

耕作措施对陇中麦豆轮作系统土壤真菌群落的影响

沈吉成, 李玲玲*, 谢军红, 彭正凯, Eunice Essel, 邓超超, 王进斌, 颀健辉

(甘肃省干旱生境作物学重点实验室 / 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 为探究耕作措施对陇中旱农区麦豆轮作系统土壤真菌多样性的影响, 依托 2001 年布设在陇中旱农区的田间定位试验, 应用高通量测序技术比较传统耕作 (T) 与 3 种保护性耕作 [免耕 (NT)、传统耕作 + 秸秆还田 (TS) 和免耕 + 秸秆覆盖 (NTS)] 对麦豆轮作体系真菌群落结构的影响。结果表明: 1) 子囊菌门 (52.74%)、担子菌门 (14.10%) 为陇中旱农区麦豆轮作系统土壤真菌的主要优势种群, 免耕秸秆覆盖处理下担子菌门丰度较传统耕作增加 15.01%, 免耕处理子囊菌门、担子菌门丰度较传统耕作分别提高 3.67%、1.86%。2) 保护性耕作措施能不同程度提高 0 ~ 30 cm 土层土壤真菌丰富度与多样性指数, 其中以免耕秸秆覆盖效果最明显, 但各处理间差异不显著; 较传统耕作, 0 ~ 30 cm 土层土壤真菌特有 OTU 数量 NT>NTS>TS>T, 同时较传统耕作, 免耕秸秆覆盖处理土壤真菌 OTU 数量提高 8.07%, 免耕处理提高 12.41%。因此, 在陇中旱农区推广以免耕秸秆覆盖为主的保护性耕作措施有利于提高土壤真菌群落丰富度和多样性。

关键词: 土壤真菌群落; 耕作措施; 秸秆还田

土壤微生物在土壤生态系统中起着关键作用, 80% ~ 90% 的土壤相关功能都被微生物所调节, 包括土壤养分转化, 系统的稳定性及抗干扰能力等^[1]。其中真菌构成了土壤的大部分微生物生物量, 其具有分解有机质、为植物提供养分的功能, 是生态系统健康的指示物^[2]。近年来对不同耕作措施下土壤微生物生物量及微生物群落结构多样性的研究越来越受到人们的重视。研究表明, 保护性耕作有利于提高土壤微生物活性和数量, 少免耕结合作物秸秆覆盖, 可以提高土壤表层微生物量及种群多样性^[3], 与传统耕作相比, 免耕可以改善真菌群落结构组成与多样性^[4]。陇中旱农区由于传统耕作方式以翻耕为主, 导致该地区水土流失严重, 土壤结构破坏, 肥力低下, 而保护性耕作措施具有改善土壤结构, 提高土壤质量的作用, 尤其以免耕秸秆覆盖作用最显著^[5]。然而, 关于长期不同耕作措施对陇中旱农区土壤性状的影响, 以往研究主要集中在土壤肥力^[5]、有机碳^[6]、团聚体^[7]等方面, 但

对土壤真菌群落构成和多样性的影响缺乏研究。因此, 为了理解土壤真菌对耕作措施与秸秆覆盖的响应, 全面认识耕作措施对黄绵土土壤中真菌群落构成、物种丰度、物种多样性的影响, 本研究应用高通量测序方法探究不同耕作措施下土壤真菌群落组成与结构的差异, 以期为保护性耕作的推广应用提供理论和技术依据。

1 研究地区与方法

1.1 试区概况

本研究于 2018 年在位于甘肃省定西市李家堡镇的甘肃农业大学旱作农业综合实验站进行, 所依托田间定位试验始于 2001 年。该区属中温带半干旱偏旱区, 太阳辐射量为 $592.9 \text{ kJ} \cdot \text{cm}^{-2}$, 多年平均日照时数 2 477 h; 年均气温 6.4°C , $\geq 0^\circ\text{C}$ 积温为 $2\,934^\circ\text{C}$, $\geq 10^\circ\text{C}$ 积温为 $2\,239^\circ\text{C}$, 年均无霜期 140 d; 多年平均降水量 391 mm, 年蒸发量 1 531 mm, 为典型的一年一熟雨养农业区。试区土壤为典型黄绵土, 土层深厚, 土质较绵软, 质地较均匀, 贮水性能良好。

1.2 试验设计

试验采用春小麦和豌豆双序列轮作方式 (豌豆 - 小麦、小麦 - 豌豆)。各序列分别设 4 个处理 (表 1), 3 次重复, 小区面积 80 m^2 ($4 \text{ m} \times 20 \text{ m}$), 随机区组排列。

收稿日期: 2019-01-08; 录用日期: 2019-03-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31460337, 31660373 和 31761143004); 甘肃省教育厅项目 (2017C-12); 十二五国家科技支撑计划项目 (2012BAD14B03 和 2015BAD22B04-3)。

作者简介: 沈吉成 (1989-), 男, 甘肃兰州人, 硕士研究生, 主要研究旱地与绿洲农作制。E-mail: 1911561480@qq.com。

通讯作者: 李玲玲, E-mail: lill@gsau.edu.cn。

表 1 试验处理及代码描述

代码	处理	具体操作
T	传统耕作不覆盖	前茬作物收获后至土壤冻结前, 试验地进行三耕两耨。
NTS	秸秆覆盖 + 免耕	整个试验期采取完全免耕, 免耕播种机一次性完成施肥和播种, 收获脱粒后的全部作物秸秆覆盖在原小区。
NT	免耕不覆盖	试验整个阶段都免耕, 但不覆盖, 播种时用免耕播种机一次性完成施肥和播种。
TS	传统耕作 + 秸秆翻入	耕作方式同 T (三耕两耨), 但随第 1 次耕作将所有前茬作物秸秆翻入土壤。

春小麦播量 $187.5 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$; 豌豆播量 $100 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。小麦行距 20 cm, 豌豆行距 24 cm, 播深均为 7 cm。春小麦播期为每年 3 月中旬, 7 月下旬至 8 月上旬期间收获; 豌豆于 4 月上旬播种, 7 月中下旬收获。小麦各处理均施氮 $105 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, P_2O_5 $105 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$; 豌豆各处理均施氮 $20 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, P_2O_5 $105 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, 播种时作基肥混施。试验春小麦品种为“定西 40 号”, 豌豆品种为“绿农 2 号”。

1.3 样品采集与分析

土壤样品采集于 2018 年 6 月豌豆田非根际土, 对角线五点法采集每个小区 0 ~ 10、10 ~ 30 cm 土样, 分层混匀后除去根系等杂物, 各小区各层次土样 (共 24 个土样) 在田间立刻存入干冰箱, 带回实验室 -80°C 保存, 用于分析土壤真菌群落结构。

土壤微生物 DNA 提取采用美国 (MOBIO Power Soil DNA Isolation Kit) 强力土壤 DNA 提取试剂盒。按照试剂盒说明书进行。用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳对土壤 DNA 的完整性进行检测。

真菌引物 ITS3F (5' -GCATCGATGAAGAAGCAGC-3') 和 ITS4 (5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增 ITS2 片段。PCR 反应程序为: 95°C 5 min; 95°C 30 s, 53°C 30 s, 72°C 1 min 共 35 个循环; 72°C 7 min, 4°C 保存。PCR 产物用 1% 琼脂凝胶电泳检测, 所得产物经 PCR 产物纯化试剂盒进行回收、测序。

1.4 数据处理与分析

利用数据库 FLASH、QIIME、UNITE 和 INSDC 分析土壤中真菌物种多样性, 对优质序列在相似性 $\geq 97\%$ 的水平上进行 OTU (Operation taxonomic unit) 聚类。采用 QIIME 和 Mothur 软件^[8-9] 计算真菌群落丰度指数 (Observed species 指数和 Chao 指数) 和多样性指数 (香农指数和辛普森指数), 测序深度用 Good-coverage 指数表示; 应用 R 软件

对 OTU 丰度进行主成分分析 (PCA) 并制图, 利用 SPSS 19 进行方差分析。土壤微生物总 DNA 的提取、测序委托南京集思慧远生物科技有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 耕作措施对门分类水平上土壤真菌群落分布比例的影响

4 种耕作模式下门水平上真菌群落结构 (图 1), 丰度大于 1% 的真菌门类中优势菌群为子囊菌门 (Ascomycota) 约 52.74%, 担子菌门 (Basidiomycota) 约 14.10%。保护性耕作措施 (NTS、NT、TS) 能不同程度增加子囊菌门、担子菌门所占真菌群落百分比。其中 0 ~ 30 cm 土层, 较 T 处理, NTS 处理担子菌门增加 15.01%, NT 处理担子菌门增加 1.86%, 子囊菌门增加 3.67%, TS 处理分别增加 2.42% 和 4.35%, 表明土壤真菌群落变化因不同的耕作方式有明显变化。

2.2 不同耕作模式下土壤真菌群落的丰富度和多样性

Chao 指数和 Observed species 指数可估计群落中实际存在的物种数, 一般而言, Chao 指数或 Observed species 指数越大, 群落的丰富度越高; 香农指数和辛普森指数可反映群落物种多样性, 香农指数和辛普森指数越大, 说明群落多样性越高。不同耕作措施对 0 ~ 30 cm 土层土壤真菌群落丰富度与多样性的影响如表 2 所示, 样本测序深度指数值均在 99% 以上, 由表 2 可知各处理间差异不显著 ($P>0.05$)。其中 0 ~ 10 cm 土层 NT 处理土壤真菌丰富度指数 (Chao 指数、Observed species 指数) 最高, 10 ~ 30 cm 土层 NTS 处理丰富度指数最高。秸秆还田处理 (NTS、TS) 下土壤真菌多样性指数 (香农指数、辛普森指数) 大于单纯的免耕和传统耕作。

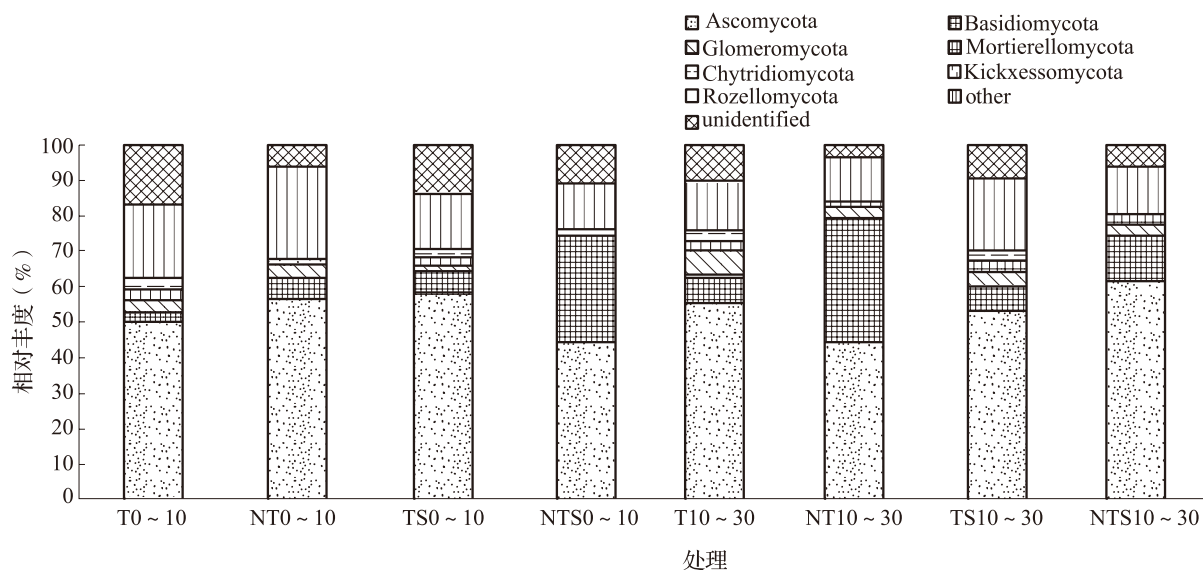


表 2 不同耕作措施下 0 ~ 30 cm 土层土壤真菌丰度指数和多样性指数

土层厚度 (cm)	处理	覆盖度	Chao 指数	Observed species 指数	香农指数	辛普森指数
0 ~ 10	T	0.999 4	432.04 a	415.67 a	6.34 a	0.970 3 a
	NT	0.998 7	496.40 a	442.33 a	5.91 a	0.955 4 a
	TS	0.999 0	456.31 a	421.67 a	6.08 a	0.945 7 a
	NTS	0.998 6	432.17 a	389.33 a	4.72 a	0.854 1 a
10 ~ 30	T	0.998 8	424.51 a	397.00 a	5.94 a	0.955 7 a
	NT	0.998 1	493.35 a	447.33 a	4.94 a	0.742 7 a
	TS	0.998 6	463.04 a	424.00 a	6.10 a	0.963 8 a
	NTS	0.998 0	512.56 a	458.33 a	5.99 a	0.956 0 a

注：不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著 ($P<0.05$)。

2.3 不同耕作措施对土壤真菌 OTU 丰度的影响

采用基于真菌群落在不同土层丰度的主成分分析方法，研究不同耕作模式下 0 ~ 30 cm 土壤真菌群落丰度的具体差异。如图 2A 所示 0 ~ 10 cm 土层 PC1 贡献率为 13.81%，PC2 的贡献率为 10.67%，较 T 处理，NTS 处理真菌群落分布于 PC1 的负值区域和 PC2 的正负值区域，其分布较集中，NT 次之，且 NTS、NT 处理下真菌群落距离近；10 ~ 30 cm 土层 PC1 贡献率为 12.46%，PC2 的贡献率为 10.89%（图 2B），较 T 处理 NT、NTS 处理真菌群落均分布于 PC1 正值区域，NT>NTS，且 NTS、NT 处理下真菌群落距离近。因此保护性耕作对提高真菌群落丰度作用显著，其中以免耕秸秆覆盖效果最佳。

2.4 不同耕作措施对土壤真菌 OTU 群落聚类的影响

如表 3 所示，不同耕作措施对 0 ~ 30 cm 土层土壤真菌 OTU 数量变化作用明显。其中 0 ~ 10 cm 土层 NT 处理真菌 OTU 数量最多（442），10 ~ 30 cm 土层 NTS 处理最多（459）。结合 OTU 韦恩图（图 3）可知，0 ~ 10 cm 土层共同包含 OTU 数量为 2 527，其中 NT 处理 OTU 数量最多为 793 个，特有 OTU 为 106；10 ~ 30 cm 土层共同包含 OTU 数为 2 589，其中 NTS 处理 OTU 最多为 796 个，特有 OTU 为 123。0 ~ 30 cm 土层较 T 处理，NTS 处理 OTU 数量提高 8.07%，NT 处理提高 12.41%。各处理真菌特有 OTU 数量 NT（115）>NTS（104）>TS（101）>T（85），表明免耕、免耕秸秆覆盖有利于增加土壤 0 ~ 30 cm 真菌类群。

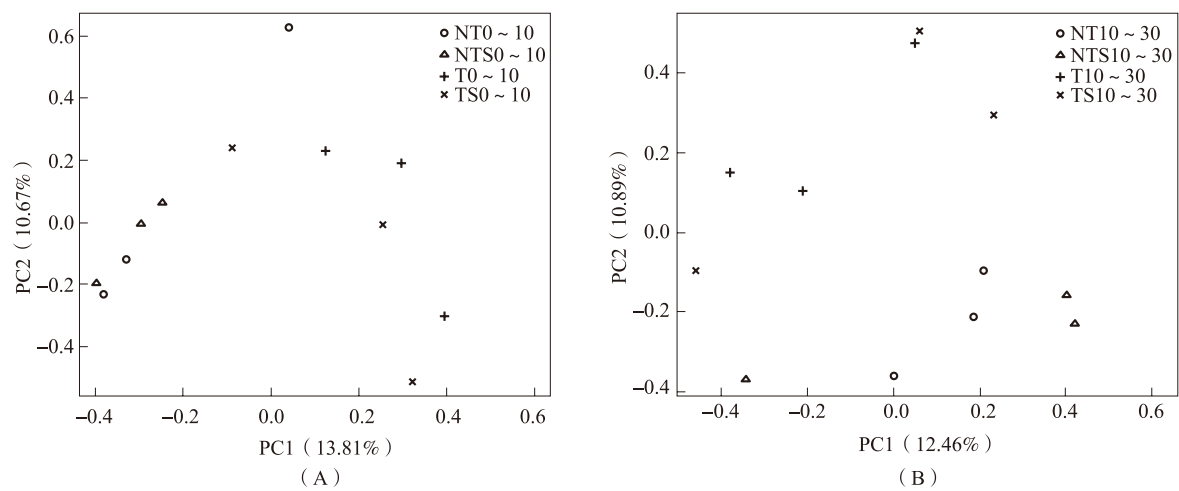


图2 不同耕作措施下0~30 cm 土层土壤真菌 OTU 主成分分析

表3 不同耕作措施下土壤样本获得的真菌 OTU 序列读数

处理	土层厚度 (cm)	
	0 ~ 10	10 ~ 30
T	416	397
NT	442	448
TS	422	425
NTS	389	459

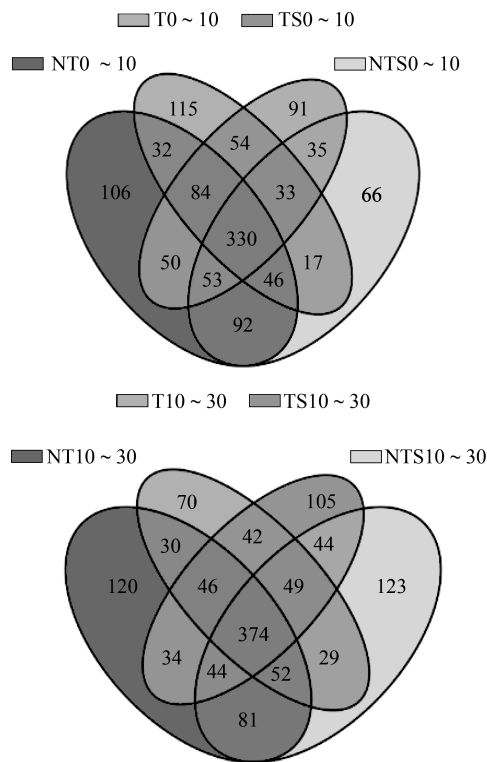


图3 不同耕作措施下0~30 cm 土层土壤真菌 OTU 韦恩图

3 讨论与结论

从 OTU 聚类韦恩图中看出, 0 ~ 30 cm 土层较 T 处理, NTS 处理 OTU 数量提高 8.07%, NT 提高 12.41%。真菌特有 OTU 数量 NT (115) > NTS (104) > TS (101) > T (85)。相对于传统耕作, 保护性耕作措施不仅提高 0 ~ 30 cm 土壤真菌群落的丰度, 且特有真菌类群也相对较高, 尤以免耕秸秆覆盖提高土壤真菌群落的丰度和类群最突出; 同时子囊菌门、担子菌门为陇中旱农区麦豆轮作系统土壤真菌的主要优势种群, 其中免耕秸秆覆盖处理下担子菌门丰度较传统耕作增加 15.01%, 免耕处理子囊菌门、担子菌门丰度较传统耕作分别提高 3.67%、1.86%。这与程存刚等^[10]观点基本一致。其原因是免耕秸秆覆盖改善土壤结构, 改变土壤微生物栖息地, 为微生物的生长活动提供必要的能源和营养物质, 提高土壤中微生物的活性^[11], 从而加快土壤中微生物的自身物质合成, 并利用外源养分进行新陈代谢。同时秸秆还田改善土壤物理性状, 有利于土壤有机碳、土壤微生物生物量碳的累积^[12], 有利于提高土壤微生物丰度及活性。

多样性指数是评价土壤微生物群落丰富度和多样性的重要指标, 高的多样性指数表明高的微生物群落丰富度和多样性^[13]。本研究结果表明, 秸秆还田处理 (NTS、TS) 下土壤真菌丰富度和多样性指数 (Observed species 指数、Chao 指数、香农指数、辛普森指数) 均大于单纯的免耕和传统耕作, 但各处理间差异不显著 ($P>0.05$)。这与 Souza 等^[14]的

研究结果不一致,这可能与耕作年限有关。由于免耕年限较短,对不同类型的微生物群落影响不同,不同微生物群落间,丰度增降相互抵消^[15],而在生长季节秸秆还田的影响被作物生长效应对微生物群落的影响所掩盖^[16],同时随着秸秆还田量的增加,短期免耕影响被秸秆还田所掩盖^[17],而短期的免耕增加了土壤扰动,增加土壤的通气性^[18],导致秸秆覆盖效应被掩盖。此外 Xiang 等^[19]和董炜灵等^[20]指出不同时空尺度下气候因子和土壤理化因子也会对土壤真菌群落多样性结构产生重要影响,保护性耕作措施对土壤真菌群落丰富度与多样性的影响需进一步深入研究。因此在陇中旱农区保护性耕作措施有利于提高土壤真菌群落结构。其中以免耕秸秆覆盖对提高土壤真菌群落丰富度与多样性作用最明显。

参考文献:

- [1] Lozano Y M, Hortal S, Armas C. Interactions among soil, plants, and microorganisms drive secondary succession in a dry environment [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2014, 78: 298–306.
- [2] 张晶, 张慧文, 李新宇, 等. 土壤真菌多样性及分子生态学研究进展 [J]. *应用生态学报*, 2004, 15 (10): 1958–1962.
- [3] 樊晓刚, 金轲, 李兆君, 等. 不同施肥和耕作制度下土壤微生物多样性研究进展 [J]. *植物营养与肥料学报*, 2010, 16 (3): 744–751.
- [4] 董立国, 袁汉民, 李生宝, 等. 玉米免耕秸秆覆盖对土壤微生物群落功能多样性的影响 [J]. *生态环境学报*, 2010, 19 (2): 444–446.
- [5] 罗珠珠, 黄高宝, 张仁陟, 等. 长期保护性耕作对黄土高原旱地土壤肥力质量的影响 [J]. *中国生态农业学报*, 2010, 18 (3): 458–464.
- [6] 王琳, 李玲玲, 高立峰, 等. 长期保护性耕作对黄绵土总有机碳和易氧化有机碳动态的影响 [J]. *中国生态农业学报*, 2013, 21 (9): 1057–1063.
- [7] 武均, 蔡立群, 罗珠珠, 等. 保护性耕作对陇中黄土高原雨养农田土壤物理性状的影响 [J]. *水土保持学报*, 2014, 28 (2): 112–117.
- [8] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nature Methods*, 2010, 7 (5): 335–341. DOI: 10.1038/nmeth.f303.
- [9] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (23): 7537–7541.
- [10] 程存刚, 赵德英, 吕德国, 等. 植物源有机物料对果园土壤微生物群落多样性的影响 [J]. *植物营养与肥料学报*, 2014, 20 (4): 913–922.
- [11] 郑有飞, 石春红, 吴芳芳, 等. 土壤微生物活性影响因子的研究进展 [J]. *土壤通报*, 2009, 40 (5): 1209–1214.
- [12] Debosz K, Rasmussen P H, Pedersen A R. Corrigendum to “Temporal variations in microbial biomass C and cellulolytic enzyme activity in arable soils: Effects of organic matter input” [J]. *Applied Soil Ecology*, 2000, 14 (1): 81–82.
- [13] 李玉洁, 李刚, 宋晓龙, 等. 休牧对贝加尔针茅草原土壤微生物群落功能多样性的影响 [J]. *草业学报*, 2013, 22 (6): 21–30.
- [14] Souza R C, Hungria M, Cantão M E, et al. Metagenomic analysis reveals microbial functional redundancies and specificities in a soil under different tillage and crop-management regimes [J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 86: 106–112.
- [15] Adl S M, Coleman D C, Read F. Slow recovery of soil biodiversity in sandy loam soils of Georgia after 25 years of no tillage management [J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2006, 114 (2–4): 323–334.
- [16] Ceja-Navarro J A, Rivera-Orduna F N, Patino-Zuniga L, et al. Phylogenetic and multivariate analyses to determine the effects of different tillage and residue management practices on soil bacterial communities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (11): 3685–3691.
- [17] 郭梨锦, 曹凑贵, 张枝盛, 等. 耕作方式和秸秆还田对稻田表层土壤微生物群落的短期影响 [J]. *农业环境科学学报*, 2013, 32 (8): 1577–1584.
- [18] Azooz R H, Arshad M A, Franzluebbers A J. Pore size distribution and hydraulic conductivity affected by tillage in Northwestern Canada [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1996, 60 (4): 1197–1201.
- [19] Xiang D, Veresoglou S D, Rillig M C, et al. Relative importance of individual climatic drivers shaping arbuscular mycorrhizal fungal communities [J]. *Microbial Ecology*, 2016, 72 (2): 418–427.
- [20] 董炜灵, 尹华群, 刘学端, 等. 土壤性质对真菌温度敏感性的影响 [J]. *中国土壤与肥料*, 2018, (2): 127–134.

Effects of tillage on wheat-pea rotation system soil fungal community in the dryland farming area of central Gansu

SHEN Ji-cheng, LI Ling-ling*, XIE Jun-hong, PENG Zheng-kai, Eunice Essel, DENG Chao-chao, WANG Jin-bin, XIE Jian-hui (Gansu Provincial Laboratory of Arid land Crop Sciences/Agronomy College, Gansu Agricultural University, Lanzhou Gansu 730070)

Abstract: The objective of the study was to investigate the effects of tillage on soil fungal diversity in a long-term tillage wheat-pea rotation system. The long-term tillage field experiment was established in central Gansu in 2001. The experiment

[下转第 153 页]