

DOI: 10.20103/j.stxb.202208062247

樊丹丹, 孔维栋. 围栏对青藏高原不同类型草地土壤原核微生物多样性的影响. 生态学报, 2024, 44(2): 651-661.

Fan D D, Kong W D. Effects of fencing on prokaryotic diversity in different grassland soils on the Tibetan Plateau. Acta Ecologica Sinica, 2024, 44(2): 651-661.

围栏对青藏高原不同类型草地土壤原核微生物多样性的影响

樊丹丹^{1,2}, 孔维栋^{1,2,*}

1 中国科学院青藏高原研究所青藏高原地球系统与资源环境国家重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 草地退化是草地植被的倒退演替, 导致生物多样性丧失和生态系统功能退化, 围栏是恢复退化草地生态系统功能的有效管理措施。微生物是土壤中的重要组成部分, 在维持草地生态系统稳定性和功能方面发挥着重要作用。然而, 目前尚不清楚围栏如何影响不同类型草地土壤微生物群落。以青藏高原草甸、草原和荒漠草地三种草地类型的退化草地为研究对象, 设置围栏和放牧两种处理, 采用 Illumina HiSeq 高通量测序技术研究了围栏对土壤原核微生物群落多样性和群落结构的影响。结果表明: 围栏未显著影响草甸土壤原核微生物的丰富度、Shannon 多样性和均匀度, 但显著增加了草原土壤的原核微生物的丰富度、Shannon 多样性和均匀度 ($P < 0.05$), 稍降低了荒漠草地土壤原核微生物的丰富度、Shannon 多样性和均匀度 ($P = 0.086, 0.072$ 和 0.099)。在围栏处理的草地中, 土壤原核微生物丰富度、Shannon 多样性和均匀度与年均温、干旱度和 pH 显著负相关 ($P < 0.01$), 与年平均降水量、溶解性有机碳、地上生物量和植物多样性显著正相关 ($P < 0.01$)。在放牧处理的草地中, 土壤原核微生物丰富度、Shannon 多样性和均匀度与年均温和干旱度显著负相关 ($P < 0.05$), 但原核微生物丰富度和 Shannon 多样性与所有土壤理化和植被因素均无显著相关性。冗余分析 (RDA) 表明, 不同类型草地土壤原核微生物群落结构发生了显著的变化, 并沿草甸、草原和荒漠草地的过渡逐渐转变 ($P < 0.001$)。方差分解分析 (VPA) 进一步表明, 原核微生物群落结构变化主要受年均温、年平均降水量、干旱度和 pH 的驱动。围栏显著改变了不同类型草地中部分样点土壤原核微生物群落结构。三种草地类型的主要原核微生物优势门均为放线菌门 (Actinobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria) 和酸杆菌门 (Acidobacteria)。放线菌门 (Actinobacteria) 的相对丰度在荒漠草地土壤中最高, 而变形菌门 (Proteobacteria) 和酸杆菌门 (Acidobacteria) 的相对丰度在草甸土壤中最高。此外, 不同类型围栏和放牧草地土壤原核微生物类群的相对丰度均无显著差异。研究表明不同类型草地土壤原核微生物群落对围栏的响应不同, 这为因地制宜制定草地管理措施提供了数据支持, 为草地退化的防治提供了理论支持。

关键词: 围栏; 土壤原核微生物群落; 草地类型; 青藏高原

Effects of fencing on prokaryotic diversity in different grassland soils on the Tibetan Plateau

FAN Dandan^{1,2}, KONG Weidong^{1,2,*}

1 State Key Laboratory of Tibetan Plateau Earth System, Environment and Resources (TPESER), Institute of Tibetan Plateau Research, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

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

Abstract: Grassland degradation is a retrogressive succession of grassland vegetation, which leads to the loss of biodiversity and the degradation of ecosystem functions. Fencing is an effective management practice to restore grassland ecosystem function. Microorganisms, as the critical component of soil, play important roles in maintaining the stability and function of

基金项目: 国家自然科学基金项目 (42007047, 42177101, 32161123004); 国家重点研发计划项目 (2022YFE0114000)

收稿日期: 2022-08-06; **网络出版日期:** 2023-10-20

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wdkong@itpcas.ac.cn

grassland ecosystems. However, it is unclear how fencing affects prokaryotic communities in different grassland soils. In this study, two treatments of fencing and grazing were set up to investigate the effects of fencing on soil prokaryotic diversity and community structure for three grassland types (meadow, steppe, and desert grassland) in degraded grasslands of the Tibetan Plateau, using Illumina HiSeq high-throughput sequencing technology. The results demonstrated that fencing did not significantly influence the prokaryotic richness, Shannon diversity and evenness in meadow soils, but significantly increased in steppe soils ($P < 0.05$), and slightly decreased in desert grasslands ($P = 0.086, 0.072, \text{ and } 0.099$). In fencing grasslands, prokaryotic richness, Shannon diversity and evenness negatively correlated with mean annual temperature, aridity index, and pH ($P < 0.01$), but positively correlated with mean annual precipitation, dissolved organic carbon, aboveground plant biomass, and plant diversity ($P < 0.01$). In contrast, soil prokaryotic richness, Shannon diversity and evenness negatively correlated with mean annual temperature and aridity index ($P < 0.05$), but prokaryotic microbial richness and Shannon diversity did not correlate with all soil physicochemical and vegetation properties in grazing grasslands. Redundancy analysis (RDA) showed that significant differences were detected in the soil prokaryotic community structure across the three grassland types, and gradually shifted along the transition of meadow, steppe, and desert grassland ($P < 0.001$). Variance partitioning analysis (VPA) further revealed that the prokaryotic community structure variations were mainly driven by mean annual temperature, mean annual precipitation, aridity index, and pH. Fencing significantly altered the soil prokaryotic community structure at some sample sites in different grassland types. The dominant phyla were Actinobacteria, Proteobacteria, and Acidobacteria in the three grassland types. Actinobacteria showed the highest relative abundance in desert grassland soils, while Proteobacteria and Acidobacteria showed the highest in meadow soils. In addition, there were no significant differences in the relative abundance of soil prokaryotic taxa between different types of fencing and grazing grasslands. This study showed that the prokaryotic community in different grassland soils responded differently to fencing. This provides data support for the development of local condition-specific management strategies for grasslands and offers theoretical support for the restoration of degraded grasslands.

Key Words: fencing; soil prokaryotic community; grassland type; Tibetan Plateau

草地是地球上最大的陆地生态系统之一,覆盖了地球表面的 40%,参与气候调节、碳封存、水净化和侵蚀控制等关键的生态系统服务,对维持生态系统稳定至关重要^[1-2]。然而,由于气候变化和人类活动的增加(如过度放牧),近一半的草地生态系统出现了不同程度的退化^[3]。草地退化导致植物群落多样性和生产力下降,土壤物理结构受损以及土壤养分含量下降^[4-5]。

围栏被广泛认为是恢复全球退化草地的最有效措施^[6-8]。围栏提高植物生产力,维持植物多样性,增加土壤养分水平^[9-10]。另外,围栏不仅可以改变生态系统过程以促进植物群落生长,还可以通过增加养分的有效性来影响土壤微生物群落^[11-12]。围栏显著提高了土壤细菌数量,在荒漠草地次表层土壤提高了 1.47 倍^[13],在东北羊草草原上增加了 0.51 倍^[14],在小针茅荒漠草原 0—10 cm 和 10—20 cm 土层分别增加了 35.98%—63.80% 和 22.69%—88.03%^[15]。围栏也改变了细菌群落结构,酸杆菌门(Acidobacteria)和变形菌门(Proteobacteria)的相对丰度显著增加,而放线菌门(Actinobacteria)显著降低^[16]。然而,围栏对土壤原核微生物群落多样性的影响在之前的研究中并不一致。前人研究表明,围栏显著增加半干旱草地土壤细菌多样性,这可能与围栏后凋落物分解的增强和土壤有机质含量、养分有效性的增加有关^[17-18]。然而,研究发现,围栏显著降低典型草原土壤细菌多样性,这是由较高的土壤含水率引起的^[19]。也有一些研究表明,围栏未显著影响大西洋山地草原和青藏高原草甸土壤细菌多样性,这与草地类型和放牧历史有关^[5,20]。因此,土壤微生物群落对围栏的响应可能因草地类型而异^[21]。然而,不同类型草地土壤原核微生物多样性和群落结构是否以及如何对围栏做出响应仍然知之甚少。

青藏高原素有“世界屋脊”“亚洲水塔”之称,具有独特的自然地理格局和多样的生态系统,对中国乃至亚

洲的水土保持、碳封存和生物多样性保护至关重要^[22]。高寒草地是青藏高原最主要的生态系统类型, 占总面积的 70% 以上^[23], 放牧是高寒草地最重要的土地利用活动^[24]。近几十年来, 过度放牧的沉重压力, 加上恶劣的气候, 导致青藏高原部分地区草地严重退化^[25]。因此, 在政府政策的引导下, 围栏已被用作恢复青藏高原退化高寒草地的有效方法^[26]。受气候和土壤条件的综合影响, 草甸、草原和荒漠草地是青藏高原地区三种主要的草地类型, 植被类型不同, 水分供应梯度明显。植物群落和土壤微生物群落与草地类型密切相关, 草地类型通过影响土壤特性和资源与土壤微生物群落联系起来^[27]。其中, 土壤原核微生物一般指核质和细胞质之间不存在明显核膜, 只存在称作核区的裸露 DNA, 也没有细胞器的一类原始单细胞生物, 其代谢途径和生存环境多样, 包括细菌和古细菌等。深入研究青藏高原围栏对不同草地生态系统土壤原核微生物群落的影响, 对退化草地生态系统的功能恢复和可持续性管理有着重要理论指导意义。在本研究中, 研究了三种不同类型的高寒草地在围栏和放牧处理下土壤原核微生物多样性和群落结构的变化以及其环境驱动因子, 以便了解围栏对不同生态系统的影响机制, 以及为退化草地的生态恢复和管理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况与样地设置

研究区位于青藏高原北部 31°N 至 34°N 及 79°E 至 93°E 总长度 1200 km 的东西向狭长地带。海拔范围为 4297—4648 m, 气温年较差小, 生长季平均气温为 7.15—11.46℃, 生长季平均降水量为 143.76—527.27 mm, 多集中在 6—9 月。该样带从东向西跨越半湿润、半干旱和干旱的高山大陆性气候, 优势物种从草甸中的高山嵩草 (*Kobresia pygmaea*)、草原中的紫花针茅 (*Stipa purpurea*) 到沙漠草地中的紫花针茅 (*S. purpurea*) 和沙生针茅 (*S. glareosa*)^[28]。2017 年 7 月, 在该样带设置 12 个采样点, 从东到西涉及三种草地类型: 草甸、草原和荒漠草地, 每种草地类型包含了四个不同的样点。每个样点均设置成对的围栏和放牧样地, 围栏建于 2006 年, 且每个样点的放牧样地都是在距离围栏一公里内随机选取的。

1.2 样品采集与处理

在每个样点的围栏和放牧样地中分别随机设置 5 个间隔不小于 20 m 的 1 m×1 m 的样方, 共计 5 个重复。在每个样方中齐地面刈割收获植物样品, 按物种分别保存在单独的信封中。在每个样方内用直径为 7 cm 的根钻随机采集 5 个 0—20 cm 的土芯混合, 将取出的根土混合样品装入自封袋中, 带回实验室后冲洗漂净并将根系分离。将植物地上部分和根系样品在 65℃ 下烘干 48 小时, 称重以获得其生物量。同时, 在每个样方使用直径 2.5 cm 的土钻随机取五个土芯并充分混合, 取样深度为 0—10 cm。土样采集后使用 2 mm 孔的筛子过筛, 去除石子植物根系等杂质, 一部分装在全降解袋保存在 -80℃ 冰箱中用于分子实验; 另一部分风干后用于土壤理化因子的测定。综上, 共 120 份植物(地上和地下部分)和土壤样品。

1.3 环境因子的测定

土壤总有机碳 (TOC) 使用总有机碳分析仪 TOL-L (TOL-VCPh, Shimadzu, 日本) 测定, 土壤硝态氮 (NO_3^- -N) 和铵态氮 (NH_4^+ -N) 采用 2 M KCl (5:1) 浸提, 并用流动分析仪 (Smartchem200 Discrete Auto Analyzer, Alliance, 法国) 测定。土壤 pH 值使用 pH 计 (Sartorius PB-10, 德国) 测定, 所采用的土水比为 1:2.5。土壤溶解性有机碳 (DOC) 和溶解性氮 (DN) 采用 2 M KCl (1:4) 浸提, 使用 TOC-N 自动分析仪 (multi N/C 3100, Jena, 德国) 测定。从每个样点附近的气象站收集生长季 (5 月至 9 月) 的气候数据, 包括样本采集期间的平均气温、累积降水和干旱指数。每个样方内出现的物种数量用作样方水平的植物丰富度 (PR)。植物多样性 (PD) 的计算方法如下: $PD = -\sum_{i=1}^{PR} P_i \ln P_i$, 其中 P_i 代表物种 i 的相对重要性值; 植物均匀度 (PE) 的计算方法为: $PE = \frac{PD}{\ln(PR)}$ 。

土壤总 DNA 的提取和 16S rRNA 基因高通量测序

土壤样品总 DNA 的提取使用 MoBio Powersoil™ DNA isolation kit (MOBIO, 加利福尼亚州, 美国) 试剂盒

提取,操作过程完全按照试剂盒说明书进行。获得的 DNA 样品采用 Nanodrop® ND-2000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, 威尔明顿, 特拉华州) 和 1% 琼脂糖凝胶电泳测定其数量和质量。

本研究使用聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 16S rRNA 基因的 V4—V5 区, 扩增引物为 515F (5'-GTGCCAGC MGCCGCGGTAA-3') 和 806R (5'-GGACTACN VGGGTWTCTAAT-3')。PCR 的反应体系为 25 μ L, 包括 12.5 μ L Premix Ex Taq 酶 (包含 1 \times PCR 缓冲液, 1.5 Mm MgCl₂, 每种 dNTP 各 0.4 μ M, 0.5 U 的 Ex Taq), 前后引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, DNA 模板 (约 20 ng) 1 μ L, 无菌水补齐至 25 μ L。PCR 目标序列的扩增程序设置为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 并在 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。PCR 产物用 1 \times TAE 缓冲液配制 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳分离, 收集目的片段并使用 Axygen® AxyPrep™ 胶回收试剂盒 (AXYGEN, 美国) 纯化, 将不同样品的纯化 PCR 产物等摩尔质量混合后, 在广东美格基因科技有限公司的 Illumina HiSeq 2500 测序仪上进行测序。

1.5 数据分析

使用 QIIME 平台进行处理 16S rRNA 基因高通量测序数据^[29]。使用 FLASH 软件拼接双端测序序列^[30], 随后进行质量控制, 去除质量不好 (序列长度 < 200 bp, 碱基识别模糊, 平均碱基质量 < 20) 的序列。质控后的序列使用基于 UCHIME 算法的 Usearch 8 软件检测并去除嵌合体^[31]。在嵌合体检测后, 剩余的高质量序列使用 UCLUST 方法按照 97% 的相似性聚类成可操作分类单元 (OTUs)^[32], 去除在所有样品中只出现了一次的单一序列。使用 Silva 132 数据库 (<https://www.arb-silva.de/>) 注释 16S rRNA 基因序列的分类信息^[33]。

根据 OTUs 表使用 R 软件中的 vegan 包^[34] 计算原核微生物群落的多样性指标, 包括丰富度、均匀度和多样性指数, 分析不同草地类型中原核微生物多样性的变化。同时使用 SPSS 21.0 (IBM Inc., Armonk, NY, 美国) 进行配对 T 检验, 以检验原核微生物丰富度、多样性和均匀度在不同围栏处理中的差异。使用 R 包 “psych” 和 “ggh4x” 进行 Spearman 相关关系热图的绘制, 以检测原核微生物丰富度、多样性和均匀度与不同环境因子的相关性。根据 OTUs 表及环境因子数据使用 R 软件中 vegan 包的 “rda”、“adonis” 和 “varpart” 函数进行冗余分析 (RDA)、置换多元方差分析 (PERMANOVA) 和方差分解分析 (VPA), 以研究不同生态系统和围栏处理原核微生物群落结构的差异及主要的环境驱动因子。

2 结果与分析

2.1 土壤原核微生物多样性及其与环境因子的关系

土壤原核微生物多样性结果显示, 围栏对不同类型草地土壤原核微生物多样性表现出不一致的影响 (图 1)。围栏未显著影响草甸土壤原核微生物的丰富度、Shannon 多样性和均匀度, 但显著增加了草原土壤原核微生物的丰富度、Shannon 多样性和均匀度 ($P < 0.05$)。相反, 围栏稍降低了荒漠草地土壤原核微生物的丰富度、Shannon 多样性和均匀度 ($P = 0.086, 0.072$ 和 0.099)。在草甸中, 放牧和围栏草地土壤原核微生物丰富度 (7614.55 ± 129.36 和 7654.90 ± 147.95) 和 Shannon 多样性 (7.88 ± 0.04 和 7.84 ± 0.09) 均表现出相对稳定的趋势。在草原中, 围栏草地土壤原核微生物丰富度、Shannon 多样性和均匀度分别增加了 1.93%—6.14%、0.95%—1.65% 和 0.56%—1.02%; 而在荒漠草地中分别下降了 0.78%—5.40%、0.12%—2.17% 和 0.33%—1.66%。

对原核微生物多样性与环境因子进行 Spearman 相关分析 (图 2), 结果表明环境因子显著影响了土壤原核微生物多样性。在围栏草地中, 原核微生物丰富度、Shannon 多样性和均匀度与年均温、干旱度和 pH 显著负相关 ($P < 0.01$), 与年平均降水量、DOC、DN、地上生物量、植物丰富度、植物多样性、植物均匀度和根系生物量显著正相关 ($P < 0.01$)。在放牧草地中, 原核微生物丰富度、Shannon 多样性和均匀度与年均温和干旱度显著负相关 ($P < 0.05$), 但与土壤和植被因子的相关性却消失了, 说明放牧通过改变土壤和植被条件影响原核微生物多样性。

2.2 土壤原核微生物群落结构性及其环境驱动因子

采用冗余分析 (RDA) 分析各环境因子与土壤原核微生物群落结构之间的关系。结果显示 (图 3), 土壤原核微生物群落结构沿草甸、草原和荒漠草地的过渡逐渐转变, 且原核微生物群落在三种草地类型中能够明

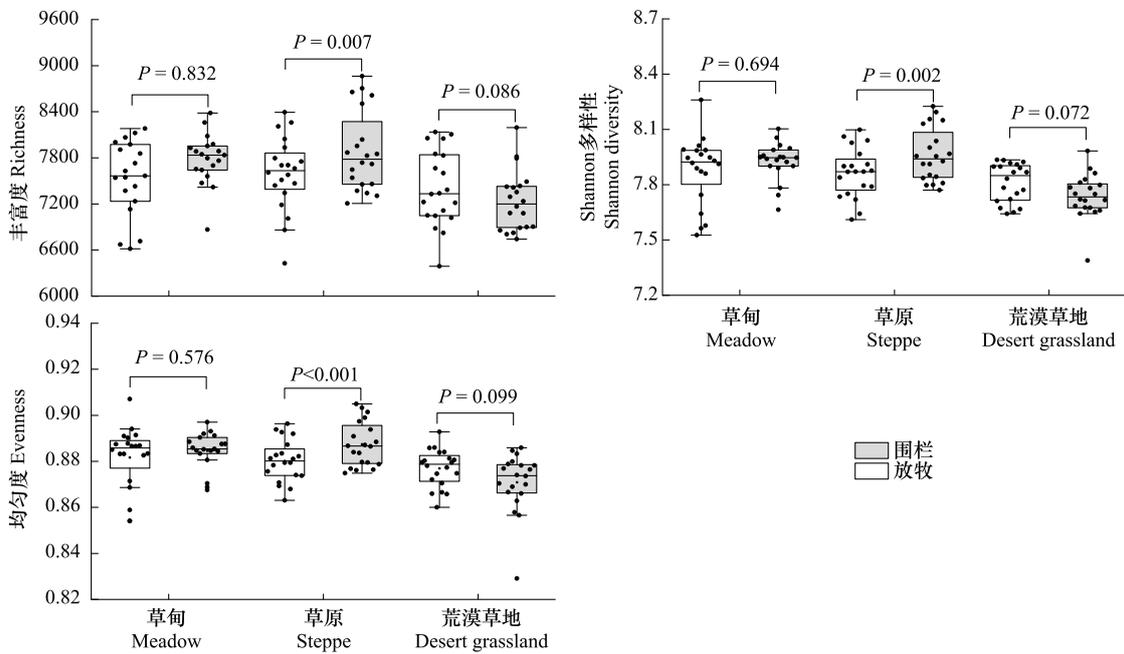


图 1 围栏和放牧处理下不同类型草地土壤原核微生物丰富度、Shannon 多样性和均匀度

Fig.1 Soil prokaryotic richness, Shannon diversity, and evenness soils in different grassland types under fenced and grazed treatments

显区分。置换多元方差分析 (PERMANOVA) 结果表明 (表 1 和 2), 不同草地类型土壤原核微生物群落结构差异显著 ($P < 0.001$), 而围栏对草甸土壤中 S1、S2 和 S4 样点的原核微生物群落结构具有显著的差异 ($P < 0.05$), 对草原土壤的 S5—7 样点的原核微生物群落结构也具有显著的差异 ($P < 0.05$), 对荒漠草地土壤中所有样点均具有显著的差异 ($P < 0.05$)。此外, 原核微生物群落结构主要受到温度、降水、土壤 pH、地上植物生物量、根系生物量和总氮驱动。VPA 结果显示 (表 3),

所有环境因子对三种草地类型中原核微生物群落结构变异的总解释率为 42.09%。温度、干旱度指数和降水对原核微生物群落落结构影响最大, 解释了原核微生物群落 7.63% 的变化。其中温度是驱动原核微生物群落

表 1 草地类型和围栏对土壤原核微生物群落的影响

Table 1 Effects of grassland types and fencing on soil prokaryotic communities

参数 Parameters	置换多元方差分析 PERMANOVA	
	R^2	P
草地类型 Grassland types	0.380	<0.001
围栏 Fencing	0.007	0.197
草地类型×围栏 Grassland types×Fencing	0.012	0.277

表 2 不同类型草地各样点中围栏对土壤原核微生物群落的影响

Table 2 Effects of fencing on soil prokaryotic communities in different grassland types at each site

草地类型 Grassland types	样点 Sites	处理 Treatment	置换多元方差分析 PERMANOVA	
			R^2	P
草甸 Meadow	S1	围栏对放牧	0.173	0.027
	S2	围栏对放牧	0.160	0.014
	S3	围栏对放牧	0.113	0.385
	S4	围栏对放牧	0.171	0.009
草原 Steppe	S5	围栏对放牧	0.357	0.009
	S6	围栏对放牧	0.145	0.014
	S7	围栏对放牧	0.191	0.012
	S8	围栏对放牧	0.104	0.583
荒漠草地 Desert grassland	S9	围栏对放牧	0.152	0.018
	S10	围栏对放牧	0.146	0.043
	S11	围栏对放牧	0.186	0.003
	S12	围栏对放牧	0.184	0.017

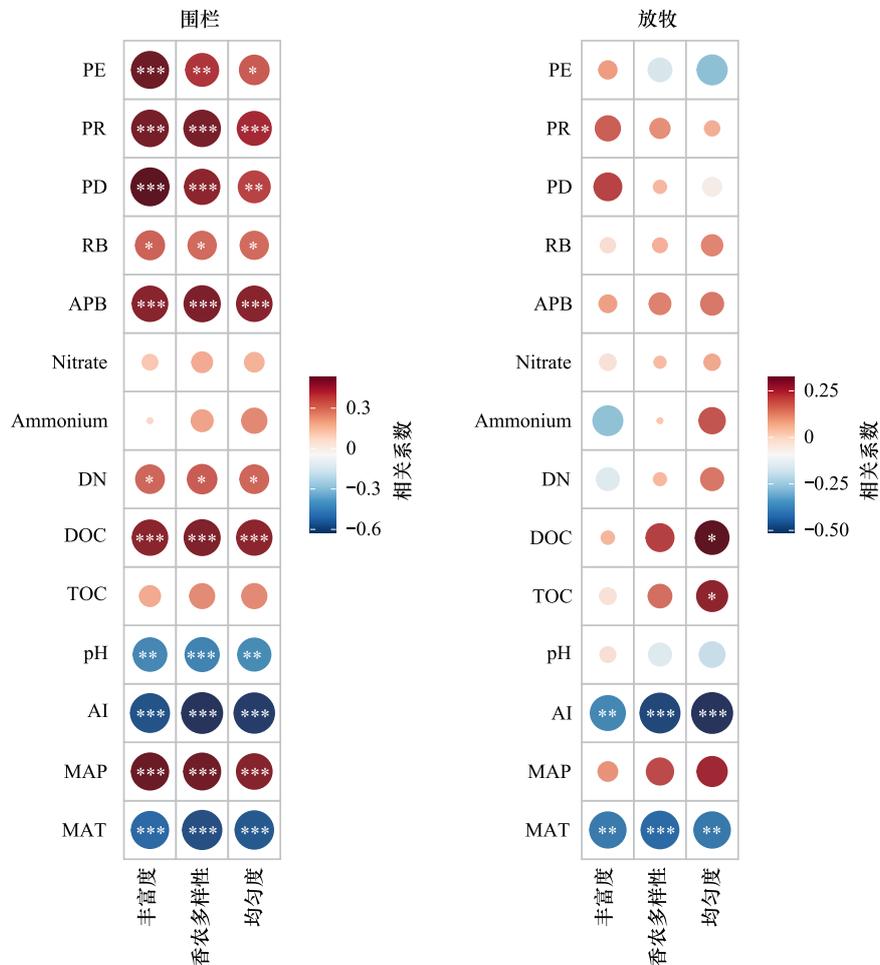


图2 围栏和放牧处理下土壤原核微生物多样性与环境因子之间的 Spearman 相关性分析

Fig.2 Spearman correlations between soil prokaryotic diversity and environmental factors under fenced and grazed treatments

* 代表相关性水平: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; PE: 植物均匀度 Plant evenness; PR: 植物丰富度 Plant richness; PD: 植物多样性 Plant diversity; RB: 根系生物量 Root biomass; Nitrate: 硝态氮; Ammonium: 铵态氮; APB: 地上植物生物量 Aboveground plant biomass; DN: 溶解性氮 Dissolved nitrogen; DOC: 溶解性有机碳 Dissolved organic carbon; TOC: 总有机碳 Total organic carbon; AI: 干旱度 Aridity index; MAP: 年均降水量 Mean annual precipitation; MAT: 年均温 Mean annual temperature

结构变化的最主要的气候因子,其单独解释率为 3.43%,而土壤 pH 是驱动原核微生物群落结构变化的主要的土壤因子,其单独解释率为 1.17%。

2.3 土壤原核微生物群落组成

土壤原核微生物 OTUs 的注释结果(图 4)显示,在同一生态系统中,围栏和放牧草地中土壤原核微生物群落组成在门水平上未发生显著变化,排名前 7 的菌群均为放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、未分类门(Unclassified)、奇古菌门(Thaumarchaeota)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和疣微菌门(Verrucomicrobia)。其中,放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)和酸杆菌门(Acidobacteria)是不同类型围栏和放牧草地土壤原核微生物的优势门,占原核微生物群落组成的 60%左右。荒漠草地中的放线菌门(Actinobacteria)相对丰度略高于草甸和草原,在草甸、草原和荒漠草地中的平均相对丰度分别为 24.9%、22.9%和 26.4%。而变形菌门(Proteobacteria)和酸杆菌门(Acidobacteria)相对丰度在荒漠草地中最低,明显低于其他两类草地。

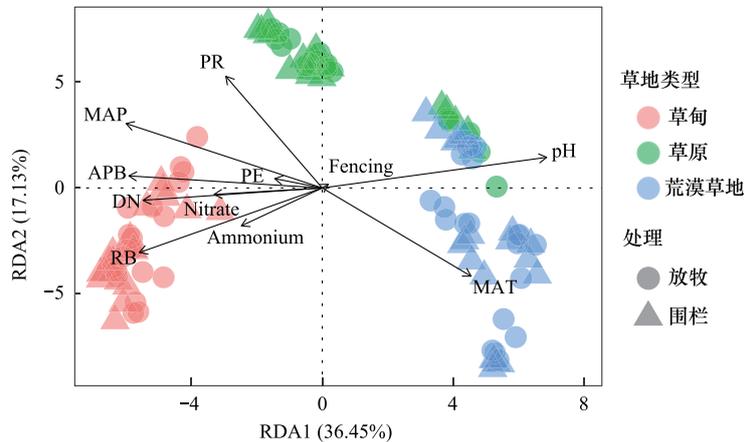


图3 土壤原核微生物群落结构与环境因子的冗余分析

Fig.3 Redundancy analysis of soil prokaryotic community structure and environmental factors

Fencing: 围栏; Nitrate: 硝态氮; Ammonium: 铵态氮

表3 环境因素对土壤原核微生物群落结构的单独贡献

Table 3 Individual contribution of environmental factors to the soil prokaryotic community structure

变量 Variables	单独解释率 Individually explained/%	变量 Variables	单独解释率 Individually explained/%
MAT	3.43 ***	Nitrate	0.21 **
MAP	2.10 ***	APB	0.27 **
AI	2.10 ***	RB	0.12
pH	1.17 ***	PR	0.18 *
TOC	0.29 **	PD	0.23 **
DOC	0.50 ***	PE	0.21 **
DN	0.47 ***	Fencing	0.03
Ammonium	0.45 ***	总解释率 Total explained	42.09

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; MAT: 年均温 Mean annual temperature; MAP: 年均降水量 Mean annual precipitation; AI: 干旱度 Aridity index; TOC: 总有机碳 Total organic carbon; DOC: 溶解性有机碳 Dissolved organic carbon; DN: 溶解性氮 Dissolved nitrogen; Ammonium: 铵态氮; Nitrate: 硝态氮; APB: 地上植物生物量 Aboveground plant biomass; RB: 根系生物量 Root biomass; PR: 植物丰富度 Plant richness; PD: 植物多样性 Plant diversity; PE: 植物均匀度 Plant evenness; Fencing: 围栏

3 讨论

本研究发现围栏未显著影响草甸土壤原核微生物多样性,而显著提高了草原的原核微生物多样性,但稍降低了荒漠草地的原核微生物多样性,这表明栖息地是影响原核微生物多样性的主要因素^[35]。造成这一结果的原因是:当土壤环境和气候因素发生变化时,不同类型草地土壤原核微生物群落结构存在差异,导致原核微生物多样性呈现不同趋势^[36]。与草原相比,草甸具有更好的环境条件,例如更高的降水、TOC、DOC和植物生物量,这为土壤原核微生物群落提供更多的养分,以补偿放牧带来的损害^[37]。此外,有研究表明在草甸中,适度放牧可能促使植物生物量快速转化,增加养分的利用率并促进植被再生^[38],同时加速养分循环,并增加土壤微生物多样性^[39]。因此,相对于围栏草地,放牧草地能够保持类似的原核微生物多样性水平。而在草原中,围栏可以增加草地地上植物生物量,从而增加源自凋落物分解和根系分泌物的土壤有机碳和氮,最终增加草原土壤原核微生物多样性^[16,21]。本研究中围栏草地土壤原核微生物多样性与地上植物生物量、溶解性有机碳、植物多样性和根系生物量之间的显著正相关也表明,在围栏过程中植被和土壤因子的正向变化促进了草原土壤原核微生物多样性的变化。而在荒漠草地,围栏降低了原核微生物多样性,这归因于不同的放牧历史和土壤性质^[40]。同时,本研究中放牧草地土壤原核微生物多样性与植物因子和土壤因子均无显著相关性,

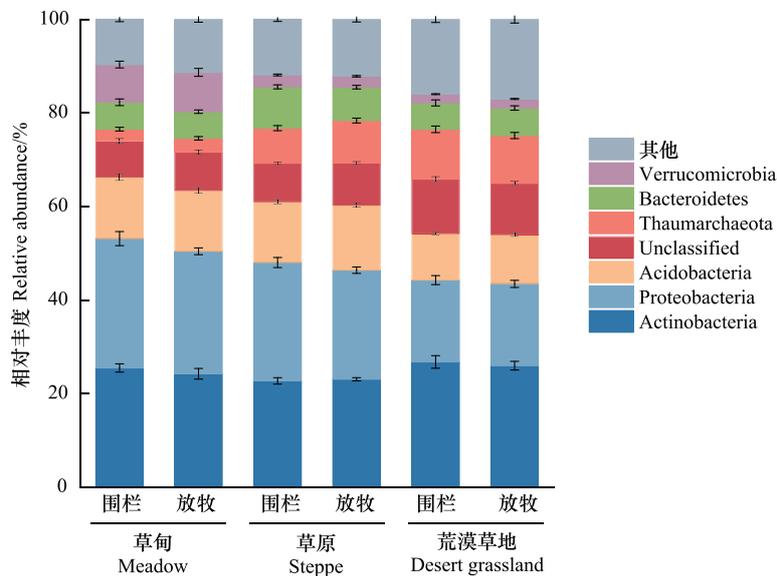


图4 围栏和放牧处理下不同类型草地土壤原核微生物群落在门水平上的相对丰度

Fig.4 Relative abundance of soil prokaryotic community at phylum level in different grassland types under fenced and grazed treatments

Verrucomicrobia: 疣微菌门; Bacteroidetes: 拟杆菌门; Thaumarchaeota: 奇古菌门; Unclassified: 未分类门; Acidobacteria: 酸杆菌门; Proteobacteria: 变形菌门; Actinobacteria: 放线菌门

也表明放牧可能将荒漠草地原本的植物条件和土壤状况全部破坏,使其处于最低值。而牲畜放牧可通过添加富含氮的易分解粪便,以及通过践踏将植被凋落物混入土壤有机质中来刺激氮的矿化^[38],可导致土壤养分增加,进一步增加原核微生物多样性^[41]。

本研究中青藏高原不同类型草地中土壤原核微生物群落结构差异显著($P < 0.001$),且草甸、草原和荒漠草地沿着温度和降水梯度能够明显区分。VPA分析也表明,温度、降水和干旱度是影响原核微生物群落结构的关键因子。有研究表明,干旱环境中微生物的发生和生物过程受到植物覆盖和土壤气候因素变化的显著驱动^[17,42]。温度升高和降水增加促进有机质分解,养分循环速率提高,具有加速土壤生物群不同功能组之间多样化相互作用的作用,从而提高高效养分的供应^[43-44]。也有研究表明,温度是确定性过程的环境过滤因素,可对微生物进行选择,例如,升温可以选择更快地处理碳以促进其自身生长的微生物,并且显著降低原核微生物群落演替过程的随机性,从而影响原核微生物群落结构^[45]。同时,降水增加直接提高了土壤水的供应,并通过调节半干旱草原的植物生产力和碳分配间接增加土壤中的养分^[46-47],并促进土壤原核微生物群落富集那些快速生长且更具活性的富营养型原核微生物类群^[48]。此外,与其他研究一样,本研究也发现土壤pH值是土壤原核微生物群落结构的重要决定因素^[49]。土壤pH值可以通过改变生化结构直接改变空间尺度(从根际到大陆)和生态系统中的原核微生物,也可以通过改变养分的溶解度来间接影响原核微生物^[50]。

放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)和酸杆菌门(Acidobacteria)的相对丰度占原核微生物群落组成的60%左右,这与其他学者关于高寒草地土壤原核微生物群落的研究类似^[35,41]。在本研究中,放线菌门(Actinobacteria)在荒漠草地土壤中最丰富,显著高于草甸和草原。这是因为与其他原核微生物类群相比,放线菌门(Actinobacteria)被认为是寡营养原核微生物(即生长缓慢的K-策略原核微生物)^[51]。相反,变形菌门(Proteobacteria)的相对丰度沿生态系统类型从草甸、草原到荒漠草地逐渐降低。这与它们的富营养生存属性有关^[52-53]。据报道,酸杆菌门(Acidobacteria)具有独特的贫营养特性及其在低温下的代谢活性^[7]。本研究中,土壤养分含量从草甸、草原到荒漠草地逐渐减少,而在酸杆菌门(Acidobacteria)在荒漠草地中的相对丰度最低,表现出相互矛盾的趋势。这是因为酸杆菌对土壤pH值的变化非常敏感^[54]。上述结果表明,以适应各种条件、代谢活性较高为特征的土壤原核微生物在高寒草地生境条件下存活良好。

4 结论

本研究通过高通量测序技术分析围栏对青藏高原不同类型草地土壤原核微生物多样性和群落结构的影响,探讨了驱动原核微生物群落变化的环境因子。本研究发现围栏对不同类型草地土壤原核微生物多样性的影响显著不同。在围栏草地中,原核微生物多样性与气候、植被和土壤因子显著相关,但在放牧草地中与植被和土壤因子无显著相关性,这表明围栏通过改变不同类型草地的植被和土壤因子来影响原核微生物多样性。原核微生物群落结构在不同草地类型存在显著差异,且大部分采样点的围栏和放牧草地原核微生物群落结构也存在显著差异。气候因子(温度、降水和干旱度)对原核微生物群落结构的解释度最高,反映了其在驱动三种草地类型土壤原核微生物群落结构演变中的主导作用。三种草地类型中原核微生物均以变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)占优势。研究结果为评估围栏如何影响不同类型退化草地的土壤原核微生物多样性提供更好的知识背景,并可以为未来退化草地的恢复和修复提供理论支撑。此外,原核微生物群落对放牧的响应为不同类型退化草地生态系统的可持续管理提供重要指导。

参考文献(References):

- [1] Han X, Li Y H, Du X F, Li Y B, Wang Z W, Jiang S W, Li Q. Effect of grassland degradation on soil quality and soil biotic community in a semi-arid temperate steppe. *Ecological Processes*, 2020, 9(1): 63.
- [2] Peng J W, Liu H, Hu Y, Sun Y, Liu Q, Li J G, Dong Y H. Shift in soil bacterial communities from K- to r-strategists facilitates adaptation to grassland degradation. *Land Degradation & Development*, 2022, 33(12): 2076-2091.
- [3] Gang C C, Zhou W, Chen Y Z, Wang Z Q, Sun Z G, Li J L, Qi J G, Odeh I. Quantitative assessment of the contributions of climate change and human activities on global grassland degradation. *Environmental Earth Sciences*, 2014, 72(11): 4273-4282.
- [4] Liu S B, Zamanian K, Schleuss P M, Zarebanadkouki M, Kuzyakov Y. Degradation of Tibetan grasslands: consequences for carbon and nutrient cycles. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2018, 252: 93-104.
- [5] Aldezabal A, Moragues L, Odriozola I, Mijangos I. Impact of grazing abandonment on plant and soil microbial communities in an Atlantic Mountain grassland. *Applied Soil Ecology*, 2015, 96: 251-260.
- [6] Listopad C M C S, Köbel M, Príncipe A, Gonçalves P, Branquinho C. The effect of grazing exclusion over time on structure, biodiversity, and regeneration of high nature value farmland ecosystems in Europe. *Science of the Total Environment*, 2018, 610/611: 926-936.
- [7] Wang J L, Li W, Cao W X, Atio Abalori T, Liu Y Z, Xin Y Q, Wang S L, Zhang D G. Soil bacterial community responses to short-term grazing exclusion in a degraded alpine shrubland-grassland ecotone. *Ecological Indicators*, 2021, 130: 108043.
- [8] 樊丹丹, 刘艳娇, 曹慧丽, 陈昊, 孔维栋, 李香真. 围栏工程对退化草地土壤理化性质和微生物群落的影响. *科技导报*, 2022, 40(3): 41-51.
- [9] Laliberté E, Wells J A, DeClerck F, Metcalfe D J, Catterall C P, Queiroz C, Aubin I, Bonser S P, Ding Y, Fraterrigo J M, McNamara S, Morgan J W, Merlos D S, Vesk P A, Mayfield M M. Land-use intensification reduces functional redundancy and response diversity in plant communities. *Ecology Letters*, 2010, 13(1): 76-86.
- [10] Liu X, Ma Z W, Huang X T, Li L H. How does grazing exclusion influence plant productivity and community structure in alpine grasslands of the Qinghai-Tibetan Plateau? *Global Ecology and Conservation*, 2020, 23: e01066.
- [11] Zhang C, Liu G B, Song Z L, Wang J, Guo L. Interactions of soil bacteria and fungi with plants during long-term grazing exclusion in semiarid grasslands. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 124: 47-58.
- [12] Wang S Z, Fan J W, Li Y Z, Huang L. Effects of grazing exclusion on biomass growth and species diversity among various grassland types of the Tibetan Plateau. *Sustainability*, 2019, 11(6): 1705.
- [13] 罗冬, 王明玖, 郑少龙, 李元恒. 围封对荒漠草原土壤微生物数量及其酶活性的影响. *生态环境学报*, 2016, 25(5): 760-767.
- [14] 朱瑞芬, 唐凤兰, 刘杰淋, 刘凤歧. 围栏对东北羊草草地土壤微生物数量的影响. *黑龙江农业科学*, 2012(8): 118-121.
- [15] 吴昊, 杨婷婷, 高永, 姚国征, 党晓宏, 张格. 放牧对小针茅荒漠草原土壤微生物分布的影响. *干旱区资源与环境*, 2016, 30(11): 180-185.
- [16] Wang Z, Zhang Q, Staley C, Gao H L, Ishii S, Wei X R, Liu J, Cheng J M, Hao M D, Sadowsky M J. Impact of long-term grazing exclusion on soil microbial community composition and nutrient availability. *Biology and Fertility of Soils*, 2019, 55(2): 121-134.

- [17] de Araujo Pereira A P, Lima L A L, Bezerra W M, Pereira M L, Normando L R O, Mendes L W, de Oliveira J G B, Aratjo A S F, Melo V M M. Grazing exclusion regulates bacterial community in highly degraded semiarid soils from the Brazilian Caatinga biome. *Land Degradation & Development*, 2021, 32(6): 2210-2225.
- [18] Wang Z, Li X L, Ji B M, Struik P C, Jin K, Tang S M. Coupling between the responses of plants, soil, and microorganisms following grazing exclusion in an overgrazed grassland. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 640789.
- [19] Fan D D, Kong W D, Wang F, Yue L Y, Li X Z. Fencing decreases microbial diversity but increases abundance in grassland soils on the Tibetan Plateau. *Land Degradation & Development*, 2020, 31(17): 2577-2590.
- [20] Yin Y L, Wang Y Q, Li S X, Liu Y, Zhao W, Ma Y S, Bao G S. Soil microbial character response to plant community variation after grazing prohibition for 10 years in a Qinghai-Tibetan alpine meadow. *Plant and Soil*, 2021, 458(1): 175-189.
- [21] Yao M J, Rui J P, Li J B, Wang J M, Cao W D, Li X Z. Soil bacterial community shifts driven by restoration time and steppe types in the degraded steppe of Inner Mongolia. *CATENA*, 2018, 165: 228-236.
- [22] Li M, Zhang X Z, Wu J S, Ding Q N, Niu B, He Y T. Declining human activity intensity on alpine grasslands of the Tibetan Plateau. *Journal of Environmental Management*, 2021, 296: 113198.
- [23] Jiang H M, Chen Y C, Hu Y, Wang Z W, Lu X Y. Soil bacterial communities and diversity in alpine grasslands on the Tibetan Plateau based on 16S rRNA gene sequencing. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2021, 9: 630722.
- [24] Chen H, Zhu Q A, Peng C H, Wu N, Wang Y F, Fang X Q, Gao Y H, Zhu D, Yang G, Tian J Q, Kang X M, Piao S L, Ouyang H, Xiang W H, Luo Z B, Jiang H, Song X Z, Zhang Y, Yu G R, Zhao X Q, Gong P, Yao T D, Wu J H. The impacts of climate change and human activities on biogeochemical cycles on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Global Change Biology*, 2013, 19(10): 2940-2955.
- [25] Zhou H, Zhang D G, Jiang Z H, Sun P, Xiao H L, Wu Y X, Chen J G. Changes in the soil microbial communities of alpine steppe at Qinghai-Tibetan Plateau under different degradation levels. *Science of the Total Environment*, 2019, 651: 2281-2291.
- [26] Wang L, Gan Y T, Wiesmeier M, Zhao G Q, Zhang R Y, Han G D, Siddique K H M, Hou F J. Grazing exclusion—an effective approach for naturally restoring degraded grasslands in Northern China. *Land Degradation & Development*, 2018, 29(12): 4439-4456.
- [27] Nielsen U N, Osler G H R, Campbell C D, Burslem D F R P, van der Wal R. The influence of vegetation type, soil properties and precipitation on the composition of soil mite and microbial communities at the landscape scale. *Journal of Biogeography*, 2010, 37(7): 1317-1328.
- [28] Wu J S, Song M H, Ma W L, Zhang X Z, Shen Z X, Tarolli P, Wurst S, Shi P, Ratzmann G, Feng Y F, Li M, Wang X T, Tietjen B. Plant and soil's $\delta^{15}\text{N}$ are regulated by climate, soil nutrients, and species diversity in alpine grasslands on the northern Tibetan Plateau. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 2019, 281: 111-123.
- [29] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman F D, Costello E K, Fierer N, Peña A G, Goodrich J K, Gordon J I, Huttley G A, Kelley S T, Knights D, Koenig J E, Ley R E, Lozupone C A, McDonald D, Muegge B D, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky J R, Turnbaugh P J, Walters W A, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [30] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [31] 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.
- [32] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [33] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner F O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D590-D596.
- [34] Dixon P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science*, 2003, 14(6): 927-930.
- [35] Qin Y Y, Zhang X F, Adamowski J F, Biswas A, Holden N M, Hu Z Y. Grassland grazing management altered soil properties and microbial β -diversity but not α -diversity on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Applied Soil Ecology*, 2021, 167: 104032.
- [36] Qi X G, Wang C, He T J, Ding F, Zhang X F, An L Z, Xu S J. Bacterial community changes and their responses to nitrogen addition among different alpine grassland types at the eastern edge of Qinghai-Tibetan Plateau. *Archives of Microbiology*, 2021, 203(10): 5963-5974.
- [37] Zhang H R, Fu G. Responses of plant, soil bacterial and fungal communities to grazing vary with pasture seasons and grassland types, northern Tibet. *Land Degradation & Development*, 2021, 32(4): 1821-1832.
- [38] Han G D, Hao X Y, Zhao M L, Wang M J, Ellert B H, Willms W, Wang M J. Effect of grazing intensity on carbon and nitrogen in soil and vegetation in a meadow steppe in Inner Mongolia. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2008, 125(1/2/3/4): 21-32.
- [39] Du Y G, Ke X, Dai L C, Cao G M, Zhou H K, Guo X W. Moderate grazing increased alpine meadow soils bacterial abundance and diversity index on the Tibetan Plateau. *Ecology and Evolution*, 2020, 10(16): 8681-8687.
- [40] Wang F F, Li Z M, Fu B J, Lü Y H, Liu G P, Wang D B, Wu X. Short-term grazing exclusion alters soil bacterial co-occurrence patterns rather

- than community diversity or composition in temperate grasslands. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 824192.
- [41] Yang F, Niu K C, Collins C G, Yan X B, Ji Y G, Ling N, Zhou X H, Du G Z, Guo H, Hu S J. Grazing practices affect the soil microbial community composition in a Tibetan alpine meadow. *Land Degradation & Development*, 2019, 30(1): 49-59.
- [42] Vázquez-Dean J, Maza F, Morel I, Pulgar R, González M. Microbial communities from arid environments on a global scale. A systematic review. *Biological Research*, 2020, 53(1): 29.
- [43] Schindlbacher A, Rodler A, Kuffner M, Kitzler B, Sessitsch A, Zechmeister-Boltenstern S. Experimental warming effects on the microbial community of a temperate mountain forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(7): 1417-1425.
- [44] Zhao Z N, Wei X R, Wang X, Ma T E, Huang L Q, Gao H L, Fan J, Li X Z, Jia X X. Concentration and mineralization of organic carbon in forest soils along a climatic gradient. *Forest Ecology and Management*, 2019, 432: 246-255.
- [45] Guo X, Feng J J, Shi Z, Zhou X S, Yuan M T, Tao X Y, Hale L, Yuan T, Wang J J, Qin Y J, Zhou A F, Fu Y, Wu L Y, He Z L, Van Nostrand J D, Ning D L, Liu X D, Luo Y Q, Tiedje J M, Yang Y F, Zhou J Z. Climate warming leads to divergent succession of grassland microbial communities. *Nature Climate Change*, 2018, 8(9): 813-818.
- [46] Manzoni S, Schaeffer S M, Katul G, Porporato A, Schimel J P. A theoretical analysis of microbial eco-physiological and diffusion limitations to carbon cycling in drying soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 73: 69-83.
- [47] Hu Y L, Ganjurjav H, Hu G Z, Wang X X, Wan Z Q, Gao Q Z. Seasonal patterns of soil microbial community response to warming and increased precipitation in a semiarid steppe. *Applied Soil Ecology*, 2023, 182: 104712.
- [48] Goldfarb K C, Karaoz U, Hanson C A, Santee C A, Bradford M A, Treseder K K, Wallenstein M D, Brodie E L. Differential growth responses of soil bacterial taxa to carbon substrates of varying chemical recalcitrance. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2: 94.
- [49] Yu C Q, Han F S, Fu G. Effects of 7 years experimental warming on soil bacterial and fungal community structure in the Northern Tibet alpine meadow at three elevations. *Science of the Total Environment*, 2019, 655: 814-822.
- [50] Fierer N, Jackson R B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(3): 626-631.
- [51] Zhang C, Li J, Wang J, Liu G B, Wang G L, Guo L, Peng S Z. Decreased temporary turnover of bacterial communities along soil depth gradient during a 35-year grazing exclusion period in a semiarid grassland. *Geoderma*, 2019, 351: 49-58.
- [52] Leff J W, Jones S E, Prober S M, Barberún A, Borer E T, Firn J L, Harpole W S, Hobbie S E, Hofmockel K S, Knops J M H, McCulley R L, La Pierre K, Risch A C, Seabloom E W, Schütz M, Steenbock C, Stevens C J, Fierer N. Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(35): 10967-10972.
- [53] Xun W B, Yan R R, Ren Y, Jin D Y, Xiong W, Zhang G S, Cui Z L, Xin X P, Zhang R F. Grazing-induced microbiome alterations drive soil organic carbon turnover and productivity in meadow steppe. *Microbiome*, 2018, 6(1): 170.
- [54] Sait M, Davis K E R, Janssen P H. Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the Phylum Acidobacteria occurring in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3): 1852-1857.