

玉米根际和非根际土壤细菌微多样性与土壤有机碳矿化的关系

付先恒^{1,3}, 李世清¹, 岳善超^{1,2}, 沈玉芳^{1,2}

(1.中国科学院 水利部 水土保持研究所, 陕西 杨凌 712100;

2.西北农林科技大学 资源与环境学院, 陕西 杨凌 712100; 3.中国科学院大学 北京 100049)

摘要: [目的] 运用高级别分类学分辨率揭示玉米根际和非根际土壤中细菌群落微多样性, 并探讨微多样性与土壤有机碳矿化的关系, 从更精细的分类学分辨率水平上为玉米根际土壤中微生物驱动的碳循环提供理论依据。[方法] 以西北农林科技大学曹新庄试验农场为依托, 采取田间生长条件下玉米根际和非根际两种土壤类型。利用高通量测序技术, 比较 OTUs 和 ASVs 两种分类学分辨率水平上玉米根际和非根际土壤中的细菌群落结构, 揭示细菌群落的微多样性。同时通过培养试验检测根际和非根际土壤的有机碳矿化特性。[结果] 通过比较 OTUs 和 ASVs 两种分类学分辨率水平上的细菌群落, OTUs 和 ASVs 两种方式显示出相似的细菌群落结构。在玉米根际和非根际土壤类型中, ASVs 在更高分类学分辨率水平上描绘细菌群落组成, 同时揭示了普遍存在于 OTUs 内的不同菌株或生态型。此外, 两种不同生长策略 (r-策略和 K-策略) 细菌物种的相对丰度差异是导致根际和非根际土壤细菌群落结构不同的主要因素。培养试验表明, 根际土壤有机碳矿化量显著高于非根际土壤。3 a 的连续采样分析结果表明, 根系是田间成熟玉米根际和非根际土壤理化性质差异的主要因素而受时间 (2019—2021 年) 的影响较小。根际和非根际土壤细菌微多样性与相应的土壤有机碳累积矿化量具有显著相关性。[结论] ASVs 方式展示了田间生长条件下玉米根际和非根际土壤中的细菌微多样性具有显著差异, 且细菌微多样性与根际和非根际土壤有机碳累积矿化量相关。

关键词: 根际土壤; 非根际土壤; 细菌; 微多样性; 土壤有机碳

文献标识码: A

文章编号: 1000-288X(2023)01-0323-09

中图分类号: S154.3, S513

文献参数: 付先恒, 李世清, 岳善超, 等. 玉米根际和非根际土壤细菌微多样性与土壤有机碳矿化的关系 [J]. 水土保持通报, 2023, 43(1): 323-331. DOI: 10.13961/j.cnki.stbctb.20230220.001; Fu Xianheng, Li Shiqing, Yue Shanchao, et al. Relationship of bacterial microdiversity of rhizosphere and bulk soil with soil organic carbon mineralization in maize fields [J]. Bulletin of Soil and Water Conservation, 2023, 43(1): 323-331.

Relationship of Bacterial Microdiversity of Rhizosphere and Bulk Soil with Soil Organic Carbon Mineralization in Maize Fields

Fu Xianheng^{1,3}, Li Shiqing¹, Yue Shanchao^{1,2}, Shen Yufang^{1,2}

(1. Institute of Soil and Water Conservation, Chinese Academy of Sciences and Ministry of Water

Resource, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. College of Resources and Environmental Sciences, Northwest A&F

University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Objective] The bacterial community microdiversity in the maize rhizosphere and bulk soil was determined to study the relationship between microdiversity and soil organic carbon mineralization through the use of high-resolution taxonomy in order to provide a theoretical foundation for microbially driven carbon cycling in the maize rhizosphere. [Methods] The rhizosphere and bulk soil samples were collected in maize fields on the experimental farm of Cao Xinzhuang, Northwest A&F University. High-throughput sequencing technology was used to detect the bacterial community structure in the rhizosphere and bulk soil. Thereafter,

收稿日期: 2022-07-29

修回日期: 2022-10-07

资助项目: 国家重点研发计划“黄土高原旱作适水改土与产能提升技术模式及应用”(2021YFD1900700)

第一作者: 付先恒 (1990—), 男 (汉族), 贵州省贵阳市人, 博士研究生, 研究方向为土壤微生物驱动的碳循环。Email: xianhengfu@hotmail.com。

通信作者: 李世清 (1963—), 男 (汉族), 甘肃省天水市人, 博士, 研究员, 主要从事旱地农业生态及土壤有机碳氮循环研究。Email: sqli@ms.iswc.ac.cn。

distinct taxonomic resolution levels (OTUs vs ASVs) were used to reveal the microdiversity of bacterial communities. Incubation experiments were conducted to examine organic carbon mineralization characteristics of the rhizosphere and bulk soil of maize. [Results] The distinct taxonomic resolution levels revealed similar bacterial community structure in the rhizosphere and bulk soil. ASVs depicted bacterial community composition at a fine scale taxonomic resolution level, and revealed different strains or ecotypes prevalent within the same OTU. Furthermore, differences in the relative abundance of bacterial species from distinct growth strategies (r- and K-strategies) were the main factors contributing to the different bacterial community structures in the rhizosphere and bulk soil. Incubation experiments showed that organic carbon mineralization was significantly higher in the rhizosphere than in bulk soil. The results of three years of continuous sampling revealed that roots were the main factor causing differences between the rhizosphere and bulk soil physicochemical properties of mature maize in the field, and that time had little influence (from 2019 to 2021). Cumulative mineralization of soil organic carbon was associated with bacterial microdiversity between the rhizosphere and bulk soil. [Conclusion] ASV-level exhibited significant differences in bacterial microdiversity between the rhizosphere and bulk soil in a maize field, and bacterial microdiversity was associated with cumulative mineralization of soil organic carbon.

Keywords: rhizosphere; bulk soil; bacteria; microdiversity; soil organic carbon

根际是植物根系、土壤微生物和土壤各种元素及养分等强烈相互作用的区域^[1]。植物根系通过释放根系分泌物(低分子量的有机酸和代谢产物等)影响根系相关的土壤微生物群落结构和多样性以及根际相关的土壤理化性质^[2]。玉米(*Zea mays*)作为重要的粮食作物,在中国广泛种植并且其产量长期位居粮食作物第一^[3]。因此,玉米根际相关土壤中的微生物群落被广泛地关注和研究。有研究表明,玉米品种、玉米的基因型、生长阶段或者玉米根际土壤的矿质养分、土壤质地等都对应玉米根际的微生物群落组成产生重要的影响^[4]。尽管如此,根际和非根际土壤之间也能够明显观测到微生物群落组成的差异^[5]。比如,微生物群落的多样性在根际土壤中显著低于非根际土壤,且微生物多样性从非根际土到根表面呈降低趋势^[6]。然而,在田间生长的成熟玉米根际和非根际土壤中微生物的群落结构依然缺乏研究。

在不同的生态环境中,操作分类单元(Operational taxonomic units, OTUs)被广泛地用于鉴定和探查微生物群落结构和多样性^[7]。通过多种聚类算法将一段给定的目标基因序列以 97% 相似性聚类,所得到的 OTUs 被用于代表或者假定为一个微生物物种^[8]。然而有研究表明,在得到的 OTUs 内观测到高度的遗传变异,这种高度的遗传变异被视为微多样性(microdiversity)^[9-10]。并且,在 OTUs 内观察到的微多样性是由于系统发育不一致性导致的,而不仅仅是 97% 相似性这一宽松的聚类阈值引起的,同时微多样性的产生受到环境因素的驱动^[10]。这就导致需要在更高分类学分辨率水平上探查微生物群落结构。单核苷酸变体(amplicon sequence

variants, ASVs)能够在给定的目标基因序列上检测出因为一个核苷酸不同引起的序列差异^[11]。因此,ASVs 被用于检测 OTUs 内存在的遗传变异。通过比较 ASVs 和 OTUs 揭示微多样性时,ASVs 被视为是一个微生物物种即 OTUs 中的不同菌株或者生态型^[12]。然而,在田间生长的成熟玉米根际和非根际土壤中关于微生物群落微多样性鲜有报道。

土壤作为全球陆地生态系统中最大的有机碳库,土壤有机碳库的微小变动都会引起大气 CO₂ 浓度的巨大变化^[13]。土壤有机碳(SOC)的矿化受到非生物因素如温度、土壤水分、pH 值以及矿质元素等因素的间接影响,一般认为土壤微生物作为关键因素能够直接影响有机碳的矿化^[14]。此外,有研究表明玉米根际和非根际土壤有机碳的矿化具有显著差异^[15-16]。尽管如此,将玉米根际和非根际土壤有机碳矿化与其土壤微生物微多样性关联的报道依然缺乏。

1 材料与方 法

1.1 试验地概况

本试验于 2019 年 6 月到 2021 年 10 月,在陕西省杨凌农业高新技术产业示范区西北农林科技大学曹新庄试验农场(E108°05', N34°18')进行。该地区海拔 520 m,属于温带季风气候,降雨主要发生在 7—9 月。年平均气温为 12.9 °C,降水量为 660 mm,日照时数为 2 163.5 h,年均蒸发量为 993.2 cm,湿润指数为 0.64,无霜期为 211 d。试验地的土壤类型为壤土(anthrosol),依据中国土壤系统分类,土壤为粉砂质黏壤土;在开展试验之前,试验地 0—20 cm 土层土

壤理化性质为:土壤有机碳 7.97 g/kg,全氮 0.93 g/kg,全磷 0.71 g/kg,pH 值为 8.36,土壤容重 1.42 g/cm³。

1.2 试验设计和土壤收集

在西北农林科技大学曹新庄试验农场内设置一个 30 m×20 m 的小区,使用先玉 335 作为种植研究对象,行距 70 cm,株距 30 cm,播种深度 5 cm。于 2019 年 6 月 25 日、2020 年 6 月 18 日和 2021 年 6 月 27 日进行播种,于 2019 年 10 月 11 日、2020 年 10 月 9 日和 2021 年 10 月 11 日进行收获。小区内过磷酸钙(P₂O₅ 含量 16%)施用量为 140 kg P₂O₅/hm²,硫酸钾(K₂O 含量 51.2%)施用量为 120 kg K₂O/hm²,纯氮(尿素,N 含量 46%)施用量为 225 kg/hm²,磷钾肥和尿素混合在一起,在播种前作为基肥施入(人工撒施),之后旋耕使其混入土壤约 15 cm 深。试验年份无灌水,田间病虫害和杂草防控均按照农场防控措施统一进行。

玉米花期有利于微生物活动^[17],因此分别在 2019,2020,2021 年的 9 月中旬采集玉米根际和非根际土壤。在小区的平面几何中心处随机取 6 株玉米,以避免可能归因于小区末端植物养分可用性增加的边界效应,并尽可能保持根系完整^[6]。土壤的收集采用抖根分离法,取紧密粘于根系的土壤为根际土(TS)。非根际土为:抖落的松散土壤(LS),同时用土钻(直径为 5 cm)钻取相应玉米植株两行之间 0—20 cm 深的土壤(BS)。即 3 种土壤类型:TS, LS 和 BS,每种土壤类型有 6 个重复,共 18 个土壤样品。其中,2019 年和 2020 年采集的土壤样品装入聚乙烯袋中,放入冰盒带回实验室。土壤过 2 mm 筛后,用于测定理化指标。2021 年采集的土壤样品装入聚乙烯袋中,放入冰盒带回实验室。土壤过 2 mm 筛后,分为 3 部分:一部分放入 4 °C 冰箱用于测定土壤 DNA,第二部分用于测定理化指标,第三部分用于测定土壤有机碳矿化特征。

1.3 土壤理化性质及有机碳矿化特征的测定

土壤全氮(TN)采用凯氏定氮法测定^[18],采用重铬酸钾外加热法测定土壤有机碳(SOC)^[19]。取土样 5 g 加 50 ml 1 mol/L 的 KCl 溶液,在 25 °C 恒温摇床中以每分钟 220 转的转速浸提 1 h 后过滤连续流动分析仪测定土壤中硝态氮(NO₃⁻-N)和铵态氮(NH₄⁺-N)含量^[19]。称取 10 g 风干土壤加入 25 g 去离子水,连续搅拌 1 min 后静置 30 min,用 pH 计测定 pH 值^[19]。

通过培养测定土壤有机碳矿化特征,将过 2 mm 筛的土壤 20 g 放入 500 ml 培养瓶中,加蒸馏水至最大田间持水量的 70%。预培养 7 d,以恢复土壤微

生物活性。随后在培养瓶内放入一个装有 10 ml 0.1 mol/L NaOH 溶液的 50 ml 透明塑料瓶,用于吸收培养期内土壤矿化出的 CO₂ 量。将培养瓶用塑料膜密封并放置在 25 °C 的恒温培养箱内培养,随后用称重法每隔 4 d 称重以补充水分,维持土壤在培养期内的水分稳定。并在培养的 1,4,7,10,15,20,25,30 d 更换 NaOH 溶液,并测定 CO₂ 吸收量。

1.4 土壤 DNA 的提取和数据分析

使用土壤 DNA 试剂盒(FastDNA[®] Spin Kit for Soil)依据操作指南从 0.5 g 的土壤样品中提取 DNA。采用细菌引物 341 F (5'-CCTACGGGAG-GCAGCAG-3') 和 806 R (5'-GACTACHVGGG-TATCTAATCC-3') 扩增土壤样品细菌的 16 S rRNA。然后在 Illumina HiSeq platform 上测序。使用 QIIME2 通路分析并得到 ASVs,后用 Opticlust algorithm 算法在 97% 序列相似度水平上聚类得到 OTUs。使用数据库 Silva 16 S rRNA (www.arb-silva.de) 进行物种注释和分类。将得到的 OTUs 抽样到相同水平,并选择丰度大于 5 000 的 OTUs 计算微多样性^[20]。我们遵循 García-García 等^[21]报道的方式来计算微多样性。简要地说,即将传统样品中以 OTUs 为单位来计算多样性,转换为以 OTUs 内包含的 ASVs 为单位来计算多样性,并将计算范围从样品转换为每一条 OTUs。在本文中我们为了便于区分,仍然使用术语“OTUs”和“ASVs”用于代表两种分类学分辨率。所有统计分析过程均在 R 软件(v4.0.1; <http://www.r-project.org/>)中完成并使用以下功能包“vegan”“stats”“scales”“recharts”“dplyr”“phyloseq”和“ape”。

2 结果与分析

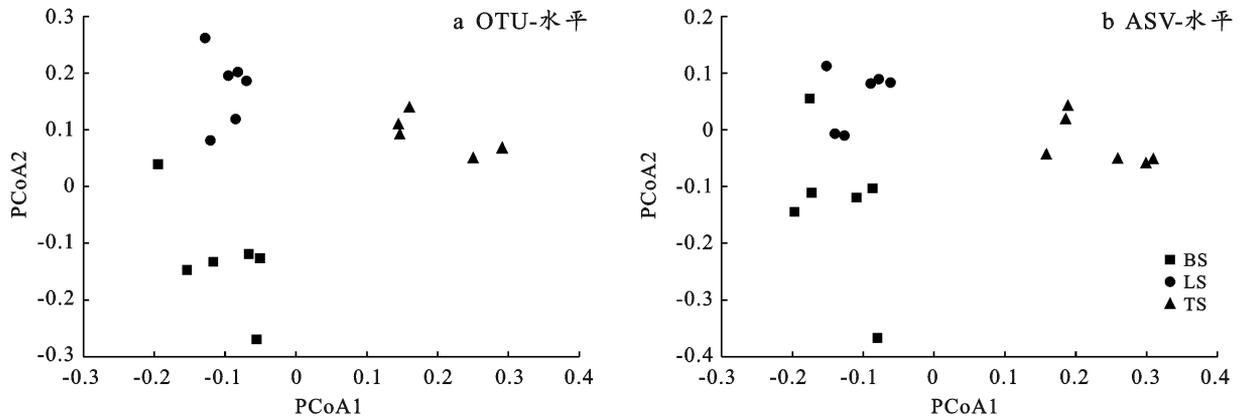
2.1 玉米根际和非根际土壤中细菌的群落结构

从所有的土壤样品中得到 443 851 条高质量的细菌序列,并从中获取了 7 597 条 ASVs。采用 Unweighted UniFrac 距离的主坐标分析(PCoA)评价细菌群落组成在根际和非根际土壤中的差异。结果显示无论是在 OTUs 分辨率水平还是在 ASVs 分辨率水平上,细菌群落分别根据 TS, LS 和 BS 3 种类型聚集(图 1)。并且通过比较 OTUs 水平的 Unweighted UniFrac 距离矩阵和 ASVs 水平 Unweighted UniFrac 距离矩阵,Mantel 分析显示两种分类学分辨率水平展现出群落结构良好的一致性(mantel test, $p < 0.001, R = 0.975$)。

细菌门水平上显示所有土壤样品中以 Pro-

teobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria, Gemmatimonadetes, Actinobacteria, Chloroflexi, Nitrospirae 和 Verrucomicrobia 占据主导(图 2)。在根际土壤 TS 中, Proteobacteria 占 43.6%, Bacteroidetes 占 17.9%, Acidobacteria 占 10.2%, Gemmatimonadetes 占 8.9%, Actinobacteria 占 11.5%, Chloroflexi 占 4.3%, Nitrospirae 占 1.2% 和 Verrucomicrobia 占 1.1%(图 2)。在非根际土壤 BS 中, Proteobacteria 占 36.1%, Bacteroidetes 占 12.6%, Acidobacteria 占 13.6%, Gemmatimonadetes 占 10.3%, Actinobacteria 占 7.3%, Chloroflexi 占 6.4%, Nitrospirae 占

2.6% 和 Verrucomicrobia 占 6.8%(图 2)。类似的, 在 LS 土壤中, Proteobacteria 占 35.2%, Bacteroidetes 占 12.3%, Acidobacteria 占 13.1%, Gemmatimonadetes 占 11.3%, Actinobacteria 占 10.3%, Chloroflexi 占 6.1%, Nitrospirae 占 2.3% 和 Verrucomicrobia 占 5.6%(图 2)。通过方差分析显示 Proteobacteria 和 Bacteroidetes 在 TS 土壤中丰度显著高于 BS 土壤和 LS 土壤(表 1)。而 Acidobacteria, Chloroflexi 和 Verrucomicrobia 在 BS 土壤和 LS 土壤中丰度显著高于 TS 土壤, 且 BS 土壤和 LS 土壤之间丰度无显著差异(表 1)。



注: BS 为植株两行之间 0—20 cm 深的土壤; LS 为根系抖落的松散土壤; TS 为紧密粘于根系的土壤。下同。

图 1 OTUs(a)和 ASVs(b)两种分辨率水平下 TS, LS 和 BS 土壤类型中的细菌群落结构差异

Fig.1 Differences in bacterial community structure in TS, LS and BS soil types at distinct taxonomic resolution levels: OTUs (a) and ASVs (b)

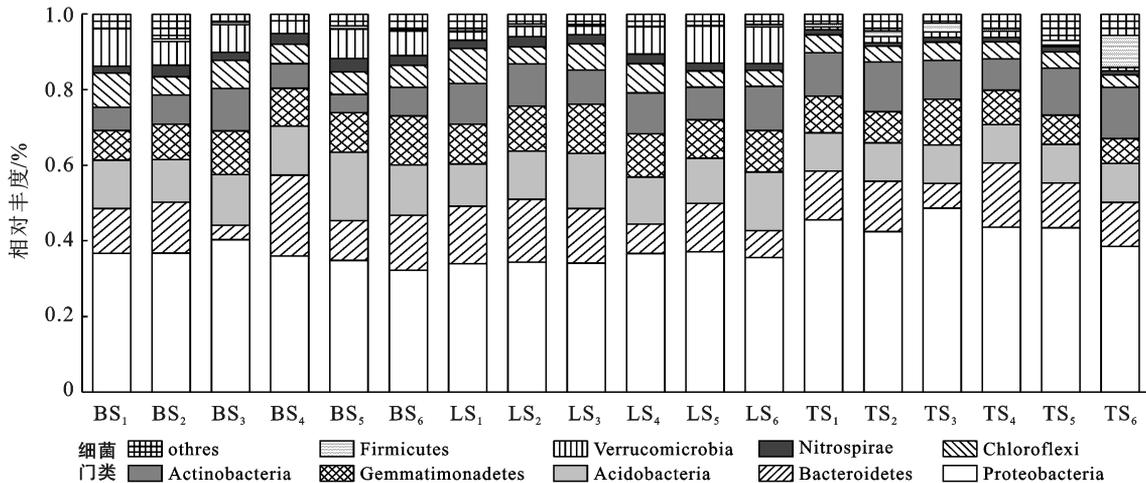


图 2 ASVs 分类学分辨率水平下 TS, LS 和 BS 土壤类型中细菌门水平相对丰度

Fig.2 Relative abundance of bacterial community in TS, LS and BS soil types at the taxonomic resolution level of ASVs

2.2 玉米根际和非根际土壤细菌微多样性差异

在得到的所有 OTUs 中, 选择相对丰度最高的前 3 条 OTUs 来展示同一个 OTUs 内所具有的不同

生态型或者菌株。结果显示, OTU-1, OTU-3 和 OTU-18 作为丰度最高的前 3 条 OTUs 包含了不同的 ASVs(表 2)。其中每 1 条不同的 ASVs 代表了同

一个 OTU 内不同菌株或生态型。例如,OTU-1 中包含了 ASV10, ASV1 035 以及 ASV1 204 等多条 ASVs。在 OTU-3 中包含了 ASV11, ASV125 和 ASV1 609 等多条 ASVs。OTU-18 具有类似的结果。结果表明 ASVs 揭示了包含在 OTU 内更高分类学分辨率水平上的系统发育不一致性。

此外,在获得的所有 OTUs 中,包含两个或两个以上 ASVs 的 OTUs 被选出并计算微多样性。我们的结果表明 TS 土壤中的细菌微多样性明显高于 BS 和 LS 土壤中的细菌微多样性(图 3)。在 TS 土壤中细菌微多样性在 1.31~1.79 之间,而在 LS 土壤中细菌微多样性在 0.45~1.57 之间。类似的,BS 土壤中细菌微多样性在 0.47~1.21 之间。

表 1 3 种土壤类型中细菌分类物种的差异

Table 1 Differences in bacterial species among the three soil types

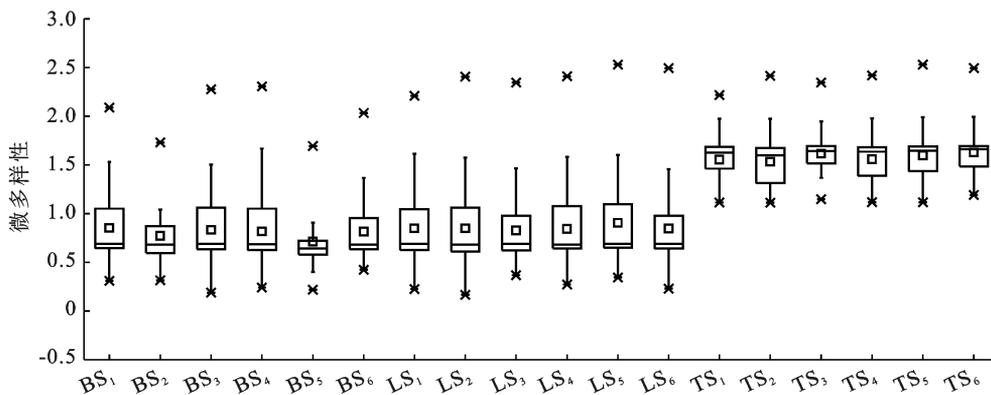
细菌物种	土壤类型		
	BS	LS	TS
Proteobacteria	0.36±0.03 ^b	0.35±0.01 ^b	0.44±0.03 ^a
Bacteroidetes	0.12±0.03 ^b	0.12±0.04 ^b	0.15±0.06 ^a
Acidobacteria	0.14±0.02 ^a	0.13±0.02 ^a	0.10±0.01 ^b
Gemmatimonadetes	0.10±0.02 ^{ab}	0.11±0.01 ^a	0.07±0.02 ^b
Actinobacteria	0.07±0.02 ^b	0.10±0.01 ^a	0.11±0.02 ^a
Chloroflexi	0.06±0.01 ^a	0.06±0.02 ^a	0.04±0.01 ^b
Nitrospirae	0.03±0.01 ^a	0.02±0.01 ^{ab}	0.01±0.01 ^b
Verrucomicrobia	0.07±0.02 ^a	0.06±0.03 ^a	0.01±0.01 ^b
others	0.04±0.02 ^a	0.03±0.01 ^b	0.04±0.02 ^a

注:同行不同字母表示显著差异性($p < 0.05$),表中数据为平均值±标准差($n=6$)。

表 2 丰度最高的 3 条 OTUs 中的不同生态型

Table 2 Distinct ecotypes in three most abundant OTUs

不同分类学分辨率			不同分类学分辨率			不同分类学分辨率		
OTUs	ASVs	属名	OTUs	ASVs	属名	OTUs	ASVs	属名
OTU-1	ASV10	<i>Sphingomonas</i>	OTU-3	ASV11		OTU-18	ASV1448	
OTU-1	ASV1035	<i>Sphingomonadaceae</i>	OTU-3	ASV125		OTU-18	ASV152	
OTU-1	ASV1204	<i>Ellin6055</i>	OTU-3	ASV1609		OTU-18	ASV1661	
OTU-1	ASV1241	<i>Sphingomonas</i>	OTU-3	ASV1641		OTU-18	ASV2577	
OTU-1	ASV1321	<i>Ellin6055</i>	OTU-3	ASV17		OTU-18	ASV2580	
OTU-1	ASV1345	<i>Ellin6055</i>	OTU-3	ASV1829	<i>Sphingomonas</i>	OTU-18	ASV312	<i>Saprospiraceae</i>
OTU-1	ASV1376	<i>Sphingomonas</i>	OTU-3	ASV243		OTU-18	ASV32	
OTU-1	ASV1650	<i>Ellin6055</i>	OTU-3	ASV245		OTU-18	ASV332	
OTU-1	ASV167	<i>Sphingomonas</i>	OTU-3	ASV2572		OTU-18	ASV5	
OTU-1	ASV169	<i>Sphingomonas</i>	OTU-3	ASV2637		OTU-18	ASV552	
OTU-1	ASV18	<i>Sphingomonas</i>	OTU-3	ASV3111		OTU-18	ASV82	



注:箱体实线从上至下分别为上边缘、上四分位数、中位数、下四分位数、下边缘,方框中的空心方块是平均值。空心圆表示异常值,上下边缘的“×”分别是第 1 个和第 99 个百分位数。

图 3 TS,LS 和 BS 土壤类型中细菌微多样性的显著差异

Fig.3 Significant differences in bacterial microdiversity in TS, LS and BS soil types

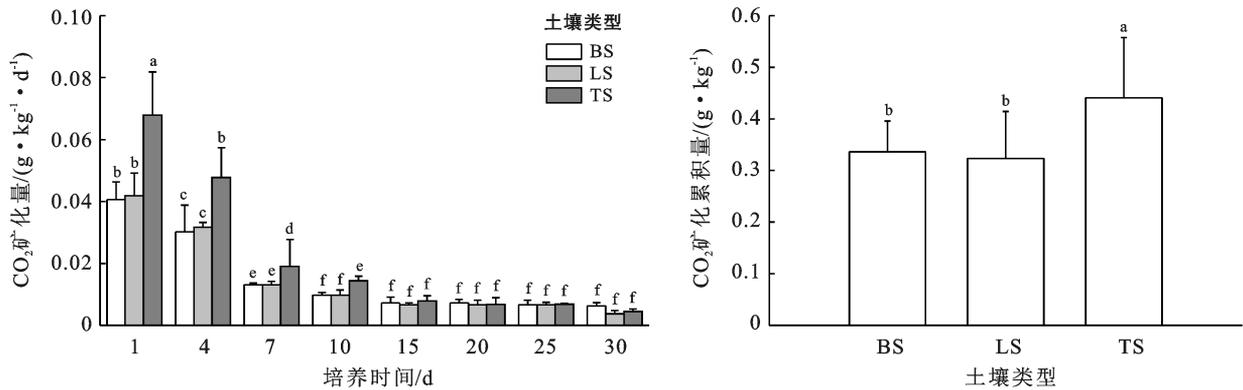
2.3 玉米根际和非根际土壤有机碳矿化特征

研究表明,3 种土壤类型的土壤有机碳的矿

化速率随时间增长而降低(图 4)。在培养的早期,TS 土壤有机碳矿化速率显著高于 LS 和 BS 土壤。培养

到第 7—10 d 后, TS, LS 和 BS 3 种土壤类型的有机碳矿化速率显著减缓, 且 3 种土壤类型之间有机碳矿化速率无显著差异。通过 30 d 的培养, TS 土壤有机碳矿化速率从 67.9 mg/kg/d 降低到 4.5 mg/kg/d。LS 土壤有机碳矿化速率从 41.4 mg/kg/d 降低到 6.2 mg/kg/d, 而 BS 土壤有机碳矿化速率从 40.7

mg/kg/d 降低到 3.75 mg/kg/d。经过 30 d 的培养后, TS 土壤有机碳矿化累积量显著高于 LS 和 BS 土壤有机碳矿化累积量(图 4)。TS 土壤累积矿化量为 0.44 g/kg, 而 BS 和 LS 土壤累积矿化量分别为 0.33 g/kg, 0.32 g/kg。TS, LS 和 BS 3 种土壤类型有机碳累积矿化量分别占总土壤有机碳含量的 5.4%, 4.4% 及 4.3%。



注: 不同字母表示处理间差异显著 ($p < 0.05$)。

图 4 TS, LS 和 BS 3 种土壤类型有机碳矿化量及累积矿化量

Fig. 4 Organic carbon mineralization rate and cumulative mineralisation in TS, LS and BS soil types

2.4 玉米根际和非根际环境特征与土壤细菌微多样性

从土壤类型来看, 2019 年 3 种不同的土壤类型中 TS 土壤有机碳含量显著高于 LS 和 BS 土壤(表 3)。全氮和 pH 值在 3 种土壤类型之间无显著差异。硝态氮在 TS 土壤中显著最高, 而在 LS 和 BS 两种土壤类型之间硝态氮无显著差异。铵态氮在 TS 土壤中含量显著最低, 而在 BS 和 LS 两种土壤类型之间无显著差异。2020 年和 2021 年两年分别采集的 3 种不同土壤类型理化性质与 2019 年 3 种不同土壤类型理化性质具有相似的规律。从时间来看, 无论是

2019, 2020 年还是 2021 年, 土壤有机碳含量和硝态氮含量均在 TS 土壤类型中显著最高, 而在 BS 和 LS 中无显著差异。类似地, 无论是 2019, 2020 年还是 2021 年, 铵态氮含量均在 TS 土壤类型中显著最低, 而在 BS 和 LS 中无显著差异。特别地, 全氮和 pH 值, 无论是在各采样时间之间还是土壤类型之间均无显著差异(表 3)。使用 2021 年的土壤理化性质与细菌微多样性进行分析。通过 Mantel 分析表明, 土壤有机碳含量、土壤有机碳累积矿化量、铵态氮以及硝态氮均与细菌微多样性呈显著相关性(表 4)。

表 3 3 种不同土壤类型的环境特征差异

Table 3 Differences in the environmental traits of three different soil types

采样时间	样品	土壤有机碳/ ($g \cdot kg^{-1}$)	pH 值	硝态氮/ ($mg \cdot kg^{-1}$)	铵态氮/ ($mg \cdot kg^{-1}$)	全氮/ ($g \cdot kg^{-1}$)
2019 年	TS	8.19 ± 0.08^a	8.37 ± 0.01^a	14.55 ± 0.35^a	2.07 ± 0.19^b	0.75 ± 0.04^a
	LS	7.51 ± 0.33^b	8.38 ± 0.03^a	12.44 ± 0.67^b	2.79 ± 0.18^a	0.75 ± 0.02^a
	BS	7.44 ± 0.32^b	8.40 ± 0.04^a	12.47 ± 0.76^b	2.84 ± 0.21^a	0.77 ± 0.03^a
2020 年	TS	8.12 ± 0.13^a	8.42 ± 0.05^a	14.18 ± 0.14^a	2.11 ± 0.20^b	0.75 ± 0.03^a
	LS	7.65 ± 0.25^b	8.39 ± 0.03^a	12.50 ± 0.65^b	2.81 ± 0.08^a	0.77 ± 0.04^a
	BS	7.42 ± 0.17^b	8.41 ± 0.03^a	12.61 ± 0.82^b	2.95 ± 0.05^a	0.74 ± 0.03^a
2021 年	TS	8.20 ± 0.16^a	8.41 ± 0.05^a	14.11 ± 1.37^a	2.24 ± 0.43^b	0.74 ± 0.02^a
	LS	7.50 ± 0.22^b	8.40 ± 0.04^a	12.97 ± 0.38^b	2.84 ± 0.23^a	0.74 ± 0.04^a
	BS	7.45 ± 0.26^b	8.40 ± 0.05^a	11.94 ± 0.31^b	2.80 ± 0.26^a	0.76 ± 0.03^a

注: 不同时期同列不同字母表示显著差异性 ($p < 0.05$), 表中数据为平均值 \pm 标准差 ($n = 6$)。

表 4 Mantel 分析揭示的细菌微多样性与环境特征相关性
Table 4 Bacterial microdiversity correlates with environmental traits revealed by Mantel analysis

环境特征	微多样性
pH 值	0.15
土壤有机碳累积矿化量	0.17*
全氮	-0.05
硝态氮	0.27*
铵态氮	-0.17*
土壤有机碳含量	0.21*

注: * 表示 $p < 0.05$ 水平上显著相关。

3 讨论

3.1 根际和非根际土壤中的细菌群落结构

研究结果表明,土壤细菌群落结构无论是在 OTUs 水平还是在 ASVs 水平,均表现为根据土壤类型划分和聚集(图 1)。此外,通过 Mantel 分析比较两种分类学分辨率水平,结果显示细菌群落结构在 OTUs 水平和在 ASVs 水平之间具有良好一致性(Mantel test, $p < 0.001$, $R = 0.975$)。通常在对微生物群落结构的研究中,基于给定目标基因区域,精确核苷酸序列即单核苷酸变体被推荐作为基本单元去定义物种及分类^[11]。因此,先前有研究通过野外取样检测微生物群落结构来评价 OTUs 水平和 ASVs 水平是否展现出不同的生态结果。正如 Glassman 等^[22]所报道的结果,微生物群落结构通过 OTUs 和 ASVs 两种方式展示出相似的生态结果,而 ASVs 方式仅仅是增加了微生物多样性的分辨率。这与我们的结果相一致且结果表明我们通过对比 OTUs 和 ASVs 两种分辨率水平足以得到有意义的生态结论。

TS, LS 和 BS 土壤中的细菌群落主要由 Proteobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria, Gemmatimonadetes, Actinobacteria, Chloroflexi, Nitrospirae 和 Verrucomicrobia 构成(图 2)。在玉米根际土壤 TS 中 Proteobacteria 占 43.6%, Bacteroidetes 占 17.9%。而在非根际土壤 BS 中 Proteobacteria 占 36.1%, Bacteroidetes 占 12.6%。类似的,在非根际土壤 LS 中 Proteobacteria 占 35.2%, Bacteroidetes 占 12.3%。这与之前所报道的结果相一致,即细菌门 Proteobacteria 和 Bacteroidetes 在玉米根际更丰富^[6,23]。通常情况下从物种的生长策略来看, Proteobacteria 和 Bacteroidetes 被视为 r-策略者, r-策略者主要利用易分解以及生物有效性高的碳源,又或者被视为快速生长的机会主义者其群落会随着环境是否利于生长而波动^[24]。此外,有研究表明 r-策略者有能力利用根系分泌的各种有机碳基质作为能量来

源^[25]。在本研究中,我们观察到在非根际土壤 BS 中 Acidobacteria 占 13.6%, Chloroflexi 占 6.4% 以及 Verrucomicrobia 占 6.8%。类似的,在非根际土壤 LS 中 Acidobacteria 占 13.1%, Chloroflexi 占 6.1% 以及 Verrucomicrobia 占 5.6%。然而在根际土壤 TS 中 Acidobacteria 占 10.2%, Chloroflexi 占 4.3% 以及 Verrucomicrobia 占 1.1%。这表明 Acidobacteria, Chloroflexi 和 Verrucomicrobia 在非根际土壤中更丰富(图 2)。此前有研究表明, Acidobacteria, Chloroflexi 和 Verrucomicrobia 被认为是 K-策略者,而 K-策略者或缓慢生长的微生物丰度通常在非根际土壤中较根际土壤中更高^[6]。总的来说,我们的结果表明根际和非根际土壤微生物群落结构通过 OTUs 和 ASVs 两种方式显示出相似的结果,而 ASVs 在更高分类学分辨率水平上揭示微生物群落结构。r-策略和 K-策略两种不同生长策略物种的相对丰度差异是导致根际和非根际土壤微生物群落结构不同的主要因素。

3.2 根际和非根际土壤中的细菌微多样性

当关注于相对丰度最高的前 3 条 OTUs 时,我们观察到了每条 OTUs 中都包含了多条 ASVs,而每条 ASVs 分别代表了不同的菌株或者生态型(表 2)。结果表明运用 ASVs 分类学分辨率水平揭示了存在于 OTUs 内的微多样性。这与之前的研究结果相一致,即在玉米各生育期的根际土壤以及根际和非根际土壤之间均发现土壤微生物微多样性普遍存在^[26-27]。一般认为,微多样性的产生取决于一系列生物机制,包括横向的基因转移、单个核苷酸的多态化、其他基因组突变,同时多种环境因素驱动了微多样性的产生,如温度、养分、碳底物等^[10]。此外,研究结果表明微多样性在 TS 土壤中明显高于 LS 和 BS 土壤(图 3)。通常情况下,根系能够分泌各种有机底物从而根本上改变根际土壤中的生化环境^[1,5]。得益于基因的转移和重组,微生物依赖于基因的多样性去适应高度异质的根际环境^[10]。有研究表明玉米根际高度异质的环境因素影响了根际微生物单个种群的种内基因多样性^[27]。而种内基因多样性导致了成百上千共存的生态型占据了不同的生态位以避免过度竞争^[28]。正如之前研究所报道的,高度异质的玉米根际环境不仅仅招募了根际土壤所有微生物物种当中的部分物种,而且招募了单一物种内的一些特殊生态型或菌株^[26-27]。实际上,在所得到的所有 OTUs 中,尽管不是每一条 OTUs 都包含不同的 ASVs。但是微多样性在 OTUs 中的确普遍存在。总之,我们的研究结果表明在 ASVs 分类学水平上揭示了普遍存在于 OTUs 内的微多样性。且受到根际分泌物的影响,根

际土壤中的微多样性与非根际土壤中的微多样性具有显著差异。

3.3 根际和非根际土壤细菌微多样性与环境特征相关

本研究中,我通过培养试验观察到 TS, LS 和 BS 3 种土壤类型的有机碳矿化速率均表现出随时间延长而逐渐降低,且 TS 土壤有机碳累积矿化量显著高于 LS 和 BS 土壤(图 4)。在培养初期土壤有机碳具有较高的矿化速率且随着培养时间的增加而降低,这一矿化趋势与之前大多数的研究结果相一致^[15-16,29]。而 TS 土壤有机碳累积矿化量显著高于 BS 和 LS 土壤,这一结果与根际土壤有机碳含量和有机碳具有较高的生物有效性有关。例如,根系释放的有机碳量占到植物固定总碳量的 1%~40%,根系分泌物中包含糖、有机酸、氨基酸等初等代谢产物能够被微生物直接利用作为能量来源^[1]。同时这与我们观察到 TS 土壤中有机碳含量显著高于 LS 和 BS 土壤的结果相一致(表 3)。此外,我们的研究结果显示 TS 土壤的硝态氮含量显著高于 BS 和 LS 两种土壤类型,而铵态氮在 TS 土壤中含量显著低于 LS 和 BS 土壤(表 3)。一般而言,由于根系吸收养分从而形成了土壤养分含量从根表到土壤延伸的梯度变化^[1,30]。从根表向土壤延伸 5 mm 的范围被认为是受根系影响最大的区域^[1,30]。这支持了本研究中 TS 土壤中的有机碳,铵态氮和硝态氮与 LS 和 BS 土壤具有显著差异的结果。表明 TS 土壤主要受到根系影响而根系对 BS 和 LS 土壤影响较弱。通常养分从土壤向根系移动主要通过质流和扩散两种作用^[1]。因此,TS 土壤的硝态氮含量显著高于 BS 和 LS 两种土壤可能是由于硝态氮在土壤溶液中的含量较高且主要通过质流作用在根表累积。同时,由于根际微生物受根系影响将根际土壤中的有机氮矿化产生的硝态氮也是导致 TS 土壤硝态氮含量显著高于 BS 和 LS 两种土壤的重要因素^[1]。相反,铵态氮在 TS 土壤中含量显著低于 LS 和 BS 土壤可能是由于铵态氮在土壤溶液中的含量较低且移动主要通过扩散作用,因此在根表形成了亏缺区域。此外,我们的研究结果显 TS, LS 和 BS3 种土壤类型的理化性质差异受时间的影响较小(即 2019, 2020, 2021 年 3 个采样时间点之间差异不显著),而受空间的影响显著(即从根表到非根际)。表明根系是导致田间成熟玉米根际和非根际土壤理化性质差异的主要因素而非时间。正如之前所报道的,根系及其各种分泌物导致根际成为高选择性的环境不仅导致根际和非根际土壤理化性质的差异同时形成了从根表到非根际土壤的养分梯度,水分梯度,酶梯度和生物梯度等^[1,5]。

在本研究中,土壤细菌微多样性与土壤有机碳、硝态氮以及铵态氮具有显著相关性(表 4)。这一结果表明微多样性的产生受到环境因素的驱动^[10,31]。同时,本试验的结果表明土壤有机碳矿化累积量与细菌微多样性显著正相关(表 4)。本课题组之前的研究结果表明,土壤细菌的群落结构及其多样性与土壤有机碳矿化具有相关性^[31]。类似的,微生物群落结构和多样性与土壤有机碳矿化具有相关性在之前的研究中也广泛地报道^[14,23,24]。而在本试验中,土壤细菌微多样性与土壤有机碳矿化具有相关性,而这种相关性的产生可能是因为根际分泌物不仅仅影响土壤细菌微多样性,且改变了环境中的有机碳含量及其生物有效性,导致根际细菌微多样性与非根际细菌微多样性产生差异的同时提高了根际土壤的有机碳矿化量,而非根际土壤则不受影响。

4 结论

总的来说,OTUs 和 ASVs 两种方式在揭示根际或者非根际土壤细菌群落结构时显示出相似性,而根际和非根际土壤之间的细菌群落结构具有显著差异。r-策略和 K-策略两种不同生长策略物种的相对丰度差异是导致根际和非根际土壤细菌群落结构不同的主要因素。ASVs 在更高分类学分辨率水平上揭示田间生长条件下的成熟玉米根际和非根际土壤中细菌群落微多样性普遍存在于 OTUs 内。在 ASVs 分类学分辨率水平上,受到根际分泌物影响,根际土壤中的微多样性与非根际土壤中的微多样性具有显著差异。根系是田间成熟玉米根际和非根际土壤理化性质差异的主要因素而非时间。细菌微多样性与土壤有机碳、硝态氮以及铵态氮具有显著的相关性。通过培养试验表明,根际土壤有机碳矿化量显著高于非根际土壤。且根际和非根际土壤细菌微多样性与相应的土壤有机碳累积矿化量有关。

[参 考 文 献]

- [1] Kuzyakov Y, Razavi B S. Rhizosphere size and shape: Temporal dynamics and spatial stationarity [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 135:343-360.
- [2] 张利,邱松,刘建霞,等.植物根际土壤生态研究进展[J]. *四川农业科技*, 2021(7):39-40.
- [3] 姜涛.氮肥运筹对夏玉米产量、品质及植株养分含量的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2013, 19(3):559-565.
- [4] 程扬,刘子丹,沈启斌,等.秸秆生物炭施用对玉米根际和非根际土壤微生物群落结构的影响[J]. *生态环境学报*, 2018, 27(10):1870-1877.
- [5] Fan Kunkun, Cardona C, Li Yuntao, et al. Rhizosphere-

- associated bacterial network structure and spatial distribution differ significantly from bulk soil in wheat crop fields [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017,113:275-284.
- [6] Peiffer J A, Spor A, Koren O, et al. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110 (16):6548-6553.
- [7] 高贵锋,褚海燕.微生物组学的技术和方法及其应用[J]. *植物生态学报*,2020,44(4):395-408.
- [8] 钟辉,刘亚军,王滨花,等.分析方法对细菌群落 16S rRNA 基因扩增测序分析结果的影响[J]. *生物技术通报*,2022,38(6):81-92.
- [9] Koeppl A F, Wu M. Surprisingly extensive mixed phylogenetic and ecological signals among bacterial Operational Taxonomic Units [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013,41(10):5175-5188.
- [10] Larkin A A, Martiny A C. Microdiversity shapes the traits, niche space, and biogeography of microbial taxa [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2017,9(2): 55-70.
- [11] Callahan B J, McMurdie P J, Holmes S P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis [J]. *The ISME Journal*, 2017,11(12):2639-2643.
- [12] Martiny A C, Treseder K, Pusch G. Phylogenetic conservatism of functional traits in microorganisms [J]. *The ISME Journal*, 2013,7(4):830-838.
- [13] Smith P, Fang Changming, Dawson J J C, et al. Impact of global warming on soil organic carbon [M]. *Advances in Agronomy*. Amsterdam: Elsevier, 2008:1-43.
- [14] Blagodatskaya E, Kuzyakov Y. Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: Critical review [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2008,45(2): 115-131.
- [15] 莫朝阳,张鑫林,杨京平.根际激发效应对土壤有机碳累积及分解的影响[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*,2021,47(4):527-533.
- [16] 李晓月.根际土壤不同形态碳、氮的含量及特性研究 [D].陕西 杨凌:西北农林科技大学,2011.
- [17] 杨泽良,李萍芳,薛涛,等.玉米根际土壤微生物群落结构及多样性季节变化特征[J]. *西南农业学报*,2020,33 (5):1001-1010.
- [18] Page A L, Miller R H, Keeney D R. *Methods of soil analysis (part II)*[J]. American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.
- [19] Cui Yongxing, Bing Haijian, Fang Linchuan, et al. Diversity patterns of the rhizosphere and bulk soil microbial communities along an altitudinal gradient in an alpine ecosystem of the Eastern Tibetan Plateau [J]. *Geoderma*, 2019,338:118-127.
- [20] Lundin D, Severin I, Logue J B, et al. Which sequencing depth is sufficient to describe patterns in bacterial α - and β -diversity? [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2012,4(3):367-372.
- [21] Garcia-Garcia N, Tamames J, Linz A M, et al. Microdiversity ensures the maintenance of functional microbial communities under changing environmental conditions [J]. *The ISME Journal*, 2019,13(12):2969-2983.
- [22] Glassman S I, Martiny J B H. Broad-scale ecological patterns are robust to use of exact sequence variants versus operational taxonomic units [J]. *mSphere*, 2018,3(4):e00148-e00118.
- [23] Huang Yuhong, Liu Yue, Geng Jun, et al. Maize root-associated niches determine the response variation in bacterial community assembly and function to phthalate pollution [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 429:128280.
- [24] Fierer N, Bradford M A, Jackson R B. Toward an ecological classification of soil bacteria [J]. *Ecology*, 2007, 88(6):1354-1364.
- [25] Philippot L, Raaijmakers J M, Lemanceau P, et al. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(11):789-799.
- [26] Di Cello F, Bevivino A, Chiarini L, et al. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (11):4485-4493.
- [27] Dalmastri C, Chiarini L, Cantale C, et al. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations [J]. *Microbial Ecology*, 1999,38(3):273-284.
- [28] Foster K R, Schluter J, Coyte K Z, et al. The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash [J]. *Nature*, 2017,548(7665):43-51.
- [29] Fu Xianheng, Song Qilong, Li Shiqing, et al. Dynamic changes in bacterial community structure are associated with distinct priming effect patterns [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2022,169:108671.
- [30] Kandeler E, Marschner P, Tschirko D, et al. Microbial community composition and functional diversity in the rhizosphere of maize [J]. *Plant and Soil*, 2002,238(2): 301-312.
- [31] 黄耀,刘世梁,沈其荣,宗良纲.环境因子对农业土壤有机碳分解的影响[J]. *应用生态学报*,2002,13(6):709-714.