

DOI: 10.5846/stxb202003120515

赵爱花, 刘蕾, 付伟, 武慧, 陈保冬. 施氮对森林生态系统 AM 真菌群落组成及多样性的影响. 生态学报, 2020, 40(21): 7576-7587.

Zhao A H, Liu L, Fu W, Wu H, Chen B D. Can understory nitrogen addition overestimate the effects of nitrogen deposition on arbuscular mycorrhizal fungal community?. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(21): 7576-7587.

施氮对森林生态系统 AM 真菌群落组成及多样性的影响

赵爱花^{1,2}, 刘蕾^{1,3}, 付伟^{1,2}, 武慧^{1,2}, 陈保冬^{1,2,*}

1 中国科学院生态环境研究中心城市与区域生态国家重点实验室, 北京 100085

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 南京信息工程大学生态研究院, 江苏省农业气象重点实验室, 南京 210044

摘要:丛枝菌根(AM)真菌能够和绝大多数陆生植物形成互惠共生体,具有重要的生态功能。在氮(N)沉降日益严重的背景下,越来越多的土壤生态学家开始关注N沉降对AM真菌群落的影响,然而已有研究大多数集中在草地生态系统,对森林生态系统的关注相对较少,而在森林生态系统开展的模拟研究又多采用林下施N的方式,忽略了冠层发生的一系列生态过程,可能无法准确反映真实情形。依托鸡公山野外控制试验平台,采用高通量测序技术就不同施N方式(林下 vs 林冠)及速率对AM真菌alpha多样性和群落组成的影响进行了连续4a的监测。试验综合考虑植被、坡向和坡度等因素,采用完全随机区组设计,包括4个区组(重复),每个区组随机设置5个样方,对应5个不同处理:对照(CK)、林冠施N 25 kg hm⁻² a⁻¹(CN25)和50 kg hm⁻² a⁻¹(CN50)、林下施N 25 kg hm⁻² a⁻¹(UN25)和50 kg hm⁻² a⁻¹(UN50)。结果发现,在目前的N素添加水平和时间尺度上,施N方式和施N速率对AM真菌的alpha多样性都没有显著影响,二者之间也无交互作用。然而,经过一年的试验处理,施N方式对AM真菌群落组成产生了轻微的影响,而施N速率有极显著的影响,且二者之间存在显著交互作用。当施N速率为25 kg hm⁻² a⁻¹时,林冠施N和对照相比差异不显著,而林下施N处理AM真菌群落组成与对照相比差异极显著,与林冠施N相比,差异也极显著;当施N速率为50 kg hm⁻² a⁻¹时,林冠施N与对照处理群落组成有略微差异(P=0.080),林下施N与林冠施N及对照处理相比AM真菌群落组成均没有显著变化。在接下来的三年中,施N方式和施N速率对AM真菌的群落组成都没有显著影响,二者之间也无显著交互作用。这说明在特定的施N速率和处理时间下,林下施N可能会高估自然N沉降对AM真菌群落组成的影响。随着处理时间的延长,不同处理下AM真菌群落有趋同的趋势,可能是因为AM真菌群落对N沉降产生了适应性。本研究评估了施N方式对森林生态系统AM真菌群落组成与结构的影响,在未来的研究中需要设定更多的N素梯度和更长的时间跨度,才能够更全面的认识N沉降的生态效应。

关键词:氮沉降;林冠;林下;速率;菌根真菌

Can understory nitrogen addition overestimate the effects of nitrogen deposition on arbuscular mycorrhizal fungal community?

ZHAO Aihua^{1,2}, LIU Lei^{1,3}, FU Wei^{1,2}, WU Hui^{1,2}, CHEN Baodong^{1,2,*}

1 State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

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

3 Institute of Ecology, Jiangsu Key Laboratory of Agricultural Meteorology, Nanjing University of Information Science and Technology, Nanjing 210044, China

基金项目:国家自然科学基金项目(41877050,31300446)

收稿日期:2020-03-12; 修订日期:2020-06-01

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: bdchen@rcees.ac.cn

Abstract: Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi can form symbiosis with most terrestrial plants and provide important ecological services. Under the intensified nitrogen (N) deposition, more and more soil ecologists pay attention to the impacts of N deposition on AM fungal community. However, most relevant studies were carried out in grassland ecosystems, while studies on forest ecosystem were very limited. Moreover, most simulation studies in forest ecosystems applied N to the forest floor, ignoring the canopy processes, may not accurately reflect the natural situations. We conducted a field experiment on the influence of N addition mode (understory vs canopy) and rate on AM fungi in a mixed deciduous forest of China. The experiment had a fully randomized block design with four blocks (replicates) and each block included five plots. Within each block, each plot was randomly assigned with one of the five treatments: ambient (CK), canopy addition of N at 25 (CN25) or 50 kg hm⁻² a⁻¹ (CN50), understory addition of N at 25 (UN25) or 50 kg hm⁻² a⁻¹ (UN50). AM fungal alpha diversity indices and community composition were determined by high-throughput sequencing. The results showed that under the experimental conditions, AM fungal richness and Shannon diversity indices were not significantly altered by N addition mode, rate or their interactions. However, after one year of experimental treatment, N application mode showed a marginal effect on AM fungal community composition, while N application rate showed an extremely significant effect, and the treatment interaction was also significant. At N addition rate of 25 kg hm⁻² a⁻¹, the difference between canopy N addition and control was not significant, while the AM fungal community composition was significantly changed by understory N addition. At N application rate of 50 kg hm⁻² a⁻¹, canopy addition of N slightly altered AM fungal community composition, but understory of N application did not change AM fungal community composition. In the next three years, N addition mode, rate or their interactions all showed no significant effects on AM fungal community composition. Overall, the results indicated that understory application of N may overestimate the effect of N deposition on the AM fungal community under natural conditions at certain N application rate and time scale. AM fungal communities under different treatments tend to converge over time, suggesting that AM fungal community may have adapted to N deposition over time. This study evaluated the effects of different N application modes on AM fungal community in forest ecosystem. We could have a more comprehensive understanding of the ecological impacts of N deposition by considering broader N gradients and longer observation period in future research.

Key Words: nitrogen deposition; canopy; understory; rate; mycorrhizal fungi

自工业革命以来,大量化石燃料的燃烧,以及农业和工业生产活动中氮(N)素消耗大量增加,加速了全球大气 N 沉降并导致一系列生态环境问题。据估计,1995 年全球平均 N 沉降速率大约是 1860 年的 3 倍,而 2050 全球平均 N 沉降速率将增加到 1860 年的 6 倍^[1]。我国陆地生态系统 N 沉降速率已达 21.1 kg hm⁻² a⁻¹^[2],其中,湿沉降速率已经由 20 纪 90 年代的 11.11 kg hm⁻² a⁻¹增加到 13.87 kg hm⁻² a⁻¹^[3],增长了近 25%,在今后几十年中我国 N 沉降的形势将更加严峻^[2]。N 沉降增加一方面可以提高受 N 限制的生态系统的生产力^[4],另一方面过多的 N 素供应也会给生态系统带来诸多负面影响,如土壤酸化^[5]、植物物种多样性丧失^[6]、水体富营养化^[7]等。同时,N 沉降还可以通过改变土壤环境(如 N 的有效性、土壤酸化等)直接影响土壤微生物多样性^[8-9],或通过地上植被的生理生态响应间接作用于土壤微生物^[10]。

丛枝菌根(Arbuscular mycorrhiza, AM)真菌是一类在陆地生态系统中广泛存在的土壤真菌,能与绝大多数陆地植物形成互惠共生体系,具有许多重要的生态功能,如帮助植物获取 N、P 等矿质养分和水分,增强植物对生物和非生物胁迫的适应能力^[11],改变植物群落的组成、多样性,还能影响生态系统的生产力和结构功能稳定性^[12-13]。在陆地生态系统 N 素循环过程中,AM 真菌除了能够吸收、转运 N 素以外,在 N 素生物固定、硝化、反硝化以及 N 素淋洗过程中均具有潜在重要作用^[14-15]。AM 真菌一方面通过改善植物磷(P)营养,提高豆科植物的固 N 能力^[14],另一方面可能通过影响固 N 微生物功能基因的表达来调控 N 素的生物固定^[16]。AM 真菌还可能通过与氨氧化微生物竞争底物^[17],改变氨氧化微生物的群落组成^[18]及植物根系营养生理^[19]调控硝化过程,通过调控反硝化细菌的数量^[20]及相关功能基因的表达进而影响反硝化过程^[16]。此外,AM 真菌还能够通过改善土壤结构^[21],促进宿主植物对无机 N 的吸收等多种途径减少因淋洗而造成的土壤 N 素损失。

鉴于 N 沉降形势的严峻性和 AM 真菌重要的生态功能,越来越多的土壤生态学家开始关注 N 沉降对 AM

真菌的影响并开展了试验研究。目前,已有相关研究多采用 N 素添加的方式模拟 N 沉降,受到具体试验条件的影 响,研究结果不甚一致:N 沉降对 AM 真菌多样性可能有积极作用^[22],没有显著影响^[23],或者具有消极作用^[24];类似地,对于 AM 真菌群落组成而言,有的研究显示 N 沉降有显著影响^[25-28],而另外一些研究则显示无显著影响^[29-30]。影响 N 沉降生态效应的因素有很多,如施 N 速率^[22]、N 素形态^[31]、试验方法^[29]、试验周期^[32]等。此外,还可能受到环境中 N 的背景值及生态系统类型的影响^[33]。因此,客观认识和评价 N 沉降对 AM 真菌的影响,还需要开展更为系统的研究工作。

总体上,目前 N 沉降对 AM 真菌多样性和群落组成影响的研究多集中在草地生态系统,对森林生态系统的研究相对匮乏。在森林生态系统中开展的有限研究中,施 N 方式又多为林下施 N^[24-25,29],这种方式忽略了冠层发生的一系列生态过程,如 N 的吸收、固定、挥发、转化等^[34-38],而这些过程都会影响到达地面的 N 的形态和数量^[39],因此林下施 N 可能无法准确反映自然条件下 N 沉降对 AM 真菌多样性和群落组成的影响。Huang 等^[40]研究发现,林冠施 N 对土壤微生物生物量和群落组成的影响小于林下施 N,那么对 AM 真菌来说是否也是类似的情况,目前尚无相关报道。基于此,我们依托鸡公山林冠模拟氮沉降野外试验平台,通过连续 4 a 的样品采集和分析,尝试回答这个问题。我们提出的研究假设是:林下施 N 模拟 N 沉降会高估自然 N 沉降对森林土壤 AM 真菌多样性和群落组成的影响。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

鸡公山林冠模拟 N 沉降野外试验平台于 2013 年建于河南省信阳市以南 38 km 的鸡公山国家级自然保护区(31°46'—31°52'N, 114°01'—114°06'E)的原生林中。研究区由于地处北亚热带边缘秦岭山系西端的浅山区,受东亚季风气候的影响,具有典型的北亚热带向暖温带过渡的季风气候和山地气候特征,四季分明。研究区内土壤以黄棕壤、黄褐土为主,pH 值在 5.0 到 6.0 之间。植被类型为落叶阔叶混交林,林龄约 45 a。优势乔木树种为麻栎(*Quercus acutissima* Carruth.)、栓皮栎(*Quercus variabilis* Bl.)和枫香(*Liquidambar formosana* Hance),林下树种和草本丰富。

根据 1951—2011 年间的气象数据,鸡公山地区年平均气温为 15.2℃,年降雨量为 1119 mm,其中 80% 的降水集中在 4 到 10 月份,年均空气湿度为 79%^[41]。N 沉降的背景值大约为 19.6 kg hm⁻² a⁻¹,其中 NH₄⁺/NO₃⁻ 比值接近于 1^[41]。

1.2 实验设计

实验采用完全随机区组设计,包括 4 个区组(相当于 4 个试验重复),每个区组随机设置 5 个半径为 17 m 的样方,对应 5 个试验处理:对照(CK)、林冠施 N 25 kg hm⁻² a⁻¹(CN25)或 50 kg hm⁻² a⁻¹(CN50)、林下施 N 25 kg hm⁻² a⁻¹(UN25)或 50 kg hm⁻² a⁻¹(UN50)。为防止处理间的干扰,各样方之间留有至少 20 m 的缓冲带,每个缓冲带中间都加装深度为 1 m 的 PVC 隔离板。

N 添加在每年 4 到 10 月份进行,每月一次,一年 7 次。添加的 N 素形态为 NH₄NO₃ 溶液。每次施 N 时,添加的 NH₄NO₃ 溶液相当于 3 mm 的降水量,一年的添加量相当于 21 mm 的降水量,小于该地区年均降雨量的 2%,因此水分的影响可以忽略不计^[41]。林冠施 N 和林下施 N 都是由位于相应样方中心的自动喷洒装置来实现的。林冠喷洒装置高 35 m(冠层以上约 5 m),林下喷洒装置距离地面的高度为 1.5 m。该装置顶端安装有一套摇臂喷头,有供水管道与样地外的蓄水池连接,利用变频调速恒压喷灌设备提供压力,驱动摇臂喷头 360° 旋转,以保证喷洒的均匀性和精确性。塔基处供水管道安装有水量计,可精准控制每次处理的用水量。关于装置的细节、工作方式和效率参考 Zhang 等^[41]。

1.3 样品采集与分析

从 2013 年到 2016 年,每年最后一次 N 添加处理完成之后,进行土壤样品采集。采样时间为 11 月中下旬到 12 月初,具体时间视当地天气情况而定。土壤样品的采集和分析,以及生物信息学分析均参考 Zhao

等^[32]。为了尽可能减少采样位置的影响,在各样方核心区 20 m×20 m 范围内选取 5 棵树作为目标树。在距每棵目标树 1—2 m 范围内,取 2 钻土(直径 3 cm,深度 10 cm),每个样方共 10 钻土,制备成一个混合土样,用冰袋运送到实验室。混合土样过 2 mm 筛之后分成两部分,一部分冷冻干燥后储存于-80℃冰箱,用于土壤微生物总 DNA 的提取;另一部分自然风干,用于测定土壤 pH、有效磷(available phosphorus, AP)等基本理化性质。

土壤有效磷用 0.5 mol/L 的 NaHCO₃提取,钼蓝比色法测定^[42];土壤 pH 值采用水土比 2.5:1, PB-10 pH 计(Sartorius, Göttingen, Germany)测定;铵态 N、硝态 N 首先用 2 mol/L 的 KCl 浸提(水土比为 5:1),然后用连续流动分析仪进行测定(SAN++, Skakar, Breda, Holland);铵态氮、硝态氮含量之和作为有效 N 含量(available nitrogen, AN);有效 N 与有效 P 之比即为 N/P 比。

采用 Power-Soil RDNA 提取试剂盒(MO BIO Laboratories, San Diego, CA, United States),按照说明书提取土壤 DNA。DNA 样品用灭菌超纯水稀释 5 倍,然后进行巢式 PCR 扩增。扩增的引物分别为 AML1/AML2^[43]和 AMV4.5NF/AMDGR^[44],扩增体系及程序设置与 Zhao 等^[32]相同:第一次 PCR 反应总体积为 25 μL,其中含有 2.5 μL 10 × Ex-Taq 缓冲液(Mg²⁺ Plus)、2.0 μL dNTP 混合物、0.25 μL Ex-Taq(5u/mL)(Takara, 大连,中国)、1.0 μL(10 mg/mL)BSA(TaKaRa, 大连,中国),双端引物各 0.5 μL(10 μmol/L),17.25 μL 无菌水和 1.0 μL DNA 模板。PCR 扩增条件如下:94℃ 预变性 3 min;94℃ 45 s,51℃ 40 s,72℃ 1 min,扩增 35 个循环;然后 72℃ 延伸 10 min,16℃ 冷却 2 分钟。第一轮的 PCR 产物进行 10 倍稀释,作为第二轮的模板。第二轮扩增体系与第一轮相同,扩增条件如下:94℃ 预变性 3 min;94℃ 40 s,58℃ 1 min,72℃ 1 min,扩增 35 个循环;然后 72℃ 延伸 10 min,4℃ 冷却 2 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,送上海瀚宇科技有限公司切胶回收、纯化、建库及测序(Illumina Miseq PE300 测序平台)。

最初的数据质量控制和序列拼接由上海瀚宇生物科技有限公司完成。原始测序数据用 Trimmomatic v 0.32^[45]进行质控,主要步骤如下:(1)删除带有 N 碱基的 reads;(2)删除低质量的 reads Q value<20);(3)删除过短的 reads(<50 bp)及其配对 reads。用 Mothur v.1.32.1^[46]进行序列拼接,允许引物有 1 个碱基的错配。删除拼接同聚物长度>8,序列总长<200 bp 的序列。嵌合体的过滤由 Chimera.uchime v.4.2^[47]完成。使用 Usearch v.9.0.2132_i86linux32^[48]在 97% 的相似性水平划分 OTU (operational taxonomic unit,操作分类单元)。删除序列数<5 条的 OTUs。其余 OTUs 的代表序列和 NCBI GenBank 数据库及 MaarjAM 数据库进行比对,满足下列条件的 OTUs 用于后续分析:Identifications >97% similarity, >90% coverage 及 >200 BLAST score value,不满足条件者被舍去。为了进一步确认分类信息的可靠性,我们把 OTUs 的代表序列和在 GenBank 数据库中比对到的序列放在一起,采用 MEGA v5^[49],依据 Kimura 2-parameter 模型构建了 Neighbor-Joining 系统发育树。除了 bootstrap 数目设为 1000 以外,其余参数均采用默认值。

1.4 统计分析

所有的统计分析均采用 R 3.3.2 (R Core Team, 2016) 完成。采用中位数稀释法对每年的样品测序数据进行标准化^[50]。标准化后的 OTU 表格进行 Hellinger 转化,作为分析 AM 真菌群落组成的数据,也用来计算 AM 真菌群落的 alpha 多样性指数(丰富度 S、香依指数 H、Pielou's 均匀度指数 J 和辛普森指数)。用“vegan”包^[51]“specnumber”函数计算丰富度。香依指数和辛普森指数的计算采用“vegan”包“diversity”函数完成。Pielou's 均匀度指数 $J=H/\log(S)$ 。采用“aov”函数进行双因素方差分析,评估施 N 方式和施 N 速率对土壤因子和 AM 真菌 alpha 多样性指数的影响,分析之前用“stats”包“shapiro.test”函数进行正态性检验,不符合要求的数据进行 1 次或 2 次乘方、开方、log 或 Box-Cox 转化,若转化后仍不满足正态分布,则采用“friedman.test”函数进行 Friedman 检验。

施 N 方式和施 N 速率对 AM 真菌群落组成的影响及不同处理间的两两比较,均采用“vegan”包“adonis2”函数进行 PERMANOVA 分析,距离矩阵为“Bray-Curtis”距离,置换次数设为 9999 次。为了实现数

据的可视化,使用“vegan”包“metaMDS”函数进行 NMDS 分析并作图。

2 结果

2.1 施氮对土壤理化性质的影响

在 2013 年,施 N 速率对土壤 pH 值有显著影响($P=0.024$)。两个施 N 速率与对照相比,pH 值均显著降低,但是两个施 N 速率之间没有显著差异。施 N 方式对土壤 pH 没有显著影响($P=0.826$),而且施 N 方式和施 N 速率之间也没有显著交互作用($P=0.929$)(表 1)。对于其他土壤性质而言,施 N 方式、施 N 速率的影响及二者交互作用均不显著(表 1)。在 2014 年,施 N 方式和施 N 速率对所有土壤性质参数均无显著影响(表 1)。在 2015 年,施 N 方式显著影响了土壤 pH 值($P=0.021$)(表 1),林下施 N 土壤 pH 值(4.21)显著低于林冠施 N 处理(4.35)。对于其他土壤性质而言,施 N 方式、施 N 速率的影响以及二者交互作用均不显著(表 1)。2016 年和 2013 年结果基本相同。

2.2 高通量测序基本信息及 AM 真菌 OTUs 分类情况

对连续 4 a 共 80 个土壤 DNA 样品进行高通量测序,初步得到 761939 条序列,划分为 661 个 OTUs。经过严格筛选以后,最终确认 AM 真菌的 OTUs 为 181 个,共 604890 条序列,隶属于 1 门,1 纲,4 目,8 科,9 属,50VT(virtual taxa)。其中,绝大多数的 OTUs 和序列属于 *Glomus* 属,其次为 *Acaulospora* 属(图 1)。OTUs 的代表序列已上传到 Genbank 数据库(MN559107-MN559287)。序列数过少的 3 个样品(2014 年区组 3 的 CN50 处理 33 条;2015 年区组 1 的 UN50 处理 194 条;2016 年区组 4 的 UN25 处理 60 条),在后续的分析中没有被包括进来,其余样品的序列数均多于 1957 条。

2.3 施氮对 AM 真菌 alpha 多样性指数和群落组成的影响

从 2013 年到 2016 年,施 N 方式、施 N 速率及二者之间的交互作用对 AM 真菌 alpha 多样性指数都没有显著影响(表 2)。随着处理时间的延长,不同处理下 AM 真菌的 alpha 多样性指数有趋同的趋势(表 2)。

在 2013 年,施 N 方式对 AM 真菌群落组成有轻微影响($P=0.052$),而施 N 速率有极显著的影响($P=0.004$),且二者之间有显著交互作用($P=0.045$)(表 3):施 N 速率为 $25 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ 时,林冠施 N(CN25)与对照差异不显著($P=0.115$),林下施 N(UN25)与对照差异极显著($P=0.005$),且林冠施 N(CN25)和林下施 N(UN25)相比,群落组成差异极显著($P=0.002$)(表 4,图 2);当施 N 速率为 $50 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ 时,林冠施 N(CN50)、林下施 N(UN50)及对照三者之间均无显著差异(表 4,图 2)。从 2014 年到 2016 年,施 N 方式和施 N 速率对 AM 真菌群落组成都没有显著影响,双因素交互作用也不显著(表 3,图 2)。

2.4 AM 真菌 alpha 多样性指数和群落组成的变化与土壤因子变化之间的关系

在目前的时间尺度下,AM 真菌 alpha 多样性指数与土壤因子之间没有显著的相关性(表 5)。在 2013 年,AM 真菌群落组成的变化与土壤 pH 呈显著正相关关系(表 6),与其他土壤因子之间无显著相关关系,而从 2014 年到 2016 年,所有土壤因子与 AM 真菌群落组成之间的相关性均未达到显著水平(表 6)。

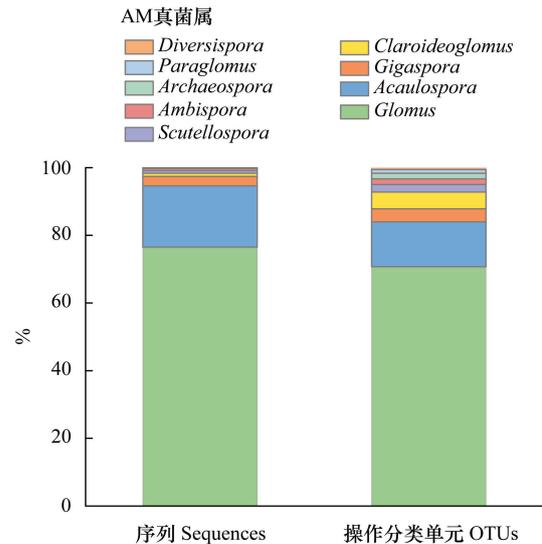


图 1 所有土壤样品 AM 真菌序列和操作分类单元的分布情况

Fig. 1 The proportional distributions of AM fungal sequences and derived AM fungal OTUs detected in all soil samples

表 1 施 N 方式和施 N 速率对土壤性质的影响
Table 1 The influence of N treatment approach and rate on soil properties over years

对照	林冠施氮 25 kg hm ⁻² a ⁻¹		林下施氮 25 kg hm ⁻² a ⁻¹		林下施氮 50 kg hm ⁻² a ⁻¹		氮添加方式 NTM (F, P)	氮添加速率 NDR (F, P)	交互作用 NTM×NDR (F, P)	
	CN25	CN50	UN25	UN50	UN25	UN50				
2013 年										
速效磷	44.11±6.84 a	29.83±5.01 a	34.90±10.85a	37.50±10.37a	41.65±3.70a	0.508	0.487	0.801	0.467	0.880
pH	4.57±0.12 a	4.28±0.05 a	4.29±0.09a	4.28±0.04a	4.35±0.12a	0.050	0.826	4.840	0.024*	0.929
速效氮	24.76±2.23a	18.24±2.79a	26.37±2.40a	28.16±4.84a	27.93±5.61a	1.526	0.236	0.550	0.588	0.395
N/P 比	0.63±0.16a	0.68±0.15a	1.11±0.46a	0.53±0.04a	0.69±0.13a	0.333	0.573	0.506	0.613	0.869
2014 年										
速效磷	22.44±0.63	26.06±3.28	27.57±2.42	26.63±2.14	26.31±3.37	Friedman chi-squared=4.608, P=0.466				
pH	4.35±0.15a	4.15±0.10a	4.25±0.10a	4.12±0.01a	4.23±0.03a	0.051	0.825	3.473	0.058	0.983
速效氮	13.21±2.11ab	13.01±1.55b	17.14±1.19a	13.88±1.63ab	12.37±1.01b	1.721	0.209	0.950	0.409	0.072
N/P 比	0.59±0.15a	0.55±0.13a	0.64±0.07a	0.53±0.07a	0.48±0.04a	0.686	0.423	0.128	0.881	0.662
2015 年										
速效磷	27.40±6.56a	35.72±2.63a	32.15±3.12a	44.29±2.45a	44.77±7.66a	2.593	0.128	3.279	0.066	0.503
pH	4.35±0.11ab	4.27±0.08ab	4.43±0.10a	4.14±0.03b	4.18±0.03b	6.933	0.021*	2.635	0.109	0.204
速效氮	8.24±2.08a	11.88±2.28a	8.52±1.56a	9.15±2.52a	10.66±2.43a	0.023	0.881	0.463	0.638	0.616
N/P 比	0.31±0.05a	0.33±0.06a	0.29±0.07a	0.20±0.05a	0.26±0.06a	1.437	0.249	0.441	0.651	0.473
2016 年										
速效磷	11.54±1.88a	8.94±0.69a	16.04±3.28a	12.73±2.87a	17.4±6.58a	0.098	0.759	0.900	0.431	0.737
pH	4.41±0.04a	4.31±0.06ab	4.28±0.07ab	4.17±0.05b	4.31±0.05ab	0.771	0.396	4.750	0.028*	0.226
速效氮	9.63±1.00a	9.81±1.42a	11.25±1.60a	8.66±2.01a	12.59±1.53a	0.002	0.961	1.802	0.199	0.721
N/P 比	0.90±0.13a	1.09±0.10a	0.75±0.12a	0.79±0.22a	1.03±0.30a	0.002	0.966	0.035	0.966	0.350

表中数据为平均值±标准误(n=4); * 双因素方差分析显著(P<0.05); 多重比较方法为 Duncan 检验; 不符合方差分析条件的, 进行 Friedman 检验

表 2 不同年份下施 N 方式和施 N 速率对 AM 真菌 alpha 多样性指数的影响
Table 2 The effects of N addition mode and rate on AM fungal alpha diversity indices

对照	林冠施氮 25 kg hm ⁻² ·a ⁻¹		林下施氮 25 kg hm ⁻² ·a ⁻¹		林下施氮 50 kg hm ⁻² ·a ⁻¹		氮添加方式 NTM (F, P)	氮添加速率 NDR (F, P)	交互作用 NTM×NDR (F, P)	
	CN25	CN50	UN25	UN50	UN25	UN50				
2013 年										
丰富度	56.75±5.27a	56.25±10.89a	54.25±6.22a	33.00±6.87b	2.329	0.148	1.895	0.185	1.767	0.205
香依指数	3.31±0.16ab	3.30±0.29ab	3.39±0.14a	2.53±0.42b	2.036	0.174	1.708	0.215	1.657	0.224
Pielou's 均匀度指数	0.82±0.03ab	0.83±0.03ab	0.85±0.01a	0.72±0.08b	0.912	0.355	1.919	0.181	1.098	0.359
辛普森指数	0.95±0.00a	0.94±0.02a	0.95±0.01a	0.92±0.02	0.444	0.518	0.985	0.402	0.469	0.637
2014 年										
丰富度	52.25±5.89ab	57.25±11.20ab	60.75±6.82ab	38.25±7.79b	1.452	0.248	0.503	0.615	2.122	0.157
香依指数	3.30±0.15a	3.29±0.28a	3.46±0.13a	2.73±0.36a	0.957	0.340	0.499	0.618	1.717	0.215
Pielou's 均匀度指数	0.84±0.02a	0.82±0.04a	0.85±0.01a	0.81±0.01a	0.000	0.989	0.103	0.903	0.340	0.718
辛普森指数	0.95±0.01	0.93±0.02	0.95±0.00	0.93±0.00	Friedman chi-squared=1.364, P=0.928					
2015 年										
丰富度	47.50±18.32a	42.75±11.18a	56.00±7.39a	35.33±7.22a	0.052	0.822	0.364	0.701	0.568	0.579
香依指数	2.87±0.59a	2.93±0.37a	3.39±0.19a	2.88±0.21a	0.217	0.649	0.303	0.743	0.382	0.690
Pielou's 均匀度指数	0.79±0.06	0.80±0.05	0.85±0.02	0.82±0.01	Friedman chi-squared=6.212, P=0.286					
辛普森指数	0.87±0.07	0.91±0.03	0.95±0.01	0.92±0.01	Friedman chi-squared=5.215, P=0.390					
2016 年										
丰富度	40.50±8.84a	43.00±13.69a	46.67±12.12a	41.50±6.65a	0.078	0.784	0.764	0.484	0.158	0.855
香依指数	3.00±0.29a	2.92±0.42a	3.14±0.35a	3.00±0.20a	0.024	0.879	0.934	0.416	0.296	0.749
Pielou's 均匀度指数	0.83±0.02	0.81±0.03	0.83±0.03	0.81±0.02	Friedman chi-squared=7.121, P=0.212					
辛普森指数	0.93±0.02a	0.90±0.04a	0.93±0.03a	0.93±0.02a	0.037	0.850	0.693	0.517	0.361	0.703

表中数据为平均值±标准误(n=4); 双因素方差分析, 显著作用(P<0.05)加粗显示。多重比较方法为 Duncan 检验; 不符合方差分析条件的, 进行 Friedman 检验

表 3 不同年份施 N 方式和施 N 速率对 AM 真菌群落组成的影响
Table 3 The effects of N addition mode and rate on AM fungal community composition over years

			2013 年		2014 年		2015 年		2016 年	
			F	P	F	P	F	P	F	P
群落组成	NTM	1	1.842	0.052	0.700	0.697	0.681	0.703	0.435	0.897
Community	NDR	2	2.203	0.004 *	0.909	0.553	1.730	0.060	1.366	0.178
composition	NTM×NDR	2	1.645	0.045 *	0.678	0.817	1.057	0.379	0.465	0.956

采用双因素 PERMANOVA 分析, * 表示显著作用,显著水平为 $P < 0.05$

表 4 2013 年不同处理间 AM 真菌群落组成差异
Table 4 The dissimilarity of AM fungal community composition among different treatments in 2013

	对照 CK	林冠施氮 $25 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ CN25	林冠施氮 $50 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ CN50	林下施氮 $25 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ UN25
林冠施氮 $25 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ CN25	0.115	-	-	-
林冠施氮 $50 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ CN50	0.080	0.061	-	-
林下施氮 $25 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ UN25	0.005 *	0.002 *	0.078	-
林下施氮 $50 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ UN50	0.480	0.159	0.366	0.182

采用 PERMANOVA 分析, * 表示显著作用,显著水平为 $P < 0.05$

表 5 所有样品 AM 真菌 alpha 多样性指数与土壤因子之间的 Pearson 相关性分析
Table 5 Pearson correlation analysis between AM fungal alpha diversity indices and soil parameters of all samples

	丰富度 Richness			香依指数 Shannon index			Pielou's 均匀度指数 Pielou's evenness			辛普森指数 Simpson index		
	df	r	P	df	r	P	df	r	P	df	r	P
速效磷 s/(mg/kg) Available phosphoru	73	-0.038	0.628	73	-0.055	0.682	72	-0.091	0.780	72	-0.091	0.780
pH	73	-0.137	0.880	73	-0.130	0.868	72	-0.092	0.781	72	-0.092	0.781
速效氮/(mg/kg) Available nitrogen	75	0.076	0.255	75	0.035	0.383	74	-0.042	0.642	74	-0.043	0.642
N/P 比 N/P ratio	72	0.071	0.274	72	0.056	0.319	71	0.042	0.394	71	0.042	0.361

表 6 不同年份 AM 真菌群落组成与土壤因子之间的 Mantel 检验
Table 6 Mantel test between the changes in AM fungal community composition and the dissimilarity of soil factors over years

	2013 年		2014 年		2015 年		2016 年	
	r	P	r	P	r	P	r	P
速效磷 Available phosphorus (mg/kg)	-0.223	0.987	0.160	0.051	-0.129	0.865	0.082	0.273
pH	0.223	0.050 *	0.183	0.107	-0.025	0.561	-0.011	0.513
速效氮 Available nitrogen (mg/kg)	0.041	0.378	0.029	0.369	-0.006	0.495	0.025	0.386
N/P 比 N/P ratio	0.166	0.849	0.127	0.156	-0.003	0.490	-0.116	0.801

* 表示显著作用,显著水平为 $P < 0.05$

3 讨论

3.1 氮沉降对土壤理化性质的影响

施 N 速率对土壤 pH 值的影响,从 2013 年到 2016 年依次为显著 ($P = 0.024$)、轻微 ($P = 0.058$)、不显著 ($P = 0.109$) 又到显著 ($P = 0.028$) (表 1)。据此我们推测,土壤 pH 值对 N 沉降的响应可能存在短期“应激反应”,中期“适应现象”和长期的“累积效应”。而 N 沉降能够降低土壤 pH 值,早已被很多研究所证实^[5, 28, 32],可能的机制包括:(1) 铵根离子 (NH_4^+) 被植物根系吸收,同时将 H^+ 释放到土壤中,导致土壤酸化;(2) NH_4^+ 经

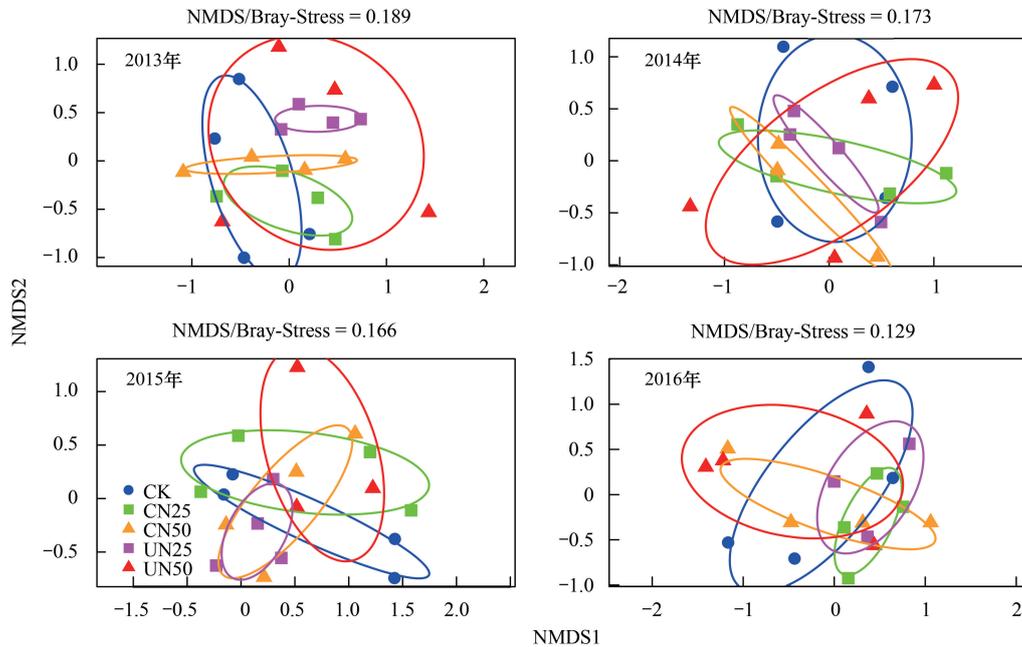


图2 不同处理下 AM 真菌群落组成

Fig.2 The variation of AM fungal community composition among different treatments

不同颜色的椭圆代表不同处理下 95% 的置信区间;CK: 对照;CN25: 林冠施 N 25 kg hm⁻² a⁻¹;CN50: 林冠施 N 50 kg hm⁻² a⁻¹;UN25: 林下施 N 25 kg hm⁻² a⁻¹;UN50: 林下施 N 50 kg hm⁻² a⁻¹

过硝化作用被转化为亚硝酸根离子,进而转化为硝酸根离子的过程中释放出 H⁺,导致土壤酸化;(3) NH₄⁺ 置换碱基阳离子,如 Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺等,金属阳离子的丢失会降低土壤对酸化的缓冲能力^[32]等。

之前的 meta 分析表明,不论是在区域尺度上^[52],还是在全球范围内^[53],温带森林生态系统土壤 pH 值对 N 沉降的响应都十分敏感。对于我国森林生态系统来说,N 沉降速率 < 30 kg hm⁻² a⁻¹ 也会显著降低土壤 pH 值^[52]。我们的研究也支持此观点,因为在 2013 年和 2016 年,低 N 处理(25 kg hm⁻² a⁻¹)与对照处理相比,pH 值有显著下降。同时,高 N(50 kg hm⁻² a⁻¹)处理与对照相比,pH 值也有显著下降,但与低 N 处理(25 kg hm⁻² a⁻¹)相比,并无显著差异,这可能是由于本研究区域土壤 pH 背景值较低造成的。因为 Tian 等^[53] meta 分析表明,土壤 pH 值的背景值越低,对 N 沉降的响应越不敏感。而本研究区域的初始 pH 值为弱酸性(5.0—6.0),所以尽管施 N 速率增加一倍,土壤 pH 值并没有很大的改变。

在 2015 年,林下施 N 土壤 pH 值与林冠施 N 处理相比显著降低,这与 Huang 等^[40] 研究结果一致。这一现象说明在特定条件下,林下施 N 会高估自然 N 沉降对土壤环境的影响。

3.2 氮沉降对 AM 真菌 alpha 多样性的影响

在目前的时间尺度下(4 a),施 N 方式、施 N 速率对 AM 真菌物种 alpha 多样性指数都没有显著影响,且二者也没有显著交互作用,说明在目前的 N 素添加水平和时间尺度下,林下施 N 并没有高估自然 N 沉降对 AM 真菌 alpha 多样性的影响。尽管施 N 以后土壤 pH 值有显著下降,但是 pH 值的变化并没有对 AM 真菌 alpha 多样性造成影响。土壤 pH 值与 AM 真菌的 alpha 指数没有明显关系(表 5),这与之前该试验平台的研究结果相符^[32]。此外,之前的研究还发现,土壤 N/P 比与 AM 真菌的丰富度和香依指数关系密切^[32],而在目前的时间尺度下,施 N 方式和施 N 速率都没有明显改变土壤 N/P 比(表 1)。我们推测这可能是 AM 真菌 alpha 多样性对 N 沉降没有响应的原因之一。随着处理时间的延长,几种试验处理下 AM 真菌 alpha 多样性有趋同的趋势(表 2),这可能是森林生态系统土壤 AM 真菌对持续 N 素输入产生了适应,也可能和 N 素添加浓度有关。例如,刘永俊等^[54] 研究发现,低量施肥(30 g/m²(NH₄)₂HPO₄)对垂穗披碱草(*Elymus nutans*)根系

中 AM 真菌物种丰富度没有显著影响,而当施肥量达到为 120 g/m^2 时,施肥表现出极其显著的负面作用。对于土壤真菌来说,N 素添加带来的影响还受到试验持续时间的影响^[33],如 Van Diepen 等^[25] 研究发现,在美国北部森林中,经过连续 12 年的 N 素添加,区域 A 的 AM 真菌香依指数有轻微的增加,而区域 C 有轻微的下降。本研究时间跨度为 4 a,那么在更大的时间尺度上,N 沉降是否会对 AM 真菌 alpha 多样性产生显著影响还值得进一步研究。

3.3 氮沉降对 AM 真菌群落组成的影响

在试验早期(2013 年),施 N 方式对 AM 真菌的群落组成有轻微影响,而且受到施 N 速率的制约:当施 N 速率较低($25 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$)时,林下施 N 对 AM 真菌群落组成的影响大于林冠施 N,支持了我们的假设;而当施 N 速率较高($50 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$)时,两种施 N 方式都没有显著改变 AM 真菌群落组成,与我们的假设不一致。这些结果说明在特定试验条件下,林冠施 N 比林下施 N 能更好地反应自然 N 沉降对 AM 真菌群落组成的影响,与 Huang 等^[40] 的研究结论相似。冠层对 N 的截留会影响到达地面的 N 的数量^[39],截留的百分比和生态系统类型、N 沉降量及研究区域土壤特征有关,少则 10% 以下,多则 70%—80%^[41]。在本试验样地内,林冠喷洒的 N 被冠层截留大概占到一半左右^[55],在短时间内,林冠喷洒的 N 只有一半左右直接到达林下。所以林冠施 N $25 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ (CN25),大致相当于林下施 N $12.5 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$,林冠施 N 速率为 $50 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ (CN50),则大概相当于林下施 N $25 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ (UN25),如此施 N 方式的问题就基本简化为林下不同施 N 速率的问题。在 Jiang 等^[56] 的研究中,随着施 N 速率的增加,N 添加对 AM 真菌群落组成的影响也越大。在本研究中,CN25、CN50、UN25 与对照相比,*P* 值依次为 0.115,0.080,0.005,基本上与 Jiang 等^[56] 的研究结果相一致,但是 UN50 与对照相比差异却不显著($P=0.480$),这有可能是因为试验处理重复次数较少,组内的差异可能掩盖了组间差异(图 2),所以在空间异质性较大的环境条件下进行控制试验时,需要尽可能地增加重复次数。

从 2014 年到 2016 年,不同试验处理之间 AM 真菌群落组成差异不显著,可能有两方面的原因:(1) AM 真菌对 N 素添加产生了一定程度的适应;(2) 试验处理时间还不够长。Van Diepen 等^[25] 研究还发现,经过连续 12 年的慢性 N 沉降,枫木 (*Acer spp.*) 根中 AM 真菌的群落组成发生了显著的改变,因此在更长的时间尺度上,施 N 是否会对土壤 AM 真菌群落组成产生影响还需要后续研究。

4 结论

本试验条件下,施氮对落叶阔叶混交林土壤 AM 真菌 alpha 多样性没有显著影响,但在试验早期施氮对 AM 真菌的群落组成产生一定的影响,林下施氮高估了自然氮沉降对 AM 真菌群落组成的影响。随着处理时间的延长,不同试验处理下 AM 真菌群落有趋同趋势,这可能是因为 AM 真菌群落对 N 沉降产生了适应。本研究评估了不同施 N 方式对森林生态系统土壤 AM 真菌的影响,考虑到实验条件的局限性,在未来的研究中需要考虑更多的 N 素添加梯度和更长的时间跨度,才能够更全面的认识氮沉降的生态效应。

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, Vöösmary C J. Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 2004, 70(2): 153-226.
- [2] Liu X J, Zhang Y, Han W X, Tang A H, Shen J L, Cui Z L, Vitousek P, Erisman J W, Goulding K, Christie P, Fangmeier A, Zhang F S. Enhanced nitrogen deposition over China. *Nature*, 2013, 494(7438): 459-462.
- [3] Jia Y L, Yu G R, He N P, Zhan X Y, Fang H J, Sheng W P, Zuo Y, Zhang D Y, Wang Q F. Spatial and decadal variations in inorganic nitrogen wet deposition in China induced by human activity. *Scientific Reports*, 2015, 4: 3763.
- [4] Schulte-Uebbing L, De Vries W. Global-scale impacts of nitrogen deposition on tree carbon sequestration in tropical, temperate, and boreal forests: a meta-analysis. *Global Change Biology*, 2018, 24(2): e416-e431.
- [5] Lu X K, Mao Q G, Gilliam F S, Luo Y Q, Mo J M. Nitrogen deposition contributes to soil acidification in tropical ecosystems. *Global Change Biology*, 2014, 20(12): 3790-3801.

- [6] McClean C J, Van Den Berg L J L, Ashmore M R, Preston C D. Atmospheric nitrogen deposition explains patterns of plant species loss. *Global Change Biology*, 2011, 17(9) : 2882-2892.
- [7] Jaworski N A, Howarth R W, Hettling L J. Atmospheric deposition of nitrogen oxides onto the landscape contributes to coastal eutrophication in the northeast United States. *Environmental Science & Technology*, 1997, 31(7) : 1995-2004.
- [8] Zhou Z H, Wang C K, Zheng M H, Jiang L F, Luo Y Q. Patterns and mechanisms of responses by soil microbial communities to nitrogen addition. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 115: 433-441.
- [9] Chen D M, Xing W, Lan Z C, Saleem M, Wu Y, Hu S J, Bai Y F. Direct and indirect effects of nitrogen enrichment on soil organisms and carbon and nitrogen mineralization in a semi-arid grassland. *Functional Ecology*, 2019, 33(1) : 175-187.
- [10] Högborg M N, Briones M J I, Keel S G, Metcalfe D B, Campbell C, Midwood A J, Thornton B, Hurry V, Linder S, Näsholm T, Högborg P. Quantification of effects of season and nitrogen supply on tree below-ground carbon transfer to ectomycorrhizal fungi and other soil organisms in a boreal pine forest. *New Phytologist*, 2010, 187(2) : 485-493.
- [11] Smith S E, Read D. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd ed. London: Academic Press, 2008.
- [12] Van der Heijden M G A, Klironomos J N, Ursic M, Moutoglou P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders I R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 1998, 396(6706) : 69-72.
- [13] Van Der Heijden M G A, Bardgett R D, Van Straalen N M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 2008, 11(3) : 296-310.
- [14] Veresoglou S D, Chen B D, Rillig M C. Arbuscular mycorrhiza and soil nitrogen cycling. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 46: 53-62.
- [15] 陈永亮, 陈保冬, 刘蕾, 胡亚军, 徐天乐, 张莘. 丛枝菌根真菌在土壤氮素循环中的作用. *生态学报*, 2014, 34(17) : 4807-4815.
- [16] Veresoglou S D, Shaw L J, Hooker J E, Sen R B. Arbuscular mycorrhizal modulation of diazotrophic and denitrifying microbial communities in the (mycorrhizal) rhizosphere of *Plantago lanceolata*. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 53: 78-81.
- [17] Bollmann A, Bär-Gilissen M J, Laanbroek H J. Growth at low ammonium concentrations and starvation response as potential factors involved in niche differentiation among ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10) : 4751-4757.
- [18] Chen Y L, Chen B D, Hu Y J, Li T, Zhang X, Hao Z P, Wang Y S. Direct and indirect influence of arbuscular mycorrhizal fungi on abundance and community structure of ammonia oxidizing bacteria and archaea in soil microcosms. *Pedobiologia*, 2013, 56(4/6) : 205-212.
- [19] Yao Q, Wang L R, Zhu H H, Chen J Z. Effect of arbuscular mycorrhizal fungal inoculation on root system architecture of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) seedlings. *Scientia Horticulturae*, 2009, 121(4) : 458-461.
- [20] Amora-Lazcano E, Vázquez M M, Azcón R. Response of nitrogen-transforming microorganisms to arbuscular mycorrhizal fungi. *Biology and Fertility of Soils*, 1998, 27(1) : 65-70.
- [21] Rillig M C, Hoyer A T, Carran A. Minimal direct contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to DOC leaching in grassland through losses of glomalin-related soil protein. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(9) : 2967-2970.
- [22] Zheng Y, Kim Y C, Tian X F, Chen L, Yang W, Gao C, Song M H, Xu X L, Guo L D. Differential responses of arbuscular mycorrhizal fungi to nitrogen addition in a near pristine Tibetan alpine meadow. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 89(3) : 594-605.
- [23] Li X L, Zhu T Y, Peng F, Chen Q, Lin S, Christie P, Zhang J L. Inner Mongolian steppe arbuscular mycorrhizal fungal communities respond more strongly to water availability than to nitrogen fertilization. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(8) : 3051-3068.
- [24] Camenzind T, Hempel S, Homeier J, Horn S, Velescu A, Wilcke W, Rillig M C. Nitrogen and phosphorus additions impact arbuscular mycorrhizal abundance and molecular diversity in a tropical montane forest. *Global Change Biology*, 2014, 20(12) : 3646-3659.
- [25] Van Diepen L T A, Lilleskov E A, Pregitzer K S. Simulated nitrogen deposition affects community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in northern hardwood forests. *Molecular Ecology*, 2011, 20(4) : 799-811.
- [26] Chen Y L, Zhang X, Ye J S, Han H Y, Wan S Q, Chen B D. Six-year fertilization modifies the biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a temperate steppe in inner Mongolia. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 69: 371-381.
- [27] Kim Y C, Gao C, Zheng Y, He X H, Yang W, Chen L, Wan S Q, Guo L D. Arbuscular mycorrhizal fungal community response to warming and nitrogen addition in a semiarid steppe ecosystem. *Mycorrhiza*, 2015, 25(4) : 267-276.
- [28] Chen Y L, Xu Z W, Xu T L, Veresoglou S D, Yang G W, Chen B D. Nitrogen deposition and precipitation induced phylogenetic clustering of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 115: 233-242.
- [29] Van Diepen L T A, Entwistle E M, Zak D R. Chronic nitrogen deposition and the composition of active arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology*, 2013, 72: 62-68.
- [30] Mueller R C, Bohannan B J M. Shifts in the phylogenetic structure of arbuscular mycorrhizal fungi in response to experimental nitrogen and carbon dioxide additions. *Oecologia*, 2015, 179(1) : 175-185.
- [31] Sheldrake M, Rosenstock N P, Mangan S, Revillini D, Sayer E J, Olsson P A, Verbruggen E, Tanner E V J, Turner B L, Wright S J. Responses

- of arbuscular mycorrhizal fungi to long-term inorganic and organic nutrient addition in a lowland tropical forest. *The ISME Journal*, 2018, 12(10): 2433-2445.
- [32] Zhao A H, Liu L, Xu T L, Shi L L, Xie W, Zhang W, Fu S L, Feng H Y, Chen B D. Influences of canopy nitrogen and water addition on AM fungal biodiversity and community composition in a mixed deciduous forest of China. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1842.
- [33] Wang C, Liu D W, Bai E. Decreasing soil microbial diversity is associated with decreasing microbial biomass under nitrogen addition. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 120: 126-133.
- [34] Sparks J P. Ecological ramifications of the direct foliar uptake of nitrogen. *Oecologia*, 2009, 159(1): 1-13.
- [35] Dail D B, Hollinger D Y, Davidson E A, Fernandez I, Sievering H C, Scott N A, Gaige E. Distribution of nitrogen-15 tracers applied to the canopy of a mature spruce-hemlock stand, Howland, Maine, USA. *Oecologia*, 2009, 160(3): 589-599.
- [36] Matson A L, Corre M D, Veldkamp E. Nitrogen cycling in canopy soils of tropical montane forests responds rapidly to indirect N and P fertilization. *Global Change Biology*, 2014, 20(12): 3802-3813.
- [37] Hanson P J, Lindberg S E. Dry deposition of reactive nitrogen compounds: a review of leaf, canopy and non-foliar measurements. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*, 1991, 25(8): 1615-1634.
- [38] Cardelús C L, Mack M C, Woods C, DeMarco J, Treseder K K. The influence of tree species on canopy soil nutrient status in a tropical lowland wet forest in Costa Rica. *Plant and Soil*, 2009, 318(1/2): 47-61.
- [39] Houle D, Marty C, Duchesne L. Response of canopy nitrogen uptake to a rapid decrease in bulk nitrate deposition in two eastern Canadian boreal forests. *Oecologia*, 2015, 177(1): 29-37.
- [40] Huang X R, Liu Y F, Li Y Y, Guo P P, Fang X, Yi Z G. Foliage application of nitrogen has less influence on soil microbial biomass and community composition than soil application of nitrogen. *Journal of Soils and Sediments*, 2019, 19(1): 221-231.
- [41] Zhang W, Shen W J, Zhu S D, Wan S Q, Luo Y Q, Yan J H, Wang K Y, Liu L, Dai H T, Li P X, Dai K Y, Zhang W X, Liu Z F, Wang F M, Kuang Y W, Li Z A, Lin Y B, Rao X Q, Li J, Zou B, Cai X, Mo J M, Zhao P, Ye Q, Huang J G, Fu S L. CAN canopy addition of nitrogen better illustrate the effect of atmospheric nitrogen deposition on forest ecosystem? *Scientific Reports*, 2015, 5: 11245.
- [42] 鲍士旦. 土壤农化分析(第三版). 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [43] Lee J, Lee S, Young J P W. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 65(2): 339-349.
- [44] Sato K, Suyama Y, Saito M, Sugawara K. A new primer for discrimination of arbuscular mycorrhizal fungi with polymerase chain reaction-denature gradient gel electrophoresis. *Grassland Science*, 2005, 51(2): 179-181.
- [45] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [46] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, Hall J R, Hartmann M, Hollister E B, Lesniewski R A, Oakley B B, Parks D H, Robinson C J, Sahl J W, Stres B, Thallinger G G, Van H D J, Weber C F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [47] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, Quince C, Knight R. Uchime improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200.
- [48] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than blast. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [49] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [50] De Cárcer D A, Denman S E, McSweeney C, Morrison M. Evaluation of subsampling-based normalization strategies for tagged high-throughput sequencing data sets from gut microbiomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(24): 8795-8798.
- [51] Oksanen J, Blanchet F G, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D, Minchin P R, O'Hara R B, Simpson G L, Solymos P, Stevens M H H, Szoecs E, Wagner H. *Vegan: Community Ecology Package*. R Package Version 2.4-3. 2017. <https://cran.r-project.org/package=vegan>.
- [52] Tian D, Du E Z, Jiang L, Ma S H, Zeng W J, Zou A L, Feng C Y, Xu L C, Xing A J, Wang W, Zheng C Y, Ji C J, Shen H H, Fang J Y. Responses of forest ecosystems to increasing n deposition in China: a critical review. *Environmental Pollution*, 2018, 243: 75-86.
- [53] Tian D S, Niu S L. A global analysis of soil acidification caused by nitrogen addition. *Environmental Research Letters*, 2015, 10(2): 024019.
- [54] 刘永俊, 石国玺, 毛琳, 成岗, 蒋胜竞, 冯虎元. 施肥对垂穗披碱草根系中丛枝菌根真菌的影响. *应用生态学报*, 2011, 22(12): 3131-3137.
- [55] Liu T, Mao P, Shi L L, Eisenhauer N, Liu S J, Wang X L, He X X, Wang Z Y, Zhang W, Liu Z F, Zhou L X, Shao Y H, Fu S L. Forest canopy maintains the soil community composition under elevated nitrogen deposition. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 143: 107733.
- [56] Jiang S J, Liu Y J, Luo J J, Qin M S, Johnson N C, Öpik M, Vasar M, Chai Y X, Zhou X L, Mao L, Du G Z, An L Z, Feng H Y. Dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal community structure and functioning along a nitrogen enrichment gradient in an alpine meadow ecosystem. *New Phytologist*, 2018, 220(4): 1222-1235.