

DOI: 10.5846/stxb201901030031

李金花,高克祥,万利,曹国玉,焦方园,王延平,田叶韩,赵炳杰,李传荣.微生物菌剂对楸树幼苗生长及根际土细菌群落结构的影响.生态学报, 2020,40(21):7588-7601.

Li J H, Gao K X, Wan L, Cao G Y, Jiao F Y, Wang Y P, Tian Y H, Zhao B J, Li C R. Effects of microbial agent on the growth of *Catalpa bungei* seedlings and the diversity of bacterial community in rhizosphere soil. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(21): 7588-7601.

微生物菌剂对楸树幼苗生长及根际土细菌群落结构的影响

李金花^{1,2}, 高克祥³, 万利⁴, 曹国玉⁵, 焦方园^{1,2}, 王延平^{1,2}, 田叶韩³, 赵炳杰^{1,2}, 李传荣^{1,2,*}

1 泰山森林生态系统国家定位观测研究站, 泰安 271018

2 黄河下游森林培育国家林业局重点实验室, 泰安 271018

3 山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018

4 中国标准化研究院, 北京 100191

5 烟台市林业局, 烟台 264000

摘要:为探究球毛壳 ND35 微生物菌剂对楸树幼苗生长及土壤肥力的作用机制,本研究楸树幼苗为研究对象,采用室内盆栽试验,设计 0(CK),10(T1),15(T2),20(T3)4 种微生物菌剂施用量,测定幼苗生长情况、土壤微生物组成结构、土壤酶和土壤养分等特征。研究结果如下:(1)球毛壳 ND35 微生物菌剂可显著促进楸树幼苗的生长,株高、地径、地上及地下生物量显著提高($P<0.05$),T2 处理下促生效果最好。(2)施用球毛壳 ND35 微生物菌剂可显著提高土壤中有有机质、硝态氮、铵态氮含量及脲酶、磷酸酶、蔗糖酶活性($P<0.05$)。(3)球毛壳 ND35 微生物菌剂可显著影响土壤细菌群落组成,提高细菌群落的丰富度和多样性,使土壤中 β -变形菌纲(Betaproteobacteria)、 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)的相对丰度显著下降, α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、 δ -变形菌纲(Deltaproteobacteria)的相对丰度呈显著提高,可使土壤中鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)的相对丰度显著提高 21.88%—103.56% ($P<0.05$),芽孢杆菌属(*Bacillus*)的相对丰度提高 66.28%—65.97% ($P<0.05$),酸杆菌属(*Acidibacter*)的相对丰度提高 12.76%—38.06%。(4)冗余分析(RDA)结果表明,土壤硝态氮、铵态氮、有机质是影响土壤细菌群落分布和多样性的重要环境因子,土壤细菌群落结构的改变会显著影响土壤脲酶、蔗糖酶、碱性磷酸酶的活性。因此,施用球毛壳 ND35 微生物菌剂可通过影响植物根际土壤的化学性质及生物性质,促进楸树幼苗的生长。这一研究结果为楸树繁育提供了新的指导方向,亦为将其用于困难立地及退化生态系统植被恢复提供基础理论指导。

关键词:球毛壳 ND35;楸树;高通量测序;细菌群落;根际土

Effects of microbial agent on the growth of *Catalpa bungei* seedlings and the diversity of bacterial community in rhizosphere soil

LI Jinhua^{1,2}, GAO Kexiang³, WAN Li⁴, CAO Guoyu⁵, JIAO Fangyuan^{1,2}, WANG Yanping^{1,2}, TIAN Yehan³, ZHAO Bingjie^{1,2}, LI Chuanrong^{1,2,*}

1 Taishan Forest Ecosystem State Locating Observation and Research Station in Shandong, Tai'an 271018, China

2 Key Laboratory of State Forestry Administration for Silviculture of the Lower Yellow River, Tai'an 271018, China

3 College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

4 China National Institute of Standardization, Beijing 100191, China

基金项目:林业公益性行业科研专项(201504406);山东省林业科技创新项目(2019LY005,LYCX07-2018-37);山东省“双一流”奖补资金资助项目(SYL2017XTT03);国家自然科学基金(31570705);山东省新旧动能转换重大工程重大课题攻关项目(2019XJDNZH-08-38-01)

收稿日期:2019-01-03; 修订日期:2020-06-01

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: chrlis@sdau.edu.cn

5 Yantai Forestry Bureau, Yantai 264000, China

Abstract: In order to investigate the mechanism of the *Chaetomium globosum* ND35 microbial agent on the growth and soil fertility of *Catalpa bungei* seedlings, the *C. bungei* seedlings were taken as the research object and 0, 10, 15, and 20 g microbial agents were applied on the *C. bungei* seedlings' root. And the growth status of the seedlings, the composition structure of soil microorganisms, soil enzymes and soil nutrients were measured. The results were obtained as follows: (1) the *C. globosum* ND35 could significantly promote the growth of *C. bungei* seedlings. The plant height, ground diameter, aboveground and underground biomass were significantly increased ($P < 0.05$). And there was a best promotion effect at T2. (2) The contents of organic matter, nitrate nitrogen, ammonia nitrogen and the activity of urease, phosphatase and sucrose enzyme in soil were significantly improved by applying the *C. globosum* ND35 microbial agent ($P < 0.05$). (3) The composition of soil bacterial communities was significantly influenced by *C. globosum* ND35. And the diversity of soil bacterial communities was also increased significantly. The relative abundance of Betaproteobacteria and Gammaproteobacteria were significantly declined after using *C. globosum* ND35. And the relative abundance of Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Acidibacter* were significantly improved. Among them, the relative abundance of *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Acidibacter* increased 21.88%—103.56% ($P < 0.05$), 66.28%—65.97% ($P < 0.05$), 12.76%—38.06%, respectively. (4) Redundancy analysis (RDA) ascertained that the distribution and diversity of bacterial communities were closely related to the organic matter, nitrate nitrogen and ammonia nitrogen. And the activity of urease, sucrase and alkaline phosphatase were significantly altered with the change of soil bacterial community structure. Therefore, applying *C. globosum* ND35 microbial agent could promote the growth of *C. bungei* seedlings by affecting the chemical and biological properties of rhizosphere soil. The results could provide a new direction for the breeding of *C. bungei* seedlings and theoretical guidance for the *C. globosum* ND35 microbial agent application in vegetation restoration of degraded ecosystems.

Key Words: *Chaetomium globosum* ND35; *Catalpa bungei*; high-throughput sequencing; bacterial community; rhizosphere soil

微生物是土壤环境的重要组成部分,参与调节了土壤生态系统中 80%—90%的代谢过程,不仅是养分循环和转化的主要推动者,更是有机质形成和分解的主要参与者^[1-2],因而众多学者将微生物群落特征的变化作为评价土壤生态系统结构和功能的动态指标。在所有土壤微生物中细菌种类最为丰富,数量多且分布广,约占土壤微生物总量的 70%—90%^[3-4]。其不仅在维持土壤生态系统稳定和提高土壤肥力方面发挥了重要作用^[5],而且在促进植物生长、防治或减轻病虫害方面扮演着重要角色^[4,6-8]。土壤细菌对外界环境的干扰极为敏感^[9],不同施肥模式^[10]、施用微生物菌剂^[6]、不同林下植被管理措施^[11]等均会导致细菌群落结构发生大幅度变化,从而影响土壤生态系统的稳定性及功能发挥。可见,土壤细菌群落特征指标可用于评价土壤生态系统功能。

微生物菌剂是有益微生物菌群以某种多孔物质为载体加工制成的微生物活菌制剂,能够在土壤或基质中繁殖,形成有利于植物生长的优势菌群^[12],其在一定程度上能改善土壤微生物区系及代谢活性,防治土传病害,对植物具有显著的促生作用。相关研究表明,施用芽孢杆菌、荧光假单胞杆菌、淡紫拟青霉等微生物菌剂能够显著促进烟草植株的生长,控制根结线虫的发病率,提高土壤微生物群落的多样性和对碳源的利用率^[13]。王超等^[14]的研究也表明,有机农田施用枯草芽孢杆菌菌肥可显著促进冬瓜体内营养成分的积累,改善冬瓜品质,提高土壤细菌群落的丰富度。另外由于微生物菌剂应用成本低、处理效果好、不会对环境造成污染,也已成为国内外退化生态系统恢复的主要研究内容^[15-16],特别是恢复模式的评价和选择。球毛壳 (*Chaetomium globosum*) ND35 微生物菌剂的活性菌株 ND35 是分离自健康毛白杨 (*Populus tomentosa*) 内生优势菌株,具有广泛的拮抗活性,属于囊菌门、核菌纲、球壳目、黑孢壳科、毛壳菌属^[17]。该菌株寄主范围广,定

殖能力强,其菌丝在植物体内蔓延迅速,与植物形成互惠共生关系^[18]。作为促生微生物菌剂,目前诸多研究报道了其对于黄瓜、番茄、小麦等草本及禾本科植物的促生作用^[19-21],而关于其对乔木促生及根际土壤微生物群落的影响尚未引起足够的重视。

楸树(*Catalpa bungei*)属紫葳科梓树属,是我国特有的珍贵用材和观赏树种,自古素有“木王”之美称。由于根系发达,常常作为固沙保土、护堤固岸的造林树种。目前研究多见于楸树种质资源、抗逆性、无性株系、良种壮苗配套技术等方面^[22-24],鲜有调控其根系生长环境方面的研究。本研究探讨施用球毛壳 ND35 微生物菌剂对楸树幼苗生长的影响,并采用高通量测序的方法分析其根际土壤微生物群落的响应,同时结合土壤肥力指标,探讨其对楸树的作用机理,旨在为楸树资源的可持续利用提供技术依据,为将其应用于困难立地和退化生态系统的植被恢复提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

该试验在山东农业大学林学实验站遮雨棚内进行。选择一年生粗细一致、无病虫害的楸树实生苗进行盆栽实验,培养基质为过 2 mm 筛的砂质土。其田间最大持水量为 22.35%,有机质含量为 9.99 g/kg,硝态氮 64.93 mg/kg,氨态氮 61.92 mg/kg,速效磷 13.27 mg/kg,土壤 pH 为 7.05。种植盆规格为高 19.7 cm,外口径为 29.4 cm,内口径为 25.4 cm。为减少试验时花盆内水分及养分的流失,每个花盆下面都配有花盆托。试验所用微生物菌剂为山东农业大学植保学院高克祥教授实验室提供,其活性成分为球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)ND35 菌株,孢子浓度约为 6.01×10^7 cfu/g。

1.2 试验设计

试验时基质灭菌,每盆栽植一株楸树实生苗,试验中球毛壳 ND35 微生物菌剂的用量为 0、10、15、20 g/株,分别记为 CK、T1、T2、T3,每处理 10 个重复。在试验进行 120 d 时,每个处理中随机选取 6 株楸树幼苗,测定株高、地径,之后整株收割用于生物量的测定。同时从中选取 3 株轻轻抖掉根系外围土,用毛刷轻轻刷粘附在根表面的土壤作为根际土,过 2 mm 筛后,一部分置于无菌的 15 mL 离心管中,用液氮罐保存带回实验室,用于细菌群落结构的测定;另一部分用自封袋带回实验室,风干过筛后用于土壤理化性质和土壤酶活的测定。

1.3 测试指标及方法

1.3.1 土壤理化性质和酶活性的测定

土壤 pH 值用电极法测定,土壤悬浊液为水土质量比 1:2.5;土壤有机质采用重铬酸钾容量法测定;土壤氨态氮、硝态氮采用流动分析仪(AA-3,德国)测定;土壤有效磷采用 NaHCO_3 浸提-间断流化学分析仪(Smartchem 200,意大利 AMS)测定。

土壤脲酶采用靛蓝比色法测定,蔗糖酶采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定,碱性磷酸酶采用磷酸苯二钠法测定,过氧化氢酶采用高锰酸钾滴定法测定。

1.3.2 土壤微生物基因组 DNA 的提取

采用 CAT 法提取样本基因组 DNA^[25],利用琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的纯度及浓度。取适量的样品于离心管中,使用无菌水稀释样品至 $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$,置于冰箱 -20°C 保存。

1.3.3 土壤细菌 16S rDNA 基因 PCR 扩增

以稀释后的基因组 DNA 为模板,用引物 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTA AT-3')^[26]对 V4-V5 高变区进行 PCR 扩增。

PCR 反应体系为:15 μL Phusion Master Mix (2 \times); 3 μL Primer (2 $\mu\text{mol}/\text{L}$); 10 μL Gdna (1 $\text{ng}/\mu\text{L}$); 2 μL H_2O 。

PCR 反应程序为:(1)在 98°C 下预变性 1 min;(2)在 98°C 下变性 10 s, 50°C 下退火 30 s, 72°C 下延伸 30 s, 循环 30 次;(3)在 72°C 下继续延伸 5 min。PCR 产物用 2% 浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测,检测完毕后于

4℃保存备用。

1.3.4 土壤细菌 16S rDNA 基因测序

将 PCR 扩增产物送至北京诺禾致源生物信息科技有限公司利用 Illumina Hiseq 2500 平台进行高通量测序。

1.4 数据处理方法

使用 Qiime 软件 (Version 1.9.1) 进行 Chao1 指数、Shannon 指数、Simpson 指数、ACE 指数的计算;应用 SPSS 21.0 软件对数据进行单因素方差分析 (one way ANOVA) 及 Pearson 相关性分析,以 Duncan 法则进行多重比较,显著水平 $P < 0.05$, 极显著水平 $P < 0.01$;运用 Canoco 5.0 软件进行冗余分析 (RDA) 及主成分分析 (PCA);采用 Origin 2018 作图。

2 结果分析

2.1 微生物菌剂 ND35 对楸树幼苗生长指标的影响

施用球毛壳 ND35 微生物菌剂可显著促进楸树幼苗的生长 (图 1), 且不同施用量的作用效果不同。与 CK 相比, 楸树幼苗的株高和地径在 T1 处理下分别显著提高 25.37% 和 7.53% ($P < 0.05$), 地下生物量在 T1 和 T2 处理下显著提高 40.41% 和 29.00% ($P < 0.05$), 地上生物量在 3 种菌剂施用量下均与 CK 差异显著 ($P < 0.05$), 提高率为 22.60%—41.74%。因此, 球毛壳 ND35 菌剂在 T2、T3 施用量下对楸树幼苗的促生效果较为显著。

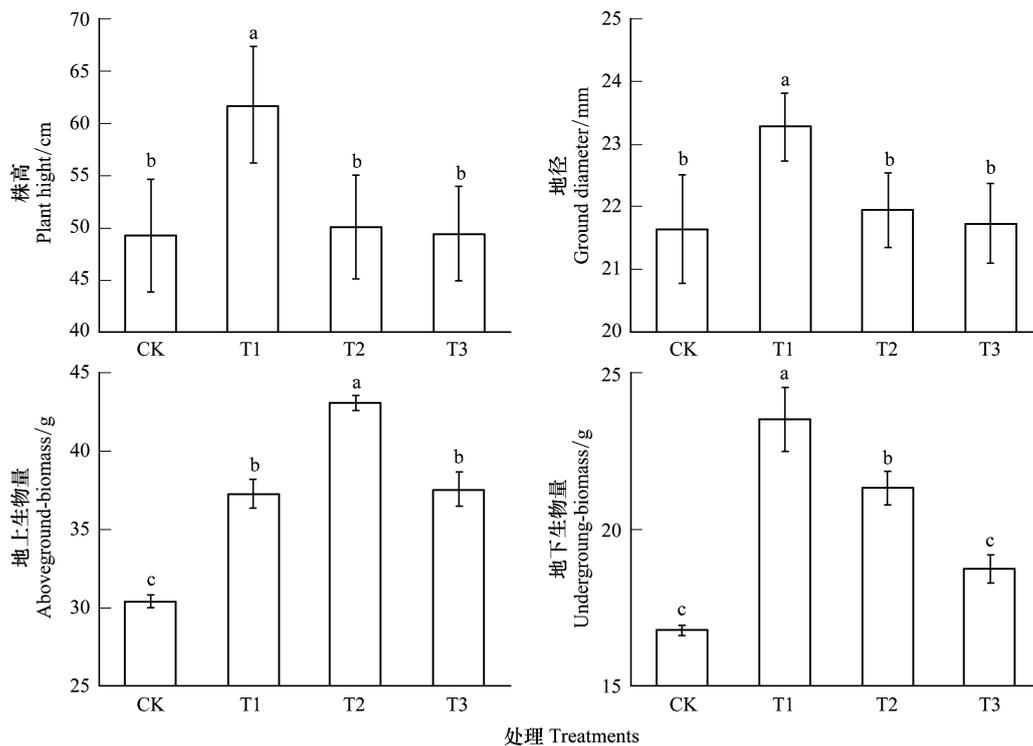


图 1 不同处理下楸树的生长量指标

Fig.1 The growth indices of *Catalpa bungei* under different treatments

在同一指标图中,不同字母表示在 5% 水平上差异显著 (Duncan test); CK: 不施微生物菌剂对照 Unamended control; T1: 施用 10 g/株 ND35 微生物菌剂 ND35 microbial agent was applied at 10 g/tree; T2: 施用 15 g/株 ND35 微生物菌剂 ND35 microbial agent was applied at 15 g/tree; T3: 施用 20 g/株 ND35 微生物菌剂 ND35 microbial agent was applied at 20 g/tree

2.2 微生物菌剂 ND35 对土壤酶活性与理化性质的影响

球毛壳 ND35 微生物菌剂的施用对土壤中脲酶、蔗糖酶、碱性磷酸酶活性有显著影响,对过氧化氢酶活性

的影响不显著(表1)。脲酶活性随菌剂用量的增加呈先降低后上升趋势,其中 T3 中的脲酶活性较 CK 显著提高 60.48% ($P < 0.05$)。碱性磷酸酶、蔗糖酶均随菌剂用量的增加呈先上升后下降的趋势,其活性较 CK 分别提高 57.44%—114.88%、13.03%—78.90%, T2 中碱性磷酸酶、蔗糖酶活性与 CK 差异显著 ($P < 0.05$)。为了更好地刻画菌剂施用对土壤质量的影响,参考 García-Ruiz^[27] 的方法将土壤酶的几何平均数(Geometric Mean of Enzymes, GMea)作为评价土壤质量的酶活性指标。结果发现, T1、T2、T3 处理下的 GMea 显著高于 CK ($P < 0.05$),且在 T2 处理下 GMea 有最大值。说明施用球毛壳 ND35 菌剂可显著提高土壤酶活性,这主要是由于土壤酶一般来自植物根系、微生物群落和动植物残体,其活性与外界环境变化密切相关。

表 1 不同处理土壤酶活性分析
Table 1 Soil enzyme activities in different treatments

处理 Treatments	指数 Indices				
	脲酶 Urease/ ($\text{mg g}^{-1} \text{d}^{-1}$)	碱性磷酸酶 Alkaline Phosphatase/ ($\text{mg g}^{-1} \text{d}^{-1}$)	蔗糖酶 Sucrase/ ($\text{mg g}^{-1} \text{d}^{-1}$)	过氧化氢酶 Catalase/ (mL/g)	土壤酶的 几何平均数 Geometric mean of enzymes
CK	14.88±0.41b	5.78±0.17b	3.46±0.05c	2.57±0.06a	191.34±6.62c
T1	14.69±0.13b	9.10±2.66ab	5.39±0.40b	2.66±0.19a	465.11±120.55b
T2	17.77±1.48b	12.42±0.97a	6.19±0.15a	2.92±0.02a	984.28±14.81a
T3	23.88±3.33a	11.03±1.55ab	3.91±0.18c	2.72±0.08a	675.15±49.79b

同列不同字母表示该指标在 5% 水平上差异显著 (Duncan test); CK: 不施微生物菌剂对照 Unamended control; T1: 施用 10 g/株 ND35 微生物菌剂 ND35 microbial agent was applied at 10 g/tree; T2: 施用 15 g/株 ND35 微生物菌剂 ND35 microbial agent was applied at 15 g/tree; T3: 施用 20 g/株 ND35 微生物菌剂 ND35 microbial agent was applied at 20 g/tree

菌剂的施用显著提高了土壤中有机质、铵态氮、硝态氮的含量(表2),对土壤速效磷含量影响不显著。与 CK 相比,球毛壳 ND35 微生物菌剂使土壤中有机质、铵态氮、硝态氮的含量分别提高 35.61%—54.24%、25.00%—82.71%、13.04%—48.42% ($P < 0.05$)。但不同用量处理之间,土壤有机质、铵态氮含量差异不显著,而硝态氮含量在 T2、T3 处理下显著高于 T1 处理 ($P < 0.05$)。菌剂处理下的土壤速效磷含量相比 CK 提高 2.71%—7.35%,但不显著 ($P > 0.05$)。这一方面可能是由于微生物菌剂自身含有部分元素含量,另一方面可能是微生物作为土壤的重要组成部分,其代谢产物能够促进土壤中的养分循环。

表 2 不同处理土壤的 pH 和养分含量
Table 2 Soil chemical properties of different treatments

处理 Treatments	pH 值 pH value	有机质 Organic matter/ (g/kg)	硝态氮 Nitrate- nitrogen/ (mg/kg)	铵态氮 Ammonium- nitrogen/ (mg/kg)	有效磷 Available phosphorus/ (mg/kg)
CK	7.04±0.03b	9.66±1.30b	10.76±0.90b	12.35±1.20b	12.92±0.29a
T1	7.13±0.05ab	13.10±0.44a	13.45±2.22ab	13.96±1.21b	13.27±0.66a
T2	7.20±0.04a	14.18±0.47a	19.66±1.22a	18.33±0.87a	13.87±0.50a
T3	7.11±0.02ab	14.90±0.91a	17.55±2.90a	18.03±0.29a	3.42±0.61a

2.3 微生物菌剂 ND35 对土壤细菌群落结构的影响

2.3.1 土壤 α 多样性分析

施用球毛壳 ND35 微生物菌剂后,土壤样品的 ACE、Chao1、Shannon 及 Simpson 指数均随施用量的增加呈现先上升后下降的趋势(表3)。T1、T2、T3 中细菌群落的多样性和丰富度指数均显著高于 CK,尤其 T2 中的 ACE、Chao1、Shannon、Simpson 指标数值相比 CK 分别显著提高了 19.83%、38.82%、4.62%、2.01% ($P < 0.05$),说明球毛壳 ND35 菌剂的施用能显著提高土壤细菌群落的丰富度和多样性。

表 3 不同处理土壤细菌群落多样性分析

Table 3 Diversity indices of bacterial community of different soil

指数 Indices	处理 Treatments			
	CK	T1	T2	T3
ACE 指数 ACE Index	3049.360±195.25b	3600.160±300.39ab	4147.760±104.57a	3396.320±66.65b
Chao1 指数 Chao1 Index	2967.950±204.92b	3568.900±342.83ab	4120.070±64.68a	3370.860±102.49b
Shannon 指数 Shannon Index	9.310±0.11b	9.610±0.07a	9.740±0.03a	9.550±0.06ab
Simpson 指数 Simpson Index	0.995±0.001b	0.997±0.000a	0.997±0.000a	0.996±0.001a

同行不同字母表示该指标在 5%水平上差异显著(Duncan test)

2.3.2 土壤 β 多样性分析

将土壤细菌群落 OTU 的相对丰度进行 PCA 分析,结果如图 2 所示。图 2 中第一主成分(PC1 轴)可解释 13.93%的细菌群落组成,第二主成分(PC2 轴)可以解释 10.84%的细菌组成。结果表明,施用与未施用微生物菌剂处理的土壤细菌主要成分有比较明显的分类趋势,除个别样品外,CK 处理下细菌的种类基本集中在第四象限,含有较高的第一主成分,T1、T2、T3 处理下细菌的种类基本分布在第一和第二象限,含有较高的第二主成分,并且分布相对集中。此结果认为,施用球毛壳 ND35 微生物菌剂能够显著改变土壤中细菌的群落组成,但不同用量处理下土壤细菌群落组成差异不明显。

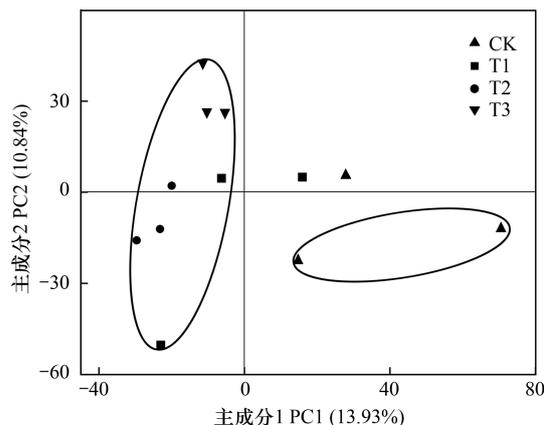


图 2 不同处理土壤细菌群落 OTU 相对丰度的主成分分析 (PCA)

2.3.3 土壤细菌群落组成

从门的分类水平看,各处理细菌群落组成相似(图 3)。主要包含变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、浮游菌门(Planctomycetes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、疣微菌门(Verrucomicrobia) 10 个细菌门,约占全部细菌丰度的

Fig.2 Principal components analysis based on OTU relative abundance of soil bacterial community

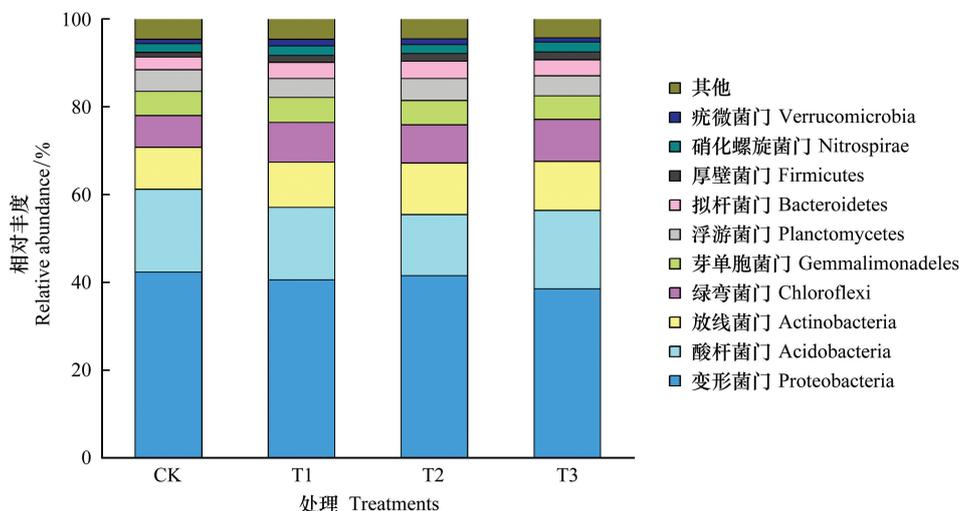


图 3 不同处理土壤门水平细菌群落组成

Fig.3 Composition of soil bacterial community on the phylum level

95%左右。其中各处理的变形菌门、酸杆菌门及放线菌门相对丰度在 10% 以上,为优势细菌门。变形菌门是最为优势的细菌门,主要包括 β -变形菌纲 (Betaproteobacteria)、 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria)、 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria)、 δ -变形菌纲 (Deltaproteobacteria) 4 个亚纲。施用球毛壳 ND35 微生物菌剂后,变形菌门的相对丰度有所下降,其 4 个亚纲的分布也发生了显著变化(图 4)。其中 β -变形菌纲、 γ -变形菌纲的相对丰度呈下降趋势,尤其是 T2、T3 中 β -变形菌纲的相对丰度比 CK 分别下降 34.70%、37.22% ($P < 0.05$),而 α -、 δ -变形菌纲的相对丰度呈显著增加趋势,分别从 CK 的 7.72%、6.34% 增加至 10.68%—12.55%、7.69%—8.83%,T2 中这两个细菌纲的相对丰度分别比 CK 增加 62.59% 和 39.24% ($P < 0.05$)。酸杆菌门是第二大优势细菌门,施用球毛壳 ND35 微生物菌剂后,它的相对丰度有所降低,尤在 T2 中下降了 25.93% ($P < 0.05$),这可能是其他细菌门的增加所致。放线菌门能产生种类繁多的胞外酶和次生代谢产物,促进土壤中动植物遗骸的腐烂,在生态系统中扮演着重要角色,它也是不同处理下的优势细菌门类。与 CK 相比,施用微生物菌剂可使其相对丰度提高 7.21%—21.6% ($P > 0.05$),这主要是由于菌剂的施用显著提高了土壤环境中有机质的含量。另外,还有部分细菌门的相对丰度发生显著了变化,与 CK 相比,T1、T2、T3 中绿弯菌门、拟杆菌门、厚壁菌门、硝化螺旋菌门的相对丰度分别增加 21.30%—32.01%、28.56%—40.64%、50.04%—70.47%、2.22%—13.59%,其中绿弯菌门及厚壁菌门的相对丰度在 T3 中与 CK 差异显著 ($P < 0.05$)。

从细菌属水平来看,根据物种注释和丰富度信息,选取相对丰度排名前 30 的细菌属进行分析(图 5)。未施用微生物菌剂的土壤(CK)中固氮弧菌属 (*Azoarcus*)、H16、苔藓菌属 (*Bryobacter*)、*Gaiella* 的相对丰度较高 (>1%)。T1、T2 处理的土壤中,RB41、地杆菌属 (*Geobacter*)、固氮弧菌属 (*Azoarcus*)、H16、*Gaiella*、unidentified-

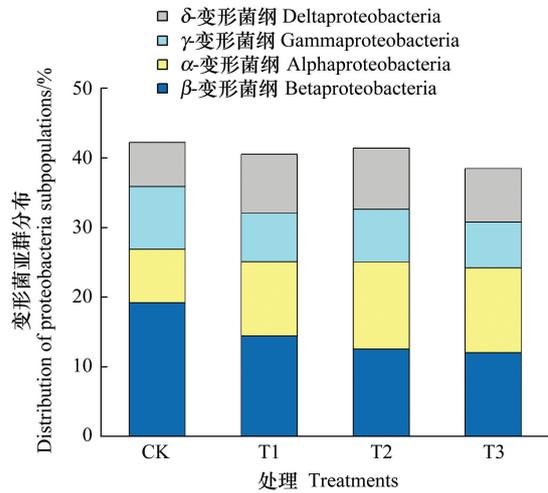


图 4 不同处理土壤中变形菌纲亚群的分布
Fig.4 Distribution of soil proteobacteria under different treatments

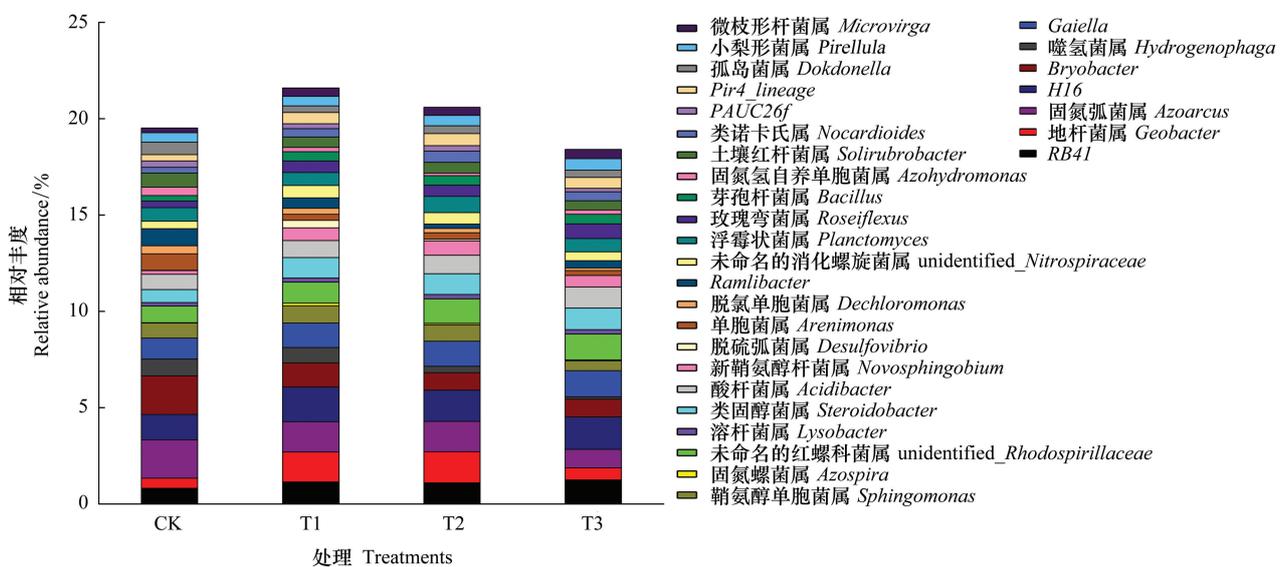


图 5 不同处理土壤属水平细菌群落组成
Fig.5 Composition of soil bacterial community on the genus level

Rhodospirillaceae、类固醇杆菌属 (*Steroidobacter*) 的相对丰度较高 (>1%), T3 处理的土壤中, RB41、H16、Gaiella、unidentified-*Rhodospirillaceae*、类固醇杆菌属 (*Steroidobacter*)、酸酞菌属 (*Acidibacter*) 的相对丰度较高 (>1%)。另外,施用球毛壳 ND35 微生物菌剂可显著增加土壤中某些功能菌株和有益菌株的相对丰度。例如,施用微生物菌剂后,土壤中鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 的相对丰度提高了 21.88%—103.56% ($P < 0.05$);芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的相对丰度在 T1、T2、T3 处理中相比 CK 分别显著提高 65.38%、66.28%、65.97% ($P < 0.05$)。施用球毛壳 ND35 菌剂后,土壤中酸杆菌属 (*Acidibacter*) 相对丰度提高了 12.76%—38.06%。由此可见,施用球毛壳 ND35 微生物菌剂,可显著引起土壤中细菌属水平群落组成的变化。

2.3.4 土壤细菌群落特征与土壤因子的相关性

土壤微生物群落不仅受生物因素的影响,也会受到土壤中环境因子的影响。为探讨它们之间的关系,本研究选取不同处理下土壤的化学性质及酶活性作为环境因子,以优势细菌群落的相对丰度及其多样性指标作为物种数据,进行 RDA 分析 (图 6)。从图中可以看出,优势细菌群落的相对丰度主要与土壤中硝态氮、铵态氮、有机质含量高度相关,其中硝态氮、铵态氮、有机质含量对土壤中放线菌门、 δ -变形菌纲、 α -变形菌纲的分布具有正反馈效应,对 β -变形菌纲、 γ -变形菌纲、酸酞菌门、变形菌门的分布具有负反馈效应。土壤细菌群落的多样性和丰富度主要受土壤中硝态氮、铵态氮、有机质含量的影响,硝态氮、铵态氮、有机质含量的积累会提高土壤细菌群落的多样性。土壤酶主要来自植物根系分泌物、动植物残骸及微生物的代谢产物,因此土壤微生物群落的变化势必会对土壤酶活性产生影响。研究结果显示,土壤中 α -变形菌纲、 δ -变形菌纲及放线菌门

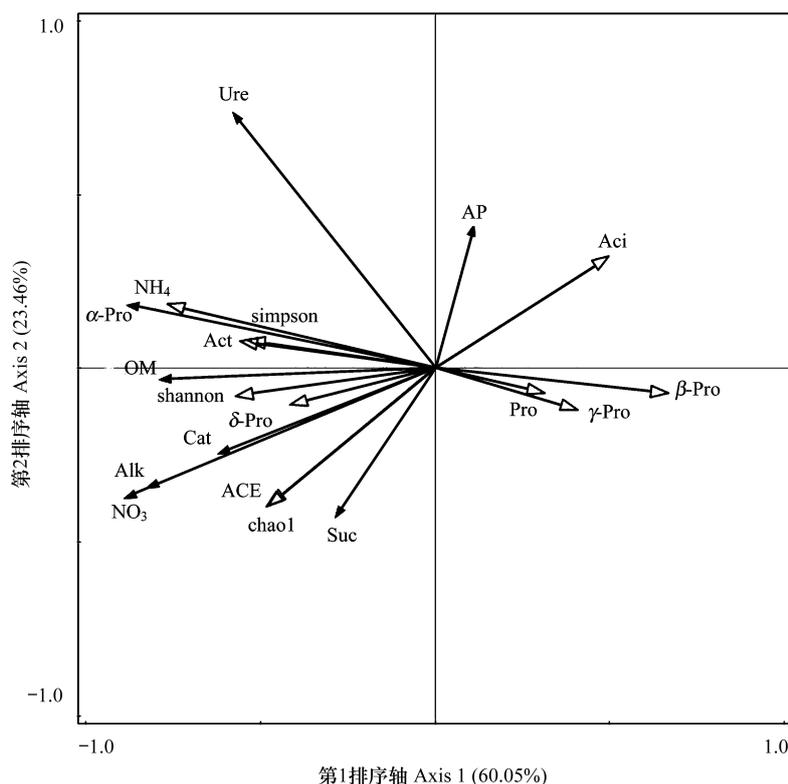


图 6 细菌群落特征与土壤因子的冗余分析 (RDA)

Fig.6 Redundancy analysis of bacterial community and soil factors

AP:速效磷 Available Phosphorus; OM:有机质 Organic Matter; NO₃:硝态氮 Nitrate-Nitrogen; NH₄:铵态氮 Ammonium-Nitrogen; Pro:变形菌门 Proteobacteria; Aci:酸酞菌门 Acidobacteria; Act:放线菌门 Actinobacteria; α -Pro: α -变形菌纲 Alphaproteobacteria; β -Pro: β -变形菌纲 Betaproteobacteria; γ -Pro: γ -变形菌纲 Gammaproteobacteria; δ -Pro: δ -变形菌纲 Deltaproteobacteria; Cat:过氧化氢酶 Catalase; Ure:脲酶 Urease; Suc:蔗糖酶 Sucrase; Alk:碱性磷酸酶 Alkaline Phosphatase

的相对丰度对土壤酶活性呈正相关,其中 α -变形菌纲的相对丰度与脲酶、磷酸酶活性高度正相关, δ -变形菌纲的分布与蔗糖酶活性高度正相关;而土壤中酸酐菌门、 β -变形菌纲、 γ -变形菌纲、变形菌门的相对丰度与土壤酶活性呈负相关,其中过氧化氢酶活性与土壤中酸酐菌门、 β -变形菌纲的分布高度负相关。综合分析可得,土壤硝态氮、铵态氮、有机质是影响土壤优势细菌群落组成及多样性的主要环境因子,土壤中 α -变形菌纲、 δ -变形菌纲、酸酐菌门、 β -变形菌纲的分布能够显著影响土壤的酶活性。

2.4 楸树生长量与土壤指标的相关性

为了解土壤因子对楸树幼苗生长的影响,本研究对土壤化学性质、酶活性及优势细菌群落与楸树生长指标进行相关性分析,结果如表 4。从表 4 可以看出,土壤中速效磷、硝态氮、铵态氮、有机质、脲酶、蔗糖酶、碱性磷酸酶、过氧化氢酶及优势细菌群落 α -变形菌纲、 δ -变形菌纲、放线菌门的分布对楸树幼苗的生长具有正向促进作用,其中株高与土壤中铵态氮、有机质含量呈显著正相关 ($P < 0.05$),与硝态氮含量及 α -变形菌纲的分布呈极显著正相关 ($P < 0.01$);地径与硝态氮、铵态氮、有机质、蔗糖酶、碱性磷酸酶及优势细菌群落 α -变形菌纲、 δ -变形菌纲呈显著正相关 ($P < 0.05$),与过氧化氢酶活性呈极显著正相关 ($P < 0.01$);地上、地下生物量与硝态氮、过氧化氢酶、碱性磷酸酶及 δ -变形菌纲的分布呈显著正相关 ($P < 0.05$),与蔗糖酶活性及 α -变形菌纲的分布呈极显著正相关 ($P < 0.01$);所有生长指标与速效磷含量及放线菌门的分布相关性不显著 ($P > 0.05$)。优势细菌群落 β -变形菌纲、酸酐菌门的分布对植物的生长具有负反馈效应, β -变形菌纲的含量与株高、地下生物量呈显著负相关 ($P < 0.05$),酸酐菌门的分布与地上生物量呈显著负相关 ($P < 0.05$),与地径及地下生物量呈极显著负相关 ($P < 0.01$),这可能由于这两种细菌群落中含有致病菌群。综合分析可知,土壤因子硝态氮、铵态氮、有机质、蔗糖酶、碱性磷酸酶、过氧化氢酶、酸酐菌门、 α -变形菌纲、 β -变形菌纲、 δ -变形菌纲能够显著影响楸树幼苗的生长状况。

表 4 楸树幼苗生长指标与土壤因子相关性矩阵

Table 4 Correlation matrix between growth indexes of *Catalpa bungei* seedlings and soil factors

因子 Factors	指标 Indices				
	株高 P-height	地径 G-diameter	地上生物量 A-biomass	地下生物量 U-biomass	根冠比 RS-ratio
速效磷 Available phosphorus	0.285	0.486	0.516	0.392	-0.079
硝态氮 Nitrate-nitrogen	0.747**	0.706*	0.638*	0.624*	-0.455
铵态氮 Ammonium-nitrogen	0.655*	0.688*	0.517	0.567	-0.515
有机质 Organic matter	0.611*	0.671*	0.530	0.650*	-0.709**
脲酶 Urease	0.513	0.190	0.141	0.174	-0.219
蔗糖酶 Invertase	0.510	0.807*	0.766**	0.845**	-0.707*
过氧化氢酶 Catalase	0.416	0.704**	0.686*	0.568	-0.207
碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase	0.550	0.660*	0.688*	0.656*	-0.447
变形菌门 Proteobacteria	-0.297	0.083	-0.030	-0.137	0.324
β -变形菌纲 Betaproteobacteria	-0.739*	-0.492	-0.544	-0.656*	0.702*
α -变形菌纲 Alphaproteobacteria	0.828**	0.686*	0.745**	0.799**	-0.697*
γ -变形 Gammaproteobacteria	-0.287	-0.148	-0.264	-0.357	0.443
δ -变形菌纲 Deltaproteobacteria	0.392	0.650*	0.577*	0.671*	-0.636*
酸酐菌门 Acidobacteria	-0.538	-0.776**	-0.724*	-0.725**	0.468
放线菌门 Actinobacteria	0.512	0.366	0.514	0.448	-0.416

P-height; 株高 Plant-height; G-diameter; 地径 Ground-diameter; A-biomass; 地上生物量 Aboveground-biomass; U-biomass; 地下生物量 Underground-biomass; RS-ratio, 根冠比 Root-shoot Ratio; * 表示在 5% 水平上显著相关, ** 表示在 1% 水平上极显著相关

3 讨论

3.1 球毛壳 ND35 微生物菌剂对楸树根际微生物群落的影响

本研究基于 Illumina MiSeq 测序平台对不同用量球毛壳 ND35 微生物菌剂处理的楸树幼苗根际土细菌群

落结构进行测序分析。根际土是受植物根系直接影响的区域,是植物-微生物-酶相互作用的特殊生态环境,是植物能量代谢和物质循环最活跃的区域之一,其细菌群落结构是表征土壤肥力的主要生物学指标^[28]。以往研究发现微生物菌剂的施用会导致土壤微生物功能多样性发生变化,从而使土壤细菌群落结构发生显著变化^[13-14],本研究的土壤细菌群落结构分析得出与之一致的结果。这首先是由于微生物菌剂中含有大量的蛋白类、糖类有机成分及氮、磷、钾等营养物质,其次其活性菌株在土壤中定殖后可分泌激素类物质,促使植物根系释放更多的分泌物^[29]。这些均为微生物的生长繁殖提供了更多的碳源物质,能够促进土壤中有益菌的增殖。本研究所使用的球毛壳 ND35 菌剂可分泌吲哚乙酸 (IAA)、赤霉素等物质 (GAs)^[30],可提高土壤中放线菌门、厚壁菌门、拟杆菌门等有益菌的相对丰度,放线菌门中某些细菌的次生代谢产物可拮抗病原菌^[31],厚壁菌门中的大多数细菌具有病害生物防控的功能,拟杆菌门可有效降解土壤中的纤维素,促进有机碳循环^[26]。以往研究结果认为,变形菌门、酸酞菌门、放线菌门为不同类型土壤中的优势细菌群落^[32-34],这与本研究结果一致。在本研究中微生物菌剂施用使变形菌门和酸酞菌门的相对丰度有不同程度的下降,放线菌门的相对丰度显著提高,但优势菌门的种类并未因菌剂的加入而改变,与施用枯草芽孢杆菌菌剂对烟草根际土壤细菌群落影响的研究一致^[35]。这可能与不同细菌具有不同的生态幅有关,变形菌门、酸酞菌门、放线菌门在土壤中的生态幅较宽^[32],受环境影响较小,因此菌剂的加入并未影响各处理中优势细菌的种类。值得注意的是,施用球毛壳 ND35 微生物菌剂后,变形菌亚群的分布发生了显著变化, β -变形菌纲、 γ -变形菌纲的相对丰度显著下降,而 α -变形菌纲、 δ -变形菌纲的相对丰度显著上升,这可能与菌剂处理的土壤具有较高的养分含量有关。有研究表明高营养状态的土壤中含有丰富的 α -变形菌,土壤中有有机质及全氮含量对 α -变形菌的相对丰度具有正向促进作用^[36-37]。本研究的 RDA 分析也表明, α -变形菌的相对丰度与土壤中有有机质、硝态氮、铵态氮的含量呈正相关性,这可能是因为 α -变形菌中包含大量参与碳氮循环的细菌群落。

研究表明微生物菌剂的施用可以显著提高土壤中微生物群落的多样性,促进有益菌的增殖^[13-14]。逆境条件下也得出类似的结果,如接种蜡样芽孢杆菌 (*B. cereus*) L90 可显著提高干旱生境中核桃根际土壤细菌群落的多样性^[38]。本研究结果亦显示,施用菌剂的土壤细菌群落多样性和丰富度指标均显著高于 CK,且各指标随菌剂施用量的增加呈现先上升后下降的趋势,在 T2 处理下有最大值。丰富的细菌群落多样性,会促进土壤生态系统健康稳定的发展,是土壤健康的标志之一。研究发现由于细菌的拮抗和竞争,在高细菌多样性的土壤中病原菌难以生长繁殖,并且微生物能够释放土壤酶,催化氧化还原、有机质矿化、污染物降解、腐殖物质在土壤中的合成以及生长活性物的释放等多种生物化学反应^[39]。因此施用球毛壳 ND35 微生物菌剂会使土壤向“健康细菌型”发展。这一方面可能是由于球毛壳 ND35 微生物菌剂对病原菌的重寄生作用以及营养和生态位点的竞争作用及其在代谢过程中产生了具有抑菌活性的抗生物质^[40-41],从而抑制了病原菌的增殖,使有益菌占据了更多的生态位,例如本研究中球毛壳 ND35 微生物菌剂处理后含有大量与植物共生有益菌的 α -变形菌纲的相对丰度显著上升;另一方面球毛壳 ND35 菌剂的施用提高了土壤酶活性,改善了土壤的养分状况,使得土壤环境更适合有益微生物的生长繁殖。

3.2 球毛壳 ND35 微生物菌剂对楸树根际土壤酶活及理化性质的影响

研究发现,微生物菌剂的施用可显著提高土壤中关键酶的活性^[12,42]。这与本研究结果一致,在本研究中球毛壳 ND35 菌剂显著提高了土壤中脲酶、蔗糖酶、磷酸酶、过氧化氢酶的活性。这主要是由于微生物菌剂能够利用其自身的微生物活动,改善植物根际环境,提高根际土壤中微生物的多样性,而根际微生物分泌的一些诱导化合物可以提高土壤酶活性^[43]。例如本研究中优势细菌群落 α -变形菌纲、 δ -变形菌纲的分布对土壤脲酶、蔗糖酶及碱性磷酸酶活性具有正反馈作用,而球毛壳 ND35 微生物菌剂的施用可显著提高土壤中 α -变形菌纲、 δ -变形菌纲的相对丰度。也有研究认为,施用微生物菌剂对土壤酶活性的影响并不显著,甚至是抑制某些土壤酶活性,例如在鲁凯珩等^[44]的研究中发现,施用贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) S3-1 微生物菌剂会抑制土壤中脲酶的活性,而对土壤蔗糖酶活性无显著影响,这可能与不同的菌剂类型及土壤 pH 有关。土壤中的酶活性与速效养分含量密切相关,酶活性越高,越有利于土壤中营养元素的矿化,从而更有利于系统内

的物质循环^[45],因此酶活性的提高会促进土壤中养分的利用。本研究中,酶活性较高的土壤中其有机质、速效磷、硝态氮、铵态氮含量也显著提高,与以往的研究结果一致^[46]。这首先是由于微生物菌剂自身含有的大量有机质和养分含量,其次是由于微生物菌剂的有益菌株在土壤中定殖后,可分泌有机酸溶解释放出被土壤颗粒等吸附的营养元素,在提高土壤酶活性的同时活化土壤中的养分含量,延长了土壤中速效养分的有效供给^[29]。微生物不仅可以改善土壤肥力,反过来土壤环境因子对细菌的种类及组成也具有一定影响^[47-48]。值得关注的是在本研究结果中,土壤 pH 与细菌群落结构的相关性并不显著,而以往的许多研究报道了土壤 pH 是影响细菌群落结构的重要因子^[49-50],尤其是对酸酞菌门的影响。方宇等^[51]的研究认为酸酞菌门的相对丰度与土壤 pH 呈极显著正相关,而 Männistö 等^[52]和 Griffiths 等^[53]的研究表明,酸杆菌丰度与 pH 呈显著负相关,在本研究中土壤 pH 与酸酞菌门的分布并未存在显著相关性,这一结果此前也有所报道^[54],这可能与不同的土壤类型及管理方式有关。此外还有研究证实,微生物菌剂能通过改善土壤的团粒结构,提高土壤的保水能力^[16],这在本研究中未涉及,需要进一步探讨。

3.3 球毛壳 ND35 微生物菌剂对楸树幼苗生长量的影响

许多研究证实施用微生物菌剂对植物具有显著的促生作用,如微生物菌剂的施用可显著促进冬瓜、烟草植株及高羊茅的生长^[13-14,42],也有研究认为单施微生物菌剂对植物的促生作用不显著^[55]。这可能与不同的菌剂类型及宿主植物有关,同时菌剂与宿主植物的作用时间也会显著影响试验结果。本研究结果表明,施用球毛壳 ND35 微生物菌剂提高了楸树幼苗的株高、地径及生物量的积累,且综合评价结果显示,在 T2、T3 处理下与 CK 差异显著($P < 0.05$),这说明在一定的菌剂施用量下显著促进了楸树的生长发育。有研究表明,微生物菌剂对植物的促生作用机制一方面是由于菌剂中的活性菌株能够产生多胺^[56]、植物激素^[57]、铁载体^[58]、抑制性物质或抗菌化合物、合成降解酶^[59]等,提高植物抗逆性,促进植物生长,另一方面微生物菌剂活性菌株可通过改善植物营养,调节纤维素酶、果胶酶、几丁质酶、淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶的作用来催化不同的生化过程促进植物生长^[60]。也有研究表明,菌剂的施用改善了植物根际的微生物群落结构,促进有益菌的定植,提高土壤酶活性,防止土壤中养分含量的流失,从而促进植物生长^[29,61]。这一作用机制在本研究也得到证实。本研究发现施用球毛壳 ND35 微生物菌剂可显著提高植物根际土壤中鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)的相对丰度,其在土壤中的主要功能是降解芳香族化合物,产生吲哚乙酸(IAA)、赤霉素(GAs)促进植物生长^[62];土壤中酸杆菌属(*Acidibacter*)在分解蛋白质、摄取土壤酸性物质方面发挥着重要作用,是维持土壤生态平衡的有益菌株^[63],施用球毛壳 ND35 后,其相对丰度显著提高;芽孢杆菌属在土壤中起着拮抗病原微生物、诱导系统抗性、促进植物生长的作用,施用球毛壳 ND35 菌剂可显著提高其相对丰度^[64-65]。另外,研究的细菌群落 β 多样性分析表明,施用微生物菌剂能够显著影响土壤中细菌群落的特征,细菌群落特征与土壤酶活性及环境因子的 RDA 分析发现,土壤中优势细菌群落 α -变形菌纲、 δ -变形菌纲、酸酞菌门、 β -变形菌纲的分布能够显著影响土壤中酶的活性及速效养分含量,而楸树生长指标与土壤因子的相关性分析结果发现,土壤中的速效养分含量、蔗糖酶、碱性磷酸酶、过氧化氢酶活性及酸酞菌门、 α -变形菌纲、 β -变形菌纲、 δ -变形菌纲的分布能够对楸树的生长产生显著的影响^[66]。

4 结论

(1)球毛壳 ND35 微生物菌剂的施用可通过改善和平衡土壤中微生物群落的结构特征,促进土壤酶的释放,改善土壤肥力,从而促进楸树的生长,且在 T2 处理下对土壤的改善作用及楸树的促进作用最为显著。在实际应用的过程中,适宜的菌剂用量不仅对植物的生长至关重要,同时可节约经济成本。本研究可为微生物菌剂的合理施用提供技术参考。另外,本研究结果进一步验证了球毛壳 ND35 对植物的作用机理,完善了其对乔木植物作用机制的研究空白,为楸树的壮苗培育提供了新的研究方向。

(2)以往研究结果表明水分限制和养分匮乏是裸露矿区退化生态系统植被难以恢复的主要因子,其将直接影响植被的恢复效果及矿区的生态功能,因此提高土壤肥力及蓄水能力是矿区生态修复的关键。本研究中

发现,球毛壳 ND35 微生物菌剂的施用能够快速活化土壤养分,显著提高植物对土壤养分的利用效率,促进植物的生长发育。因此,在困难立地及退化生态系统恢复与重建中具有巨大的应用潜力,而应用后的生态效益还有待进一步的研究。

参考文献 (References):

- [1] 杨成德, 龙瑞军, 陈秀蓉, 满元荣, 徐长林, 惠婧婧. 东祁连山高寒草甸土壤微生物量及其与土壤物理因子相关性特征. 草业学报, 2007, 16(4): 62-68.
- [2] Bardgett R D, Freeman C, Ostle N J. Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. The ISME Journal, 2008, 2(8): 805-814.
- [3] 陈秀蓉, 南志标. 细菌多样性及其在农业生态系统中的作用. 草业科学, 2002, 19(9): 34-38.
- [4] 陈国华, 弭宝彬, 李莹, 李春月. 转 *mapk* 双链 RNA 干扰表达载体黄瓜对根际土壤细菌多样性的影响. 生态学报, 2013, 33(4): 1091-1097.
- [5] Abbott L K, Murphy D V. Soil Biological Fertility: A Key to Sustainable Land Use in Agriculture. Dordrecht: Springer, 2007.
- [6] 牛聪聪, 耿国明, 于雷, 解群杰, 廖晶晶, 齐红岩. 尿素配施木霉菌剂提高甜瓜产量、品质及土壤微生物功能多样性. 植物营养与肥料学报, 2019, 25(4): 620-629.
- [7] 费裕舫, 黄樱, 张筱, 张元明, 曹光球, 陈世品, 兰思仁, 王迪. 不同有机肥处理对紫色土油茶林土壤微生物群落结构的影响. 应用与环境生物学报, 2020, 26(4): 1-12.
- [8] Jacobsen C S, Hjelmsø M H. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. Current Opinion in Biotechnology, 2014, 27: 15-20.
- [9] Lejon D P H, Chaussod R, Ranger J, Ranjard L. Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest soil (Morvan, France). Microbial Ecology, 2005, 50(4): 614-625.
- [10] 张云伟, 徐智, 汤利, 李艳红, 宋建群, 徐健钦. 不同有机肥对烤烟根际土壤微生物的影响. 应用生态学报, 2013, 24(9): 2551-2556.
- [11] 费裕舫, 吴庆锥, 路锦, 季春杉, 郑宏, 曹世江, 林开敏, 曹光球. 林下植被管理措施对杉木大径材林土壤细菌群落结构的影响. 应用生态学报, 2020, 31(2): 407-416.
- [12] 侯乐梅, 孟瑞青, 卮兰春, 齐迎斌. 不同微生物菌剂对基质酶活性和番茄产量及品质的影响. 应用生态学报, 2016, 27(8): 2520-2526.
- [13] Ricardo A, Christopher D, Christopher M M F. Analogous wheat root rhizosphere microbial successions in field and greenhouse trials in the presence of biocontrol agents *Paenibacillus peoriae* SP9 and *Streptomyces fulvissimus* FU14. Molecular Plant Pathology, 2020, 21(5): 622-635.
- [14] 王超, 李刚, 黄思杰, 张弛, 田伟, 田然, 王磊, 席运官. 枯草芽孢杆菌菌肥对有机冬瓜根区土壤微生物生态的影响. 微生物学通报, 2019, 46(3): 563-576.
- [15] 李少朋, 毕银丽, 陈咄圳, 陈书琳, 张延旭, 孔维平, 王瑾. 干旱胁迫下 AM 真菌对矿区土壤改良与玉米生长的影响. 生态学报, 2013, 33(13): 4181-4188.
- [16] Cong P F, Ouyang Z, Hou R X, Han D R. Effects of application of microbial fertilizer on aggregation and aggregate-associated carbon in saline soils. Soil and Tillage Research, 2017, 168: 33-41.
- [17] 刘晓光, 高克祥, 谷建才, 杜建玲, 唐秀光. 毛白杨内生菌优势种毛壳 ND35 室内拮抗作用的研究. 林业科学, 1999, 35(5): 57-61.
- [18] 高建锋, 李雪, 刘珊珊, 孔丹丹, 庄振国, 高克祥, 刘勇红. 内生真菌球毛壳 ND35 的生物安全性评价. 山东农业科学, 2010(1): 71-75.
- [19] 米士伟, 戴杨, 高克祥, 孟庆果, 高克祥, Mendgen K. 球毛壳 ND35 菌株在宿主植物上的侵染定殖. 植物保护学报, 2011, 38(6): 493-498.
- [20] 丛国强, 尹成林, 何邦令, 李玲, 高克祥. 水分胁迫下内生真菌球毛壳 ND35 对冬小麦苗期生长和抗旱性的影响. 生态学报, 2015, 35(18): 6120-6128.
- [21] 宋富海, 王森, 张先富, 高克祥, 尹成林, 陈学森, 毛志泉. 球毛壳 ND35 菌肥对苹果连作土壤微生物和平邑甜茶幼苗生物量的影响. 园艺学报, 2015, 42(2): 205-213.
- [22] 王长兰, 陈发菊, 金玉佩, 王玉兵, 梁宏伟. 楸树的开花生物学及繁育系统研究. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(9): 1981-1987.
- [23] 王如岩, 于水强, 张金池, 周垂帆, 陈莉莎. 干旱胁迫下接种菌根真菌对滇柏和楸树幼苗根系的影响. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2012, 36(6): 23-27.
- [24] 邱权, 李吉跃, 王军辉, 何茜, 苏艳, 马建伟, 董菊兰. 水肥耦合效应对楸树苗期叶片净光合速率和 SPAD 值的影响. 生态学报, 2016, 36(11): 3459-3468.
- [25] 刘璐, 何寻阳, 谢强, 王克林. 桂西北喀斯特常见豆科植物根瘤菌的遗传多样性. 应用生态学报, 2015, 26(12): 3663-3669.
- [26] 王明元, 侯式贞, 董涛, 张敏瑜, 刘建福, 徐志周. 香蕉假茎生物炭对根际土壤细菌丰度和群落结构的影响. 微生物学报, 2019, 59(7): 1363-1372.

- [27] García-Ruiz R, Ochoa V, Hinojosa M B, Carreira J A. Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(9): 2137-2145.
- [28] 刘磊, 李彩凤, 郭广昊, 桑丽敏, 郭剑, 陈明, 盖志佳, 于洋, 王玉波. NaCl+Na₂SO₄胁迫对甜菜根际土壤微生物数量及酶活性的影响. *核农学报*, 2016, 30(10): 2033-2040.
- [29] 宋以玲, 于建, 陈士更, 肖承泽, 李玉环, 苏秀荣, 丁方军. 复合微生物菌剂对棉花生理特性及根际土壤微生物和化学性质的影响. *土壤*, 2019, 51(3): 477-487.
- [30] 刘璇. 球毛壳 ND35 菌株实时荧光定量 PCR 检测体系的建立及其在植物中的定殖检测[D]. 山东农业大学, 2012.
- [31] 曾希柏, 王亚男, 王玉忠, 林志灵, 李莲芳, 白玲玉, 苏世鸣, 沈灵凤. 不同施肥模式对设施菜地细菌群落结构及丰度的影响. *中国农业科学*, 2013, 46(1): 69-79.
- [32] 丁新景, 黄雅丽, 敬如岩, 马风云, 安然, 田琪, 陈博杰. 基于高通量测序的黄河三角洲 4 种人工林土壤细菌结构及多样性研究. *生态学报*, 2018, 38(16): 5857-5864.
- [33] 王伏伟, 王晓波, 李金才, 叶爱华, 王妍, 车威, 朱林. 施肥及秸秆还田对砂姜黑土细菌群落的影响. *中国生态农业学报*, 2015, 23(10): 1302-1311.
- [34] 杨菁, 周国英, 田媛媛, 刘倩丽, 刘成锋, 杨权, 周洁尘. 降香黄檀不同混交林土壤细菌多样性差异分析. *生态学报*, 2015, 35(24): 8117-8127.
- [35] 游德, 张立猛, 计思贵, 高加明, 张成省, 孔凡玉. 枯草芽孢杆菌菌剂对烟草根际土壤细菌群落的影响. *应用生态学报*, 2014, 25(11): 3323-3330.
- [36] Janssen P H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3): 1719-1728.
- [37] 柳春林, 左伟英, 赵增阳, 邱礼鸿. 鼎湖山不同演替阶段森林土壤细菌多样性. *微生物学报*, 2012, 52(12): 1489-1496.
- [38] 刘方春, 邢尚军, 马海林, 杜振宇, 马丙尧. 干旱生境中接种根际促生细菌对核桃根际土壤生物学特征的影响. *应用生态学报*, 2014, 25(5): 1475-1482.
- [39] Shiomi Y, Nishiyama M, Onizuka T, Marumoto T. Comparison of bacterial community structures in the rhizosphere of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9): 3996-4001.
- [40] Gao K, Liu X, Kang Z, Mendgen K. Mycoparasitism of rhizoctonia solani by endophytic *Chaetomium spirale* ND35: ultrastructure and cytochemistry of the interaction. *Journal of Phytopathology*, 2005, 153(5): 280-290.
- [41] 郭晓, 高克祥, 印敬明, 白复芹, 马迎新, 于丹, 刘晓光. 螺旋毛壳 ND35 β-1,3-葡聚糖酶的诱导、性质及其抑菌作用. *植物病理学报*, 2005, 35(6): 493-503.
- [42] 张美存, 程田, 多立安, 赵树兰. 微生物菌剂对草坪植物高羊茅生长与土壤酶活性的影响. *生态学报*, 2017, 37(14): 4763-4769.
- [43] 宁川川, 王建武, 蔡昆争. 有机肥对土壤肥力和土壤环境质量的影响研究进展. *生态环境学报*, 2016, 25(1): 175-181.
- [44] 鲁凯珩, 金清, 曹沁, 李珊珊, 孙舒荣, 蒋秋艳, 金杰人, 凌丽晨, 符歆灏, 杜萱, 肖明. 不同微生物菌剂对田间西红柿品质以及土壤酶活性的影响. *上海师范大学学报: 自然科学版*, 2019, 48(2): 197-206.
- [45] 叶协锋, 张友杰, 鲁喜梅, 魏跃伟, 李琰琰, 刘国顺. 土壤微生物与土壤营养关系研究进展. *土壤通报*, 2010, 41(1): 237-241.
- [46] 唐玉姝, 慈恩, 颜廷梅, 魏朝富, 杨林章, 沈明星. 太湖地区长期定位试验稻麦两季土壤酶活性与土壤肥力关系. *土壤学报*, 2008, 45(5): 1000-1006.
- [47] Jiang Y J, Liang Y T, Li C M, Wang F, Sui Y Y, Suvannang N, Zhou J Z, Sun B. Crop rotations alter bacterial and fungal diversity in paddy soils across East Asia. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 95: 250-261.
- [48] Li T Z, Liu T T, Zheng C Y, Kang C S, Yang Z C, Yao X T, Song F B, Zhang R Z, Wang X R, Xu N, Zhang C Y, Li W, Li S M. Changes in soil bacterial community structure as a result of incorporation of *Brassica* plants compared with continuous planting eggplant and chemical disinfection in greenhouses. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173923.
- [49] Lauber C L, Hamady M, Knight R, Fierer N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(15): 5111-5120.
- [50] Chu H Y, Fierer N, Lauber C L, Caporaso J G, Knight R, Grogan P. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(11): 2998-3006.
- [51] 方宇, 王飞, 李清华, 林诚, 何春梅. 连续水旱轮作对水稻冷浸田土壤细菌群落结构的影响. *土壤学报*, 2018, 55(2): 515-525.
- [52] Männistö M K, Tirola M, Häggblom M M. Bacterial communities in Arctic fields of Finnish Lapland are stable but highly pH-dependent. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 59(2): 452-465.
- [53] Griffiths R I, Thomson B C, James P, Bell T, Bailey M, Whiteley A S. The bacterial biogeography of British soils. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(6): 1642-1654.

- [54] Liu J J, Sui Y Y, Yu Z H, Shi Y, Chu H Y, Jin J, Liu X B, Wang G H. Soil carbon content drives the biogeographical distribution of fungal communities in the black soil zone of Northeast China. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 83: 29-39.
- [55] 李凤霞, 赵营. 氮肥减量配施微生物菌剂对灌淤土花椰菜产量及土壤微生物的影响. *水土保持研究*, 2017, 24(2): 94-100.
- [56] Fan G, Liu Y, Wang X, Zhan Y. Cross-talk of polyamines and nitric oxide in endophytic fungus-induced betulin production in *Betula platyphylla* plantlets. *Trees*, 2014, 28: 635-641.
- [57] Bose J, Rodrigo-Moreno A, Shabala S. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65: 1241-1257.
- [58] Bartholdy B A, Berreck M, Haselwandter K. Hydroxamate siderophore synthesis by *Phialocephala fortinii*, a typical dark septate fungal root endophyte. *BioMetals*. 2001, 14(1): 33-42.
- [59] Rajesh P S, Ravishankar R V. Hydrolytic enzymes and quorum sensing inhibitors from endophytic fungi of *Ventilago madraspatana* Gaertn. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2013, 2(2): 120-124.
- [60] Furtado B U, Szymańska S, Hryniewicz K. A window into fungal endophytism in *Salicornia europaea*: deciphering fungal characteristics as plant growth promoting agents. *Plant Soil*, 2019, 445(11): 577-594.
- [61] Zhang S, Guo X, Yun W, Xia Y, You Z, Rillig M. Arbuscular mycorrhiza contributes to the control of phosphorus loss in paddy fields. *Plant Soil*, 2020, 447(1): 623-636.
- [62] 胡杰, 何晓红, 李大平, 刘强. 鞘氨醇单胞菌研究进展. *应用与环境生物学报*, 2007, 13(3): 431-437.
- [63] 周柳婷, 李建鹏, 赵艳琳, 罗扬, 白莹, 陈军, 吴则焰, 林文雄. 基于高通量测序的连栽木麻黄根际土壤细菌群落变化研究. *生态学报*, 2020, 40(8): 2670-2679.
- [64] 吴林坤, 陈军, 杨波, 肖志刚, 路翠红, 王娟英, 林文雄. 地黄连作对叶际细菌群落结构及多样性的影响. *应用生态学报*, 2019, 30(10): 3509-3517.
- [65] Banerjee S, Palit R, Sengupta C. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of Crop Science*, 2010, 4(6): 378.
- [66] 李金花. 球毛壳 ND35 微生物菌剂对楸树幼苗抗旱性及土壤肥力的影响[D]. 山东农业大学, 2019.