应用生态学报 2017年11月 第28卷 第11期 http://www.cjae.net
Chinese Journal of Applied Ecology, Nov. 2017, **28**(11): 3740-3750 DOI: 10.13287/j.1001-9332.201711.033

毛竹种植对土壤细菌和真菌群落结构及多样性的影响

赵天心 毛新伟 程 敏 陈俊辉 秦 华 李永春 梁辰飞 徐秋芳*
(浙江农林大学环境与资源学院, 浙江省森林生态系统碳循环与固碳减排重点实验室, 浙江临安 311300)

摘 要 为揭示天然林改为毛竹林过程中土壤微生物变化规律,在浙江省湖州市安吉县和长兴县两地选择不同种植历史的粗放经营毛竹林,分层采集0~20和20~40 cm的混合土壤样品,应用PCR-DGGE技术分析土壤细菌和真菌群落结构及多样性变化.结果表明:在马尾松林改种毛竹林或毛竹林入侵杂灌阔叶林形成毛竹纯林过程中,土壤细菌和真菌的群落结构均发生明显变化,且细菌结构对毛竹种植的响应更敏感;随着毛竹生长时间的延长,表层土壤细菌群落表现出抵抗干扰、最后向改种毛竹之前状态恢复的趋势.毛竹种植时间、样地和土层均对土壤细菌和真菌多样性产生显著影响,其中样地和土层的影响明显大于种植时间.土壤性质和细菌、真菌结构的冗余分析结果表明,不同地点、不同土层驱动土壤微生物结构随时间变化的主要因子没有一致规律,且第1、2轴对样地变化的解释率大多低于65.0%,说明除本研究分析的5个土壤化学指标外,可能还有其他土壤理化性质共同驱动微生物结构的变化.

关键词 毛竹; 种植时间; 粗放经营; 土壤细菌和真菌群落; 多样性; DGGE; 速效钾; 有效磷

Effects of *Phyllostachys edulis* cultivation on soil bacterial and fungal community structure and diversity.

ZHAO Tian-xin, MAO Xin-wei, CHENG Min, CHEN Jun-hui, QIN Hua, LI Yong-chun, LIANG Chen-fei, XU Qiu-fang* (*Zhejiang Provincial Key Laboratory of Carbon Cycling in Forest Ecosystems and Carbon Sequestration, School of Environment and Resources, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an* 311300, *Zhejiang, China*).

Abstract: This study examined how soil bacterial and fungal communities responded to the cultivation history of Moso bamboo in Anji and Changxing counties, Huzhou, Zhejiang, China. Soil samples (0-20 and 20-40 cm) were taken from bamboo plantations subjected to different cultivation histories and analyzed the community structures of soil bacterial and fungal by PCR-DGGE methods. It was found that soil bacterial and fungal communities varied greatly with the development of bamboo plantations which converted from Masson pine forest or formed via invading adjacent broadleaf shrub forest. Soil bacterial community structures exhibited a greater response to bamboo cultivation time than fungal community, but bacteria structure of surface soil displayed an ability of resiliency to disturbance and the tendency to recover to the original state. The cultivation time, sampling site and soil layer significantly affected the biodiversity of soil bacteria and fungi, especially the latter two factors. Redundancy analysis (RDA) of soil properties and bacteria or fungi communities showed that there were no accordant factors to drive the alteration of microbial structure, and the first two axes explained less than 65.0% of variance for most of the sampling sites and soil layers, indicating there existed soil parameters besides the five examined that contributed to microbial community alteration.

Key words: *Phyllostachys edulis*; cultivation history; extensive management; soil bacterial and fungal communities; diversity; DGGE; available K; available P.

本文由国家自然科学基金项目(31570602)和浙江省自然科学基金重点项目(LZ16C160002)资助 This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31570602) and Key Project of Zhejiang Natural Science Foundation, China (LZ16C160002).
2017-02-07 Received, 2017-08-11 Accepted.
* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xuqiufang@zafu.edu.cn

土壤微生物群落是土壤生物区系中最重要的功能组分之一，在生态系统中起着重要作用.土壤微生物参与有机质分解、驱动养分循环、活化土壤中的营养元素，被看作是土壤有效养分的源和汇[1].微生物对养分的利用状况反映土壤质量的重要特性[2]，并控制着 CO_2、CH_4和 N_2O 等温室气体的排放[3-4].

毛竹(*Phyllostachys edulis*)隶属禾本科竹亚科刚竹属，是我国重要经济竹种，具有生长快、产量高、用途广的特点.第八次全国森林资源清查(2009—2013年)结果显示，我国竹林面积达 601 万 hm^2，其中毛竹林的面积为 443 万 hm^2，占竹林面积的 70.0%左右，并且还将继续增加.毛竹林演替是毛竹林面积迅速扩大的重要原因.随着毛竹林面积的不断扩大，中国主要竹产区的植被类型以及整个生态系统养分循环将发生显著变化.植被类型是影响土壤微生物分布和多样性的重要因素之一.不同植物的凋落物和根系分泌物中碳的质量差异可影响土壤微生物的群落组成[3]和微生物生物量[5].徐秋芳[6]研究发现，毛竹林土壤有机质含量与阔叶林没有差别，但高于杉木(*Cunninghamia lanceolata*)林和马尾松(*Pinus massoniana*)林，且毛竹林土壤腐殖质的结构明显不同于杉木林、马尾松林和阔叶林.产生这一差异的原因可能与地上植被结构和生物量有关，地上植被种植引起的土壤微生物群落结构和多样性改变可能是影响土壤有机质积累或消耗的关键因素.

目前，毛竹纯林面积增加的途径主要有 2 条，一是人为改造其他林分，二是毛竹入侵其他林分并替代原有林[7].占土壤微生物物种数 70%～80%的细菌以及具有生物量优势的真菌是有机质转化的主体.浙江省天目山自然保护区毛竹入侵天然林最终替代天然林后，土壤微生物脂肪酸总量增加，微生物的群落结构也发生变化[7-8].天然马尾松林改种毛竹短期(5 年)内微生物量和多样性下降，而随着时间的增加逐渐恢复，至 25 年时逐渐恢复到改造前(马尾松林)水平；马尾松林与毛竹林土壤微生物的群落结构差异明显，毛竹纯林种植时间越长其微生物类群与其他林分差异越大[8].为了更好地揭示毛竹纯林形成、发展过程中土壤细菌和真菌群落的结构变化，本研究分别选择 2 种途径不同形成时间的粗放经营毛竹林，并以原来的林分为对照，利用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(DGGE 法)研究毛竹纯林土壤细菌和真菌群落结构以及土壤理化性质的变化，为毛竹林发展过程中生态功能的变化评价提供理论依据.

1　研究区域与研究方法

1.1　研究区概况

研究区一位于浙江省湖州市安吉县孝丰镇(30°23′—30°52′ N，119° 14′—119° 53′ E)，该地属于北亚热带季风气候，年平均气温 15 ℃，年均降水量1485 mm，年均日照时数 2005 h，无霜期 226 d.毛竹林栽培区属低山丘陵地貌，土壤母质为粉砂和细砂混合岩.毛竹林由马尾松林砍伐后改种而成，最初种植毛竹时施用少量化肥，之后则以冬季劈除林下灌草的粗放经营为主，每隔一年挖笋砍竹.

研究区二位于浙江省湖州市长兴县煤山镇(30°43′—31°11′ N，119°33′—120°06′ E)，属亚热带季风气候，年平均气温 15.6 ℃，年均降水量 1309 mm，年均日照时数 1810.3 h.土壤母质为粉砂岩，土层厚，石砾少.毛竹林是通过毛竹入侵阔叶杂木、并替代阔叶林后形成的纯林，以冬季劈除林下灌草的粗放经营为主，每隔一年挖笋砍竹，无施肥史.

1.2　样品采集与处理

2013 年 10 月，在安吉县按照生态控制原则和实际生产情况，选择 4 个不同种植年限的粗放经营毛竹林：5 年(5Y，营造年份为 2008 年)、9 年(9Y，营造年份为 2004 年)、15 年(15Y，营造年份为 1998 年)和 18 年(18Y，营造年份为 1995 年)，同时选择种植毛竹前立地条件相似的马尾松林作为对照(CK)，共计 5 个梯度.首先分别确定 3 个标准样地，在每个标准样地中按一定距离设置 3 个剖面，去除表层落叶等杂物后分层采集表层(0～20 cm)和亚表层(20～40 cm)土壤样品，将相同土层的 3 份土壤样品混合为 1 个样品，最终同一种植年限的毛竹林分别形成 3 个重复的表层和亚表层土壤样品.2014 年 6 月，在长兴县选择毛竹入侵后形成的 5 个时间梯度的样地，以未入侵的阔叶杂木林为对照(CK)，毛竹纯林生长时间分别为 5 年(5Y)、12 年(12Y)、20 年(20Y)和 50 年(50Y).按照上述方法采集 0～20 和 20～40 cm 土壤样品，样品混匀后过 2 mm 筛，按四分法分成两份分别装入无菌塑料袋，置于冰上带回实验室.

所有样品均分为两份，一份冷冻干燥后置于 −70 ℃保存，用于 DNA 提取；另一份自然风干后用于土壤理化性质分析.

1.3　DNA 提取与引物合成

土壤微生物总 DNA 采用 DNA 提取试剂盒 Power Soil® DNA Isolation Kit(Mo Bio，美国)提取；

牛血清白蛋白(20 mg · mL^{-1})购自 Takara(大连);细菌和真菌通用引物由生工生物工程(上海)有限公司合成.

1.4 土壤化学性质分析

土壤化学性质分析参照文献[9]进行.土壤 pH 值采用 1 ∶ 2.5 土水比,用酸度计(Mettler Toledo Seveneasy, 瑞典)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;有机质含量采用重铬酸钾容量法测定;速效钾采用醋酸铵浸提-火焰光度计测定;全氮采用凯氏定氮法测定.

1.5 土壤细菌和真菌的变性梯度凝胶电泳(DGGE)

DGGE 方法参照文献[10]进行.细菌 PCR 扩增所用引物为 968F-GC 和 1401R,扩增片段长约 432 bp;真菌 PCR 扩增所用引物为 FR1-GC 和 FF390,扩增片段长约 400 bp.20 μL 反应体系如下:10 × Premix Taq 10 μL,引物(10 μmol · L^{-1})各 0.2 μL,模板 DNA 0.3 μL,牛血清白蛋白(BSA, 20 mg · mL^{-1})0.2 μL,用无菌双蒸水补足至 20 μL.细菌的 PCR 反应参数:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 1 min,50 ℃退火1 min,72 ℃延伸 1 min,30 个循环,最后 72 ℃延伸10 min.真菌的 PCR 反应参数:95 ℃预变性 8 min,95 ℃变性 30 s,50 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 2 min,30 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min.反应均设置阴性对照组,取 4 μL PCR 产物经 1.0%(m/v)琼脂糖凝胶电泳检测产物及其纯度.

应用 DCode™ Universal Mutation Detection System(Bio-Rad),将细菌的扩增产物在 6.0%的聚丙烯酰胺、变性梯度为 45.0%~60.0%凝胶上进行电泳;将真菌的扩增产物在 8.0%的聚丙烯酰胺、变性梯度为 45.0%~60.0%凝胶上进行电泳[100.0%变性胶含有 7 mol · L^{-1}尿素和 40.0%(v/v)去离子甲酰胺].细菌和真菌的电泳过程条件一致:胶厚度为 1 mm、电泳缓冲液为 1×TAE、60 ℃、80 V 电泳 13 h,SYBR green Ⅰ 染色 30 min,用 Gel Doc™ EQ 凝胶成像系统(Bio-Rad, USA)拍照保存.

1.6 数据处理

数据处理参照文献[10].采用 Microsoft Excel 2013 软件对数据进行处理和绘图,采用 SPSS 18.0 分析相关性(Pearson 法),DGGE 图谱经 Quantity One 4.5.1 (Bio-Rad, USA)软件数字化,并采用 Shannon 多样性指数(H)对土壤细菌和真菌多样性进行分析,其计算公式为:

$$H = -\sum (n_i/N)\ln(n_i/N)$$

式中:n_i为每条电泳条带光密度峰值;N 是同一泳道中所有条带光密度峰值总和;电泳条带光密度峰值通过 Quantity One 软件获取.

根据 DGGE 图谱中条带的数目及光密度值通过 BIO-DAP 程序计算样品的 Shannon 指数.以单因素和多因素方差分析评估时间梯度、土层深度以及采样地点对 Shannon 指数的影响,均值的多重比较检验采用 LSD 最小显著极差法(α=0.05).基于相同土层不同种植时间的细菌和真菌 DGGE 结果和土壤性质,应用 CANOCO 4.5 软件(Microcomputer Power, Ithaca, USA)进行冗余分析(RDA).

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质变化

安吉县不同种植时间毛竹林土壤化学性质变化见表1.马尾松林改种毛竹后表层土壤pH上升,种

表 1 安吉县不同种植年限(Y)毛竹林土壤化学性质

Table 1 Soil chemical properties of Moso bamboo stands with different cultivation years (Y) in Anji County (mean±SD)

土层 Soil layer (cm)	处理 Treatment	pH (H_2O)	有机碳 Organic C (g · kg^{-1})	碱解氮 Available N (mg · kg^{-1})	有效磷 Available P (mg · kg^{-1})	速效钾 Available K (mg · kg^{-1})
0~20	CK	4.51±0.05b	25.11±1.26b	137.10±42.70a	0.64±0.15d	40.00±7.20bc
	5Y	4.61±0.08ab	33.55±0.93a	102.20±3.90b	1.97±0.41a	67.00±8.20a
	9Y	4.88±0.15a	22.84±3.68c	93.12±3.70b	1.95±0.43a	41.00±5.00c
	15Y	4.71±0.12a	24.48±1.10b	93.95±20.40b	1.49±0.85b	45.70±3.20b
	18Y	4.63±0.06ab	20.31±2.45c	70.15±5.10c	1.23±0.25c	44.70±5.90b
20~40	CK	4.51±0.03b	14.83±1.33a	44.57±0.86b	1.29±0.11b	31.00±2.65b
	5Y	4.68±0.03ab	14.32±0.90ab	45.64±4.93b	4.23±1.94a	48.00±1.00a
	9Y	4.79±0.00a	13.83±1.23abc	65.43±2.42a	2.64±0.73ab	26.67±0.58c
	15Y	4.75±0.15a	11.94±0.63bc	50.81±4.74b	1.26±0.58b	34.50±3.50b
	18Y	4.65±0.05ab	11.52±0.64c	46.93±0.82b	1.26±0.41b	33.00±2.00b

同列不同字母表示差异显著(P<0.05) Different letters in the same column meant significant difference at 0.05 level. 下同 The same below.

植第 9 年和 15 年时明显高于对照；表层土壤在经营初期(5Y)有机碳、有效磷和速效钾的含量显著增加，而碱解氮则明显下降.毛竹纯林种植 18 年时土壤有机碳、碱解氮和有效磷含量显著低于其他种植年限样地，速效钾则与对照无显著差异.亚表层土壤除碱解氮外大多数化学性质变化规律与表层土壤相似，土壤碱解氮的最大值出现在第 9 年且显著高于其余样品.相关性分析结果表明，安吉县表层有机碳与速效钾含量之间呈极显著正相关，pH 和有效磷含量呈显著正相关；亚表层土壤碱解氮含量分别与 pH 和速效钾呈显著正相关，速效钾和有效磷呈显著正相关.

长兴县不同种植时间毛竹林土壤化学性质变化见表 2.不同时间毛竹林表层土壤 pH 均无显著差异；有机碳含量在第 5 年和第 20 年时较高且显著高于其他样品；速效钾在前 20 年含量逐渐下降，第 50 年时又显著上升；第 5 年时碱解氮含量显著下降，之后随着经营时间的增加含量逐渐回升，但仍低于对照.亚表层土壤有机碳含量变化规律与表层相似，速效钾和有效磷含量在第 5 年时显著上升，碱解氮含量在第 5 年时最低.相关性分析表明，长兴县毛竹林表层土壤有机碳与碱解氮含量呈显著正相关，亚表层土壤有机碳分别与碱解氮和速效钾呈极显著正相关.

2.2　基于 PCR-DGGE 的细菌群落结构及多样性

PCR-DGGE 是一种半定量方法，理论上图谱中一个条带对应一个物种，条带亮度可表达对应物种丰度，亮度越大丰度越高.通过对安吉县毛竹林表层土壤细菌结果分析发现，15 个样品共扩增出 35 个条带，大多数条带均为所有样品的共性条带，其中条带 5、12、15、16 亮度大，为所有土壤的优势菌种(图 1).改种 5 年时条带亮度与对照差别不大，但平均条带数量比对照多 3 条，说明马尾松改种毛竹林后短期内土壤表层细菌原来物种丰度没有受到影响，反而增加了新物种；而 9 年之后则随着毛竹种植时间增加条带数量和亮度逐渐下降，亮度下降特别明显的有条带 6、8、9、18，说明在改种毛竹的 18 年时间内，随着毛竹纯林时间的增加土壤细菌的群落结构发生了明显变化.长兴县毛竹林表层土壤 15 个样品共计 38 个条带，毛竹改种 50 年时条带数(33)多于其他处理(27~29).改种 5 年时多数条带的亮度增加，之后随着毛竹纯林时间的增加整体亮度下降，说明毛竹入侵形成纯林后在短期内对表层土壤的细菌数量起到促进作用，而随着时间的增加细菌数量逐渐下降.表层土壤共有 9 条共性条带，且随着时间增加总体呈下降趋势，其中亮度最大的条带 15 下降最明显，50 年时其亮度已与其他条带没有区别.

安吉县毛竹林亚表层土壤的条带数量随着种植时间表现为先增加后下降的变化规律，与表层土壤相似；亚表层土壤细菌 DGGE 条带数少于表层土壤；随着毛竹纯林种植时间增加条带亮度也逐渐变弱，但下降的幅度不如表层土壤明显.长兴县亚表层土壤细菌的变化规律与安吉县略有不同，对照 CK 的条带亮度明显低于 5 年的毛竹纯林，之后随着毛竹种植时间的增加条带数和亮度呈下降趋势，20 年时最少，50 年时略有恢复.除对照外，亚表层土壤的条带数量和亮度均高于表层土壤.

根据土壤细菌 PCR-DGGE 图谱中条带位置和亮度的数值化信息计算 Shannon 指数(表 3).为了进一步揭示影响土壤细菌多样性的因素，进行了毛竹种植时间梯度、土层和样地的 3 因子方差分析，结果表明，样地、土层以及种植时间梯度对土壤细菌多

表 2　长兴县不同种植年限(Y)毛竹林土壤化学性质

Table 2　Soil chemical properties of Moso bamboo stands with different cultivation years (Y) in Changxing County (mean±SD)

土层 Soil layer (cm)	处理 Treatment	pH (H_2O)	有机碳 Organic C ($g \cdot kg^{-1}$)	碱解氮 Available N ($mg \cdot kg^{-1}$)	有效磷 Available P ($mg \cdot kg^{-1}$)	速效钾 Available K ($mg \cdot kg^{-1}$)
0~20	CK	5.14±0.37a	10.74±1.02b	224.9±8.48a	2.39±0.34b	27.56±4.88b
	5Y	5.36±0.12a	20.09±2.06a	135.7±12.65d	2.54±0.32b	23.24±1.94b
	12Y	5.07±0.23a	10.96±1.76b	158.0±5.88c	2.72±0.58b	24.66±2.88b
	20Y	5.42±0.04a	10.75±0.94b	184.7±13.00b	5.90±0.97a	20.98±1.88b
	50Y	5.16±0.15a	17.46±0.79a	176.7±4.73bc	2.63±0.74b	39.39±5.84a
20~40	CK	4.99±0.16a	5.68±1.78b	127.7±15.67a	9.34±0.90a	16.49±3.64c
	5Y	5.17±0.25a	12.79±2.10a	74.4±1.91b	2.59±0.65b	25.39±4.18b
	12Y	5.07±0.17a	7.53±2.59b	109.1±4.87a	2.66±0.84b	22.76±0.82bc
	20Y	4.99±0.06a	5.43±1.44b	127.3±7.17a	2.55±1.90b	19.15±1.84bc
	50Y	4.97±0.18a	14.00±3.11a	109.1±9.74a	5.41±1.79b	34.87±2.13a

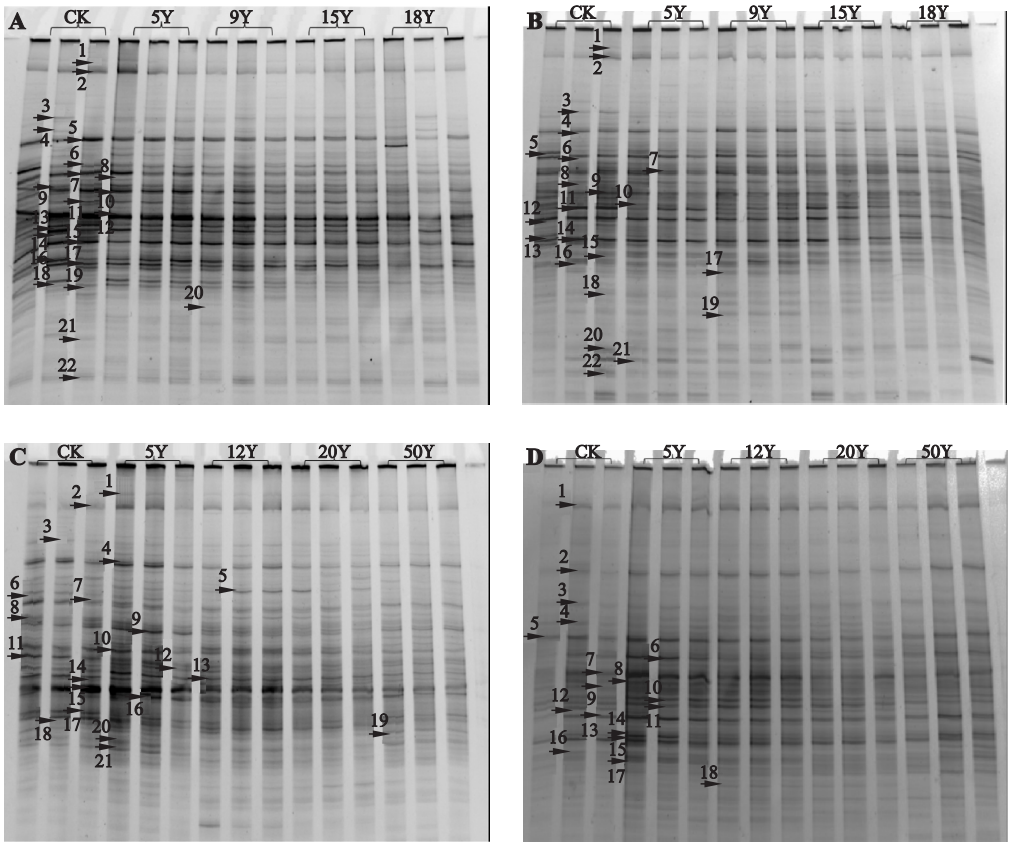


图 1 毛竹林不同种植年限(Y)土壤细菌群落结构的 DGGE 图谱

Fig.1 DGGE fingerprints of soil bacterial communities in bamboo stands with different cultivation years (Y).

A、B 分别为安吉县毛竹林表层和亚表层土壤 A and B indicated surface and subsurface soil of bamboo stands in Anji County, respectively; C 和 D 分别为长兴县毛竹林表层和亚表层土壤 C and D indicated surface and subsurface soil of bamboo stands in Changxing County, respectively. 图中带箭头的阿拉伯数字为条带编号 Arabic number with arrow indicated serial DGGE band. 下同 The same below.

表 3 毛竹林种植年限、样地和土层(3 因子)对土壤细菌和真菌 Shannon 多样性指数的影响结果

Table 3 Effect results of cultivation years, sampling sites and soil layers (Three-way ANOVA) on biodiversity indices of soil bacteria and fungi

F 值 *F* value	样地 Site (L)	土层深度 Soil depth (SD)	时间梯度 Time gradient (G)	L×SD	SD×G	L×G	L×SD×G
细菌 Bacteria	60.22**	90.02**	3.98**	105.00**	0.62	0.30	1.98
真菌 Fungi	38.78**	36.39**	5.30**	21.30**	0.64	0.32	1.59

* $P<0.05$; ** $P<0.01$.

多样性指数的影响均达极显著水平,其中样地和土层的 *F* 值远大于毛竹种植时间梯度,样地和土层的双因子交互作用的 *F* 值大于独立作用,而时间梯度分别与样地及土层的双因子交互作用、以及三者的 3 因子交互作用均不显著.

冗余分析(RDA)能反映样方(平面散点)之间的相互关系、以及样方与环境因子的关系.为了揭示毛竹种植时间对土壤细菌结构的影响,以毛竹林土壤细菌 DGGE 条带位置和相对光密度信息为因变量、土壤化学性质为变量进行冗余分析,箭头连线长度越长表示该环境因子与样本分布相关性越大,即对所有样本的分布格局影响最大;变量箭头连线与样点到坐标中心连线之间的夹角越小,表示该环境因子与样点关系越密切,连线越长对该样地细菌或真菌结构影响越大.安吉县表层土壤第 1 排序轴和第 2 排序轴分别解释了样本中 35.5% 和 24.8% 的变异(图 2);第 1 排序轴上依次分布着第 1 组 CK 和 18Y、第 2 组 5Y、第 3 组 9Y 和 15Y,同一组的土壤细菌结构相似度大.CK 和种植时间最长的 18Y 在第 2 排序轴上被进一步区分,说明仍存在微小差异.土壤性质的箭头连线长度依次为有效磷、碱解氮和 pH,其中有效磷的影响达到了显著水平,对样地变异的解释为 14.0%(表 4).有效磷、pH 与 9Y、15Y 土壤细菌结构关系密切,随着有效磷含量增加,沿第 1 轴依

表 4　不同环境变量对毛竹林土壤细菌和真菌群落的解释

Table 4　Explanation of different environmental factors affecting the communities of soil bacteria and fungi in *Phyllostachys edulis* stands (%)

项目 Item	样地 Site	土层深度 Soil layer (cm)	pH (H_2O)	有机碳 Organic C	碱解氮 Available N	有效磷 Available P	速效钾 Available K	合计 Total
细菌	安吉县	0~20	8	6	10	14	6	44
Bacteria	Anji County	20~40	7	9	12	4	5	37
	长兴县	0~20	8	21	12	7	3	51
	Changxing County	20~40	6	5	9	11	16	47
真菌	安吉县	0~20	9	7	9	11	7	43
Fungi	Anji County	20~40	8	9	8	6	10	41
	长兴县	0~20	12	13	13	11	6	55
	Changxing County	20~40	5	9	6	17	16	53

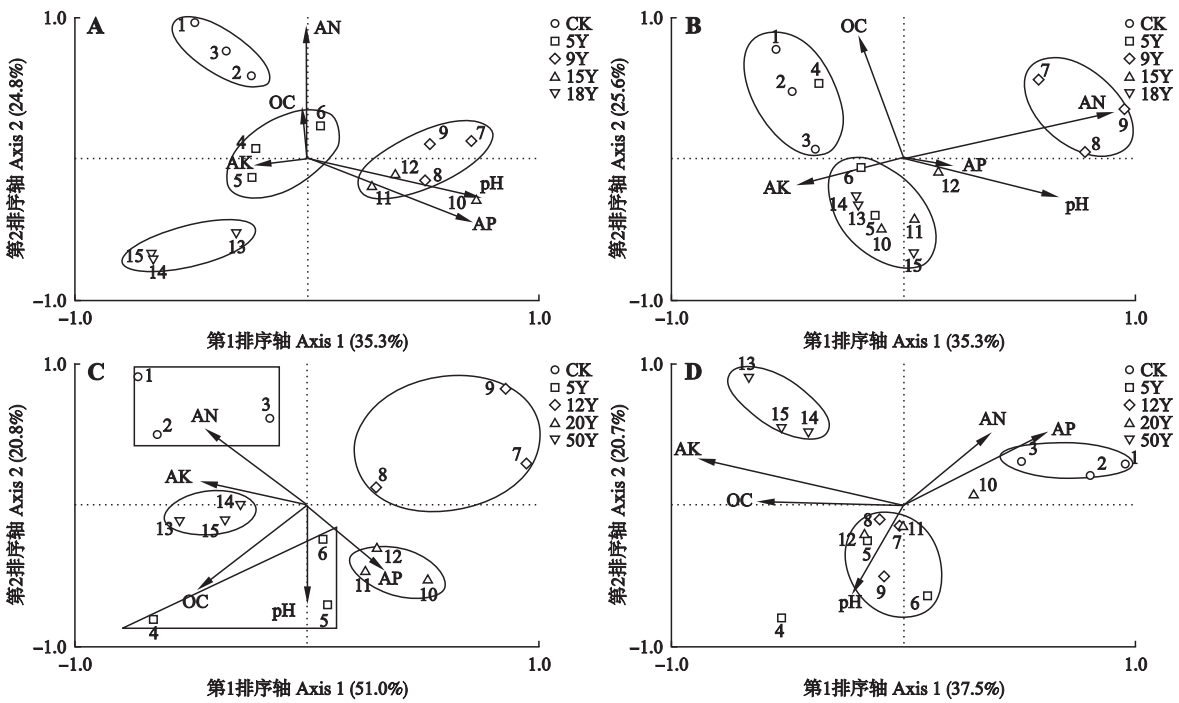


图 2　毛竹林土壤化学性质与细菌群落结构的冗余分析

Fig.2　Redundancy analysis of soil chemical properties and bacterial community in *Phyllostachys edulis* stands.

AN：碱解氮 Available N；AK：速效钾 Available K；OC：有机碳 Organic C；AP：有效磷 Available P. 下同 The same below.

次出现第 1 组(CK 和 18Y)、第 2 组(5Y)和第 3 组(9Y 和 15Y).安吉县亚表层土壤第 1、2 排序轴解释的变量情况与表层土壤相似,第 1 排序轴将 9Y 与其他土壤明显区分,第 2 排序轴又将 CK 与 15Y 和 18Y 区分.与表层不同,亚表层土壤碱解氮的箭头最长,且与 9Y 土壤的细菌结构关系密切,对样地变异的解释为 12.0%,但没有达到显著水平.

长兴县毛竹林表层土壤第 1、第 2 排序轴共解释的样本的总变异最高(71.8%),解释率最高的是碱解氮(12.0%).不同种植时间样地分布的相互关系与安吉县有相似之处,对照与毛竹种植 50Y 在第 1 排序位置距离最近,两者的细菌群落结构相似;12Y 样地与所有土壤指标的相关度小或者负相关;有机质的解释率最高,为 21.0%,但没有达到显著水平.长兴县毛竹林亚表层土壤第 1 和第 2 排序轴共解释了样本中 58.2%的总变异,速效钾对样地土壤细菌结构变化的影响达到显著水平,对样地变异的解释为 16.0%.50Y 一组,与速效钾关系密切;5Y、12Y 和 20Y 为第 2 组,与土壤 pH 关系密切;第 3 组对照与碱解氮以及有效磷关系密切.说明随着毛竹种植时间增加,土壤细菌结构逐渐演变.

2.3　基于 PCR-DGGE 的真菌群落结构及多样性

安吉县毛竹林 15 个土壤表层样品共检测到 25 个真菌条带(图 3),CK、5Y、9Y 和 18Y 的条带数差异不大.前期不同处理之间虽然数量上差别不大,但条带位置发生了变化.除共性条带5随着毛竹种植

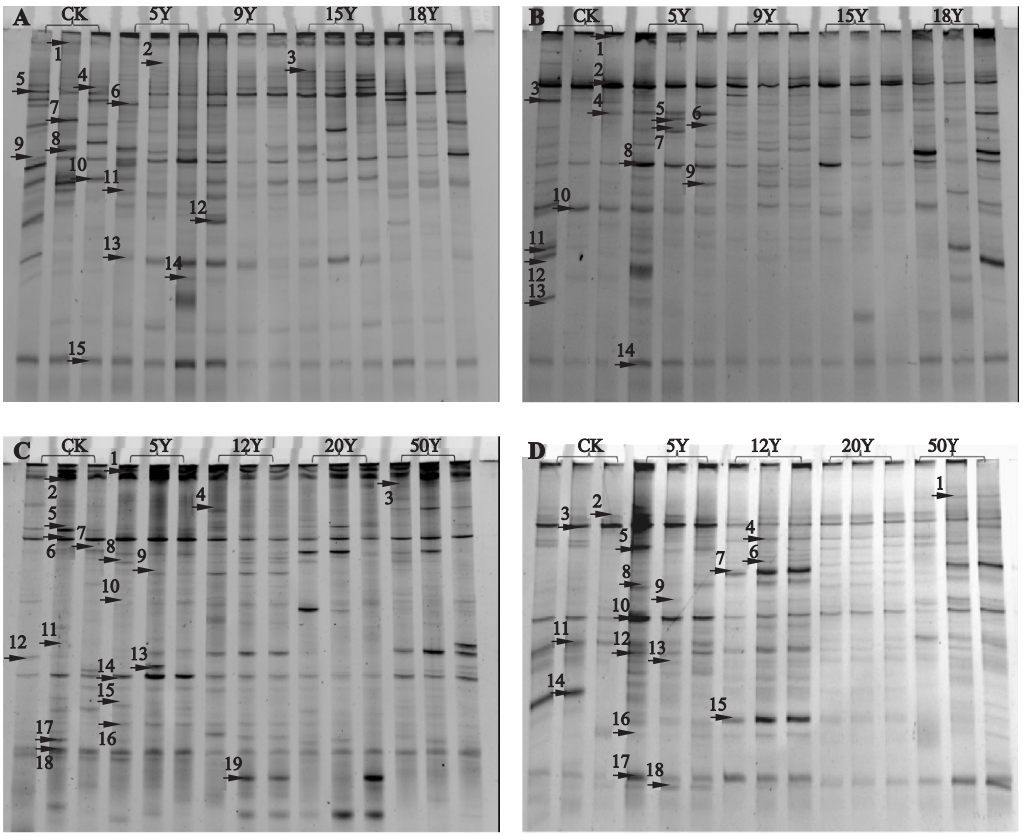


图 3 毛竹林不同种植年限(Y)土壤真菌群落结构的 DGGE 图谱

Fig.3 DGGE fingerprints of soil fungal communities in bamboo stands with different cultivation years (Y).

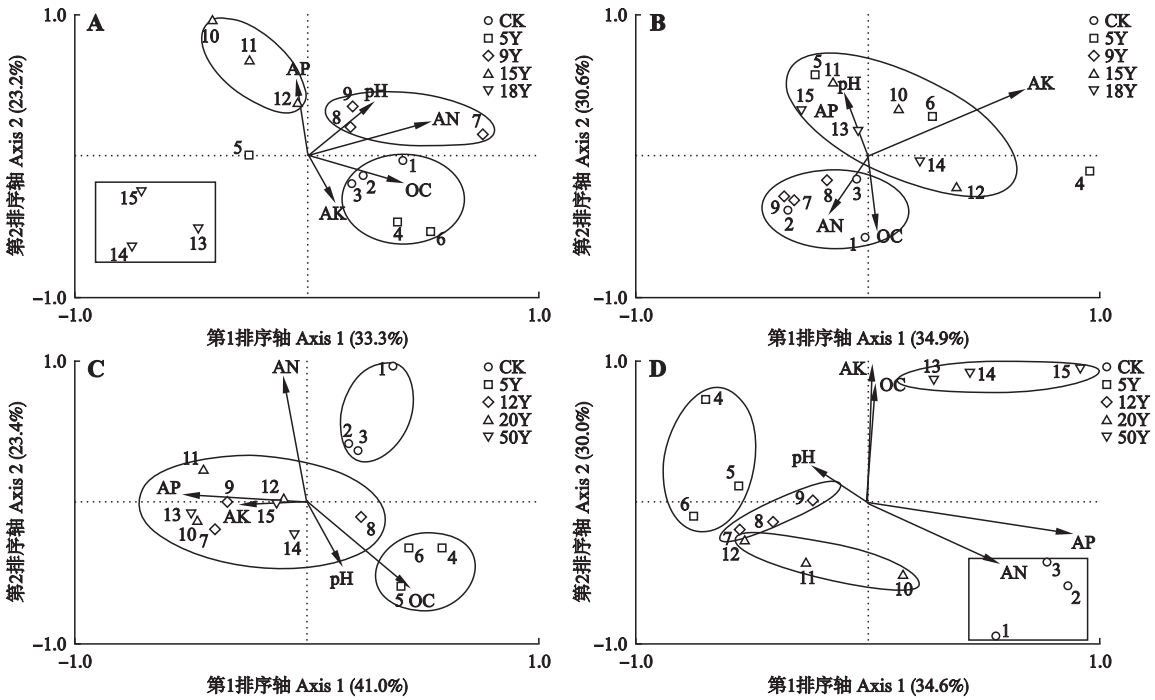


图 4 毛竹林土壤性质与真菌群落结构的冗余分析

Fig.4 Redundancy analysis of chemical properties and fungal community of soils in *Phyllostachys edulis* stands.

时间增加外,其余共性条带不同处理中亮度变化规律性不明显.总体上毛竹种植 9 年之后条带整体亮度呈逐渐下降趋势,说明了土壤真菌的丰度呈下降趋势.长兴县毛竹林 15 个表层土壤样品共检测到 28

个条带，5Y、12Y 和 50Y 最多，20Y 与对照最少，说明改种毛竹林后表层土壤真菌物种数量增加；条带 12 在 50Y 土壤中亮度最大.

安吉县毛竹林亚表层土壤 15 个样品共检测到 19 个真菌条带，其中 18Y 最高，平均达 17.0 条.亮度最大的共性条带 2 出现在所有样品中，随着毛竹纯林时间的增加优势减弱.长兴县毛竹林 15 个亚表层样品共检测到 24 个条带，20Y 和 50Y 所有条带亮度均有所下降.

对毛竹种植时间、土层和样地的 3 因子方差分析结果与细菌相似，土壤真菌多样性指数同样受样地、土层以及种植时间的极显著影响，但样地和土层对土壤真菌多样性指数影响不如细菌，相反种植时间对真菌的影响大于细菌；样地和土层两者对细菌和真菌的交互作用均达到极显著水平，而种植时间分别与样地及土层的双因子交互作用以及三者的 3 因子交互作用均不显著(表 3).

冗余分析表明，第 1、2 排序轴共解释了安吉县表层土壤样本 56.5%的总变异(图 4)，几个土壤性质箭头长度及解释率差别不大(表 4)，说明对样本分布的影响度比较均匀.CK、5Y 和 9Y 分布在第 1 排序轴的右侧，15Y 和 18Y 在左侧；种植时间最长的样地(18Y)与其他样地的差异最大，与所有性质呈负相关.安吉县亚表层土壤真菌第 1、2 排序轴共解释了样本 65.5%的总变异；样品分为两组，CK 和 10Y 一组，与碱解氮和有机碳关系密切；其余样地为一组，与 pH、有效磷和速效钾关系密切.

长兴县表层土壤真菌第 1、2 排序轴共解释了样本中 64.4%的总变异(图 4)，所有样品可分为 CK、5Y 和其余样地 3 组.长兴县亚表层土壤真菌第 1、第 2 排序轴共解释了样本 64.6%的总变异，样品在第 1 排序轴上可分为两组，CK 和 50Y 分布在右侧，说明毛竹种植时间达到 50Y 时亚表层土壤真菌结构相比其他时间更加接近 CK；综合第 1 排序和第 2 排序轴的距离，5Y 和 CK 两者相距最远，说明改种毛竹短期内土壤真菌结构发生较大变化.速效钾和有效磷的影响达到了显著和极显著水平，对样地变异的解释分别为 16.0%和 17.0%.

3　讨　　论

影响土壤微生物多样性和群落结构变化的因素很多，其中土壤水分、养分、有机质和 pH 等是重要因素[11-12].由于土壤中异养微生物占很大比例[4]，因此有机碳的数量和质量是影响微生物，特别是真菌的重要因子[13].毛竹拥有旺盛的生长能力和强大的扩鞭能力[14]，毛竹替代其他森林后最直接的影响主要是植被类型发生转换.安吉县马尾松林砍伐后改种毛竹，土壤翻耕加快了土壤有机质分解.长兴县毛竹入侵杂灌阔叶林则主要通过毛竹根系分泌物以及凋落物分解对土壤有机质产生影响.土壤养分因为毛竹改种前后土壤有机质转化以及植物对养分吸收的差异等间接作用而发生变化.

土壤细菌和真菌的 DGGE 图谱显示，随着毛竹种植时间的增加，土壤细菌和真菌带谱发生了变化.土壤细菌的带谱变化规律较明显，且相同种植时间的几个土壤，即重复之间带谱的相似度较高(图 1)；而不同地区土壤真菌结构随时间的变化规律的一致性以及同一样地的样品的重复性都不如细菌(图 3).RDA 分析中样点的分布格局是土壤性质和细菌或土壤性质和真菌结构综合作用的结果，相同的样地和土壤性质下细菌和真菌的 RDA 分布格局完全不同.毛竹林土壤细菌群落结构的冗余分析结果把所有年龄梯度的样地完全区分开来(图 2)，而土壤真菌群落结构出现 2 个甚至 3 个年龄梯度的样点聚在一起的现象，说明土壤细菌结构比真菌结构对长期毛竹种植响应更敏感.土地利用方式改变土壤微生物群落结构报道不少，Jesus 等[15]和 Wallenius 等[16]发现土地利用方式改变细菌的群落结构，Lupatini 等[17]发现土壤真菌较古菌更易受土地利用影响，真菌也容易受到植被类型和土壤管理的影响[18].以上报道中的不同土地利用对象，其植被类型、生态系统以及相应的土壤差异均较大，如天然草地、天然森林、桉树(*Eucalyptus robusta*)、大豆(*Glycine max*)等[17]，土壤真菌的结构变化明显.本研究从马尾松林改种毛竹林，随着毛竹种植时间的增加，土壤性质变化不明显，对真菌影响小.表层土壤细菌结构变化出现一个共同规律：安吉县和长兴县的对照、5Y 以及种植时间最长样地(安吉县 18Y、长兴县 50Y)分布在第 2 排序轴的同一侧，且对照与最长时间样地距离更近.说明毛竹种植 5 年时土壤细菌结构发生变化但并不显著，之后随着时间增加变化加剧，但随着种植时间的增加，土壤细菌群落表现出向种植毛竹之前的状态恢复的趋势.何冬华等[19]对长期种植毛竹林土壤固氮细菌的研究也发现了类似的规律.事实上，微生物的这种抵抗外界干扰、恢复到初始状态的特殊功能已经在其他许多系统中被证实[20-22].另外，我们的结果也印证了孙棣棣等[8]应用磷脂脂肪酸分析(PLFA)得出的结果，即天然马尾

松林改种毛竹短期(5 年)内微生物量和多样性下降,而随着毛竹栽培时间的增加逐渐恢复,至 25 年时逐渐恢复到改造前(马尾松林)水平.李潞滨等[23]研究也发现,高级别分类水平下毛竹林土壤细菌种群与其他天然林没有差别.然而这种规律没有表现在亚表层的细菌和所有土层的真菌结构中,其原因值得进一步探索.

毛竹种植时间梯度、土层和样地的 3 因子方差分析发现,土层和样地的 F 值明显高于时间梯度的 F 值,说明采样地点、土层差异对土壤细菌和真菌多样性的影响远大于毛竹种植时间,这是因为不同样地和不同土层土壤基本理化性质之间差异远比同一土层因毛竹种植时间导致的土壤性质变化大.多样性指数相对于群落结构而言变化较小的结果与 Bissett 等[24]结果相似,长期不同的土地管理方式改变了土壤细菌、真菌以及古菌组成,但土壤细菌的多样性则没有明显变化.

土壤细菌和真菌结构变化的驱动因子:土壤的多项性质在 5 年时均有显著变化(升高或下降),其中有机质和碱解氮的显著变化发生在除安吉县亚表层以外的所有土壤(表 1、表 2).冗余分析可以揭示土壤性质对微生物结构的影响,安吉县和长兴县表层和亚表层土壤的梯度样地在 RDA 平面图中分布规律不完全一致(图 2、图 4),没有特别明显的 1 个或 2 个因子驱动土壤细菌和真菌结构变化;影响不同土层样点分布规律的主要土壤因子(最长向量)不同,安吉县和长兴县两地 4 个土层中,只有 3 个土层的有效磷和速效钾分别或共同对土壤细菌和真菌的影响达到显著水平,其他因子的影响都没有达到显著水平.原因是毛竹对养分的需求不同于其他树种,毛竹替代其他林分后有效磷和速效钾均发生变化,李永春等[25]和吴家森等[26]在天目山也发现类似现象.刘卜榕等[27]发现毛竹林土壤性质对细菌群落结构的影响大于植被.土壤有机质和碱解氮虽然在第 5 年时变化明显,但从整个时间梯度看对细菌和真菌的群落结构影响不显著.值得注意的是,所有土层土壤 RDA 的第 1、2 排序轴累计解释变量值不高,大部分在 60.0%~65.0%,各个土壤因子的解释率之和也只有 37.0%~57.0%,说明驱动土壤细菌和真菌变化的因子,除了所测的 5 个理化指标以外还有其他因子起作用,如有机碳的品质.研究表明,人工造林或外来植物入侵会影响到森林群落的物种组成、群落结构、生物量分配以及凋落物的数量和质量[28],对土壤有机质的化学组成和微生物的群落结构影响较大[11].毛竹林土壤的水溶性有机物和腐殖质的化学组成与阔叶林、杉木林和马尾松林均存在差异[6].因此,改种毛竹林后土壤有机质化学组成和结构的变化可能是重要因素,有待后续研究证明.从北美洲到南美州的美洲大陆以及北极苔原大尺度范围的研究发现,虽然植被和温度等对土壤微生物有一定影响[29],但 pH 是土壤微生物群落组成、空间分布的关键驱动因子[30-32],其中优势菌门、相对丰度都和 pH 呈显著相关[29,33].然而,本研究中土壤 pH 没有表现出对土壤微生物群落的显著影响,原因是土壤 pH 随着毛竹种植时间变化的幅度太小(小于 1 个单位).

4 结 论

毛竹替代阔叶或马尾松形成纯林后,随着毛竹纯林种植时间的增加土壤细菌和真菌的结构发生变化,且细菌结构对毛竹种植时间响应更敏感,表层土壤细菌群落表现出抵抗干扰、恢复到改种前的结构趋势.多因子方差分析证明,毛竹种植时间、样地和土层均对土壤细菌和真菌多样性产生显著影响,其中样地和土层的影响明显大于种植时间.冗余分析表明,土壤 pH、有机质、碱解氮、有效磷和速效钾含量等 5 个土壤指标对样地变化的解释率大多低于 65.0%,推测可能有其他土壤性质驱动微生物结构的变化;不同地点、不同土层驱动土壤微生物结构随着时间变化的主要因子缺乏一致性,说明是多因子共同作用导致细菌和真菌的结构变化.综合土壤性质、细菌和真菌的结构以及多样性的变化得出结论,安吉县 18 年、长兴县 50 年的毛竹种植对土壤生态功能没有不良影响.

参考文献

[1] Li J, Li Z, Wang F, *et al*. Effects of nitrogen and phosphorus addition on soil microbial community in a secondary tropical forest of China. *Biology and Fertility of Soils*, 2015, **51**: 207-215

[2] Jiang J (蒋 婧), Song M-H (宋明华). Review of the roles of plants and soil microorganisms in regulating ecosystem nutrient cycling. *Chinese Journal of Plant Ecology* (植物生态学报), 2010, **34**(8): 979-988 (in Chinese)

[3] Wang Y-X (王义祥), Weng B-Q (翁伯琦), Huang Y-B (黄毅斌). Effects of land use/cover on soil carbon storage and carbon cycle. *Subtropical Agriculture Research* (亚热带农业研究), 2005, **1**(3): 44-51 (in Chinese)

[4] Huang Q-Y (黄巧云), Lin Q-M (林启美), Xu J-M

(徐建明). Soil Biochemistry. Beijing: Higher Education Press, 2015 (in Chinese)
[5] Liu M-Q (刘满强), Hu F (胡　锋), He Y-Q (何园球), *et al*. Seasonal dynamics of soil microbial biomass and its significance to indicate soil quality under different vegetations restored on degraded red soils. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), 2003, **40**(6): 937-944 (in Chinese)
[6] Xu Q-F (徐秋芳). Study on Labile Organic Carbon Pool in Forest Soils. PhD Thesis. Hangzhou: Zhejiang University, 2003: 1-115 (in Chinese)
[7] Bai S-B (白尚斌), Zhou G-M (周国模), Wang Y-X (王懿祥), *et al*. Plant species diversity and dynamics in forests invaded by Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) in Tianmu Mountain Nature Reserve. *Biodiversity Science* (生物多样性), 2013, **21**(3): 288-295 (in Chinese)
[8] Sun D-D (孙棣棣), Xu Q-F (徐秋芳), Tian T (田甜), *et al*. Investigation on soil microbial biomass and structure in *Phyllostachys edulis* plantations with increasing cultivation time. *Scientia Silvae Sinicate* (林业科学), 2011, **47**(7): 181-185 (in Chinese)
[9] Lu R-K (鲁如坤). Soil and Agricutural Chemistry Analysis. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999 (in Chinese)
[10] He D-H (何冬华), Shen Q-L (沈秋兰), Xu Q-F (徐秋芳), *et al*. Evolvement of structure and abundance of soil nitrogen-fixing bacterial community in *Phyllostachys edulis* plantations with age of time. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), 2015, **52**(4): 934-942 (in Chinese)
[11] Jiao X-G (焦晓光), Gao C-S (高崇升), Sui Y-Y (隋跃宇), *et al*. Research on soil microbial ecology under different soil organic matter levels in farmland. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2011, **44**(18): 3759-3767 (in Chinese)
[12] Van der Putten WH. Impacts of soil microbial communities on exotic plant invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 2010, **25**: 512-519
[13] Barberán A, McGuire KL, Wolf JA, *et al*. Relating belowground microbial composition to the taxonomic, phylogenetic, and functional trait distributions of trees in a tropical forest. *Ecology Letters*, 2015, **18**: 1397-1405
[14] Cai L (蔡　亮), Zhang R-L (张瑞霖), Li C-F (李春福), *et al*. A method to inhibit the expansion of *Phyllostachys pubescens* stands based on the analysis of underground rhizome. *Journal of Northeast Forestry University* (东北林业大学学报), 2002, **31**(5): 68-70 (in Chinese)
[15] Jesus ED, Marsh TL, Tiedje JM, *et al*. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *ISME Journal*, 2009, **3**: 1004-1011
[16] Wallenius K, Rita H, Mikkonen A, *et al*. Effects of land use on the level, variation and spatial structure of soil enzyme activities and bacterial communities. *Soil Biology & Biochemistry*, 2011, **43**: 1464-1473
[17] Lupatini M, Jacques RJ, Antoniolli ZI, *et al*. Land-use change and soil type are drivers of fungal and archaeal communities in the Pampa biome. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, **29**: 223-233
[18] Kasel S, Bennett LT, Tibbits J. Land use influences soil fungal community composition across central Victoria, southeastern Australia. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, **40**: 1724-1732
[19] He D-H (何冬华), Chen J-H (陈俊辉), Xu Q-F (徐秋芳), *et al*. Effects of intensive management on abundance and composition of soil N_2-fixing bacteria in *Phyllostachys heterocycla* stands. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2015, **26**(10): 2961-2968 (in Chinese)
[20] Lekberg Y, Schnoor T, Kjøller R, *et al*. 454-sequencing reveals stochastic local reassembly and high disturbance tolerance within arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Journal of Ecology*, 2012, **100**: 151-160
[21] Frenk S, Hadar Y, Minz D. Resilience of soil bacterial community to irrigation with water of different qualities under Mediterranean climate. *Environmental Microbiology*, 2014, **16**: 559-569
[22] Stres B, Philippot L, Faganeli J, *et al*. Frequent freeze-thaw cycles yield diminished yet resistant and responsive microbial communities in two temperate soils: A laboratory experiment. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, **74**: 323-335
[23] Li L-B (李潞滨), Liu M (刘　敏), Yang S-Z (杨淑贞), *et al*. Cultivable microbial diversity at the rhizosphere of *Phyllostachys pubescens*. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2008, **48**(6): 772-779 (in Chinese)
[24] Bissett A, Richardson AE, Baker G, *et al*. Long-term land use effects on soil microbial community structure and function. *Applied Soil Ecology*, 2011, **51**: 66-78
[25] Li Y-C (李永春), Liang X (梁　雪), Li Y-F (李永夫), *et al*. Effects of *Phyllostachys edulis* invasion of native broadleaf forest on soil fungal community. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2016, **27**(2): 585-592 (In Chinese)
[26] Wu J-S (吴家森), Jiang P-K (姜培坤), Wang Z-L (王祖良), *et al*. The effects of *Phyllostachys pubescens* expansion on soil fertility in National Nature Reserve of Mount Tianmu. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* (江西农业大学学报), 2008, **30**(4): 689-692 (in Chinese)
[27] Liu B-R (刘卜榕), Xu Q-F (徐秋芳), Qin H (秦华), *et al*. Bacterial community structure in soils under four main types of vegetation in subtropical area. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), 2012, **49**(6): 1185-1193 (in Chinese)
[28] Hawkes CV, Wren IF, Herman DJ, *et al*. Plant invasion alters nitrogen cycling by modifying the soil nitrifying community. *Ecology Letters*, 2005, **8**: 976-985
[29] Chu H, Fierer N, Lauber CL, *et al*. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environmental Microbiology*, 2010, **12**: 2998-3006
[30] Xu Y-G (徐永刚), Yu W-T (宇万太), Ma Q (马

强), *et al*. Effects of long-term fertilizations on microbial biomass C and N and bacterial community structure in an aquic brown soil. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2010, **21**(8): 2078-2085 (in Chinese)

[31] Staddon WJ, Trevors JT, Duchesne LC, *et al*. Soil microbial diversity and community structure across a climatic gradient in western Canada. *Biodiversity and Conservation*, 1998, **7**: 1081-1092

[32] O'Donnell AG, Seasman M, Macrae A, *et al*. Plants and fertilisers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant and Soil*, 2001, **232**: 135-145

[33] Lauber CL, Hamady M, Knight R, *et al*. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied & Environmental Microbiology*, 2009, **75**: 5111-5120

作者简介 赵天心, 男, 1992 年生, 硕士研究生. 主要从事土壤生物与生物化学研究. E-mail: 857936436@qq.com

责任编辑 肖 红