

不同施氮量影响青稞根际微生物群落多样性和组成研究

王生萍, 同 坚, 谈建鑫, 降志兵

(西藏自治区农牧科学院农业研究所, 西藏 拉萨 850000)

摘要: 植物根际微生物组成与植物健康发育有着密切的关系。为探究不同施氮量对青稞非根际土壤微生物群落组成及其多样性的影响, 以青稞新品系藏青 3000 品种为材料, 进行不同梯度氮肥施用量研究, 将氮肥施用量设置 4 个梯度, 在青稞成熟期采集非根际土壤, 利用扩增子测序技术对非根际土壤中的细菌群落进行分析。结果发现在不同施氮水平下, 土壤细菌微生物多样性及其群落组成结构具有显著差异, 当施氮量在 N3(129.375 kg/hm²) 水平时, 非根际土壤中细菌群落 α -多样性最高, 在 N2(86.25 kg/hm²) 水平时, 特有种类最多, 达到 400 个; β -多样性最高, 其群落组成最具特殊性。通过扩增子测序技术初步确定了在不同氮肥施用量下, 青稞非根际土壤中的细菌群落结构和优势菌群, 为进一步研究氮肥施用量对青稞生长发育的影响奠定了基础, 以期从氮肥影响根际微生物的角度为青稞氮素利用增产增效提供新的策略。

关键词: 青稞; 施氮量; 物种多样性; 群落差异

中图分类号: S512.3

文献标识码: A

Effects of Different Nitrogen Application Rates on Rhizosphere Microbial Community Diversity and Composition of Highland Barley

WANG Shengping, TONG Jian, TAN Jianxin, JIANG Zhibing

(Institute of Agriculture, Xizang Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa Xizang 850000, China)

Abstract: The rhizosphere microbiome plays a crucial role in plant health and development. This study aimed to explore the effects of different nitrogen application rates on the composition and diversity of non-rhizosphere soil microbial communities of naked oats. A new highland barley line Zangqing 3000 was used as the material. Four nitrogen application levels were set, and non-rhizosphere soil samples were collected at the maturity stage of highland barley. The bacterial communities in non-rhizosphere soil were analyzed using amplicon sequencing technology. Significant differences were observed in the diversity and community composition of soil bacteria under different nitrogen application levels. The α -diversity of the bacterial community in non-rhizosphere soil was the highest at the N3 level (129.375 kg/hm²). The number of unique species reached 400 at the N2 level (86.25 kg/hm²), which was the highest among all treatments; meanwhile, the β -diversity was the highest, with the most specific community composition. The bacterial community structure and dominant flora in non-rhizosphere soil of highland barley under different nitrogen application rates were preliminarily determined by amplicon sequencing technology, which lays a foundation for further studying the effects of nitrogen fertilizer on the growth and development of highland barley. It is expected to provide a new strategy for improving nitrogen utilization efficiency and increasing yield of highland barley from the perspective of nitrogen fertilizer affecting rhizosphere microorganisms.

Key words: highland barley; nitrogen application rates; species diversity; community differences

收稿日期: 2025-12-23

基金项目: 西藏自治区现代农业产业技术体系(试点)青稞产业技术体系区域化高产高效栽培岗位项目(XZARS-QK-2026-01)。

作者简介: 王生萍(1995—), 女, 研究实习员, 主要从事微生物生态学研究, E-mail: wsp09100@163.com。

通信作者: 降志兵(1989—), 男, 助理研究员, 主要从事农作物高产栽培技术研究, E-mail: nysjzb@126.com。

青稞(*Hordeum vulgare*)为禾本科大麦属,是栽培大麦的一个变种,因其成熟时籽粒内外稃与颖果分离,籽粒裸露,故又称裸大麦^[1]。青稞适宜生长在高原清凉气候地区,耐寒性强,生长期短,高产早熟,适应性广。青稞生产不仅带动了藏区经济发展,还对社会稳定具有重要意义。作为西藏地区最主要的粮食作物,青稞籽粒含有丰富的营养成分和生理活性物质,具有丰富的营养价值和医药保健作用,秸秆也是主要饲草^[2]。我国作为世界上氮肥施用量较高的国家,氮肥的利用率却不是很高。氮肥施用量少,青稞产量降低,但施氮过多又会影响氮肥利用效率、污染环境,还会加重农户成本负担。

微生物是土壤中最活跃的组分,对外界环境比较敏感,易受肥料用量、类型、不同栽培措施等因素影响^[3],不仅参与土壤养分转化和循环过程^[4],还在维持土壤生态功能方面具有不可替代的作用。其在一定程度上决定着物质循环的快慢^[5],可反映土壤状况,例如有机质分解、养分循环、生物固氮^[6]等,氮肥施用可提高植株土壤生物多样性^[7]。孙雪琦等^[8]通过设置3个氮添加处理(无氮、低氮、高氮),测定土壤基本理化性质、微生物群落结构及多样性,结果表明氮添加显著改变了微生物的群落结构,影响真菌类群的富营养菌。李清华等^[9]对黄泥田进行施肥处理,分析了土壤微生物群落种类与数量后发现,合理施肥可显著提高土壤微生物群落数量及含量。覃金城^[10]探究不同氮肥水平对火龙果生理生长、果质及土壤微生物的影响,结果表明随着氮肥施用量增多,土壤细菌群落总量不断增大,真菌群落总量先升高后降低。

本研究以西藏自治区日喀则市白朗县青稞藏青3000非根际土壤微生物为研究对象,基于扩增子16S rRNA测定藏青3000在不同施氮量下,根际微生物种类及其群落差异,探究不同施氮量下土壤细菌含量变化规律,挖掘与氮肥相关的微生物,为揭示施氮量对青稞根际微生物群落建成的影响、青稞根际微生物对不同施氮量的响应提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验地概况

试验地位于西藏自治区日喀则市白朗县嘎

东镇扎西村(29°20'N,89°18'E),属于典型的高原温带季风半干旱气候,年平均气温5.9℃,年降水量360mm,降水一般集中在每年5—10月,以夜雨为主,全年日照时数3200h,无霜期120~140d,风期100d左右。大田土壤理化性质为:pH=8.2,属于碱性土壤;耕作层有机质含量为19.3g/kg,全氮含量为0.1%,全磷含量为0.72g/kg,全钾含量为17.1g/kg,水解性氮含量为76.7mg/kg,有效磷含量为11.3mg/kg,速效钾含量为116mg/kg。

1.2 试验设计

供试品种为青稞新品种藏青3000,设置5个梯度的底肥施肥量:CK(0kg/hm²)、N1(43.125kg/hm²)、N2(86.25kg/hm²)、N3(129.375kg/hm²)、N4(172.5kg/hm²),基肥和追肥按照7:3的比例施入,追肥时期为拔节期。每处理重复3次,每个小区面积设置25m²(2m×12.5m),共15个小区。播种量为225kg/hm²,播种方式为人工条播,行距25cm。各小区播种前,磷肥、钾肥作为基肥一次性施入,施磷肥90kg/hm²、施钾肥45kg/hm²。其他田间管理措施同一般高产田。

1.3 样品采集

土壤样品采集采用多点混合取样法^[11],每种处理在其小区随机选3个取样点,每个取样点取15cm深土壤,采集样品后置于无菌管中,做好标记,放入液氮中储存。带回实验室后用20目筛子过筛,去除样品中碎石、植物根系等杂质,用10mL无菌管分装后密封,每管3~5g,保存于-80℃冰箱。

1.4 土壤微生物DNA提取

采用CTAB方法对样本基因组DNA进行提取^[12],然后利用琼脂糖凝胶电泳检测DNA的纯度和浓度,取适量样品于离心管中,使用无菌水稀释样品至1ng/μL。以稀释后的基因组DNA为模板,根据选择的测序区域,使用带Barcode的特异引物^[13]、New England Biolabs公司的Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer和高效高保真酶进行PCR扩增,确保扩增效率和准确性。

1.5 数据统计与分析

利用Uparse软件对所有样品的全部Clean

Reads 进行聚类,默认以 97% 的相似性 (Identity) 将序列聚类成为 OTUs^[14],同时选取 OTUs 的代表性序列,依据其算法原则,将筛选的 OTUs 中出现频数最高的序列作为 OTUs 的代表序列。对 OTUs 代表序列进行物种注释,用 Mothur 方法与 SILVA 的 SSUrRNA 数据库^[15] 进行物种注释分析,获得分类学信息并分别在各个分类水平: Kingdom (界), Phylum (门), Class (纲), Order (目), Family (科), Genus (属), Species (种) 统计各样本的群落组成。使用 MUSCLE^[16] 软件进行快速多序列比对,得到所有 OTUs 代表序列的系统关系。对各样品的数据进行均一化处理,默认以样品中数据量最大的为标准进行均一化处理,后续的 Alpha 和 Beta 多样性分析都是基于均一化处理后的数据。

2 结果与分析

2.1 测序样本量及丰富度

本研究共测序 14 个样本,在一定范围内随着样本数量增加,箱线图反映了持续抽样下新 OTUs 出现的速率(图 1)。箱线图位置急剧上升时,说明群落中有大量物种被发现,至平缓时说明此环境中样本量继续增加,但发现的物种数量并未上升^[17]。本次测序数据合理,能够探索得到青稞非根际土壤微生物细菌种类,且细菌群落多样性丰富。对所有高质量的序列进行聚类后,本次共得到 9 337 个 OTUs。在 4 个施氮水平下,共有的 OTUs 有 3 399 个,其中 N2 特有的 OTUs 最多为 400 个,N1 最少仅有 145 个,N2 和 N4 共有的 OTUs 最多为 611 个(图 2)。

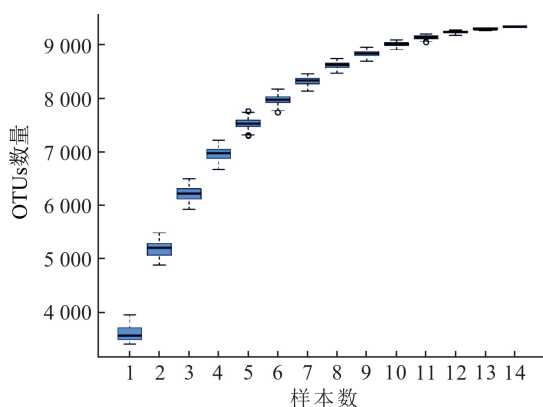


图 1 物种累积箱线图

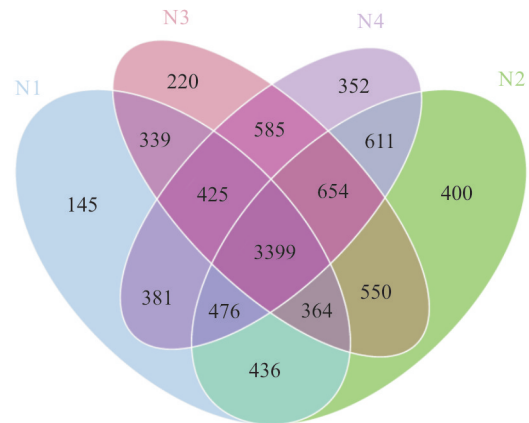


图 2 不同施氮水平下土壤微生物群落 OTUs 数量

2.2 土壤微生物群落组成及 α-多样性

对土壤中的细菌微生物含量进行丰度统计后发现,在门水平下(图 3A),丰度前 10 的优势菌门依次为变形菌门 (Proteobacteria) 占比 27.83%、酸杆菌门 (Acidobacteria) 占比 24.04%、浮霉菌门 (Planctomycetes) 占比 8.97%、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 占比 8.59%、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) 占比 7.80%、绿弯菌门 (Chloroflexi) 占比 6.25%、放线菌门 (Actinobacteria) 占比 4.02%、疣微菌门 (Verrucomicrobia) 占比 2.85%、装甲菌门 (Armatimonadetes) 占比 1.59%、晚生菌门 Latescibacteria 占比 1.13%。

在属水平下(图 3B)丰度前 8 的优势菌属依次为土壤酸杆菌属 (*Acidobacteria*) 占比 2.60%、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 占比 1.89%、寡养单胞菌属 (*Stenotrophobacter*) 占比 1.55%、海生囊菌属 (*Haliangium*) 占比 1.18%、溶杆菌属 (*Lysobacter*) 占比 0.91%、*Nitrosomonadaceae* 占比 0.90%、黄异杆菌属 (*Flavisolibacter*) 占比 0.76%、小梨形菌属 (*Pirellula*) 占比 0.71%。

通过计算不同施氮水平下青稞根系土壤细菌群落多样性指数,绘制箱线图(图 4)。由图 4 可知,在 4 个梯度氮水平处理下,N3 的群落多样性指数、丰度的覆盖率估计值、物种数量及谱系多样性均处于最高水平,且 4 种指数中 N3 分别与 N1、N2、N4 差异显著 ($p < 0.05$)。结果说明在青稞种植过程中,施氮量在 N3 水平下非根际土壤中细菌群落丰度和多样性最高;N1 细菌群落丰度和多样性最低;N2 和 N4 群落多样性无明显差异。

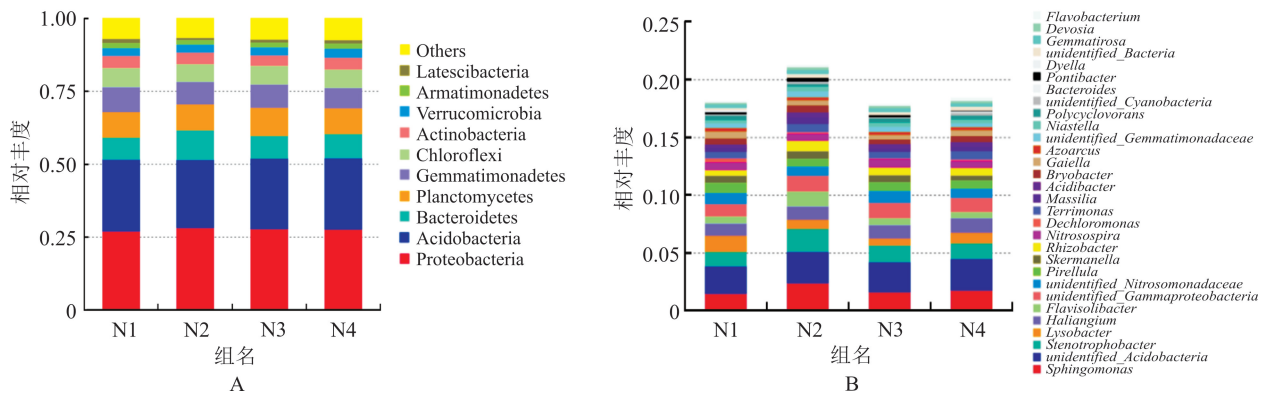


图3 门(A)、属(B)水平下的相对丰度图

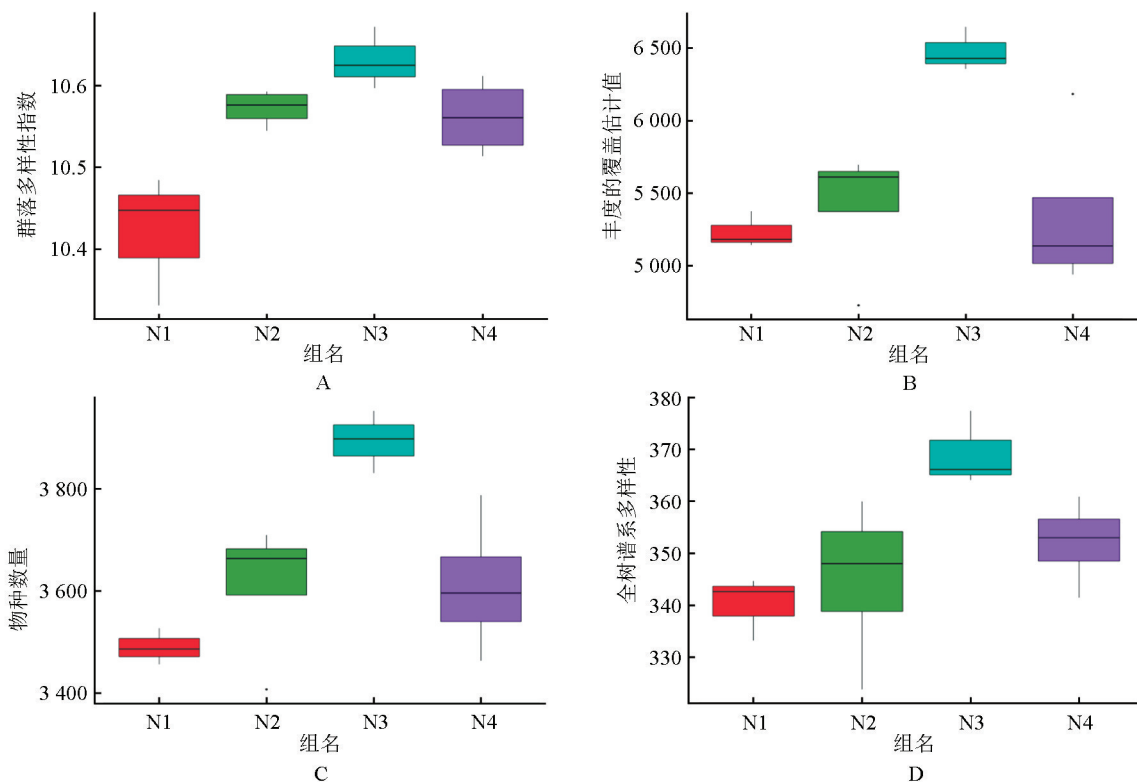


图4 不同施氮量水平下土壤细菌群落的 Alpha 多样性

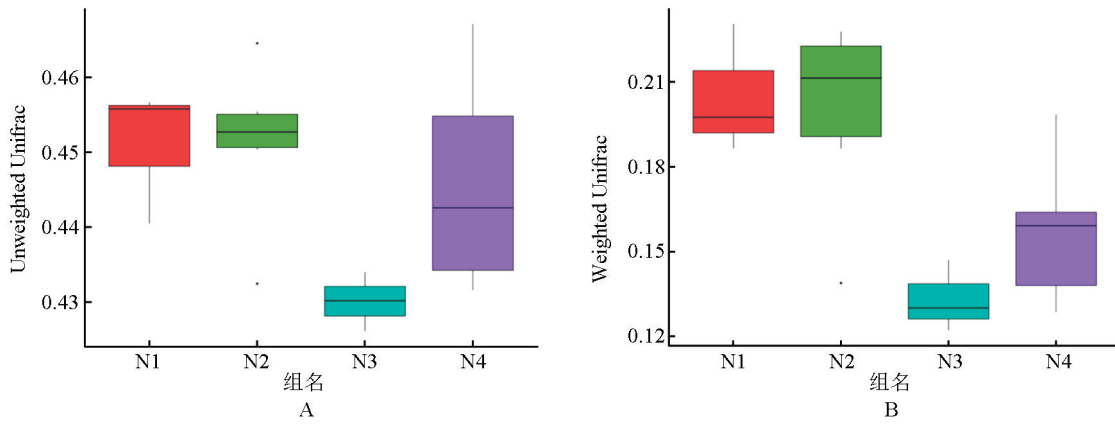
2.3 不同施氮水平下土壤细菌群落的 β -多样性

根据 Beta-diversity 概念对不同样品的微生物群落构成进行比较分析。利用 OTUs 之间的系统发生关系,计算 Unifrac 距离(Unweighted Unifrac)^[18]。再利用 OTUs 的丰度信息进一步构建 Weighted Unifrac 距离,绘制箱线图(图 5)。在 Unweighted Unifrac 距离下,N3 分别与 N1 和 N2 具有显著性差异($p < 0.05$),在 Weighted Unifrac 距离下,N3 分别与 N1 和 N2 差异极显著($p < 0.01$)。

采用 Weighted Unifrac 距离和 Unweighted Unifrac 距离两个指标来绘制 Heatmap 图(图 6),

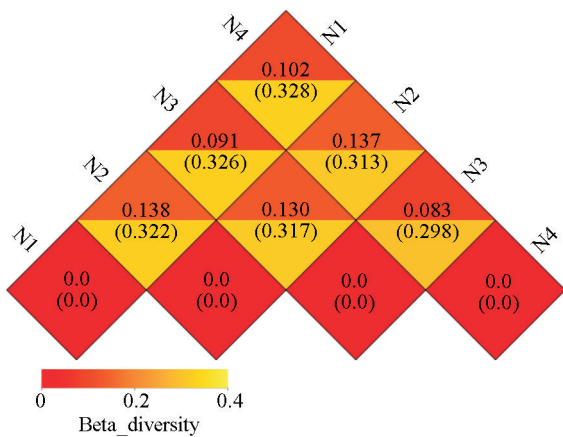
两个样品间的相异系数值越小,表示这两个样品在物种多样性方面存在的差异越小^[19]。由图 6 可知,N3 和 N4 两个处理的物种多样性差异最小,其次是 N1 和 N3。其中,差异最大的是 N1 和 N2。

运用主成分分析(PCA)最大程度地反映样品间差异,对每个样品添加聚类圈后发现(图 7),N1 和 N3 两个样品之间距离最近,说明这两组样品间群落组成最相似;N2 在坐标轴上离其他 3 组样品距离最远,说明其群落组成最具特殊性。其中,第一主成分对样品差异的贡献率为 10.95%;第二主成分对样品差异的贡献率为 8.68%。



A: Unweighted Unifrac; B: Weighted Unifrac

图5 不同施氮量下土壤细菌群落的β多样性



注:同一方格中,上下两个值分别代表 Weighted Unifrac 和 Unweighted Unifrac 距离

图6 Beta_diversity 多样性指数热图

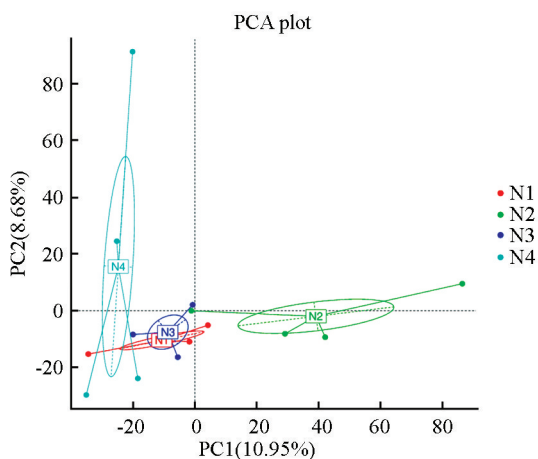


图7 主成分分析

2.4 不同施氮水平下对土壤细菌群落差异的影响

为探究4种施氮水平对群落物种的影响,通过 T-test 检验分析各处理间群落结构差异,并找出组间丰度变化具有差异的物种,在门水平下发现 N2 施氮量与 N1、N3、N4 组间均具有群落差异 ($p < 0.05$) (图8),而其他组之间比较后发现差异不显著。根据所有样品在属水平的物种注释

及其丰度,选取丰度排前35的属,从物种和样品两个层面进行聚类,在对丰度数据作热图之前,进行 Z-score 标准化处理(图9)。由图9可知,丰度较高的菌属在各施氮量水平下明显不同。N1 施氮量下,丰度较高的菌属为小梨形菌属 (*Pirellula*)、溶杆菌属 (*Lysobacter*)、固氮弧菌属 (*Azoarcus*)、脱氯单胞菌属 (*Dechloromonas*); N2 施氮量下,丰度较高的菌属为寡养单胞菌属 (*Stenotrophobacter*)、鞘脂单胞菌属 (*Sphingomonas*)、黄色细杆菌属 (*Flavitalea*)、黄色土源菌属 (*Flavisolibacter*)、固氮菌属 (*Adhaeribacter*)、马赛菌属 (*Massilia*); N3 施氮量下,丰度较高的菌属为水栖菌属 (*Aquicella*); N4 施氮量下,丰度较高的菌属为砂单胞菌属 (*Arenimonas*)、东秀珠氏菌属 (*Dongia*)。

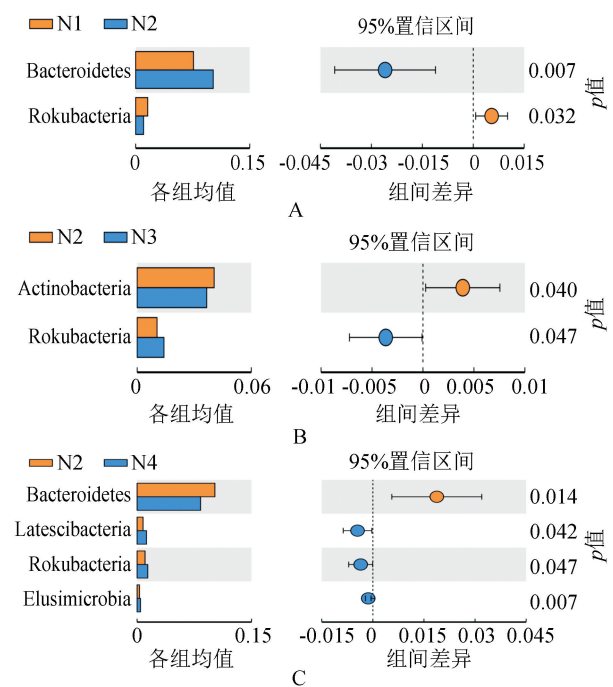


图8 门水平下 N2 与 N1(A)、N2 与 N3(B)、N2 与 N4(C)的 T-test 组间物种差异分析图

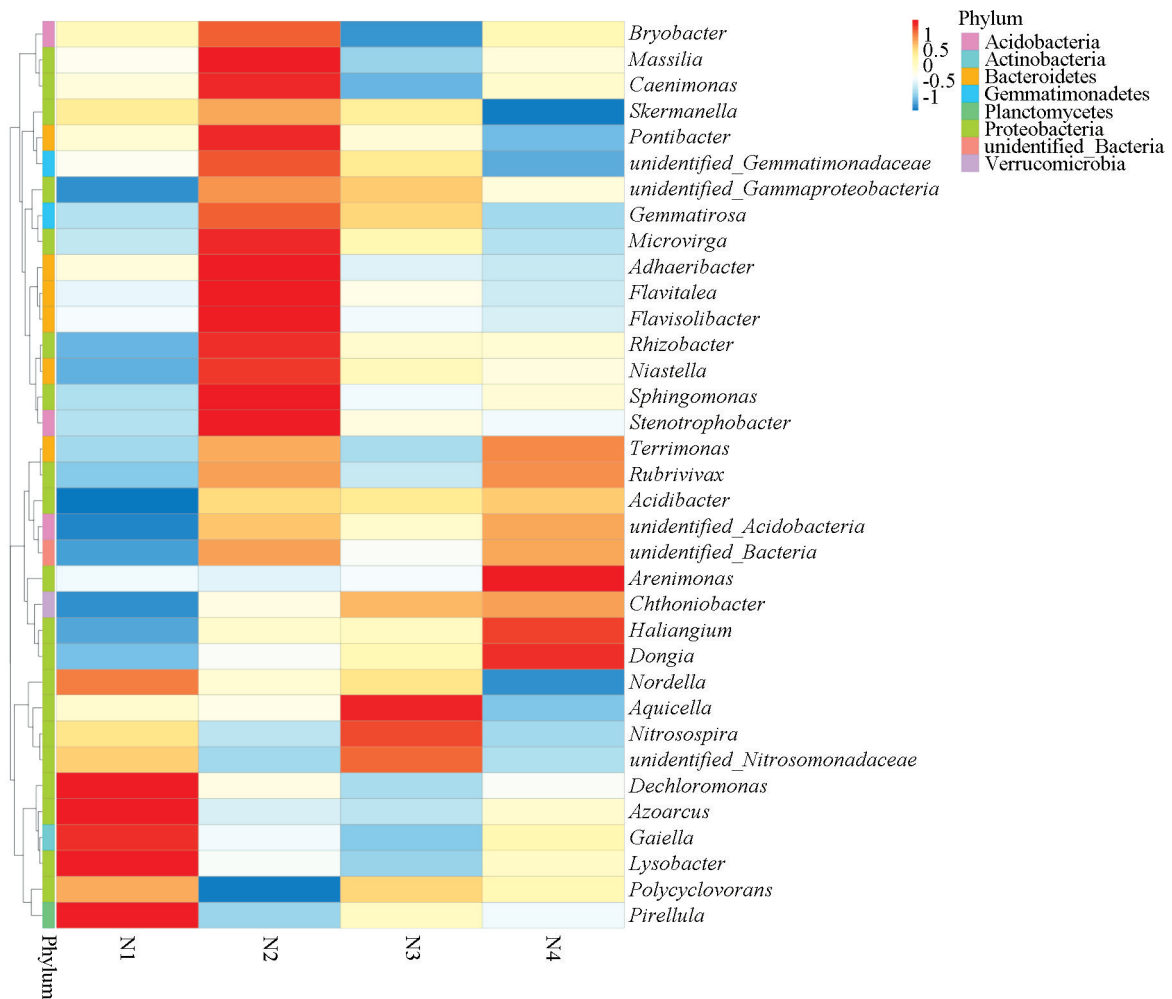


图9 不同施氮量下水平物种丰度聚类图

3 讨论与结论

本研究在青稞种植过程中设置4个不同梯度的氮肥施用量,通过扩增子16s rRNA测序,得到青稞非根际土壤微生物群落多样性数据,并根据土壤中测定的微生物含量进行统计后发现,优势菌门为变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、浮霉菌门(Planctomycetes);排名前5的优势菌属依次为土壤酸杆菌(*Acidobacteria*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophobacter*)、溶杆菌属(*Lysobacter*)、海生囊菌属(*Haliangium*)。此结果有助于进一步理解土壤微生物与青稞生长之间的互动关系,并为优化氮肥管理提供科学依据。李美玄^[20]发现氮含量增加,土壤细菌中变形菌门的相对丰度增加,而变形菌门是土壤中的有益微生物,此结果表明氮添加能够使得土壤中有益微生物含量增加,从而改变土壤健康状况。吴海宁等^[21]发现,氮肥减施降低间作花生根际土壤固氮微生物的多样性和丰度。

通过对土壤微生物群落的Alpha多样性进行统计,发现氮肥施用量不同会导致土壤微生物多样性及其群落组成具有差异,其中在N3水平下,非根际土壤中细菌群落丰度和多样性最高,与其他3种施氮水平下土壤微生物多样性具有显著差异。在统计β-多样性时发现,N1和N3两组样品群落组成最相似,N2群落组成最具特殊性。通过探究各处理间群落结构差异发现,在门水平下,N2处理与其他组间具有丰度变化差异显著的物种,而其他组间差异并不显著。在属水平下,N2处理丰度较高的属种类最多。胡启良等^[22]通过设置不同施氮量,探究其对水稻微生物群落的影响,发现增施氮肥提升了细菌群落的均匀度指数,优势细菌群落丰度也随之增加,有利于维持稻田生态系统稳定。李美玄^[20]探究氮添加对黄落叶松林土壤微生物的影响后发现,高氮添加和低氮添加均使多样性指数增加,不同水平氮添加对多样性指数具有显著差异。李玉浩等^[23]探究氮肥配施尿素对土壤无机盐、微生物及其水稻的影响,发现在水稻全生育期内,施氮能

够显著增加土壤细菌的数量。在拔节至成熟期,土壤细菌数量随控释氮肥配施比例升高呈现出先上升后下降趋势。水稻各生育期细菌数量总和也随配施比例升高呈现出先上升后下降趋势。

本研究借助扩增子测序和生物信息技术,确定了藏青 3000 非根际土壤细菌群落组成、优势菌群及其多样性,对不同施氮水平下各组样品间的菌群差异进行了分析,探讨了 α -多样性、 β -多样性变化以及分组之间是否存在差异。但是,优势菌群对青稞生长发育的促进作用及其机理还需进一步探讨,后续研究将会考虑优势菌群具有的功能和代谢途径,从而推测其对青稞的促进机理,为西藏地区青稞农业生态系统的优化和可持续发展提供有力支持。

参考文献:

- [1] 王国平,胡再青,徐冬丽,等.青稞遗传多样性及其农艺性状与 SSR 标记的关联分析 [J].云南农业大学学报(自然科学),2023(1):1-8.
- [2] 甘子鹏,徐海燕,薛守业,等.青藏高原气象因子与施肥对青稞产量的影响 [J].西南农业学报,2022,35(10):2421-2427.
- [3] 崔亮,KRISTIINA Laanemets,刘冠求,等.控施氮肥对马铃薯根际土壤微生物及酶活性的影响 [J].辽宁农业科学,2022(1):25-29.
- [4] 郭绍康,高强,陈超,等.长期施肥对黄泥田水稻土团聚体中细菌群落的影响 [J].山东农业科学,2023,55(12):96-102.
- [5] VOURLITIS G L, BERRY P, CABUCO J M, et al. Composition and Activity of Soil Microbial Communities in Native and Non-Native Vegetation of Southern California [J]. Applied Soil Ecology, 2024, 193: 105164.
- [6] LI L J, ZHU-BARKER X, YE R Z, et al. Soil Microbial Biomass Size and Soil Carbon Influence the Priming Effect from Carbon Inputs Depending on Nitrogen Availability [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 119: 41-49.
- [7] XING T T, CAI A D, LU C A, et al. Increasing Soil Microbial Biomass Nitrogen in Crop Rotation Systems by Improving Nitrogen Resources under Nitrogen Application [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2022, 21(5): 1488-1500.
- [8] 孙雪琦,戴辉,曾泉鑫,等.氮添加土壤微生物群落结构影响微生物碳利用效率 [J].生态学报,2024,44(4):1737-1746.
- [9] 李清华,王飞,林诚,等.长期施肥对黄泥田土壤微生物群落结构及团聚体组分特征的影响 [J].植物营养与肥科学报,2015,21(6):1599-1606.
- [10] 覃金城.不同保温、氮肥水平对设施火龙果生理生长、果质及土壤微生物量的影响 [D].桂林:广西师范大学,2023.
- [11] 张泽浩.氮磷添加对黄河三角洲三种典型盐生植物根际土壤细菌群落的影响 [D].泰安:山东农业大学,2023.
- [12] 孙亚玲,李艳伟,王振宝,等.基于干种子 DNA 的洋葱杂交种纯度分子标记快速鉴定 [J].山东农业科学,2023,55(11):169-175.
- [13] DESANTIS T Z, HUGENHOLTZ P, KELLER K, et al. NAST: a Multiple Sequence Alignment Server for Comparative Analysis of 16S rRNA Genes [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34: 394-399.
- [14] ONDOV B D, BERGMAN N H, PHILLIPPY A M. Interactive Metagenomic Visualization in a Web Browser [J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 385.
- [15] LI B, ZHANG X X, GUO F, et al. Characterization of Tetracycline Resistant Bacterial Community in Saline Activated Sludge Using Batch Stress Incubation with High-Throughput Sequencing Analysis [J]. Water Research, 2013, 47(13): 4207-4216.
- [16] LUNDBERG D S, YOURSTONE S, MIECZKOWSKI P, et al. Practical Innovations for High-Throughput Amplicon Sequencing [J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 999-1002.
- [17] 谭斯尹,潘礼业,罗宇琴,等.基于高通量测序分析建曲发酵过程中微生物多样性变化 [J].中国现代中药,2024,26(1):104-112.
- [18] 胡桂萍.水稻内生菌及其根系土壤微生物群落多样性的研究 [D].福州:福建农林大学,2010.
- [19] 徐海忠,薛彦华,丁洪发,等.不同地区桃树根际土壤微生物群落结构及多样性分析 [J].中国果菜,2024,44(1):72-79.
- [20] 李美玄.不同形态氮添加对黄花落叶松林土壤微生物的影响 [D].长春:吉林农业大学,2023.
- [21] 吴海宁,黄志鹏,唐秀梅,等.氮肥减施对花生根际土壤固氮微生物多样性的影响 [J].江苏农业科学,2019,47(16):93-97.
- [22] 胡启良,杨滨娟,刘宁,等.绿肥混播下不同施氮量对水稻产量、土壤碳氮和微生物群落的影响 [J].华中农业大学学报,2022,41(6):16-26.
- [23] 李玉浩,何杰,王昌全,等.控释氮肥配施尿素对土壤无机氮、微生物及水稻生长的影响 [J].土壤,2018,50(3):469-475.