

张彬, 文杨, 艾力库提·艾莎, 魏占波. 微生物多样性丧失对稻田表层和底层土壤多功能性的差异化影响[J]. 土壤学报, 2026,
ZHANG Bin, WEN Yang, EYSA Alkut, WEI Zhanbo. Differential Responses of Paddy Soil Multifunctionality in Topsoil and Subsoil to
Microbial Diversity Loss[J]. Acta Pedologica Sinica, 2026,

微生物多样性丧失对稻田表层和底层土壤多功能性的差异化影响*

张彬¹, 文杨¹, 艾力库提·艾莎¹, 魏占波^{2†}

(1. 南京信息工程大学气象灾害预报预警与评估协同创新中心/生态与应用气象学院, 南京 210044; 2. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016)

摘要: 为阐明微生物多样性丧失对稻田土壤多功能性的影响, 以及优势、中等丰度和稀有三类物种的调控作用, 以稻田表层 (0~20 cm) 和底层 (40~60 cm) 土壤为对象, 采用逐步稀释法构建微生物多样性梯度 (D0、D1、D3、D6), 结合高通量定量 PCR 技术测定土壤碳、氮、磷、硫循环相关的功能基因, 通过平均值法与多阈值法定量评价土壤多功能性; 同时利用高通量测序技术分析三类物种的多样性、群落结构和共现网络属性, 并探究其与土壤多功能性的关联。结果表明, 表层和底层土壤多功能性对微生物多样性丧失的响应存在显著差异: 与原始土壤 (D0) 相比, 基于平均值法的计算显示, 不同稀释梯度 (D1、D3、D6) 均显著降低表层土壤多功能性, 其中水稻-休闲 (RF)、水稻-小麦 (RW) 和水稻-紫云英 (RM) 种植制度下的降幅分别为 75.8%~85.8%、74.6%~80.0% 和 59.8%~64.8%, 但各稀释梯度间无显著差异; 而底层土壤多功能性虽存在小幅波动 (变化范围为 0.05~0.28), 但除水稻-紫云英种植制度的 D3 处理外, 其余稀释梯度与原始土壤均无显著差异。多阈值法分析结果进一步验证了该规律。尽管表层和底层土壤中三类物种的多样性均随稀释梯度显著下降, 但稀有物种的群落结构未发生显著改变。共现网络分析表明, 随多样性丧失程度增加, 表层土壤三类物种的网络属性 (度数、聚类系数) 显著下降; 而底层土壤中, 稀有物种的网络属性在稀释前后无显著差异。相关分析进一步发现, 表层土壤多功能性与三类物种的多样性、群落结构及网络属性均显著相关, 而底层土壤多功能性主要与共现网络中稀有物种的度数和聚类系数呈正相关, 表明微生物多样性丧失情况下, 稀有物种在底层土壤多功能性的维持和调控中发挥重要作用。综上, 微生物多样性丧失会引起表层和底层土壤多功能性的差异化响应, 这与不同土层微生物特性 (物种多样性、群落结构及共现网络) 的调控作用密切相关。

关键词: 土壤多功能性; 稀释梯度; 种植制度; 稀有物种; 共现网络

中图分类号: S154 文献标志码: A

Differential Responses of Paddy Soil Multifunctionality in Topsoil and Subsoil to Microbial Diversity Loss

ZHANG Bin¹, WEN Yang¹, EYSA Alkut¹, WEI Zhanbo^{2†}

(1. Collaborative Innovation Center on Forecast and Evaluation of Meteorological Disasters (CIC-FEMD)/School of Ecology and Applied Meteorology, Nanjing University of Information Science & Technology, Nanjing 210044, China; 2. Institute of Applied Ecology, Chinese

*国家重点研发计划课题 (2022YFD1700604) 和国家自然科学基金项目 (42577334) 资助 Supported by National Key Research and Development Program of China (No. 2022YFD1700604) and National Natural Science Foundation of China (No. 42577334)

†通讯作者 Corresponding author, E-mail: huanke217@163.com

作者简介: 张彬 (1984—), 男, 山西朔州人, 博士研究生, 副教授, 主要研究领域为土壤微生物生态。E-mail: bzhang@nuist.edu.cn

收稿日期: 2025-11-18; 收到修改稿日期: 2026-03-27; 网络首发日期 (www.cnki.net):

Abstract: 【Objective】 This study aimed to examine the impacts of microbial diversity loss on paddy soil multifunctionality, and elucidate the regulatory roles of abundant, moderate, and rare microbial taxa. 【Method】 Microbial diversity gradients (D0, D1, D3, D6) were established via the dilution-to-extinction approach and functional genes involved in C, N, P, and S cycling in topsoil (0-20 cm) and subsoil (40-60 cm) of a paddy field were quantified using high-throughput quantitative PCR. Soil multifunctionality was assessed using both the averaging and multi-threshold methods. High-throughput sequencing was employed to analyze the diversity, community structure, and co-occurrence network properties of the three microbial taxa and their relationships with soil multifunctionality. 【Result】 Results showed that the responses of soil multifunctionality in topsoil and subsoil to microbial diversity loss were different. Compared with the original soil (D0), the averaging method indicated that different dilution levels (D1, D3, D6) significantly reduced topsoil multifunctionality. The reduction rates were 75.8%-85.8%, 74.6%-80.0%, and 59.8%-64.8% under the rice-fallow (RF), rice-wheat (RW), and rice-milk vetch (RM) cropping systems, respectively, with no significant differences among the dilution levels. In contrast, although subsoil multifunctionality showed minor fluctuations (ranging from 0.05 to 0.28), no significant differences were observed between different dilution levels and the original soil except for the D3 treatment under the RM cropping system. This pattern was further verified by the multi-threshold method. Although the diversity of all three taxa significantly decreased with increasing dilution, the community structure of rare taxa remained relatively stable. Co-occurrence network analysis revealed that topological properties (degree, clustering coefficient) of all three taxa decreased significantly in topsoil under dilution. In contrast, rare taxa in subsoil maintained stable network properties despite dilution. Correlation analysis further indicated that topsoil multifunctionality was closely linked to the diversity, composition, and network topology of all three microbial taxa, while subsoil multifunctionality was primarily associated with the degree and clustering coefficient of rare taxa, which underscores the key role of rare taxa in sustaining subsoil multifunctionality in the face of microbial diversity loss. 【Conclusion】 Microbial diversity loss induces differential responses of soil multifunctionality in topsoil and subsoil, which is closely related to the diversity, community structure, and co-occurrence networks of microbial subcommunities in different soil layers.

Key words: Soil multifunctionality; Dilution gradient; Cropping system; Rare taxa; Co-occurrence network

微生物是生物地球化学循环的核心驱动者，在土壤有机质分解、养分（碳、氮、磷、硫）循环、温室气体调控等多种生态过程的协同维持（土壤多功能性）中扮演关键角色^[1]。然而，全球范围内土地利用集约化、气候变化等人为与自然干扰的加剧，正导致土壤微生物多样性呈现持续下降趋势^[2]，其对土壤多功能性的潜在影响已成为土壤生态学领域关注的热点问题^[3]。大多数研究表明，微生物多样性丧失会造成不同程度的土壤多功能性的下降，并随着时间推移破坏其稳定性^[1]。例如，Delgado-Baquerizo 等^[4]基于全球 78 个干旱区和苏格兰 179 个地点的大型数据库证实，土壤微生物多样性与陆地生态系统多功能性呈显著正相关，任何程度的微生物多样性丧失均会直接削弱气候调节与土壤肥力维持等生态系统服务功能。Wagg 等^[1]在草地生态系统的研究进一步指出，微生物群落的物种丰富度是支撑多功能性协同实现的关键。马静等^[5]通过不同复垦年限土壤的对比研究也发现，微生物多样性是驱动土壤多功能性恢复的核心因素。然而，由于土壤环境的复杂性，人们对于土壤微生物多样性丧失后土壤功能响应的认识仍较为有限，且已有关于微生物多样性丧失与土壤功能之间关系的研究，无论是基于全球尺度还是区域定位试验^[1, 4]，均主要聚焦表层土壤，对底层土壤微生物多样性丧失如何影响土壤多功能性仍缺乏深入认识。底层土壤在有机质含量、养分有效性及微生物群落组成等方面均与表层土壤存在显著差异^[6]。因而，底层土壤多功能性对微生物多样性丧失的响应模式和潜在机制可能与表层截然不同^[7]。目前，关于底层土壤多功能性对微生物多样性丧失的响应特征与关键调控因素仍知之甚少，成为制约全面理解土壤多功能性维持机制的重要知识缺口。

土壤多功能性与微生物多样性的关联并非简单的线性关系，而是受到微生物群落内部结构（尤

其是优势与稀有物种的功能分化与互作关系)的显著调控^[8]。已有研究表明,优势物种(高丰度类群)凭借生态位宽度广、代谢多功能性强的特点,能够高效利用多种环境资源,在驱动生物地球化学循环中表现出极高的活性^[9],其多样性丧失通常直接导致土壤多功能性显著下降。相比之下,稀有物种(低丰度类群)虽具有特定生境偏好、较窄的生态位宽度及有限的竞争能力,却蕴含丰富的遗传和代谢谱系^[10],不仅能够快速响应环境干扰,其内在的高多样性还可通过功能冗余和互补效应,增强生态系统功能的恢复力与长期稳定性^[11-12]。此外,土壤微生物群落内部复杂的种间互作网络是多功能性维持的重要调控枢纽。在多年恢复土壤中,优势物种作为共现网络的模块核心,通过广泛的种间共现关系整合功能资源,成为土壤多功能性的关键贡献者^[8]。而 Wang 等^[13]在酸性土壤中的研究发现,稀有物种作为网络关键类群,对土壤多功能性的调控作用更为突出。尽管国内外研究已揭示了优势与稀有物种的功能差异,但现有研究尚未明确两类物种在不同土层中对微生物多样性丧失的响应规律,且其通过多样性特征、群落组成与共现网络属性调控土壤多功能性的机制仍不清晰,限制了对土壤多功能性垂直分异维持机制的全面理解。

基于此,本研究以稻田表层与底层土壤为研究对象,采用逐步稀释法构建微生物多样性梯度,结合高通量测序与高通量定量 PCR 技术,探究微生物多样性丧失对表层和底层土壤多功能性的影响,明确优势与稀有物种维持土壤多功能性的差异化调控机制。本研究的科学问题:(1) 稀释驱动的微生物多样性丧失对表层和底层土壤多功能性的影响是否存在显著差异?(2) 优势物种与稀有物种在不同土层中,通过何种机制(多样性特征、群落结构、共现网络属性)调控土壤多功能性? 相关研究有助于深入认识土壤微生物多样性丧失与土壤功能维持之间的关系及内在调控机制。

1 材料与方 法

1.1 样地描述与土壤采集

试验样地位于江苏省淮安市盐河镇(33°19' N, 119°30' E),该地区属于亚热带季风气候,年均气温 14.4 °C,年均降水量 956 mm。土壤类型为淹育型水稻土,土壤质地组成为砂粒 82 g·kg⁻¹、粉粒 714 g·kg⁻¹、黏粒 204 g·kg⁻¹^[14]。

试验样地布置于 2020 年,共设置 3 种植制度,即水稻-休闲(RF)、水稻-小麦(RW)、水稻-紫云英(RM)。每种制度设 3 次重复,每个重复小区长 6 m,宽 5 m,采用随机区组设计。水稻于 6 月下旬移栽,10 月下旬收获;小麦于 11 月上旬播种,6 月上旬收获;水稻和小麦秸秆均还田。紫云英于 11 月上旬播种,在盛花期翻压还田。水稻季施肥量为: N 200 kg·hm⁻²、P₂O₅ 90 kg·hm⁻²、K₂O 150 kg·hm⁻²;小麦季施肥量为: N 100 kg·hm⁻²、P₂O₅ 60 kg·hm⁻²、K₂O 60 kg·hm⁻²;紫云英季不施肥。

于 2023 年 10 月水稻收获后,在每个小区按 S 形五点混合采样法采集 0~20 cm(表层)和 40~60 cm(底层)的土壤,共获得 18 个原始土壤样品(3 种植制度×3 次重复×2 个土层)。去除样品中可见植物残体与砾石,过 2 mm 筛后在-4 °C 冰箱中保存,用于后续室内培养试验。不同处理土壤的基本理化性质见 Zhang 等^[15]。

1.2 试验设计

将每个原始土壤分为两部分:一部分采用伽马射线灭菌(50 kGy),另一部分用于构建土壤微生物多样性梯度。通过逐步稀释法构建土壤微生物多样性梯度。具体地,在 500 mL 三角瓶中加入 50 g(干物质量)原始土壤和 350 mL 高压灭菌去离子水,涡旋振荡 5 min;取 100 mL 该土壤悬浮液转移至 900 mL 高压灭菌去离子水中,再次涡旋振荡 5 min,得到 10⁻¹ 稀释液(D1);重复上述操作,依次制备 10⁻³(D3)和 10⁻⁶(D6) 稀释液^[16]。

将 50 g 灭菌土壤加入 120 mL 棕色瓶中,再加入 2 mL 不同浓度稀释液,共 54 个培养瓶;另设 18 个含原始土壤(50 g)的培养瓶作为对照(D0)。所有培养瓶均用透气封口膜密封,置于 25 °C 培养 8 周。培养期间,表层和底层土壤的含水量分别维持在 220 g·kg⁻¹和 180 g·kg⁻¹(均相当于田间持

水量的 60%)。培养结束后采集土壤样品,用于土壤微生物多样性及功能基因测定。

1.3 土壤微生物多样性测定

采用 FastDNA[®]土壤 DNA 提取试剂盒 (MP Biomedicals 公司, 美国), 按照试剂盒说明书提取土壤样品中 DNA。通过 1% (*m/v*) 琼脂糖凝胶电泳评估 DNA 质量, 采用分光光度计 (ThermoFisher Scientific 公司, 美国) 测定 DNA 浓度。在 ABI GeneAmp[®] 9700 PCR 仪 (ThermoFisher Scientific 公司, 美国) 上, 使用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 扩增样品中细菌 16S rRNA 基因的 V3~V4 区。PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 3 min; 随后 27 个循环 (95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s); 最后 72 °C 稳定延伸 10 min。PCR 反应体系 (20 μ L) 包括: 4 μ L 5 \times FastPfu 缓冲液、2 μ L 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs、0.8 μ L 上下游引物 (5 μ mol \cdot L⁻¹)、0.4 μ L FastPfu DNA 聚合酶、10 ng 模板 DNA。

采用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen Biosciences 公司, 美国) 对扩增产物进行回收纯化, 随后在 Illumina PE300 测序平台 (Illumina 公司, 美国) 上进行测序。原始序列已上传至美国国家生物技术信息中心数据库 (PRJNA1208660)。使用 DADA2 工具对数据进行质量过滤与拼接, 生成扩增子序列 (ASVs) [17]。在 Qiime2 软件中, 基于 Silva 数据库对每个 ASVs 进行物种分类注释。从 72 个土壤样品中共获得 2 655 825 条高质量序列, 将细菌群落测序深度标准化为每个样品 30 870 条序列。随后, 参考 Liang 等 [18] 的分类标准, 将所有 ASVs 按照相对丰度划分为三类: 优势物种 (在所有样品中相对丰度均大于等于 1%)、中等丰度物种 (在所有样品中相对丰度介于 0.01%~1%) 和稀有物种 (在所有样品中相对丰度均小于等于 0.01%), 分别计算三类物种的香农 (Shannon) 指数, 作为对应微生物多样性的表征指标。

1.4 土壤多功能性评价与计算

为评价土壤多功能性, 本研究首先采用高通量定量 PCR 方法 [19], 对参与土壤碳、氮、磷、硫循环的微生物功能基因进行定量, 以表征土壤的功能潜力 [20]。这些基因包括: (1) 碳循环相关基因: 碳降解基因 (*apu*、*sag*、*abfA*、*manB*、*xylA*、*cex*、*chiA*、*glx*、*lig*、*mnp*)、碳固定基因 (*smtA*、*accA*、*acsA*、*acsE*、*aclB*、*korA*、*acsB*、*frdA*、*rbcL*、*pccA*、*mct*、*mcrA*); (2) 氮循环相关基因: 氮矿化基因 (*gdhA*)、硝化作用基因 (*amoA1*、*amoA2*、*amoB*)、反硝化作用基因 (*narG*、*nirK1*、*nirK2*、*nirK3*、*nirS1*、*nirS2*、*nirS3*、*nosZ1*、*nosZ2*)、氨化作用基因 (*ureC*)、氮固定基因 (*nifH*); (3) 磷循环相关基因: 有机磷矿化基因 (*bpp*、*phnK*、*phoD*、*phoX*)、无机磷溶解基因 (*gcd*、*pqqC*)、无机磷水解基因 (*ppx*); (4) 硫循环相关基因: 硫氧化基因 (*soxY*、*yedZ*)、硫还原基因 (*apsA*、*dsrA*、*dsrB*)。定量 PCR 反应采用 20 μ L 体系, 具体组成如下: 引物 (0.5 μ mol \cdot L⁻¹)、Premix Ex Taq 酶、DNA 模板 (5 ng \cdot μ L⁻¹)。反应程序设置为: 95 °C 预变性 10 min; 随后 40 个循环 (95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s)。循环结束后采用 WaferGen 软件进行熔解曲线分析, 以验证扩增产物特异性。基于标准曲线法计算各功能基因的绝对拷贝数, 确保定量结果的准确性。

土壤多功能性的计算采用平均值法和多阈值法两种方法 [3]。平均值法: 为消除不同功能基因拷贝数数量级差异, 先对所有功能基因的绝对拷贝数进行 min-max 数据标准化 (0~1 之间), 再计算标准化后所有基因拷贝数的算术平均值, 作为该方法下的土壤多功能性指数; 多阈值法: 设定 1%~99% 区间内的所有整数阈值 (间隔 1%), 对每个阈值, 统计“绝对拷贝数达到该阈值的功能基因数量”占“总功能基因数量”的比例, 该比例即为对应该阈值下的土壤多功能性指数, 以全面反映土壤在不同功能水平下的多功能性表现。

1.5 统计分析

本研究所有统计分析均基于 R 语言 (version 4.5.0) 完成。对表层和底层土壤分别进行两因素方差分析, 考察稀释梯度和种植制度对土壤多功能性和物种多样性的影响, 采用图基检验 (Tukey's HSD) 进行多重比较。分别采用夏皮罗-威尔克检验 (Shapiro-Wilk) 和莱文检验 (Levene's) 考察数据的正态分布和方差齐性假设。基于 Bray-Curtis 距离矩阵, 通过主坐标分析 (PCoA) 展示土壤功能基因组成和微生物群落组成的差异; 采用置换多元方差分析 (PERMANOVA) 量化上述组成差异的

显著性。采用皮尔逊 (Pearson) 相关分析, 探究土壤多功能性与微生物特性之间的相关关系。

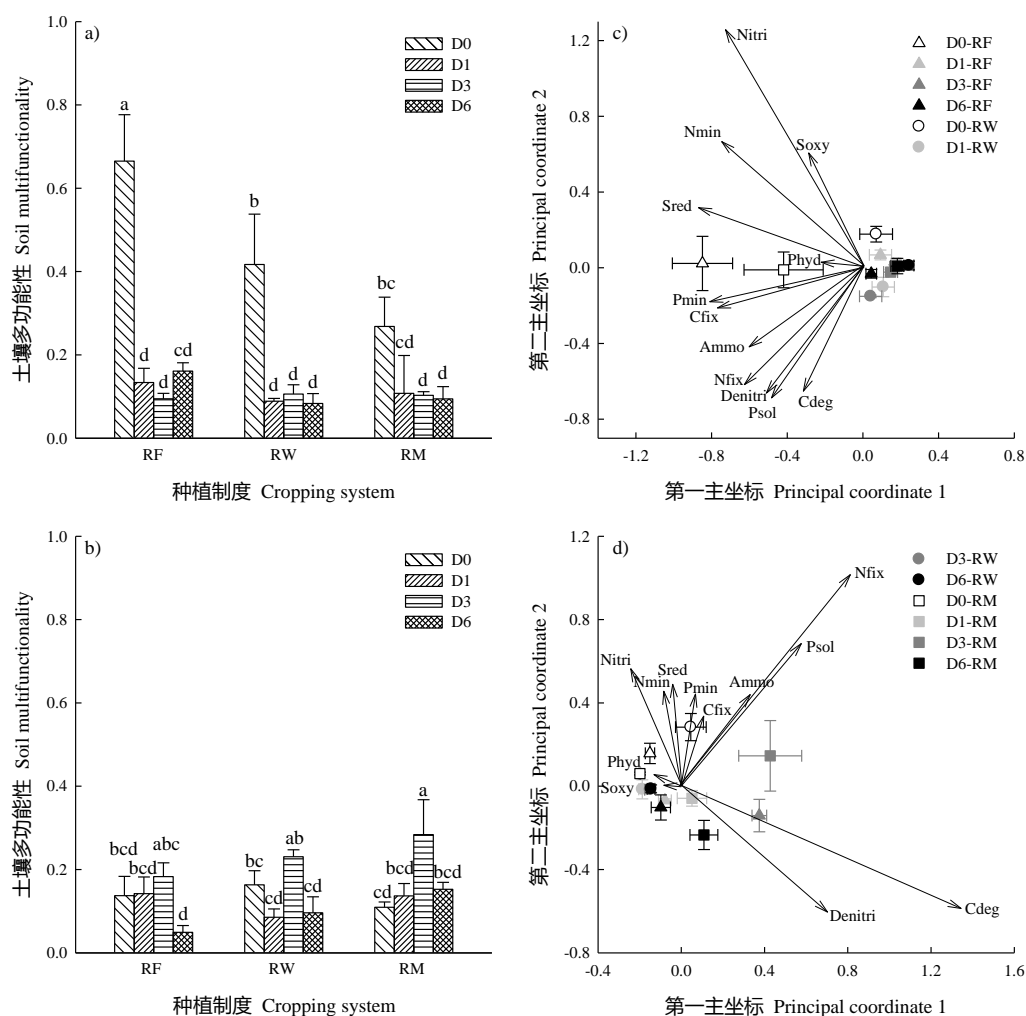
基于优势物种、中等丰度物种及稀有物种的相对丰度数据, 采用 SparCC 分析法, 通过 R 语言 “SpiecEasi” 包构建三类物种的微生物共现网络^[21]。为保证网络可靠性, 仅保留 SparCC 相关系数绝对值大于 0.3 且 $P < 0.05$ 的显著相关性关系。通过 R 语言 “igraph” 包计算共现网络中每个节点的关键拓扑属性, 包括度数和聚类系数。采用 Gephi 软件对共现网络进行可视化, 其中, 节点代表不同物种, 边代表物种间的显著相关性。

2 结果

2.1 土壤多功能性

基于平均值法分析微生物多样性丧失对土壤多功能性的影响, 发现表层与底层土壤呈现出不同的响应特征 (图 1)。表层土壤中 (0~20 cm), 与原始土壤 (D0) 相比, 稀释处理均显著降低土壤多功能性 ($P < 0.05$), 其中水稻-休闲 (RF)、水稻-小麦 (RW) 和水稻-紫云英 (RM) 种植制度下的降幅依次为 75.8%~85.8%、74.6%~80.0% 和 59.8%~64.8% ($P < 0.05$), 但不同稀释梯度 (D1、D3、D6) 之间无显著差异 ($P > 0.05$, 图 1a)。主坐标分析显示, 第一轴解释了功能潜力总变异的 78.5%, 且多数土壤功能潜力在该轴上载荷较高, 表明表层土壤多功能性的显著下降与多数土壤功能潜力降低密切相关 (图 1c)。底层土壤中 (40~60 cm), 土壤多功能性对稀释处理的响应整体不敏感, 除 RM 种植制度的 D3 处理外, 其余所有稀释梯度下的土壤多功能性与 D0 均无显著差异 ($P > 0.05$, 图 1b)。主坐标分析表明, 第一、二轴分别解释功能潜力总变异的 45.1% 和 22.3%, 其中, 碳降解 (Cdeg)、氮固定 (Nfix)、反硝化 (Denitri) 和无机磷溶解潜力 (Psol) 为第一轴的主要贡献因子 (图 1d)。

为验证上述结果, 进一步采用多阈值法分析表层和底层土壤中稀释梯度与多功能性的关系。结果显示: 表层土壤中, 随着稀释梯度增加, 达到所测功能最大值某一阈值的功能数量显著下降 (图 2a), 这与增加单位多样性后土壤功能数量在中间阈值显著增加的趋势一致 (图 2c); 而底层土壤中, 随稀释梯度增加, 达到所测功能最大值某一阈值的功能数量变化较为平缓 (图 2b), 这种趋势也体现在整个阈值范围内增加单位多样性后土壤功能数量变幅较小的结果中 (图 2d)。



注: D0、D1、

D3 和 D6 分别为原始土壤、 10^{-1} 、 10^{-3} 和 10^{-6} 稀释梯度; RF、RW 和 RM 分别为水稻-休闲、水稻-小麦和水稻-紫云英; Cdeg, 碳降解潜力; Cfix, 碳固定潜力; Nmin, 氮矿化潜力; Nitri, 硝化作用潜力; Denitri, 反硝化作用潜力; Ammo, 氨化作用潜力; Nfix, 氮固定潜力; Pmin, 有机磷矿化潜力; Psol, 无机磷溶解潜力; Phyd, 无机磷水解潜力; Soxy, 硫氧化潜力; Sred, 硫还原潜力。不同字母表示处理间显著差异 ($P < 0.05$)。表层土壤指 0~20 cm, 底层土壤指 40~60 cm。下同。Note: D0, D1, D3, and D6 represent undiluted original soil, 10^{-1} , 10^{-3} , and 10^{-6} dilution levels; RF, RW, and RM represent rice-fallow, rice-wheat, and rice-milk vetch cropping systems; Cdeg, C degradation potential; Cfix, C fixation potential; Nmin, N mineralization potential; Nitri, nitrification potential; Denitri, denitrification potential; Ammo, ammonification potential; Nfix, N fixation potential; Pmin, P mineralization potential; Psol, inorganic P solubilization; Phyd, inorganic P hydrolysis; Soxy, S oxidation potential; Sred, S reduction potential. Different letters indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$). Topsoil refers to the 0-20 cm layer, and subsoil refers to the 40-60 cm layer. The same below.

图 1 稀释梯度和种植制度对表层 (a) 与底层 (b) 土壤多功能性的影响及表层 (c) 与底层 (d) 土壤功能基因组成的主坐标分析

Fig. 1 Effect of dilution level and cropping system on soil multifunctionality in topsoil (a) and subsoil (b), and corresponding principal coordinate analysis plots of functional gene composition in topsoil (c) and subsoil (d)

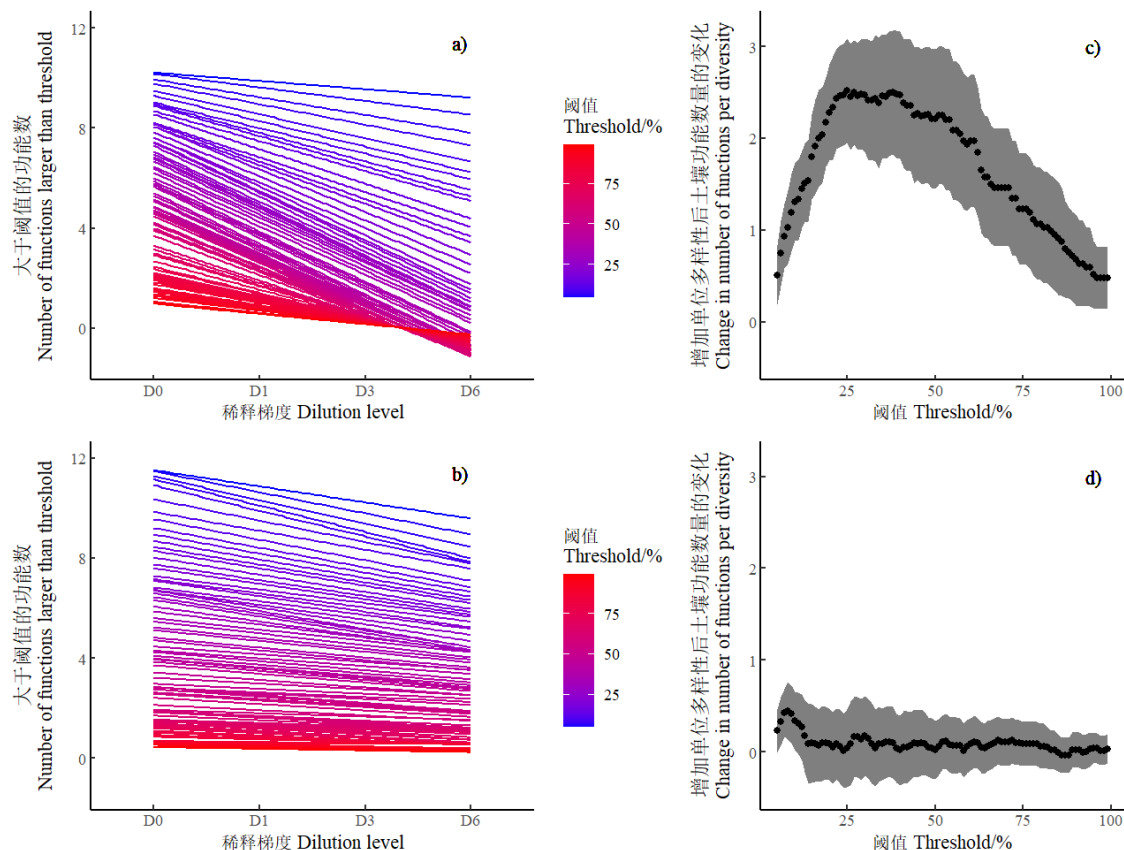


图2 稀释梯度与表层 (a) 和底层 (b) 土壤中达到所测功能最大值某一阈值的功能数量的关系及对应斜率 (c. 表层, d. 底层)

Fig. 2 Relationships between dilution level and the number of functions reaching a certain threshold relative to the maximum observed value in topsoil (a) and subsoil (b), and corresponding slopes (c, d)

2.2 微生物多样性和共现网络

为探究不同微生物类群在维持土壤多功能性中的作用, 本研究依据所有样品中 ASVs 的相对丰度, 将土壤微生物群落划分为不同亚类。其中, 841 个 ASVs 被划分为优势物种 (占总 ASVs 的 1.8%), 17 282 个 ASVs 为中等丰度物种 (占 36.5%), 29 211 个 ASVs 为稀有物种 (占 61.7%)。基于香农指数分析三类物种的多样性特征, 发现稀释处理显著降低三类物种的微生物多样性, 但降低幅度因稀释梯度和土层不同存在差异 (图 3)。表层土壤中, 优势和中等丰度物种的多样性对稀释梯度响应显著: 与 D0 相比, D1、D3 处理下多样性显著下降且降幅一致, D6 处理下多样性显著低于 D1、D3 处理 ($P < 0.05$, 图 3a, 图 3c); 稀有物种的多样性在同一种植制度下的不同稀释梯度间无显著差异, 但 RM 种植制度的多样性显著高于 RW 种植制度 ($P < 0.05$, 图 3e)。底层土壤中, D1、D3 和 D6 处理对三类物种多样性的降低幅度基本一致, 且所有种植制度间无显著差异 ($P > 0.05$, 图 3b, 图 3d, 图 3f)。

进一步通过主坐标分析揭示了三类物种群落组成的差异化响应规律 (图 4): 优势和中等丰度物种的群落组成受稀释梯度显著调控, 无论表层还是底层土壤, 第一主坐标均主要体现原始土壤 (D0) 与稀释处理 (D1、D3、D6) 的群落组成差异 ($P < 0.05$, 图 4a~图 4d), 第二主坐标主要区分不同稀释梯度间的差异 ($P < 0.05$), 而种植制度对二者群落组成无显著影响 ($P > 0.05$); 稀有物种的群落组成则未受稀释梯度和种植制度的显著影响 ($P > 0.05$, 图 4e, 图 4f)。

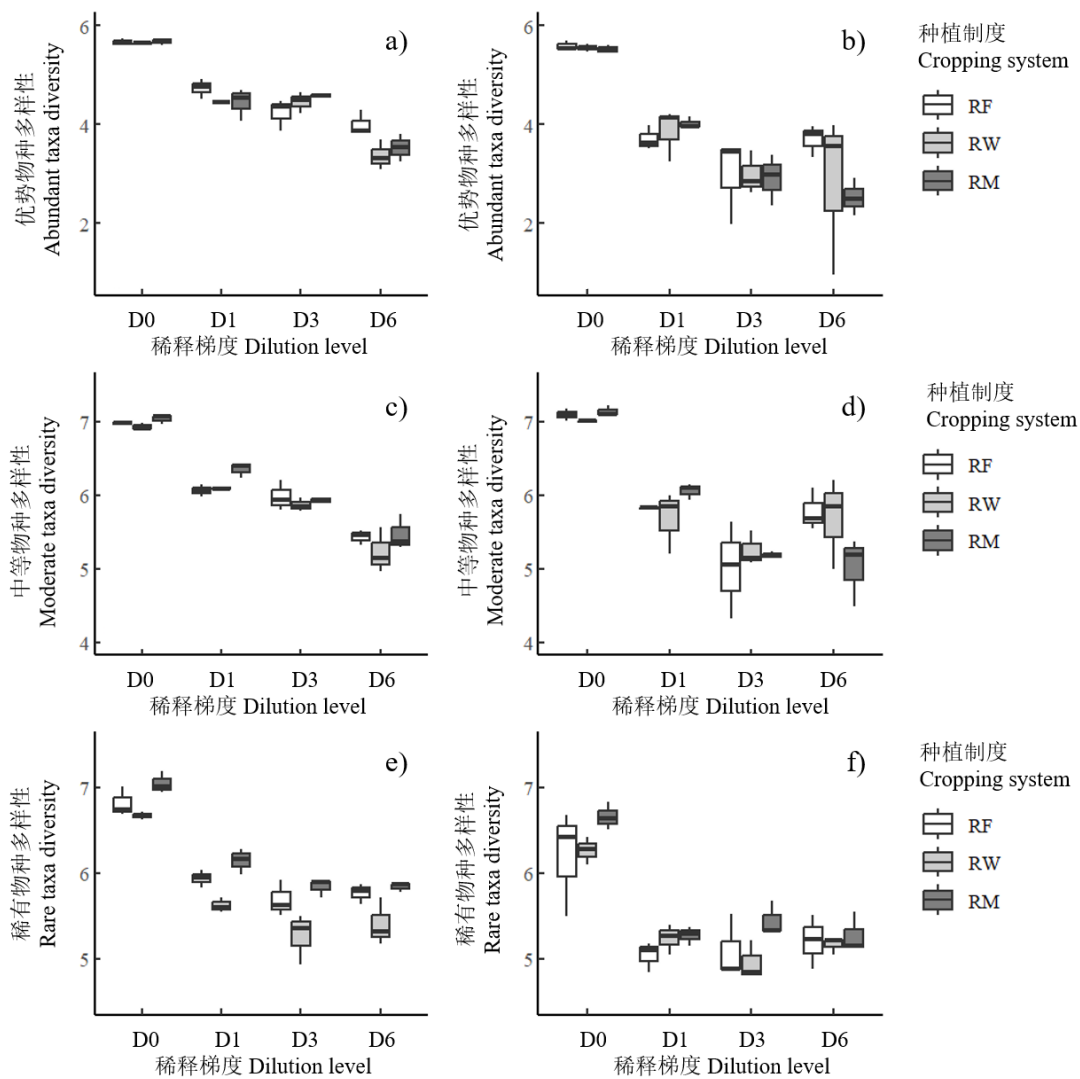
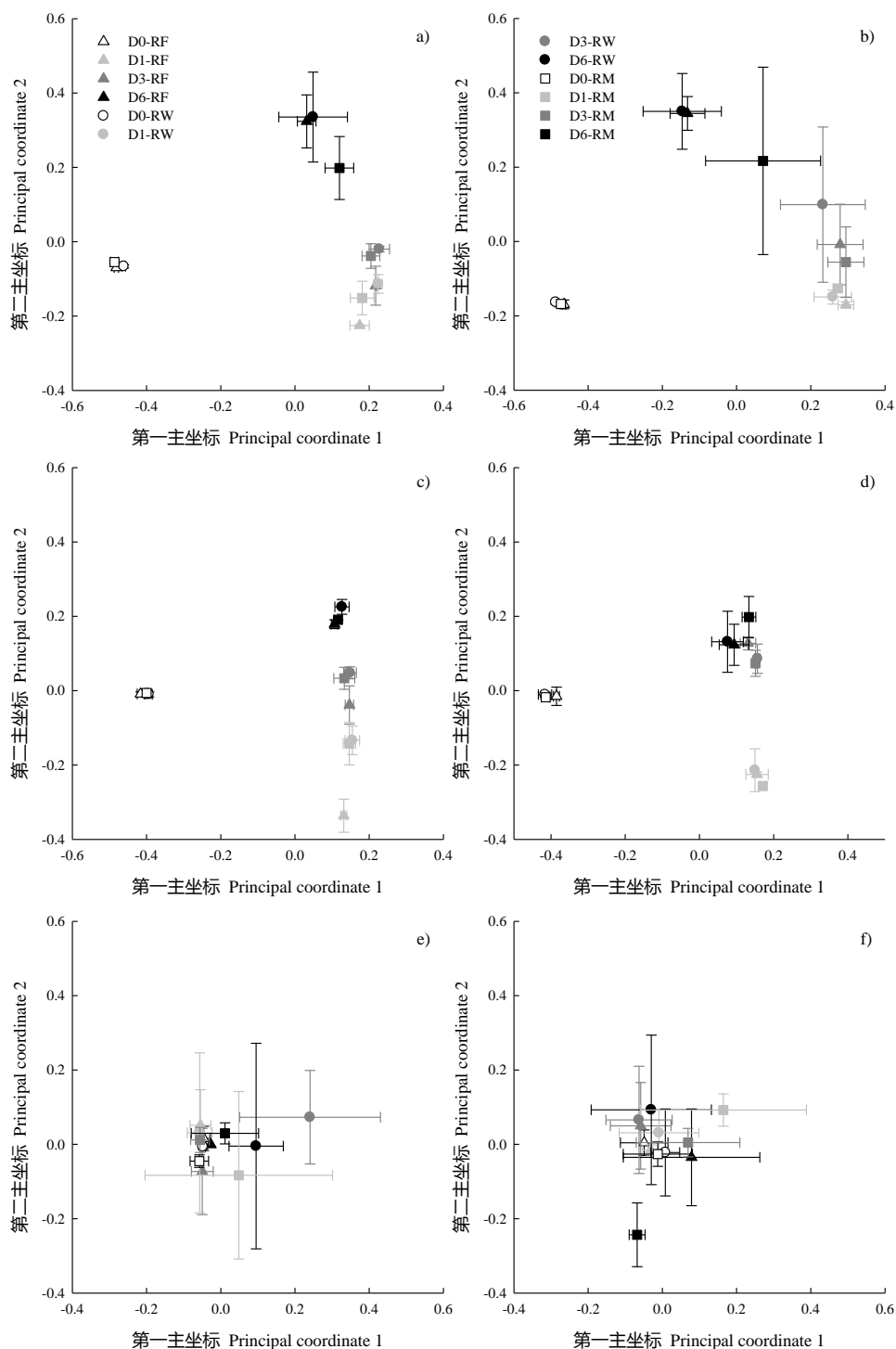


图3 不同稀释梯度和种植制度下表层 (a, c, e) 与底层 (b, d, f) 土壤中优势物种、中等丰度物种和稀有物种的多样性

Fig. 3 Diversity of abundant, moderate, and rare taxa in topsoil (a, c, e) and subsoil (b, d, f) under different dilution levels and cropping systems



注：a、b 对应优势物种的表层与底层群落组成；c、d 对应中等丰度物种的表层与底层群落组成；e、f 对应稀有物种的表层与底层群落组成。Note: a, b, community composition of abundant taxa at topsoil and subsoil; c, d, community composition of moderate taxa in topsoil and subsoil; e, f, community composition of rare taxa in topsoil and subsoil.

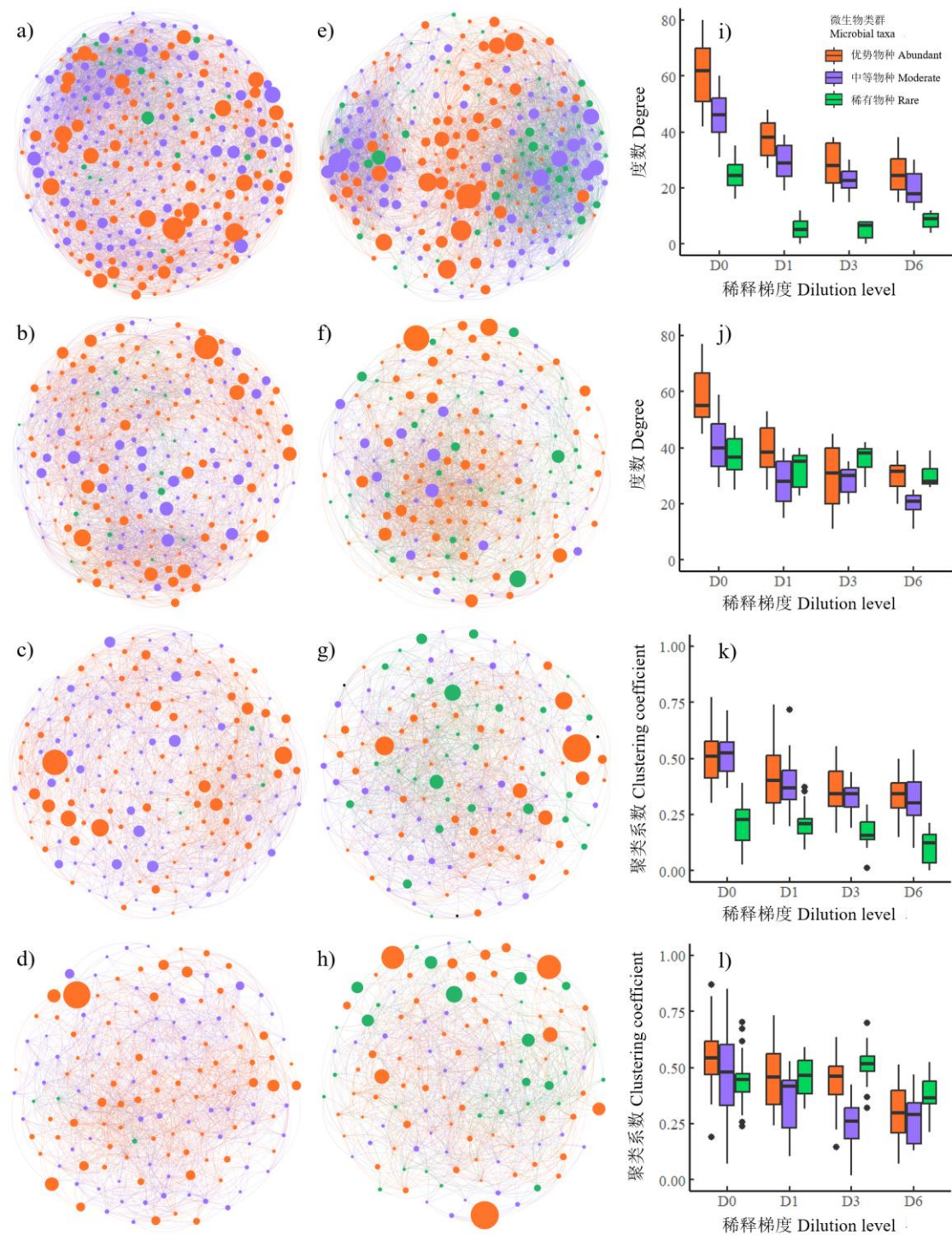
图 4 不同稀释梯度和种植制度下表层与底层土壤中优势物种、中等丰度物种和稀有物种群落组成的主坐标分析

Fig. 4 Principal coordinate analysis of community composition of abundant, moderate, and rare taxa in topsoil and subsoil under different dilution levels and cropping systems

共现网络分析表明，微生物共现网络的节点组成、度数和聚类系数均呈现显著的土层与物种类群差异（图 5）。节点组成上，表层和底层土壤的共现网络节点均随稀释梯度增加逐步减少，但物种

占比变化存在土层差异。原始土壤中，表层土壤微生物共现网络含 310 个节点，三类物种（优势、中等丰度、稀有）的节点数占比依次为 43.6%、50.0% 和 6.4%（图 5a）；底层土壤微生物共现网络含 268 个节点，三类物种的节点数占比依次为 41.4%、39.6% 和 19.0%（图 5e）。经稀释处理后，表层土壤中优势物种占比升至 52.5%~53.0%，中等丰度物种占比降至 40.0%~41.3%，稀有物种占比维持在 6.2%~7.0%（图 5b~图 5d）；底层土壤中优势物种占比升至 41.8%~53.3%，中等丰度物种占比降至 25.6%~35.5%，稀有物种占比提升至 21.1%~25.0%（图 5f~图 5h）。

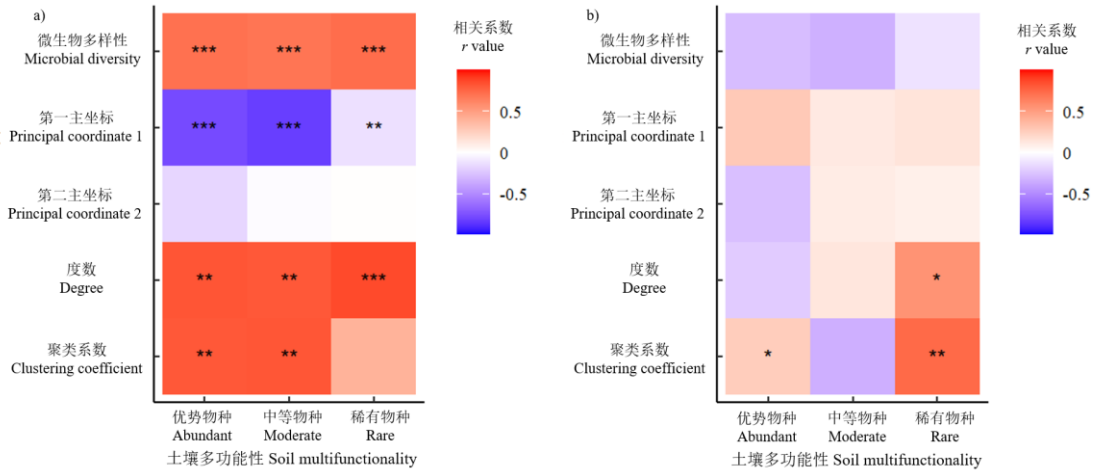
网络拓扑属性上，度数和聚类系数呈现相似的变化趋势。优势物种和中等丰度物种的度数，在表层与底层土壤中均随稀释梯度增加显著下降（ $P < 0.05$ ）；稀有物种的度数仅在表层土壤中随稀释梯度增加显著降低（ $P < 0.05$ ），底层土壤中无显著差异（ $P > 0.05$ ，图 5i，图 5j）。聚类系数方面，表层和底层土壤中优势物种、中等丰度物种的聚类系数随稀释梯度增加呈逐步下降趋势，而稀有物种的聚类系数在表层与底层土壤中均未随稀释梯度发生显著变化（ $P > 0.05$ ，图 5k，图 5l）。此外，底层土壤中稀有物种的度数与聚类系数随稀释梯度增加，逐渐高于中等丰度物种。



注: a~d, 表层土壤共现网络, 分别对应稀释梯度 D0、D1、D3、D6; e~h, 底层土壤共现网络, 分别对应稀释梯度 D0、D1、D3、D6; i、j 分别对应表层与底层土壤中三类物种的度数; k、l 分别对应表层和底层土壤中三类物种的聚类系数。Note: a-d, co-occurrence networks in topsoil, corresponding to D0, D1, D3, and D6, respectively; e-h, co-occurrence networks in subsoil, corresponding to D0, D1, D3, and D6, respectively; i, j, degree of the three taxa groups in topsoil and subsoil, respectively; k, l, clustering coefficient of the three taxa groups in topsoil and subsoil, respectively.

图 5 不同稀释梯度下表层与底层土壤中优势物种、中等丰度物种及稀有物种的共现网络和关键拓扑属性
Fig. 5 Co-occurrence networks and key topological properties of abundant, moderate, and rare taxa in topsoil and subsoil under different dilution levels

相关分析表明, 表层土壤中, 土壤多功能性与优势、中等丰度和稀有物种的微生物多样性、共现网络度数和聚类系数呈显著正相关, 而与三类物种群落组成在第一主坐标上的得分呈显著负相关 ($P<0.01$, 图 6a); 底层土壤中, 土壤多功能性与稀有物种的共现网络的度数和聚类系数呈显著正相关 ($P<0.05$, 图 6b)。



注: *, **, ***分别代表在 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.001$ 水平上相关性显著。Note: *, ** and *** indicate significant correlation at the levels of $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$, respectively.

图 6 表层 (a) 和底层 (b) 土壤多功能性与优势物种、中等丰度物种及稀有物种的微生物多样性和共现网络属性的相关性

Fig. 6 Correlations between soil multifunctionality and microbial diversity, as well as co-occurrence network properties of abundant, moderate, and rare taxa in topsoil (a) and subsoil (b)

3 讨论

3.1 表层与底层土壤多功能性对微生物多样性丧失的响应特征

本研究通过两种独立的多功能性评价方法, 一致证实稻田土壤多功能性对微生物多样性丧失的响应存在显著的土层差异: 表层土壤表现出高度敏感性, 而底层土壤则呈现出较强的抗干扰能力。平均值法结果显示, 表层土壤经稀释处理后, 三种种植制度下的多功能性均显著下降, 降幅达 60%~86% (图 1a)。主坐标分析进一步揭示, 这种下降与碳、氮、磷、硫循环相关的多数土壤功能潜力的同步降低密切相关 (第一轴解释变异度达 78.5%, 图 1c), 意味着表层土壤多功能性的维持高度依赖微生物群落对多种生态过程的协同支撑。该结果与胡漫等^[22]在集约化种植柑橘土壤中的研究结论一致, 该研究发现随着种植年限的增加, 土壤细菌群落多样性显著下降, 直接导致土壤多功能性同步降低。类似地, 长期施肥土壤的研究也证实, 表层土壤微生物多样性与多功能性呈显著正相关, 施肥处理对土壤多功能性的影响主要通过改变微生物多样性实现^[23-24]。值得注意的是, 表层土壤在不同稀释梯度 (D1、D3、D6) 之间多功能性无显著差异 (图 1a), 暗示稀释处理初期 (D1) 已造成核心功能类群的大量丧失, 后续稀释对多功能性的影响有限^[25]。多阈值法进一步验证了该规律: 表层土壤随稀释梯度增加, 达到功能阈值的功能数显著减少, 且中间阈值下单位多样性增加对功能数的提升效应最显著 (图 2a), 表明表层土壤多功能性的维持高度依赖微生物群落的功能完整性。此外, 表层土壤中水稻-紫云英种植制度下的土壤多功能性降幅显著小于水稻-休闲和水稻-小麦种植制度

(图 1a)。该差异的核心原因与水稻-紫云英制度下表层土壤维持了更高的微生物多样性密切相关^[16]。较高的微生物多样性可通过增强功能冗余效应, 缓冲微生物多样性丧失对土壤多功能性的负面冲击^[4, 7]。因此, 将豆科作物 (如紫云英) 纳入水稻种植制度, 可作为应对环境扰动导致的微生物多样性

丧失时，保护土壤整体功能的有效策略。

与表层土壤形成鲜明对比的是，底层土壤多功能性仅在水稻-紫云英种植制度的 D3 处理下出现显著变化，其余稀释梯度均与原始土壤无统计学差异，且多阈值法显示达到功能阈值的功能数量随稀释梯度变化平缓（图 1b，图 2b）。该结果与以往研究中“微生物多样性丧失必然导致多功能性下降”的普遍认知存在差异，说明底层土壤多功能性的维持具有独特的机制。一方面，底层土壤具有有机质含量低、通气性差等理化特征，长期的环境胁迫使微生物群落进化出更强的抗干扰能力^[26]，其功能维持可能更依赖少数耐胁迫类群而非物种丰富度。另一方面，主坐标分析显示底层土壤第一轴仅解释 45.1% 的功能变异，且碳降解、固氮、反硝化和磷溶解潜力是核心贡献因子（图 1d），这些功能可能具有较高的冗余^[27]。Bai 等^[28]对稻田不同深度土壤的研究进一步证实，部分功能微生物类群会在底层土壤中富集，且类群间的网络连接性显著高于表层土壤，这种紧密的种间关联可能是深层土壤多功能性抗性的重要基础。为进一步验证不同类群在土壤多功能性维持中的作用机制，下文将结合优势和稀有物种的多样性和网络属性展开讨论，以期理解深层土壤生态系统的功能稳定性机制提供新视角。

3.2 优势和稀有物种在调控表层和底层土壤多功能性中的作用

表层土壤中，优势物种与中等丰度物种的多样性在 D1、D3 处理下降幅一致，D6 处理降幅进一步扩大（图 3a，图 3c）。这两类物种作为群落中的核心功能执行者，具有广泛的生态位，其多样性的下降直接导致多种生态过程的协同性受损^[8]。此外，主坐标分析显示，与原始土壤相比，稀释处理进一步改变了优势物种和中等丰度物种的群落组成，且不同稀释梯度间也存在明显差异（图 4a，图 4c）。这种群落结构的剧烈重构，进一步破坏了优势与中等丰度物种间的相互作用关系，导致其共现网络的度数与聚类系数随稀释梯度显著下降（图 5i，图 5k），网络连通性和稳定性持续弱化，最终无法支撑多种生态功能的协同维持，引发表层土壤多功能性的显著下降。相关分析结果也证实，表层土壤多功能性与三类物种的多样性、群落组成及网络拓扑属性均呈显著正相关（图 6a），表明表层土壤多功能性的维持是优势、中等丰度和稀有物种网络协同作用的结果，而优势与中等丰度物种的敏感性响应是驱动表层土壤多功能性下降的核心因素。

在底层土壤中，稀释处理虽导致三类物种的多样性均显著下降（图 3b，图 3d，图 3f），但稀有物种的群落结构不受稀释梯度和种植制度的影响（图 4f）。这种群落结构的稳定性为底层土壤多功能性的维持提供了关键保障^[29]。Gu 等^[30]的研究也发现，深层土壤的微生物类群联系更加紧密，其中，稀有物种在网络中占据关键节点位置，其对土壤多功能性的贡献甚至大于优势物种。本研究中，原始土壤中底层稀有物种的节点占比（19.0%）显著高于表层（6.4%），经稀释处理后，底层土壤稀有物种占比进一步提升至 21.1%~25.0%（图 5e~图 5h），而表层土壤稀有物种占比维持在 6.2%~7.0%（图 5a~图 5d）。这表明底层土壤微生物群落对稀有物种的依赖度较高，稀释处理后稀有物种在网络中的核心地位进一步凸显，成为维持网络结构的重要组分。共现网络分析进一步表明，底层土壤中稀有物种的度数和聚类系数均保持相对稳定（图 5j，图 5l），意味着底层土壤种间互作具有较强的抗干扰能力，即使微生物多样性下降，稀有物种与其他物种的连通性和聚集程度仍能维持稳定，这种稳定性通过功能互补效应保障了关键生态过程的持续进行。Chen 等^[29]在有机肥施用土壤中也证实了这一点，即稀有物种（如蓝细菌门 Cyanobacteria 与球囊菌门 Glomeromycota）是驱动土壤多功能性提升的核心因子，与本研究结论相呼应。相关分析结果进一步明确了稀有物种的调控作用：底层土壤多功能性仅与稀有物种的网络度数和聚类系数呈显著正相关（图 6b），证实稀有物种的网络属性是维持底层土壤多功能性的核心因素。该发现突破了以往优势物种主导网络功能的传统认知，与 Chakraborty 等^[31]提出的稀有物种在极端环境下的功能主导假说相契合，丰富了土壤微生物网络调控功能的理论体系，为理解底层土壤生态系统的功能稳定性机制提供了新的科学视角。

本研究采用高通量定量 PCR 技术测定碳、氮、磷、硫循环相关功能基因拷贝数，以此量化土壤多功能性。需说明的是，功能基因拷贝数反映的是土壤功能潜力而非实际功能活性，但已有研究证实，稻田土壤中碳、氮、磷循环功能基因拷贝数与对应酶活性呈显著正相关^[20]，这表明功能基因可

作评估土壤质量与健康管理的指标。此外,本研究为室内控制培养试验,培养条件(恒温、固定含水量、无作物种植)与田间动态环境差异显著,可能导致微生物群落结构及功能响应与田间实际情况存在偏差,而且培养周期较短,难以反映微生物多样性丧失对土壤多功能性的长期生态效应。因此,建议未来开展田间原位试验,设置微生物多样性梯度,并结合长期定位观测,进一步验证本研究结论的普适性。

4 结论

本研究以稻田表层和底层土壤为对象,探究微生物多样性丧失对土壤多功能性的影响及调控机制。结果表明,微生物多样性丧失对稻田表层和底层土壤多功能性的影响存在显著土层差异:表层土壤多功能性显著下降,但水稻-紫云英种植制度的降幅小于水稻-休闲和水稻-小麦制度;底层土壤多功能性多数无显著变化,表现出较强的抗干扰能力。这种差异化响应与不同土层微生物特性密切相关:表层土壤多功能性依赖优势和中等丰度物种多样性与群落结构完整性的协同维持,它们对干扰的高敏感性导致功能显著衰退;而底层土壤中稀有物种的群落结构和网络稳定性不受微生物多样性丧失的显著影响,成为其多功能性维持的核心。本研究揭示了稻田土壤多功能性的分层维持机制,明确了稀有物种在底层土壤中的关键作用,为全球变化背景下稻田土壤生态系统功能保护和精准管理提供了科学依据。

参考文献 (References)

- [1] Wagg C, Bender S F, Widmer F, et al. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality[J]. PNAS, 2014, 111(14): 5266-5270.
- [2] Sun Y, Chen H Y H, Chen X, et al. Rising global temperatures reduce soil microbial diversity over the long term[J]. PNAS, 2025, 122(35): e2426200122.
- [3] Li Y Z, Zhang J Z, Jia J Y, et al. Research progresses on farmland soil ecosystem multifunctionality[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59(5): 1177-1189. [李奕赞, 张江周, 贾吉玉, 等. 农田土壤生态系统多功能性研究进展[J]. 土壤学报, 2022, 59(5): 1177-1189.]
- [4] Delgado-Baquerizo M, Maestre F T, Reich P B, et al. Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems[J]. Nature Communications, 2016, 7: 10541.
- [5] Ma J, Hua Z Y, You Y N, et al. The microbial diversity of reclaimed soil drives its multifunctional variation in the eastern plain mining area[J]. Acta Pedologica Sinica, 2025, 62(2): 528-542. [马静, 华子宜, 尤云楠, 等. 东部平原矿区复垦土壤微生物多样性驱动土壤多功能性变化[J]. 土壤学报, 2025, 62(2): 528-542.]
- [6] Eilers K G, Debenport S, Anderson S, et al. Digging deeper to find unique microbial communities: The strong effect of depth on the structure of bacterial and archaeal communities in soil[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2012, 50: 58-65.
- [7] Peng Z H, van der Heijden M G A, Liu Y, et al. Agricultural subsoil microbiomes and functions exhibit lower resistance to global change than topsoils in Chinese agroecosystems[J]. Nature Food, 2025, 6(4): 375-388.
- [8] Hou Q Q, Xia R, Yuan B D, et al. Divergent community assembly processes and multifunctionality contributions of abundant and rare soil bacteria during a 53-year restoration in the Tengger Desert, China[J]. Communications Biology, 2025, 8: 1376.
- [9] Jiao S, Lu Y H. Abundant fungi adapt to broader environmental gradients than rare fungi in agricultural fields[J]. Global Change Biology, 2020, 26(8): 4506-4520.
- [10] Jousset A, Bienhold C, Chatzinotas A, et al. Where less may be more: How the rare biosphere pulls ecosystems strings[J]. The ISME Journal, 2017, 11(4): 853-862.
- [11] Xiong C, He J Z, Singh B K, et al. Rare taxa maintain the stability of crop mycobiomes and ecosystem functions[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(4): 1907-1924.
- [12] Chen W Q, Wang J Y, Zhang Z X, et al. Number of global change factors alters the relative roles of abundant and rare microbes in

- driving soil multifunctionality resistance[J]. *Current Biology*, 2025, 35(2): 373-382.
- [13] Wang C, Guo L, Shen R F. Rare microbial communities drive ecosystem multifunctionality in acidic soils of Southern China[J]. *Applied Soil Ecology*, 2023, 189: 104895.
- [14] Dong Y B, Zhang J Q, Xu X T, et al. Symbiotic nitrogen fixation enhanced crop production and mitigated nitrous oxide emissions from paddy crops[J]. *Field Crops Research*, 2024, 307: 109261.
- [15] Zhang Z H, Dong Y B, Yang D Q, et al. Divergent effects of legume cover crops on microbial necromass accumulation at surface versus subsurface soils in subtropical paddy fields[J]. *Journal of Environmental Management*, 2025, 389: 126181.
- [16] Zhang B, Wei Z B, Zhu R, et al. Legume integration into rice cropping systems buffers topsoil functional potential against microbial diversity loss[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2025, 127: 103775.
- [17] Callahan B J, McMurdie P J, Rosen M J, et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(7): 581-583.
- [18] Liang Y T, Xiao X, Nuccio E E, et al. Differentiation strategies of soil rare and abundant microbial taxa in response to changing climatic regimes[J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(4): 1327-1340.
- [19] Zheng B X, Zhu Y G, Sardans J, et al. QMEC: A tool for high-throughput quantitative assessment of microbial functional potential in C, N, P, and S biogeochemical cycling[J]. *Science China Life Sciences*, 2018, 61(12): 1451-1462.
- [20] Jia J Y, de Goede R, Li Y Z, et al. Unlocking soil health: Are microbial functional genes effective indicators?[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2025, 204: 109768.
- [21] Barberán A, Bates S T, Casamayor E O, et al. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(2): 343-351.
- [22] Hu M, Zeng Q C, Zhou Q, et al. Study on the coupling mechanism between soil bacterial community diversity and ecosystem multifunctionality in intensive *Citrus* cultivation systems[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2025, 62(4): 1197-1209. [胡漫, 曾全超, 周全, 等. 集约化种植柑橘土壤细菌群落多样性与生态系统多功能性的耦合机制研究[J]. *土壤学报*, 2025, 62(4): 1197-1209.]
- [23] Luo G W, Rensing C, Chen H, et al. Deciphering the associations between soil microbial diversity and ecosystem multifunctionality driven by long-term fertilization management[J]. *Functional Ecology*, 2018, 32(4): 1103-1116.
- [24] Wang B, Zhang Y C, Wang X Y, et al. Effects of sustained low level organic fertiliser and chemical fertiliser blending on soil fertility and multifunctionality in oasis farmland[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2025, 62(4): 1059-1071. [王冰, 张宇辰, 王昕悦, 等. 持续低量有机肥与化肥配施对绿洲农田土壤肥力和多功能性的影响[J]. *土壤学报*, 2025, 62(4): 1059-1071.]
- [25] Li Y, Wang J L, Shen C C, et al. Microbial diversity losses constrain the capacity of soils to mitigate climate change[J]. *Global Change Biology*, 2024, 30(12): e17601.
- [26] Zhang B, Liu M Q, Qian L B, et al. Resistance and resilience of soil microbial communities: Progress and perspective[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2023, 43(14): 5674-5685. [张彬, 刘满强, 钱刘兵, 等. 土壤微生物群落抵抗力和恢复力研究进展[J]. *生态学报*, 2023, 43(14): 5674-5685.]
- [27] Chen H H, Ma K Y, Lu C Y, et al. Functional redundancy in soil microbial community based on metagenomics across the globe[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 878978.
- [28] Bai R, Wang J T, Deng Y, et al. Microbial community and functional structure significantly varied among distinct types of paddy soils but responded differently along gradients of soil depth layers[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 945.
- [29] Chen Q L, Ding J, Zhu D, et al. Rare microbial taxa as the major drivers of ecosystem multifunctionality in long-term fertilized soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2020, 141: 107686.
- [30] Gu H D, Liu Z X, Yao Q, et al. Distinct effects of abundant and rare microbial communities on ecosystem multifunctionality across the soil profiles in agricultural Isohumosols[J]. *Soil Ecology Letters*, 2025, 7(2): 240289.
- [31] Chakraborty D, Jousset A, Wei Z, et al. Rare taxa in the core microbiome[J]. *Trends in Microbiology*, 2025, 33(7): 727-737.

(责任编辑: 陈荣府)