

DOI: 10.5846/stxb201506251289

辛晓静, 刘磊, 申俊芳, 赵念席, 高玉葆. 羊草基因型数目与氮添加对土壤微生物群落的交互影响. 生态学报, 2016, 36(13): - .

Xin X J, Liu L, Shen J F, Zhao N X, Gao Y B. Interactions between genotypic number and nitrogen addition on soil microbial communities in the population of *Leymus chinensis*. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(13): - .

羊草基因型数目与氮添加对土壤微生物群落的交互影响

辛晓静, 刘磊, 申俊芳, 赵念席*, 高玉葆

南开大学生命科学学院, 天津 300071

摘要:物种多样性(或同一物种遗传多样性)减少和氮富集都是影响陆地生态系统进程的主要因素,它们之间的交互作用是否对土壤微生物群落产生显著影响已成为研究者关心的主要科学问题。本论文研究了羊草基因型数目(1、2、4 三种基因型数目组合)和氮添加(无氮添加、低氮添加和高氮添加三种水平)对土壤微生物群落的总磷脂脂肪酸(PLFA, Phospholipid Fatty Acid)含量、细菌 PLFA 生物标记含量、真菌 PLFA 生物标记含量、真菌/细菌比、以及基于每个 PLFA 生物标记相对含量百分比所得微生物群落的 Shannon-Wiener 多样性指数和 Simpson 优势度指数的影响。结果表明:氮添加对细菌 PLFA 生物标记含量,以及土壤微生物 PLFA 生物标记的 Shannon-Wiener 多样性指数和 Simpson 优势度指数具有显著影响($P < 0.05$);基因型数目对所测变量无显著影响($P > 0.05$),但基因型数目和氮添加的交互作用对细菌 PLFA 生物标记含量和真菌/细菌比具有显著影响($P < 0.05$)。该研究结果为全球变化背景下氮沉降及重要物种种群数量减少对土壤微生物群落的影响提供了科学数据,为合理解释群落动态变化提供了数据支持。

关键词:基因型数目;氮添加;微生物群落;羊草

Interactions between genotypic number and nitrogen addition on soil microbial communities in the population of *Leymus chinensis*

XIN Xiaojing, LIU Lei, SHEN Junfang, ZHAO Nianxi*, GAO Yubao

College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: Humans continue to transform the global nitrogen cycle at a record pace, through an increased combustion of fossil fuels, growing demand for nitrogen in agriculture and industry, and pervasive inefficiencies in its use, all of which has large impact on the health and processes in terrestrial and aquatic ecosystems worldwide. Studies on the effect of nitrogen addition on plant community showed that as the nitrogen input increases the biodiversity losses. Loss of biodiversity and increase in nitrogen inputs are two of the most crucial anthropogenic factors driving ecosystem processes. Both of them have received considerable attention in previous studies; however, information about their interactive effects on ecosystem function has been scarce. In particular, knowledge of how they interactively influence soil microbial communities and functions has been incomplete. Soil microbial communities can be affected directly by variations in the type, complexity, and amount of organic matter input to soils or indirectly via changes in the soil environment (e.g., soil moisture, temperature, and pH). Changes in any of these factors can influence physical and metabolic niche diversity in the soil, and therefore, may affect microbial diversity or composition. In recent years, the growing research has shown that genotypic diversity of dominant species has similar ecological effects as that of interspecific diversity in smaller species and relatively fragile

基金项目:国家自然科学基金项目(31570427)

收稿日期:2015-06-25; **修订日期:**2016-03-21

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhaonianxi@nankai.edu.cn

ecosystems. Different genotypes vary in a multitude of traits including, but not limited to, growth rates, secondary metabolism, and physiological processes. Moreover, such variations have been shown to influence associated species (such as other plants, herbivores, soil microorganisms). Although only a few studies have tested the effects of genetic diversity on soil microbial communities, a few studies have shown that gene diversity in *Populus* may affect soil microbial communities and soil processes in ways similar to species diversity. Not only the number of species but also the density of the same species or genotypes decreased because of severe degradation in some areas of typical steppes of northern China. Atmospheric nitrogen deposition played an important role on plant diversity and soil microbial communities in the process of grassland degradation. Nitrogen addition has been proved to lead to a large reduction in species richness and loss of perennial grasses in mature communities of Inner Mongolia grasslands, and it was found that it reduces microbial diversity (e.g., functional diversity) in a semi-arid temperate steppe. In the present study, the effects of genotype number of *Leymus chinensis*, nitrogen addition, and their interactions on the content and community structure of soil microbial communities were tested. The results are as follows. (1) Nitrogen addition had significant effects ($P < 0.05$) on bacterial phospholipid fatty acid (PLFA) content, Shannon-Wiener diversity index, and Simpson dominance index. (2) The number of *Leymus chinensis* genotypes had no significant effect on observed variables ($P > 0.05$), but the interaction between the genotype number and nitrogen addition had a significant effect on bacterial PLFA content and fungal to bacterial ratios ($P < 0.05$). These results provided the scientific data for the effects of nitrogen deposition and decrease in population size of important species on soil microbial community, and the exploration of community dynamics in a typical steppe of northern China in the context of global change.

Key Words: genotypic number; nitrogen addition; microbial communities; *Leymus chinensis*

化石燃料燃烧(导致大气氮沉降)、施肥措施(氮添加)等人类活动的加剧,导致全球氮富集逐渐增加^[1],已经对陆地生态系统产生了非常显著的影响^[2],这些影响既包括对地上部植物多样性(物种多样性和同一物种遗传多样性)变化的影响,也包括对地下微生物群落组成和结构的影响,使氮富集成为引起群落退化的主要因素之一。如 Zavaleta 等在加利福尼亚草原生物保护区进行了为期 3 年的模拟氮沉降实验,结果发现氮沉降使实验区的植物种类减少 5%^[3];Schmidt 等对一苔原群落模拟氮添加的实验发现,氮添加引起土壤微生物的含量降低且结构和功能发生变化^[4]。

随着群落植物多样性的改变,土壤微生物多样性及其功能也会相应地发生变化^[5]。一方面是由于不同植物个体(种类)输入土壤的有机质类型、复杂性及总量不同而直接影响地下微生物群落^[6];另一方面,植物性状如地上生物量、根系深度和密度以及根冠比的种间(种内)差异可特异性地影响土壤环境,如湿度、温度、pH 等,从而间接影响土壤微生物群落^[7-8]。近年来,在物种较少、相对脆弱的生态系统中,重要物种基因型多样性表现出与群落内物种多样性相似的生态功能被广泛证实,如与较少基因型个体组成的种群相比,多基因型个体组成的种群能提高地上部初级生产力、增加地上部节肢动物的多样性、加速凋落物分解等^[9-11],但基因型数目是否对土壤微生物群落产生影响的研究则刚刚起步^[12-13],Schweitzer 等研究发现,随杨树(*Populus*)基因多样性增加,土壤微生物群落组成呈单峰变化,这可能与基因多样性能改变土壤营养物质的可利用性有关^[13]。

植物多样性(种间和种内水平)减少和氮富集对陆地生态系统的影响很早就受到了生态学家的广泛关注^[14,15],已有相关研究分别探讨了植物多样性减少或氮添加单一因素对生态系统功能的影响^[2,5],而关于这两个因子的交互作用是否影响生态系统功能的相关研究却很少^[16-18],关注它们是否交互影响土壤微生物群落的研究则更少^[17-18]。受全球变化(氮沉降、干旱、过度放牧等因素)的影响,中国北方典型草原退化严重,已有研究证实氮添加导致群落建群种羊草(*Leymus chinensis*)和大针茅(*Stipa grandis*)等多年生禾草数量降低^[19],但建群种种群数量减少是否会与氮添加交互影响生态系统功能(如土壤微生物群落的结构与功能)的

相关研究还未展开。

羊草作为内蒙古草原的建群种之一,具有生态幅广、适应性强等特点。另外,羊草作为根茎型禾草,通过克隆繁殖,某个特定的基因型在群落中也能起到很重要的作用。最近有研究发现,不同基因型羊草数量性状间存在分化(包括与生长相关的比叶面积、与防御相关的叶片总酚浓度等等),且这种分化具有遗传基础^[20];多基因型组合羊草种群在提高种群生产力以及抗干扰方面存在正效应,对正效应起主要贡献的是类似于物种之间的生态位互补效应^[21]。因此,本研究以该区域重要建群种羊草为研究对象,构建不同基因型组合的羊草种群,通过氮添加模拟氮沉降,在人工控制条件下研究羊草基因型数目、氮添加以及它们的交互作用对羊草地下部微生物群落组成和结构的影响。以期在大气氮沉降逐渐增加的背景下,探讨羊草(*Leymus chinensis*)种群基因型多样性在保持内蒙古温带典型草原土壤微生物多样性方面的作用。我们重点关注以下问题:(1)羊草基因型数目对土壤微生物群落的组成及结构是否影响显著;(2)氮添加如何影响土壤微生物群落的含量及多样性;(3)羊草基因型数目和氮添加的交互作用是否影响土壤微生物群落的组成及结构。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本实验所用羊草为 2010 年于内蒙古锡林浩特市阿巴嘎典型草原西界采集的羊草基株,利用 ISSR 分子标记(AG)₇T 和(CA)₆A 确定不同基因型基株^[22],并编号。在相同条件下培养,除去母体效应,通过根茎无性繁殖得到同一基因型的大量分蘖。2014 年 6 月 19 日,利用这些羊草分蘖进行实验。

1.2 实验方法

本实验采用两因素三水平随机实验设计,因素一为氮添加,包括无氮添加(N0)、低氮添加(NL)及高氮添加(NH)三个水平,因素二为羊草基因型数目,包括单基因型(G1)、两基因型(G2)及四基因型(G4)三种基因型数目组合,共构建 9 种处理的实验种群。在直径 19cm 的塑料盆中,放入 2.5kg 的砂土和 50g 内蒙古典型草原区羊草草原原生生境地表新鲜土壤,每盆中分别移栽 4 株羊草单株分蘖。本实验共使用 9 种羊草基因型,每种氮添加处理下,移栽单基因型(G1)9 盆,两基因型组合(G2)5 盆,四基因型组合(G4)3 盆,共 17 盆;3 种氮添加处理总共 51 盆,基因型组合方式见表 1。移栽时,将羊草基株的分蘖统一去除根茎并以基因型编号进行标记,修剪使得地上部高度为 15cm,地下根系长度为 10cm,地上部叶片数为 4 片。对移栽 1 周内死去的分蘖重新种植。

表 1 本研究所用基因型组合方式
Table 1 Genotype combinations in the present study

羊草基因型数目 Number of <i>Leymus chinensi</i> genotypes	基因型组合方式 Genotype combinations
单基因型 Mono-genotype	Y18; Y24; Y1—8; 3/8; 3/25; 4/6; Y24; Y1—8; 3/1
两基因型组合 Combination of 2 genotypes	Y18, Y24; Y1—8, 3/8; 3/25, 4/6; Y24, Y1—8; 3/1, Y1—8
四基因型组合 Combination of 4 genotypes	Y1—8, 3/25, 3/8, Y24; 3/9, Y18, 3—32, 4/6; Y18, Y1—8, Y24, 3/8

不同基因型组合用分号隔开

经过一段时间恢复生长,2014 年 8 月 13 日,对实验种群进行氮添加处理,无氮添加(N0)、低氮添加(NL)和高氮添加(NH)为每周每盆分别施加 0 mL、10 mL、30 mL 0.0125 mol/L NH₄NO₃溶液,按全年 52 周计算,对应的施氮量分别为 0、6.42、19.24 g N/m²/a,施氮标准参照齐玉春等^[23]、张菊等^[24]略作改动;本实验共施氮 16 次。实验期间,土壤湿度控制在(10±2)%左右,除定期施加 NH₄NO₃溶液外,无其他营养添加,定期除去杂草,无高温和遮阳等胁迫;所有盆随机放置,每周更换位置以避免位置效应。2014 年 11 月 28 日,收集每盆中间位置的土壤作为根系土,立即过直径 1 mm 筛,除去植物残余根系后于-80℃冰冻保存,用于土壤微生物磷脂脂肪酸(PLFA, Phospholipid Fatty Acid)生物标记分析。

本研究采用磷脂脂肪酸(Phospholipid Fatty Acid, PLFA)温和甲酯化法^[25]进行土壤微生物 PLFA 生物标

记提取,利用气质联用色谱分析仪(Agilent 7890GC 5975MSD)进行 PLFA 生物标记分离及鉴定^[26]。对 C₁₄—C₂₀之间成功分离的 PLFA 生物标记进行含量计算及表征分类^[27]。其中,表征细菌的为 i14:0、i15:0、16:1ω7c、a16:0、i16:0、cy17:0、i17:0、17:0、18:1ω7c;表征真菌的为 18:2ω6,9c、18:1ω9c^[27-28]。

1.3 数据分析

PLFA 生物标记含量计算公式为:

$$\text{PLFA}(\text{nmol/gDW}) = (\text{PPLFA} \times S \times V) \div (\text{POSTD} \times D \times R \times W \times M)$$

式中,*PPLFA* 和 *POSTD* 分别是样品和标准物质的峰值面积,*S* 为内标标准物质的浓度 (ng/μL),*D* 为稀释倍数,*R* 为分取倍数,*V* 为样品的测定体积 (μL),*W* 为土壤干重 (g DW),*M* 为相应的 PLFA 的相对分子质量。

PLFA 生物标记生态学参数:

香农-威纳多样性指数 (Shannon-Wiener diversity index)^[29]:

$$H = - \sum p_i \lg p_i$$

辛普森优势度 (Simpson dominance index)^[30]:

$$D = 1 - \sum p_i^2$$

式中,*p_i* 为第 *i* 种 PLFA 生物标记在样品中的相对含量百分比。

将样品中是否检测到某一特定 PLFA 标记为 1 或 0 构建 0、1 矩阵,基于矩阵计算样品间的 Jaccard's 相似性系数,并基于相似性系数构建 UPGMA 聚类图;统计每个样品中检测到的 PLFA 生物标记总数及表征细菌、真菌和未分类的 PLFA 生物标记种类数。

由于本研究中各处理间重复不等,因此采用混合线性模型 (Mixed model) 双因素分析来检验羊草基因型数目、氮添加以及它们的交互作用对土壤微生物群落组成和结构 (PLFA 总量, Shannon-Wiener 多样性指数、Simpson 优势度, 细菌 PLFA 生物标记含量, 真菌 PLFA 生物标记含量, 真菌/细菌比) 以及检测得到的生物标记种类数的影响, 羊草基因型数目和氮添加设为固定因子。对于双因素分析中被检测的受交互作用显著影响的变量, 进一步进行简单效应分析, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) Duncan 检验来检测相同的氮添加 (基因型数目) 条件下, 基因型数目 (氮添加) 是否对该变量平均值影响显著; 而对仅受单一因素显著影响的变量, 进一步利用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 多重比较 Duncan 检验来检测不同处理是否对该变量的平均值影响显著。以上数据分析利用 SPSS21.0 完成, 在进行统计检验之前对数据进行转换以满足正态分布和方差齐性。

2 结果与分析

2.1 不同处理下土壤微生物 PLFA 生物标记种类

对 C₁₄—C₂₀ PLFA 生物标记进行统计, 共得到 41 种生物标记, 每个样品中得到的 5—15 种 PLFA 生物标记, 其中低氮添加四基因型组合 (NLG4) 处理组的一份样品中检测到的 PLFA 生物标记最少, 而无氮添加两基因型组合 (N0G2) 处理组的一份样品中检测到的 PLFA 生物标记最多。没有任何 PLFA 生物标记出现在所有样品中。只有两种 PLFA 生物标记, 16:0 和 18:0, 在大于 45 份样品中被检测到。其中, 16:0 在无氮添加单基因型 (N0G1)、低氮添加单基因型 (NLG1) 和无氮添加两基因型组合 (N0G2) 的一些样品中未被检测到, 而 18:0 在低氮添加多基因型组合 (NLG2 和 NLG4) 各一个样品中未检测到。有 8 种 PLFA 生物标记仅在一个样品中被检测到 (表 2)。

对不同处理得到的 PLFA 生物标记的种类数进行分析, 发现总 PLFA 生物标记和未分类 PLFA 生物标记在处理间无显著差异, 而细菌 PLFA 生物标记和真菌 PLFA 生物标记在处理间差异显著 ($P < 0.05$)。细菌 PLFA 生物标记种类数最高的出现在无氮添加四基因型组合 (N0G4) 处理组, 显著高于高氮添加单基因型 (NHG1) 和低氮添加多基因型组合 (NLG2 和 NLG4) 处理组; 而真菌 PLFA 生物标记在三个高氮处理组较高,

显著高于其他处理组(无氮添加单基因型 N0G1 除外)(表 3)。

表 2 51 份土壤样品中检测得到的 PLFA 生物标记种类及归类情况
Table 2 The type and classification of PLFA biomarkers detected in 51 soil samples

PLFA	N0G4	NLG4	NHG4	N0G2	NLG2	NHG2	N0G1	NLG1	NHG1	份数 Sum	类群 Classification
i14:0	110	110	111	11110	00000	11101	111001101	010111011	101101111	34	细菌
i15:0	000	000	000	11100	00000	00000	000001111	000000000	000000000	7	细菌
16:1ω7c	110	100	111	10111	10010	11111	101001011	011111001	101101011	34	细菌
a16:0	000	110	000	00000	01101	00000	111100111	100000000	000000000	13	细菌
i16:0	111	000	000	11110	00000	00000	000000001	111100000	000000000	12	细菌
cy17:0	111	000	000	00001	00000	00000	000000000	111100000	000000000	8	细菌
i17:0	000	000	000	10110	00000	00000	000100001	000000000	000000000	5	细菌
17:0	011	100	000	00000	10000	00000	001000000	001101001	100111001	14	细菌
18:1ω7c	000	000	111	00000	00000	11111	000000000	000000000	000000000	8	细菌
18:2ω6,9c	000	000	110	11001	10001	11101	111111111	100111110	111111111	35	真菌
18:1ω9c	010	110	111	01000	01010	11111	100000000	000000000	011101111	22	真菌
14:0	000	011	010	11000	01011	00000	100001000	000001000	100100010	14	未分类
a14:0	000	100	000	00011	00000	00000	001001010	011001000	000000011	11	未分类
9Me14:0	000	000	110	10000	00000	00000	000000000	000000000	000001000	4	未分类
15:0	111	110	011	00011	11101	11111	000000000	111111111	111011111	35	未分类
11Me16:1ω5c	000	000	000	00000	00000	00010	000010000	000000000	000000000	2	未分类
10Me16:0	000	000	000	00000	00100	00010	010000110	000000000	000000000	5	未分类
16:0	111	111	111	01110	11111	11111	111011111	110011111	111111111	46	未分类
10Me17:1ω7c	010	000	000	01000	00000	00000	000000000	000100001	000001000	5	未分类
9Me17:0	000	000	000	00000	00000	01101	000000000	000000000	000000000	3	未分类
18:3ω6,9,12c	110	000	000	00101	00000	00000	000000000	000000000	000000000	4	未分类
18:3ω3,6,9c	000	000	000	00010	00000	00000	000000000	000000000	000000000	1	未分类
18:1ω4,7	000	000	000	00000	00000	00000	000000000	000000000	000001000	1	未分类
18:1ω9t	110	100	111	11011	11100	01111	101111110	111011111	011000110	36	未分类
18:1ω5t	000	000	000	00000	00000	00000	000000000	001100000	000000000	2	未分类
18:1ω5c	110	101	010	11111	00110	01000	001111011	110000101	000000000	23	未分类
18:1ω8c	000	000	000	00000	00000	00000	000000100	000000000	000000000	1	未分类
18:1ω12c	000	100	000	10000	00000	00000	100000000	000001000	000001000	5	未分类
18:1ω11c	000	000	000	00000	00000	00010	000000010	000100000	000101000	5	未分类
18:1ω10c	000	000	000	00001	00010	00000	001000000	000000000	000000000	3	未分类
18:1ω10t	000	010	000	00000	10000	00000	000000000	000000010	000000010	4	未分类
18:0	111	111	101	11111	11111	11011	111111111	111111111	111111111	49	未分类
19:1ω10	000	000	000	00100	00000	00000	000000000	000000000	000000000	1	未分类
10Me19:0	000	000	001	00000	00000	00000	000000000	000000000	000000000	1	未分类
i19:0	100	110	101	10010	10111	00010	011101110	111111111	010101001	31	未分类
20:4ω6,9,12,15t	000	111	111	10110	10111	10110	100000011	001000011	111000111	28	未分类
20:3ω6,9,12	000	000	000	00000	01000	00000	000000000	000011111	000000000	6	未分类
20:2ω6,9c	000	000	000	00000	00000	00000	000000000	001000000	000000000	1	未分类
20:1ω9c	001	000	000	00000	00000	00000	000000000	000000000	000000000	1	未分类
20:3ω7,10,13	000	000	000	00000	00000	00000	000000000	001000000	000000000	1	未分类
20:0	000	000	010	10000	00000	01001	000011000	000010000	000000000	7	未分类

N0、NL 和 NH 分别表示无氮添加、低氮添加和高氮添加,G4、G2 和 G1 分别表示四基因型组合、两基因型组合和单基因型。1/0 分别表示在样品中检测/未检测到该脂肪酸;;同一个样品中检测到的脂肪酸列为一列

表 3 不同处理对土壤微生物 PLFA 生物标记的种类数的影响

Table 3 The effects of different treatments on the amount of microbial PLFA biomarkers (mean ± SE)									
变量 Variables	N0G4	NLG4	NHG4	N0G2	NLG2	NHG2	N0G1	NLG1	NHG1
PLFA 生物标记总量 PLFA biomarkers sum	10.33±7.76	9.67±2.60	11.67±0.67	12.00±0.89	8.80±0.37	10.80±0.58	10.00±0.80	11.00±0.55	9.56±0.87
细菌生物标记 Bacterial PLFA biomarkers	4.00±0.58a	2.00±1.15bc	3.00±0.00abc	3.80±0.58ab	1.20±0.20c	2.80±0.20abc	2.89±0.54abc	2.78±0.52 abc	2.00±0.37bc
真菌生物标记 Fungal PLFA biomarkers	0.33±0.33c	0.67±0.33bc	1.67±0.33a	0.80±0.37bc	0.80±0.20bc	1.80±0.20a	1.11±0.11ab	0.67±0.17bc	1.78±0.15a
未分类生物标记 Uncategorized PLFA biomarkers	6.00±1.00	7.00±1.15	7.00±0.58	7.40±0.68	6.80±0.37	6.20±0.86	6.00±0.60	7.56±0.41	5.78±0.60

同一行内相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)

2.2 不同处理对土壤微生物群落组成及结构的影响

双因素分析结果显示,羊草基因型数目、氮添加以及它们的交互作用对总 PLFA 生物标记和真菌 PLFA 生物标记含量均无显著影响,而氮添加对细菌 PLFA 生物标记含量、群落 Shannon-Wiener 指数、Simpson 优势度指数具有显著影响,即氮添加主效应显著;氮添加和基因型数目交互作用对细菌 PLFA 生物标记含量、真菌/细菌比具有显著影响(表 4)。对受交互作用显著影响的两个变量(细菌 PLFA 生物标记含量和真菌/细菌比),进一步进行简单效应分析,结果显示:在基因型数目为 2(G2)的条件下,低氮添加显著降低了细菌 PLFA 生物标记含量,其他条件下未检测到对细菌 PLFA 生物标记含量的显著影响;而氮添加对单基因型和四基因型组合真菌/细菌比均具有显著影响,但无规律可循(图 1A)。无氮添加(N0)条件下,基因型数目的增加显著影响了真菌/细菌比,单基因型(G1)条件下真菌/细菌比显著高于多基因型条件下的真菌/细菌比(图 1B)。对仅受氮添加影响的两个变量进行多重比较分析,结果显示:Shannon-Wiener 多样性指数和 Simpson 优势度表现出相同的趋势,均为无氮添加(N0)处理显著高于低氮添加(NL)处理组,且这种差异主要体现在无氮添加单基因型(N0G1)组显著高于低氮添加四基因型组合(NLG4)组(表 4,图 2)。

表 4 羊草基因型数目、氮添加及其交互作用对根际土壤微生物群落的影响

Table 4 The effects of genotype number, nitrogen addition and their interactions on the responses of microbial community						
变量 Variables	基因型数目 Genotype number (G)		氮添加 Nitrogen addition (N)		基因型数目×氮添加 G × N	
	<i>F</i> (2, 47)	<i>P</i>	<i>F</i> (2, 47)	<i>P</i>	<i>F</i> (4, 47)	<i>P</i>
PLFA 生物标记总量 PLFA biomarkers content (nmol/g DW)	0.379	0.687	0.177	0.838	1.186	0.331
细菌 PLFA 生物标记 Bacterial PLFA biomarkers (nmol/g DW)	0.447	0.643	3.518	0.039	2.606	0.049
真菌 PLFA 生物标记 Fungal PLFA biomarkers (nmol/g DW)	1.65	0.204	1.215	0.307	0.777	0.546
真菌/细菌比 Fungal to bacterial ratio	1.178	0.319	2.658	0.083	5.238	0.002
香农-威纳指数 Shannon-Wiener diversity index	1.157	0.324	3.759	0.032	1.477	0.226
辛普森优势度 Simpson dominance index	1.188	0.315	4.353	0.019	1.096	0.371

$P < 0.05$ 表示差异显著

2.3 根系微生物群落相似性研究

将土壤微生物 PLFA 生物标记按 1 或 0 统计(表 2)后进行 Jaccard's 相似性系数计算(数据略),并基于

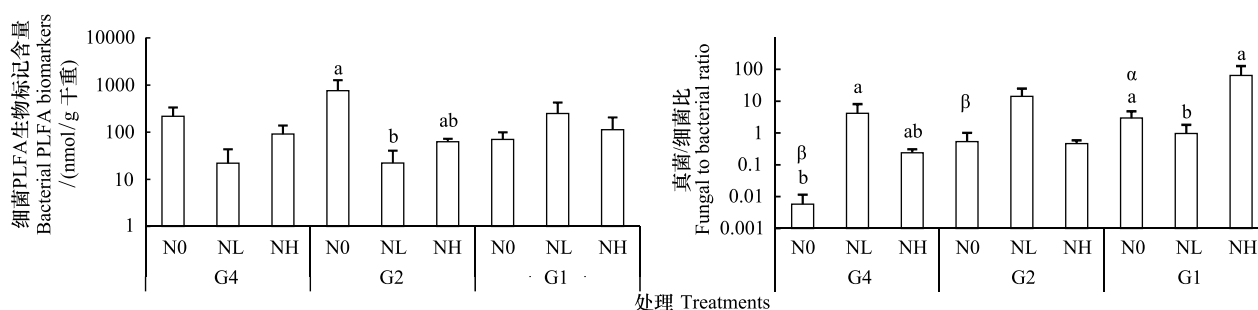


图1 不同处理条件下细菌 PLFA 生物标记含量及真菌/细菌比

Fig.1 The biomass of bacterial PLFA biomarkers and fungal to bacterial ratio under different treatments

N0、NL 和 NH 分别表示无氮添加、低氮添加和高氮添加,G4、G2 和 G1 分别表示四基因型组合、两基因型组合和单基因型。相同字母表示处理间差异不显著 ($P > 0.05$),其中,英文字母表示相同基因型数目,氮添加处理的影响;而希腊字母表示相同氮添加条件下,基因型数目的影响

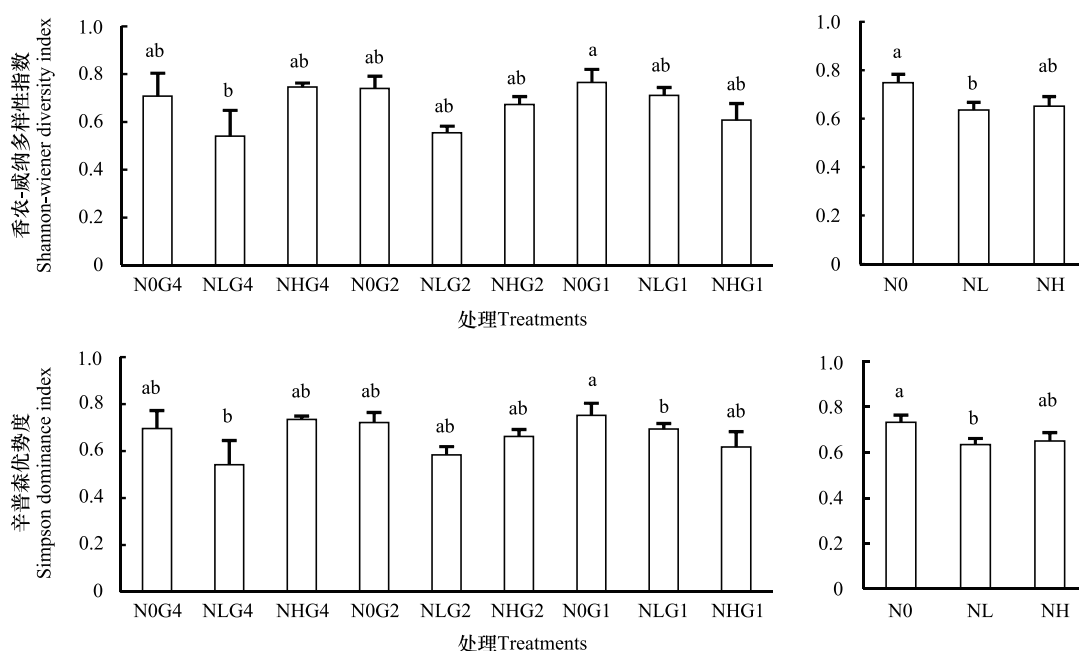


图2 不同处理条件下土壤微生物群落 Shannon-Wiener 多样性指数和 Simpson 优势度指数

Fig.2 Shannon-Weiner diversity index (A) and Simpson dominance index (B) of microbial community under different treatments

相同字母表示处理间差异不显著 ($P > 0.05$)

相似性系数矩阵得到 UPGMA 聚类图。聚类结果可以看出,有两个明显的组群与处理有关:第一组群以高氮添加(NH)为主,而第二个组群以单基因型(G1)种群为主,这一结果表明高氮添加(或物种基因型减少)会使地下部分微生物群落组成更相似。

3 讨论

植物多样性(种间和种内)与氮添加的交互作用是否影响土壤微生物群落组成和结构的研究刚刚起步, Chung 等^[17]对美国明尼苏达中东部天然草原以及 Strecker 等^[18]对德国萨勒河附近一半天然草地的研究均未检测到植物多样性与氮添加交互作用对土壤微生物群落的组成和结构具有显著影响,但 Chung 等研究发现植物物种多样性和氮添加的交互作用对土壤凋落物分解过程中的两个重要酶(β -葡萄糖苷酶和过氧化物酶)影响显著,并分析这可能是通过凋落物生化性质的改变而发生的。我们以中国北方草原重要建群种羊草为研究

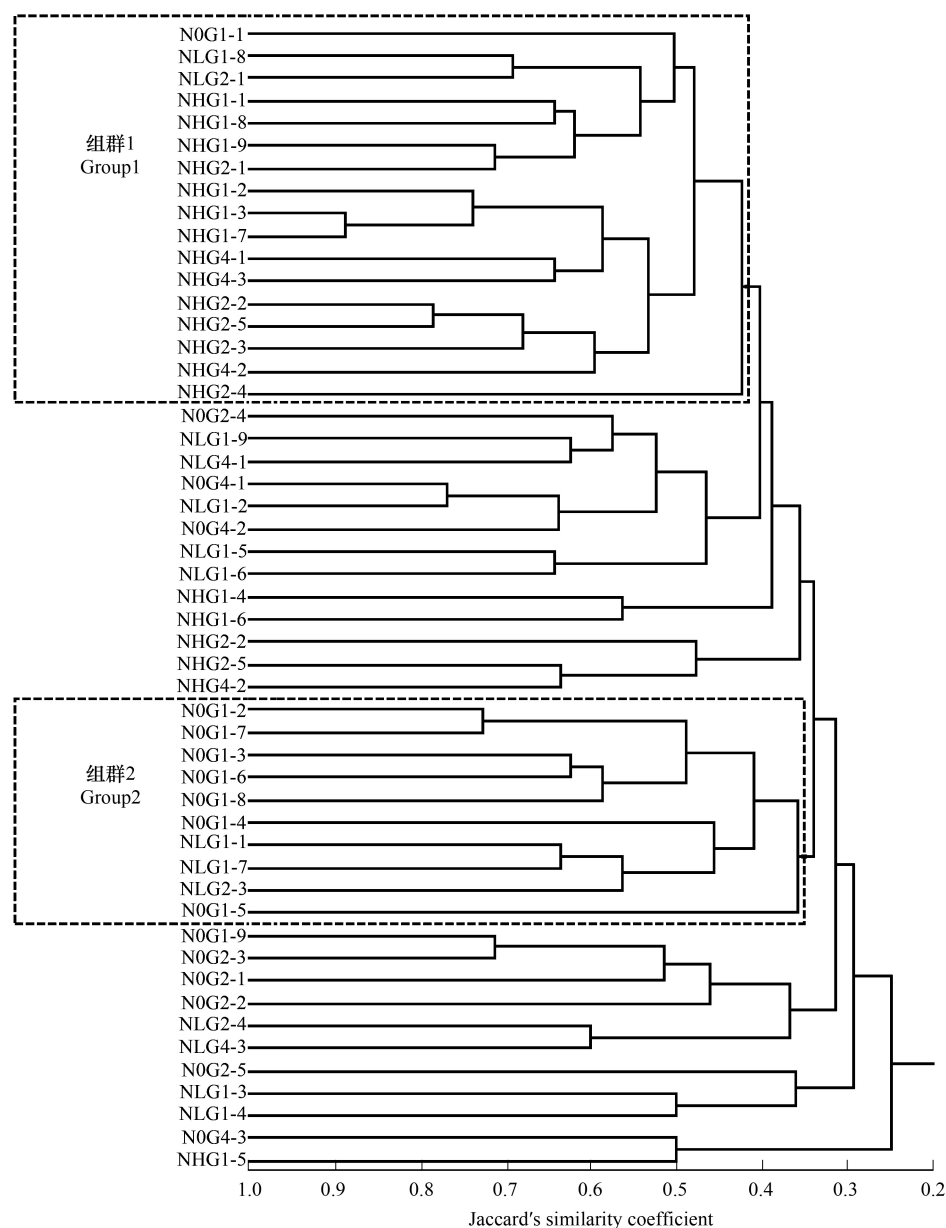


图3 不同处理的微生物群落 PLFA 生物标记聚类分析

Fig.3 Cluster analysis of microbial PLFA biomarkers with different treatments

对象,首次研究了植物种内基因型数目与氮添加的交互作用对土壤微生物群落组成和结构的及 PLFA 生物标记数量特征的影响,未检测到羊草基因型数目与氮添加交互作用对土壤微生物总 PLFA 生物标记含量的显著影响,这与前面提及的研究结果相似。但双因素分析发现两者的交互作用对细菌 PLFA 生物标记含量及真菌/细菌比具有显著影响(表 4),即羊草基因型数目和氮添加交互作用对土壤微生物的组成和结构均具有显著影响。这一结果与本研究为人工控制条件,所受干扰因素较少有关,也充分说明了羊草的多基因型效应受环境因素的影响显著^[21]。进一步简单效应的分析结果显示,在无氮添加处理下,基因型数目对微生物含量及真菌/细菌比影响显著,而氮添加将限制这种影响(表 4);聚类分析结果中组群 1 以高氮添加处理组为主(图 2),这些结果表明氮添加使得不同基因型数目羊草种群下土壤微生物群落的组成和结构更趋同,支持 Wei 等提出的在草原生态系统中,氮富集将弱化植物-微生物相互关系的观点,这可能与氮添加使得土壤微生物生长从资源限制转换为土壤酸性限制,减弱了植物碳对土壤微生物的限制,因而减弱了植物对土壤微生物的影响有关^[31]。聚类分析结果中组群 2 以无氮和低氮添加下的单基因型羊草为主(图 2),说明羊草种群基因型

数目的减少也会使得地下土壤微生物群落的组成更趋同,但这种影响弱于高氮添加。

关于同种植物基因型数目与土壤微生物群落的组成和结构关系的研究刚刚起步,我们基于已有的物种多样性与土壤微生物群落的组成及结构的研究^[32-34],对两者间的关系作了以下推测:(1)随着基因型数目的增加,植物输入土壤的次生代谢物发生改变,从而引起土壤氮的可利用性发生变化,使得土壤微生物群落组成呈显著的单峰曲线,这种关系在 Schweitzer 等对杨属植物研究时已经被证实^[13]。(2)由于基因型多样性对种群生物量具有显著的正效应,因此随着基因型数目的增加种群生物量增加,相应的微生物量,特别是真菌含量增加。(3)植物生物量增加导致微生物量增加,进而使得植物与微生物间对土壤资源的竞争加剧而使得结果不确定。在本研究中,羊草基因型数目对所观测的微生物群落含量组成和结构各变量均无显著影响,这可能与氮添加的主效应有关(表4);表3和图1结果显示,在无氮添加组,随着基因型数目的增加,细菌 PLFA 生物标记的数量增加而真菌 PLFA 生物标记的数量减少,真菌/细菌比下降。总体上来看,植物基因型数目与微生物群落间的关系表现为不确定,支持推测(3)。

在全球变化的大背景下,大气氮沉降对中国北方典型草原的影响已经被很多研究证实,氮添加能减少群落多年生禾草的数量、降低同种密度或基因型多样性^[19,35]。羊草作为中国北方典型草原区最重要的建群种,在维持群落生态系统功能方面具有重要作用。本研究结果表明群落建群种羊草基因型数目降低及高氮添加会使得土壤微生物群落更趋同,基因型数目与氮添加的交互作用对土壤微生物群落组成及结构具有显著影响,这一研究结果不仅为全面理解植物多样性与微生物群落结构和功能的关系提供数据补充,而且为氮沉降与基因型数目的交互作用如何影响土壤微生物群落的研究提供数据支持,对全球变化下生态系统进程的合理预测具有重要意义。

参考文献 (References):

- [1] Galloway J N, Dentener F J, Capone D G, Boyer E W, Howarth R W, Seitzinger S P, Asner G P, Cleveland C C, Green P A, Holland E A, Karl D M, Michaels A F, Porter J H, Townsend A R, Vosmarty C J. Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 2004, 70(2): 153-226.
- [2] Zhang N L, Wan S Q, Li L H, Bi J, Zhao M M, Ma K P. Impacts of urea N addition on soil microbial community in a semi-arid temperate steppe in northern China. *Plant and Soil*, 2008, 311(1/2): 19-28.
- [3] Zavaleta E S, Shaw M R, Chiariello N R, Mooney H A, Field C B. Additive effects of simulated climate changes, elevated CO₂ and deposition nitrogen on grassland diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(13): 7650-7654.
- [4] Schmidt S K, Lipson D A, Ley R E, Fisk M C, West A E. Impacts of chronic nitrogen additions vary seasonally and by microbial functional group in tundra soils. *Biogeochemistry*, 2004, 69(1): 1-17.
- [5] Orwin K H, Wardle D A, Greenfield L G. Ecological consequences of carbon substrate identity and diversity in a laboratory study. *Ecology*, 2006, 87(3): 580-593.
- [6] Berg G, Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 68(1): 1-13.
- [7] Angers D A, Caron J. Plant-induced changes in soil structure: processes and feedbacks. *Biogeochemistry*, 1998, 42(1/2): 55-72.
- [8] Hooper D U, Bignell D E, Brown V K, Brussaard L, Dangerfield J M, Wall D H, Wardle D A, Coleman D C, Giller K E, Lavelle P, Vander Putten W H, De Ruiter P C, Rusek J, Silver W L, Tiedje J M, Wolters V. Interactions between aboveground and belowground biodiversity in terrestrial ecosystems: patterns, mechanisms and feedbacks. *Bioscience*, 2000, 50(12): 1049-1061.
- [9] Crutsinger G M, Collins M D, Fordyce J A, Gompert Z, Nice C C, Sanders N J. Plant genotypic diversity predicts community structure and governs an ecosystem process. *Science*, 2006, 313(5789): 966-968.
- [10] Bailey J K, Deckert R, Schweitzer J A, Rehill B J, Lindroth R L, Gehring C, Whitham T G. Host plant genetics affect hidden ecological players: links among *Populus*, condensed tannins, and fungal endophyte infection. *Canadian Journal of Botany*, 2005, 83(4): 356-361.
- [11] Wang X Y, Miao Y, Yu S, Chen X Y, Schmid B. Genotypic diversity of an invasive plant species promotes litter decomposition and associated processes. *Oecologia*, 2014, 174(3): 993-1005.
- [12] Weinert N, Meincke R, Gottwald C, Heuer H, Schlöter M, Berg G, Smalla K. Bacterial diversity on the surface of potato tubers in soil and the influence of the plant genotype. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 74(1): 114-123.

- [13] Schweitzer J A, Fischer D G, Rehill B J, Wooley S C, Woolbright S A, Lindroth R L, Whitham T G, Zak D R, Hart S C. Forest gene diversity is correlated with the composition and function of soil microbial communities. *Population Ecology*, 2011, 53(1): 35-46.
- [14] Butchart S H M, Walpole M, Collen B, Strien A V, Scharlemann J P W, Almond R E A, Baillie J E M, Bomhard B, Brown C, Bruno J. Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science*, 2010, 328(5982): 1164-1168.
- [15] Galloway J N, Townsend A R, Erisman J W, Bekunda M, Cai Z, Freney J R, Martinelli L A, Seitzinger S P, Sutton M A. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, 2008, 320(5878): 889-892.
- [16] Reich P B, Knops J, Tilman D, Craine J, Ellsworth D, Tjoelker M, Lee T, Wedin D, Naeem S, Bahaeddin D, Hendrey G, Jose S, Wragge K, Goth J, Bengtson W. Plant diversity enhances ecosystem responses to elevated CO₂ and nitrogen deposition. *Nature*, 2001, 410(6830): 809-812.
- [17] Chung H, Zak D R, Reich P B, Ellsworth D S. Plant species richness, elevated CO₂, and atmospheric nitrogen deposition alter soil microbial community composition and function. *Global Change Biology*, 2007, 13(5): 980-989.
- [18] Strecker T, Barnard R L, Niklaus P A, Scherer-Lorenzen M, Weigelt A, Scheu S, Eisenhauer N. Effects of plant diversity, functional group composition, and fertilization on soil microbial properties in experimental grassland. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125678.
- [19] Bai Y F, Wu J G, Clark C M, Naeem S, Pan Q M, Huang J H, Zhang L X, Han X G. Tradeoffs and thresholds in the effects of nitrogen addition on biodiversity and ecosystem functioning: evidence from Inner Mongolia grasslands. *Global Change Biology*, 2010, 16(1): 358-372.
- [20] 李军鹏. 羊草种群内基因型多样性对不同水热条件的响应研究[D]. 天津: 南开大学, 2012: 1-36.
- [21] 申俊芳, 任慧琴, 辛晓静, 徐冰, 高玉葆, 赵念席. 羊草基因型多样性能增强种群对干扰的响应. *生态学报*, 2015, 35(23): 10.5846/stxb201405130979.
- [22] 王丹. 内蒙古中东部草原羊草(*Leymus chinensis*)种内变异与分化研究[D]. 天津: 南开大学, 2004: 39-41.
- [23] 齐玉春, 彭琴, 董云社, 肖胜生, 孙良杰, 刘欣超, 何亚婷, 贾军强, 曹丛丛. 温带典型草原土壤总有机碳及溶解性有机碳对模拟氮沉降的响应. *环境科学*, 2014, 35(8): 3073-3082.
- [24] 张菊, 康荣华, 赵斌, 黄永梅, 叶芝祥, 段雷. 内蒙古温带草原氮沉降的观测研究. *环境科学*, 2013, 34(9): 3552-3556.
- [25] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29(2): 111-129.
- [26] 任慧琴, 赵念席, 陈磊, 高玉葆. 土壤微生物群落结构分析中磷脂脂肪酸法和温和碱性甲酯化法的比较及定量优化. *环境化学*, 2014, 33(5): 760-764.
- [27] 白震, 何红波, 张威, 解宏图, 张旭东, 王鸽. 磷脂脂肪酸技术及其在土壤微生物研究中的应用. *生态学报*, 2006, 26(7): 2387-2394.
- [28] Lucas-Borja M E, Candel D, Jindo K, Moreno J L, Andrés M, Bastida F. Soil microbial community structure and activity in monospecific and mixed forest stands, under Mediterranean humid conditions. *Plant and Soil*, 2012, 354(1/2): 359-370.
- [29] Ge F. *Modern Ecology*. Beijing: Science Publishing House, 2002: 252-254.
- [30] Sun H X, Liu X L. Microbes studies of tea rhizosphere. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(7): 1353-1357.
- [31] Wei C Z, Yu Q, Bai E, Lu X T, Li Q, Xia J Y, Kardol P, Liang W J, Wang Z W, Han X G. Nitrogen deposition weakens plant-microbe interactions in grassland ecosystems. *Global Change Biology*, 2013, 19(12): 3688-3697.
- [32] Chase J M, Leibold M A. Spatial scale dictates the productivity-biodiversity relationship. *Nature*, 2002, 416(6879): 427-430.
- [33] Kaye J P, Hart S C. Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 1997, 12(97): 139-142.
- [34] Eisenhauer N, Bessler H, Engels C, Gleixner G, Habekost M, Milcu A, Partsch S, Sabais A C W, Scherber C, Steinbeiss S, Weigelt A, Weisser W W, Scheu S. Plant diversity effects on soil microorganisms support the singular hypothesis. *Ecology*, 2010, 91(2): 485-496.
- [35] Pan Q M, Bai Y F, Han X G, Yang J C. Effects of nitrogen additions on a *Leymus chinensis* population in a typical steppe of Inner Mongolia. *Acta Phytocologica Sinica*, 2005, 29(2): 311-317.