

不同施氮水平对冬油菜根际微生物群落特征的影响

刘东海¹, 张 智¹, 梅亮贤², 乔 艳¹, 刘东伟², 肖卓熙¹, 李 菲¹, 胡 诚^{1*}

(1 湖北省农业科学院植保土肥研究所, 湖北武汉 430064; 2 湖北省黄麦岭化工研究院有限公司, 湖北武汉 430061)

摘要:【目的】探究冬油菜根际微生物群落特征对不同施肥的响应, 确定油菜氮肥适宜用量, 为土壤培肥和调控土壤生态功能提供理论依据【方法】田间试验在油菜种植区(武穴)开展, 在秸秆还田条件下设置 5 个处理: 不施氮肥 (SN0)、N 120 kg/hm² (SN120)、N 180 kg/hm² (SN180)、N 240 kg/hm² (SN240) 和 N 300 kg/hm² (SN300), 采用 16S rRNA 和 ITS 高通量测序方法, 分析根际土壤细菌和真菌群落结构及其功能变化, 同时测定土壤理化性质和作物产量。【结果】1) 与不施氮处理 (SN0) 相比, 施氮处理降低了根际土壤有效磷含量 (24.63%~35.10%) 和速效钾含量 (39.67%~59.77%), 提高了全氮 (6.18%~14.60%) 和碱解氮含量 (7.18%~34.99%)。SN180 处理提升土壤全氮和碱解氮含量的幅度最小, SN300 处理提升幅度最大。随着氮肥的增加, 有机碳含量呈增长趋势, pH 呈下降趋势, 油菜产量先增加后减少, SN180 产量最高。2) 随着施氮量的递增, 细菌的 Chao1 指数呈递增趋势; 与 SN0 处理相比, SN180 处理提高了真菌 Shannon 指数 7.20%。施氮肥改变了细菌和真菌群落结构。与 SN0 处理相比, SN180 处理提高了子囊菌门、担子菌门和拟杆菌门相对丰度, 降低了被孢霉门和酸杆菌门相对丰度, 减缓了鞘氨醇单胞菌和芽孢杆菌属的减少趋势, 富集了红假单胞菌属 (*Rhodopseudomonas*) 和线黑粉酵母属 (*Filobasidium*)。与 SN0 处理相比, 施氮处理均降低了化学异养、固氮、芳香化合物降解和几丁质分解功能菌群的丰度, 同时降低 undefined saprotroph 丰度。3) 环境因子与群落关联网分析和 RDA 分析显示, 土壤有机碳 (SOC)、碱解氮 (AN)、全氮 (TN) 和有效磷 (AP) 含量是影响真菌群落的主要环境因子, SOC 和 AP 含量是细菌群落的主要影响因子。无色穗孢属 (*Achroiostrictus*) 与 SOC 含量呈负相关, 与 AN 呈正相关。*Emericella* 与 AN 和 TN 含量呈显著负相关, 与 pH 呈显著正相关。SOC 与类诺卡氏属 (*Nocardioides*) 显著正相关, 与厌氧粘细菌属 (*Anaeromyxobacter*) 显著负相关。【结论】从产量、群落多样性及富集有益微生物角度综合分析, 冬油菜施用 N 180 kg/hm² 是较合理的氮肥用量。

关键词: 氮肥; 冬油菜; 微生物群落结构; 功能预测

Effects of different levels of nitrogen application on the characteristics of rhizosphere microbial communities of winter rape

LIU Dong-hai¹, ZHANG Zhi¹, MEI Liang-xian², QIAO Yan¹, LIU Dong-wei², XIAO Zhuo-xi¹, LI Fei¹, HU Cheng^{1*}

(1 Institute of Plant Protection and Soil Fertilizer, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan, Hubei 430064;

2 Huangmailing Chemical Research Institute Co., Ltd Hubei, Wuhan, Hubei 430061)

Abstract: 【Objectives】To investigate the response of inter-root microbial communities of winter oilseed rape to different fertilizers, and to determine the appropriate amount of nitrogen fertilizer for oilseed rape, in order to provide a theoretical basis for soil fertilization and regulation of soil ecological functions. 【Methods】The field experiment was carried out in the oilseed rape planting area (Wuxue), and five treatments were set up under straw-returning conditions, namely, no nitrogen fertilizer (SN0), nitrogen fertilizer N 120 kg/hm² (SN120), nitrogen fertilizer N 180 kg/hm² (SN180), nitrogen fertilizer N 240 kg/hm² (SN240) and nitrogen fertilizer N 300 kg/hm² (SN300). The community structure and functional changes of bacteria and fungi in rhizosphere soil were analyzed using 16S rRNA and ITS high-throughput sequencing methods, while soil physicochemical properties and yield were determined. 【Results】1) Compared with SN0, nitrogen fertilizer application reduced available phosphorus

收稿日期: 2024-03-17 接受日期: 2024-09-10

基金项目: 国家农业科技项目 (20221805); 湖北省重点研发计划项目 (2022BCA061)。

联系方式: 刘东海 E-mail: 396520042@qq.com; * 通信作者 胡诚 E-mail: huchenghxz@163.com

(24.63%–35.10%) and available potassium (39.67%–59.77%), and increased total nitrogen (6.18%–14.60%) and alkali-hydrolyzed nitrogen (7.18%–34.99%) in rhizosphere soil. SN180 increased soil total nitrogen and alkali-hydrolyzed nitrogen to the smallest extent, while SN300 increased the most. With the increase of nitrogen fertilizer, organic carbon showed an increasing trend, pH showed a decreasing trend, and yield increased first and then decreased, with SN180 having the highest yield. 2) With the increase of nitrogen application, Chao1 index of bacteria showed an increasing trend. Compared with SN0, SN180 increased the Shannon index of fungi by 7.20%. Application of nitrogen fertilizer changed the community structure of bacteria and fungi. Compared with SN0, SN180 increased the relative abundance of Ascomycetes, Basidiomycetes and Bacteroidetes, decreased the relative abundance of Mortierellomycota and Acidobacteria, and slowed down the decreasing trend of *Sphingomonas* and *Bacillus*. *Rhodopseudomonas* and *Filobasidium* were enriched. Compared with SN0, nitrogen fertilizer application reduced the abundance of chemical heterotrophic, nitrogen fixation, aromatic compound degradation and chitin decomposition functional bacterial groups, and also reduced the abundance of undefined saprotroph. 3) The analysis of environmental factors and community association network and RDA analysis showed that soil organic C (SOC), alkali-hydrolyzed N (AN), total N (TN) and available P (AP) were the main environmental factors affecting the fungal community, and SOC and AP were the main environmental factors affecting the bacterial community. *Achroistachys* was negatively correlated with SOC and positively correlated with AN. *Emericelosis* was significantly negatively correlated with AN and TN, and significantly positively correlated with pH. SOC was significantly positively correlated with *Nocardioides* and negatively correlated with *Anaeromyxobacteria*. 【Conclusions】 From the perspective of yield, community diversity and enrichment of beneficial microorganisms, applying nitrogen fertilizer of N 180 kg/hm² is a reasonable amount for winter rapeseed.

Key words: nitrogen fertilizer; winter rape; microbial community structure; functional prediction

油菜对氮素需求量大^[1], 合理施用氮肥我国冬油菜可平均增产 42.5%^[2], 但实际生产中依然存在施肥不足、过量或偏施的现象^[3]; 氮肥过量施用降低了肥料利用率^[4]、油菜产量和籽粒品质^[5]。肥料被认为是导致土壤微生物群落改变的主要驱动因子。有报道指出, 细菌和真菌多样性均随氮肥施用量增加呈降低趋势^[6], 且施氮量越高多样性的降低幅度越大^[7]。张叶^[8]的油菜盆栽试验结果则显示, 不同施氮量对油菜根际真菌多样性和土壤细菌群落结构影响不显著。Peng 等^[9]指出, 施肥不仅显著影响油菜产量形成和养分供给, 而且会导致根际微生物的优势种群和相对丰度发生变化, 从而影响有机物矿化进程和养分供给水平。甘国淦等^[10]指出, 长期不同养分缺乏会显著改变冬油菜根际细菌和真菌群落的组成结构及其多样性。目前, 关于施氮对微生物群落的具体影响尚未形成共识, 因此在油菜主产区(武穴)深入探究氮肥施用如何改变油菜根部周围土壤微生物群落的特征, 具有重要科学意义。在植物根际微生态环境中, 微生物显著影响着“土壤-植物”系统中矿质元素的生物有效性及植物生长环境的健康状况^[11], 同时根际微生物多样性差异反映了植物的健康和受胁迫

程度^[12]。Feng 等^[13]分析了中国 10 个长期(大于 20 年)定位施肥试验, 指出土壤中存在少量微生物类群对施肥的响应一致。这些物种或可作为指示生物来监测施肥对土壤肥力的影响。但是目前研究没有明确哪些物种可以作为土壤肥力的指示物种。因此, 不同施氮肥条件下, 油菜根际土壤中是否也存在关键物种可以作为指示土壤肥力的一个参考指标, 从而指导施肥, 有必要深入研究。

因此, 本研究基于田间肥料定位试验来探明秸秆还田前提下, 冬油菜根际细菌和真菌群落特征和功能对氮肥的响应, 为冬油菜根际生态过程中的养分调控、土壤培肥和可持续发展提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地点位于湖北省武穴市(北纬 29°54'17", 东经 115°30'19"), 该地区属亚热带季风气候, 年平均气温 16.8℃, 年平均降水量 1409 mm, 年平均日照 1900 h。土壤类型为黄棕壤, 属于世界粮农组织(World Food and Agriculture Organization, FAO)分类

中的漂白淋溶土 (albic luvisol)。种植前 0—20 cm 深度土壤基本性状为: 土壤有机质 30.8 g/kg, pH 5.5, 碱解氮 177.0 mg/kg, 有效磷 24.9 mg/kg, 速效钾 104.7 mg/kg。

1.2 试验设计

冬油菜—水稻轮作为该地区主要的种植制度, 一年两熟。该地区灌溉排水条件良好。油菜试验从 2019 年开始, 每年 9 月上旬左右育苗, 10 月中下旬进行移栽, 栽种密度为 11.43 万株/hm², 次年 5 月收获, 秸秆全量还田。试验共 5 个处理, 分别为: 不施氮肥 (SN0)、N 120 kg/hm² (SN120)、N 180 kg/hm² (SN180)、N 240 kg/hm² (SN240) 和 N 300 kg/hm² (SN300)。各处理重复 3 次, 小区面积 20 m², 随机区组排列。冬油菜氮肥 50% 作为基肥, 20% 在越冬期施用, 30% 在抽苔期施用。磷、钾肥一次性基施, 用量分别为 P₂O₅ 90 kg/hm²、K₂O 120 kg/hm²。肥料种类分别为尿素 (N 46%)、过磷酸钙 (P₂O₅ 12%)、氯化钾 (K₂O 60%)。统一其他田间管理。5 月 20 日, 油菜实际测产。

1.3 样品采样与测定

1.3.1 土壤样品采集及指标测定 2019 年 10 月移栽油菜, 共进行了 4 年试验, 于 2023 年 4 月冬油菜盛花期采集土壤样品, 各小区选取长势均匀的 5 株油菜连根拔起, 抖掉附着的松散土, 用刀片采集根际土壤, 作混合样。标记后装入无菌密封袋, 放入有冰袋的冰盒带回实验室。一部分样品风干磨细过 0.25 mm 筛, 保存。测定土壤全氮、碱解氮、有效磷、速效钾、pH 和有机碳; 以上测定方法均参考《土壤农化分析》^[14]。另一部分放入 -80℃ 冰箱保存, 用于土壤微生物测序。

1.3.2 土壤微生物多样性分析 由上海美吉生物医药科技有限公司完成根系样品总 DNA 提取、PCR 扩增和序列测定。细菌 16S rDNA V3~V4 区扩增采用前引物序列 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和后引物序列 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3'), 真菌 ITS 扩增采用前引物序列 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和后引物序列 ITS2R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')。目标条带胶回收纯化后进行文库构建, 利用 IlluminaMiSeqPE250 平台进行高通量测序。

1.4 数据处理

测序原始数据去除引物接头序列和各低质量碱基后进行拼接, 舍弃长度短于 160 bp 的序列, 去除

非特异性扩增序列及嵌合体后, 得到每个样本的有效序列数据。以 97% 为规定阈值, 对 16S 和 ITS 序列划分可操作分类单元 (OTU)。采用 QIIME, 调用 UCLUST 序列对比工具按 97% 的序列相似度进行归并, 并选取每个 OTU 度最高的序列作为该 OTU 的代表序列。针对细菌 16S rRNA 和真菌 ITS rRNA 分别采用 Greengenes 数据库和 Silva 数据库作为 OTU 分类地位鉴定的模板序列。

1.5 统计分析

试验数据采用 Excel 2019、IBM SPSS Statistics 20 统计软件进行单因素方差分析, 平均数据以“平均数±标准差 (SD)”表示, 采用 LSD 法检验 0.05 水平上的差异显著性。利用 OriginPro 2019b 进行计算和作图。微生物群落组成和多样性以及环境因子和细菌或真菌群落的关联网络分析, 利用上海美吉生物医药科技有限公司的 I-sanger 云数据分析平台进行在线数据分析。

2 结果与分析

2.1 冬油菜根际土壤理化特征及产量

根际土壤理化性质分析结果 (表 1) 显示, 与 SN0 处理相比, 随着施氮量的增加, pH 呈下降趋势。与 SN0 处理相比, SN120、SN180、SN240 和 SN300 处理根际土壤有效磷含量分别显著降低了 25.27%、35.10%、28.73% 和 24.63%, SN120、SN180、SN240 和 SN300 处理速效钾含量分别显著降低了 39.67%、59.77%、53.47% 和 56.12%, 全氮含量提高了 6.18%~14.60% 和碱解氮含量提高了 7.18%~34.99%。SN300 处理碱解氮含量显著提高了 34.99% 和全氮含量显著提高了 14.61%。施氮肥降低了土壤碳氮比, 但对有机碳的影响不显著。与 SN0 处理相比, 随着施氮量的增加, 产量先增加后减少, SN180 处理产量显著提高了 448.57%, 达到 2217.17 kg/hm²。

2.2 冬油菜根际微生物多样性

与 SN0 处理比较, 施氮处理的根际细菌 Chao1 指数和 Shannon 指数虽没有显著变化, 但细菌 Chao1 指数呈现降低趋势, 其中 SN120 处理的 Chao1 指数最小, 降低了 8.79%; 各施肥处理间, 随着施氮量的增加, 细菌 Chao1 指数呈递增趋势。与 SN0 处理相比, 施氮处理根际土壤真菌 Chao1 指数和 Shannon 指数虽无显著变化, 但真菌 Chao1 指数呈现降低趋势, SN300 处理的真菌 Chao1 指数和 Shannon 指数较小, SN180 处理真菌 Shannon 指数最高, 较

表 1 不同施氮水平根际土壤理化性质及冬油菜产量

Table 1 Rhizosphere soil physicochemical properties and yield of of winter rape under different nitrogen levels								
处理 Treatment	pH	有机碳 Organic C (g/kg)	全氮 Total N (g/kg)	C : N	碱解氮 Alkali-hydrolyzed N (mg/kg)	有效磷 Available P (mg/kg)	速效钾 Available K (mg/kg)	产量 Yield (kg/hm ²)
SN0	6.07±0.08 a	17.92±2.02 a	1.78±0.15 b	10.05±0.35 a	136.08±12.51 b	32.34±5.08 a	223.02±39.50 a	404.17±141.26c
SN120	6.07±0.05 a	17.09±1.91 a	1.92±0.04 b	8.89±0.87 b	151.11±14.81 b	24.07±3.97 b	134.54±56.76 b	1731.33±105.88 b
SN180	6.03±0.10 a	17.21±1.19 a	1.89±0.14 ab	9.09±0.49 ab	145.85±15.20 b	20.99±1.49 b	89.71±10.17 b	2217.17±76.07 a
SN240	5.95±0.11 a	17.49±0.85 a	1.92±0.13 ab	9.16±0.72 ab	160.76±27.66 ab	23.05±2.15 b	103.78±18.75 b	1679.17±121.20 b
SN300	5.95±0.27 a	18.82±0.70 a	2.04±0.02 a	9.22±0.36 ab	183.69±8.28 a	24.37±0.43 b	97.86±21.10 b	1608±80.13 b

注: 表中数据为平均值±标准差。同列数据后不同小写字母表示不同施氮肥水平下理化指标之间差异显著性 ($P<0.05$)。
Note: Data in the table are shown as mean± SD. Values followed by different lowercase letters in a column mean significant difference among the physiochemical properties under different nitrogrn levels ($P<0.05$).

SN0 处理提高 7.20% (表 2)。

2.3 冬油菜根际微生物群落组成

由图 1 可知, 不同施氮肥水平下, 真菌的优势菌群主要是子囊菌门 (Ascomycota)、担子菌门 (Basidiomycota) 和被孢霉门 (Mortierellomycota), 三者占总体菌群相对丰度的 84%~92%。与 SN0 处理相比, SN180 处理提高了子囊菌门相对丰度 10.45%, 显著降低了被孢霉门相对丰度 76.92%; SN300 处理显著降低了子囊菌门相对丰度 30.0%, 显著提高了担子菌门相对丰度 210.0%。

细菌的优势菌群是变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteriota)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、酸杆菌门 (Acidobacteriota)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和拟杆菌门 (Bacteroidota), 占总体菌群相对丰度的 82%~86%, 其中酸杆菌门作为油菜根际土壤中的优势菌门, 占到了总菌门的 16%~20%。与 SN0 相比, 施氮没有显著改变细菌群落组成, 但 SN120 处

理显著提高了酸杆菌门的相对丰度 53.85%, SN240 和 SN300 处理则分别提高了其相对丰度 23.08% 和 23.08%, SN180 处理则降低了其相对丰度 7.69%。与 SN0 处理相比, SN180 处理的优势菌群相对丰度基本相同, 提高了拟杆菌门的相对丰度 (图 1)。

由图 2 可知, 细菌属水平方面, 与 SN0 处理比较, SN120、SN180、SN240 和 SN300 处理分别降低了鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 相对丰度 75.01%、45.91%、67.48% 和 66.29%, 分别降低了芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 相对丰度 36.20%、10.77%、56.07% 和 45.86%; SN180 处理减缓了鞘氨醇单胞菌属和芽孢杆菌属的降低趋势。施氮肥提高了节杆菌属 (*Arthrobacter*) 相对丰度, 其中 SN180 和 SN300 处理分别提高了 122.35% 和 82.08%; SN180、SN240 和 SN300 处理分别降低了 *Candidatus_Solibacter* 相对丰度 28.53%、15.00% 和 12.81%。SN120、SN240 和 SN300 处理分别提高了慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 相对

表 2 不同施氮肥水平下根际细菌和真菌 Alpha 多样性

Table 2 Alpha diversity of rhizosphere bacteria and fungi under different nitrogen levels				
处理 Treatment	细菌 Bacteria		真菌 Fungi	
	Chao1 指数	香农指数	Chao1 指数	香农指数
	Chao1 index	Shannon index	Chao1 index	Shannon index
SN0	4007.25±349.81 a	6.72±0.277 a	659.45±67.72 a	4.03±0.51 a
SN120	3654.87±426.38 a	6.73±0.292 a	648.35±57.68 a	4.08±0.33 a
SN180	3919.01±288.57 a	6.67±0.377 a	625.02±57.41 a	4.32±0.28 a
SN240	3968.81±230.24 a	6.86±0.128 a	579.44±75.29 a	3.27±0.75 a
SN300	3983.59±94.55 a	6.78±0.141 a	530.63±130.21 a	3.32±1.07 a

注: 表中数据为平均值±标准差。同列数据后不同小写字母表示不同施氮肥水平下植株之间差异显著 ($P<0.05$)。
Note: DData in the table are shown as mean± SD. Values followed by different lowercase letters in a column mean significant difference among the root systems under different nitrogrn levels ($P<0.05$).

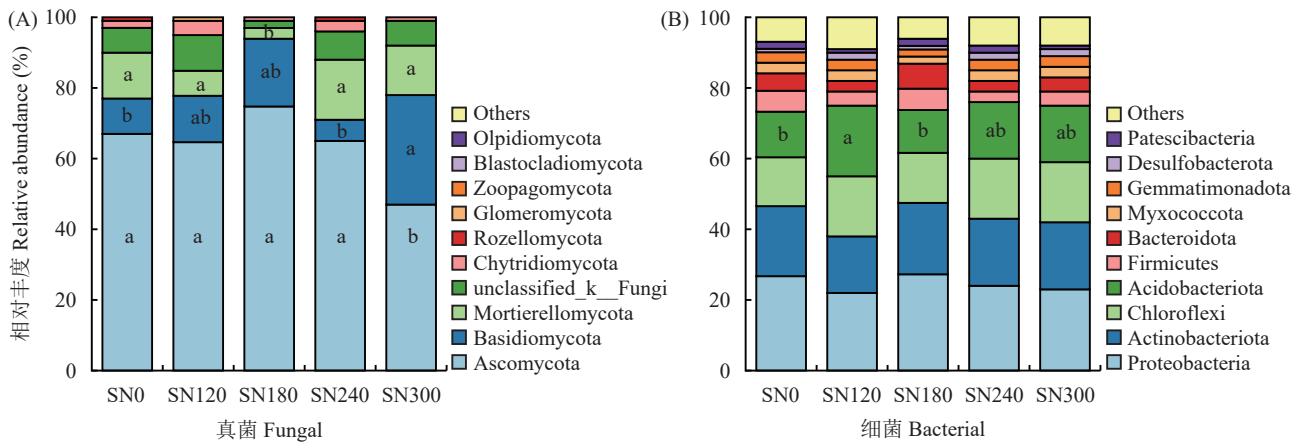


图 1 不同施氮肥水平下油菜根际真菌群落和细菌群落特征 (门水平)

Fig. 1 Characteristics of rhizosphere bacterial and fungal communities in rape under different nitrogen levels (phylum level)

注：图中标注不同小写字母的物种表示存在显著差异，未标注字母的物种差异不显著。

Note: The species marked with different lowercase letters in the figure indicate significant difference, and the species without letters indicate no significant difference.

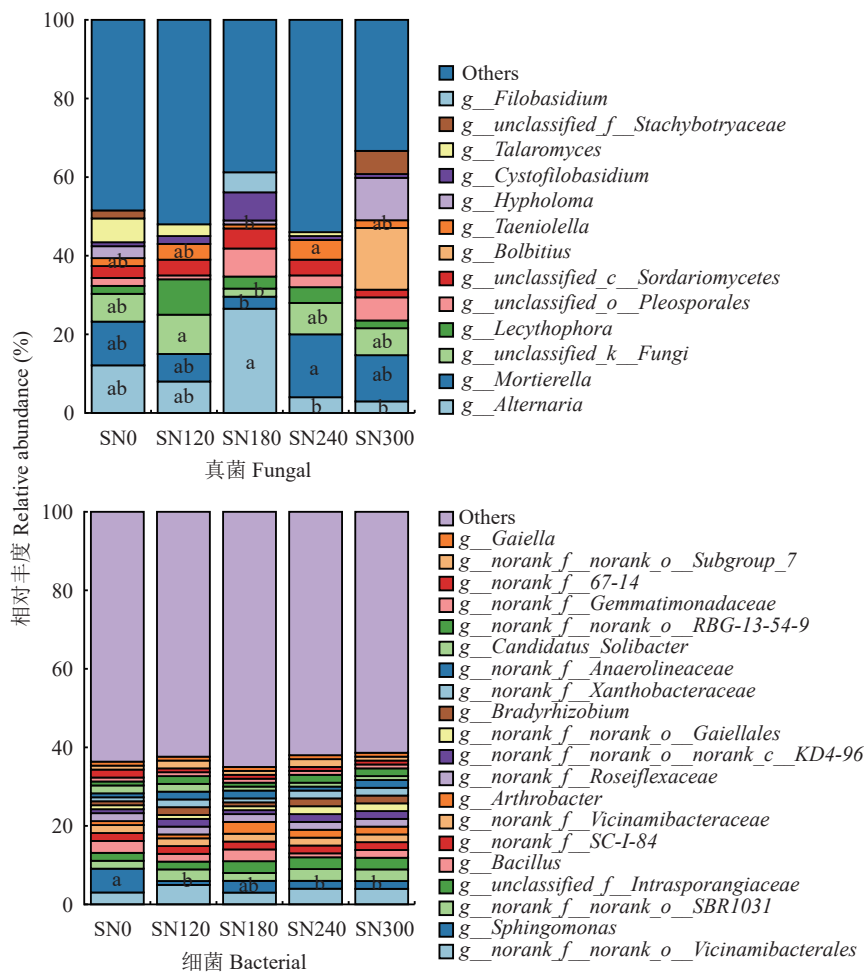


图 2 不同施氮水平下油菜根际真菌和细菌群落特征 (属水平)

Fig. 2 Characteristics of rhizosphere fungal and bacterial communities in rape under different nitrogen levels (genus level)

注：图中标注不同小写字母的物种表示存在显著差异，未标注字母的物种差异不显著。

Note: The species marked with different lowercase letters in the figure indicate significant difference, and the species without letters indicate no significant difference.

丰度 26.43%、23.29% 和 41.38%, 但是 SN180 降低了 7.0%。

真菌属水平方面(图 2), 与 SN0 处理相比, SN180 处理显著提高了链格孢属 (*Alternaria*) 相对丰度 116.67%, 其他施氮处理提高不显著。SN180 中线黑粉酵母属 (*Filobasidium*) 丰度最高 (5.02%)。SN0 处理中篮状菌属 (*Talaromyces*) 相对丰度最高 (6.05%), SN300 处理中 *Bolbitius* 相对丰度最高 (16.14%)。

2.4 冬油菜根际微生物群落结构差异

由图 3 可知, 细菌方面, SN240 处理富集蓝菌门中的 Oxyphotobacteria_Incertae_Sedis 目及其未知的科属。SN180 富集变形菌门中的红假单胞菌属 (*Rhodopseudomonas*)。SN0 富集蓝菌门中蓝细菌目 (Cyanobacteriales), 念珠藻科 (Nostocaceae) 和 Nostoc_PCC-7524。真菌方面, SN0 富集担子菌门的一些未知菌类, SN240 富集弯孢霉属 (*Curvularia*)。SN300 富集球腔菌属 (*Phaeosphaeria*) 和韧伞属 (*Hypholoma*)。SN180 富集 Hypocreales_fam_Incertae_sedis 科、枝孢属 (*Cladosporium*)、煤炱目 (Capnodiales) 和枝孢菌科 (Cladosporiaceae)。

2.5 细菌和真菌功能预测

本研究借助 FUN Guild 在线数据平台 (<https://github.com/UMNFuN/FUNGuild>) 展开真菌功能预测分析(图 4A)。主要营养型为腐生菌, 其次为病原菌和共生菌。与 SN0 处理相比, SN180 处理显著提高了 Animal pathogen-endophyte-plant pathogen-wood saprotroph 菌群相对丰度 124.47%, 其他施氮处理则降低了 34.33%~75.56%; SN240 处理显著提高了 Plant Pathogen 菌群相对丰度 80.55%, 其他施氮处理

变化不显著。SN120、SN180、SN240 和 SN300 分别降低了 Undefined Saprotroph 相对丰度 43.17%、30.37%、29.67% 和 7.34%, 随着施氮肥用量的增加, Undefined Saprotroph 丰度呈现增加趋势。与 SN0 比较, SN180 处理显著降低了 Fungal parasite 相对丰度 76.18%, SN300 处理显著提高了 Fungal parasite 相对丰度 96.37%。与 SN0 比较, SN120、SN180 和 SN240 分别提高了 Endophyte 相对丰度 368.28%、66.54% 和 90.18%, SN300 降低了 Endophyte 相对丰度 12.59%。

根据 16S 序列的分类注释结果, 采用 FAPROTAX 工具对细菌群落功能注释后展开分析(图 4B)。相对丰度较高的功能分组前 8 位分别为化能异养 (chemoheterotrophy 和 aerobic chemoheterotrophy)、固氮 (nitrogen_fixation)、人体致病菌 (human_pathogens_all 和 human_pathogens_pneumonia)、动物寄生菌 (animal_parasites_or_symbionts)、尿素分解 (ureolysis)、芳香化合物降解 (aromatic_compound_degradation)、几丁质分解 (chitinolysis) 和光合营养 (phototrophy) 功能类细菌, 分别占总细菌群落的 61.80% (32.28% 和 29.52%)、3.80%、7.60% (4.00% 和 3.60%)、4.07%、2.07%、1.80%、1.74% 和 1.21%。与 SN0 处理相比, 施氮降低了化学异养、固氮、芳香化合物降解和几丁质分解功能菌群的丰度; 提高了人体致病菌 (human_pathogens_all 和 human_pathogens_pneumonia) 和动物寄生菌 (animal_parasites_or_symbionts) 丰度。SN180 处理提高了硝酸呼吸作用 (nitrate respiration)、氮呼吸作用 (nitrogen respiration)、硝酸还原作用 (nitrate-reduction) 和尿素分解 (ureolysis), 降低了固氮作用 (nitrogen_fixation)。

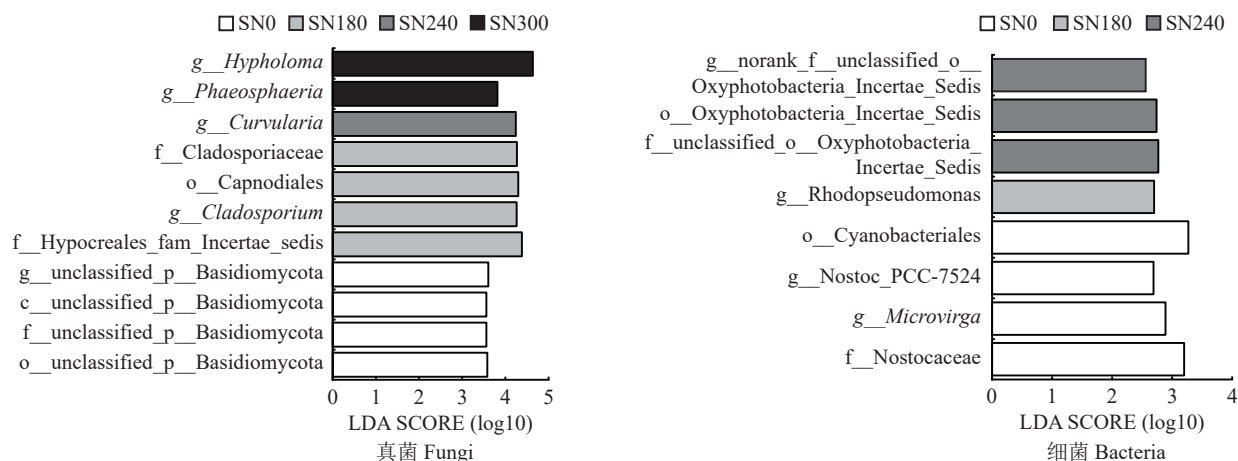


图 3 Lefse 多级物种差异判别分析

Fig. 3 Lefse multilevel discriminant analysis of species differences

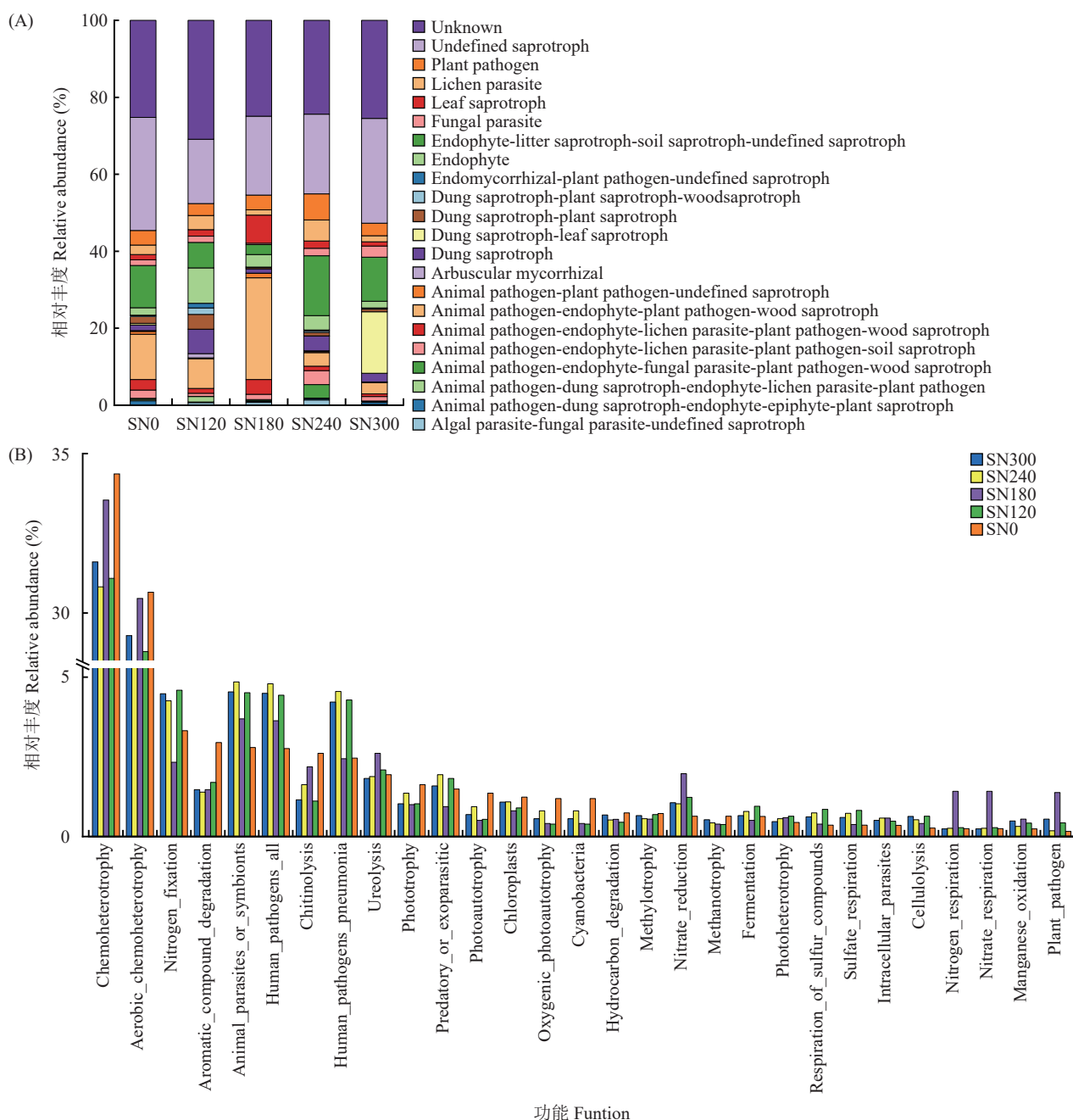


图4 真菌 (A) 和细菌 (B) 功能预测
Fig. 4 Fungal (A) and bacterial (B) functional groups inferred

2.6 环境因子与土壤真菌和细菌优势菌属的关联网络分析

环境因子与土壤真菌、细菌优势菌属之间进行关联网络分析 ($P < 0.02$, $|R^2| > 0.5$), 结果 (图 5) 显示, 环境因子与真菌群落关联网络的平均度 (2.89)、网络直径 (6)、图密度 (0.11) 和平均路径长 (2.33) 均大于环境因子与细菌群落关联网络。环境因子与真菌群落关联网络分析 (图 5A) 得出, 土壤有机碳 (SOC)、碱解氮 (AN)、全氮 (TN)、有效磷 (AP)、pH、C : N 和速效钾 (AK) 的平均度分别是 11、11、8、

4、2、2 和 1。SOC 含量与 *Bolbitius*、*Hypholoma*、*Curvularia*、*Schizothecium* 和 *Panaeolus* 丰度呈显著正相关, 与 *Pseudeurotium*、*Westerdykella*、*Achroioestachys* 以及 3 个未分类真菌呈显著负相关。AN、TN 含量均与 *Schizothecium* 和 *Panaeolus* 相对丰度呈显著正相关, 均与 *Minutisphaera*、*Pseudeurotium*、*Emericellopsis* 和 *Achroioestachys* 等呈显著负相关; AN 含量还与 *Westerdykella*、*Entrophospora* 以及未分类的真菌菌属呈显著负相关。AP 含量与 *Chaetomium* 和 *Zopfiella* 呈显著正相关。pH 与 *Alternaria*、*Emericellopsis* 呈

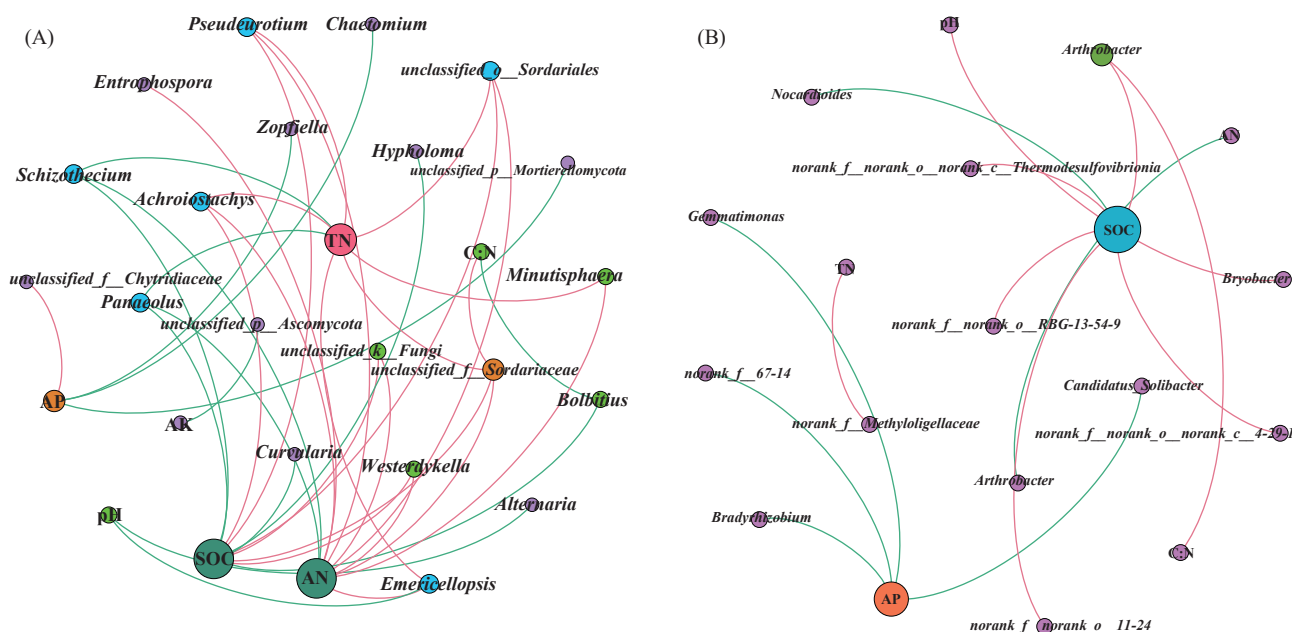


图 5 真菌 (A) 和细菌 (B) 与环境因子关联网络分析

Fig. 5 Network analysis of fungal (A) and bacterial (B) correlation with environmental factors

注: 图中绿色和红色分别代表正和负相互作用。SOC—土壤有机碳; AP—有效磷; AN—碱解氮; AK—速效钾; TN—全氮。

Note: The green and red colors represent positive and negative interactions, respectively. SOC—Soil organic C; AP—Available P; AN—Alkali-hydrolyzable N; AK—Available K; TN—Total N.

显著正相关。C : N 与 *Bolbitius* 呈显著正相关。

环境因子与细菌群落关联网络分析 (图 5B) 得出, SOC、AP、AN、TN、AK 含量和 C : N 的平均度分别是 6、4、1、1、1 和 1。SOC 与 *Nocardioides* 显著正相关, 与 *Anaeromyxobacter* 以及 4 个不确定的细菌属显著负相关。AP 含量与 *Bradyrhizobium*、*Gemmatimonas* 等 4 个属呈显著正相关。pH 与 *Bryobacter* 呈显著负相关。C : N 与 *Anaeromyxobacter*

呈显著负相关。

2.7 土壤真菌和细菌群落的 RDA 分析

环境因子与真菌和细菌群落的冗余分析结果见图 6。真菌 RDA 分析结果 (图 6A) 显示, 第一轴和第二轴解释度合计 45.49%, SOC、AN、TN 和 AP 是影响真菌群落的主要环境因子。细菌 RDA 分析结果 (图 6B) 显示, SOC 和 AP 是影响细菌群落的主要环境因子。

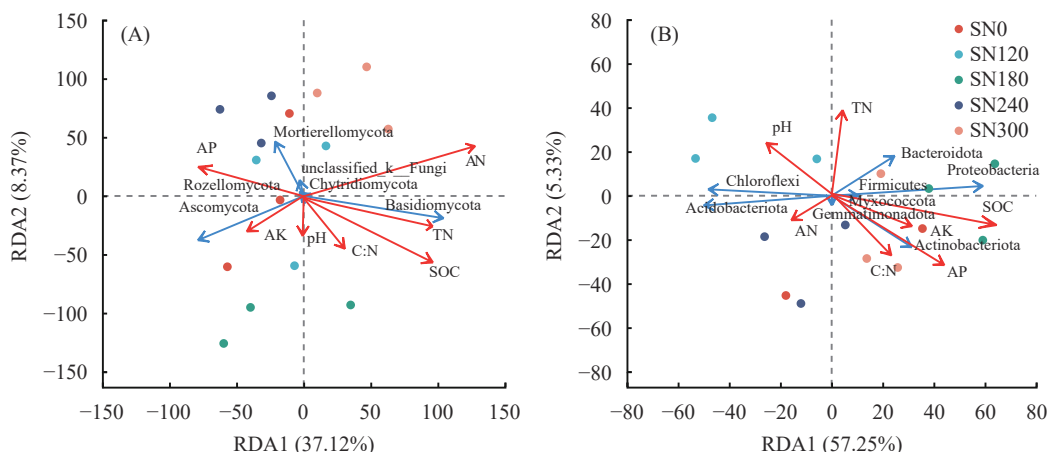


图 6 真菌 (A) 和细菌 (B) 门水平 RDA 分析

Fig. 6 RDA analysis of fungi (A) and bacteria (B) at the phylum level

注: SOC—土壤有机碳; AP—有效磷; AN—碱解氮; AK—速效钾; TN—全氮。

Note: SOC—Soil organic C; AP—Available P; AN—Alkali-hydrolyzable N; AK—Available K; TN—Total N.

3 讨论

3.1 土壤理化特征和产量对施氮肥的响应

与 SN0 比较, 施氮肥未显著降低 pH, 随着氮肥用量的增加, pH 呈现下降趋势, 与唐贤等^[15]研究的结论一致。与 SN0 比较, 随着施氮量的增加, 产量先增加后减少, SN180 产量显著提高了 448.57%, 产量最高, 作物从土壤中吸收的磷钾元素大于其他施氮处理, 因此, 与其他施氮处理比较, SN180 处理的土壤中有有效磷和速效钾含量最低。从产量角度而言, SN180 是适宜的氮肥用量。

3.2 根际微生物对施氮肥的响应

Chao1 和 Shannon 指数越大, 说明样品的物种丰富度和多样性越高。Yang 等^[16]指出, 施氮降低了不同生态系统土壤细菌多样性 (-11%) 和真菌多样性 (-17%)。靳玉婷等^[17]也指出, 秸秆还田配施化肥油菜季土壤细菌的 Chao1 指数和 Shannon 多样性指数有所降低。本研究中, 与 SN0 处理比较, 施氮肥均减少了细菌 Chao1 指数, 差异不显著, 随着氮肥用量的增加, 细菌的 Chao1 指数成递增趋势。Zhou 等^[18]指出, 长期施用氮肥和磷肥降低了真菌多样性, 且随着化肥用量的增加, 对真菌群落的影响加大。本研究中, 与 SN0 处理比较, SN180 提高了真菌 Shannon 指数 7.20%, 其他氮肥处理真菌 Shannon 指数呈下降趋势, 说明合理的氮肥用量能够维持真菌多样性。

Wang 等^[19]指出, 施用无机肥降低了子囊菌门丰度。过量氮肥对子囊菌门是有害的^[20]。本研究 SN180 提高了子囊菌门相对丰度 10.45%, SN120、SN240 和 SN300 处理降低了子囊菌门相对丰度。子囊菌门大多数为腐生菌, 可以分解难降解性有机质, 促进土壤碳的吸收利用^[21]。酸杆菌门作为油菜根际土壤中的细菌优势菌门, 占总体菌群相对丰度的 16%~20%; Kielak 等^[22]和 Han 等^[23]研究发现, 土壤酸杆菌能够进行复杂的碳降解, 可能有助于秸秆的降解。本研究中, SN120、SN240 和 SN300 处理显著提高了酸杆菌门的相对丰度, SN180 处理降低了酸杆菌门的相对丰度。Dai 等^[24]通过对全球数据的荟萃分析指出, 长期施氮肥并不一定增加酸杆菌门的相对丰度, 与施用的养分投入有关。许多鞘氨醇单胞菌具有固氮、溶解磷酸盐、产生植物生长激素等功能, 能够促进植物生长和提高植物抗逆性^[25-26]; 芽孢杆菌属也能促进植物生长^[27]。在各施氮处理中, SN180 处理减缓了根际土壤鞘氨醇单胞菌和芽孢杆菌丰度的降

低。施肥均提高了真菌的链格孢属丰度, 链格孢属是引起植物病害的重要真菌类群之一^[28], 可能会增加患植物病害的风险。SN180 处理根际土壤富集线黑粉酵母属 (*Filobasidium*); Keszthelyi 等^[29]发现 *Filobasidium* 能够分泌一种针对致病真菌 *Cryptococcus neoformans* 的毒素, 可作为生物防治剂。SN180 处理富集变形菌门中的红假单胞菌属, 其属于非共生固氮菌^[30], 可提高土壤固氮潜力和固氮菌抗逆性^[31]。因此, SN180 处理可能存在致病菌和拮抗菌的某种平衡, 还需深入研究。慢生根瘤菌属是兼性固氮菌^[32], 来自土壤和非豆科植物的菌株缺乏共生固氮需要的 *nif* 和 *nod* 基因^[33], 因此施肥促进了慢生根瘤菌属的营养生长, 而不是固氮^[34]。SN120、SN240 和 SN300 处理分别提高了土壤慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 相对丰度, 但是 SN180 处理降低其相对丰度。这可能有两个原因: 1) 与氮肥投入量有关; 2) 氮肥的适宜用量促进油菜生长和提高产量, 加大了油菜对土壤养分的吸收, 导致土壤有效磷含量较低, 本研究中慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 与有效磷 (AP) 存在显著正相关。

3.3 环境因子与群落关联网络分析

环境因子与群落关联网络分析和 RDA 分析均显示, SOC、AN、TN 和 AP 是真菌群落的主要影响因素, SOC 和 AP 是细菌群落的主要影响因素。无色穗孢属 (*Achroistachys*) 与 SOC 负相关, 与 AN 正相关。无色穗孢属均为土壤致病真菌, 对作物生长具有不利影响, 并降低作物产量^[35]。*Emericellopsis* 与 AN 和 TN 显著负相关, 与 pH 显著正相关。*Emericellopsis* 属的很多物种被认为是生物活性代谢物的重要来源, 例如 *Emericellopsis cladophorae* 能够产生一系列抗真菌衍生化合物等^[36]。说明过量施氮肥可能促进有害菌的生长, 提高土壤有机碳能够抑制有害菌的生长。

厌氧粘细菌缺乏反硝化作用中的 *nirS* 和 *nirK* 基因, 只能还原 NO_3^- -N 生成 NH_4^+ -N 或者还原 N_2O 生成 N_2 来获得生长所需的能量, 因此可能不利于土壤中氮素的固存^[37]。类诺卡氏菌属是我国黄土高原地区的优势固碳微生物^[38], 可通过 3-羟基丙酸双循环与还原性三羧酸循环实现大气 CO_2 的固定^[39]; 本研究发现 SOC 与类诺卡氏属 (*Nocardioides*) 显著正相关, 与厌氧粘细菌属 (*Anaeromyxobacter*) 显著负相关。因此, 秸秆还田下合理的氮肥投入对微生物固氮和固碳过程有一定影响。

4 结论

冬油菜施 N 180 kg/hm² 显著提高了油菜籽产量, 减少磷、钾养分在土壤中的富集, 同时提高了真菌 Shannon 指数, 减缓了有益菌(鞘氨醇单胞菌属和芽孢杆菌属)下降趋势, 富集了非共生固氮菌(红假单胞菌属)和线黑粉酵母属(*Filobasidium*)。但是根际土壤中微生物群落复杂, 目前研究方法存在局限性, 关键物种难以作为土壤肥力的一个参考指标。有机碳、碱解氮、全氮和有效磷是真菌群落的主要环境因子, 有机碳和有效磷是细菌群落的主要影响因子。施氮显著影响油菜根际微生物群落特征, 过量施用氮肥导致病害微生物丰度增加, 综上所述, 施 N 180 kg/hm² 是种植油菜比较合理的施氮量。

参 考 文 献:

- [1] Narits L. Effect of nitrogen rate and application time to yield and quality of winter oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera* subvar. *Biennis*)[J]. *Agronomy Research*, 2010, 8(3): 671–686.
- [2] 李慧, 马常宝, 鲁剑巍, 等. 中国不同区域油菜氮磷钾肥增产效果. *中国农业科学*, 2013, 46: 1837–1847.
Li H, Ma C B, Lu J W, *et al.* Increasing effect of N, P and K fertilizer on rapeseed in different regions of China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(9): 1837–1847.
- [3] 李志宏. 基于农户调研的油菜化肥农药施用现状分析[D]. 湖北武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2021.
Li Z H. Analysis of chemical fertilizer and pesticide application status in oilseed rape (*Brassica napus* L.) based on farmers' survey[D]. Wuhan, Hubei: MS Thesis of Hua Zhong Agricultural University, 2021.
- [4] 张芳芳, 胡跃, 刘士山, 等. 施氮量对成都平原直播油菜氮肥利用率和农田氮素表观平衡的影响[J]. *四川农业大学学报*, 2022, 40(4): 558–564.
Zhang F F, Hu Y, Liu S S, *et al.* Effects of nitrogen application rate on nitrogen use efficiency and apparent nitrogen balance of direct seeding rapeseed in Chengdu Plain of Sichuan Province[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2022, 40(4): 558–564.
- [5] 宋毅, 李静, 谷贺贺, 等. 氮肥用量对冬油菜籽粒产量和品质的影响[J]. *作物学报*, 2023, 49(7): 2002–2011.
Song Y, Li J, Gu H H, *et al.* Effects of application of nitrogen on seed yield and quality of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.)[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2023, 49(7): 2002–2011.
- [6] Yang Y, Cheng H, Gao H, An S S. Response and driving factors of soil microbial diversity related to global nitrogen addition[J]. *Land Degradation & Development*, 2020, 31(2): 190–204.
- [7] Zhang M L, Zhang X, Zhang L Y, *et al.* The stronger impact of inorganic nitrogen fertilization on soil bacterial community than organic fertilization in short-term condition[J]. *Geoderma*, 2021, 382: 114752.
- [8] 张叶. 不同施氮水平对土壤微生物及油菜生育后期氮素代谢的影响[D]. 湖南, 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2021.
Zhang Y. Effects of different nitrogen application levels on soil microorganisms and nitrogen metabolism of rapeseeds at late growth stage[D]. Changsha, Hunan: MS Thesis of Hunan Agricultural University, 2021.
- [9] Peng C J, Lai S S, Luo X S, *et al.* Effects of long term rice straw application on the microbial communities of rapeseed rhizosphere in a paddy-upland rotation system[J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 557: 231–239.
- [10] 甘国渝, 陈佛文, 邹家龙, 等. 长期不同养分缺乏对冬油菜土壤微生物群落组成及多样性的影响[J]. *中国土壤与肥料*, 2022, (4): 37–46.
Gan G Y, Chen F W, Zou J L, *et al.* Effects of long-term different nutrient deficiency on the composition and diversity of soil microbial community in winter oilseed rape[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2022, (4): 37–46.
- [11] Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I, *et al.* Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria[J]. *Science*, 2011, 332: 1097–1100.
- [12] 刘杰, 林茂祥, 肖忠, 等. 根腐病对茅苍术根际微生物群落多样性的影响[J]. *中国野生植物资源*, 2022, 41(1): 36–43.
Liu J, Lin M X, Xiao Z, *et al.* Influence of root rot diseases on microbial diversity in rhizosphere soil of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC[J]. *Chinese Wild Plant Resources*, 2022, 41(1): 36–43.
- [13] Feng Y Z, Delgado-Baquerizo M, Zhu Y G, *et al.* Responses of soil bacterial diversity to fertilization are driven by local environmental context across China[J]. *Engineering*, 2022, 12: 164–170.
- [14] 鲍士旦. 土壤农化分析(3版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
Bao S D. Soil and agrochemical analysis (3rd edition)[J]. Beijing China Agriculture Press, 2000.
- [15] 唐贤, 梁丰, 徐明岗, 等. 长期施用化肥对农田土壤pH影响的整合分析[J]. *吉林农业大学学报*, 2020, 42(3): 316–321.
Tang X, Liang F, Xu M G, *et al.* A Meta analysis of effects of long-term application of chemical fertilizer on pH of farmland soil[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2020, 42(3): 316–321.
- [16] Yang Y, Chen X, Liu L, *et al.* Nitrogen fertilization weakens the linkage between soil carbon and microbial diversity: A global meta-analysis[J]. *Global Change Biology*, 2022, 28(21): 6446–6461.
- [17] 靳玉婷, 李先藩, 蔡影, 等. 秸秆还田配施化肥对稻-油轮作土壤酶活性及微生物群落结构的影响[J]. *环境科学*, 2021, 42(8): 3985–3996.
Jin Y T, Li X F, Cai Y, *et al.* Effects of straw returning with chemical fertilizer on soil enzyme activities and microbial community structure in rice-rape rotation[J]. *Environmental Science*, 2021, 42(8): 3985–3996.
- [18] Zhou J, Jiang X, Zhou B, *et al.* Thirty four years of nitrogen fertilization decreases fungal diversity and alters fungal community composition in black soil in northeast China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 95: 135–143.
- [19] Wang Y, Ji H, Hu Y, *et al.* Different selectivity in fungal communities between manure and mineral fertilizers: A study in an alkaline soil after 30 years fertilization[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2613.

- [20] Wang J T, Zheng Y M, Hu H W, *et al.* Soil pH determines the alpha diversity but not beta diversity of soil fungal community along altitude in a typical Tibetan forest ecosystem[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2015, 15(5): 1224–1232.
- [21] Paungfoo-Lonhienne C, Yeoh Y K, Kasinadhuni N R P, *et al.* Nitrogen fertilizer dose alters fungal communities in sugarcane soil and rhizosphere[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8678.
- [22] Kielak A M, Barreto C C, Kowalchuk G A, *et al.* The ecology of Acidobacteria: Moving beyond genes and genomes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 744.
- [23] Han Y L, Ma W, Zhou B Y, *et al.* Effects of straw-return method for the maize-rice rotation system on soil properties and crop yields[J]. *Agronomy*, 2020, 10(4): 461.
- [24] Dai Z M, Su W Q, Chen H H, *et al.* Long-term nitrogen fertilization decreases bacterial diversity and favors the growth of Actinobacteria and Proteobacteria in agro-ecosystems across the globe[J]. *Global Change Biology*, 2018, 24(8): 3452–3461.
- [25] Asaf S, Numan M, Khan A L, *et al.* Sphingomonas: From diversity and genomics to functional role in environmental remediation and plant growth[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020, 40(2): 138–152.
- [26] Kim Y J, Park J Y, Balusamy S R, *et al.* Comprehensive genome analysis on the novel species *Sphingomonas panacis* DCY99T reveals insights into iron tolerance of ginseng[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(6): 2019.
- [27] 葛晓颖, 孙志刚, 李涛, 等. 设施番茄连作障碍与土壤芽孢杆菌和假单胞菌及微生物群落的关系分析[J]. *农业环境科学学报*, 2016, 35(3): 514–523.
- Ge X Y, Sun Z G, Li T, *et al.* Soil *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., and microbial communities under tomato continuous cropping in greenhouse production[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(3): 514–523.
- [28] 高芬, 吴元华. 链格孢属(*Alternaria*)真菌病害的生物防治研究进展[J]. *植物保护*, 2008, 34(3): 1–6.
- Gao F, Wu Y H. Progresses in the biocontrol of plant diseases caused by *Alternaria*[J]. *Plant Protection*, 2008, 34(3): 1–6.
- [29] Keszthelyi A, Hamari Z, Pfeifer I, *et al.* Comparison of killer toxin-producing and non-producing strains of *Filobasidium capsuligenum*-proposal for two varieties[J]. *Microbiological Research*, 2008, 163(3): 267–276.
- [30] Wang C, Zheng M M, Song W F, *et al.* Impact of 25 years of inorganic fertilization on diazotrophic abundance and community structure in an acidic soil in Southern China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 113: 240–249.
- [31] Shi W, Zhao H Y, Chen Y, *et al.* Organic manure rather than phosphorus fertilization primarily determined symbiotic nitrogen fixation rate and the stability of diazotrophic community in an upland red soil[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2021, 319: 107535.
- [32] Rivas R, Martens M, De Lajudie P, Willems A. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32(2): 101–110.
- [33] Zhong C F, Hu G, Hu C, *et al.* Comparative genomics analysis reveals genetic characteristics and nitrogen fixation profile of *Bradyrhizobium*[J]. *iScience*. 27(2), 108948.
- [34] Weyens N, van der Lelie D, Taghavi S, *et al.* Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation [J]. *Trends in Biotechnology*, 2009, 27: (10): 591–598.
- [35] Zhang J L, Liu Q W, Li K, *et al.* Peanut root exudates suppress *Fusarium solani* and modulate the microbial community structure of rhizosphere in grape replant soil[J]. *Horticulturae*, 2022, 8(10): 892.
- [36] Gonçalves M F M, Hilário S, Van de Peer Y, *et al.* Genomic and metabolomic analyses of the marine fungus *Emerizellopsis cladophorae*: Insights into saltwater adaptability mechanisms and its biosynthetic potential[J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(1): 31.
- [37] Onley J R, Ahsan S, Sanford R A, *et al.* Denitrification by *Anaeromyxobacter dehalogenans*, a common soil bacterium lacking the nitrite reductase genes *nirS* and *nirK*[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2018, 84(4): e01985–17.
- [38] 黄倩. 黄土高原土壤固碳微生物及其固定CO₂的机理[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2021.
- Huang Q. The mechanism of CO₂ fixation by soil carbon-fixation microorganisms in the Loess Plateau[D]. Yangling, Shaanxi: MS Thesis of Northwest A&F University, 2021.
- [39] Kuang B, Xiao R, Hu Y, *et al.* Metagenomics reveals biogeochemical processes carried out by sediment microbial communities in a shallow eutrophic freshwater lake[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 13: 1112669.