

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2019.01.010

紫茎泽兰不同入侵区域土壤细菌群落多样性比较研究

柳 旭, 孔令杰, 杨 康, 韩月龙, 张凤娟*
河北大学生命科学学院, 河北 保定 071002

摘要:【目的】紫茎泽兰的入侵将对入侵地生态环境和农业经济造成严重危害,比较紫茎泽兰不同入侵区域土壤细菌多样性,丰富入侵植物的土壤微生物假说,也为紫茎泽兰的防控提供重要的理论依据。【方法】采用磷脂脂肪酸(PLFAs)分析法和16s rDNA高通量测序法,对不同紫茎泽兰重度入侵区域其根际土壤细菌群落进行分析比较,在此基础上使用相关性分析和主成分分析等统计方法,比较土壤细菌群落差异,探究其与土壤环境因子之间的相互关系。【结果】(1)各采样点中紫茎泽兰根际土壤细菌含量占微生物总量的比例均高于60%。其中Y2样点土壤细菌含量显著高于其他样点样品,达 $123.74\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,但该样地中检测到的门、科、属数量均低于其他样点。(2)从门水平上看,各样点土壤样品中相对丰度最高的前五个门分别是变形杆菌门、放线菌门、酸杆菌门、拟杆菌门和疣微菌门,其中变形杆菌门的相对丰度均为最高,在细菌群落中所占比例均超过30%;从属水平上看,四个样点存在不同的优势菌群,Y1样点优势菌群为固氮菌属和芽孢杆菌属,Y2样点优势菌群为乳酸杆菌属、结核分枝杆菌属以及根瘤菌属等,Y3样点优势属为鞘氨醇单胞菌属,Y4中的优势菌群为假单胞菌属。(3)土壤速效钾、铵态氮、有机碳、蔗糖酶、脲酶以及蛋白酶等环境因子与土壤细菌群落Alpha多样性指数存在显著相关性;土壤速效钾、硝态氮、有机碳、蔗糖酶、脲酶、蛋白酶等环境因子影响不同样点紫茎泽兰根际土壤细菌群落组成。【结论】不同紫茎泽兰重度入侵区域其根际土壤细菌在含量、门水平和属水平上均存在差异。土壤速效钾、有机质含量、蔗糖酶、脲酶等是影响土壤细菌群落结构的主要因素。

关键词: 紫茎泽兰; 不同入侵区域; 磷脂脂肪酸; 高通量测序; 土壤细菌

Comparative study on soil bacterial community diversity in different invasive regions of *Ageratina adenophora*

LIU Xu, KONG Lingjie, YANG Kang, HAN Yuelong, ZHANG Fengjuan*
College of Life and Science, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China

Abstract:【Aim】The alien plant *Ageratina adenophora* can do serious damage to the environment and agriculture production. Comparative study on soil bacterial community diversity in different invasive regions of *A. adenophora* greatly enriched the soil microbial hypothesis of invasive plants and provided an important theoretical basis for the prevention and control of *A. adenophora*.【Method】Phospholipid fatty acid (PLFAs) analysis and 16s rDNA high-throughput sequencing were used to analyze and compare the bacterial communities in the rhizosphere soil of different severely invasive areas of *A. adenophora*. Based on this, correlation analysis and principal component analysis were used to explore the relationship between soil bacterial community and soil environmental factors.【Result】(1) The ratio of bacterial content in the rhizosphere soil of *A. adenophora* to the total amount of microorganisms in each sampling area was higher than 60%. The soil bacterial concentration in Y2 was significantly higher than other samples, reaching $123.74\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, but the number of phyla, families and genera detected in this area was lower than other sample areas. (2) At the level of the phylum, the top five phyla with the highest relative abundance in all soil samples are Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, and Verrucomicrobia. In all soil samples, the relative abundance of Proteobacteria is the highest, whose proportion in the bacterial community is more than 30%. At the genus level, the four sample areas have different advantage genera. The dominant groups in Y1 are *Pirellula* and *Bacillus*, and the dominant bacteria in Y2 are *Lactobacillus*, *Mycobacterum* and *Bradyrhizobium*.

收稿日期(Received): 2018-08-21 接受日期(Accepted): 2018-10-15
基金项目: 国家自然科学基金项目(31372000); 河北省自然科学基金项目(C2015201021, C2015201241); 教育厅自然科学基金项目(ZD2016039)
作者简介: 柳旭, 女, 硕士研究生。研究方向: 入侵植物学。E-mail: liuxu0314@vip.qq.com
* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: fengjuanzhang@126.com

zobium, the dominant bacterium in Y3 and Y4 is Sphingomonas and Pseudomonas respectively. (3) The environmental factors such as soil available potassium, ammonium nitrogen, organic carbon, sucrase, urease and protease have significant correlation with soil bacterial community Alpha diversity index; environmental factors such as soil available potassium, nitrate nitrogen, organic carbon, invertase, urease and protease affect the bacterial community composition in the rhizosphere soil of *A. adenophora*. 【Conclusion】 There are differences in the concentration, phylum level and genus level of rhizosphere soil bacteria in different invasive areas of *A. adenophora*. Soil available potassium, organic matter content, invertase, urease are the main factors affecting soil bacterial community structure.

Key words: *Ageratina adenophorum*; different invasion area; phospholipid fatty acid; high-throughput sequencing; soil bacterial community

紫茎泽兰 *Ageratina adenophorum* (Sprengel) R. K. H. 为多年生半灌木, 属菊科泽兰属 (Sang *et al.*, 2010), 原产于美洲墨西哥至哥斯达黎加一带 (王文琪, 2006), 于 20 世纪 40 年代由缅甸传入我国云南省, 现广泛分布于我国西南地区, 并有进一步扩张的趋势 (Wang & Wang, 2010)。紫茎泽兰具有强大的生态适应性和竞争优势, 对当地的农牧业发展、人畜健康以及生态环境造成严重威胁 (Lu *et al.*, 2005)。

土壤微生物在外来植物入侵过程中起着重要作用 (肖博, 2014)。入侵植物与土壤微生物之间的相互作用关系深刻影响着入侵植物的适应性和竞争力 (付伟等, 2017; Zhang *et al.*, 2017, 2018)。土壤微生物参与土壤中有机质的分解、土壤腐殖质形成及分解以及养分的转化和循环, 是生态系统的重要组成部分 (滕应和黄昌勇, 2002; Ge *et al.*, 2010; McGuire *et al.*, 2010)。入侵植物在入侵地形成稳定种群后会影响到入侵地的植物群落结构, 进而引起土壤微生物的多样性发生变化 (Levine *et al.*, 2003)。如藎香蓟 *Ageratum conyzoides* L. 对梨树各发育时期和各土层土壤微生物数量和比例的影响呈现多态效应, 对土壤中细菌数量的提高效应优于对土壤真菌和放线菌 (吴红英等, 2010); 空心莲子草 *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. 入侵后, 土壤中可培养细菌和真菌的数量显著增加, 而放线菌的数量显著下降 (王志勇等, 2011); 假高粱 *Sorghum halepense* (L.) Pers. 的根系分泌物能选择性地影响其根际细菌的数量和群落结构, 形成假高粱特有的根际土壤细菌群落结构和多样性, 一些土壤细菌的介入会提高假高粱的竞争优势 (刘纯等, 2013)。因此, 土壤细菌群落与植物的入侵密不可分 (牛红榜等, 2007a; 于兴军等, 2005), 探究入侵植物根际土壤细菌群落变化对揭示其入侵机制具有重要意义。

关于紫茎泽兰入侵与土壤微生物之间的关系已有广泛研究 (Yu *et al.*, 2005)。紫茎泽兰入侵改变了土壤微生物群落结构, 提高土壤自生固氮菌、氨氧化细菌和真菌的数量、提高土壤可利用的养分水平, 创造对自身生长有利的土壤环境 (牛红榜等, 2007a); 刘潮等 (2018) 和 Yu *et al.* (2014) 证明紫茎泽兰根围的土壤微生物增强了其对本地植物种的竞争力, 形成了自我促进的入侵机制; 紫茎泽兰叶水溶液中的次生化感物质对土壤细菌群落结构影响也较大 (Zhu *et al.*, 2017), 其入侵改变了根际土壤细菌多样性, 可能通过聚集一些特定的菌群来实现成功入侵。本研究采集云南境内不同入侵域紫茎泽兰根际土壤, 比较不同生境中紫茎泽兰根际土壤细菌群落结构, 探究土壤细菌群落结构与环境因子间的关系。研究结果对于揭示紫茎泽兰的入侵机制具有重要作用, 同时也大大丰富入侵植物的土壤微生物假说, 并为紫茎泽兰入侵的控制和管理以及生态系统的修复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料采集

紫茎泽兰样地位于中国西南地区的云南省 (97°31'–206°11'E, 21°8'–29°15'N)。该地土壤类型多为红壤, 气候属于亚热带高原季风型, 干湿季节分明, 紫茎泽兰入侵严重, 形成明显的单优群落。于 2017 年 3 月在云南昆明、玉溪、普洱采用“五点法”分别采集紫茎泽兰根际土壤样品, 设置样方大小为 3 m×3 m, 每个样点选取 3 个样方。去除样品中的石块、断根及其他杂质, 在实验室将土壤过 2 mm 筛。土样过筛后分成 3 份: 一份于室温保存, 用于土壤理化性质测定; 一份置于 -20 °C 保存, 用于 PLFAs 分析; 一份置于 -80 °C 保存, 用于分子分析。采集的土壤样品的基本信息见表 1。

表 1 取样地点概况
Table 1 The general situation of sample location

编号 Sample	采样地点 Sample location	经纬度 Longitude and latitude	生境 Habitat	海拔 Altitude/m
Y1	普洱市思茅区普洱学院 Pu'er College, Simao District, Pu'er	22°46'4"N, 101°0'6"E	校园外荒地, 紫茎泽兰盖度为 80%~90% Off-campus wasteland, <i>A. adenophora</i> coverage is 80%~90%	1330
Y2	玉溪市红塔区 Hongta District, Yuxi	24°26'19"N, 102°34'14"E	路边荒地, 紫茎泽兰盖度为 83%~95% Roadside wasteland, <i>A. adenophora</i> coverage is 83%~95%	1680
Y3	昆明市官渡区宝丰 Baofeng, Guandu District, Kunming	24°56'5"N, 102°43'25"E	荒地, 紫茎泽兰盖度为 85%~95% Wasteland, <i>A. adenophora</i> coverage is 85%~95%	1890
Y4	昆明市西山区 Xishan District, Kunming	24°58'40"N, 102°36'59"E	西山后山, 紫茎泽兰盖度为 90%~95% Western Mountain, <i>A. adenophora</i> coverage is 90%~95%	2100

1.2 土壤样品理化性质的测定

土壤 pH 值用电位法测定(水土比=2.5:1);土壤蛋白酶活性用茚三酮比色法测定,以 24 h 后 1 g 土壤中氨基氮的 mg 数表示;脲酶活性用苯酚钠—次氯酸钠比色法测定,以 1 g 土壤中 NH₃-N 的 mg 数表示;磷酸酶活性用磷酸苯二钠比色法测定,以 1 g 土样 1 h 催化 PNPP 分解生成对硝基苯酚的 μg 数表示;蔗糖酶活性用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定,以 24 h 后 1 g 土中葡萄糖 mg 数表示(关松荫,1986;哈兹耶夫等,1980);土壤速效磷用碳酸氢钠浸提—钼锑抗比色法测定;速效钾用 1 mol·L⁻¹中性醋酸铵浸提—火焰光度计法测定;有机质采用重铬酸钾法测定;铵态氮和硝态氮用 2 mol·L⁻¹ KCl 溶液浸提土样后,采用全自动化学分析仪(Smart-Chem 200, Alliance, France)测定(南京农业大学,1990)。

1.3 磷脂脂肪酸 (phospholipid fatty acid , PL-FAs) 分析

参考 Frostegård *et al.* (1993) 和 Kourtev *et al.* (2002) 方法对 PLFA 进行提取和分析。PLFA 成分分析采用 Sherlock MIS 4.5 微生物自动鉴定系统 (sherlock microbial identification system, 美国 MIDI 公司),其中 PLFA 定量采用 19:0 内标法。根据结构不同,不同特征脂肪酸对应不同的微生物(吴愉萍,2009; Frostegård & Baath, 1996; Hill *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2013; Olsson & Alstrom, 2000)。

1.4 土壤 DNA 提取及 PCR 扩增

采用手提法(张海燕等,2009; Zhou *et al.*, 1996)提取土壤样品总基因组 DNA,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测土壤总 DNA 的完整性,利用 DNA 浓度测定仪(Nanodrop)检测 DNA 浓度。使用 16S rDNA-V4 区特异引物 515F (5'-GCGCCAGCMGC-CGCGGTAA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGT-

WTCTAAT-3')进行 PCR 测定,用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.5 Miseq 测序

本研究采用 Miseq (Illumina, 美国)进行 DNA 测序,将测序后的 DNA 序列拼接,同时对序列的质量和拼接效果进行质控过滤,然后按照 barcode 标签序列识别并区分样品,得到有效数据。采用 Usearch 软件设置 97% 相似性,对有效 DNA 序列数据进行操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 分类。Miseq 测序、序列拼接以及 OTU 分类均由北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成。

1.6 数据处理与分析

实验数据以平均值±标准差的形式表示;采用 Microsoft Excel 2016 软件统计数据;采用 SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和主成分分析 (principal components analysis, PCA);采用 Microsoft Excel 2016 和 Past 3 软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同样点紫茎泽兰根际土壤样品微生物群落结构

Y1、Y2、Y3 和 Y4 样点紫茎泽兰根际土壤样品中分别检测到 53、61、58 和 57 种 PLFA。选取大于 0.01 nmol·g⁻¹ 的 32 种 PLFA 进行分析,其中代表革兰氏阳性细菌的 PLFA 15 种、革兰氏阴性细菌 12 种、真菌 1 种、放线菌 3 种、丛枝菌根真菌 1 种(表 2)。分析结果表明,4 个样点中各类微生物含量均存在显著差异(表 3),其中 Y2 采样点的细菌、真菌、放线菌、丛枝菌根真菌及总磷脂脂肪酸含量均显著高于其他样点,而 Y1 样点的各类微生物含量均显著低于其他样点。各采样点的各类群微生物中以细菌 PLFAs 含量最高,占总 PLFAs 的 63.55%~74.92% (图 1),各生境土壤样品细菌磷脂脂肪酸含量均表现为与微生物

总磷脂脂肪酸含量相同的变化趋势。

对紫荃泽兰根际土壤微生物群落 PLFA 进行主成分分析(图 2),结果显示,4 种样品分别位于四个不同的象限且空间距离较远,说明在不同样点土壤微生物的群落结构存在差异。采用 SPSS21.0 软件计算主成分因子载荷值,对 PC1 贡献较大的 PL-

FA 为 16 : 1 ω9c,17 : 0,14 : 0 iso,16 : 0 iso 和 17 : 0 anteiso;对 PC2 贡献较大的 PLFA 为 12 : 0 和 14 : 0,根据表 2,以上 PLFA 均为代表细菌的 PLFA,说明细菌群落的差异是影响不同样点紫荃泽兰根际土壤微生物群落差异的主要因素。

表 2 土壤微生物 PLFA 生物标记物
Table 2 Phospholipid fatty acid (PLFA) signatures of soil micro-organisms

微生物类型 Microbe type	脂肪酸 Fatty acid
革兰氏阴性细菌 Gram negative bacteria	10 : 0 3OH;12 : 0;12 : 0 2OH;14 : 0;16 : 1 ω9c;17 : 1 ω8c;17 : 0 cyclo;17 : 00;18 : 1 ω5c;18 : 00; 18 : 1 ω7c 11-methyl;19 : 0 cyclo ω8c
革兰氏阳性细菌 Gram positive bacteria	11 : 0 2OH;13 : 0 iso;13 : 0 anteiso;14 : 0 iso;14 : 0 anteiso; 15 : 1 iso G;15 : 0 iso;15 : 0 anteiso; 16 : 1 iso H;16 : 0 iso;17 : 0 iso;17 : 0 anteiso;19 : 0 iso;19 : 0 anteiso;20 : 0 iso
真菌 Fungi	18 : 1 ω9c
放线菌 Actinobacteria	14 : 1 ω5c;17 : 0 10-methyl;18 : 0 10-methyl, TBSA
丛枝菌根真菌 AMF	16 : 1 ω5c

表 3 同样地土壤微生物各菌群磷脂脂肪酸含量(n=3)
Table 3 The contents of soil microbial PLFAs in different soil samples (n=3)

样地 Sample	细菌磷脂脂肪酸含量 Total bacterial PLFAs/ (μg · g ⁻¹)	真菌磷脂脂肪酸含量 Fungal PLFAs/ (μg · g ⁻¹)	放线菌磷脂脂肪酸含量 Actinomycetic PLFAs/ (μg · g ⁻¹)	AMF 磷脂脂肪酸含量 AMF PLFAs/ (μg · g ⁻¹)	微生物总磷脂脂肪酸含量 Total microbial PLFAs/ (μg · g ⁻¹)
Y1	16.70±0.57a	2.38±0.06a	0.63±0.01a	2.61±0.13a	22.33±1.15a
Y2	123.74±10.17b	19.69±1.17b	6.94±0.25b	14.81±0.97b	165.17±12.56b
Y3	44.46±2.78c	9.39±0.35c	3.99±0.20c	12.10±0.77c	69.96±7.01c
Y4	55.16±1.99c	16.01±1.02d	5.66±0.31d	3.49±0.12a	80.31±4.45c

同列数据(平均值±标准误)后不同小写字母者表示在 5%水平上差异显著。
The data (means±SD) in the same column with the different letters mean significant differences at 5% level.

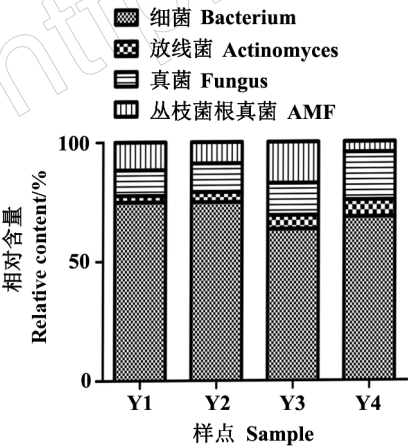


图 1 不同样点土壤微生物群落相对含量堆积图
Fig.1 Soil microbial community relative content accumulation histogram in different locations

Y1:普洱市思茅区;Y2:玉溪市红塔区;
Y3:昆明市官渡区;Y4:昆明市西山区。

Y1: Simao District, Pu'er; Y2: Hongta District, Yuxi;
Y3: Guandu District, Kunming; Y4: Xishan District, Kunming.

2.2 土壤细菌的 OTU 丰度和 α 多样性

对土壤样品 DNA 进行高通量测序,经过拼接

和过滤处理后,获得 16S rDNA 标签序列,根据 97% 的序列相似性划分为不同的 OTU。OTUs 丰度稀释曲线(图 3)显示,随着测序数量的上升,稀释曲线斜率逐渐下降,趋向平坦但未达平台期,说明测序数量足够,能够反映样品中的物种组成特征,但仍有小部分低丰度类群未被覆盖。

土壤细菌多样性指数和丰富度指数如表 4 所示。4 个样点之间土壤细菌 Shannon 指数和 Simpson 指数无显著差异。Y2 的 Chao1 指数显著低于 Y1、Y3 和 Y4,而 Y1、Y3 和 Y4 无显著差异。PD_whole_tree 指数代表通过进化关系观察到的种属数,本实验中 Y2 土壤细菌的种属数显著低于其他 3 个样地;Y3 土壤细菌的种属数显著高于 Y2,但低于 Y1、Y4 且差异显著;Y1、Y4 土壤细菌种属数无显著差异。

2.3 土壤细菌 OTUs 分布

各土壤样品一共有 12398 个细菌 OTUs(图 4),其中共有的 OTUs 为 2737 个,只占总数的 22.08%,说明不同地理条件对土壤细菌 OTU 影响明显。Y2

与 Y1、Y3、Y4 的细菌 OTU 共有数少于其他 3 个样品之间的细菌 OTU 共有数,说明 Y2 区域与 Y1、Y3 和 Y4 区域细菌组成存在差异。

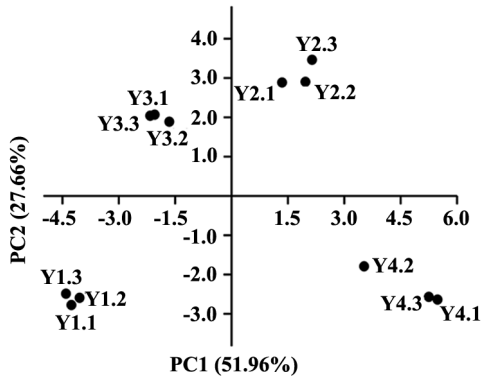


图 2 土壤微生物群落的 PCA

Fig.2 Principle component analysis of soil microbes

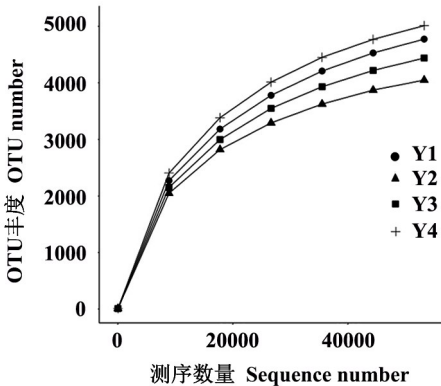


图 3 细菌 OTUs 稀释曲线

Fig.3 Rarefaction curves of the bacterial assemblages (OTU abundance)

表 4 不同样点土壤样品细菌 α 多样性指数

Table 4 Alpha diversity index of bacteria in different samples

样点 Sample	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	Chao1 指数 Chao1 index	PD_whole_tree
Y1	10.14±0.04	0.0028±0.0001	6030.03±334.60a	293.00±8.46a
Y2	9.91±0.10	0.0033±0.0006	4769.31±383.99b	248.83±2.83b
Y3	10.00±0.05	0.0032±0.0003	5855.29±134.59a	268.15±6.79c
Y4	10.03±0.11	0.0054±0.0010	6183.42±313.05a	301.12±1.22a

同列数据(平均值±标准误)后不同小写字母者表示在 5% 水平上差异显著。
The data (means±SD) in the same column with the different letters mean significant differences at 5% level.

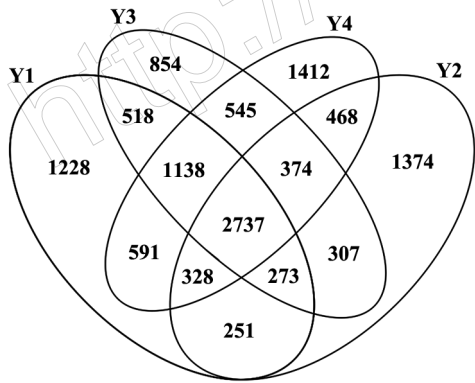


图 4 细菌 OTUs 分布韦恩图

Fig.4 Venn graph of bacteria OTUs distribution

2.4 细菌群落组成及丰度

PCA 显示(图 5),同一入侵区域的微生物群落在 PCA 图中较接近,表明同一入侵区域的微生物群落组成较相似。Y3 位于 PC2 的正半轴,Y4 位于 PC2 的负半轴,说明不同海拔地区的细菌物种组成有明显差异;Y1、Y2、Y3、Y4 分别位于 4 个象限且距离较远,说明 4 个样点的细菌组成存在差异。

根据各 OTU 代表序列的物种注释结果,4 种土

壤样品中分别检测出细菌 44 门 295 科 458 属、39 门 269 科 438 属、40 门 289 科 454 属以及 45 门 303 科 479 属,其中 Y2 样品中检测到的细菌门数量、科数量以及属数量均低于其他 3 个样点,Y1 和 Y4 土壤样品检测到的门数量不存在差异,Y1、Y3 和 Y4 样品中所检测到的科数量和属数量不存在差异。

选取各样点土壤样品中细菌在门分类水平上最大丰度排名前 10 的物种,生成物种相对丰度堆积图(图 6)。由图 6 可知,4 个样点土壤样品都具有丰富的物种,在门的水平归类的细菌达到了 80% 以上。最大丰度排名前 10 的种类为:变形菌门、放线菌门、酸杆菌门、拟杆菌门、疣微菌门、厚壁菌门、浮霉菌门、芽单胞菌门、绿弯菌门以及 Latescibacteria。在各采样点的土壤样品中,不同门类细菌所占的比例不同,但变形菌门的占比均为最高。

根据所有样本在属分类水平的物种注释及丰度信息,选取丰度排名前 30 的属,根据其在每个样本中的丰度信息,从物种和样本 2 个层面进行聚类,绘制物种丰度聚类热图(图 7)。在属水平上,

每个样点中各类细菌相对丰度存在差异,且同种细菌在不同样点中相对丰度不同。Y1 中的优势菌群为固氮菌属和芽孢杆菌属;Y2 中的优势菌为乳酸杆菌属、结核分枝杆菌属以及根瘤菌属和伯克霍尔德氏菌属;Y3 中的优势属为鞘氨醇单胞菌属和诺卡氏菌属;而 Y4 样地假单胞菌属为优势菌群。

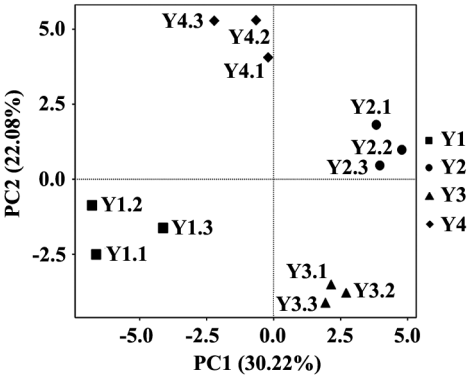


图 5 细菌群落的 PCA
Fig.5 Principal component analysis of soil bacterial communities

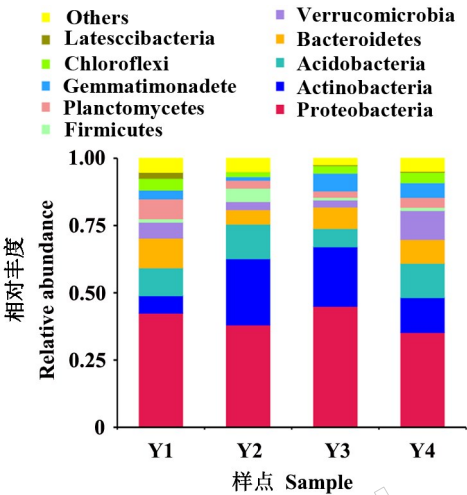


图 6 门水平上的细菌相对丰度柱形图
Fig.6 The relative abundance of bacteria in Phylum level
Y1: 普洱市思茅区; Y2: 玉溪市红塔区;
Y3: 昆明市官渡区; Y4: 昆明市西山区。
Y1: Simao District, Pu'er; Y2: Hongta District, Yuxi;
Y3: Guandu District, Kunming; Y4: Xishan District, Kunming.

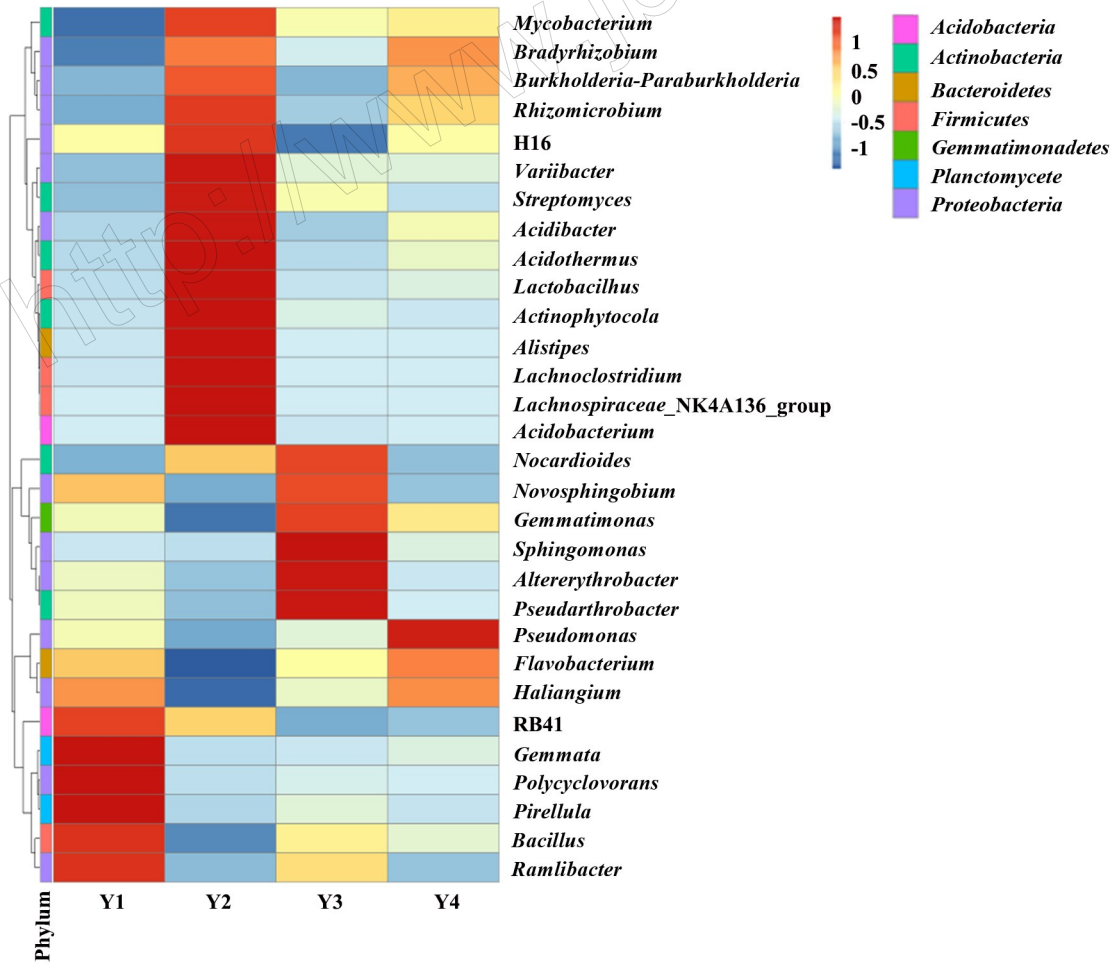


图 7 属水平上的物种丰度聚类热图
Fig.7 The heatmap of bacterial relative abundance at the genus level

2.5 土壤的理化性质

各样品土壤养分和酶活含量均存在显著差异(表 5)。Y3 样点土壤样品的速效磷、铵态氮、酸性磷酸酶含量显著高于其他区域。Y2 样点土壤样品

的速效钾、硝态氮、有机碳、蔗糖酶、脲酶、碱性磷酸酶以及蛋白酶含量均显著高于其他样点。除铵态氮含量外,Y1 样点土壤样品的其他养分及酶活含量均显著低于 Y2、Y3、Y4 样点。

表 5 不同样点土壤样品理化性质
Table 5 Physico-chemical properties of soil samples in different areas

样点 Sample	pH 值 pH value	速效磷含量 Available phosphorous/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	速效钾含量 Available potassium/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	硝态氮含量 Nitrate nitrogen/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	铵态氮含量 Ammonium nitrogen/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	有机碳含量 Organic carbon/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
Y1	7.00±0.04ab	1.90±0.18a	165.27±2.18a	2.69±0.07a	319.83±2.05a	6.27±0.18a
Y2	6.85±0.05b	21.32±0.35b	295.43±3.28b	27.34±0.26b	255.37±7.28b	68.45±0.31b
Y3	7.52±0.29a	47.93±0.31c	249.25±3.44c	3.85±0.11c	420.00±5.77c	19.27±0.65c
Y4	7.13±0.07b	12.05±0.30d	202.93±4.03d	6.68±0.60d	327.97±5.09a	36.95±1.28d

样点 Sample	蔗糖酶含量 Sucrase activity/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	脲酶含量 Urease activity/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	碱性磷酸酶含量 Alkaline phosphatase/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	酸性磷酸酶含量 Acid phosphatase/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	蛋白酶含量 Protease/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
Y1	4.66±0.28a	2.78±0.32a	80.21±1.92a	61.62±2.81a	12.68±0.83a
Y2	43.04±0.79b	51.66±0.57b	185.92±3.72b	141.30±3.72b	68.45±0.34b
Y3	30.84±0.18c	14.27±0.34c	167.33±1.84c	198.67±2.12c	43.76±2.04c
Y4	13.08±0.49d	6.91±0.62d	113.68±2.32d	151.39±1.84d	26.35±0.55d

同列数据(平均值±标准误)后不同小写字母者表示在 5%水平上差异显著。
The data (means±SD) in the same column with the different letters mean significant differences at 5% level.

2.6 紫茎泽兰不同入侵区域土壤细菌群落丰度及组成与环境因子的关系

本实验中各样点土壤理化性质差异较大,为检验各土壤环境因子是否影响土壤细菌多样性及组成变化,研究采用 Pearson 相关性分析及 Mantel test 计算了细菌群落多样性指数和组成与各环境因子之间的关系。土壤因子与土壤细菌的 Shannon 指数和 Simpson 指数无显著相关,说明土壤环境因子未对 4 个样品的土壤细菌多样性产生影响。而土壤速效钾、铵态氮、有机碳、蔗糖酶、脲酶和蛋白酶含量与细菌群落 Chao1 指数呈显著或极显著相关,说明以上土壤环境因子显著影响了土壤细菌的丰富度(表 6)。海拔、土壤速效钾、硝态氮、有机碳、蔗糖酶、蛋白酶以及脲酶均与细菌群落组成存在显著相关($P<0.05$),即以上环境因子均显著影响了细菌群落的组成(表 7)。综上所述,土壤速效钾、有机碳、蔗糖酶、脲酶以及蛋白酶是影响不同样点紫茎泽兰根际土壤细菌群落结构的主要因素。

3 讨论

土壤中的细菌是植物生长的主要驱动力之一(张丽娜等,2016),外来植物大量定居后可以通过增加与土壤养分循环有关的细菌数量来加速土壤的养分循环,提高植物根系对土壤养分的利用率,

以促进自身的生长、竞争和扩散(牛红榜等,2007a)。如互花米草 *Spartina alterniflora* Loisel.根际土壤中细菌分布量最大,表明其在土壤中起主要作用(郑洁等,2017);薇甘菊 *Mikania micrantha* Kunth 根际土壤中细菌含量也显著高于真菌和放线菌含量(杨琼等,2015)。本实验通过 PLFAs 分析法和 PCA,发现各样点土壤微生物中细菌含量所占比例均为最高,且细菌含量差异是导致不同入侵区域土壤微生物群落差异的主要因素。通过 16S rDNA 高通量测序发现,各入侵区域中土壤细菌门类数量相似,但在各区域中不同门类细菌的含量存在显著差异。其中,变形菌门、放线菌门、厚壁菌门和酸杆菌门含量相对较高,这与牛红榜等(2007b)和朱珣之等(2015)的研究结果相似。研究表明,酸杆菌门是新近基于分子生态学研究划分的新细菌类群,广泛存在于自然界各种环境中,约占土壤细菌类群的 5%~46%,可能是健康土壤的指示菌(Ellis et al.,2003);变形菌门和厚壁菌门在多种植物根际土壤中也是优势类群,如葡萄 *Vitis vinifera* L.(Vega-avila et al.,2015)、红芸豆 *Phaseolus vulgaris* L.(Suyal et al.,2015)、菊芋 *Helianthus tuberosus* L.(Yang et al.,2016);而放线菌门多是土壤中的正常菌群(朱珣之等,2015)。

表 6 环境因子与土壤细菌群落多样性指数的 Pearson 相关性分析

Table 6 Pearson correlation analysis of environmental factors and soil bacterial community diversity index

环境因子 Environmental factor	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	Chao1 指数 Chao1 index
pH 值 pH value	0.173	0.073	0.453
速效磷 Available phosphorous	-0.297	0.155	-0.136
速效钾 Available potassium	-0.490	0.197	-0.640 *
硝态氮 Nitrate nitrogen	0.097	0.040	0.504
铵态氮 Ammonium nitrogen	-0.452	0.123	-0.738 * *
有机碳 Organic carbon	-0.537	-0.086	-0.634 *
蔗糖酶 Sucrase activity	-0.528	0.217	-0.666 *
脲酶 Urease activity	-0.500	0.177	-0.775 * *
碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase	-0.544	0.169	-0.579
酸性磷酸酶 Acid phosphatase	-0.408	-0.080	-0.089
蛋白酶 Protease	-0.517	0.178	-0.687 *
海拔 Altitude	-0.279	-0.371	0.147

* 代表显著性 $P<0.05$; * * 代表显著性 $P<0.01$ 。
* indicates significant differences at 0.05 level; * * indicates significant differences at 0.01 level.

表 7 细菌群落组成和环境因子的 Mantel 检验

Table 7 Mantel tests of bacterial community and environmental factors

环境因子 Environmental factor	r	P
pH 值 pH value	0.053	0.357
海拔 Altitude	0.332	0.020
速效磷 Available phosphorous	0.068	0.221
速效钾 Available potassium	0.710	0.001
硝态氮 Nitrate nitrogen	0.935	0.001
铵态氮 Ammonium nitrogen	0.188	0.102
有机碳 Organic carbon	0.918	0.001
蔗糖酶 Sucrase activity	0.691	0.001
脲酶 Urease activity	0.838	0.001
碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase	0.562	0.201
酸性磷酸酶 Acid phosphatase	0.173	0.112
蛋白酶 Protease	0.761	0.001

本实验所有土壤样品中共有的相对丰度较高的细菌为变形菌门的假单胞菌属和鞘氨醇单胞菌属,变形菌门的慢生根瘤菌属、厚壁菌门的芽孢杆菌属以及放线菌门的链霉菌属在部分区域土壤样品中相对丰度较高。牛红榜等(2007b)发现,紫茎泽兰根际土壤中存在丰富的芽孢杆菌和假单胞菌,通过这些具有强拮抗性能的根际有益微生物的反馈作用,使得紫茎泽兰能在与当地植物竞争中处于有利地位。慢性根瘤菌属、链霉菌属和鞘氨醇单胞菌属均为土壤中的有益微生物菌群(施河丽等,2018; Chaintreuil *et al.*, 2000),在土壤碳、氮循环中起重要作用。紫茎泽兰入侵后,其根际土壤中氨氧

化细菌、自生固氮菌等有益功能菌显著高于本地植物根际土壤,这些功能菌参与土壤氮循环,可间接为植物提供氮源,促进紫茎泽兰生长,使其在与本地植物竞争中获得优势(戴莲等,2012)。

土壤性质是影响微生物群落变化的主要因素之一(王光华等,2006)。本研究所选土壤人为干预较少,因此,细菌群落的变化主要体现在土壤自身理化性质的差异上。红毛草 *Murdannia nudiflora* (L.) Brenan 根际土壤中的细菌含量与过氧化氢酶、蔗糖酶、纤维素酶和脲酶活性存在一定的相关性(张丽娜等,2016);而互花米草根际土壤中细菌 PLFA 与土壤有机碳、蔗糖酶、过氧化氢酶呈显著相关性(郑洁等,2017)。本研究 4 个采样地土壤样品理化性质相差较大,通过细菌多样性指数和土壤因子间的 Pearson 相关性分析以及细菌群落组成和环境因子的 Mantel 检验可知,土壤中蔗糖酶、脲酶、蛋白酶是影响紫茎泽兰根际土壤细菌群落的主要因素。土壤养分与肥力直接相关,直接影响植物生长,土壤微生物的活跃状态与土壤物质、能量循环相关,间接影响土壤肥力。杨琼等(2015)发现,薇甘菊根际土壤细菌与土壤有机质、铵态氮和硝态氮、有效磷相关性显著;邵文山等(2016)对荒漠草原 4 种常见植物群落土壤养分及微生物的研究发现,土壤有机质、全氮、速效磷与土壤细菌群落均存在显著正相关关系;本研究结果也显示,有机质以及硝态氮与土壤细菌群落组成关系密切。Zhang *et al.* (2013)指出,土壤 pH 值也是影响微生物多样性的主要因素,但本研究没有发现土壤 pH 值对土壤细菌群落及多样性有明显影响,可能与研究中涉及的样品 pH 值范围较近似有关($pH=6.85\sim7.50$)。

本研究利用 PLFAs 分析和 16s rDNA 高通量测序方法相结合,比较不同采样点紫茎泽兰根际土壤细菌群落结构差异,得到如下结论:不同样点紫茎泽兰根际土壤中细菌含量存在显著差异,且细菌含量在微生物总量中占比最高。各样点土壤细菌在门类数量上相似,但不同门类的细菌相对丰度不同,其中,变形菌门的相对丰度占比均最高;从属水平上看,不同样点存在着不同的优势菌群,且同种细菌在不同样点土壤的含量差异较大。通过对土壤环境因子和细菌群落作相关性分析发现,土壤中的速效钾、有机质、蔗糖酶、脲酶以及蛋白酶是影响土壤细菌群落结构的主要因素。

参考文献

- 戴莲, 李会娜, 蒋智林, 万方浩, 刘万学, 2012. 外来植物紫茎泽兰入侵对根际土壤有益功能细菌群、酶活性和肥力的影响. 生态环境学报, 21(2): 237-242.
- 付伟, 王宁, 庞芳, 黄玉龙, 吴俊, 祁珊珊, 戴志聪, 杜道林, 2017. 土壤微生物与植物入侵: 研究现状与展望. 生物多样性, 25(12): 1295-1302.
- 关松荫, 1986. 土壤酶及其研究法. 北京: 农业出版社.
- 哈兹耶夫, 郑洪元, 周礼恺, 1980. 土壤酶活性. 北京: 科学出版社.
- 刘潮, 韩利红, 宋培兵, 张亚萍, 2018. 土壤微生物对紫茎泽兰与我国西南当地植物生长的影响. 江苏农业科学, 46(7): 104-107.
- 刘纯, 黄红娟, 张朝贤, 王茂云, 陈小奇, 王金信, 2013. 假高粱根系分泌物对土壤细菌群落多样性的影响. 生态环境学报, 22(7): 1124-1128.
- 南京农业大学, 1990. 土壤农化分析. 北京: 农业出版社.
- 牛红榜, 刘万学, 万方浩, 2007a. 紫茎泽兰 (*Ageratina adenophora*) 入侵对土壤微生物群落和理化性质的影响. 生态学报, 27(7): 3051-3060.
- 牛红榜, 刘万学, 万方浩, 刘波, 2007b. 紫茎泽兰根际土壤中优势细菌的筛选鉴定及拮抗性能评价. 应用生态学报, 18(12): 2795-2800.
- 邵文山, 李国旗, 陈科元, 赵盼盼, 2016. 荒漠草原四种常见植物群落土壤养分及土壤微生物特征. 北方园艺 (15): 161-166.
- 施河丽, 孙立广, 谭军, 赵秀云, 王瑞, 2018. 生物有机肥对烟草青枯病的防效及对土壤细菌群落的影响. 中国烟草科学, 39(2): 54-62.
- 滕应, 黄昌勇, 2002. 重金属污染土壤的微生物生态效应及其修复研究进展. 生态环境学报, 11(1): 85-89.
- 王光华, 金剑, 徐美娜, 刘晓冰, 2006. 植物、土壤及土壤管理对土壤微生物群落结构的影响. 生态学杂志, 25(5): 550-556.
- 王文琪, 2006. 外来物种紫茎泽兰 *Eupatorium adenophorum* Spreng 入侵机制的研究. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.
- 王志勇, 江雪飞, 郑慧, 方治伟, 郑世学, 2011. 脂肪酸甲酯法检测空心莲子草入侵影响土壤微生物群落结构的初步研究. 微生物学杂志, 31(6): 6-9.
- 吴红英, 孔云, 姚允聪, 毕宁宁, 亓丽萍, 付占国, 2010. 间作芳香植物对沙地梨园土壤微生物数量与土壤养分的影响. 中国农业科学, 43(1): 140-150.
- 吴翰萍, 2009. 基于磷脂脂肪酸 (PLFA) 分析技术的土壤微生物群落结构多样性的研究. 硕士学位论文. 杭州: 浙江大学.
- 肖博, 2014. 外来入侵植物紫茎泽兰与土壤微生物的互作. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院.
- 杨琼, 梁羽, 杨剑, 胡章立, 2015. 入侵植物薇甘菊的根际土壤微生物特征. 生态科学, 34(2): 148-155.
- 于兴军, 于丹, 卢志军, 马克平, 2005. 一个可能的植物入侵机制: 入侵种通过改变入侵地土壤微生物群落影响本地种的生长. 科学通报, 50(9): 896-903.
- 张海燕, 王彩虹, 龚明福, 张利莉, 2009. 一种简单有效且适于土壤微生物多样性分析的 DNA 提取方法. 生物技术通报 (8): 151-155.
- 张丽娜, 王桔红, 陈文, 陈学林, 陈晓芸, 2016. 红毛草不同程度入侵区土壤微生物群落结构和部分理化指标的比较及其相关性分析. 植物资源与环境学报, 25(2): 33-40.
- 郑洁, 刘金福, 吴则焰, 洪伟, 何中声, 蓝亦琦, 刘思迪, 2017. 闽江河口红树林土壤微生物群落对互花米草入侵的响应. 生态学报, 37(21): 7293-7303.
- 朱珣之, 李强, 李扬革, 韩洪波, 马克平, 2015. 紫茎泽兰入侵对土壤细菌的群落组成和多样性的影响. 生物多样性, 23(5): 665-672.
- CHAINTREUIL C, GRIAUD E, PRIN Y, LORQUIN J, BA A, GILLIS M, LAJUDIE P, DREYFUS B, 2000. Photosynthetic Bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza Breviligulata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12): 5437-5447.
- ELLIS R J, MORGAN P, WEIGHTMAN A J, 2003. Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6): 3223-3230.
- FROSTEGÅRD A, BAATH E, 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 22(1/2): 59-65.
- FROSTEGÅRD A, TUNLID A, BAATH E, 1993. Phospholipid Fatty Acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11): 3605-3617.
- GE G F, LI Z J, FAN F L, CHU G X, HOU Z N, LIANG Y C, 2010. Soil biological activity and their seasonal variations in response to long-term application of organic and inorganic fertilizers. *Plant and Soil*, 326(1/2): 31.
- HILL G T, MITKOWSKI N A, ALDRICH W F, EMELE L R, JURKONIE D D, FICKE A, MALDONADO R S, LYNCH S T, NELSON E B, 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 15(1): 25-36.
- HUANG Z Q, WAN X H, HE Z M, YU Z P, WANG M H,

- HU Z H, YANG Y S, 2013. Soil microbial biomass, community composition and soil nitrogen cycling in relation to tree species in subtropical china. *Soil Biology and Biochemistry*, 62(5): 68–75.
- LEVINE J M, VILA M, ANTONIO C M D, DUKES J S, GRIGULIS K, LAVOREL S, 2003. Mechanisms underlying the impacts of exotic plant invasions. *The Royal Society*, 270: 775–781.
- LU P, SANG W, MA K, 2005. Progress and prospects in research of an exotic invasive species, *Eupatorium adenophorum*. *Acta Phytocologica Sinica*, 29(6): 1029–1037.
- MCGUIRE K L, ZAK D R, EDWARDS I P, BLACKWOOD C B, UPCHURCH R, 2010. Slowed decomposition is biotically mediated in an ectomycorrhizal, tropical rain forest. *Oecologia*, 164(3): 785–795.
- OLSSON S, ALSTROM S, 2000. Characterisation of bacteria in soils under barley monoculture and crop rotation. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(10): 1443–1451.
- RUI W, WANG Y Z, 2010. Invasion dynamics and potential spread of the invasive alien plant species *Ageratina adenophora* (Asteraceae) in China. *Diversity and Distributions*, 12(4): 397–408.
- SANG W, ZHE L, AXMACHER J C, 2010. Invasion pattern of *Eupatorium adenophorum*, Spreng in southern China. *Biological Invasions*, 12(6): 1721–1730.
- SUYAL D C, YADAV A, SHOUCHE Y, GOEL R, 2015. Bacterial diversity and community structure of Western Indian Himalayan red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizosphere as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Biologia*, 70(3): 305–313.
- VEGA-AVILA A D, GUMIERE T, ANDRADE P A M, LIMA-PERIM J E, DURRER A, BAIGORI M, VAZQUEZ F, ANDREOTE F D, 2015. Bacterial communities in the rhizosphere of *Vitis vinifera* L. cultivated under distinct agricultural practices in Argentina. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 107(2): 575–588.
- YU W Q, WAN F H, HE X H, LIU W Z, LIU W X, ZHANG L L, 2014. Soil microbes enhance competition ability of the exotic *Ageratina adenophora* sprengel against native plant species. *Journal of Biosafety*, 23(3): 156–164.
- YU X J, YU D, LU Z J, MA K P, 2005. A new mechanism of invader success: exotic plant inhibits natural vegetation restoration by changing soil microbe community. *Chinese Science Bulletin*, 50(11): 1105–1112.
- ZHANG B, LIANG C, HE H B, ZHANG X D, 2013. Variations in soil microbial communities and residues along an altitude gradient on the Northern slope of Changbai Mountain, China. *PLoS ONE*, 8(6): e66184.
- ZHANG F J, LI Q, CHEN F X, XU H Y, INDERJIT, WAN F H, 2017. Arbuscular mycorrhizal fungi facilitate growth and competitive ability of an exotic species *Flaveria bidentis*. *Soil Biology and Biochemistry*, 115: 275–284.
- ZHANG F J, LI Q, ELLEN H Y, CHEN X, SHI Q, WAN F H, 2018. AM fungi facilitate the competitive growth of two invasive plant species, *Ambrosia artemisiifolia* and *Bidens Pilosa*. *Mycorrhiza*, 28(8): 703–715.
- ZHOU J Z, BRUNS M A, TIEDJE J M, 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2): 316–322.
- ZHU X Z, LI Y P, FENG Y L, MA K P, 2017. Response of soil bacterial communities to secondary compounds released from *Eupatorium adenophorum*. *Biological Invasions*, 19(5): 1471–1481.

(责任编辑:郭莹)

<http://www.jbscn.org>