

林昕, 董强, 王平, 等. 氮、磷添加对青藏高原高寒草甸丛枝菌根真菌群落的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(2): 95-103.
LIN Xin, DONG Qiang, WANG Ping, et al. Effects of nitrogen and phosphorus additions on arbuscular mycorrhizal fungi community in the alpine meadow in Qinghai-Tibetan plateau[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(2): 95-103.

氮、磷添加对青藏高原高寒草甸丛枝菌根真菌群落的影响

林 昕¹, 董 强¹, 王 平¹, 姜丽丽², 胡嘉丽¹, 汪诗平^{2,3}, 纪宝明¹

(1 北京林业大学 草业与草原学院, 北京 100083; 2 中国科学院 青藏高原研究所/中国科学院 高寒生态国家重点实验室, 北京 100101; 3 中国科学院 青藏高原地球科学卓越创新中心, 北京 100101)

摘要:【目的】探究青藏高原高寒嵩草草甸生态系统中丛枝菌根真菌 (AMF) 群落对氮、磷添加的响应及其驱动因子, 补充目前高寒草甸 AMF 对施肥响应研究的不足。【方法】通过常规分析和高通量 (Illumina-Miseq) 测序, 分析氮 (0、7.5、15.0 g·m⁻²)、磷 (0、7.5、15.0、30.0 g·m⁻² P₂O₅) 添加 3 年对青藏高原高寒小嵩草草甸土壤化学性质、AMF 侵染率、OTU 丰度、Shannon 多样性指数和 AMF 群落组成的影响。【结果】测序共发现 36 个 AMF 的 OTU, 归属于 7 个科。氮、磷的添加及其交互作用对 AMF 侵染率、OTU 丰度和 Shannon 多样性指数均无显著影响。相对于低施氮处理, 高施氮处理显著降低球囊霉门的相对丰度。土壤有机碳、硝态氮、有效磷和全磷含量均是影响 AMF 群落的土壤因子。【结论】青藏高原高寒嵩草草甸根系 AMF 群落不受氮、磷添加的影响, 群落分布与土壤因子有显著相关性。

关键词: 丛枝菌根真菌; 微生物群落; 氮添加; 磷添加; 高寒草甸; 青藏高原
中图分类号: Q938.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)02-0095-09

Effects of nitrogen and phosphorus additions on arbuscular mycorrhizal fungi community in the alpine meadow in Qinghai-Tibetan plateau

LIN Xin¹, DONG Qiang¹, WANG Ping¹, JIANG Lili², HU Jiali¹, WANG Shiping^{2,3}, JI Baoming¹
(1 College of Grassland Science, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2 Key Institute of Tibetan Plateau, Chinese Academy of Sciences/Laboratory of Alpine Ecology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3 Center for Excellence in Tibetan Plateau Earth Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the responses of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) community to nitrogen and phosphorus additions and the driven factors in the Qinghai-Tibetan alpine meadow, and have a better knowledge of the effects of fertilization on alpine meadow AMF community. 【Method】Through regular analyses and high-throughput sequencing (Illumina Miseq), we studied the effects of nitrogen addition (0, 7.5, 15.0 g·m⁻²) and phosphorus addition (0, 7.5, 15.0 and 30.0 g·m⁻² P₂O₅) for three year on soil chemical property, AMF colonization rate, OTU richness, Shannon diversity index and AMF community composition in Qinghai-Tibetan alpine meadow. 【Result】The 36 AMF OTUs from seven families were detected. The addition of

nitrogen, phosphorus and their interaction had no influence on AMF colonization rate, OTU richness and Shannon diversity index. Compared with low nitrogen addition treatment, high nitrogen input treatment significantly decreased the relative abundance of Glomeraceae. Soil organic carbon, nitrate nitrogen, available phosphorus and total phosphorus contents were the factors which impacted AMF community. 【Conclusion】 Root AMF community in Qinghai-Tibetan alpine *Kobresia* meadow wasn't affected by nitrogen or phosphorus addition. However, the distribution of community was significantly correlated with edaphic factors.

Key words: arbuscular mycorrhizal fungi; microbial community; nitrogen addition; phosphorus addition; alpine meadow; Qinghai-Tibetan plateau

丛枝菌根真菌 (Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) 是属于球囊霉门 Glomeromycota 的专性共生微生物, 可以与陆地 80% 以上的植物根系共生。AMF 自身生长所需的碳源完全依赖宿主植物, 作为回馈, 它们可以帮助宿主吸收矿质营养, 提高宿主植物对生物及非生物胁迫的抗性^[1]。研究发现 AMF 对植物种群、群落甚至是草地生态系统都有重要的调控作用^[2-4]。

高寒草甸是青藏高原东南部主要的草地类型^[5], 其主要建群植物为莎草科嵩草属的小嵩草 *Kobresia pygmaea*、矮嵩草 *K. humilis*、线叶嵩草 *K. capillifolia* 和藏嵩草 *K. tibetica* 等^[6-7], 因此也称作高寒嵩草草甸。莎草科植物一直被认为是非丛枝菌根植物, 但有研究发现在青藏高原 AMF 可以与嵩草属植物共生^[8-9], 并对土壤团聚体的形成起重要作用^[10]。基于 AMF 在草地生态系统中的重要性以及高寒嵩草草甸在青藏高原草地中所占的比例, 研究高寒嵩草草甸生态系统中 AMF 的群落构建及动态对深入理解青藏高原草地土壤-植被相互作用具有重要意义。

近几十年来, 受全球气候变暖和人类活动加剧的影响, 青藏高原约 1/3 的草地发生了不同程度的退化^[11]。施肥是退化草地恢复的有效方式之一, 目前关于养分添加 (主要是氮和磷) 能否及如何影响高寒草甸 AMF 群落的研究相对稀少, 并且仅限于海拔不超过 3 500 m 的区域^[12-14], 不能代表海拔为 3 200~5 200 m 的青藏高原高寒嵩草草甸^[7]。目前基于传统形态鉴别^[15] 和分子测序^[16] 的研究表明, 随海拔提升, AMF 侵染率、孢子数量和物种丰度下降, AMF 群落组成也随之变化。不同海拔高度 AMF 群落对施肥的响应可能不同, 为了更全面地认识高寒草甸, 有必要选择海拔更高的区域进行研究。

本试验选取海拔约 4 500 m 的高寒嵩草草甸施肥样地, 研究不同氮、磷添加对青藏高原高寒嵩草草甸 AMF 群落的影响及潜在驱动因子。本研究的核心科学问题为探究高寒嵩草草甸根系 AMF 群落

对氮、磷添加的响应机制, 及在添加氮、磷条件下主导 AMF 群落变化的因素。

1 研究区概况和方法

1.1 研究区概况

研究样地位于中国科学院青藏高原研究所那曲生态环境观测站 (E91°12'~93°02', N30°31'~31°55'), 属于西藏那曲东南部, 海拔 4 480 m, 年平均气温 -2.1 °C, 年平均降水 406.2 mm, 高原山地气候, 土壤类型为始成土, 主要植物种类有小嵩草、矮嵩草和藏嵩草 *Carex thibetica* 等。

1.2 样地设计及取样

2013 年设置了 48 个 5 m × 5 m 的小区, 完全随机设计, 3 个施氮梯度, 4 个施磷梯度, 4 次重复。施用的氮肥为尿素, 各处理每年施用量分别为 0、7.5、15.0 g·m⁻², 分别记为 N0、N1 和 N2。施用的磷肥为过磷酸钙, 有效成分为 P₂O₅, 各处理每年 P₂O₅ 施用量分别为 0、7.5、15.0、30.0 g·m⁻², 分别记为 P0、P1、P2 和 P3。每年 7 月末施肥 1 次。

2016 年 8 月 18 日, 在每个小区随机挑选 1 个植被覆盖度相似的点作为样点。用土钻从每个样点均取深 20 cm、直径 8 cm 的土块。将土块过 2 mm 筛, 去除土和石块, 将保留的根系装入自封袋作为 1 份样品, -20 °C 保存。另取部分过筛的土装入自封袋, 4 °C 保存。共计取得 48 份根系样品和 48 份土壤样品, 冷藏运送至北京林业大学草地资源与生态实验室。在进行后续试验分析前, 将所有根系样品室温解冻, 然后用清水洗净。

1.3 土壤化学成分分析

取适量土壤样品进行土壤化学成分分析。土壤有机碳用重铬酸钾滴定法^[17] 测定; 土壤全氮用凯氏定氮法^[18] 测定; 土壤铵态氮和硝态氮均用 1 mol·L⁻¹ 的氯化钾溶液浸提, 然后用紫外分光光度法^[19] 测定; 土壤全磷和有效磷分别用高氯酸-硫酸和碳酸氢钠浸提, 并用钼-锑比色法^[20-21] 测定; pH 在水土质量比为 2.5:1 的条件下测量。

1.4 丛枝菌根真菌侵染率测定

根据 Brundrett 等^[22-23] 的方法, 先从每份根系样品中剪取若干长 1.5 cm 的幼嫩根段, 用台盼蓝染色。染色后在每份样品中挑出 30 个根段, 切成 1 cm 根段, 然后将每 10 个根段平行地放置在载玻片上, 滴加乳酸甘油制片, 每份样品制作 3 个玻片。在 200×显微镜下根据 McGonigle 等^[24] 的方法测定 AMF 侵染率。

1.5 丛枝菌根真菌 DNA 提取、扩增及测序

在每份根系样品中, 剪取 40 根长 1 cm 的幼嫩根段, 用 CTAB 法^[25] 提取其中的 DNA。提取出的 DNA 用无菌去离子水稀释 20 倍作为 DNA 原液, 然后进行巢式 PCR 扩增。2 轮 PCR 的反应体系均为 25 μ L: 2 $\times$ Pfu PCR MasterMix (KP201) 12.5 μ L, 无菌去离子水 8.5 μ L, DNA 模板 2 μ L 以及 2 个引物各 1 μ L。第 1 轮 PCR 使用的引物为 NS31(5'-TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3') 和 AML2(5'-GAACCCAAACACTTTGGTTTCC-3'), 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预热 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。第 1 轮 PCR 的产物稀释至 1/10 作为第 2 轮 PCR 的模板。第 2 轮 PCR 使用的引物为 AMV4.5NF(5'-AAGC TCGTAGTTGAATTTTCG-3') 和 AMDGR(5'-CCCAACTATCCCTATTAATCAT-3')^[26], 其中 AMDGR 的 5'端带有由 12 个碱基组成的 barcode。第 2 轮 PCR 反应条件与第 1 轮 PCR 相同, 所得的产物用 10 g·L⁻¹ 2 $\times$ TAE 的琼脂糖凝胶进行电泳 (电压 120 V, 时间 30 min) 检测。若样品有目标 DNA 条带 (约 280 bp) 检出, 取 4 μ L 第 2 轮 PCR 模板用 2 倍的反应体系进行第 2 轮 PCR。若样品无目标条带检出, 用该样品的 DNA 原液重复巢式 PCR, 若 2 次重复均无目标条带, 则去除该样品。根据此方法 N1P1 处理中的 1 个样品无条带, 去除后剩余 47 个样品。切取含目标条带的凝胶, 使用 DNA 胶纯化试剂盒 (Axygen, 美国) 进行 DNA 纯化。纯化后的 DNA 使用 Nanodrop 8000 超微量分光光度计测定浓度, 根据测定的浓度用移液枪从每个样品中吸取含 100 ng DNA 的溶液混合至 1 个离心管, 送至中国科学院成都生物研究所在 Illumina Miseq 平台进行高通量测序。

1.6 生物信息学分析

测序得到的原始数据使用 QIIME^[27] 进行分析。首先对数据进行质量控制, 最大错误期望=0.5, 最短序列长度=200, 然后依次去除重复、chimeras 和 singletons。使用 UPARSE-OTU 算法和 Silva 数据库, 依据 97% 的相似度阈值划分代表 OTU 并制

作 OTU 表。在 Excel 中除去不属于球囊霉门、出现的样本数少于 3 以及序列数小于总序列量 0.01% 的 OTU, 并删除序列数小于总序列 1% 的样品以降低误差。对所有样品根据最小的样本序列量进行重新抽样, 以减小样本量不同造成的差异。此外, 将代表 OTU 序列上传至 NCBI, 与 GenBank 的已有序列进行比对, 获得相近的参考序列。使用代表序列和参考序列在 MEGA 7 中使用 p-distance 模型, 在 bootstrap 值为 1 000 下构建邻接树, 直观查看代表 OTU 的系统发生情况。本研究获得的代表 OTU 序列均上传至欧洲核苷酸档案库, 序列号为 LR535994~LR536029。

1.7 统计分析

统计 OTU 数量作为 OTU 丰度, 并计算 AMF 各科在各样品和各处理中的相对丰度。在 R(3.2.2) 中使用 Vegan 包中 diversity 功能计算每个样品的 Shannon 多样性指数。

进行方差分析前, 将数据进行转换以符合数据分布的正态性和方差同质性。其中, 对土壤化学成分、OTU 丰度和 Shannon 多样性指数数据进行对数转换, 侵染率和 AMF 科相对丰度数据作反正弦平方根转换。转换后的数据在 JMP 11 中进行双因素方差分析, 分析氮、磷添加是否显著影响以上数据, 具有显著差异 ($P<0.05$) 的结果使用 Tukey's HSD 检验进行多重比较。

在群落分析前, 先应用 R 对 OTU-样品矩阵进行 Hellinger 转换以减少稀有 OTU 的影响, 然后用 vegdist 功能将矩阵转化为 Bray-Curtis 矩阵。在 R 中使用 Vegan 包中的 adonis 功能进行 PerMANOVA 分析, 研究施氮、磷和其交互作用对 AMF 群落组成的影响。将土壤化学成分数据作为环境变量导入 R 并转化为 Euclidean 矩阵, 与之前的群落矩阵一起进行 Mantel 分析, 以研究土壤化学成分与 AMF 群落组成的关系。

最后, 进行排序分析以研究不同处理 AMF 的群落分布情况。首先用原始的 OTU-样品矩阵进行去趋势对应分析, 根据排序轴长结果进一步使用典范对应分析, 并用 envfit 功能进行 Monte Carlo 检验找出与 AMF 群落分布有显著相关的环境因子。最终使用 ggplot 包进行画图, 直观显示各处理下 AMF 群落分布及其和环境因子的关系。

2 结果与分析

2.1 土壤化学成分

方差分析得出, 不同施氮处理铵态氮和硝态氮含量差异均极显著 ($P<0.001$); 不同施磷处理全磷和

有效磷含量也有极显著 ($P<0.001$) 差异;氮、磷添加的交互作用对硝态氮和有效磷含量有显著 ($P=0.021$, $P=0.040$) 影响 (表 1)。其中, N2 处理铵态氮和硝态氮含量高于 N0 和 N1 处理; P3 处理全磷和有效磷量高于其余施磷处理, P2 处理有效磷含量高于 P0 处理 (表 2)。氮、磷添加及其交互作用未对土壤有机碳、全氮和 pH 产生显著影响 (表 1)。

表 1 不同施肥处理土壤化学成分含量差异显著性分析

Table 1 Significance analyzes of soil chemical component content differences in different fertilization treatments						
指标 Index	氮添加		磷添加		氮、磷添加交互作用	
	Nitrogen addition		Phosphorus addition		Interaction between nitrogen and phosphorus additions	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
有机碳 Organic carbon	0.610	0.549	0.940	0.431	1.849	0.117
全氮 Total nitrogen	0.737	0.486	0.343	0.794	0.674	0.672
铵态氮 Ammonium nitrogen	15.662	<0.001	1.094	0.367	1.939	0.105
硝态氮 Nitrate nitrogen	21.780	<0.001	2.711	0.061	2.964	0.021
全磷 Total phosphorus	0.304	0.740	17.135	<0.001	0.389	0.881
有效磷 Available phosphorus	0.502	0.610	33.642	<0.001	2.509	0.040
pH	1.336	0.276	0.329	0.804	0.948	0.473

表 2 不同施肥处理试验样地的土壤化学成分含量¹⁾

Table 2 Soil chemical component contents of the experiment field in different fertilization treatments								
处理 Treatment		w/%			w/(mg·kg ⁻¹)			pH
N	P	有机碳 Organic carbon	全氮 Total nitrogen	全磷 Total phosphorus	铵态氮 Ammonium nitrogen	硝态氮 Nitrate nitrogen	有效磷 Available phosphorus	
N0	P0	4.79±0.45a	0.26±0.01a	0.040±0.001cd	2.53±0.77b	7.49±1.43bc	2.72±0.49d	6.74±0.08a
	P1	3.61±0.79a	0.21±0.06a	0.040±0.006cd	3.91±2.16b	5.23±1.25bc	6.39±2.34cd	6.77±0.11a
	P2	3.25±0.58a	0.23±0.04a	0.044±0.007abcd	2.06±0.27b	6.26±1.90bc	13.64±7.19bcd	6.66±0.06a
	P3	3.69±0.65a	0.27±0.09a	0.057±0.012abc	2.15±1.37b	4.67±1.14c	21.78±4.00abc	6.65±0.12a
N1	P0	3.59±0.42a	0.22±0.01a	0.038±0.001d	1.83±0.73b	15.32±5.27bc	2.17±1.35d	6.69±0.08a
	P1	3.35±0.40a	0.24±0.01a	0.046±0.003abcd	2.25±1.07b	6.96±0.95bc	9.73±0.83bcd	6.47±0.15a
	P2	3.77±0.47a	0.22±0.04a	0.042±0.004bcd	6.07±4.38b	9.00±0.49bc	5.49±2.61d	6.73±0.19a
	P3	3.83±0.73a	0.24±0.04a	0.060±0.010ab	6.28±5.37b	5.79±0.91bc	26.02±13.21ab	6.67±0.23a
N2	P0	2.98±0.32a	0.19±0.01a	0.038±0.003d	27.07±11.00a	35.66±15.70ab	2.28±0.12d	6.64±0.11a
	P1	3.57±0.94a	0.23±0.08a	0.044±0.004abcd	13.72±9.81ab	24.76±22.05bc	4.54±1.96d	6.61±0.15a
	P2	3.29±0.39a	0.24±0.05a	0.047±0.003abcd	7.13±0.85b	14.94±3.58bc	11.30±5.63bcd	6.61±0.05a
	P3	4.24±1.50a	0.23±0.03a	0.060±0.010a	15.41±11.90ab	59.55±23.70a	35.21±5.05a	6.60±0.07a

1)表中数据为平均值±标准差;同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$, Tukey's HSD法);N0、N1、N2指氮施用量为0、7.5、15.0 g·m⁻²的处理;P0、P1、P2和P3指磷施用量为0、7.5、15.0、30.0 g·m⁻²的处理

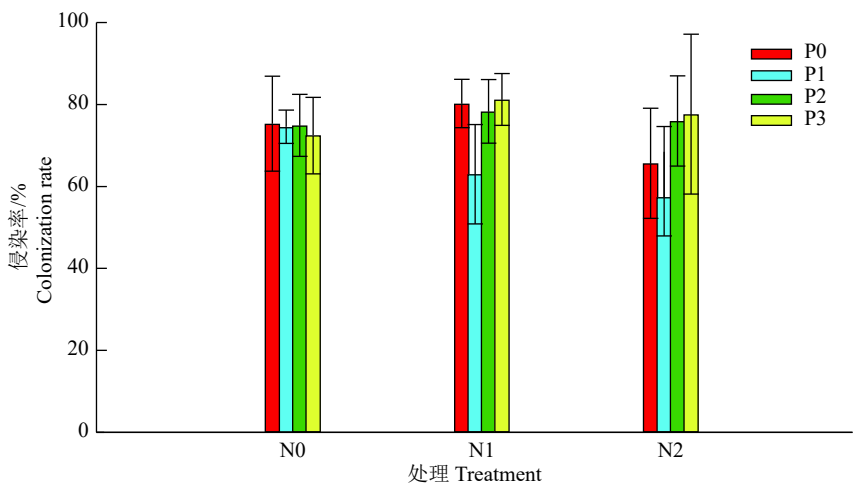
1) Data in the table were mean value ± standard deviation; Different lowercase letters in the same column indicated significant differences ($P<0.05$, Tukey's HSD test); N0, N1, N2 indicated nitrogen application amount 0, 7.5, 15.0 g·m⁻²; P0, P1, P2, P3 indicated phosphorus application amount 0, 7.5, 15.0, 30.0 g·m⁻²

2.2 丛枝菌根真菌侵染率

如图 1 所示, 根系样品 AMF 侵染率平均值为 73.1%。方差分析结果表明, 氮、磷的施加及其交互作用对 AMF 侵染率无显著 ($P=0.350$, $P=0.119$, $P=0.562$) 影响。

2.3 测序总体结果

测序数据除杂后, 剩余 43 个样品, 共获得 234 041 条 AMF 序列。每个样品序列数从 297 至 15 397 不等。将所有样品重新抽样至样本量为 297 后, 获得 36 个 OTU, 每个样品的 OTU 数量从 1 至 12 个不

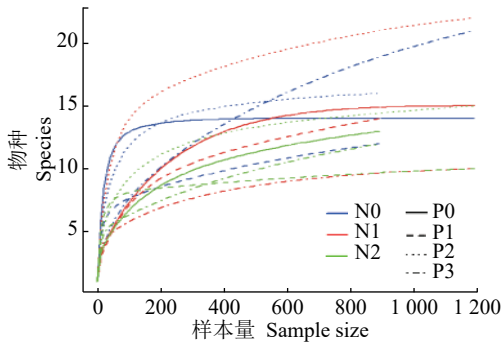


N0、N1、N2 指氮施用量为 0、7.5、15.0 g·m⁻² 的处理; P0、P1、P2 和 P3 指磷施用量为 0、7.5、15.0、30.0 g·m⁻² 的处理
N0, N1, N2 indicated nitrogen application amount 0, 7.5, 15.0 g·m⁻²; P0, P1, P2, P3 indicated phosphorus application amount 0, 7.5, 15.0, 30.0 g·m⁻²

图 1 不同施肥处理下丛枝菌根真菌感染率

Fig. 1 Arbuscular mycorrhizal fungal colonization rates in different fertilization treatments

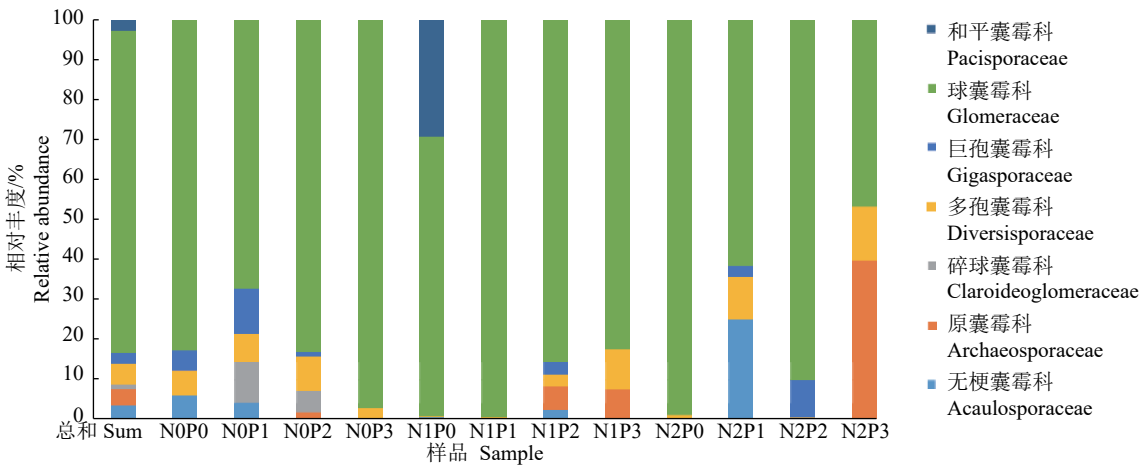
等, 平均值为 5.6 个。根据稀释曲线 (图 2) 可以看出, 重新抽样后 N0P2、N1P0、N1P3、N2P2 和 N2P1 对应的曲线末端趋于平滑, 说明测序深度较为饱和。经比对, 所有 AMF 的 OTU 分属 7 个科, 其中球囊霉科有 27 个 OTU, 10 285 条序列, 占总序列的 80.5%; 多孢囊霉科 Diversisporaceae 有 3 个 OTU, 666 条序列, 占总序列的 5.2%; 碎球囊霉科 Claroideoglomeraceae 有 2 个 OTU, 146 条序列, 占总序列的 1.1%; 无梗囊霉科 Acaulosporaceae、原囊霉科 Archaeosporaceae、巨孢囊霉科 Gigasporaceae 和和平囊霉科 Pacisporaceae 各有 1 个 OTU, 序列数分别为 441、532、351 和 350 条, 共占总序列的 13.1%(图 3)。根据 OTU 代表序列和参考序列构建的邻接树如图 4 所示。



N0、N1、N2 指氮施用量为 0、7.5、15.0 g·m⁻² 的处理; P0、P1、P2 和 P3 指磷施用量为 0、7.5、15.0、30.0 g·m⁻² 的处理
N0, N1, N2 indicated nitrogen application amount 0, 7.5, 15.0 g·m⁻²; P0, P1, P2, P3 indicated phosphorus application amount 0, 7.5, 15.0, 30.0 g·m⁻²

图 2 不同施肥处理下分子测序的稀释曲线

Fig. 2 Rarefaction curve of sequencing samples in different fertilization treatments



N0、N1、N2 指氮施用量为 0、7.5、15.0 g·m⁻² 的处理; P0、P1、P2 和 P3 指磷施用量为 0、7.5、15.0、30.0 g·m⁻² 的处理
N0, N1, N2 indicated nitrogen application amount 0, 7.5, 15.0 g·m⁻²; P0, P1, P2, P3 indicated phosphorus application amount 0, 7.5, 15.0, 30.0 g·m⁻²

图 3 不同施肥处理下丛枝菌根真菌各科的相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of different arbuscular mycorrhizal fungal families in different fertilization treatments

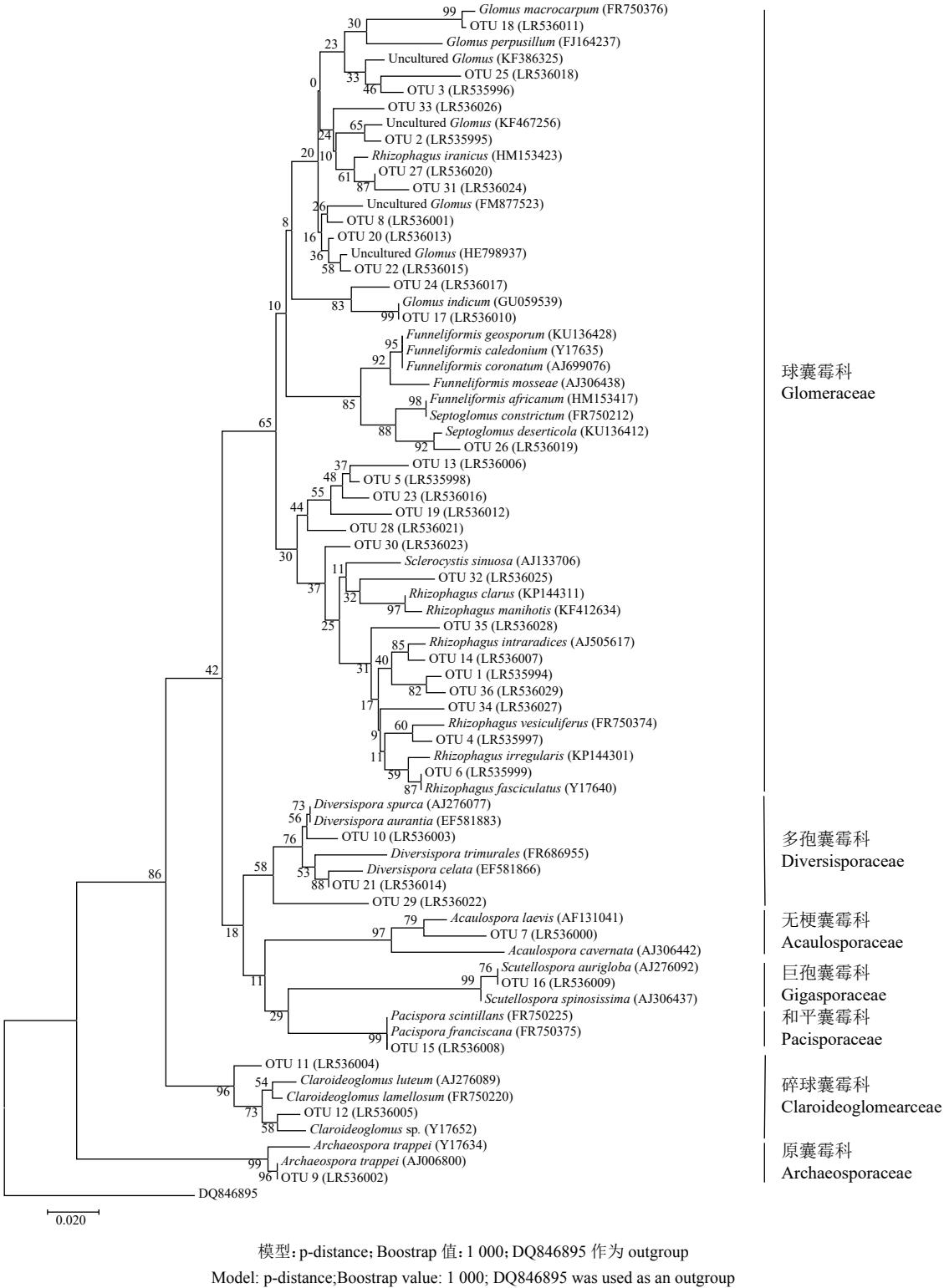
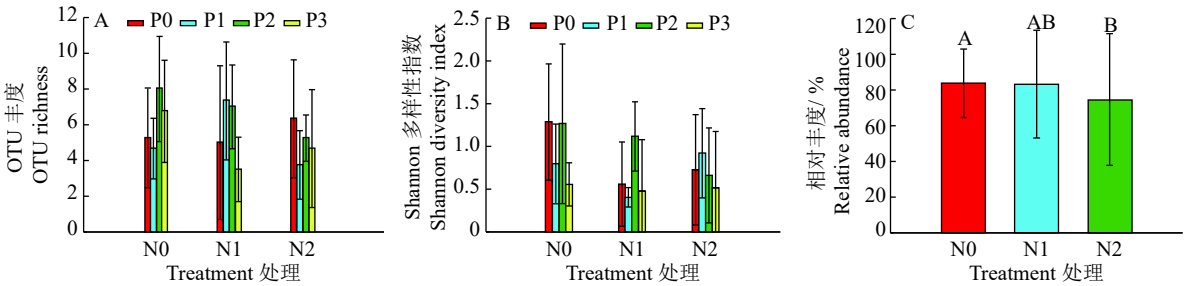


Fig. 4 Neighbor-joining tree constructed based on representative sequences of 36 arbuscular mycorrhizal fungal OTUs and their reference sequences

2.4 氮、磷添加对丛枝菌根真菌群落的影响

方差分析结果显示, 氮、磷添加及其交互作用对 OTU 丰度和 Shannon 多样性指数无显著影响 (图 5A、5B)。但施氮对球囊霉科的相对丰度有显著影响 ($P<0.001$), N2 处理球囊霉科的相对丰度显著低于

N1(图 5C)。
PerMANOVA 结果表明氮、磷添加处理及其交互作用对 AMF 群落组成无显著影响 ($P = 0.680$, $P = 0.473$, $P = 0.589$)。Mantel 分析结果显示 AMF 群落组成与有机碳含量和硝态氮含量有显著正相关



不同柱子上不同大写字母表示在 $P<0.001$ 水平差异显著 (Tukey's HSD 检验)
Different capital letters on different columns indicated significant differences at $P<0.001$ level (Tukey's HSD test)

图 5 不同施肥处理丛枝菌根真菌 OTU 丰度、Shannon 多样性指数及球囊霉科相对丰度

Fig. 5 OTU richness, Shannon diversity index of arbuscular mycorrhizal fungi and relative abundance of Glomeraceae in different fertilization treatments

($r=0.176$, $P=0.110$; $r=0.142$, $P=0.041$) 关系。此外, Monte Carlo 结果表明有机碳、硝态氮、全磷和有效磷含量均对 AMF 群落结构有显著影响 ($r=0.04$, $P=0.001$; $r=0.327$, $P=0.013$; $r=0.185$, $P=0.025$; $r=0.188$, $P=0.020$)。这 4 个环境因子在典范对应分析中对排序结果的解释量为 11.70%, 第 1 轴和第 2 轴的解释量分别为 6.13% 和 2.61%。(图 6)。

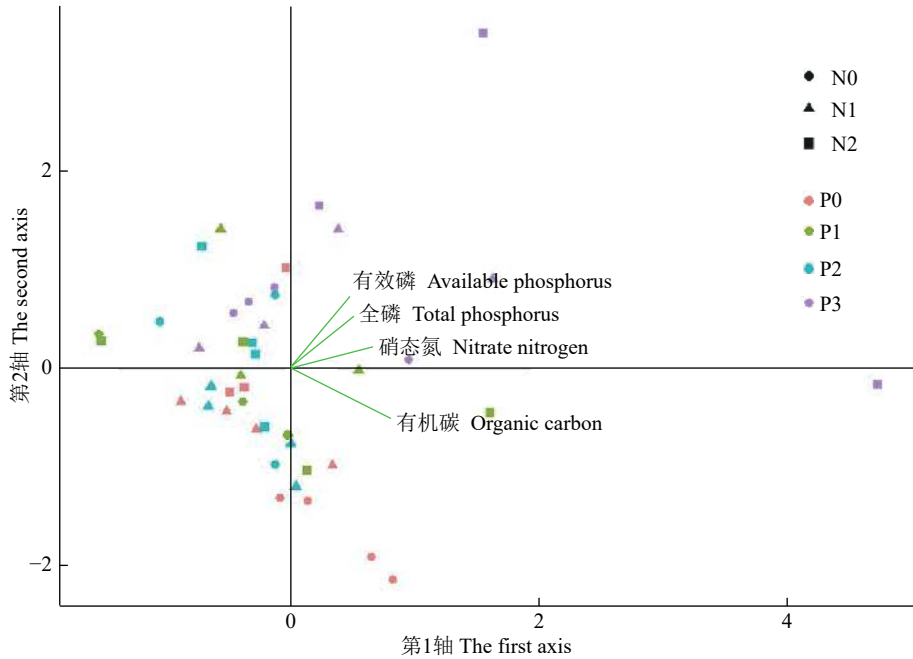


图 6 不同施肥处理丛枝菌根真菌群落以及显著环境变量的典范对应分析图

Fig. 6 Canonical correspondence analysis plot of arbuscular mycorrhizal fungal community distribution and significant environmental variables among different fertilization treatments

3 讨论与结论

在农田和天然草地生态系统中, 施加氮和磷会降低 AMF 侵染率、OTU 丰度和多样性, 改变根系和根际土壤中 AMF 的群落结构^[28-29]。研究认为出现这种现象的原因是土壤养分的增加使植物更多依靠自身根系去吸收营养, 降低对帮助其吸收养分的微生物的依赖^[30]。本研究发现, 施氮显著提高了土壤中铵态氮和硝态氮的含量, 施磷显著增加了土壤中全磷和有效磷的含量, 但氮、磷的施加对 AMF

侵染率、OTU 丰度、多样性以及群落组成均无显著影响。因此, 本研究的结果与此前在其他生态系统下的研究结果存在差异^[28-29], 该差异可能是由以下原因造成的。

首先, 差异可能是海拔不同造成的。目前相关研究^[12-14]的海拔不超过 3 500 m, 低于本试验样地的海拔 4 480 m。海拔会显著影响 AMF 的群落和功能, Gai 等^[15]和 Shi 等^[31]通过形态学方法发现不同海拔条件下 AMF 侵染率、孢子密度以及菌丝密度

都会有显著变化;Liu 等^[16] 和 Li 等^[32] 通过分子测序手段发现不同海拔条件下 AMF 群落组成有显著差异。本研究与此前研究的海拔不同,气候、植被及土壤条件都会有不同,进而导致 AMF对氮、磷添加的差异性响应。

第二,在高寒地区 AMF 不仅能帮助植物进行养分吸收,同时也可帮助植物应对环境胁迫。因此即使在施肥条件下植物不需要 AMF 来帮助其获取养分,还是要与 AMF 保持共生关系应对胁迫。Xiang 等^[13] 在海拔 3 220 m 的青藏高原高寒草地施肥 3 年,发现同时添加氮和磷时 AMF的 OTU 丰度和多样性均显著高于对照,也高于氮、磷单独添加时的水平。Chen 等^[33] 研究认为,虽然在养分充足的条件下,植物在营养吸收上降低了对 AMF 的依赖,然而,植物依然需要 AMF 来帮助其对抗环境胁迫,尤其是球囊霉科可以提高宿主抗寒性。在本研究的高寒草甸生态系统中,一方面氮、磷的添加使得植物群落降低了对 AMF 吸收养分的依赖,另一方面植物群落却增加了依靠 AMF 来对抗胁迫的需要。因此,2 个效应综合使得在氮、磷添加的情况下 AMF 的 OTU 丰度、多样性和群落组成未受显著影响。

另一个可能引起差异的原因是样品内及样品间的差异较大,影响了氮、磷添加的效应。从稀释曲线可以看出,个别样品的曲线在终点处仍在上升,说明其测序深度未达到饱和,此时增加取样量可能会有更多的 OTU 出现。同时,通过典范对应分析图可以直观地发现,N2P3 处理 3 次重复的 AMF 群落分布距离较大,该处理 3 次重复的 AMF 群落的差异是所有处理的重复间差异最大的。基于样本内的误差,本试验结果存在一定限制性。

本研究中,PerMANOVA 分析发现,施加氮、磷不影响 AMF 群落组成,但通过 Mantel 分析发现 AMF 群落的组成与有机碳和硝态氮含量有显著的正相关关系。典范对应分析的结果表明有机碳、硝态氮、全磷和有效磷含量与 AMF 群落的分布有显著的正相关关系,其中有机碳与 AMF 群落分布的相关性最大。有机碳主要对低磷条件 (P0 和 P1 处理)AMF 群落有影响,硝态氮、全磷和有机碳主要对高磷条件 (P3 处理)AMF 群落有影响。相关研究也表明,土壤有机质、硝态氮和有效磷均是对高寒草甸 AMF 群落有显著影响的土壤成分^[34-35]。

Zheng 等^[34] 发现施氮能改变 AMF 群落,但不是通过直接作用,而是间接地通过改变土壤其他成分 (如有机碳) 和植物群落来影响 AMF 群落。土壤成分也可以直接或间接地影响微生物群落^[36-37]。因

此可以解释本研究中施肥未对 AMF 群落产生影响,但特定的土壤因子与 AMF 群落分布有显著相关性。

综上所述,基于青藏高原 4 500 m 海拔高寒草甸的研究发现,氮、磷添加对 AMF 的侵染率、OTU 丰度和多样性无显著影响。该发现回答了本研究要明确的第 1 个核心科学问题,即青藏高原高寒嵩草草甸根系中的 AMF 群落不受氮、磷添加的影响,与海拔较低的 AMF 群落对氮、磷的响应不同;对第 2 个核心科学问题,影响青藏高原高寒嵩草草甸根系 AMF 群落的因子主要是有机碳和硝态氮含量,全磷和有效磷含量是次要因子。未来研究还需要系统选取不同海拔的样地,以获取青藏高原不同海拔高寒草甸 AMF 群落对施肥的响应。另外,在全面剖析 AMF 群落变化规律及驱动机制的基础上,亟需研究 AMF 群落变化如何反馈影响地上植被的个体生长与群落动态,探索高寒草地退化及恢复演替中的地下生态过程及机理。

参考文献:

[1] SMITH S E, READ D J. Mycorrhizal symbiosis[M]. 3rd ed. Salt Lake City: American Academic Press, 2008.

[2] van der HEIJDEN M G A, BARDGETT R D, van STRAALEN N M. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems[J]. *Ecol Lett*, 2008, 11(3): 296-310.

[3] SMITH M D, HARTNETT D C, WILSON G W T. Interacting influence of mycorrhizal symbiosis and competition on plant diversity in tallgrass prairie[J]. *Oecologia*, 1999, 121(4): 574-582.

[4] van der HEIJDEN M G A, WIEMKEN A, SANDERS I R. Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occurring plant[J]. *New Phytol*, 2003, 157(3): 569-578.

[5] MIEHE G, MLEHE S, KAISER K. Status and dynamics of the *Kobresia pygmaea* ecosystem on the Tibetan plateau[J]. *Ambio*, 2008, 37(4): 272-279.

[6] 杨元合, 饶胜, 胡会峰, 等. 青藏高原高寒草地植物物种丰富度及其与环境因子和生物量的关系[J]. *生物多样性*, 2004, 12(1): 200-205.

[7] 王长庭, 龙瑞军, 丁路明. 青藏高原高寒嵩草草甸基本特征的研究[J]. *草业科学*, 2004, 21(8): 16-19.

[8] MUTHUKUMAR T, UDAIYAN K, SHANMUGHAVEL P. Mycorrhiza in sedges: An overview[J]. *Mycorrhiza*, 2004, 14(2): 65-77.

[9] GAI J P, CAI X B, FENG G, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with sedges on the Tibetan plateau[J]. *Mycorrhiza*, 2006, 16(3): 151-157.

[10] LI X, ZHANG J, GAI J, et al. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi of sedges to soil aggregation along an altitudinal alpine grassland gradient on the Tibetan Plat-

- eau[J]. *Environ Microbiol*, 2015, 17(8): 2841-2857.
- [11] 马玉寿, 郎百宁, 王启基. “黑土型”退化草地研究工作的回顾与展望[J]. *草业科学*, 1999, 16(2): 5-9.
- [12] LIU Y, SHI G, MAO L, et al. Direct and indirect influences of 8 yr of nitrogen and phosphorus fertilization on Glomeromycota in an alpine meadow ecosystem[J]. *New Phytol*, 2012, 194(2): 523-535.
- [13] XIANG X, GIBBONS S M, HE J S, et al. Rapid response of arbuscular mycorrhizal fungal communities to short-term fertilization in an alpine grassland on the Qinghai-Tibet Plateau[J]. *PeerJ*, 2016, 4. doi: 10.7717/peerj.2226.
- [14] SHEN D, YE C, HU Z, et al. Increased chemical stability but decreased physical protection of soil organic carbon in response to nutrient amendment in a Tibetan alpine meadow[J]. *Soil Biol Biochem*, 2018, 126: 11-21.
- [15] GAI J P, TIAN H, YANG F Y, et al. Arbuscular mycorrhizal fungal diversity along a Tibetan elevation gradient[J]. *Pedobiologia*, 2012, 55(3): 145-151.
- [16] LIU L, HART M M, ZHANG J, et al. Altitudinal distribution patterns of AM fungal assemblages in a Tibetan alpine grassland[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2015, 91(7). doi: 10.1093/femsec/fiv078.
- [17] PERRIER E R, KELLOGG M. Colorimetric determination of soil organic matter[J]. *Soil Sci*, 1960, 90(2): 104-106.
- [18] BRADSTREET R B. Kjeldahl method for organic nitrogen[J]. *Anal Chem*, 1965, 26(1). doi: 10.1021/ac60085a028.
- [19] NORMAN R J, EDBERG J C, STUCKI J W. Determination of nitrate in soil extracts by dual-wavelength ultraviolet spectrophotometry 1[J]. *Soil Sci Soc Am J*, 1985, 49(5): 1182-1185.
- [20] OLSEN S R. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate[M]. Washington: United States Department of Agriculture, 1954.
- [21] BRAY R H, KURTZ L T. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils[J]. *Soil Sci*, 1945, 59(1): 39-46.
- [22] BRUNDRETT M, BOUGHER N, DELL B, et al. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture[M]. Canberra: RePEc, 1996.
- [23] BRUNDRETT M C, MELVILLE L, PETERSON L. Practical methods in mycorrhiza research[M]. Guelph: Mycologue Publications, 2000.
- [24] MCGONIGLE T P, MILLER M H, EVANS D G, et al. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular: A arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *New Phytol*, 1990, 115(3): 495-501.
- [25] STEWART C N Jr., VIA L E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications[J]. *Biotechniques*, 1993, 14(5): 748-750.
- [26] LUMINI E, ORGIAZZI A, BORRIELLO R, et al. Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach[J]. *Environ microbiol*, 2010, 12(8): 2165-2179.
- [27] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nat methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [28] LIN X, FENG Y, ZHANG H, et al. Long-term balanced fertilization decreases arbuscular mycorrhizal fungal diversity in an arable soil in North China revealed by 454 pyrosequencing[J]. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(11): 5764-5771.
- [29] CAMENZIND T, HEMPEL S, HOMEIER J, et al. Nitrogen and phosphorus additions impact arbuscular mycorrhizal abundance and molecular diversity in a tropical montane forest[J]. *Glob Chang Biol*, 2014, 20(12): 3646-3659.
- [30] JOHNSON N C. Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae?[J]. *Ecol Appl*, 1993, 3(4): 749-757.
- [31] SHI L, YANG R, ZHANG J, et al. Evidence for functional divergence in AM fungal communities from different montane altitudes[J]. *Fungal Ecol*, 2015, 16: 19-25.
- [32] LI X, XU M, CHRISTIE P, et al. Large elevation and small host plant differences in the arbuscular mycorrhizal communities of montane and alpine grasslands on the Tibetan Plateau[J]. *Mycorrhiza*, 2018, 28(7): 605-619.
- [33] CHEN S, JIN W, LIU A, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) increase growth and secondary metabolism in cucumber subjected to low temperature stress[J]. *Sci Hort*, 2013, 160: 222-229.
- [34] ZHENG Y, KIM Y C, TIAN X F, et al. Differential responses of arbuscular mycorrhizal fungi to nitrogen addition in a near pristine Tibetan alpine meadow[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2014, 89(3): 594-605.
- [35] ZHENG Y, CHEN L, LUO C Y, et al. Plant identity exerts stronger effect than fertilization on soil arbuscular mycorrhizal fungi in a sown pasture[J]. *Microb Ecol*, 2016, 72(3): 647-658.
- [36] BÜNEMANN E K, SCHWENKE G D, van ZWIETEN L. Impact of agricultural inputs on soil organisms: A review[J]. *Aust J Soil Res*, 2006, 44(4): 379-406.
- [37] KERNAGHAN G. Mycorrhizal diversity: Cause and effect?[J]. *Pedobiologia*, 2005, 49(6): 511-520.