

覆盖和埋置白三叶对黄土高原苹果园土壤细菌多样性的影响

马震珠¹, 魏倩倩², 李尚玮¹, 杨文权², 寇建村¹

(1. 西北农林科技大学 草业与草原学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: [目的] 探究白三叶在不同降解时期果园土壤细菌多样性的变化, 为果园白三叶的利用及果园生草模式的推广提供理论依据。[方法] 在陕西省洛川县苹果园内分别以覆盖和埋置两种方式将白三叶 (*Trifolium repens*) 返园, 通过高通量测序研究两种返园方式下白三叶降解 1, 3, 6, 12 个月时土壤细菌的多样性、丰度及群落结构。[结果] ① 白三叶返园处理下, 土壤微生物优势菌群种类未表现出显著变化, 丰度存在差异, 返园处理组土壤中出现梭杆菌门 (Acidobacteria)、广古菌门 (Euryarchaeota)、泉古菌门 (Crenarchaeota)、螺旋体门 (Spirochaetes) 和硝化螺旋菌 (Nitrospira) 门等特有菌群。② 白三叶返园对苹果园土壤细菌群落分布存在显著影响 ($p < 0.05$), 且不同降解时期存在差异。两种返园处理组中酸杆菌门 (Acidobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、变形菌门 (Proteobacteria) 丰度增高, 厚壁菌门 (Firmicutes) 丰度降低。③ 随着白三叶降解时间增加, 芽单胞菌 (*Gemmatimonas*)、黄杆菌 (*Flavobacterium*)、*Opitutu* 和 *Arenimonas* 属的细菌相对丰度增高, 硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*)、奈瑟菌属 (*Neisseria*)、*Pirellula* 和 *Steroidobacter* 的丰度降低。[结论] 覆盖和埋置白三叶均能改善土壤菌群结构, 提高有益菌丰度, 促进土壤微生物生态系统物质循环。

关键词: 白三叶; 苹果园; 覆盖; 埋置; 细菌多样性

文献标识码: A

文章编号: 1000-288X(2019)05-0143-09

中图分类号: S154.3, S182

文献参数: 马震珠, 魏倩倩, 李尚玮, 等. 覆盖和埋置白三叶对黄土高原苹果园土壤细菌多样性的影响[J]. 水土保持通报, 2019, 39(5): 143-151. DOI: 10.13961/j.cnki.stbctb.2019.05.020; Ma Zhenzhu, Wei Qianqian, Li Shangwei, et al. Effects of covering or burying *Trifolium repens* on diversity of soil bacteria community in an apple orchard in Loess Plateau [J]. Bulletin of Soil and Water Conservation, 2019, 39(5): 143-151.

Effects of Covering or Burying *Trifolium Repens* on Diversity of Soil Bacteria Community in an Apple Orchard in Loess Plateau

Ma Zhenzhu¹, Wei Qianqian², Li Shangwei¹, Yang Wenquan², Kou Jiancun¹

(1. College of Grassland Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: [Objective] The return of *Trifolium repens* to an apple orchard was investigated to understand the effects on soil bacteria diversity in different degradation stages, and to provide theoretical basis for the utilization of *T. repens* in orchards and the promotion of pasture-planting in orchards. [Methods] Fresh *T. repens* was covered or buried in an apple orchard in Luochuan County, Shaanxi Province. At 1, 3, 6 and 12 months of *T. repens* degradation, soil samples were collected, and high-throughput sequencing technology was performed to determine the diversity, richness and structure of soil bacteria. [Results] ① There were no significant differences in the diversity of preponderant bacteria after *T. repens* returning, but some richness was different. Acidobacteria, Euryarchaeota, Crenarchaeota, Spirochaetes and Nitrospira were found in the soil of the return treatment group. ② There were some remarkable differences in community distribution of soil bacteria ($p < 0.05$), varying in different degrading period after the return of *T. repens*. The richness of Acidobacteria, Bacteroidetes and Proteobacteria increased, but that of Firmicutes decreased in soil samples from the two treatment groups compared with the control. ③ Over time, the richness of *Gemmatimonas*,

收稿日期: 2019-04-04

修回日期: 2019-04-28

资助项目: 国家自然科学基金项目“黄土高原水热季节耦合对苹果园白三叶降解形成土壤有机质的影响机理”(31302027)

第一作者: 马震珠(1994—), 女(汉族), 青海省湟源县人, 在读硕士生, 研究方向为植物资源利用与开发。E-mail: mazhenzhu@nwfau.edu.cn.

通讯作者: 寇建村(1976—), 女(汉族), 青海省湟中县人, 副教授, 博士, 主要从事草地资源植物开发与利用、果草复合系统生理生态研究。E-mail: jiancun02@163.com.

Flavobacterium, *Opitut*, and *Arenimonas* increased in groups in which *T. repens* had returned; however, the richness of *Nitrospira*, *Neisseria*, *Pirellula*, and *Steroidobacter* decreased. [Conclusion] Either covering or burying *T. repens* could optimize structure of soil bacteria community, increase probiotics abundance and improve the matter cycle in the microbial ecosystem.

Keywords: *Trifolium repens*; apple orchard; covering; burying; bacteria diversity

中国是世界苹果生产第一大国,据联合国粮农组织统计,2017 中国苹果产区面积达 $2.22 \times 10^5 \text{ hm}^2$, 占世界苹果产区总面积的 45%^[1]。黄土高原位居中国苹果生产四大产区之首,且近几年种植面积还在不断扩大,是中国苹果产业的主力^[2]。但许多果园建于干旱少雨、土壤瘠薄的高原沟壑地带,土壤有机质含量偏低、土壤稳定供水供肥能力较低^[3],加之近几年农村产业结构的调整,传统有机肥减少而商品有机肥成本较高,导致苹果生产主要依赖化肥。而化肥的过量施用不但使肥料利用率降低,还造成了果园土壤和苹果质量的下降以及环境污染等问题^[4-5]。在一些发达国家,普遍采用果园生草模式,近些年在中国也大力推广^[6]。因为果园生草不仅可以提高土壤保水能力、减少水土流失、环境污染,还可以通过牧草降解改善果园土壤质量,提高土壤有机质,为果园提供稳定的有机肥源^[7-8]。

土壤中的微生物是整个土壤生态系统里最为活跃的组成,对土壤质量,肥力功能以及可持续发展都存在着不容忽视的作用^[9]。土壤细菌约占土壤微生物的 70%~90%^[10],它们直接参与土壤中有有机质的分解、合成等各项生物循环^[11]。对土壤细菌的传统研究是通过室内培养来进行的,但土壤中存在许多不可培养的细菌,因此传统研究下得到的土壤细菌信息量较少。高通量测序是目前使用广泛的现代生物技术之一,尤其在土壤微生物的相关研究中运用较多,采用此种技术不用像传统手段一样依赖细菌的分离培养,从环境中即可获取基因信息,能够快速、高效、准确且全面地反映土壤细菌多样性的真实情况^[12]。

植物残体回归土壤会引起土壤生态以及肥力变化,这些变化必然对土壤细菌产生影响,这类研究多见于森林及农田生态系统^[13-14]。有关果园白三叶返还苹果园土壤对细菌多样性的研究未见报道,本研究将苹果园白三叶分别以覆盖和埋置两种方式返园,探究在不同降解时期果园土壤细菌多样性的变化,以期在白三叶在果园中更好的利用及果园生草模式的推广提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验地概况

试验地选自陕西省延安市洛川县无公害苹果示

范园,该地区地处东经 $109^{\circ}13'$,北纬 $35^{\circ}26'$ 。该地区位于黄土高原腹地海拔 1 100 m,气候属于暖温带半湿润半干旱大陆性季风气候,年平均气温 9.2°C ,年平均降水 622 mm,降水主要集中在 5—9 月,全年无霜期 167 d。日照时数达 2 448.6 h,日照充足,昼夜温差大。土壤为黑垆土,质地为中壤,土层深厚。试验区地势、地貌、土质等自然条件一致,试验果园种植半矮化红富士,采用旱作耕作模式。

1.2 试验设计

2014 年 5 月 27 日,将苹果树行间的白三叶刈割后分装于 $20 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ 的尼龙袋中,每袋装新鲜茎叶 200 g。在果树行间等距离挖深 40 cm 宽 30 cm 的沟,将挖出土壤均匀混合,备用。试验设 2 个处理。(1)覆盖。将备用土壤分装于 $30 \text{ cm} \times 30 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$ 的软塑料盆中,放入沟内,与地面持平,将装有白三叶的尼龙袋覆盖于花盆土壤表面,压平;

(2)埋置。在容器内装入 15~20 cm 备用土,将装有白三叶的尼龙袋平放至上层,压平,覆土至装满容器,容器顶端与地面持平。对照组不放白三叶,仅用备用土装满容器。每个处理 5 次重复。

1.3 土壤样品采集

在白三叶降解 1,3,6 和 12 个月分别时采集土壤样品。采样时,将容器内土壤混合均匀,去除杂质,采用四分法留取土样。部分装入铝盒内用于土壤含水量测定,其余部分过 20 目筛、混合均匀后密封,储存于 -80°C 冰箱内备用。

1.4 土壤微生物总 DNA 提取及检测

称取 1 g 土样,使用 E. Z. N. A. 土壤基因组 DNA 试剂盒(Omega 公司,美国)按试剂盒操作说明,进行土壤微生物总基因组 DNA 提取和纯化。采用紫外分光光度计法检测 DNA 浓度及纯度,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的完整性。

1.5 PCR 扩增及产物纯化

以 20 ng DNA 为模板,使用引物:515F(5-GT-GCCAGCMGCCGCGGTAA-3)和 806R(5-GGAC-TACVSGGGTATCTAAT-3)扩增土壤细菌 16S rDNA 上的 V4 高度可变区。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增条件为: 98°C

5min; 98 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 27 个循环; 72 °C 延伸 5 min。完成 PCR 扩增后,对产物进行检测,合格产物用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(Axygen 公司,美国)进行切胶回收,并做纯化。另外,通过 PCR 向 16S rDNA 的 PCR 产物末端加上带有 Index 的接头,以便进行 NGS 测序。

1.6 文库质检及定量

使用 Agilent 2100 生物分析仪(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)检测文库质量,通过 Qubit2.0 Fluorometer(Invitrogen, Carlsbad, CA)检测文库浓度。DNA 文库混合后,使用 Illumina MiSeq 平台进行测序。

1.7 数据分析

双端测序得到的正反向 reads 首先进行两两组装连接,过滤拼接结果中含 N 的序列,保留序列长度大于 200 bp 的序列。经过质量过滤,去除嵌合体序列,最终得到的序列用于操作分类单元即 OTU(operational taxonomic units)分析,使用 Qiime (1.9.1) 软件 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,比对参考数据库,在各个水平统计每个样本的群落组成。

用 R 语言软件生成不同分类水平上的物种分布图,并将属水平下 TOP 20 物种丰度绘制为聚类热图。基于 OTU 分析结果,统计不同分组共有和特有的 OTU,绘制韦恩图。根据 OTU 列表中的各样品物种丰度信息,应用 Qiime 中的 alpha_diversity.py 命令计算 Shannon, ACE 及 Chao1 等指数,并作稀释曲线。基于 Brary-Curtis 样本间距离矩阵用 R 语言软件进行 PCA 分析并做图。

2 结果与分析

2.1 测序结果及土壤菌群多样性分析

OTU(operational taxonomic units)即操作分类单元,是在群体遗传学研究中,为了便于分析,人为设置的分类统一标志,通常在 97% 的相似水平下对所有序列进行 OTU 划分。本试验中不同时期采集的各样本 OTU 数如表 1 所示。

本试验中 12 个样本随着有效序列数的增加均表现为先快速增长,然后增速变缓,说明所有样本的物种组成比较均匀。此外,当有效序列数达到 5 000 时,增速趋于平缓,所有样本的有效序列数目均超过 5 000(见图 1),说明测序数据量已经足以真实反映样品中所有的物种组成。

表 1 测序获得的土壤细菌 OTU 数

处理	OTU 数量	处理	OTU 数量
CK ₁	1 267	CK ₃	1 248
CG ₁	1 223	CG ₃	1 320
BG ₁	1 309	BG ₃	1 409
CK ₂	1 366	CK ₄	1 223
CG ₂	1 196	CG ₄	1 380
BG ₂	1 301	BG ₄	1 360

注:CK₁ 为降解 1 个月的对照;CK₂ 为降解 3 个月的对照;CK₃ 为降解 6 个月的对照;CK₄ 为降解 12 个月的对照;CG₁ 为降解 1 个月的覆草处理;CG₂ 为降解 3 个月的覆草处理;CG₃ 为降解 6 个月的覆草处理;CG₄ 为降解 12 个月的覆草处理;BG₁ 为降解 1 个月的埋草处理;BG₂ 为降解 3 个月的埋草处理;BG₃ 为降解 6 个月的埋草处理;BG₄ 为降解 12 个月的埋草处理。下同。

2.2 土壤细菌 OTU 概况

分别在不同降解时期,对土壤细菌 OTU 进行对比分析。结果发现,在降解 1,3,6,12 个月时,对照(CK)土壤细菌特有的 OTU 数量分别为 123,159,95,65,覆草处理(CG)特有的 OTU 数量分别为 131,102,90,171,埋草处理(BG)特有的 OTU 数量分别为 175,158,160,120(见图 1)。分析比对各处理在不同降解时期特有的 OTU,发现对照、覆草处理和埋草处理中分别有 338,324 和 378 个不同降解时间特有的 OTU,分别占不同处理特有 OTU 的 76%,66%,62%(见图 2)。

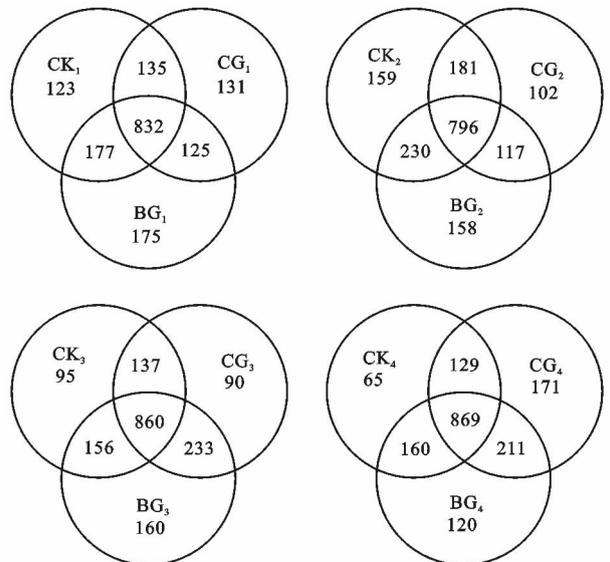


图 1 不同返园方式下土壤细菌群落 OUT 的韦恩图

通过对不同降解时间特有 OTU 对应物种的丰度分析发现,特有 OTU 对应的土壤菌群在门水平上主要有以下几种:厚壁菌门(Firmicutes)、浮霉菌门

(Planctomycetes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、蓝细菌门(Cyanobacteria)以及疣微菌门(Verrucomicrobia)(见表 2)。值得注意的是,覆草降解一个月时,其土

样菌群中还存在一定的梭杆菌门(Fusobacteria),而相同降解时间下的埋草处理和对照组中则未出现;埋草处理在降解 1,3,12 个月时土样中均有广古菌门(Euryarchaeota),且降解 1 个月时还有泉古菌门(Crenarchaeota)。另外,在覆草和埋草处理中增加了硝化螺旋菌门(Nitrospira)和螺旋体门(Spirochaetes)。

表 2 各处理在不同降解时间特有物种门水平分布

%

土壤细菌	处理					
	CK ₁	CG ₁	BG ₁	CK ₂	CG ₂	BG ₂
泉古菌门 Crenarchaeota	2.66	2.03	3.16	3.38	1.39	2.15
SR1	0.00	0.00	0.02	0.01	0.03	0.01
OP10	0.00	0.00	0.02	0.00	0.01	0.04
硝化螺菌门 Nitrospira	0.29	0.30	0.52	1.10	0.60	0.84
螺旋体菌门 Spirochaetes	0.01	0.01	0.02	0.09	0.03	0.32
梭杆菌门 Fusobacteria	0.22	0.22	0.16	0.32	0.29	0.37
广古菌门 Euryarchaeota	0.56	0.14	0.17	1.09	0.40	0.34
OD1	0.00	0.02	0.00	0.00	0.36	0.08
WS3	0.00	0.00	0.02	0.03	0.01	0.06
疣微菌门 Verrucomicrobia	0.05	4.78	5.11	6.27	5.67	6.68
变形菌门 Proteobacteria	29.04	35.35	36.96	31.67	39.48	33.64
浮霉菌门 Planctomycetes	2.78	2.06	3.13	2.47	2.19	2.72
芽单胞菌门 Gemmatimonadetes	1.56	1.65	2.07	3.06	2.71	3.40
厚壁菌门 Firmicutes	18.97	9.87	10.68	11.52	9.90	8.33
蓝藻菌门 Cyanobacteria	0.36	0.45	0.23	0.36	0.21	0.13
绿弯菌门 Chloroflexi	0.53	0.52	1.22	1.11	1.32	1.60
拟杆菌门 Bacteroidetes	8.41	13.62	10.00	10.02	16.40	11.65
放线菌门 Actinobacteria	10.08	12.22	9.20	6.34	3.31	2.50
酸杆菌门 Acidobacteria	13.65	9.03	9.75	12.49	7.86	14.00
土壤细菌	CK ₃	CG ₃	BG ₃	CK ₄	CG ₄	BG ₄
泉古菌门 Crenarchaeota	3.40	2.99	3.49	3.99	3.34	4.86
SR1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
OP10	0.00	0.02	0.03	0.01	0.02	0.05
硝化螺菌门 Nitrospira	0.41	0.40	0.65	0.57	0.33	0.54
螺旋体菌门 Spirochaetes	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
梭杆菌门 Fusobacteria	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
广古菌门 Euryarchaeota	0.41	0.27	0.73	0.96	1.87	1.24
OD1	0.09	0.61	0.58	0.02	0.34	0.16
WS3	0.13	0.13	0.20	0.13	0.17	0.09
疣微菌门 Verrucomicrobia	2.05	3.07	2.43	1.37	2.21	1.66
变形菌门 Proteobacteria	24.61	30.02	30.49	27.39	31.00	33.23
浮霉菌门 Planctomycetes	1.80	2.66	3.63	2.02	2.48	3.00
芽单胞菌门 Gemmatimonadetes	2.29	1.68	2.81	2.01	2.05	2.64
厚壁菌门 Firmicutes	25.56	10.91	10.38	18.26	10.78	8.48
蓝藻菌门 Cyanobacteria	2.96	7.17	0.90	1.60	6.73	2.33
绿弯菌门 Chloroflexi	1.00	0.97	1.51	1.06	0.90	1.51
拟杆菌门 Bacteroidetes	4.65	7.90	7.17	2.99	5.91	4.52
放线菌门 Actinobacteria	15.68	18.30	17.66	20.29	17.10	18.52
酸杆菌门 Acidobacteria	7.95	6.54	7.59	8.22	6.89	8.54

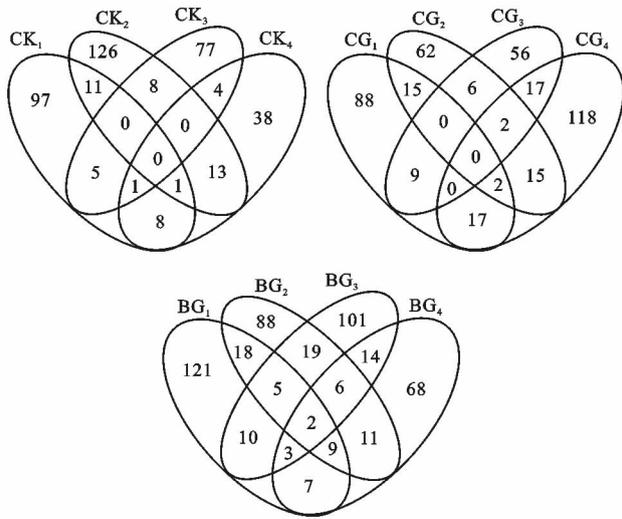


图 2 不同返园方式特有的 OTU 在不同降解时期土壤细菌群落的韦恩图

2.3 土壤细菌群落多样性

ACE 指数和 Chao1 指数是在生态学中估计物种总数的两种常用指数,均由 Chao 最早提出^[15],两种指数算法有所不同,但都能够用来估计群落中 OTU 数目,反映菌群丰度。ACE 和 Chao1 指数越大则表示土壤菌群丰度越高。在本试验中降解 1,3,6,12 个月时,覆草和埋草的 Chao1 和 ACE 指数均高于对照。在降解 1 个月和 3 个月时,埋草处理的 ACE 指数高于覆草处理,然而在降解 6 个月和 12 个月时,埋草处理的 ACE 指数则低于覆草处理(见表 3)。Shannon 指数^[16]用来估算样本中的微生物多样性。覆草和埋草处理的 Shannon 指数均高于对照,且埋草的 Shannon 指数比覆草的高(见表 3)。

表 3 土壤细菌丰富度和多样性指数

处理	Chao1 指数	ACE 指数	Shannon 指数
CK ₁	1 507.11	1 533.15	8.39
CG ₁	1 522.48	1 535.72	8.46
BG ₁	1 576.01	1 599.11	8.68
CK ₂	1 510.47	1 501.31	8.72
CG ₂	1 597.01	1 596.23	8.90
BG ₂	1 612.15	1 610.45	8.91
CK ₃	1 558.92	1 579.53	8.01
CG ₃	1 588.89	1 603.56	8.58
BG ₃	1 693.62	1 702.30	9.02
CK ₄	1 509.00	1 515.69	8.24
CG ₄	1 640.28	1 679.57	8.53
BG ₄	1 668.35	1 651.49	8.94

2.4 土壤细菌群落物种丰度

本试验对所有样本在不同分类水平下的土壤菌

群丰度进行了分析。从门水平来看,共有 22 种细菌被检出,其中丰度较高的菌群有厚壁菌门(Firmicutes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、蓝细菌(Cyanobacteria)及浮菌门(Planctomycetes)(见表 4)。在不同处理下土壤主要菌群丰度存在差异,和对照相比,覆草和埋草处理的厚壁菌丰度降低;拟杆菌、蓝细菌和变形菌丰度增高,且覆草处理高于埋草处理;埋草处理浮霉菌丰度增加。

在不同降解时间,各处理土壤中几个主要菌群的丰度发生变化。对照随降解时间增加,酸杆菌及拟杆菌丰度降低,放线菌的丰度增高;厚壁菌和变形菌丰度在不同降解时间丰度变化均表现为波动状态,厚壁菌在降解 6 个月时丰度最高,变形菌在降解 3 个月时丰度最高。在覆草处理中,降解 6 个月和 12 个月时杆菌丰度降低,但蓝细菌丰度增加。埋草处理中,降解后期放线菌和蓝细菌的丰度增加,拟杆菌丰度减少,而厚壁菌丰度在降解 3,6,12 个月时较 1 个月时增高(见表 4)。

2.5 土壤细菌群落物种结构

将属水平 TOP 20 的物种分布绘制为聚类热图(见图 3),通过颜色差异可直观显示菌群的相似性和差异性,图中由灰到黑代表菌群丰度由高到低。横向为样本分组聚类树,不同分解时间分为两类,降解 1 个月和 3 个月的所有样本归为一类,6 个月和 12 个月归为一类。纵向为物种聚类树,TPO 20 菌群被分为 4 类,聚类 I 由分支杆菌属(*Mycobacterium*)、马赛菌属(*Massilia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、乳球菌属(*Lactococcus*)以及(*Solirubrobacte*)组成;聚类 II 由芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)、*Opiritutu*、黄杆菌属(*Flavobacterium*)和 *Arenimonas*组成;聚类 III 由硝化螺旋菌属(*Nitrospira*)、奈瑟菌属(*Neisseria*)、*Pirellula* 和 *Steroidobacter* 组成;聚类 IV 由鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、溶杆菌属(*Lysobacter*)、珊瑚球菌属(*Corallococcus*)、*Flavisolibacte*、*Adhaeribacter* 及 *Skermanella* 组成。

不同物种聚类的菌群丰度在不同降解时间存在差异,聚类 I 在降解 1 个月、6 个月和 12 个月时菌群丰度高,而 3 个月时其丰度低;聚类 II 细菌的丰度随着降解时间的增加而增加;聚类 III 细菌在降解前期(1 个月和 3 个月)丰度高,而降解后期(6 个月和 12 个月)降低;聚类 IV 细菌在降解 1 个月时丰度最高。

表 4 土壤细菌门水平菌群丰度

%

土壤细菌	处理					
	CK ₁	CG ₁	BG ₁	CK ₂	CG ₂	BG ₂
WS3	0.00	0.00	0.02	0.03	0.01	0.06
疣微菌门 Verrucomicrobia	0.05	4.78	5.11	6.27	5.67	6.68
互养菌门 Synergistetes	0.01	0.01	0.00	0.01	0.02	0.03
螺旋体菌门 Spirochaetes	0.01	0.01	0.02	0.09	0.03	0.32
SR1	0.00	0.00	0.02	0.01	0.03	0.01
变形菌门 Proteobacteria	29.04	35.35	36.96	31.67	39.48	33.64
浮霉菌门 Planctomycetes	2.78	2.06	3.13	2.47	2.19	2.72
OP10	0.00	0.00	0.02	0.00	0.01	0.04
OD1	0.00	0.02	0.00	0.00	0.36	0.08
硝化螺菌门 Nitrospira	0.29	0.30	0.52	1.10	0.60	0.84
芽单胞菌门 Gemmatimonadetes	1.56	1.65	2.07	3.06	2.71	3.40
梭杆菌门 Fusobacteria	0.22	0.22	0.16	0.32	0.29	0.37
厚壁菌门 Firmicutes	18.97	9.87	10.68	11.52	9.90	8.33
异常球菌门 Deinococcus-Thermus	0.01	0.04	0.21	0.01	0.07	0.01
蓝藻菌门 Cyanobacteria	0.36	0.45	0.23	0.36	0.21	0.13
绿弯菌门 Chloroflexi	0.53	0.52	1.22	1.11	1.32	1.60
衣原体门 Chlamydiae	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
拟杆菌门 Bacteroidetes	8.41	13.62	10.00	10.02	16.40	11.65
放线菌门 Actinobacteria	10.08	12.22	9.20	6.34	3.31	2.50
酸杆菌门 Acidobacteria	13.65	9.03	9.75	12.49	7.86	14.00
广古菌门 Euryarchaeota	0.56	0.14	0.17	1.09	0.40	0.34
泉古菌门 Crenarchaeota	2.66	2.03	3.16	3.38	1.39	2.15
土壤细菌	CK ₃	CG ₃	BG ₃	CK ₄	CG ₄	BG ₄
WS3	0.13	0.13	0.20	0.13	0.17	0.09
疣微菌门 Verrucomicrobia	2.05	3.07	2.43	1.37	2.21	1.66
互养菌门 Synergistetes	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
螺旋体菌门 Spirochaetes	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SR1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
变形菌门 Proteobacteria	24.61	30.02	30.49	27.39	31.00	33.23
浮霉菌门 Planctomycetes	1.80	2.66	3.63	2.02	2.48	3.00
OP10	0.00	0.02	0.03	0.01	0.02	0.05
OD1	0.09	0.61	0.58	0.02	0.34	0.16
硝化螺菌门 Nitrospira	0.41	0.40	0.65	0.57	0.33	0.54
芽单胞菌门 Gemmatimonadetes	2.29	1.68	2.81	2.01	2.05	2.64
梭杆菌门 Fusobacteria	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
厚壁菌门 Firmicutes	25.56	10.91	10.38	18.26	10.78	8.48
异常球菌门 Deinococcus-Thermus	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
蓝藻菌门 Cyanobacteria	2.96	7.17	0.90	1.60	6.73	2.33
绿弯菌门 Chloroflexi	1.00	0.97	1.51	1.06	0.90	1.51
衣原体门 Chlamydiae	0.00	0.00	0.02	0.00	0.01	0.13
拟杆菌门 Bacteroidetes	4.65	7.90	7.17	2.99	5.91	4.52
放线菌门 Actinobacteria	15.68	18.30	17.66	20.29	17.10	18.52
酸杆菌门 Acidobacteria	7.95	6.54	7.59	8.22	6.89	8.54
广古菌门 Euryarchaeota	0.41	0.27	0.73	0.96	1.87	1.24
泉古菌门 Crenarchaeota	3.40	2.99	3.49	3.99	3.34	4.86

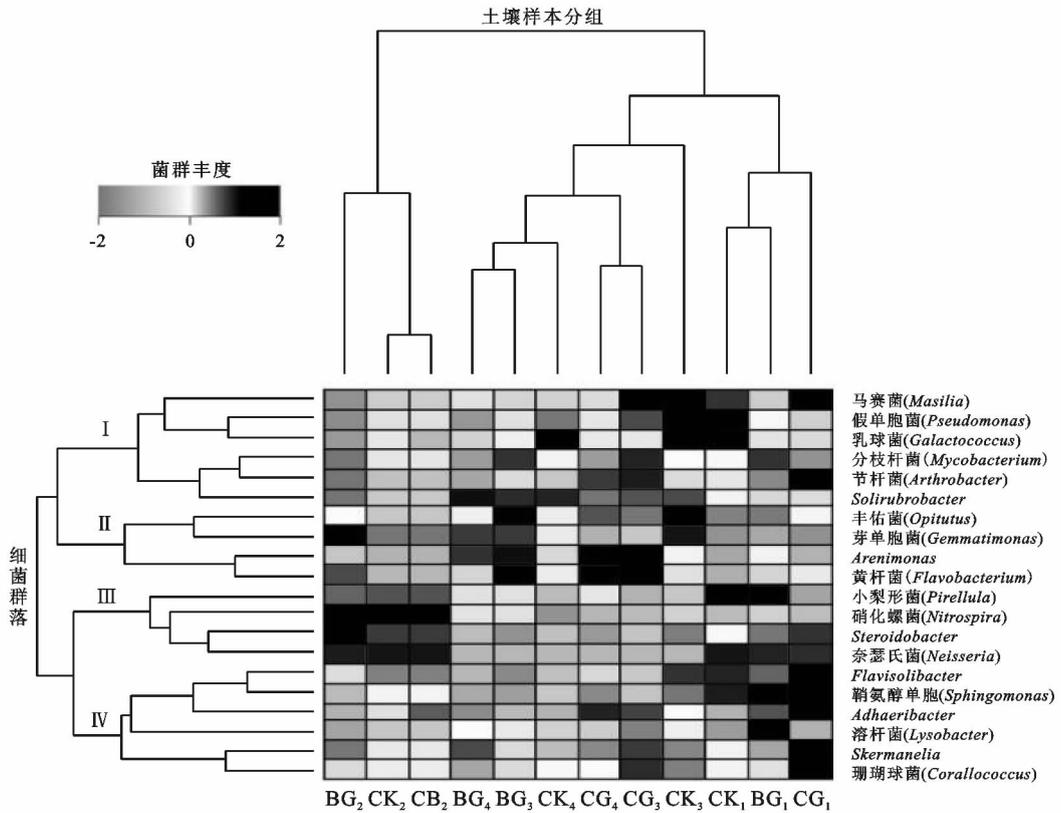


图 3 土壤细菌丰度前 20 个属的聚类热图

2.6 土壤细菌群落主成分分析

本试验对 TOP 20 菌群分布进行了主成分分析(见图 4)。结果表明,各处理多数样本点分别集中到坐标图的不同位置,说明不同处理下的土壤细菌结构存在差异。从降解时间来看,降解 1 个月和 3 个月时

的样本点分别聚集,降解 6 个月和 12 个月的样本点聚集到了一起。有 9 个属的土壤菌群对 PC₁(第一主成分)贡献较大(负载的绝对值大于 0.2),主要来自变形菌门和放线菌门,有 12 个属对 PC₂(第二主成分)贡献较大,主要来自变形菌门和拟杆菌门。

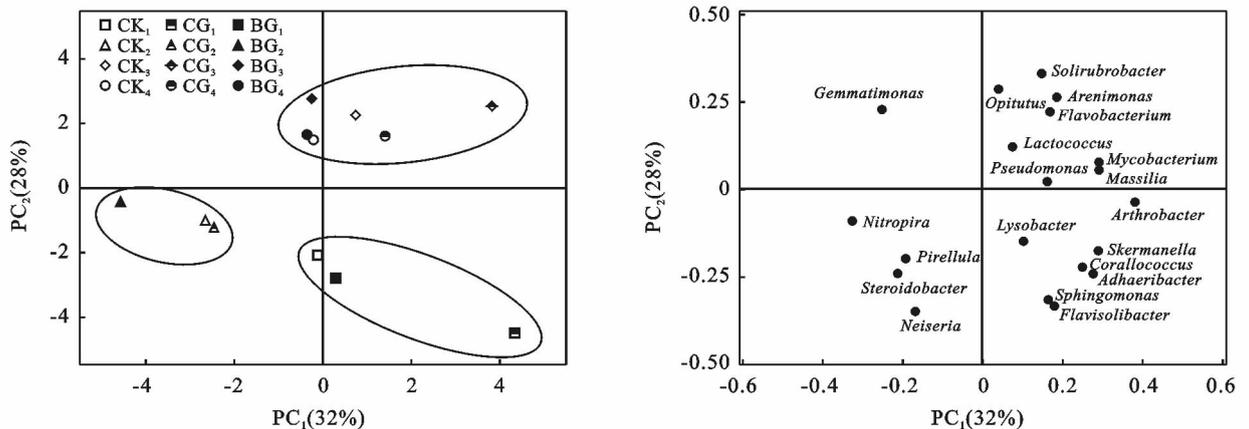


图 4 土壤细菌群落丰度前 20 属主成分分析

3 讨论

3.1 白三叶降解对土壤微生物群落结构的影响

白三叶返园未对土壤微生物优势菌群种类产生显著影响,不同处理组与对照间共有 OTU 较多,但

优势菌群的丰度在对照与两种返园处理组间均存在显著差异,并且出现了一些特有 OTU,说明白三叶的两种返园方式均对土壤细菌群落结构产生了影响,这一结果与之前一些其他外源有机物返园研究结果一致^[17]。白三叶返园后土壤中出现了梭杆菌门、广古

菌门、泉古菌门、螺旋体门和硝化螺旋菌门,说明这些菌与白三叶的降解高度相关。

两种返园方式下特有 OTU 分散在不同降解时间,同一时期重叠较少,推测这些菌群可能参与白三叶降解的不同过程。植物残体在土壤中的分解转化在不同时期的化学结构存在较大的差异,降解前期主要分解一些容易被微生物代谢利用的碳水化合物,后期则是一些诸如木质素、单宁等较难分解的物质,这也是菌群在不同时期结构有所不同的主要原因^[18]。同时,覆草和埋草处理会对土壤环境造成一些影响,水分、温度以及光照等因素也会对微生物的生长和有机物降解产生影响,对土壤肥力而言此类影响通常都是积极的^[19]。不同降解时期不同菌群的增加,有助于果园各种植物残体的分解利用。植物残体是有机质的重要来源^[20],植物残体的分解速率决定着生态系统中各类养分循环的效率,对土壤养分有效性的高低有着重要影响^[21],因此,通过菌群变化可以判断覆草和埋草均有利于果园土壤养分的积累和有效利用。

3.2 白三叶降解对土壤微生物群落物种分布及其丰度的影响

在苹果园覆盖或埋置白三叶对土壤细菌群落分布存在显著影响,且不同降解时期存在差异。在两种返园处理组中酸杆菌、拟杆菌、变形菌等细菌丰度提高。酸杆菌是土壤中一类重要的细菌类群,占土壤细菌总量的 20% 左右^[22],酸杆菌和拟杆菌门具有纤维素降解功能^[23],酸杆菌相对丰度与多糖含量、土壤理化性质及肥力状况密切相关^[24]变形菌门是一种重要的固氮菌,其大多数细菌在土壤氮素循环、去磷以及有机物降解中有着重要的功能^[25]。白三叶返园使得这些有益菌增多,说明两种返园方式均可通过提高土壤有益细菌丰度,促进土壤有机质的积累和转化,培肥地力,优化土壤理化性质。一些研究发现厚壁菌门细菌能够促进植物残体分解,增强土壤肥力^[26]。但在本研究中,白三叶返园后厚壁菌门丰度却低于对照,这可能是由于植物残体的种类、大小以及在土壤中位置的不同造成的^[27],此外,环境以及气候条件等综合因素也会影响微生物群落丰度^[28]。

本研究发现在不同降解时期,属水平 TOP 20 细菌丰度存在明显差异,即随着白三叶降解时间增加,芽单胞菌、黄杆菌、*Opitutu* 和 *Arenimonas* 属的细菌丰度增高,而硝化螺旋菌属、奈瑟菌属、*Pirellula* 和 *Steroidobacter* 的相对丰度降低。焦奎宝^[29]研究表明,土壤硝化螺旋菌的丰度与有机物含量有关。因此,白三叶随着降解时间增长养分释放量逐渐减少是造成这一现象的主要原因。此外,鞘氨醇单胞菌属、

溶杆菌属、珊瑚球菌属、*Flavisolibacte*、*Adhaeribacter* 和 *Skermanell* 等菌群均大量存在于降解前期,可能与该时期土壤中存在易于降解的物质以及前期降解过程中释放出的大量可溶物质有关^[30]。

4 结论

(1) 白三叶覆盖和埋置返园处理下,苹果园土壤微生物优势菌群种类未表现出显著变化,丰度存在差异。返园处理组土壤中出现梭杆菌门、广古菌门、泉古菌门、螺旋体门和硝化螺旋菌门等特有菌群,分散于不同降解时期,与白三叶降解过程高度相关。

(2) 白三叶覆盖和埋置返园,对苹果园土壤细菌群落分布存在显著影响,且不同降解时期存在差异,在两种返园处理组中酸杆菌、拟杆菌、变形菌等细菌丰度增高,厚壁菌门丰度降低。

(3) 随着白三叶降解时间增加,芽单胞菌、黄杆菌、*Opitutu* 和 *Arenimonas* 属的细菌丰度增高,硝化螺旋菌属、奈瑟菌属、*Pirellula* 和 *Steroidobacter* 的相对丰度降低;鞘氨醇单胞菌属、溶杆菌属、珊瑚球菌属、*Flavisolibacte*、*Adhaeribacter* 和 *Skermanell* 等菌群均大量存在于降解前期。

[参 考 文 献]

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division, FAO statistical database[EB/OL]. (2019-3-24)[2019-4-04]http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL.
- [2] 于林霞,张波,白秀广.黄土高原区苹果生产技术效率及其影响因素研究:基于 528 户苹果种植户的调查数据[J].干旱区资源与环境,2018,32(4):68-74.
- [3] 孙馨宇,张泉,张鹏,等.温度、水分及有机物料对苹果园土壤有机碳转化和微生物群落多样性的影响[J].土壤通报,2018,49(4):822-833.
- [4] Guo J H, Liu X J, Zhang Y, et al. Significant acidification in major Chinese croplands[J]. Science, 2010, 327(5968):1008-1010.
- [5] Liu Xuejun, Zhang Ying, Han Wenxuan, et al. Enhanced nitrogen deposition over China[J]. Nature, 2013, 494(7438):459-462.
- [6] 寇建村,杨文权,韩明玉,等.我国果园生草研究进展[J].草业科学,2010,27(7):154-159.
- [7] 李发林,郑域茹,郑涛,等.果园带状生草对果园面源污染的控制效果[J].水土保持学报,2013,27(3):82-89.
- [8] Qian Xun, Gu Jie, Pan Hongjia, et al. Effects of living mulches on the soil nutrient contents, enzyme activities, and bacterial community diversities of apple orchard soils[J]. European Journal of Soil Biology, 2015,70:23-30.
- [9] van der Heijden M G A, Wagg C. Soil microbial diversi-

- ty and agro-ecosystem functioning[J]. *Plant and Soil*, 2013, 363(1/2):1-5.
- [10] 王岳坤,洪葵. 红树林土壤细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析[J]. *微生物学报*, 2005, 45(2):201-204.
- [11] Kulmatiski A, Beard K H, Stevens J R, et al. Plant-soil feedbacks: A meta-analytical review[J]. *Ecology Letters*, 2008, 11(9):980-992.
- [12] Tan B, Ng C, Nshimiyimana J P, et al. Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: Current progress, challenges, and future opportunities[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6:1-20.
- [13] 立天宇,康峰峰,韩海荣,等. 冀北辽河源自然保护区土壤微生物碳代谢对阔叶林凋落物组成的响应[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(3):715-722.
- [14] Sakala W D, Cadisch G, Giller K E. Interactions between residues of maize and pigeonpea and mineral N fertilizers during decomposition and N mineralization [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32(5):679-688.
- [15] Pitta D W, Pinchak W E, Dowd S E, et al. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets [J]. *Microbial Ecology*, 2010, 59(3):511-522.
- [16] Shannon C E. A mathematical theory of communication [J]. *ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review*, 2001, 5(1):3-55.
- [17] 刘富庭. 覆盖或生草措施对黄土高原地区苹果园土壤有机碳组分及微生物的影响[D]. 陕西 杨凌:西北农林科技大学, 2014.
- [18] 李昌明,王晓玥,孙波. 基于固态¹³C 核磁共振波谱研究植物残体分解和转化机制的进展[J]. *土壤*, 2017, 49(4):658-664.
- [19] Aerts R. The freezer defrosting: Global warming and litter decomposition rates in cold biomes[J]. *Journal of Ecology*, 2006, 94(4):713-724.
- [20] Kogel-Knabner I. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter[J]. *Cheminform*, 2010, 33(23):139-162.
- [21] Berg B, McClaugherty C. Initial litter chemical composition[M]// *Plant Litter*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2003: 49-77.
- [22] Janssen P H, Yates P S, Grinton B E, et al. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions acidobacteria, actinobacteria, proteobacteria, and verrucomicrobia [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(5):2391-2396.
- [23] Pankratov T A, Kirsanova L A, Kaparullina E N, et al. *Telmatobacter bradus* gen. nov. sp. nov. a cellulolytic facultative anaerobe from subdivision 1 of the Acidobacteria, and emended description of *Acidobacterium capsulatum* Kishimoto et al. 1991 [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(2):430-437.
- [24] Rawat S R, Mannisto M K, Yana B, et al. Comparative genomic and physiological analysis provides insights into the role of Acidobacteria in organic carbon utilization in Arctic tundra soils[J]. *Fems Microbiol Ecology*, 2012, 82(2):341-355.
- [25] Nguyen H T T, Le V Q, Hansen A A, et al. High diversity and abundance of putative polyphosphate-accumulating Tetrasphaera-related bacteria in activated sludge systems[J]. *Fems microbiology ecology* 2011, 76(2):256-267.
- [26] 张明锦,张健,纪托未,等. 林窗对凋落物分解过程中细菌群落结构和多样性的影响[J]. *生态环境学报*, 2015, 24(8):1287-1294.
- [27] 王晓玥,孙波. 植物残体分解过程中微生物群落变化影响因素研究进展[J]. *土壤*, 2012, 44(3):353-359.
- [28] García-Orenes F, Morugán-Coronado A, Zornoza R, et al. Changes in soil microbial community structure influenced by agricultural management practices in a Mediterranean agro-ecosystem[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e80522.
- [29] 焦奎宝. 生草制苹果园土壤微生物群落结构与功能特征研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2014
- [30] 刘晶,谢婉余,张巧明,等. 黄土丘陵区不同植物凋落叶片的分解及养分释放特性[J]. *草业学报*, 2018, 27(9):27-35.