

DOI: 10.5846/stxb201807041462

马垒, 赵文慧, 郭志彬, 王道中, 赵炳梓. 长期不同磷肥施用量对砂姜黑土真菌多样性、群落组成和种间关系的影响. 生态学报, 2019, 39(11):

Ma L., Zhao W. H., Guo Z. B., Wang D. Z., Zhao B. Z. Effects of long-term application of phosphorus fertilizer on fungal community diversity, composition, and intraspecific interactions and variation with application rate in a lime concretion black soil. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(11):

长期不同磷肥施用量对砂姜黑土真菌多样性、群落组成和种间关系的影响

马 垒^{1,3}, 赵文慧^{1,3}, 郭志彬², 王道中², 赵炳梓^{1,*}

1 中国科学院南京土壤研究所, 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210008

2 安徽省农业科学院土壤肥料研究所, 合肥 230031

3 中国科学院大学, 北京 100049

摘要:以安徽蒙城砂姜黑土氮磷钾肥肥效长期定位试验为平台, 选取 P0 (不施磷肥)、P1 (P_2O_5 45 kg/hm²) 和 P2 (P_2O_5 90 kg/hm²) 3 个磷肥施用梯度, 采用现代高通量测序技术, 探索长期施用磷肥对真菌多样性、群落组成和种间关系的影响。结果发现真菌多样性随磷肥施入量增加而降低, 且与全磷和有效磷均成显著负相关。磷肥施用导致真菌群落组成发生明显改变, 冗余分析结果表明这与全磷和可溶性有机碳密切相关。P1 和 P2 中子囊菌门和子囊菌纲显著升高, 而被孢霉菌门和被孢霉菌纲则显著降低。在属水平上, 施磷处理中腐生营养型真菌显著升高, 而病原型和共生型真菌显著降低; 其中 P0 中 *Sagenomella*、*Simplicillium*、*Magnaportheopsis*、*Schizothecium* 和 *Nigrospora* 等 5 个属相对丰度最高; P1 中 *Plenodomus*、*Penicillium* 和 *Arthrobotrys* 相对丰度最高; P2 中 *Cyphellophora*、*Zopfiella*、*Guehomyces*、*Mortierella* 和 *Mucor* 等 5 个属相对丰度最高。网络分析发现施磷后真菌网络复杂度和稳定性升高, 物种间正相关关系增加, 负相关关系减少。因此在砂姜黑土区长期施用磷肥可降低真菌多样性, 增加土壤中腐生营养型真菌、减少共生或病原菌数量, 同时提高物种间网络复杂度和稳定性。以上结果表明磷肥施用对促进土壤养分循环, 控制植物病害、维持地下生态系统稳定性具有重要作用。

关键词:砂姜黑土; 磷肥; 高通量测序; 真菌; 网络分析

Effects of long-term application of phosphorus fertilizer on fungal community diversity, composition, and intraspecific interactions and variation with application rate in a lime concretion black soil

MA Lei^{1,3}, ZHAO Wenhui^{1,3}, GUO Zhibin², WANG Daozhong², ZHAO Bingzi^{1,*}

1 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Nanjing 210008, China

2 Soil and Fertilizer Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Phosphorus (P) deficiency is a limiting factor for agricultural production in the region covered with lime concretion black soil. Application of chemical P fertilizer is a common strategy to improve P availability. Numerous studies have demonstrated the essential role of P fertilization on soil fertility and crop yield, whereas relatively little is known about the effects of long-term P application on the belowground fungal community. The overall objective of this study was to investigate the effects of long-term P fertilization on fungal community diversity, composition, and intraspecific interactions

基金项目:国家重点研发计划项目 (2016YFD0300802); 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-03)

收稿日期:2018-07-04; **网络出版日期:**2018-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: bzhao@issas.ac.cn

in a lime concretion black soil, and to assess how the effects varied with application rate. Soils from a 21-year field experiment located in Mengcheng County, Anhui Province, were used, with treatments including three levels of P application rates, i.e. (1) P0: unamended control, (2) P1: chemical P fertilizer was applied at P_2O_5 45 kg/hm², and (3) P2: chemical P fertilizer was applied at P_2O_5 90 kg/hm². ITS1 gene pyrosequencing was employed to characterize the fungal community diversity and composition. The results showed that long-term P fertilization significantly improved soil fertility. Compared with the P0 treatment, the total P (TP) from the P2 and P1 treatments was 40.00% and 24.00% higher, and the available P (AP) was 384% and 144% higher, respectively. The Shannon index decreased with the P application rates, and was significantly negatively correlated with TP ($r = -0.678$, $p = 0.045$) and AP ($r = -0.677$, $p = 0.045$). Ascomycota was the dominant phylum in the studied soil, with its relative abundance being 65.71%—79.86%. Principal coordinate analysis (PCoA) revealed that the fungal community structure differed significantly among the different treatments. Redundancy analysis (RDA) further suggested that the fungal community structure was mainly determined by TP and dissolved organic carbon (DOC). Compared with the P0 treatment, the relative abundance of Ascomycota from P2 and P1 was 9.87% and 11.75% higher, and that of Sordariomycetes was 28.63% and 15.97% higher, respectively. Conversely, the relative abundance of Mortierellomycota from P2 and P1 was 42.63% and 43.81% lower, and that of Mortierellomycetes was 43.82% and 42.63% lower, respectively. Long-term P fertilization resulted in a significant enrichment of saprophytic fungi, namely, the genera of *Plenodomus*, *Penicillium*, and *Arthrotrichum* were enriched in the P1 treatment, and the genera of *Cyphellophora*, *Zopfiella*, *Guehomyces*, *Mortierella*, and *Mucor* were enriched in the P2 treatment. However, pathogenic (i.e., *Simplicillium* and *Magnaportheopsis*) and symbiotic (i.e., *Sagenomella* and *Nigrospora*) fungi were depleted in the P1 and P2 treatments, relative to that of the P0 treatment. Co-occurrence network analysis revealed that long-term P fertilization increased network complexity, as reflected by the larger edge number and higher average degree in the P1 and P2 treatments than in the P0 treatment, which may enhance the network stability by reducing the spread of indirect effects in the treatments with P application. Moreover, the P1 and P2 treatments had a higher ratio of positive edges, indicating more cooperators in the P1 and P2 treatments, whereas more defectors occurred in the P0 treatment. Our results demonstrated that long-term P application can improve P availability, reduce fungal community diversity, alter fungal community structure, increase saprophytic taxa, eliminate pathogenic and symbiotic taxa, and enhance network complexity and stability in lime concretion black soil.

Key Words: lime concretion black soil; phosphorus fertilization; high-throughput sequencing; fungal community; network analysis

砂姜黑土广泛分布于安徽、河南、山东等省,是我国主要的中低产田之一,其中磷有效性不足是砂姜黑土作物生产的重要限制因素^[1-2]。施用化学磷肥是提高磷素有效性,提升作物产量的最主要的农业措施之一^[3],但同时也可能影响地下微生物^[4]。我们之前的研究表明,长期施用磷肥可显著提高砂姜黑土酶活性和细菌多样性,同时改变细菌群落结构^[5]。然而长期施用磷肥对砂姜黑土真菌群落的影响目前仍不清楚。

真菌是农田土壤中最常见的微生物之一,根据营养方式可将其划分为腐生营养型、共生营养型和病原型等三种类型,在土壤有机质转化、促进/抑制作物生长和控制作物疾病等方面具有重要作用^[6]。真菌的生长受温度、pH、水分和养分等多种土壤环境因子的影响^[6]。磷肥的施用一方面可通过增加磷素有效性直接影响真菌群落结构,同时还可以通过改变土壤 pH、碳氮有效性以及影响植物生长等间接影响真菌群落结构^[4,7-8]。Beauregard 等^[4]对单一苜蓿耕作的壤质粘土进行 8 年不同磷肥施用梯度(不施磷肥、 P_2O_5 20 kg/hm²和 P_2O_5 40 kg/hm²)处理后,发现真菌群落结构发生显著变化,但并未对真菌多样性和丛枝菌根真菌群落结构产生明显影响。而 Cheng 等^[9]发现经过 90 年长期施用磷肥(P_2O_5 100 kg/hm²)后丛枝菌根真菌多样性显著降低,并且形成了一个与未施磷处理明显不同的群落结构。这种不一致的结果可能是由于不同的磷肥施用量、土壤质

地或作物轮作方式导致。虽然关于长期施用磷肥对真菌影响已有一些研究,但这些研究或者利用低分辨率的方法(比如 DGGE, PLFA 等)^[4,10],或者没有设置不同的磷肥梯度来研究不同磷肥施用量对真菌群落的影响^[9];且多数研究集中在施磷对真菌多样性、群落组成的影响^[4,7-11],而长期不同磷肥施用量下真菌网络构成和物种间的关系我们仍不清楚。

本研究以安徽蒙城砂姜黑土氮磷钾肥肥效长期定位试验为平台,选取 P0(不施磷肥)、P1(P_2O_5 45 kg/hm²)和 P2(P_2O_5 90 kg/hm²)3 个磷肥施用梯度。利用现代高通量测序技术,测定经过 21 年长期施用磷肥后真菌群落多样性及群落组成的差异。同时利用新兴的网络分析手段,研究不同磷肥施用量下真菌网络关系,探索磷肥施用对真菌种间关系的影响。

1 材料与方法

1.1 长期试验样地概况

长期试验位于农业部蒙城砂姜黑土生态环境站内(33°13'N, 116°35'E)。该试验站地处皖北平原,属于暖温带半湿润季风气候,年平均降雨量 872.4 mm,年均气温 14.8℃,供试土壤为砂姜黑土区最具代表的普通砂姜黑土。试验开始(1994 年)前土壤基本理化性质如下:有机质 9.90 g/kg,全氮 0.79 g/kg,全磷 0.28 g/kg,有效磷 7.80 mg/kg,速效钾 111.00 mg/kg。试验样地 1994—1998 年为小麦玉米轮作,1998—2015 年为小麦大豆轮作。

1.2 长期试验样地设计

试验共设置 9 个处理,本研究选取其中 3 个处理,即:(1)P0(不施磷肥);(2)P1(P_2O_5 45 kg/hm²);(3)P2(P_2O_5 90 kg/hm²)。每个处理设置 3 个重复,小区面积 19 m²,完全随机区组设计。除磷肥施用差异外,所有处理氮肥和钾肥施用量一致,其中 N 187.5 kg/hm²,K₂O 135 kg/hm²。氮肥为尿素,磷肥为普钙,钾肥为氯化钾。小麦、大豆品种为当地主栽品种,每 5—10 年更换一次。

1.3 土壤样品采集

所有土壤样品于 2015 年 6 月小麦成熟期时采集,即截止样品采集时,各处理已经历总共 21 年不同施肥处理。采用 S 采样法,使用直径 5 cm 的土钻采集 0—15 cm 的表层土壤,每个小区采取 9 钻混合成一个土壤样品。所有样品采用冰袋保鲜运回实验室。土壤样品在去除植物根系和大的石块后过 2 mm 筛混匀。所有样品分为两部分,一部分室温下风干后用于土壤理化性质测定,另一部分置于-80℃用于土壤 DNA 提取。

1.4 土壤理化性质测定

土壤理化性质均采用土壤常规分析方法测定^[12]。土壤 pH 按土水比 1:5(质量体积比)充分混合后用 pH 计测定;土壤有机碳(SOC)采用重铬酸钾氧化外加热法测定;土壤全氮(TN)采用半微量开氏法测定;全磷(TP)和有效磷(AP)采用钼锑抗比色法;可溶性有机碳(DOC)采用土水比 1:5(质量体积比)充分振荡 30 min 后,上清液过 0.45 μm 滤膜,滤液采用有机碳分析仪测定;土壤硝态氮(NO₃⁻-N)和铵态氮(NH₄⁺-N)采用 2 mol/L 的 KCl 提取,硝态氮采用双波段比色法,铵态氮采用靛酚蓝比色法。

1.5 土壤 DNA 提取及真菌 ITS1 基因高通量测序

土壤 DNA 采用 Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)试剂盒提取。每个样品称取 0.50 g 鲜土,按照说明书操作提取 DNA。

选取真菌 ITS1 区进行高通量测序。PCR 扩增采用特异性引物 ITS5F (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')/ITS1R (5'-GCTCGCTTCTTCATCGATGC-3')。每个样品前端引物均含有不同的 7 bp Barcode 用于区分不同样品。PCR 扩增条件包括 94℃ 5 min;90℃ 60 s,55℃ 60 s,72℃ 75 s,30 个循环,之后 72℃ 10 min。反应产物采用 QIA quick PCR Purification kit (Qiagen)进行纯化。将不同样品的 PCR 扩增产物等摩尔混合后,采用 Illumina 公司 MiSeq 测序仪完成序列分析(委托上海派森诺生物科技股份有限公司测定)。

1.6 数据统计分析

高通量测序所得序列按照以下步骤进行分析^[5]: (1) 双端序列采用 FLASH 进行拼接; (2) 使用 Cutadapt 切除引物; (3) 采用 QIIME (1.91) 去除质量分数低于 20, 序列短于 200 bp 的低质量序列; (4) 采用 RDP 数据库去除嵌合体; (5) 得到的高质量序列采用 Uparse 软件, 以 97% 相似度进行 OTU 划分, 采用 Blast 方法以 UNITE 数据库为比对进行注释。将未注释到门水平序列删除后, 所有样品随机抽取 27,000 条序列进行后续分析。真菌香农指数在 QIIME 中计算。基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析 (PCoA)、冗余分析 (RDA) 均使用 R 2.15.3 软件的 vegan 包进行。使用 vegan 包中的“mrpp”、“anosim”和“adonis”函数进行真菌群落结构相似性检验, 使用“bioenv”函数得到最优的 RDA 模型。Linear Discriminant analysis (LEfSe) 在 Galaxy 网站 (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) 中进行, 其中 LDA 值大于 3 的物种为显著差异物种。采用 SparCC 软件进行网络分析, 为了减少网络复杂度, 只选取 SparCC 值 $|r| > 0.80$, $P < 0.001$ 的关系用于网络构建。网络参数的计算和网络图形制作在 Gephi 0.9.2 软件中进行。使用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析和相关分析, 采用新复检验法 (Duncan's New Multiple Range Test) 进行平均值显著性多重比较 ($P < 0.05$)。采用 Microsoft Excel 2007 和 Origin 8.0 软件进行数据处理和绘图。

2 结果

2.1 土壤理化性质

土壤理化性质如表 1 所示。长期不同磷肥施用量对土壤 pH 和全氮均没有显著影响 ($P > 0.05$, 下同), 但土壤有机碳在 P2 处理中显著升高 ($P < 0.05$, 下同), 分别比 P0 和 P1 处理提高 7.65% 和 10.33%。全磷和可溶性有机碳含量均随着磷肥施入量的增加而显著升高, 其中 P2 和 P1 处理全磷分别比 P0 处理增加 40.00% 和 24.00%, 可溶性有机碳分别增加 31.36% 和 15.60%。铵态氮和硝态氮在不同施肥处理中呈相反的变化趋势, 其中铵态氮按照 $P0 < P1 < P2$ 的顺序升高, 而硝态氮则按照 $P2 < P1 < P0$ 的顺序升高。可以预见, 长期施用磷肥下有效磷含量显著升高, 其中 P2 和 P1 处理有效磷含量分别是 P0 处理的 4.84 倍和 2.44 倍。随着磷肥施入量的增加, 土壤碳氮比逐渐升高, 而土壤碳磷比和氮磷比则显著降低。

表 1 长期不同磷肥施用量对砂姜黑土理化性质的影响

Table 1 Physico-chemical properties of the lime concretion black soil relative to long-term P fertilization

处理 Treatment	pH	土壤有机碳 SOC/(g/kg)	全氮 TN/(g/kg)	全磷 TP/(g/kg)	可溶性有机碳 DOC/(mg/kg)
P0	5.22±0.28a	8.42±0.31b	1.07±0.05a	0.25±0.01c	18.78±0.14c
P1	5.43±0.06a	8.63±0.15b	1.01±0.03a	0.31±0.02b	21.71±1.63b
P2	5.53±0.13a	9.29±0.23a	1.05±0.09a	0.35±0.01a	24.67±0.20a

处理 Treatment	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N/(mg/kg)	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N/(mg/kg)	有效磷 AP/(mg/kg)	碳氮比 C:N	碳磷比 C:P	氮磷比 N:P
P0	1.56±0.32b	43.08±5.07a	2.34±0.08b	7.85±0.12b	34.05±1.22a	4.34±0.16a
P1	1.69±0.15b	10.44±1.02b	5.71±0.72b	8.52±0.27ab	28.30±2.12b	3.32±0.21b
P2	2.80±0.01a	8.06±0.20b	11.33±2.92a	8.85±0.50a	26.46±0.54b	3.00±0.23b

表中数据为平均值±标准差 ($n=3$), 同一列数据后不同字母表示显著差异 (Duncan 法, $P < 0.05$); P0: 不施肥对照, unamended control; P1: 施用 P_2O_5 45 kg/hm², chemical P fertilizer was applied at P_2O_5 45 kg/hm²; P2: 施用 P_2O_5 90 kg/hm², chemical P fertilizer was applied at P_2O_5 90 kg/hm²; SOC: soil organic carbon; TN: total nitrogen; TP: total phosphorus; DOC: dissolved organic carbon; NH₄⁺-N: ammonium; NO₃⁻-N: nitrate; AP: available phosphorus

2.2 真菌群落多样性

经过质量控制后, 总共得到 423,426 条高质量序列 (每个样品 27,137—64,626 条序列), 所有样品均一化为 27,000 条序列后, 以 97% 相似度与 UNITE 数据库进行比对, 总共得到 321 个 OTU (每个样品 237—263 个 OTU), 这些 OTU 归属于 10 个门, 29 个纲, 66 个目, 107 个科和 147 个属。以香农指数表征真菌 α -多样性

(图 1),发现当序列数达到 27,000 条时,香农指数在 P0 处理中最高(5.43),P1 处理居中(5.10),而 P2 处理最低(4.99),但各处理间差异未达显著性水平。相关性分析表明(图 1),香农指数与土壤中全磷($r = -0.678$, $P = 0.045$)和有效磷($r = -0.677$, $P = 0.045$)均成显著负相关。以上结果表明随着磷肥施入量的增加,土壤全磷和有效磷含量随之升高,而真菌 α -多样性有不断降低的趋势。

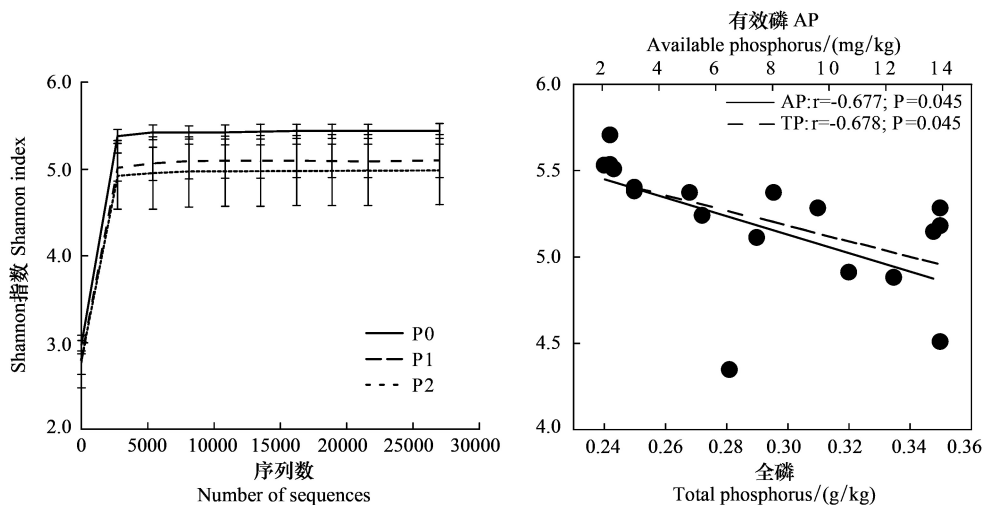


图 1 长期不同磷肥施用量对砂姜黑土真菌群落 α 多样性的影响及其与全磷和有效磷之间的关系

Fig.1 Fungal alpha-diversity of the lime concretion black soil relative to long-term P fertilization

P0:不施肥对照,unamended control;P1:施用 P_2O_5 45 kg/hm²,chemical P fertilizer was applied at P_2O_5 45 kg/hm²;P2:施用 P_2O_5 90 kg/hm², chemical P fertilizer was applied at P_2O_5 90 kg/hm²;AP:available phosphorus;TP:total phosphorus

对均一化的 OTU 表,基于 Bray-Curtis 距离进行主坐标分析(图 2)发现,主坐标的前两轴总共解释了 63.63%的总方差,其中第一轴和第二轴分别解释 46.17%和 17.46%的总方差。不施用磷肥的 P0 处理聚集在左侧,而施用磷肥的 P1 和 P2 处理聚集在右侧。分别采用 MRPP、ANOSIM 和 ADONIS 的方法对不施磷肥的 P0 处理与施用磷肥的 P1 和 P2 处理真菌群落进行相似性检验,结果发现真菌群落结构在施用磷肥后发生显著变化。以不同处理中 OTU 丰度作为响应变量,以土壤理化性质作为解释变量进行冗余分析,结果发现 DOC 和 TP 是导致施磷后真菌群落结构变化的主要环境因子。以上结果表明长期施用磷肥后真菌群落结构发生显著改变,这种变化与土壤养分(TP 和 DOC)密切相关。

2.3 真菌群落组成

子囊菌门(Ascomycota)是砂姜黑土中的优势菌(图 3),其相对丰度在 9 个样品中在 65.71%—79.86%之间。其余相对丰度大于 1%的门主要为被孢霉菌门(Mortierellomycota)和担子菌门(Basidiomycota),其在 3 个处理中平均相对丰度分别为 9.54%和 2.12%。单因素方差分析发现不同真菌物种对磷肥施用响应不同(图 3)。在门水平上(图 3),子囊菌门相对丰度随磷肥施入而显著增加,P2 和 P1 处理分别比 P0 高出 9.87%和 11.75%;而被孢霉菌门则随磷肥施入而显著降低,P2 和 P1 分别比 P0 降低 42.63%和 43.81%;其余菌门在三处理间差异未达到显著水平。

在纲水平上(图 3),子囊菌纲(Sordariomycetes)相对丰度最高,在 3 个处理中平均相对丰度占总序列数的 45.31%。其余相对丰度大于 1%的分别为散囊菌纲(Eurotiomycetes)、被孢霉菌纲(Mortierellomycetes)、锤舌菌纲(Leotiomycetes)和座囊菌纲(Dothideomycetes)。单因素方差分析发现子囊菌纲相对丰度随磷肥施入而显著升高,P1 和 P2 处理分别比 P0 提高 15.97%和 28.63%;尽管被孢霉菌纲相对丰度在 P1 和 P2 处理间没有显著差异,但它们比 P0 处理分别降低了 42.63%和 43.82%;对锤舌菌纲来说,只有 P2 处理显著降低其丰度达 48.41%,而 P1 与 P0 处理间没有显著差异;不同磷肥施用量对散囊菌纲和座囊菌纲相对丰度没有显著影响。

采用 LEfSe 方法,在属水平上对真菌群落进行差异物种分析,结果如图 3 所示。*Sagenomella*、

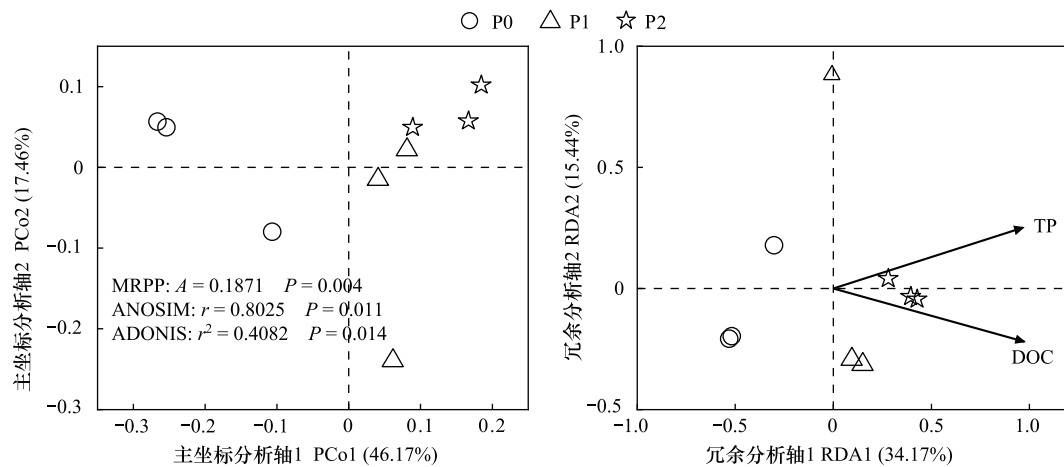


图2 长期不同磷肥施用量下砂姜黑土真菌群落结构及其与土壤理化因子关系

Fig.2 Fungal community structure and its relationship with soil properties of the lime concretion black soil relative to long-term P fertilization

MRPP:多响应置换过程分析,multiple response permutation procedure;ANOSIM:相似性分析,analysis of similarities;ADONIS:多元方差分析,analysis of variance using distance matrices;TP:全磷,total phosphorus;DOC:可溶性有机碳,dissolved organic carbon

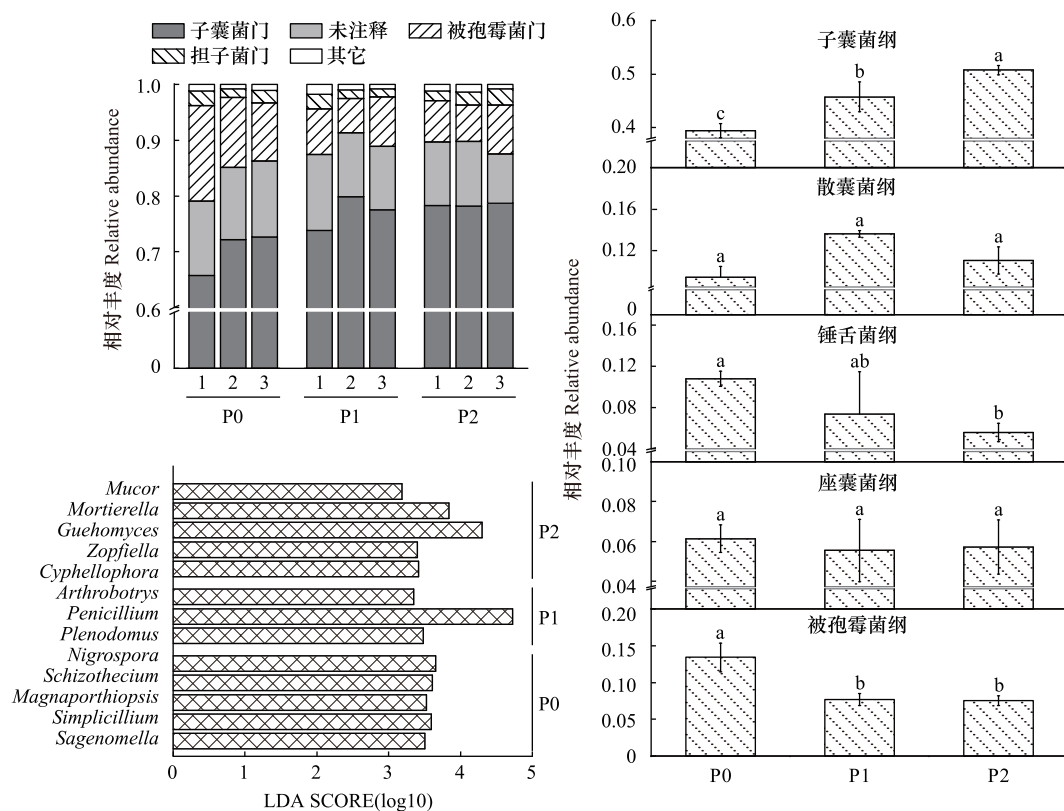


图3 长期不同磷肥施用量下砂姜黑土真菌群落相对丰度大于1%的门、纲以及属水平上差异物种

Fig.3 Relative abundance of the most abundant phyla, class and the influential species at genus level relative to long-term P fertilization
 柱子高度和误差线代表平均值和标准差($n=3$),不同字母表示在不同处理间显著差异(Duncan法, $P<0.05$),条形图长度代表LDA值,只显示不同组间差异显著的物种(LDA>3)

Simplicillium、*Magnaporthiopsis*、*Schizothecium* 和 *Nigrospora* 等5个属相对丰度在P0处理中最高;*Plenodomus*、*Penicillium* 和 *Arthrotrix* 等3个属相对丰度在P1处理中最高;而 *Cyphellophora*、*Zopfiella*、*Guehomyces*、

Mortierella 和 *Mucor* 等 5 个属相对丰度在 P2 处理中最高。

2.4 真菌群落种间关系

采用 SparCC 软件分别计算三种磷肥施用量下真菌 OTU 之间的关系,结果如图 4 所示。其中图中每一个节点代表一个 OTU,节点的大小代表其拥有的连接数量多少,不同节点颜色代表不同真菌门类;两个节点间的实线连接代表正相关关系,虚线连接代表负相关关系。对各网络中的节点数量进行统计,发现子囊菌门和担子菌门是三个网络中的优势菌。其中子囊菌门分别在 P0、P1 和 P2 处理中占有所有节点数量的 61.54%、72.12%和 74.79%,而担子菌门分别为 8.97%、6.73% 和 6.72%。

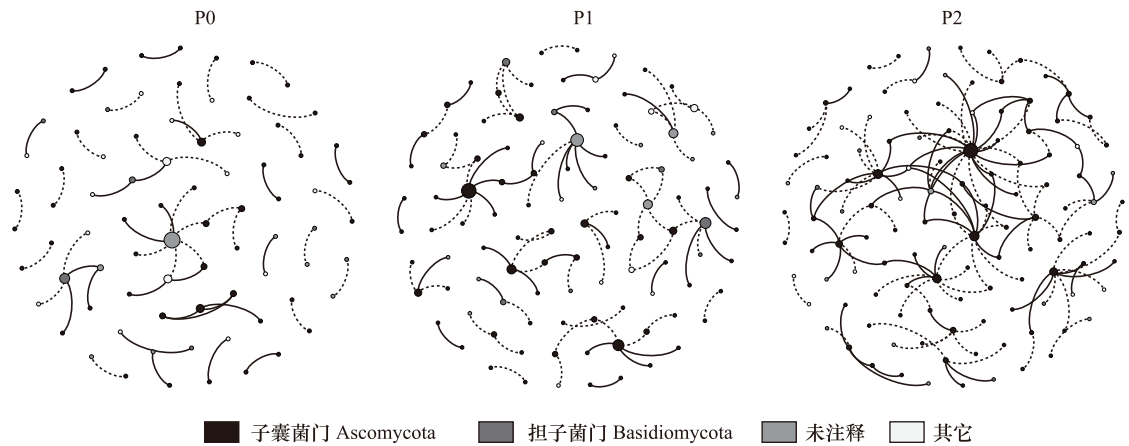


图 4 长期不同磷肥施用量对真菌群落网络组成的影响

Fig.4 Co-occurrence network analysis of fungal communities relative to long-term P fertilization

不同磷肥施用量下网络参数如表 2 所示。其中平均路径长度表示网络中任意两点间的平均距离;网络直径代表任意两个节点距离中的最大值;平均聚类系数和模块性反应网络中节点聚集在一起的程度;平均度代表每个节点拥有的连接的平均值。所测网络模块性指数均高于 0.4,说明 3 个网络均具有模块化结构。网络中连接的数量和平均度可用来表征网络复杂度,这两种指标均随磷肥施入量的增加而升高,说明施用磷肥可提高真菌网络复杂度,从而可能提高其稳定性。施用磷肥的 P2 和 P1 处理正相关比例增加,分别较 P0 处理高出 10.43%和 25.46%,而负相关比例分别比 P0 处理降低 9.27%和 22.63%。此外 P0 处理中具有较高的平均聚集系数,说明该处理中各节点聚集程度更高。

表 2 长期不同磷肥施用量下真菌群落网络指标的变化

Table 2 Key topological features of fungal community networks relative to long-term P fertilization

网络指标 Network metric	处理 Treatment		
	P0	P1	P2
节点数 Nodes	78	104	119
连接数 Edges	51	83	127
正连接比例 Ratio of positive edges	47.06	59.04	51.97
负连接比例 Ratio of negative edges	52.94	40.96	48.03
平均路径长度 Average path length	1.853	2.235	4.020
网络直径 Network diameter	5	6	10
平均聚集系数 Average clustering coefficient	0.286	0.110	0.117
模块性 Modularity	0.919	0.920	0.749
平均度 Average degree	0.654	0.798	1.067

3 讨论

3.1 长期施用磷肥对真菌多样性的影响

我们之前的研究表明,在砂姜黑土区细菌 α -多样性随着磷肥的施入而显著升高,而这主要与土壤中 TP 和 DOC 含量的升高有关^[5]。而本研究结果表明,与细菌相反,真菌 α -多样性随磷肥施入量的增加而不断降低的趋势,且与 TP ($r=-0.678, P=0.045$) 和 AP ($r=-0.677, P=0.045$) 均成显著负相关(图 1)。He 等^[11]发现在青藏高原草甸土中连续三年施用磷肥后,真菌群落 α -多样性显著降低。与之相似,Liu 等^[8]通过培育试验发现在红壤中施用磷肥后真菌 α -多样性显著降低。施磷后真菌 α -多样性的降低可能与土壤中 P 有效性变化有关。研究表明在低 N:P 环境中(P 丰富),细菌活性明显高于真菌,而在高 N:P 环境中(P 匮乏),真菌活性则显著高于细菌^[13]。本研究中 N:P 随着磷肥的施入而不断降低(表 1),因此这种 N 和 P 有效性的变化可能更利于细菌的生长,从而导致细菌 α -多样性升高,而真菌 α -多样性降低。此外,施用磷肥后,土壤中捕食真菌的土壤动物增加,也可能导致真菌 α -多样性的降低^[8]。

主坐标分析结果表明不施用磷肥与施用磷肥处理的真菌群落结构沿着第一轴分开(图 2),表明长期施用磷肥后真菌群落 β -多样性发生明显变化。冗余分析的结果进一步表明 TP 和 DOC 是导致真菌群落结构差异的最主要环境因子(图 2)。本研究中随着磷肥施入量的增加,土壤中 TP 含量显著升高(表 1),而 P0 处理中磷含量的不足可能直接影响真菌的生长。磷是真菌生长所必需的营养元素,磷素不足可导致真菌 DNA、RNA、功能酶和细胞壁等合成受阻,从而直接限制真菌生长^[14]。此外真菌是农田土壤中植物残体的最主要分解者,而植物残体中 C:P 远高于微生物^[15],因此土壤磷素缺乏可能会影响真菌对有机碳的分解利用,从而间接影响真菌的生长。DOC 升高是导致施磷后真菌群落结构变化的另一个环境因子。土壤中的真菌大多都是异养微生物,需要吸收外界碳来获取养分和能源^[6]。不同微生物对碳有效性适应性不同,其中一些生长较快的 r -策略型物种适宜在高浓度碳环境中,而一些生长缓慢的 k -策略型物种则适宜在低浓度碳环境中^[16]。前人的研究表明,pH 对土壤真菌群落结构形成具有重要影响^[17-18],而本研究中不同施磷处理间 pH 变化差异很小(5.22—5.53),因此可能对真菌群落结构影响并不显著。上述结果表明在砂姜黑土区长期施用磷肥后,土壤养分(TP 和 DOC)的变化是导致真菌群落结构发生改变的主要环境因子。

3.2 长期施用磷肥对真菌群落组成的影响

与以往本地区的研究结果相同,子囊菌门是砂姜黑土中的优势菌种^[18]。在门和纲水平上进行单因素方差分析,发现子囊菌门及其门下的子囊菌纲均随着磷肥施入而显著升高(图 3)。子囊菌门是土壤中主要的腐生营养型真菌,是土壤中动植物残体的主要分解者^[19]。研究认为子囊菌门适于高肥力的土壤环境,其相对丰度随着氮肥、磷肥、秸秆的施入而显著升高^[11, 19-20]。本研究中长期施用磷肥后土壤中 SOC、DOC、TP 和 AP 等养分指标显著增加(表 1),可能会有利于子囊菌门的生长。归属于子囊菌门的锤舌菌纲相对丰度在施磷处理中显著降低(图 3)。研究表明锤舌菌纲可以与植物共生生长,其相对丰度与 AP 含量成极显著负相关^[17, 20-21]。因此可以推断作物在磷含量高的土壤中与锤舌菌纲共生模式减弱,导致该物种在高磷土壤中相对丰度显著降低。被孢霉菌门及被孢霉菌纲相对丰度在施用磷肥后也显著降低(图 3)。研究表明被孢霉菌门中的一些真菌具有溶磷作用^[7],可以溶解土壤中的难利用的磷素,因此可以推断其在低磷土壤中更具有生长优势。

采用 LEfSe 方法,在属水平上对真菌群落组成进行差异物种分析(图 3)。结果发现 P0 处理中 *Simplicillium*、*Magnaportheopsis*、*Sagenomella* 和 *Nigrospora* 等相对丰度最高,其中 *Simplicillium* 和 *Magnaportheopsis* 为植物病原菌^[22-23],*Sagenomella* 和 *Nigrospora* 为植物内生菌^[24-25]。而 *Penicillium*、*Mortierella*、*Mucor* 和 *Zopfiella* 等则在施磷处理中显著升高,其中 *Penicillium*、*Mortierella* 和 *Mucor* 均为腐生营养型真菌^[26-27]。上述结果表明长期施用磷肥可提高土壤中腐生营养型真菌,降低共生和病原型真菌相对丰度。与我们的研究结果相似,Song 等^[10]研究发现经过 21 年连续施用磷肥后土壤中腐生营养型真菌增多,而共生的

丛枝菌根真菌显著降低。一个可能的解释是,长期施用磷肥后,作物秸秆和根系残留物增多,土壤中的腐生营养型微生物可以通过分解植物残体获得养分和能量,在土壤中具有较高的竞争力。丛枝菌根真菌与植物共生生长,可促进植物对土壤中矿质养分(尤其是磷)的吸收,而磷肥的施用导致土壤养分(P)含量升高,植物对丛枝菌根真菌的依赖性降低,导致其相对丰度降低^[10];在缺磷施肥土壤中,植物秸秆和根系残留量较少,此时腐生营养型微生物由于没有充足的外源有机物料补充,而失去竞争优势,这时土壤中的植物病原菌、植物内生菌等可以通过寄生或共生的方式通过宿主获取养分和能量,从而具有较强的竞争力。此外,*Zopfiella* 在施磷土壤显著升高(图3),研究表明 *Zopfiella* 可通过分泌抗真菌化合物,抑制植物病原菌,从而控制植物病害^[28]。

3.3 长期施用磷肥对真菌种间关系的影响

我们对三种磷肥施用量下真菌群落进行网络分析,探索长期施用磷肥对真菌群落种间关系的影响(图4)。首先,长期施用磷肥下网络中子囊菌门比例逐渐增多,而担子菌门比例逐渐减少。研究表明子囊菌门主要分解新鲜植物残体,而担子菌门主要分解难利用碳^[29]。这种物种营养习性的变化可能与土壤中C的有效性有关,本研究中长期施用磷肥后土壤中易利用的DOC含量显著升高,可能导致子囊菌在网络关系中比例增多。其次,随着磷肥施用量不断升高,真菌网络连接数和平均度也随之升高(表2),意味着施用磷肥后真菌物种之间的直接作用增多,而间接作用减少,而这种网络复杂度的增加会导致网络更加稳定,对外界环境变化“抵抗性”更强^[30]。与我们的研究结果相似,Feng等^[31]研究发现长期施用磷肥可以增加细菌物种间的关联,从而减少环境对物种筛选作用。最后,我们发现施用磷肥后物种之间正相关作用比例增加,而负相关作用比例减少(表2)。这可能是由于P0土壤中养分(尤其是TP和DOC)含量较低,各物种为争夺养分而导致竞争作用增多,而施磷土壤中由于养分资源充足,因此各个物种间正相关比例增多。值得注意的是P1处理中正相关连接比例最高,这种正相关连接的增加有利于形成更多的营养级,物种之间通过资源或代谢产物互补使得养分利用更为高效^[32]。此外随着磷肥的施入,平均聚类系数逐渐降低,这说明长期施用磷肥增加可土壤异质性,可满足不同生态位真菌生长;而不施磷肥土壤中较高的平均聚类系数意味着其内物种功能的高度一致性,环境因子的筛选作用较强,只有那些适应缺磷条件的物种存在于网络中。

前人的研究结果表明,在砂姜黑土区长期施用磷肥可显著提高砂姜黑土土壤肥力,提升地上作物产量^[1-3]。而本研究的结果进一步表明,长期施用磷肥还可明显改变地下真菌群落多样性、组成和种间关系。施磷后土壤中 *Penicillium*、*Mortierella* 和 *Mucor* 等腐生营养型真菌的增多有助于土壤有机质的转化,*Simplicillium* 和 *Magnaportheopsis* 等植物病原菌的减少有助于减缓作物病害。此外磷肥施用还可提高真菌网络复杂度和稳定性。这些结果有助于我们了解地下微生物群落与土壤环境因子、地上作物之间关系。

4 结论

经过21年不同磷肥施用梯度后,真菌多样性随磷肥施用量的增多而有降低的趋势,并与土壤TP和AP成显著负相关。磷肥施用显著改变了真菌群落组成,而这主要与土壤养分(TP和DOC)的变化有关。磷肥的施用刺激腐生营养型真菌的生长,但导致病原型和共生/寄生型真菌相对丰度降低。此外长期施用磷肥还可增加真菌群落结构的复杂度和稳定性。

参考文献(References):

- [1] 王道中,郭熙盛,何传龙,刘枫. 砂姜黑土长期定位施肥对小麦生长及土壤养分含量的影响. 土壤通报, 2007, 38(1): 55-57.
- [2] 李玮,乔玉强,陈欢,曹承富,杜世州,赵竹. 秸秆还田和施肥对砂姜黑土理化性质及小麦-玉米产量的影响. 生态学报, 2014, 34(17): 5052-5061.
- [3] 王道中,郭熙盛,刘枫,何传龙. 长期施肥对砂姜黑土无机磷形态的影响. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(3): 601-606.
- [4] Beauregard M S, Hamel C, Atul-Nayyar, St-Arnaud M. Long-term phosphorus fertilization impacts soil fungal and bacterial diversity but not AM fungal community in alfalfa. Microbial Ecology, 2010, 59(2): 379-389.
- [5] 马垒,郭志彬,王道中,赵炳梓. 长期三水平磷肥施用梯度对砂姜黑土细菌群落结构和酶活性的影响. 土壤学报, Doi: 10.11766/trxb201805080149.
- [6] Deacon J. Introduction: the fungi and fungal activities//Deacon J, ed. Fungal Biology. Malden, MA: Blackwell Publishing Ltd, 2013: 1-15.

- [7] Bao Z H, Matsushita Y, Morimoto S, Hoshino Y T, Suzuki C, Nagaoka K, Takenaka M, Murakami H, Kuroyanagi Y, Urashima Y, Sekiguchi H, Kushida A, Toyota K, Saito M, Tsushima S. Decrease in fungal biodiversity along an available phosphorous gradient in arable andosol soils in Japan. *Canadian Journal of Microbiology*, 2013, 59(6): 368-373.
- [8] Liu M, Liu J, Chen X F, Jiang C Y, Wu M, Li Z P. Shifts in bacterial and fungal diversity in a paddy soil faced with phosphorus surplus. *Biology and Fertility of Soils*, 2018, 54(2): 259-267.
- [9] Cheng Y, Ishimoto K, Kuriyama Y, Osaki M, Ezawa T. Ninety-year-, but not single, application of phosphorus fertilizer has a major impact on arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Plant and Soil*, 2013, 365(1/2): 397-407.
- [10] Song G, Chen R, Xiang W, Yang F, Zheng S, Zhang J, Zhang J, Lin X. Contrasting effects of long-term fertilization on the community of saprotrophic fungi and arbuscular mycorrhizal fungi in a sandy loam soil. *Plant Soil and Environment*, 2015, 61(3): 127-136.
- [11] He D, Xiang X J, He J S, Wang C, Cao G M, Adams J, Chu H Y. Composition of the soil fungal community is more sensitive to phosphorus than nitrogen addition in the alpine meadow on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Biology and Fertility of Soils*, 2016, 52(8): 1059-1072.
- [12] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [13] Güsewell S, Gessner M O. N:P ratios influence litter decomposition and colonization by fungi and bacteria in microcosms. *Functional Ecology*, 2009, 23(1): 211-219.
- [14] Tapia-Torres Y, Rodríguez-Torres M D, Elser J J, Islas A, Souza V, García-Oliva F, Olmedo-Álvarez G. How to live with phosphorus scarcity in soil and sediment: lessons from bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(15): 4652-4662.
- [15] Mouginot C, Kawamura R, Matulich K L, Berlemont R, Allison S D, Amend A S, Martiny A C. Elemental stoichiometry of fungi and bacteria strains from grassland leaf litter. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 76: 278-285.
- [16] Dighton J, White J F. *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2017: 501-508.
- [17] Ma M C, Jiang X, Wang Q F, Ongena M, Wei D, Ding J L, Guan D W, Cao F M, Zhao B S, Li J. Responses of fungal community composition to long-term chemical and organic fertilization strategies in Chinese mollisols. *MicrobiologyOpen*, 2018, 7(5): e00597.
- [18] Sun R B, Dsouza M, Gilbert J A, Guo X S, Wang D Z, Guo Z B, Ni Y Y, Chu H Y. Fungal community composition in soils subjected to long-term chemical fertilization is most influenced by the type of organic matter. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(12): 5137-5150.
- [19] Ma A Z, Zhuang X L, Wu J M, Cui M M, Lv D, Liu C Z, Zhuang G Q. Ascomycota members dominate fungal communities during straw residue decomposition in arable soil. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66146.
- [20] Zhou J, Jiang X, Zhou B K, Zhao B S, Ma M C, Guan D W, Li J, Chen S F, Cao F M, Shen D L, Qin J. Thirty four years of nitrogen fertilization decreases fungal diversity and alters fungal community composition in black soil in northeast China. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 95: 135-143.
- [21] Dean S L, Farrer E C, Taylor D L, Porras-Alfaro A, Suding K N, Sinsabaugh R L. Nitrogen deposition alters plant-fungal relationships: linking belowground dynamics to aboveground vegetation change. *Molecular Ecology*, 2014, 23(6): 1364-1378.
- [22] Ward N A, Schneider R W, Aime M C. Colonization of soybean rust sori by *Simplicillium lanosoniveum*. *Fungal Ecology*, 2011, 4(5): 303-308.
- [23] Bei S K, Zhang Y L, Li T T, Christie P, Li X L, Zhang J L. Response of the soil microbial community to different fertilizer inputs in a wheat-maize rotation on a calcareous soil. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2018, 260: 58-69.
- [24] Tian J J, Gao X X, Zhang W M, Wang L, Qu L H. Molecular identification of endophytic fungi from *aquilaria sinensis* and artificial agarwood induced by pinholes-infusion technique. *African Journal of Biotechnology*, 2013, 12(21): 3115-3131.
- [25] Zhao R L, Li W J, Zhang Y, Lin F C, Wang Y, Yang J Z, Hyde K D. Endophytic fungi from the medicinal plant, *Panax notoginseng*, isolated from healthy and root-rot diseased individuals. *Chiang Mai Journal of Science*, 2014, 41(2): 249-261.
- [26] Eichlerová I, Homolka L, Žižňáková L, Lisá L, Dobiášová P, Baldrian P. Enzymatic systems involved in decomposition reflects the ecology and taxonomy of saprotrophic fungi. *Fungal Ecology*, 2015, 13: 10-22.
- [27] Vašutová M, Edwards-Jonášová M, Baldrian P, Čermák M, Cudlín P. Distinct environmental variables drive the community composition of mycorrhizal and saprotrophic fungi at the alpine treeline ecotone. *Fungal Ecology*, 2017, 27: 116-124.
- [28] Huang X Q, Liu L L, Wen T, Zhu R, Zhang J B, Cai Z C. Illumina MiSeq investigations on the changes of microbial community in the *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* infected soil during and after reductive soil disinfestation. *Microbiological Research*, 2015, 181: 33-42.
- [29] Francioli D, Schulz E, Lentendu G, Wubet T, Buscot F, Reitz T. Mineral vs. Organic amendments: microbial community structure, activity and abundance of agriculturally relevant microbes are driven by long-term fertilization strategies. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1446.
- [30] Suweis S, Grilli J, Banavar J R, Allesina S, Maritan A. Effect of localization on the stability of mutualistic ecological networks. *Nature Communications*, 2015, 6: 10179.
- [31] Feng Y Z, Guo Z Y, Zhong L H, Zhao F, Zhang J B, Lin X G. Balanced fertilization decreases environmental filtering on soil bacterial community assemblage in north china. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2376.
- [32] Xun W B, Huang T, Li W, Ren Y, Xiong W, Ran W, Li D C, Shen Q R, Zhang R F. Alteration of soil bacterial interaction networks driven by different long-term fertilization management practices in the red soil of South China. *Applied Soil Ecology*, 2017, 120: 128-134.