AN: 碱解氮 Alkalytic nitrogen; TP: 全磷 Total phosphorus; AP: 有效磷 Available phosphorus; TK: 全钾 Total potassium; AK: 速效钾 Readily available potassium. 2)不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下同。Different letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

2.2 微生物群落结构

单位质量枯落物细菌与真菌基因拷贝数随林龄增大在不同枯落物层总体呈“V”形趋势。细菌在幼龄林最高，近熟林最低，成熟林阶段又有所上升，其中半分解层细菌基因拷贝数在不同发育阶段林分中均最高(图 1a)。真菌基因拷贝数在中龄林或近熟林较低，在成熟林与幼龄林较高，其中未分解层真菌基因拷贝数在不同发育阶段林分中均最高(图 1b)。

基于 T-RFLP 测定数据分析不同发育阶段林分微生物群落结构多样性指数(表 5)与微生物群落结构差异(图 2)。总体而言，不同发育阶段林分细菌与真菌半、全分解层丰富度指数与多样性指数在近熟林或中龄林最高，在幼龄林最低，而均匀度指数在近熟林最低。丰富度指数与多样性指数在幼龄林与

成熟林随枯落物分解程度增加而减小，在中龄林与近熟林呈相反趋势，而均匀度指数在幼龄林、中龄林与成熟林随枯落物分解程度增加而增加。微生物群落在 PCA 图中的分布可以看出，不同发育阶段林分全分解层细菌群落较相似，真菌群落差异较大。中龄林与成熟林未分解、半分解层细菌群落结构相似；幼龄林未分解、半分解层与近熟林未分解层细菌群落结构相似；幼龄林、中龄林未分解、半分解层以及近熟林未分解层真菌群落结构相似。近熟林半分解层的真菌与细菌与其他林龄分布距离较远，表明近熟林半分解层真菌与细菌群落结构存在特异性。

2.3 优势微生物种群

对相对含量大于 3% 的优势菌进行分析，不同处理中优势菌相对含量总值基本均大于 60%，因此可

表 4 不同发育阶段林分枯落物层及养分储量

Table 4 Reserves of litter and nutrients relative to stand different in development stage

林分 Stands	SOC/ (kg·hm ⁻²)	TN/ (kg·hm ⁻²)	AN/ (kg·hm ⁻²)	TP/ (kg·hm ⁻²)	AP/ (kg·hm ⁻²)	TK/ (kg·hm ⁻²)	AK/ (kg·hm ⁻²)	Ca ²⁺ / (kg·hm ⁻²)	Mg ²⁺ / (kg·hm ⁻²)	KC/ (t·hm ⁻²)
YW	858±65.08e	19.24±0.67fg	1.25±0.12e	3.31±1.13c	0.61±0.12b	7.55±1.95ef	2.80±0.09efh	5.90±0.29c	0.59±0.02d	2.4±0.02i
YB	3 151±924.7c	84.28±6.86b	5.06±0.33b	15.03±3.83a	2.40±0.22a	32.57±4.98c	9.90±0.95c	46.68±2.08a	2.52±0.11c	9.4±0.52c
YQ	760.2±21.09e	16.72±0.53fg	1.24±0.23e	2.62±1.18c	0.28±0.05b	9.43±0.48def	1.45±0.31h	6.568±0.32c	0.54±0.03d	2.2±0.05j
TY	4 769	120.2	7.55	20.92	3.29	49.55	14.15	59.16	3.65	14.0
ZW	1 096±32.23e	21.12±1.44ef	1.29±0.17e	3.25±0.15c	0.97±0.38b	10.08±1.37def	3.38±0.06de	7.52±0.31c	0.78±0.03d	3.0±0.04g
ZB	4 319±425.1b	89.54±7.20b	4.58±0.86b	11.12±0.53b	2.75±1.26a	42.39±2.95b	11.47±0.85b	40.16±2.0abc	3.49±0.14b	12.93±0.75b
ZQ	1 058±69.7e	19.54±1.87efg	1.19±0.15e	2.85±0.94c	0.29±0.05b	13.45±0.54d	1.71±0.19fh	8.75±0.42c	0.81±0.04d	3.33±0.49f
TZ	6 473	130.2	7.06	17.22	4.01	65.92	16.56	56.45	5.07	19.26
JW	1 046±104.3e	21.09±2.02ef	0.97±0.26e	3.08±0.46c	0.81±0.20b	8.75±0.40def	3.13±0.17def	8.42±0.40	0.84±0.03d	2.65±0.29h
JB	5 502±174.7a	114.1±6.67a	6.80±0.51a	15.84±2.69a	3.29±1.42a	48.73±4.65a	14.88±2.57a	56.4±1.97a	4.55±0.20a	15.35±1.26a
JQ	2 907±114.7c	59.31±2.44c	3.70±0.38c	9.51±4.2b	0.81±0.19b	32.50±3.34c	4.58±0.79d	43.12±1.68ab	2.14±0.09c	8.56±0.86d
TJ	9 455	194.5	11.47	28.43	4.91	89.98	22.59	107.96	7.53	26.56
CW	650.4±3.40e	13.30±0.77g	0.81±0.07e	1.69±0.22c	0.20±0.01b	6.63±1.27f	1.98±0.16efh	5.54±0.24c	0.50±0.02d	1.72±0.05k
CB	1 180±126.1e	26.15±1.79e	1.62±0.19e	3.37±0.12c	0.40±0.13b	12.11±1.13de	3.44±0.25de	11.11±0.54bc	0.88±0.04d	3.44±0.27f
CQ	2 082±66.37d	41.76±1.12d	2.76±0.93d	5.16±0.24c	0.40±0.03b	29.39±3.18c	3.57±0.44de	57.6±2.3a	1.97±0.10c	6.16±0.59e
TC	3 912	81.21	5.19	10.22	1.0	48.13	8.99	74.26	3.35	11.32
林龄										
Stand age	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> =0.245	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001
分解层 Layer	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> =0.002	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001
林龄×分解层										
Standage	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> =0.008	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> =0.008	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001
×Layer										

Ca²⁺, 交换性钙离子 Exchangeable calcium ions; Mg²⁺, 交换性镁离子 Exchangeable magnesium ions; KC, 枯落物储量 Litter reserve; TY, 幼龄林养分储量 Total nutrient reserve of young stand; TZ, 中龄林养分储量 Total nutrient reserve of middle age stand; TJ, 近熟林养分储量 Total nutrient reserve of premature stand; TC, 成熟林养分储量 Total nutrient reserve of mature stand.

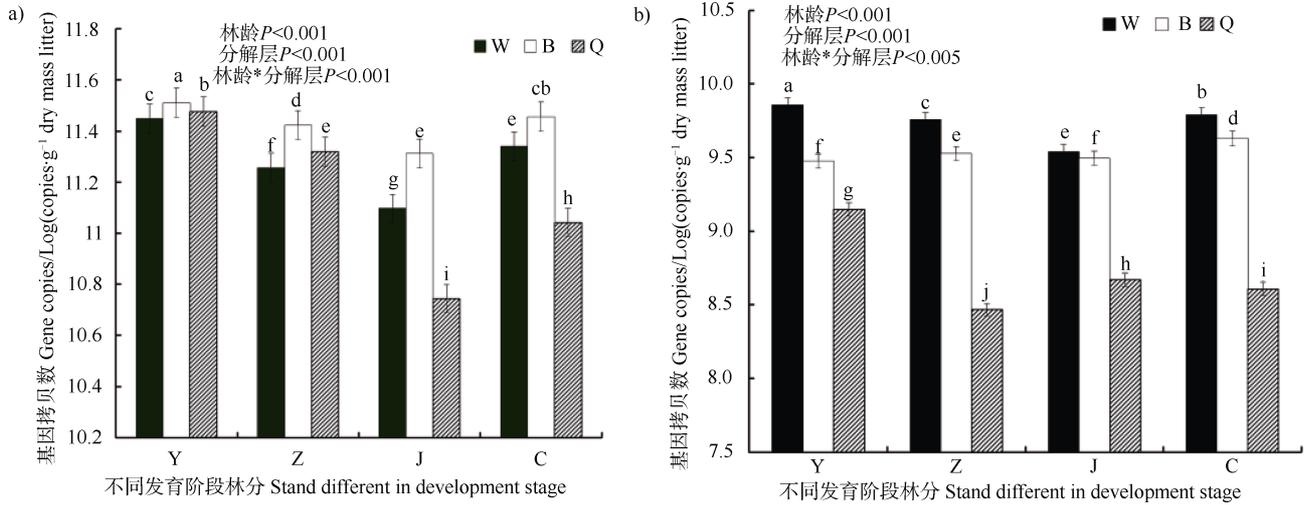


图 1 不同发育阶段林分单位质量枯落物细菌(a)与真菌(b)基因拷贝数

Fig. 1 Bacterial (a) and fungal (b) gene copies relative to stand different in development stage

表 5 不同发育阶段林分微生物群落多样性指数

Table 5 Microbial community diversity index relative to stand different in development stage

林分 Stands	细菌 Bacteria			真菌 Fungi		
	H'	E	S	H'	E	S
YW	3.15±0.019de	0.87±0.002f	36.33±0.57d	2.72±0.06b	0.79±0.007ab	30.33±1.15c
YB	3.04±0.021e	0.90±0.005c	27±1.00e	2.82±0.03ab	0.84±0.004a	28.66±1.15c
YQ	2.65±0.360f	0.90±0.003c	17±6.08f	2.27±0.03d	0.72±0.009c	23.33±0.57d
ZW	3.13±0.064de	0.87±0.002ef	36.66±2.08d	2.74±0.05b	0.80±0.008ab	30±1.00c
ZB	3.26±0.027cd	0.92±0.005b	36.66±1.15d	2.91±0.03a	0.83±0.007a	33±1.00b
ZQ	3.49±0.010ab	0.95±0.016a	47.66±0.57b	2.37±0.27d	0.74±0.104bc	24±1.73d
JW	3.22±0.021cde	0.88±0.006de	38±1.73d	2.91±0.04a	0.85±0.009a	31±1.00bc
JB	3.36±0.002bc	0.89±0.009de	44±1.73bc	2.92±0.01a	0.82±0.006a	35.66±0.57a
JQ	3.57±0.010a	0.88±0.006de	56.33±1.52a	2.06±0.01e	0.66±0.006d	22.66±0.57d
CW	3.28±0.017cd	0.87±0.009ef	42.33±2.31c	2.53±0.06c	0.75±0.011bc	29.66±3.21c
CB	3.23±0.033cde	0.89±0.004cd	37.66±2.08d	2.77±0.04ab	0.81±0.009a	30±1.73c
CQ	3.17±0.087cde	0.95±0.003a	27.66±2.88e	2.77±0.02ab	0.82±0.005a	29.33±1.15c
林龄 Stand age	P<0.001	P<0.001	P<0.001	P<0.001	P=0.546	P<0.001
分解层 Layer	P=0.766	P<0.001	P=0.15	P=0.187	P<0.001	P=0.15
林龄×分解层 Stand age×Layer	P<0.001	P<0.001	P<0.001	P<0.001	P<0.001	P<0.001

以反映微生物群落结构信息。不同发育阶段林分枯落物层优势细菌种类基本相同(图 3), 相对含量不同, 而优势真菌种类及相对含量明显不同(图 4)。细菌 T-RF145、147、435 及 533 在不同发育阶段林分枯落物各分解层均为优势菌, 相对含量受林龄以及分解层的共同影响。总体上 T-RF 145、435 及 533 在幼龄林随分解程度增加相对含量呈显著增加趋

势; T-RF 145、147 与 533 在近熟林与成熟林随分解程度增加相对含量呈显著降低趋势; T-RF147 与 435 在中龄林半分解层相对含量最高。真菌 T-RF 260 在除幼龄林及近熟林的全分解层外的其他枯落物层均为优势菌株, 但在近熟林未、半分解层相对含量显著低于其他 3 个林龄, 随分解程度增加相对含量逐渐降低。T-RF 306 主要分布在中龄林、近熟林与成

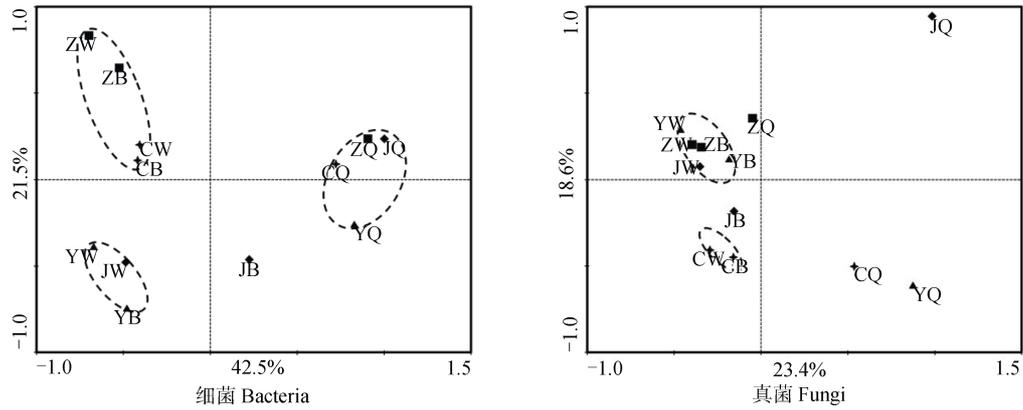


图 2 微生物群落结构 PCA 分析

Fig. 2 PCA analysis of the soil microbial community

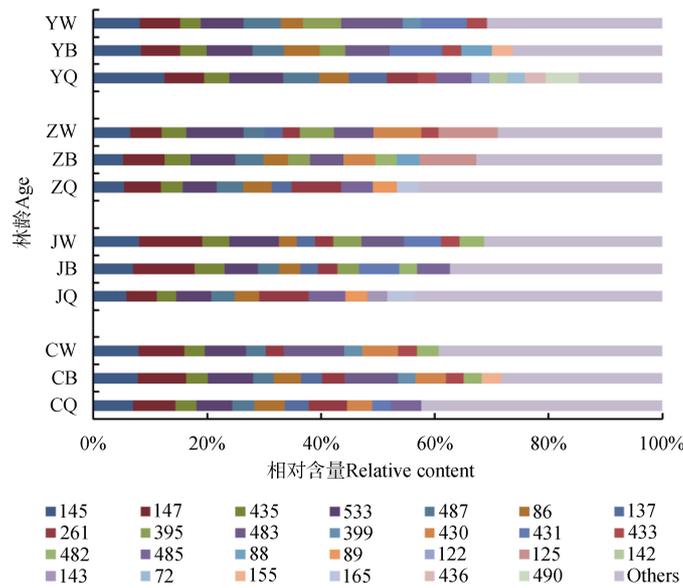


图 3 不同发育阶段林分枯落物层优势细菌 T-RFLP 分析

Fig. 3 T-RFLP analysis of the dominant bacteria in the litter relative to stand different in development stage

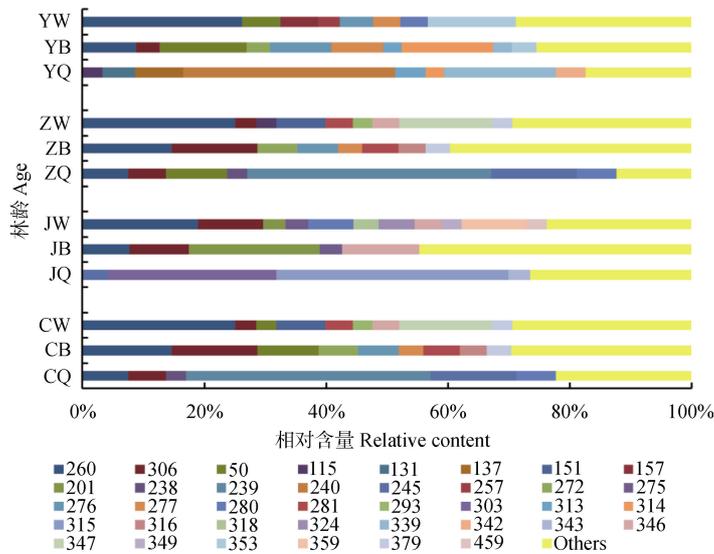


图 4 不同发育阶段林分枯落物层优势真菌 T-RFLP 分析

Fig. 4 T-RFLP analysis of the dominant fungi in the litter relative to stand different in development stage

境, 导致一部分优势菌相对含量显著下降, 甚至下降为非优势菌, 因此均匀度指数降低。这与本研究优势真菌种类在近熟林半、全分解层最少的结果相一致, 因此推测优势菌在不同发育阶段林分枯落物分解中发挥着重要作用。

3.2 微生物群落结构对不同分解层枯落物分解差异的解释

PCA 分析表明未分解、半分解层微生物群落结构与全分解层明显不同, 这主要是由于随分解进行微生物群落结构发生改变, 在分解前期 R-对策的微生物占优势, 在分解后期 K-对策的微生物占优势^[24], 这可能是导致不同分解层枯落物分解差异的主要原因。随分解进行易分解的物质越来越少, 木质素等难分解的顽拗物质不断增加, 能够分解这类物质的微生物越来越少^[25], 因此真菌基因拷贝数降低, 这与以往的研究枯落物前期分解快、后期分解慢的结论一致^[26-27]。在本研究中真菌群落结构受环境因素的影响大于细菌群落结构, 真菌是降解凋落物的先锋物种, 改变凋落物的结构及其化学组成, 软化植物残体, 为细菌定殖创造条件^[28]。细菌基因拷贝数在半分解层最高, 这也主要是由于半分解层凋落物经过前期真菌的分解, 其自身的理化性质发生很大的变化, 具有孔隙多、表面张力大、吸水面积大、油脂含量减少等特点, 使其更适宜细菌生存繁殖^[29-30]。此外, 以往的研究也表明枯落物层的分解酶主要来源于真菌^[31], 因此真菌群落结构在不同分解层枯落物分解中发挥着重要作用, 调控真菌群落结构对枯落物分解至关重要。

3.3 林分环境对不同发育阶段林分枯落物分解差异的解释

中龄林与近熟林未、半分解层微生物群落结构受环境因素的影响一致, 而幼龄林则与成熟林相同。这表明从中龄林阶段林分环境(枯落物层理化性质以及林下植被)已经开始朝不利于微生物生存的方向发展, 到近熟林阶段达到顶峰, 从成熟林阶段开始林分环境则有所改善, 逐渐趋近于幼龄林。中龄林与近熟林枯落物中微生物较幼龄林与成熟林受更多的环境因素影响, 养分含量、林下植被生物量以及 pH 基本在中龄林或近熟林最低, 而 C/N 最高, 这些都反映出近熟林与中龄林阶段枯落物质量低^[32]。在中龄林和近熟林阶段林下植被生物量已成为影响微生物群落结构的关键因素。因此, 改善林下植被对

枯落物层的理化性质及微生物群落结构均有有利的影响^[33]。本研究也证实当林分进入成熟林阶段后, 由于林分密度、郁闭度降低, 林下植被生物量增大, 易分解的草本植物以及阔叶灌木枯落物大量归还到地表, 枯落物层理化性质得到改善, 微生物数量呈上升趋势, 这与以前的研究认为成熟林阶段地力有一定改善的结论相一致^[5, 34]。盛炜彤等^[33, 35]对杉木研究表明当林分郁闭度在 0.7 以下时, 林下植被才能很好地发育, 且能促进土壤中微生物繁殖。因此有必要对中龄林以及近熟林阶段林分进行合理的经营管理(修枝和间伐), 促进林下植被发育, 改善枯落物层理化性质, 从而提高枯落物分解, 加速养分循环; 或者适当延长日本落叶松的主伐年龄, 通过林分的自然稀疏等措施对林分环境进行调节。

4 结 论

微生物群落结构的变化导致了中龄林与近熟林阶段枯落物分解慢, 地力衰退。近熟林阶段林分半分解层枯落物真菌与细菌的群落结构、优势微生物种类与其他发育阶段林分明显不同, 尤其是真菌; 真菌与细菌数量也在中龄林或近熟林枯落物层最低。中龄林或近熟林枯落物层微生物受环境因素影响较大, 林下植被生物量成为影响微生物群落结构特征的主要因子。因此, 加强对日本落叶松人工纯林中龄林与近熟林阶段的密度管理, 促进林下植被发育, 改善枯落物性质, 可以提高微生物活性, 加速养分循环, 缓解地力衰退。

参考文献 (References)

- [1] Liu S R, Li C Y. Nutrient cycling and stability of soil fertility in larch plantation in the eastern part of northern China[J]. Journal of Northeast Forestry University, 1993, 21(2): 19—24. [刘世荣, 李春阳. 落叶松人工林养分循环过程与潜在地力衰退趋势的研究[J]. 东北林业大学学报, 1993, 21(2): 19—24.]
- [2] Wang H X, Sun X M, Chen D S, et al. Changes of soil physical and chemical properties at different developmental stages of *Larix kaempferi* plantations in Xiaolongshan, Gansu Province[J]. Forest Research, 2012, 25(3): 294—301. [王宏星, 孙晓梅, 陈东升, 等. 甘肃小陇山日本落叶松人工林不同发育阶段土壤理化性质的变化[J]. 林业科学研究, 2012, 25(3): 294—301.]

- [3] Liu S R, Li X M, Niu L M. The degradation of soil fertility in pure larch plantations in the northeastern part of China[J]. *Ecological Engineering*, 1998, 10(1): 75—86.
- [4] Yang K, Shi W, Zhu J J. The impact of secondary forests conversion into larch plantations on soil chemical and microbiological properties[J]. *Plant and Soil*, 2013, 368(1/2): 535—546.
- [5] Niu X Y, Sun X M, Chen D S, et al. Soil microorganisms, nutrients and enzyme activity of *Larix kaempferi* plantation under different ages in mountainous region of eastern Liaoning Province, China[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, 26(9): 2663—2672. [牛小云, 孙晓梅, 陈东升, 等. 辽东山区不同林龄日本落叶松人工林土壤微生物、养分及酶活性[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(9): 2663—2672.]
- [6] Chen F L, Zheng H, Ouyang Z, et al. Responses of microbial community structure to the leaf litter composition[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48(3): 603—611. [陈法霖, 郑华, 欧阳志, 等. 土壤微生物群落结构对凋落物组成变化的响应[J]. *土壤学报*, 2011, 48(3): 603—611.]
- [7] de Graaff M A, Classen A T, Castro H F, et al. Labile soil carbon inputs mediate the soil microbial community composition and plant residue decomposition rates[J]. *New Phytologist*, 2010, 188(4): 1055—1064.
- [8] Chen F L, Zhang K, Xiang D, et al. Impacts of litter decomposition of *Eucalyptus* on soil microbial community: A microcosm study[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56(2): 432—442. [陈法霖, 张凯, 向丹, 等. 桉树凋落物对土壤微生物群落的影响: 基于控制实验研究[J]. *土壤学报*, 2019, 56(2): 432—442.]
- [9] Chen T, Chi M, Kong F L, et al. A review on litter decomposition and influence factors[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2016, 35(7): 1927—1935. [陈婷, 郗敏, 孔范龙, 等. 枯落物分解及其影响因素[J]. *生态学杂志*, 2016, 35(7): 1927—1935.]
- [10] Li Q, Zhou D W, Chen X Y. The accumulation, decomposition and ecological effects of above-ground litter in terrestrial ecosystem[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(14): 3807—3819. [李强, 周道玮, 陈笑莹. 地上枯落物的累积、分解及其在陆地生态系统中的作用[J]. *生态学报*, 2014, 34(14): 3807—3819.]
- [11] Jin L, Wu Z X, Yang C, et al. Comparison of microorganism in rubber leaf-litter decomposition under different environments[J]. *Journal of Forest and Environment*, 2016, 36(1): 73—79. [金龙, 吴志祥, 杨川, 等. 不同环境下橡胶凋落叶分解的微生物研究[J]. *森林与环境学报*, 2016, 36(1): 73—79.]
- [12] Peltoniemi K, Straková P, Fritze H, et al. How water-level drawdown modifies litter-decomposing fungal and actinobacterial communities in boreal peatlands[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2012, 51: 20—34.
- [13] Santonja M, Rancon A, Fromin N, et al. Plant litter diversity increases microbial abundance, fungal diversity, and carbon and nitrogen cycling in a Mediterranean shrubland[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2017, 111: 124—134.
- [14] Niu X Y, Sun X M, Chen D S, et al. Soil enzyme activities of the litter in *Larix kaempferi* Plantation[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2015, 51(4): 16—25. [牛小云, 孙晓梅, 陈东升, 等. 日本落叶松人工林枯落物土壤酶活性[J]. *林业科学*, 2015, 51(4): 16—25.]
- [15] State Forestry Administration. Forest soil standard analysis method: Standards for forestry industry of the People's Republic of China[S]. Beijing: Standards Press of China, 2000. [国家林业局. 中华人民共和国林业行业标准-森林土壤分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2000.]
- [16] Qin H, Wang H L, Strong P J, et al. Rapid soil fungal community response to intensive management in a bamboo forest developed from rice paddies[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2014, 68: 177—184.
- [17] Yamamoto N, Otawa K, Nakai Y. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea during cattle manure composting[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(4): 807—815.
- [18] Yuan H Z, Qin H L, Liu S L, et al. Response of abundance and composition of the bacterial community to long-term fertilization in paddy soils[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(22): 4610—4617. [袁红朝, 秦红灵, 刘守龙, 等. 长期施肥对红壤性水稻土细菌群落结构和数量的影响[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(22): 4610—4617.]
- [19] Shi Y W, Zhang X B, Lou K. Endophyte microbial community in *Achnatherum inebrians*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(10): 1297—1308. [史应武, 张雪兵, 娄恺. 新疆醉马草内生菌群落结构[J]. *微生物学报*, 2012, 52(10): 1297—1308.]
- [20] Feng Y, Pan C, Li Y J, et al. Effects of different forest types on microflora in subtropical soils[J]. *Soil and Environmental Sciences*, 1996, 5(1): 20—26.
- [21] Doran J W, Sarrantonio M, Liebig M A. Soil health and sustainability[J]. *Advances in Agronomy*, 1996, 56: 1—54.
- [22] Liu J J, Sui Y Y, Yu Z H, et al. High throughput sequencing analysis of biogeographical distribution of bacterial communities in the black soils of northeast China[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2014, 70: 113—122.
- [23] Sui X, Feng F J, Lou X, et al. Relationship between microbial community and soil properties during natural succession of forest land[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6: 7028—7034.

- [24] Bastian F, Bouziri L, Nicolardot B, et al. Impact of wheat straw decomposition on successional patterns of soil microbial community structure[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2009, 41(2): 262—275.
- [25] Marschner P, Umar S, Baumann K. The microbial community composition changes rapidly in the early stages of decomposition of wheat residue[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2011, 43(2): 445—451.
- [26] Qi Z M, Wang K Y, Song G Y, et al. Bio-chemical properties of the forest floor in subalpine bamboo communities in western Sichuan[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(6): 1230—1236. [齐泽民, 王开运, 宋光煜, 等. 川西亚高山箭竹群落枯枝落叶层生物化学特性[J]. *生态学报*, 2004, 24(6): 1230—1236.]
- [27] Ji X Y, Jiang H, Hong J H, et al. Effects of litter thickness on leaf litter decomposition and enzyme activity of three trees in the subtropical forests[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(6): 1731—1739. [季晓燕, 江洪, 洪江华, 等. 亚热带 3 种树种凋落叶厚度对其分解速率及酶活性的影响[J]. *生态学报*, 2013, 33(6): 1731—1739.]
- [28] Gulis V, Suberkropp K. Effect of inorganic nutrients on relative contributions of fungi and bacteria to carbon flow from submerged decomposing leaf litter[J]. *Microbial Ecology*, 2003, 45(1): 11—19.
- [29] Liu S H, Feng Z Y, Lü S H, et al. Study on water-holding capacity of litter in six vegetation communities in baihua mountainous areas of west Beijing[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2007, 21(6): 179—182. [刘尚华, 冯朝阳, 吕世海, 等. 京西百花山区 6 种植物群落凋落物持水性研究[J]. *水土保持学报*, 2007, 21(6): 179—182.]
- [30] Wei Q, Ling L, Zhang G Z, et al. Water-holding characteristics and accumulation amount of the litters under main forest types in Xinglong Mountain of Gansu, Northwest China[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(10): 2589—2598. [魏强, 凌雷, 张广忠, 等. 甘肃兴隆山主要森林类型凋落物累积量及持水特性[J]. *应用生态学报*, 2011, 22(10): 2589—2598.]
- [31] Zeng Q C. The microbial mechanism of *Quercus Wutaishansea* litter decomposition on the Loess Plateau, China[D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A & F University, 2018. [曾全超. 黄土高原辽东栎枯落物分解的微生物作用机制[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2018.]
- [32] Li G L, Liu Y, Li R S, et al. Responses of decomposition rate, nutrient return and composition of leaf litter to thinning intensities in *Pinus tabulaeformis* plantation[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2008, 30(5): 52—57. [李国雷, 刘勇, 李瑞生, 等. 油松叶凋落物分解速率、养分归还及组分对间伐强度的响应[J]. *北京林业大学学报*, 2008, 30(5): 52—57.]
- [33] Sheng W T. A study stand density management and long-term productive of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) plantation[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2001, 37(5): 2—9. [盛炜彤. 杉木林的密度管理与长期生产力研究[J]. *林业科学*, 2001, 37(5): 2—9.]
- [34] Zhang H, Sun D Y. Effects of different ages of Japanese *Larix kaempferi* artificial forest on litters and soil physicochemical characteristics[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2016, 32(1): 12—16. [张慧, 孙栋元. 不同林龄日本落叶松人工林对凋落物与土壤理化性质的影响[J]. *中国农学通报*, 2016, 32(1): 12—16.]
- [35] Sheng W T, Yang C D. Research on effect of ameliorating soil properties by under growth vegetation of China fir[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1997, 17(4): 377—385. [盛炜彤, 杨承栋. 关于杉木林下植被对改良土壤性质效用的研究[J]. *生态学报*, 1997, 17(4): 377—385.]

(责任编辑: 卢 萍)