

# 不同施肥模式对雷竹林土壤真菌群落特征的影响

陈志豪<sup>1</sup> 梁雪<sup>1</sup> 李永春<sup>1\*</sup> 李永夫<sup>1</sup> 徐秋芳<sup>1</sup> 邬奇峰<sup>2</sup> 李松昊<sup>2</sup> 沈振明<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>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/亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江临安 311300; <sup>2</sup>临安市农林技术推广中心, 浙江临安 311300)

**摘要** 为探明施肥处理对雷竹林土壤真菌群落特征的影响, 采用末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)和荧光定量PCR技术, 分析有机肥(M)、化肥(CF)、化肥配施有机肥(CFM)、化肥配施有机肥加覆盖(CFMM)及不施肥(CK)处理土壤真菌群落结构和数量特征。结果表明: 施肥显著影响真菌群落结构与多样性, 表层(0~20 cm)土壤中M、CFMM处理与CK, 亚表层(20~40 cm)土壤中CF、CFMM处理与CK之间真菌群落结构均存在明显差异; 且表层土壤中CF、CFMM处理真菌Shannon指数和均匀度指数显著低于CK。M、CFM处理表层土壤真菌数量显著高于CK。土壤有机质、全氮、铵态氮和速效钾含量显著影响了真菌群落结构的变异; 全氮、铵态氮、硝态氮含量与真菌数量均呈显著正相关。表明雷竹林表层和亚表层土壤中真菌群落对施肥处理的响应存在明显差异, 表层土壤真菌群落明显受有机质添加的影响, 而亚表层则对化肥投入较为敏感; 施肥对真菌群落多样性的影响主要集中在表层土壤。

**关键词** 施肥模式; 土壤真菌; 雷竹林; 群落特征; 土层

**Effects of different fertilization regimes on soil fungal communities under *Phyllostachys violascens* stand.** CHEN Zhi-hao<sup>1</sup>, LIANG Xue<sup>1</sup>, LI Yong-chun<sup>1\*</sup>, LI Yong-fu<sup>1</sup>, XU Qiu-fang<sup>1</sup>, WU Qi-feng<sup>2</sup>, LI Song-hao<sup>2</sup>, SHEN Zhen-ming<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Zhejiang Provincial Key Laboratory of Carbon Cycling in Forest Ecosystems and Carbon Sequestration/Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture/School of Environmental and Resources, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; <sup>2</sup>Lin'an Extending Station for Agriculture and Forestry Technique, Lin'an 311300, Zhejiang, China).

**Abstract:** In order to investigate the effect of fertilization on soil fungal community of *Phyllostachys violascens* stand, we characterized the abundance and community structure of soil fungi using the methods of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and real-time quantitative PCR. The experimental treatments included blank control (CK), chemical fertilizer (CF), organic manure (M), mixture of chemical fertilizer and organic manure (CFM) and mixture of chemical fertilizer and organic manure plus mulching (CFMM). The results showed that fungal community structure and diversity were markedly affected by different fertilization regimes. In 0–20 cm soil layer, CF and CFMM treatments resulted in a significant reduction of Shannon and evenness indices. Soil fungi under CK, M, CFMM treatments in 0–20 cm soil layer and CK, CF, CFMM treatments in 20–40 cm soil layer formed independent community structures. Soil fungal abundance showed significantly positive correlation with the concentrations of soil total nitrogen, ammonium nitrogen and nitrate nitrogen. Organic matter, ammonium nitrogen, available phosphorus and available nitrogen concentrations were the main factors that influenced the variation of fungal community composition. The above findings indicated that 0–20 cm and 20–40 cm soil layers had different characteristics in response to different fertilization regimes under *P. violascens* stand. The soil fungal community in the 0–20 cm layer was mainly affected by soil organic matter, while that in the 20–40 cm layer

本文由国家自然科学基金项目(31200473, 31470626)、浙江省自然科学基金项目(LY15C160006, LY14C160007)和浙江省教育厅科研项目(Y201225759)资助 This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31200473, 31470626), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (LY15C160006, LY14C160007) and the Science Foundation of Education Department of Zhejiang Province, China (Y201225759).

2016-07-29 Received, 2017-01-04 Accepted.

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: ycli@zafu.edu.cn

was sensitive to the input of chemical fertilizer. The effect of fertilization on the diversity of fungal community mainly occurred in the 0–20 cm soil layer.

**Key words:** fertilization mode; soil fungi; *Phyllostachys violascens* stand; community characteristic; soil layer.

竹林生态系统不仅是我国森林资源的重要组成部分,也是陆地生态系统中重要的碳汇和碳源<sup>[1]</sup>.雷竹是分布在我国南方的优良笋用竹种,具有成林快、出笋早、笋期长的特点,由于经济价值较高,近 20 多年来越来越多水稻田被改种为雷竹林<sup>[2]</sup>.施肥是雷竹林丰产培育的重要经营措施之一,长期施肥不仅造成了土壤酸化<sup>[3]</sup>、退化<sup>[4]</sup>等一系列生态问题,也导致竹笋硝酸盐含量严重超标<sup>[5]</sup>,从而影响了雷竹林可持续生产.已有研究表明,长期施肥尤其是施用化肥<sup>[6]</sup>导致了土壤氮素过饱和、氮素流失等一系列生态环境问题<sup>[7]</sup>.目前,雷竹林集约经营模式下氮肥的利用率不足 30%,大量氮肥过剩导致土壤中氮含量总体上呈增加趋势<sup>[8]</sup>.

有机质具有保持和供应铵态氮、硝态氮,促进氮素矿化的作用,且在酸性条件下更有利于转化成矿物质氮<sup>[9]</sup>.养分和微生物是土壤肥力和生产力的两个最重要的指标,微生物作为有机质分解和氮素矿化的“工程师”,其种类和密度对氮素矿化有强烈的控制作用<sup>[10]</sup>.研究表明,水稻田改种雷竹林后土壤细菌 Shannon 指数增加,但长期集约经营模式下细菌多样性先增加后大幅降低<sup>[11]</sup>.真菌与植被间有着复杂且密切的相互关系,对植物的生长发育起至关重要的作用<sup>[12]</sup>.真菌在自然生态系统中作为分解者,不但有利于植物吸收氮磷等营养元素,在促进土壤团聚体形成、改良土壤结构等方面的作用也不容忽视<sup>[13]</sup>.施肥能通过改变植物生理、土壤营养状况等条件,从而改变土壤真菌群落结构<sup>[14]</sup>,土壤真菌的多样性和群落结构与土壤碳含量显著相关<sup>[15–16]</sup>.有研究表明,在酸性森林土壤等特定生态系统中,真菌在氮素转化过程中起重要作用<sup>[17]</sup>.然而在酸化现象日益严重的雷竹林土壤中,不同的施肥方式如何影响真菌群落结构及多样性,特别是真菌在有机质分解、氮素转化过程中扮演的角色尚不得而知.

施肥在一定程度上改变了土壤结构与化学组成,该过程中肥料类型、施用方式、土壤类型以及利用方式都会对土壤真菌群落结构与多样性产生影响<sup>[18–19]</sup>.有研究表明,不同肥料的施用对土壤真菌多样性的影响不明显<sup>[20]</sup>;但也有研究认为,与单施化肥相比,长期施用有机肥不仅能改善土壤微生态

环境,也显著提高了真菌群落的多样性<sup>[21]</sup>; Qin 等<sup>[22]</sup>研究也表明,雷竹林土壤真菌群落能够快速响应于集约经营措施,然而不同施肥方式对雷竹林土壤真菌群落及多样性的影响尚鲜见报道.真菌的遗传多样性是真菌结构和功能多样性的基础,决定着真菌在土壤中的作用<sup>[23]</sup>.为此,本文拟采用 T-RFLP 与荧光定量 PCR 等技术分析不同施肥方式对雷竹林土壤真菌群落特征的影响,探讨不同施肥处理对雷竹林表层和亚表层土壤真菌群落结构、多样性和数量的影响方式及其与土壤化学性质的关联,为雷竹林科学施肥和可持续生产提供科学依据.

## 1 研究地区与研究方法

### 1.1 研究区概况与样地设置

试验地为浙江省临安市太湖源镇(30°17'58" N, 119°34'02" E),试验区为典型亚热带季风气候.年均气温 16 °C,年降水量 1550 mm,降雨主要集中在夏季,无霜期 236 d,全年日照时数为 1900 h.站点海拔 185 m,研究区土壤类型以红壤为主.试验地原为水稻田后改种为雷竹林,移栽建成竹林历时 5 年,期间没有施加任何肥料.于 2010 年 6 月起设置不同施肥处理试验,共 5 个处理:1) 不施肥 (CK); 2) 单施有机肥 (M); 3) 单施化肥 (CF); 4) 化肥配施有机肥 (CFM); 5) 化肥配施有机肥加覆盖 (CFMM).本文中施用的有机肥为雷竹专用有机肥,主要成分:50% 畜禽粪便,20% 山核桃外蒲壳基质,其他为蛭石等添加剂;其中,全 N 1.55%,全 P 2.96%,全 K 1.24%.采用随机区组设计,重复 3 次,共 15 个小区(小区面积为 10 m×10 m).覆盖指在当年 12 月施肥并覆盖一层稻草,在稻草上覆盖砻糠,持续到次年 4 月移除砻糠,CFMM 处理是目前雷竹林常见的集约经营模式.各处理具体施肥的用量与种类见表 1,施肥于每年 5、9、12 月分次进行.

### 1.2 土壤样品采集与处理

于 2015 年 6 月在每个小区中,按 5 点取样法分层采集土壤样本.具体方法如下:先去除地表凋落物及残留覆盖物等,然后分别采集 0~20 与 20~40 cm 的土壤样品,并将每个小区中分层采集的土样过 2 mm 筛后混匀为一个混合样,5 个不同处理 2 个土

表 1 不同处理的施肥量

Table 1 Fertilization rate in different treatments

处理 Treatment	每次施肥量 Fertilization rate of each time ( $\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ )			
	尿素 Urea	磷肥 Phosphate fertilizer	钾肥 Potassium fertilizer	有机肥 Organic manure
CK	0	0	0	0
M	0	0	0	7500
CF	438	438	438	0
CFM、CFMM	800	333	367	3750

CK: 对照 Control; CF: 单施化肥 Chemical fertilizer only; M: 单施有机肥 Organic manure only; CFM: 化肥配施有机肥 Chemical fertilizer with organic manure; CFMM: 化肥配施有机肥加覆盖 Chemical fertilizer with organic manure plus mulching. 下同 The same below.

层共计得到 30 个混合土样。将新鲜土样用冰盒带回实验室并分为两份,一份置于室内自然风干,研磨过筛后用于土壤理化性质分析;另一份立即冷冻干燥保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,用于提取土壤微生物总 DNA。

### 1.3 分析方法

**1.3.1 土壤化学性质** 参照《土壤农化分析》<sup>[24]</sup>中的方法。采用复合电极测定土壤 pH 值,水土比为 5:1;采用  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7\text{-H}_2\text{SO}_4$  外加热法测定土壤有机质;半微量凯氏法测定全氮;靛酚蓝比色法测定铵态氮;镀铜镉还原-重氮化偶合比色法测定硝态氮;碱解扩散法测定碱解氮;采用 Bray 法,  $\text{HCl-NH}_4\text{F}$  溶液浸提,钼锑抗比色法测定有效磷;用  $\text{NH}_4\text{Ac}$  提取,火焰光度计法测定速效钾。

**1.3.2 土壤微生物总 DNA 提取** 采用 PowerSoil™ 总 DNA 提取试剂盒提取土壤微生物总 DNA,称取 0.3 g 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中的土壤样品,按试剂盒说明书过程提取总 DNA;用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测所提取的 DNA 片段大小,提取得到的 DNA 样品保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

**1.3.3 土壤真菌群落分析** 采用 T-RFLP 方法分析雷竹林土壤真菌群落,ITS 序列 PCR 扩增采用引物 ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) 和 ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC),上游引物 (ITS1F) 的 5'端用 FAM 荧光标记。反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ,其中 Premix 10  $\mu\text{L}$ ,模板 DNA 0.3  $\mu\text{L}$ ,引物各 0.2  $\mu\text{L}$ ,Bovine Serum Albumin 0.2  $\mu\text{L}$ ,无菌超纯水 9.1  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:94  $^{\circ}\text{C}$ ,5 min;94  $^{\circ}\text{C}$ ,1 min,51  $^{\circ}\text{C}$ ,1 min;72  $^{\circ}\text{C}$ ,1 min,循环 32 次,72  $^{\circ}\text{C}$ ,10 min。PCR 产物纯化后,用限制性内切酶 Hinf I 进行酶切,反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ,其中酶 1  $\mu\text{L}$ ,纯化产物 8  $\mu\text{L}$ ,缓冲液 2  $\mu\text{L}$ ,超纯水 9  $\mu\text{L}$ 。酶切程序为:37  $^{\circ}\text{C}$ ,4 h;65  $^{\circ}\text{C}$ ,20 min。酶切产物用 ABI3730 进行扫描,分析软件为 Peak

Scanner Software 1.0。

**1.3.4 土壤真菌数量的定量分析** 采用荧光染料掺入法 (SYBR green) 进行 qPCR 来测定真菌数量。采用 SYBR Premix ExTaq™ 试剂盒 (Takara),使用 Bio-Rad CFX96 C1000™ Thermal Cycler 仪器对土壤真菌进行荧光定量 PCR 扩增,每份 DNA 样品 3 次重复。荧光定量 PCR 反应体系 20  $\mu\text{L}$ ,SYBR Premix ExTaq™ 10  $\mu\text{L}$ ,引物 (50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各 0.2  $\mu\text{L}$ ,模板 1.0  $\mu\text{L}$ ,超纯水 8.6  $\mu\text{L}$ 。PCR 引物为 NS1 (GTAGT-CATATGCTTGTC) 和 Fung (CATFCCCCGTTAC-CCGTTG),qPCR 反应条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,40 个循环。用 Nanodrop® ND-1000 测定质粒 DNA 浓度并计算真菌 18S rRNA 基因拷贝数。质粒 DNA 浓度为 123.6  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,以 10 倍梯度对重组质粒进行梯度稀释 ( $10^{-3} \sim 10^{-8}$ ),每个梯度 3 个重复,通过 qPCR 扩增获得 18S rRNA 基因标准曲线。扩增效率为 96.7%~96.8%,溶解曲线为单一峰,表层、亚表层土壤真菌基因 qPCR 相关系数分别为 1 和 0.9993。

### 1.4 数据处理与统计分析

使用 SPSS 23.0 统计软件进行双因素方差分析和 Pearson 相关分析。用 Peak Scanner 软件分析各样品的 T-RFLP 图谱,去除 T-RF<50 bp 的引物峰以及相对峰面积<1%的杂峰。将筛选后的数据在网站 <http://trex.biohpc.org/index.aspx> 上进行过滤,将图谱中每一个可统计的 T-RF,视为一个 OTU (operational taxonomic unit),每个 OTU 至少代表一种类型的真菌。将条带信息提交到 MICA 网站 (<http://mica.ibest.uidaho.edu/pat.php>) 进行在线比对,确定真菌 T-RFs 的种属分类。样品的丰富度指数 (Shannon index)、均匀度指数 (evenness index) 以及优势度指数 (Simpson index) 均通过 BIO-DAP 软件 (<http://nhsbig.inhs.uiuc.edu/Wes/population.html>) 计算。采用 Canoco for Windows 4.5 软件 (Microcomputer Power, Ithaca, USA) 对土壤真菌 T-RFLP 图谱的进行主成分分析 (principal component analysis, PCA),并对基于 T-RFLP 分析的真菌群落结构与土壤化学性质进行冗余分析 (redundancy analysis, RDA),并采用 999 次的蒙特卡罗置换检验 (Monte Carlo permutation test, 999 permutations) 进行显著性检验。使用 R 软件,计算基于 Mantel 测验的环境变量与土壤真菌群落结构的 Spearman 相关系数。

表 2 不同处理土壤化学性质

Table 2 Chemical properties of soils in different treatments

土层 Soil layer (cm)	项目 Item	pH	有机质 OM (g · kg <sup>-1</sup> )	全氮 TN (g · kg <sup>-1</sup> )	碳氮比 C/N	有效磷 AP (mg · kg <sup>-1</sup> )	速效钾 AK (mg · kg <sup>-1</sup> )	碱解氮 AN (mg · kg <sup>-1</sup> )	铵态氮 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg · kg <sup>-1</sup> )	硝态氮 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg · kg <sup>-1</sup> )
0~20	CK	5.30bA	17.59aA	1.64aA	6.60aA	62.50bA	34.28bA	118.59aA	21.61aA	20.79bA
	M	6.06aA	12.28bA	1.66aA	4.18cB	74.17aA	26.64cB	101.50cA	18.97aA	33.03abA
	CF	4.40cB	12.03bA	1.52abA	4.59cB	73.73aA	37.98aA	112.00bA	20.72aA	28.76abA
	CFM	4.79bcB	12.46bA	1.38bA	5.27bB	60.86bA	38.22aA	102.67cA	22.47aA	40.55aA
	CFMM	4.82bcA	8.46cB	1.03cA	4.67cB	52.84cA	34.48bA	114.91abA	11.40bA	24.83bA
20~40	CK	5.77bA	9.59cB	0.93bB	5.72cB	52.16aB	33.47bA	82.40aB	15.38aB	18.43abA
	M	6.53aA	9.65cB	1.08abB	5.33cA	43.77bB	37.25aA	73.50cB	11.33abB	23.03abB
	CF	5.43bcA	12.15bA	0.79cB	9.32aA	39.84cB	25.22cB	78.75abB	14.67aB	17.98abB
	CFM	5.31bcA	10.14cB	0.89bcB	6.50bA	42.32bcB	37.30aA	69.42cB	14.12aB	28.20aB
	CFMM	4.97cA	17.05aA	1.00abA	8.68aA	38.73cB	21.88dB	67.50cB	8.40bB	11.69bB
	处理 Treatment (T)	21.80 **	12.28 **	10.09 **	30.83 **	31.07 **	54.31 **	15.22 **	10.63 **	4.57 **
土层 Layer (L)	21.50 **	9.68 **	270.47 **	221.06 **	612.46 **	59.97 **	690.20 **	39.75 **	14.41 **	
T×L	1.57	98.23 **	26.06 **	55.58 **	28.00 **	105.25 **	5.67 **	0.86	0.49	

同列不同大、小写字母分别表示同一施肥处理不同土层、相同土层不同施肥处理差异显著 ( $P < 0.05$ )。Different lower- and uppercase letters within the same column indicated significant differences between the different fertilization treatments within the same soil layer and different soil layers within the same fertilization treatment, respectively, at 0.05 level. OM: Organic matter; TN: Total nitrogen; AP: Available phosphorus; AK: Available potassium; AN: Available nitrogen. 下同 The same below. \*\*  $P < 0.01$ .

## 2 结果与分析

### 2.1 不同施肥处理土壤化学性质

从表 2 可以看出,施肥处理、不同土层以及两者的互作均显著影响了土壤有机质、全氮、有效磷、速效钾、碱解氮含量以及碳氮比 ( $P < 0.01$ )。此外,不同施肥处理与土层均显著影响了土壤 pH 及铵态氮、硝态氮含量 ( $P < 0.01$ ),但两者交互作用未达显著水平。与 CK 相比,M 处理土壤 pH 显著升高 ( $P < 0.05$ ); CFMM 处理土壤有效磷、铵态氮、水溶性氮含量及碳氮比均显著降低 ( $P < 0.05$ )。表层 (0~20 cm) 土壤中,不同施肥显著降低了有机质含量与碳氮比 ( $P < 0.05$ ); CF 处理显著增加有效磷、速效钾含量 ( $P < 0.05$ ); M 处理显著增加了有效磷而降低了速效钾含量 ( $P < 0.05$ ); CFM 处理显著增加硝态氮含量,但全氮含量降低 ( $P < 0.05$ )。亚表层 (20~40 cm) 土壤中,水溶性氮含量显著降低 ( $P < 0.05$ ); CF、CFM、CFMM 处理碳氮比均显著增加 ( $P < 0.05$ )。此外,M、CF、CFM 处理的表层土壤中全氮、碱解氮、铵态氮与有效磷含量均显著高于亚表层土壤 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 基于 T-RFLP 的土壤真菌群落结构

经酶 Hinf I 处理后,得到 50~400 bp 的 T-RFs,可以反映不同样品之间真菌群落结构的差异。T-RFLP 相对丰富度图谱中 (图 1), 243、299、307 与 327 bp 的 T-RFs 代表的种类在真菌群落中居优势地位。上述 T-RFs 经比对后发现 (表 3), 相匹配的菌属主要为须腹菌属 (*Rhizopogon*) 或蜡伞属 (*Hygro-*

*cybe*)、珊瑚菌属 (*Clavaria*)、被孢霉属 (*Mortierella*) 以及叶黑粉菌属 (*Entyloma*)。T-RFs 相对丰度统计分析表明,与 CK 相比,表层土壤中 CF 处理显著增加

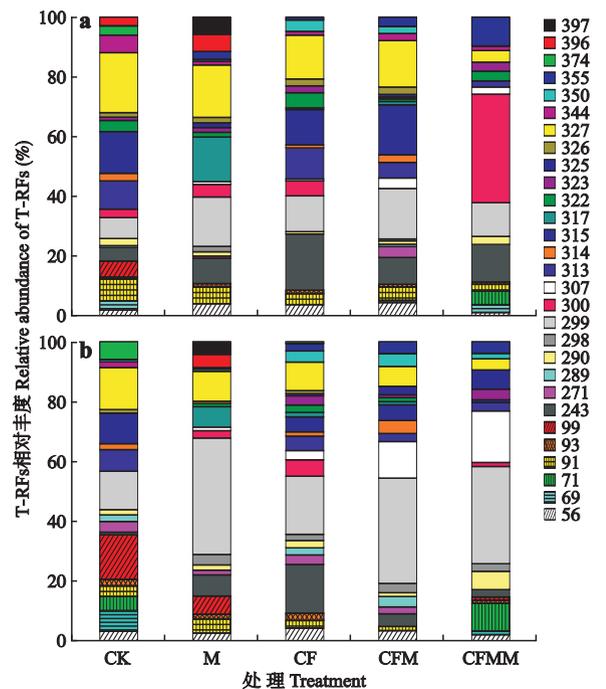


图 1 不同处理雷竹林表层和亚表层土壤真菌 T-RFs 相对丰度

Fig.1 Relative abundance of T-RFs of fungi community in topsoil and subsoil of *Phyllostachys praecox* in different treatments.

a) 0~20 cm; b) 20~40 cm. CK: 对照 Control; CF: 单施化肥 Chemical fertilizer only; M: 单施有机肥 Organic manure only; CFM: 化肥配施有机肥 Chemical fertilizer with organic manure; CFMM: 化肥配施有机肥加覆盖 Chemical fertilizer with organic manure plus mulching. 下同 The same below.

表3 土壤真菌 T-RFs 的系统发育种属

Table 3 Phylogenetic affiliations of fungal T-RFs from tested soils

T-RFs (bp)	相似菌种 Most possible species	登录号 Accession number*
243	红根须腹菌 <i>Rhizopogon rubescens</i>	254351300
	蜡伞属丛生菌 <i>Hygrocybe caespitosa</i>	553961677
299	珊瑚属镰刀状虫草 <i>Clavaria falcata</i>	529308518
307	未可培养被孢霉属 <i>Uncultured Mortierella</i>	310753659
327	叶黑粉菌 <i>Entyloma eryngii-plani</i>	308228500

\* GenBank 中已知真菌序列的 Accession 号 The Accession number of the known fungal sequence deposited in GenBank.

了 243 bp 的 T-RF, 而 CFMM 处理中 327 bp 的 T-RF 显著降低 ( $P < 0.05$ ); 在亚表层土壤中, M 处理显著增加了 299 bp 的 T-RFs, CF、CFM 与 CFMM 处理均显著增加了 307 bp 的 T-RF ( $P < 0.05$ ).

为进一步考察不同施肥处理雷竹林土壤真菌群落之间的相对相似度, 根据 T-RFs 及其相对峰面积对各样品进行主成分分析 (PCA). 表层土壤中, 主成分 1 和 2 对真菌群落变异的解释量分别为 32.6% 和 20.6% (图 2a), M 和 CFMM 处理分别形成相对独立的群, 且与 CK 处理明显分开; 表明 M 和 CFMM 处理明显改变了表层土壤真菌群落结构. 亚表层土壤中, 主成分 1 和 2 对真菌群落变异的解释量分别为 20.4% 和 18.7% (图 2b), CF、CFM 和 CFMM 处理形成相对独立的群, 与 CK 相对分开; 表明 CF、CFM 和 CFMM 处理明显改变了亚表层土壤真菌群落结构.

### 2.3 土壤真菌多样性

根据 T-RFLP 图谱中 OTU 的数量、种类和丰度, 分别计算不同施肥处理表层与亚表层土壤真菌多样性指数. Shannon 指数、均匀度指数和 Simpson 指数分别从微生物群落物种丰富度、物种均匀度以及常见物种 3 个方面反映了微生物群落功能多样性. 与 CK 相比, 表层土壤中 CF 和 CFMM 处理土壤真菌 ITS 序列表征的物种丰富度显著降低, 而优势度指数则显著升高; 且各施肥处理的均匀度指数均显著降低 ( $P < 0.05$ ). 亚表层土壤不同处理间多样性指数差异均未达到显著水平. 此外, 同一处理不同土层间多样性指数均无显著差异. 表层土壤真

表4 基于 Mantel 测验的土壤真菌群落结构与环境变量之间的 Spearman 相关系数

Table 4 Spearman's correlations ( $r$ ) between environmental variables and fungal community structure (Bray-Curtis distance) determined by Mantel test

	碱解氮 AN	有效磷 AP	有机质 OM	铵态氮 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$	全氮 TN	速效钾 AK	pH	碳氮比 C/N	水溶性氮 WSO <sub>N</sub>	硝态氮 $\text{NO}_3^- \text{-N}$
$r$	0.342	0.168	0.141	0.106	0.059	0.062	0.041	0.004	-0.026	-0.066
$P$	0.001	0.009	0.033	0.074	0.161	0.198	0.276	0.437	0.613	0.820

WSO<sub>N</sub>: Water-soluble organic nitrogen.

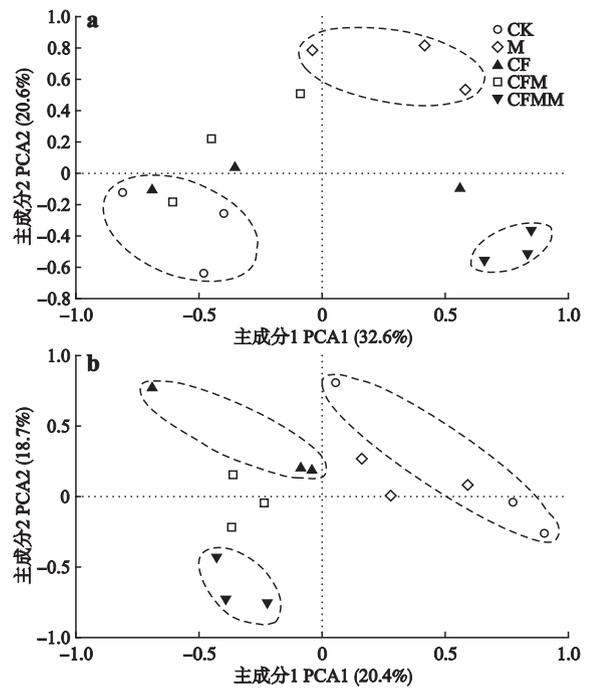


图2 不同施肥处理土壤真菌 T-RFs 的主成分分析

Fig. 2 Principle component analysis of fungal T-RFs in forest soils with different fertilization treatments.

菌群落多样性指数与土壤化学性质的相关性分析表明, 土壤真菌丰富度指数与土壤有机质、全氮含量呈显著正相关; 均匀度指数与土壤有机质、全氮、铵态氮、碳氮比呈显著正相关; 优势度指数与土壤有机质、全氮、铵态氮含量呈显著负相关 ( $P < 0.05$ ).

### 2.4 土壤性质对土壤真菌群落的影响

Mantel 测验结果表明 (表 4), 土壤真菌群落结构 (Bray-Curtis 距离) 依次与土壤碱解氮、有效磷和有机质含量呈显著正相关 ( $P < 0.05$ ). 为进一步阐明不同施肥处理后土壤化学性质对真菌群落结构的影响, 以土壤真菌的 T-RFs 和上述存在显著相关关系的土壤化学性质为变量, 进行冗余分析 (RDA).

RDA 分析表明 (图 3), 表层土壤中第一排序轴和第二排序轴分别解释了 22.0%、15.5% 的变异, 两者合并解释了真菌群落结构总变异的 37.5%; CK 和 CFMM 处理主要受碱解氮的影响, M 处理则主要受有效磷含量的影响. 亚表层土壤中第一排序轴、第二

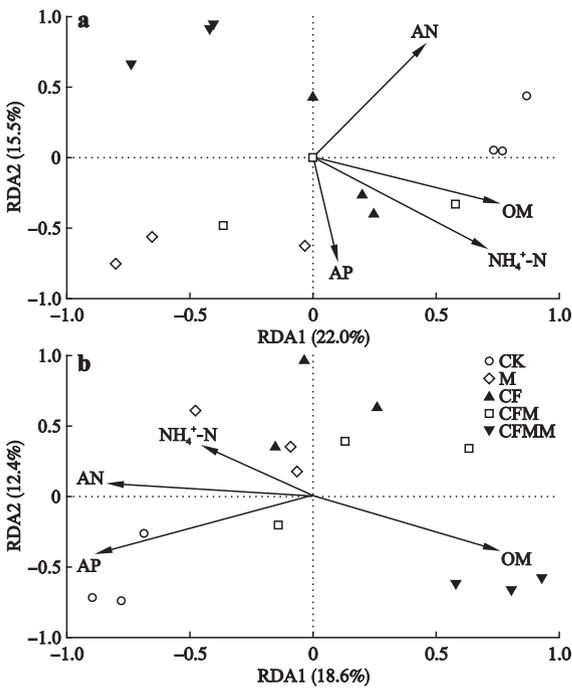


图3 土壤真菌群落组分与土壤化学性质的冗余分析 (RDA)

Fig.3 Redundancy analysis (RDA) of forest soil fungi composition and soil chemistry properties.

OM: 有机质 Organic matter; AP: 有效磷 Available phosphorus; AK: 速效钾 Available potassium; AN: 碱解氮 Available nitrogen.

排序轴分别解释了 18.6%、12.4% 的变异, 两者合并解释了 31.0% 真菌群落结构总变异; CK 主要受有效磷的影响, M 和 CF 主要受铵态氮的影响, 而 CFMM 则主要受有机质含量的影响。

## 2.5 土壤真菌丰度分析

采用荧光定量 PCR 方法检测不同施肥处理表层与亚表层土壤真菌的数量变化, 根据标准曲线计算出土壤真菌 18S rRNA 基因拷贝数。由图4可见,

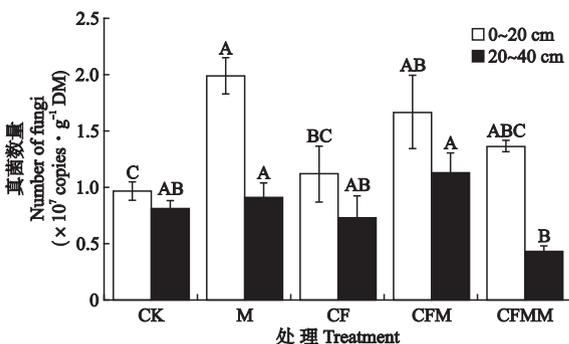


图4 不同施肥处理土壤真菌数量

Fig.4 Gene copies of soil fungi in forest soil with different fertilization treatments.

不同大写字母表示相同土层不同施肥处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。Different uppercase letters indicated significant differences between the different fertilization treatments in the same soil layers at 0.05 level.

不同施肥处理表层土壤真菌数量在  $9.66 \times 10^6 \sim 1.99 \times 10^7$  copies  $\cdot$  g<sup>-1</sup> DM; 亚表层土壤真菌数量在  $4.36 \times 10^6 \sim 1.13 \times 10^7$  copies  $\cdot$  g<sup>-1</sup> DM. 与 CK 相比, 表层土壤中 M 与 CFM 处理真菌数量显著增加 ( $P < 0.05$ ). 此外, M 和 CFMM 处理表层土壤真菌数量显著高于亚表层 ( $P < 0.05$ ). 相关分析表明, 土壤真菌数量与全氮、硝态氮、铵态氮、碱解氮、有效磷含量均呈显著正相关 ( $P < 0.05$ ), 与碳氮比呈显著负相关 ( $P < 0.05$ ). 双因素方差分析表明, 不同处理和土层对真菌数量均有显著影响 ( $P < 0.05$ ), 但二者交互作用不显著。

## 3 讨论

不同施肥模式使土壤中原有的养分比例改变, 直接导致微生物群落结构发生变化<sup>[25]</sup>; 而添加到土壤中有有机物料的数量和质量, 通常是控制涉及养分循环的不同微生物类群丰度和微生物活性的主要因素<sup>[26]</sup>. 本研究结果表明, 不同施肥模式明显改变了雷竹林土壤真菌群落结构和丰度, 但在表层和亚表层土壤中表现出不同的响应模式. 已有的研究表明, 长期施肥可以改变农田土壤真菌群落结构<sup>[21]</sup>, 而土壤真菌区系与土壤剖面层次、施肥方式有关<sup>[27]</sup>. 与已有研究中施用有机肥能够增加土壤有机质含量不同的是, 本文中不同施肥处理均显著降低了表层土壤有机质含量, M 和 CFMM 处理形成了迥异于 CK 的真菌群落结构, 而 M 和 CFM 处理则显著增加了土壤真菌数量, 表明施肥特别是有机物料的投入可能是改变雷竹林表层土壤真菌群落结构和数量的主要因素. 有机物料投入并不必然意味着土壤中有有机质含量增加<sup>[28]</sup>, 土壤真菌以有机质为能源和养分, 是分解土壤有机质的关键功能类群. 本试验施加有机肥后, 表层土壤有机质含量显著低于 CK, 其中 CFM 低于 CF; 在亚表层土壤中有有机质含量却高于 CK, 且 CFM 显著高于 M. 以上结果可能与不同处理中雷竹林的输出量不同有关, 进一步的证明需要测定竹笋产量以及凋落物数据. 本文中 Mantel 测验表明, 土壤有机质含量显著影响了土壤真菌群落结构; 高玉峰等<sup>[29]</sup>的研究也表明, 有机肥含量对土壤真菌数量和种类的影响最大. 然而, 在亚表层土壤中 CF 和 CFMM 显著增加了土壤有机质含量, CF、CFM 和 CFMM 形成了迥异于 CK 的真菌群落结构, 表明施用化肥可能对亚表层土壤真菌群落的影响相对更大. 研究表明, 化肥和有机肥会以不同的方式影响微生物参数, 相对而言真菌对化肥更加敏感<sup>[30]</sup>. 本文

中真菌群落在表层和亚表层土壤中对不同施肥模式的差异响应,可能原因是:1)表层土壤中除施用有机肥和有机覆盖等有机物料投入外,竹林枯枝落叶等新鲜有机质的投入,总体上促进了真菌的生长,导致有机质分解加速;2)化肥施用可能减少了真菌物种丰富度,并改变了亚表层土壤真菌群落结构,已有的研究表明单施氮肥能够减低真菌丰富度和改变群落结构,主要是因为减少了降解性真菌<sup>[26]</sup>.本研究中单施化肥及施肥加覆盖的集约经营模式显著降低了表层土壤真菌多样性.虽然不同施肥处理亚表层土壤真菌多样性指数没有显著变化,但施用化肥的处理中有机质含量均显著增加,可能是由于真菌对有机质分解减弱所致.

持续施用化肥(NPK)会导致土壤酸化<sup>[26,31]</sup>,土壤酸化加剧的主要原因则在于土壤中氮素种类的不完全循环或者酸性氮肥的施用<sup>[32]</sup>.本研究中也发现,除单施有机肥外,施用化肥的处理均不同程度地降低了表层和亚表层土壤 pH 值.酸性条件下自养生物受到抑制,真菌在氮素矿化过程中发挥了重要作用<sup>[33]</sup>.Mantel 测验结果表明,土壤碱解氮含量是影响土壤真菌群落结构的首要因素,相关分析也表明土壤真菌数量与全氮、硝态氮、铵态氮和碱解氮含量呈显著正相关,暗示雷竹林土壤中真菌群落可能参与了土壤氮素循环.韩世忠等<sup>[34]</sup>研究表明,土壤真菌多样性指数与土壤铵态氮呈显著正相关,而丰富度指数和均匀度指数与土壤因子间没有显著的相关性.本研究中土壤真菌群落丰富度指数与全氮含量呈显著正相关;均匀度指数与全氮、铵态氮含量呈显著正相关,表明土壤全氮含量可能对维持真菌群落的多样性具有重要作用.值得注意的是,与 CK 相比,CFMM 处理土壤铵态氮含量显著降低,且亚表层土壤真菌数量也明显降低,这可能是因为:1)雷竹林集约经营模式下产笋量高,但幼竹的发育偏好选择吸收了大量铵态氮,导致土壤中铵态氮含量迅速降低;2)CFMM 处理亚表层土壤酸化现象较为严重,植物可利用有效态氮(碱解氮)显著下降,但硝态氮却未明显下降,可能与真菌介导了异养硝化作用有关.

本研究中不同施肥处理后表层土壤 C/N 均显著下降,而亚表层土壤中施用化肥处理的 C/N 则显著上升.土壤 C/N 是影响土壤微生物群落组成的重要因素之一<sup>[35]</sup>,在偏酸性、养分有效性低、难分解底物和 C/N 较高的土壤中,真菌生长更加旺盛<sup>[34]</sup>.一般认为,偏施化肥会显著降低土壤 C/N<sup>[36]</sup>,有机施

肥模式则显著提高了土壤 C/N<sup>[37]</sup>.已有研究中土壤真菌多样性指数与土壤 C/N 呈显著正相关<sup>[38]</sup>和呈显著负相关<sup>[34]</sup>的均有报道.本文相关分析表明,雷竹林土壤真菌多样性与 C/N 呈显著正相关,真菌数量则与 C/N 呈显著负相关,表明较高的土壤 C/N 有助于增加真菌多样性,但不利于增加真菌数量.本文结果与已有研究的不一致之处,也进一步证实真菌群落在表层和亚表层土壤中对施肥处理存在差异响应,表层土壤中通过施肥增加 C、N 营养总体上促进了真菌生长和有机质分解,降低了 C/N 且增加了真菌数量;而亚表层土壤中化肥的投入使有机质分解减弱,导致 C/N 上升,并促进了某些真菌类群的生长,诸如 307 bp 的 T-RFs 代表的被孢霉属(*Mortierella*)是土壤有机质和养分含量丰富的标志类群<sup>[39]</sup>.

本研究中,单施化肥及施肥加覆盖的集约经营模式显著降低了表层土壤真菌多样性,而化肥和有机肥配合施用则维持了土壤真菌多样性并显著增加了表层真菌土壤数量.因此,有机肥的投入以及合理的施肥模式对于雷竹林的可持续生产是十分必要的.进一步的研究可通过同位素示踪等方法,明确真菌在雷竹林土壤有机质分解与氮素转化中的过程和机制,为上述推测提供确切的证据.

#### 参考文献

- [1] Li Z-C (李正才), Fu M-Y (傅懋毅), Xu D-Y (徐德应). Bamboo ecosystem and carbon dioxide sequestration. *Journal of Bamboo Research* (竹子研究汇刊), 2003, **22**(4): 1-6 (in Chinese)
- [2] Fang W (方伟), He J-C (何钧潮). Cultivation techniques of early shooting and high yielding for Lei bamboo sprout. *Journal of Zhejiang Forestry College* (浙江农林大学学报), 1994, **11**(2): 121-128 (in Chinese)
- [3] Xu Z-X (徐祖祥), Zhu X-X (祝小祥), Xu J (徐进), et al. The status and problem analysis of fertilization in the bamboo forest in Lin'an. *Journal of Agriculture* (农学学报), 2015, **5**(5): 53-56 (in Chinese)
- [4] Jin A-W (金爱武), Zhou G-M (周国模), Zheng B-S (郑炳松), et al. A preliminary study on degenerative mechanism of *Phyllostachys praecox* stand planted in a protected site. *Journal of Fujian College of Forestry* (福建林学院学报), 1999, **19**(1): 94-96 (in Chinese)
- [5] Jiang P-K (姜培坤), Xu Q-F (徐秋芳). Changes in nitrate content of bamboo shoots responsive to nitrogen fertilizer rate. *Journal of Zhejiang Forestry College* (浙江农林大学学报), 2004, **21**(1): 10-14 (in Chinese)
- [6] Zhong M (钟敏), Rong J (戎静), Zhuang S-Y (庄舜尧), et al. Nitrogen mineralization of *Phyllostachys praecox* soils with various planting years. *Journal of Zhe-*

- jiang *Agricultural Sciences* (浙江农业科学), 2011 (1): 55–58 (in Chinese)
- [7] Li X (李鑫), Ju X-T (巨晓棠), Zhang L-J (张丽娟), *et al.* Effects of different fertilization modes on soil ammonia volatilization and nitrous oxide emission. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2008, **19**(1): 99–104 (in Chinese)
- [8] Sun X (孙晓), Zhuang S-Y (庄舜尧), Liu G-Q (刘国群), *et al.* Effect of Lei bamboo plantation on soil basic properties under intensive cultivation management. *Soils* (土壤), 2009, **41**(5): 784–789 (in Chinese)
- [9] Ye L-S (叶莉莎), Chen S-L (陈双林), Guo Z-W (郭子武). Effects of mulching management on soil nitrogen, nitrification and denitrification in *Phyllostachys praecox* stand. *Forest Research* (林业科学研究), 2015, **28**(5): 669–673 (in Chinese)
- [10] Li G-C (李贵才), Han X-G (韩兴国), Huang J-H (黄建辉), *et al.* A review of affecting factors of soil nitrogen mineralization in forest ecosystems. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 2001, **21**(7): 1187–1195 (in Chinese)
- [11] Qin H (秦华), Li G-D (李国栋), Ye Z-Q (叶正钱), *et al.* Evolution of soil bacterial community in intensively managed *Phyllostachys praecox* stand and related affecting factors. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2010, **21**(10): 2645–2651 (in Chinese)
- [12] Augé RM. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, 2001, **11**: 3–42
- [13] Boddington CL, Dodd JC. The effect of agricultural practices on the development of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. II. Studies in experimental microcosms. *Plant and Soil*, 2012, **218**: 145–157
- [14] Allison SD, Hanson CA, Treseder KK. Nitrogen fertilization reduces diversity and alters community structure of active fungi in boreal ecosystems. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, **39**: 1878–1887
- [15] Weber CF, Vilgalys R, Kuske CR. Changes in fungal community composition in response to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and nitrogen fertilization varies with soil horizon. *Frontiers in Microbiology*, 2013, **4**: 78
- [16] Liu J, Sui Y, Yu Z, *et al.* Soil carbon content drives the biogeographical distribution of fungal communities in the black soil zone of northeast China. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, **83**: 29–39
- [17] Huang Y (黄莹), Long X-E (龙锡恩). Contribution of fungi to soil nitrous oxide emission and their research methods: A review. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2014, **25**(4): 1213–1220 (in Chinese)
- [18] Bearegard MS, Hamel C, Atul-Nayyar, *et al.* Long-term phosphorus fertilization impacts soil fungal and bacterial diversity but not AM fungal community in alfalfa. *Microbial Ecology*, 2009, **59**: 379–389
- [19] Arnebrant K, Bååth E, Söderström B. Changes in microbial community structure after fertilization of scots pine forest soil with ammonium nitrate or urea. *Soil Biology & Biochemistry*, 1990, **22**: 309–312
- [20] Wang D (王丹), Li L-Q (李恋卿), Liu Y-Z (刘永卓), *et al.* Influences of long-term fertilization on bacteria and fungi community structures in different aggregate-size aggregates of paddy soil in Taihu Lake region of China. *Soils* (土壤), 2012, **44**(2): 290–296 (in Chinese)
- [21] Wang Y (王轶), Li J (李季), Cao Z-P (曹志平), *et al.* Effects of long-term fertilization on soil fungi. *Chinese Journal of Eco-Agriculture* (中国生态农业学报), 2014, **22**(11): 1267–1273 (in Chinese)
- [22] Qin H, Wang H, Strong PJ, *et al.* Rapid soil fungal community response to intensive management in a bamboo forest developed from rice paddies. *Soil Biology & Biochemistry*, 2014, **68**: 177–184
- [23] He Y-H (何苑峰), Zhou G-Y (周国英), Wang S-J (王圣洁), *et al.* Fungal diversity in *Cunninghamia lanceolata* plantation soil. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 2014, **34**(10): 2725–2736 (in Chinese)
- [24] Bao S-D (鲍士旦). *Soil and Agricultural Chemistry Analysis*. 3<sup>rd</sup> ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000 (in Chinese)
- [25] Qu G-H (曲国辉), Guo J-X (郭继勋). The relationship between different plant communities and soil characteristics in Songnen grassland. *Acta Prataculturae Sinica* (草业学报), 2003, **12**(1): 18–22 (in Chinese)
- [26] Kamaa M, Mburu H, Blanchart E, *et al.* Effects of organic and inorganic fertilization on soil bacterial and fungal microbial diversity in the Kabete long-term trial, Kenya. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, **47**: 315–321
- [27] Liu S-X (刘淑霞), Wu H-Y (吴海燕), Zhao L-P (赵兰坡), *et al.* Effects of different potassium rates on potassium absorption and utilization by maize plant. *Journal of Maize Sciences* (玉米科学), 2008, **16**(4): 172–175 (in Chinese)
- [28] Fan F, Li Z, Wakelin SA, *et al.* Mineral fertilizer alters cellulolytic community structure and suppresses soil cellobiohydrolase activity in a long-term fertilization experiment. *Soil Biology & Biochemistry*, 2012, **55**: 70–77
- [29] Gao Y-F (高玉峰), He Z-D (贺字典). Study on soils effect factors to fungi diversity in Hebei Province. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报), 2010, **26**(10): 177–181 (in Chinese)
- [30] Zhong W, Gu T, Wang W, *et al.* The effects of mineral fertilizer and organic manure on soil microbial community and diversity. *Plant and Soil*, 2009, **326**: 511–522
- [31] Xia X (夏昕), Shi K (石坤), Huang Q-R (黄欠如), *et al.* The changes of microbial community structure in red paddy soil under long-term fertilization. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), 2015, **52**(3): 697–705 (in Chinese)
- [32] Sun R, Zhang XX, Guo X, *et al.* Bacterial diversity in soils subjected to long-term chemical fertilization can be more stably maintained with the addition of livestock ma-

- nure than wheat straw. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, **88**: 9–18
- [33] Boer WD, Kowalchuk GA. Nitrification in acid soils: Micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, **33**: 853–866
- [34] Han S-Z (韩世忠), Gao R (高人), Ma H-L (马红亮), *et al.* Soil fungal diversities of *Castanopsis carlesii* nature forests in mid-subtropical China. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* (热带亚热带植物学报), 2015, **23**(3): 343–352 (in Chinese)
- [35] Högberg MN, Högberg P, Myrold DD. Is microbial community composition in boreal forest soils determined by pH, C-to-N ratio, the trees, or all three? *Oecologia*, 2007, **150**: 590–601
- [36] Lei B-K (雷宝坤), Liu H-B (刘宏斌), Chen A-Q (陈安强), *et al.* Scenario analysis on effects of long-term fertilization on soil carbon and nitrogen codependency. *Ecology and Environmental Sciences* (生态环境学报), 2014, **23**(10): 1567–1573 (in Chinese)
- [37] Lu Q, Xiong Y, Xu LJ, *et al.* Effect of different fertilization patterns on carbon and nitrogen components of tobacco topsoil. *Agricultural Science & Technology*, 2014, **15**: 1156–1159
- [38] Liu L (刘丽), Xu M-K (徐明恺), Wang S-L (汪思龙), *et al.* Effect of different *Cunninghamia lanceolata* plantation soil qualities on soil microbial community structure. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 2013, **33**(15): 4692–4706 (in Chinese)
- [39] Meng L-N (孟令男), Xu X-H (许修宏), Li H-T (李洪涛), *et al.* Effects of sewage sludge compost on Chlorimuron-ethyl residue and fungal community structure in Soil. *Journal of Agro-Environment Science* (农业环境科学学报), 2014, **33**(3): 495–501 (in Chinese)

---

作者简介 陈志豪,男,1992年生,硕士研究生.主要从事土壤与环境微生物学研究. E-mail: forrinmy@126.com

责任编辑 肖红

---