

DOI: 10.11766/trxb201906190319

葛江飞, 杨为中, 高雄飞, 孙思哲, 陈俊辉, 梁辰飞, 徐秋芳, 邬奇峰, 秦华. 不同经营强度下毛竹丛枝菌根共生体对氨氧化微生物的影响[J]. 土壤学报, 2021, 58 (1): 505–513.

GE Jiangfei, YANG Weizhong, GAO Xiongfei, SUN Sizhe, CHEN Junhui, LIANG Chenfei, XU Qiufang, WU Qifeng, QIN Hua. Impacts of Mycorrhiza Symbionts on Ammonia-Oxidizing Microorganisms as Affected by Management Intensity of *Phyllostachys pubescens* Forests[J]. Acta Pedologica Sinica, 2021, 58 (1): 505–513.

不同经营强度下毛竹丛枝菌根共生体对氨氧化微生物的影响*

葛江飞^{1, 2}, 杨为中^{1, 2}, 高雄飞^{1, 2}, 孙思哲^{1, 2}, 陈俊辉^{1, 2}, 梁辰飞^{1, 2},
徐秋芳^{1, 2}, 邬奇峰³, 秦 华^{1, 2†}

(1. 浙江省森林生态系统碳循环实验室, 浙江农林大学, 浙江临安 311300; 2. 浙江农林大学环境与资源学院, 浙江临安 311300; 3. 浙江省临安区农业技术推广中心, 浙江临安 311300)

摘 要: 利用原位微宇宙试验将丛枝菌根 (Arbuscular mycorrhiza, AM) 真菌菌丝与根系区分, 设置菌根室 (RA) 和菌丝室 (AH) 两个分室处理, 以粗放经营 (extensive management, EM) 毛竹林为对照, 研究集约经营 (Intensive management, IM) 条件下毛竹林土壤丛枝菌根共生体对氨氧化微生物群落的影响及其响应机理。结果表明, 无论集约经营还是粗放经营 AH 处理土壤 pH 均显著降低, 且集约经营毛竹林 AH 处理土壤碱解氮显著降低; 不同分室处理对硝化势没有显著影响, 但集约经营毛竹林 RA 处理土壤硝化势显著高于粗放经营; 集约经营之后氨氧化古菌 (Ammonia-oxidizing archaea, AOA) 基因丰度显著降低, 而氨氧化细菌 (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 基因丰度则在两种经营强度的 AH 处理中显著降低。不同经营强度和分室处理并未对氨氧化微生物群落组成结构产生显著影响, 但网络分析显示集约经营毛竹林氨氧化微生物之间的互作和共生关系优于粗放经营, 粗放经营毛竹林氨氧化微生物之间的竞争更为激烈。研究结果为更好地理解毛竹林 AM 真菌与氨氧化微生物之间的互作关系提供了理论基础。

关键词: 毛竹林; 集约经营; 菌根共生体; 氨氧化微生物

中图分类号: S714.3 **文献标志码:** A

Impacts of Mycorrhiza Symbionts on Ammonia-Oxidizing Microorganisms as Affected by Management Intensity of *Phyllostachys pubescens* Forests

GE Jiangfei^{1, 2}, YANG Weizhong^{1, 2}, GAO Xiongfei^{1, 2}, SUN Sizhe^{1, 2}, CHEN Junhui^{1, 2}, LIANG Chenfei^{1, 2},
XU Qiufang^{1, 2}, WU Qifeng³, QIN Hua^{1, 2†}

(1. Zhejiang Provincial Laboratory of Carbon Cycling in Forest Ecosystems, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300, China; 2. School of Environmental and Resources, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300, China; 3.

* 国家自然科学基金项目 (41671252) 和杭州市农业与社会发展科研项目 (171937) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41671252) and the Hangzhou Agricultural and Social Development Research Project (No. 171937)

† 通讯作者 Corresponding author. E-mail: qinhua@zafu.edu.cn

作者简介: 葛江飞 (1994—), 女, 安徽安庆人, 硕士研究生, 主要从事土壤生物与生态功能调控研究。E-mail: Gejfei1994@163.com

收稿日期: 2019-06-19; 收到修改稿日期: 2019-07-29; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2020-03-11

Agricultural Technology Extension Centre of Lin'an City, Zhejiang Province, Lin'an, Zhejiang 311300, China)

Abstract: 【Objective】 In this comparative study, impacts of soil arbuscular mycorrhizal symbionts on ammonia-oxidizing microbial communities and their response mechanism in moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) groves different in management intensity were investigated, in an attempt to provide a theoretical basis for scientific and rational application of nitrogen fertilizer in moso bamboo forests and contribution to mitigation of global climate change. 【Method】 Sample sites of bamboo groves similar in standing condition but different in management intensity, intensive and extensive, were selected for this field experiment, in each site, four 10 m×10 m quadrats or sample plots were set up, and in each sample plot two microcosmic systems were built up with PVC and nylon nets different in mesh number. With the aid of the microcosmic system, mycorrhizal fungal mycelia were separated from the mycorrhizal root system into two compartments: the mycorrhizal chamber (RA) and the mycelial chamber (AH). Once the systems were fixed, they were left in the soil and cultured in situ for 3 months. Soil samples were collected from the microcosmic systems with a soil auger for analysis in the laboratory. The soil samples were prepared into suspensions, (1 : 2.5 = soil : water) for determination of soil pH with a pH meter; Alkali-hydrolyzable nitrogen (AN) was determined with the alkali-hydrolyzed diffusion method; available phosphorus (AP) was extracted with ammonium fluoride and hydrochloric acid solution and determined with a molybdenum-antimony colorimetry; available potassium (AK) was determined with the flame photometric method; soil organic C (SOC) with the potassium dichromate oxidation method; Soil nitrification potential with the aerobic culture method; copy numbers of *amoA* gene of ammonia-oxidizing archaea and bacteria with the Real-time quantitative PCR; and ammonia-oxidizing microbial community with the high-throughput sequencing technique. 【Result】 Results show that both intensive management and extensive management reduced significantly soil pH in the mycelial chambers (AH) in the moso bamboo forest, and only intensive management did soil alkali-hydrolyzed nitrogen in the mycelial chamber (AH). No significant difference was found between the two compartments of the same system in nitrification potential, but the soil nitrification potential in the mycorrhizal chamber (RA) in the bamboo forest was significantly higher under intensive management than under extensive management. AOA in the mycorrhizal chamber and mycelium chamber was significantly lower in gene abundance under intensive management than under extensive management, while AOB in the mycelium chambers was significantly decreased in gene abundance regardless of management intensity. Ammonia-oxidizing microbial communities did not vary much in composition or structure in either chamber under either management. However, network analysis shows that the ammonia-oxidizing microorganisms in the bamboo forest under intensive management displayed better interaction and symbiosis relationship, but less competition than those in the bamboo forest under extensive management. 【Conclusion】 To sum up, AM mycelia significantly reduce soil pH and AN content in intensively managed moso bamboo forests. Intensity of forest management does have significant impacts on nitrification potential, which however does not differ much between the two mycorrhizal compartments. Intensive management has significant effects on gene abundance of AOA and AOB in the AM mycelial compartment. Although management intensity does not have much impact on structure of the ammonia-oxidizing microorganism community in the soil, intensive management does dull nutrient competition among ammonia-oxidizing microorganisms to a certain extent.

Key words: *Phyllostachys pubescens* forest; Intensive management; Mycorrhizal symbiont; Ammonia-oxidizing microorganism

毛竹 (*Phyllostachys pubescens*) 生长周期短、用途广泛、经济价值高, 已经成为我国南方地区尤其是山区农民的主要经济来源之一。近二十余年, 为追求更高的经济效益, 大量毛竹林由粗放经营模式逐渐转变为集约经营, 主要措施为大量施用氮肥、深翻土壤以及林下清除灌木和杂草等, 从而获得更

高的竹材和竹笋产量。集约经营模式虽然增加了农户的经济收益, 但是大量施用氮肥也带来了土壤酸化、微生物活性降低以及水体富营养化等一系列环境问题^[1]。此外, 已有学者研究发现毛竹林施肥、翻耕等集约经营措施也会导致土壤某些功能菌群如固氮菌和氨氧化微生物的群落结构发生显著改

变^[2]，对土壤氮循环产生不利影响并且会加剧温室气体排放^[3]。

丛枝菌根 (Arbuscular mycorrhiza, AM) 真菌是自然界分布最广泛的一类菌根真菌，能侵染超过 80% 的高等陆生植物根系，帮助宿主植物提高水分及养分利用效率^[4]。由于氨氧化微生物是化能自养微生物，早期研究表明，AM 真菌对土壤氨氧化微生物没有影响^[5]。但近年来有研究发现，AM 真菌可能通过与氨氧化微生物竞争土壤中的有效氮 (NH_4^+) 从而影响氨氧化微生物的丰度及群落^[6-8]。Teutscheroova 等^[7]的室内培养实验研究发现接种 AM 真菌处理的土壤中氨氧化细菌 (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 的丰度显著上升，其他许多研究结果也表明 AM 真菌对 AOB 丰度的影响是积极的^[9-11]，并且 AOB 的群落结构也会因为 AM 真菌的存在发生显著的改变^[12]。但也有一些研究发现 AM 真菌的存在会对氨氧化微生物产生负面的影响^[6, 13-14]，并且这些负面的影响大多数是在土壤 NH_3 较低的情况下发生的，如土壤肥力低或者土壤 pH 较低土壤中的氨多以 NH_4^+ 的形式存在，不利于被氨氧化古菌 (Ammonia-oxidizing archaea, AOA) 或者 AOB 利用。

虽然在菌根共生过程中 AM 真菌与氨氧化微生物之间的养分竞争假设已成为目前较为流行的观点，但是这些研究未将 AM 真菌与根系的效果分开，因此无法准确评估 AM 真菌与根系对氨氧化微生物群落演变的贡献。此外，在不同的毛竹林经营强度下，菌根对氨氧化微生物影响如何目前尚未有明确的结论。因此，本研究利用原位微宇宙试验，研究毛竹林生态系统中丛枝菌根及菌丝对氨氧化微生物群落的影响及其对毛竹经营强度的响应机制，为毛竹林科学合理施用氮肥，减缓全球气候变化提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验地概况

试验地点位于浙江省杭州市临安区青山镇 (119°42' E, 30°14' N)，海拔 50 m，属亚热带季风气候，温暖湿润，光照充足，年降水量 1 420 mm，年均气温约 15.6 °C，年均无霜期约 230 d，地形为低山丘陵，土壤类型为红壤。选取集约经营毛竹林

作为研究对象，同时选取附近立地条件相似的粗放经营毛竹林作为对照。集约经营毛竹林的经营措施主要是隔年采伐老竹留养新竹，去除林下灌木、杂草，并对毛竹进行钩梢。每年 6 月中下旬采用撒施的方式对毛竹林进行施肥，然后进行深翻，化肥用量为：尿素 ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) 450 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 、过磷酸钙 ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$) 450 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 、氯化钾 (KCl) 150 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 。粗放经营毛竹林不施肥，隔年采伐老竹留养新竹，林下植被主要有连蕊茶 (*Camellia cuspidate*)、狗脊蕨 (*Woodwardia japonica*)、兔儿伞 (*Syneilesis aconitifolia*)、络石 (*Trachelospermum jasminoides*)、白花败酱草 (*Patrinia villosa*)、宝铎草 (*Disporum sessile*) 等。

1.2 试验设计

于 2017 年 6 月分别在集约经营和粗放经营的毛竹林样地各建立 4 个 10 m×10 m 的样方，各样方之间距离均大于 30 m，共计 8 个样方。在每个样方内设置 2 个不同的微宇宙系统，共计 16 个。微宇宙系统由 PVC 筒 (直径 16 cm，高度 20 cm) 和尼龙筛网制成，PVC 筒壁上开有 8 个孔 (4 个 6 cm 孔径和 4 个 3 cm 孔径)，底部开有 4 个孔 (6 cm 孔径)，所有的孔均安装有不同孔径的尼龙筛网以区分不同菌根分室处理，其中 2 mm 孔径的筛网可以使得毛竹细根及 AM 真菌菌丝均能通过 (+细根+AM 真菌)，设为菌根室 (RA) 处理；35 μm 孔径的筛网仅允许 AM 真菌菌丝通过 (-细根+AM 真菌)，设为菌丝室 (AH) 处理。分层取出样地 0~20 cm 土壤，去除明显的植物根系及石块，放置好 PVC 筒后，再尽快按照原来顺序将土壤分层放入筒内。在微宇宙系统布置完成后原地培养 3 个月，用土钻采集微宇宙系统内土壤带回实验室进行分析。鲜土样混合后过 2 mm 筛，一部分土壤立即进行 DNA 提取及硝化势的测定，另一部分风干进行理化性质分析。

1.3 土壤理化性质及硝化势测定

土壤理化性质参照鲁如坤等^[15]方法：土壤有机质采用重铬酸钾-硫酸外加热法测定；碱解氮采用碱解扩散法测定；有效磷采用盐酸-氟化铵溶液浸提，钼锑抗比色法测定；速效钾采用醋酸铵提取，火焰分光光度计测定；土壤 pH 采用水土比 2.5 : 1，玻璃电极法测定。

土壤硝化势的测定采用好气培养法^[16]并作略微

修改。称取 10 g 新鲜土样置于锥形瓶中, 加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 调节 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度到 $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 以干土计算, 将含水量调节至田间最大持水量的 60%, 同时以不加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液的土壤作为对照。将锥形瓶放于 25°C 的培养箱中避光培养 48 h, 培养结束后, 用 $50 \text{ mL } 1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$ 溶液浸提并过滤, 流动分析仪测定 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量。

1.4 土壤 DNA 提取及定量 PCR

土壤总 DNA 的提取采用 MoBio PowerSoil[®] DNA Isolation Kit 试剂盒 (MoBio Laboratories, 美国), 称取 0.5 g 冷冻干燥土壤样品, 按照试剂盒说明提取 DNA。提取的 DNA 片段大小经 1% (m/v) 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并用微量分光光度计 (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, 美国) 进行浓度测定, 保存于 -40°C 用于后续分析。

使用 CFX96[™] Real-Time System (Bio-Rad) 仪器进行氨氧化古菌和氨氧化细菌 *amoA* 功能基因实时定量分析, 以确定样品的基因拷贝数。AOA 和 AOB *amoA* 基因的 PCR 扩增采用的引物对分别是 Arch-*amoA*F: 5'-AATGGTCTGGCTTAGACG-3'/Arch-*amoA*R: 5'-GCGGCCATCCATCTGATTGT-3'和 *amoA*-1F: 5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3'/*amoA*-2R: 5'-CCCCTCGGGAAAGCCTTCTTC-3'^[17], 每个样品 3 个重复, 反应体系为: $2\times\text{SYBR Premix Ex Taq } 10 \mu\text{L}$, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上游引物和下游引物各 $0.2 \mu\text{L}$, DNA 模板 $1.0 \mu\text{L}$, 无菌水补足至 $20 \mu\text{L}$ 。AOA 和 AOB 的扩增程序见参考文献[18]。

1.5 高通量测序及数据处理

采用带 barcode 的 AOA 和 AOB 特异性引物, 利用 Illumina Miseq 平台进行高通量测序, 测序服务委托杭州联川生物技术有限公司完成。用 QIIME2 将 Miseq 测序完成后得到原始的下机数据进行处理, 利用 overlap 将双端数据进行拼接, 并进行质控、嵌合体过滤, 获得高质量的有效数据。对最终获得的有效数据采用 Vsearch2.3.4 算法按照 97% 的相似度聚类, 为了降低假阳性率, 过滤掉 singleton 序列, 获得最终的 OTU 丰度及代表序列, 进一步进行多样性分析、物种分类注释和差异分析等。

1.6 数据分析

采用 SPSS19.0 对土壤理化性质、硝化势、AOA 和 AOB *amoA* 基因拷贝数、 α 多样性指数以及优势

属相对丰度均进行单因素方差分析 (One-way analysis of variance) 和双因素方差分析 (Two-way analysis of variance) 比较各处理之间的差异显著性 ($P<0.05$)。对土壤理化性质与 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因拷贝数进行 Pearson 相关性分析。采用 R 语言 Vegan 包对不同处理土壤 AOA 和 AOB 群落结构进行非度量多维尺度转换排序分析 (Non-metric multidimensional scaling, NMDS), 并通过相似性检验 (Analysis of similarities, ANOSIM) 检验不同群落之间的差异显著性 ($P<0.05$)。为了进一步了解经营强度和不同分室处理对氨氧化微生物种群之间相互作用的影响, 利用 MENA 平台对 OTU 丰度进行网络分析。

2 结果

2.1 土壤理化性质及硝化势

无论是集约经营还是粗放经营毛竹林, AH 处理土壤 pH 均显著低于 RA 处理 ($P<0.05$)。集约经营毛竹林 AH 处理土壤碱解氮也显著低于 RA 处理 ($P<0.05$), 有机质及其他养分含量均未发生显著变化 (表 1)。与不同分室处理相比, 不同经营强度对土壤养分含量的影响更为明显。集约经营毛竹林 RA 处理土壤有机质、pH 显著低于粗放经营毛竹林, 而碱解氮含量显著高于粗放经营毛竹林土壤。同时, 集约经营毛竹林 AH 处理土壤有效磷和速效钾含量显著高于粗放经营毛竹林, 而 pH 显著降低 ($P<0.05$)。双因素方差分析结果表明, 经营强度和分室处理均显著影响土壤 pH 和碱解氮含量, 但两者没有显著的协同效应 (表 1)。

在同一类型毛竹林中, 不同分室处理之间土壤硝化势均没有显著差异 (表 1), 而集约经营毛竹林 RA 处理土壤硝化势显著高于粗放经营毛竹林 ($P<0.01$)。双因素方差分析结果表明, 经营强度对硝化势影响显著 ($P<0.01$), 不同分室处理对硝化势影响不显著, 但两者对土壤硝化势具有显著的协同作用 ($P<0.05$)。

2.2 氨氧化微生物 *amoA* 基因丰度

荧光定量 PCR 结果显示, 无论是集约经营还是粗放经营, 不同分室处理之间毛竹林 AOA 的基因丰度均无显著差异 (图 1)。而在同一分室处理条件下,

表 1 毛竹林土壤理化性质及硝化势

Table 1 Soil physico-chemical properties and nitrification potentials of the Moso bamboo forest relative to management intensity (mean±SD, n=3)

经营方式 Management	分室处理 Compartment	有机质 SOC / (g·kg ⁻¹)	碱解氮 Alkali-hydrolyzale N / (mg·kg ⁻¹)	有效磷 Available P / (mg·kg ⁻¹)	速效钾 Available K / (mg·kg ⁻¹)	pH (H ₂ O)	硝化势 Nitrification potential / (mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)
IM	RA	24.00±0.76a*	60.20±3.18a*	5.32±0.69a	71.00±7.55a	4.83±0.06a*	1.94±0.32a*
	AH	25.21±1.51a	52.36±2.95b	5.36±0.37a*	74.50±1.00a*	4.71±0.03b*	1.45±0.30a
EM	RA	30.54±2.66A	49.84±2.70A	4.61±0.87A	77.83±9.75A	5.06±0.05A	0.66±0.08a
	AH	24.48±4.82A	47.60±0.97A	4.60±0.28A	63.50±1.50A	4.91±0.08B	0.97±0.40a
	F1	P>0.05	P<0.01	P>0.05	P>0.05	P<0.01	P<0.01
	F2	P>0.05	P<0.01	P>0.05	P>0.05	P<0.01	P>0.05
	F1×F2	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P<0.05	P>0.05	P<0.05

注：IM 表示集约经营，EM 表示粗放经营，F1 表示经营强度，F2 表示分室处理。不同的小写字母表示集约经营毛竹林中不同分室处理之间差异显著 ($P<0.05$)，不同的大写字母表示粗放经营毛竹林中不同分室之间差异显著 ($P<0.05$)，*表示不同经营方式的同一分室处理之间差异显著 ($P<0.05$)，下同。Note: IM stands for intensive management, EM for extensive management, F1 stands for the factor of management intensity, F2 stands for the factor of compartment. Different capitals or lowercases indicate significant differences between different compartments in extensive or intensive management bamboo forests, respectively. * indicates significant difference between different bamboo forests ($P<0.05$) the same in compartment. The same below.

集约经营毛竹林 RA 和 AH 的 AOA 基因丰度均显著高于粗放经营 ($P<0.05$)。双因素方差分析结果表明，经营强度对 AOA 基因丰度影响显著 ($P<0.01$)。

无论是 RA 处理还是 AH 处理，AOB 在不同经营强度毛竹林之间均无显著差异 (图 1)。在同一经营强度下，无论是集约经营还是粗放经营，RA 处理土壤 AOB 基因丰度均显著高于 AH 处理 ($P<0.05$)。

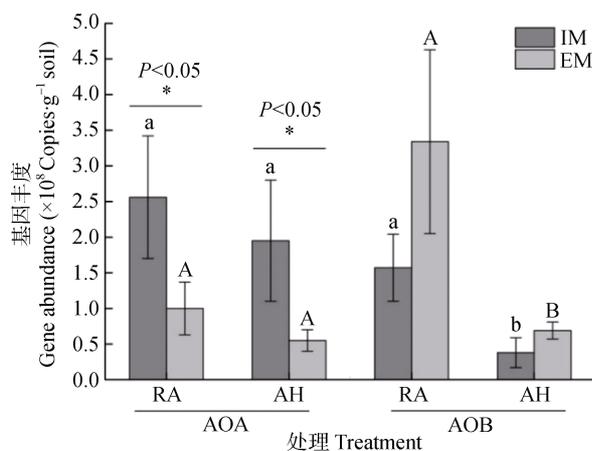


图 1 毛竹林土壤 AOA 及 AOB 基因丰度

Fig. 1 Abundance of AOA and AOB in Moso bamboo forest soils relative to management intensity

双因素方差分析结果表明，经营强度和分室处理均对土壤 AOB 基因丰度影响显著 ($P<0.05$)，两者交互作用也达到显著水平 ($P<0.05$)。

2.3 氨氧化微生物 *amoA* 基因丰度与土壤理化因子及硝化势的相关性

对氨氧化微生物丰度与土壤理化因子及硝化势的 Pearson 相关性检验结果表明，AOA 丰度与硝化势、碱解氮显著正相关，与土壤 pH 显著负相关，而 AOB 丰度则与土壤有机质和 pH 显著正相关 (表 2)。

2.4 氨氧化微生物的群落结构

集约经营毛竹林中，AH 处理 AOA 的物种数显著低于 RA 处理，而粗放经营毛竹林则相反，AH 处理 AOA 的物种数及 α 多样性指数均显著高于 RA 处理 ($P<0.05$)。两种经营方式相比，粗放经营毛竹林 AH 处理的物种数及 α 多样性指数均显著高于集约经营毛竹林 (表 3)。双因素方差分析显示经营强度对 AOA 的物种数及 α 多样性指数影响显著，不同分室处理无显著影响，但是两种因素对物种数和 Chao1 指数具有极显著的交互作用 ($P<0.01$)。与 AOA 相比，AOB 物种数及 α 多样性指数在不同经营强度和分室处理之间均无显著差异 (表 3)。双因

表 2 氨氧化微生物基因拷贝数与土壤理化及硝化势相关性分析

Table 2 Correlation analysis of abundance of ammonia oxidizers with soil properties and soil nitrification potential

指标 Index	硝化势 Nitrification potential	有机质 SOC	碱解氮 Alkali-hydrolyzale N	有效磷 Available P	速效钾 Available K	pH
AOA 丰度 AOA abundance	0.86**	-0.23	0.59*	0.42	0.40	-0.58*
AOB 丰度 AOB abundance	-0.39	0.67*	0.01	-0.23	0.20	0.72**

注: *和**分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。Note: * and ** indicate significant difference at the level of 0.05 and 0.01, respectively.

表 3 毛竹林土壤 AOA、AOB 群落多样性指数

Table 3 Diversity indices of the AOA and AOB communities in the Moso bamboo forest soils

经营方式 Management	分室处理 Compartment	AOA			AOB		
		物种数 Observed species	香农指数 Shannon index	Chao1 指数 Chao1 index	物种数 Observed species	香农指数 Shannon index	Chao1 指数 Chao1 index
IM	RA	681.7±19.7a	5.33±0.43a	886.3±36.0a	1 398±198a	7.63±0.20a	1 937±219a
	AH	622.5±29.3b*	5.43±0.07a*	822.3±26.1a*	1 378±141a	7.23±0.18a	2 023±168a
EM	RA	656.3±22.0B	5.51±0.66B	869.4±36.0B	1 500±126A	7.21±0.30A	2 115±114A
	AH	762.3±34.3A	5.92±0.06A	961.6±40.8A	1 650±130A	7.54±0.34A	2 412±180A
	F1	<i>P</i> <0.01	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.01	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> <0.05
	F2	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> >0.5	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> >0.05
	F1×F2	<i>P</i> <0.01	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> <0.01	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> >0.05

素方差分析结果表明, 仅经营强度对 AOB 群落 Chao1 指数影响显著 ($P<0.05$), 经营强度及分室处理对 AOB 群落香农指数具有显著的交互作用 ($P<0.05$)。

ANOSIM 分析结果显示, 无论是经营强度还是不同分室处理均未对 AOA 和 AOB 的群落结构产生显著影响, 但在集约经营毛竹林土壤中, RA 和 AH 处理的 AOA 群落有明显区分。对 AOB 而言, 不同经营强度毛竹林 AH 处理之间区分明显 (图 2)。

2.5 氨氧化微生物分子生态网络特征

基于两种经营强度毛竹林的分组方式, 对 AOA 和 AOB 的高通量测序数据进行网络分析。AOA 的网络分析结果显示, 粗放经营毛竹林网络中节点数高于集约经营, 但是连接数和正相关比例均低于集约经营 (表 4)。而 AOB 的网络分析结果则显示,

粗放经营毛竹林网络中节点数和连接数均高于集约经营, 但正相关比例低于集约经营毛竹林 (表 4)。不论 AOA 还是 AOB, 网络中正相关的连接数均表现出集约经营高于粗放经营的趋势。将网络节点与环境因子进行曼特尔相关性分析 (Mantel test) 发现, 在每个分类水平环境因子并未对网络中的不同物种产生显著影响。

3 讨论

微宇宙试验结果表明无论是集约经营还是粗放经营毛竹林, AH 处理土壤 pH 均显著低于 RA ($P<0.05$), 这与 Veresoglou 等^[13]的研究结果一致, 主要是由于 AM 菌丝体分泌的有机酸可降低土壤 pH。其他学者分别以烟草和沙丁旺为宿主植物研究

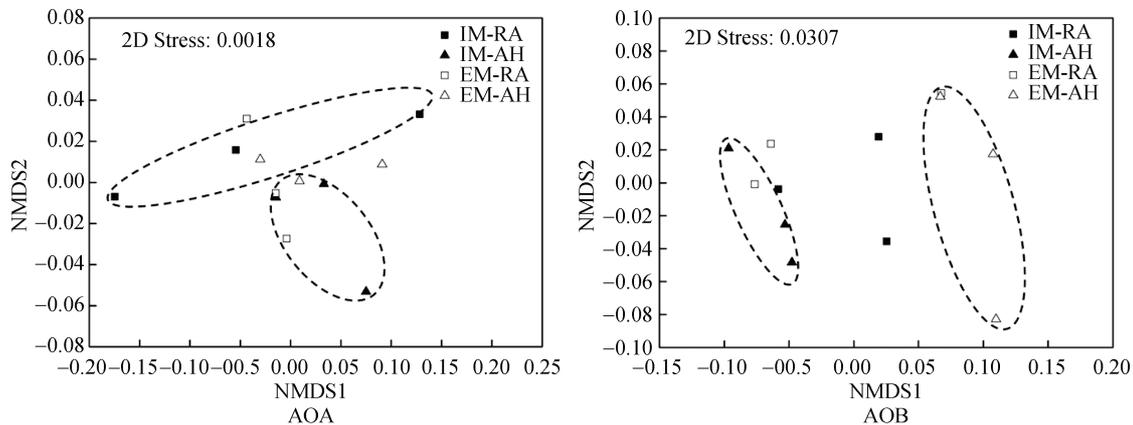


图2 AOA、AOB 群落组成 NMDS 排序图

Fig. 2 NMDS ordination plots of the community compositions of ammonia-oxidizing bacteria and archaea

表4 毛竹林土壤 AOA、AOB 分子生态网络特征

Table 4 The properties of the molecular ecological networks of the AOA and AOB communities in the Moso bamboo forest soils

网络参数 Network index	AOA		AOB	
	IM	EM	IM	EM
节点数 Total nodes	364	401	265	482
连接数 Total links	1272	632	342	1276
R^2 of power-law	0.73	0.89	0.91	0.76
平均度 Average degree	6.99	3.15	2.58	5.30
平均聚类系数 Average clustering coefficient	0.36	0.28	0.27	0.38
平均路径长度 Average path distance	6.79	8.41	4.93	7.04
正相关比例 Positive correlation ratio	76.49%	65.82%	81.58%	78.75%
模块性 Modularity	0.62	0.83	0.89	0.74
模块数 The module number	36	44	46	45

AM 真菌对其土壤理化性质的影响也得到了相同的结果^[19-20]。集约经营毛竹林 AH 处理土壤碱解氮也显著低于 RA 处理 ($P < 0.05$)。虽然在菌根系统中, 植物根系、AM 真菌以及氨氧化微生物可能会竞争土壤中的有效氮素, 但在有根系存在的菌根系统中, 植物根系随时都在进行着更新和分解, 产生氮素归还到土壤^[21], 而在无根系存在的菌丝室中, 氮的来源补充远少于菌根室, 菌丝吸收氮素导致土壤有效氮含量降低, 这可能是导致 RA 处理中土壤碱解氮高于 AH 处理的主要原因。

荧光定量 PCR 结果表明, 毛竹林经营强度对 AOA 基因丰度产生了显著的影响, 对 AOB 的影响不显著, 导致这一结果的原因可能是因为 pH 降低影响了 AOA 的丰度, 相关性分析也显示 AOA 基因

丰度与 pH 显著相关。Nicol 等^[22]发现, AOA 基因丰度随着土壤 pH 的增加而降低 (在 4.9~7.5 之间), 即相较于 AOB 而言 AOA 在自然界中拥有更广泛的生态位, 更适于在酸性土壤条件下生存并且在酸性土壤中发挥的作用更大^[23]。本研究集约经营毛竹林大量的施肥导致土壤 pH 下降, 为 AOA 提供了一个较为适宜的生存条件。研究结果发现不同的分室处理对 AOB 影响显著, 不论是集约经营还是粗放经营, AH 处理 AOB 的基因丰度均显著减少。相反, RA 处理根系和 AM 真菌共存的菌根系统中 AOB 丰度更高。相关性分析显示 pH 极显著地影响了 AOB 的丰度, 并且 AH 处理土壤 pH 变化规律与 AOB 丰度一致。因此, AH 处理 AOB 丰度均显著减少可能是因为 AM 真菌菌丝通过降低 pH 间接地影响了

AOB, 较低的 pH 会降低 AOB 底物的利用效率^[24]。这一结果与 Teutscheroova 等^[7]的盆栽结果一致, AM 真菌与植物共生对 AOA 的丰度没有显著的影响, 但是却显著提高了 AOB 的丰度。除此之外, 在 RA 处理中植物根系与 AM 真菌共生也会使得土壤孔隙度增加, 根系分泌物和菌丝分泌物的双重作用会增加土壤团聚体含量使得土壤更疏松^[25]。鉴于 AOB 为一类好氧氨氧化微生物, 疏松的土壤环境更有利于 AOB 的生存。虽然经营强度和分室处理分别对 AOA 和 AOB 的丰度产生了显著的影响, 但对 AOA 和 AOB 群落结构影响并不显著。Cavagnaro 等^[5]在 2007 年对一有机农场的 AOB 的研究结果也发现, AM 真菌并没有对其群落组成和结构产生显著的影响, 其原因可能是因为研究时间相对较短导致差异性不显著。此外, AOA 和 AOB 的群落结构对土壤理化因子的响应非常复杂, 其群落结构的变化取决于多种因子的综合效应, 这也是本研究中集约经营导致的土壤性质变化仅仅改变了 AOA 和 AOB 的基因丰度, 而对其群落结构并未产生显著影响的可能原因。

近年来, 分子生态网络已经被广泛应用于了解微生物种间交互多样性及其生态系统稳定性^[26]。本研究中对网络节点数 (Total nodes)、连接数 (Total links)、平均度 (Average degree) 的对比分析均发现 AOA 网络中集约经营连接数和平均度大于粗放经营, 说明集约经营毛竹林 AOA 分子生态网络中物种丰富程度、物种交互复杂性高于粗放经营。AOB 网络中, 粗放经营网络节点数、连接数、平均度三项指标的值均大于集约经营, 说明粗放经营毛竹林 AOB 生态网络的物种丰富度、物种交互复杂性优于集约经营, 这也说明了 AOA 和 AOB 在土壤中具有不同的生态位, 对环境的响应具有较大的差异。网络中连接的正负相关性可以用于推断微生物之间的相互关系, 正相关代表生态位一致或共生关系, 微生物共建生物膜或者交换代谢产物, 负相关代表着竞争或捕食^[26]。本研究构建的四个生态网络中, 网络节点连接之间均以正相关为主, 表明 AOA 和 AOB 的微生物之间合作关系大于竞争关系, 并且 AOA 和 AOB 的生态网络均表现出集约经营的正相关关联大于粗放经营, 表明集约经营毛竹林中 AOA 和 AOB 存在更多的共生关系, 而粗放经营毛竹林中氨氧化微生物之间的竞争更为激烈, 可能是由于土壤养分供应少于集约经营。集约经营中氨氧化微生物

之间的互动和共生关系较粗放经营更加紧密, 而粗放经营毛竹林中氨氧化微生物之间的竞争比集约经营激烈, 造成这一结果的原因可能是因为毛竹林集约经营过程中施肥增加了土壤中的氮素含量, 一定程度上缓解了氨氧化微生物之间的养分竞争。

4 结论

无论毛竹林经营强度如何 AM 真菌菌丝均显著降低了土壤 pH, 且在集约经营毛竹林中 AM 真菌菌丝显著降低了土壤碱解氮含量。不同菌根分室处理并未对硝化势产生显著影响, 但经营强度影响显著。集约经营和 AM 真菌菌丝分别对 AOA 和 AOB 基因丰度影响显著, 虽然两者对氨氧化微生物群落结构没有显著影响, 但分子生态网络分析显示集约经营缓解了氨氧化微生物之间的养分竞争。

参考文献 (References)

- [1] Yang M, Li Y F, Li Y C, et al. Effects of intensive management on soil C and N pools and soil enzyme activities in Moso bamboo plantations[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2016, 27(11): 3455—3462. [杨萌, 李永夫, 李永春, 等. 集约经营对毛竹林土壤碳氮库及酶活性的影响[J]. 应用生态学报, 2016, 27(11): 3455—3462.]
- [2] Tian T. Functional gene diversity of ammonia-oxidizing microbes of soil in *Phyllostachys pubescens*[D]. Hangzhou: Zhejiang A & F University, 2011. [田甜. 毛竹林土壤氨氧化微生物功能基因多样性[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2011.]
- [3] Li Y F, Jiang P K, Liu J, et al. Effect of fertilization on water-soluble organic C, N, and emission of greenhouse gases in the soil of *Phyllostachys edulis* stands[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2010, 46(12): 165—170. [李永夫, 姜培坤, 刘娟, 等. 施肥对毛竹林土壤水溶性有机碳氮与温室气体排放的影响[J]. 林业科学, 2010, 46(12): 165—170.]
- [4] Cheng L, Booker F L, Tu C, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi increase organic carbon decomposition under elevated CO₂[J]. Science, 2012, 337(6098): 1084—1087.
- [5] Cavagnaro T R, Jackson L E, Scow K M, et al. Effects of arbuscular mycorrhizas on ammonia oxidizing bacteria in an organic farm soil[J]. Microbial Ecology, 2007, 54(4): 618—626.
- [6] Bukovská P, Bonkowski M, Konvalinková T, et al. Utilization of organic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi—is there a specific role for protists and ammonia oxidizers?[J]. Mycorrhiza, 2018, 28(3): 269—283.

- [7] Teutscherova N, Vazquez E, Arango J, et al. Native arbuscular mycorrhizal fungi increase the abundance of ammonia-oxidizing bacteria, but suppress nitrous oxide emissions shortly after urea application[J]. *Geoderma*, 2019, 338: 493—501.
- [8] Chen Y L, Chen B D, Liu L, et al. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in soil nitrogen cycling[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34 (17): 4807—4815. [陈永亮, 陈保冬, 刘蕾, 等. 丛枝菌根真菌在土壤氮素循环中的作用[J]. *生态学报*, 2014, 34 (17): 4807—4815.]
- [9] Lü Y, Zhou L, Long G Q, et al. Effect of different nitrogen rates on the nitrification potential and abundance of ammonia-oxidizer in intercropping maize soils[J]. *Environmental Science*, 2016, 37 (8): 3229—3236. [吕玉, 周龙, 龙光强, 等. 不同氮水平下间作对玉米土壤硝化势和氨氧化微生物数量的影响[J]. *环境科学*, 2016, 37 (8): 3229—3236.]
- [10] Liu R J. *Mycorrhizology*[M]. Beijing: Science Press, 2007. [刘润进. *菌根学*[M]. 北京: 科学出版社, 2007.]
- [11] Zhang W W, Wang C, Liu M L, et al. Integrated reclamation of saline soil nitrogen transformation in the rhizosphere by earthworms and arbuscular mycorrhizal fungus[J]. *Applied Soil Ecology*, 2019, 135: 137—146.
- [12] Veresoglou S D, Verbruggen E, Makarova O, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi alter the community structure of ammonia oxidizers at high fertility via competition for soil NH_4^+ [J]. *Microbial Ecology*, 2019, 78 (1): 147—158.
- [13] Veresoglou S D, Sen R, Mamolos A P, et al. Plant species identity and arbuscular mycorrhizal status modulate potential nitrification rates in nitrogen-limited grassland soil[J]. *Journal of Ecology*, 2011, 99 (6): 1339—1349.
- [14] Chen Y L, Chen B D, Hu Y J, et al. Direct and indirect influence of arbuscular mycorrhizal fungi on abundance and community structure of ammonia oxidizing bacteria and archaea in soil microcosms[J]. *Pedobiologia*, 2013, 56 (4/5/6): 205—212.
- [15] 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.]
- [16] Chu H Y, Fujii T, Morimoto S, et al. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (2): 485—491.
- [17] Shen Q L. Characteristics and evolution of ammonia-oxidizing and nitrogen-fixing bacteria in moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) forest soils[D]. Hangzhou: Zhejiang A & F University, 2015. [沈秋兰. 毛竹林土壤氨氧化和固氮微生物特征及其演变规律[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2015.]
- [18] Rotthauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (12): 4704—4712.
- [19] Hua J F, Lin X G, Jiang Q. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on arsenic uptake and rhizosphere pH of *Nicotiana tabacum* L.[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2009, 18 (5): 1746—1752. [华建峰, 林先贵, 蒋倩. AM 真菌对烟草砷吸收及根际 pH 的影响[J]. *生态环境学报*, 2009, 18 (5): 1746—1752.]
- [20] He X L, Guo H J, Wang Y Y. Effects of soil moisture and AM fungi on the soil physicochemical property in the rhizosphere of *Astragalus adsurgens*[J]. *Journal of Hebei University: Natural Science Edition*, 2013, 33 (5): 508—513, 519. [贺学礼, 郭辉娟, 王银银. 土壤水分和 AM 真菌对沙打旺根际土壤理化性质的影响[J]. *河北大学学报: 自然科学版*, 2013, 33 (5): 508—513, 519.]
- [21] Yang X. Effects of typical plant root productivity and its decomposition on soil organic carbon and nutrients in southern ningxia[D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A & F University, 2019. [杨轩. 宁南山区典型植物根系生产力及根系分解对土壤有机碳和养分的影响[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2019.]
- [22] Nicol G W, Leininger S, Schleper C, et al. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 (11): 2966—2978.
- [23] Stopnišek N, Gubry-Rangin C, Höfnerle S, et al. Thaumarchaeal ammonia oxidation in an acidic forest peat soil is not influenced by ammonium amendment[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (22): 7626—7634.
- [24] Zhang L M, Hu H W, Shen J P, et al. ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6 (5): 1032—1045.
- [25] Traoré O, Groleau-Renaud V, Plantureux S, et al. Effect of root mucilage and modelled root exudates on soil structure[J]. *European Journal of Soil Science*, 2000, 51 (4): 575—581.
- [26] Shi W L, Jiang R D, Ma T H, et al. Molecular ecological network analysis of sedimental microbial community and its response to environmental factors in different trophic status areas of Taihu Lake[J]. *Journal of Nanjing University: Natural Science*, 2018, 54 (5): 1045—1056. [石文莉, 蒋如东, 马天海, 等. 太湖不同营养水平湖区沉积环境微生物分子生态网络特征及其环境响应分析[J]. *南京大学学报: 自然科学*, 2018, 54 (5): 1045—1056.]

(责任编辑: 卢萍)