

浙江凤阳山不同海拔常绿阔叶林土壤微生物特征

何柳¹, 曹敏敏¹, 鲁建兵¹, 郑翔¹, 刘胜龙², 姜姜¹

(1. 南京林业大学南方现代林业协同创新中心 江苏省水土保持与生态修复重点实验室, 江苏南京 210037;

2. 凤阳山-百山祖国家级自然保护区凤阳山管理处, 浙江龙泉 323700)

摘要: 【目的】探明浙江凤阳山地带性植被常绿阔叶林土壤微生物群落特征, 明确土壤微生物群落沿海拔梯度的变化规律及影响微生物群落结构和多样性的主要因子。【方法】采集海拔 343、765、1364、1611 m 处土壤样品, 利用高通量测序技术, 探究土壤微生物群落与海拔的关系。【结果】凤阳山细菌操作分类单元 (OTU) 数量多于真菌, 中低海拔 (343 和 765 m) 共有的 OTU 数目较多; Chao 1 指数随海拔上升呈下降趋势, Shannon 指数没有明显的变化规律。在门水平上, 细菌群落优势类群为酸杆菌门 Acidobacteria (43.77%~51.55%)、变形菌门 Proteobacteria (31.18%~35.77%) 和放线菌门 Actinobacteria (5.24%~7.99%); 真菌群落优势类群为担子菌门 Basidiomycota (33.16%~67.35%) 和子囊菌门 Ascomycota (22.98%~46.78%)。相对丰度前 10 位的细菌门中, 芽单胞菌门 Gemmatimonadetes、硝化螺旋菌门 Nitrospirae、疣微菌门 Verrucomicrobia 与海拔呈极显著负相关 ($P < 0.01$)。真菌群落不存在与海拔相关的微生物门, 而 LefSe 线性判别分析结果显示: 真菌群落具有更多的差异类群。此外, 主坐标分析显示: 土壤微生物群落以 765 m 为界, 存在海拔分异性特征, 且第 1 主轴与温度、土壤全磷、土壤全钾、土壤 pH 显著相关 ($P < 0.05$)。【结论】海拔变化引起了凤阳山土壤微生物群落特征的变化, 并且温度是最主要的驱动因子。图 5 表 6 参 41

关键词: 土壤细菌; 土壤真菌; 海拔; 高通量测序; 凤阳山

中图分类号: S718.5 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2022)06-1267-11

Soil microbial characteristics of evergreen broad-leaved forest at different altitudes in Fengyang Mountain, Zhejiang Province

HE Liu¹, CAO Minmin¹, LU Jianbing¹, ZHENG Xiang¹, LIU Shenglong², JIANG Jiang¹

(1. Key Laboratory of Soil and Water Conservation and Ecology Restoration, Co-Innovation Center of Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. Administration of Fengyang Mountain, Fengyang Mountain-Baishanzu National Nature Reserve, Longquan 323700, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] The objective is to explore the characteristics of soil microbial community of zonal vegetation in evergreen broad-leaved forest in Fengyang Mountain, Zhejiang Province, and to clarify the changes of soil microbial community along the elevation gradient and the main factors affecting structure and diversity of microbial community. [Method] Soil samples were collected at 343, 765, 1364 and 1611 m above sea level. High-throughput sequencing technology was used to explore the relationship between soil microbial community and altitude. [Result] The number of OTU of bacteria was more than that of fungi, and middle and low altitudes (343 and 765 m) displayed more OTUs. Chao 1 index decreased with the increase of altitude, while Shannon index had no obvious trend. The dominant taxa of bacteria at the phylum level were Acidobacteria (43.77%–51.55%), Proteobacteria (31.18%–35.77%) and Actinobacteria, (5.24%–7.99%), while

收稿日期: 2021-12-24; 修回日期: 2022-05-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32071612); 国家重点研发计划项目 (2017YFC0505500, 2017YFC0505502)

作者简介: 何柳 (ORCID: 0000-0002-2073-9553), 从事土壤微生物和凋落物分解等研究。E-mail: 761077902@qq.com。通信作者: 姜姜 (ORCID: 0000-0001-5058-8664), 教授, 从事森林水文学、生态系统生态学、全球变化和生态水文模型研究。E-mail: ecologyjiang@gmail.com

the dominant groups of fungal community were Basidiomycota (33.16%–67.35%) and Ascomycota (22.98%–46.78%). Among the top 10 bacterial phyla in relative abundance, Gemmatimonadetes, Nitrospirae and Verrucomicrobia were significantly negatively correlated with altitude ($P < 0.01$). There were no altitudinal taxa in the fungal community at the phylum level. LefSe (LDA Effect Size) analysis exhibited more different taxa in the fungal community. In addition, PCoA showed that the soil microbial community had the characteristics of altitudinal differentiation bounded by 765 m, and the first axis of this PcoA (PC1) was significantly correlated with temperature, total phosphorus, total kalium and pH ($P < 0.05$). [Conclusion] The change of altitude leads to the change of soil microbial community characteristics in Fengyang Mountain, and temperature is the main driving factor. [Ch, 5 fig. 6 tab. 41 ref.]

Key words: soil bacteria; soil fungi; altitude; high throughput sequencing; Fengyang Mountain

土壤微生物参与森林生态系统中很多生态过程^[1]。土壤细菌群落是土壤养分循环的参与者,在有机质的矿化、无机元素的转化以及土壤碳氮的积累等过程中发挥着重要作用^[2-5];土壤真菌通过产生多种胞外酶,可以有效分解各类有机质,将死去的有机物转化为生物量、二氧化碳和有机酸,从而调节碳和养分的平衡^[6-8]。

气候变暖以及氮沉降对土壤微生物群落的结构、多样性和丰富度有显著影响^[9]。山地海拔梯度作为模拟气候变化的有效方法^[10],其特点是在较短的地理距离上发生巨大的生物与非生物变化^[11],例如温度和湿度等气候要素^[1],因此,海拔梯度可以探究土壤微生物群落对气候变化的响应^[12]。研究表明:土壤微生物多样性随海拔的变化有多种模式,包括下降、增加、中海拔峰值和极端海拔峰值等^[13-15]。这是由于影响微生物群落变化的因子多种多样。LOOBY等^[13]在土壤微生物与海拔关系的研究综述中阐明:气候和土壤(尤其是pH)是驱动土壤微生物群落变化的主要机制。在对亚热带高山区域的研究中,赵盼盼等^[16]研究表明:温度与可溶性有机氮(DON)对土壤微生物群落结构变化起主导作用;孟苗婧等^[17]发现:土壤理化因子是海拔梯度上土壤微生物群落产生差异的主导因子。此外,植物群落对土壤特性有重要影响,从而改变土壤微生物的海拔分布^[18]。因此,气候因素、土壤理化性质和植物群落均影响土壤微生物多样性和群落组成^[19]。

目前,亚热带土壤微生物群落结构对海拔梯度响应的研究,主要针对细菌、真菌等大类的变化,而对不同分类水平下具体类群的关注相对较少。例如,在福建省戴云山自然保护区的研究表明:黄山松 *Pinus taiwanensis* 林土壤细菌/真菌比随海拔升高显著下降^[16];对武夷山主要植被类型土壤的研究表明:真菌数量随海拔升高而降低^[20]。针对浙江凤阳山针阔混交林,孟苗婧等^[17]利用磷脂脂肪酸法发现革兰氏阴性细菌丰度随海拔升高而增大,并且这种变化与土壤理化性质有关。这些大类群的变化并不能很好地表征土壤细菌和真菌在门水平乃至属水平的变化特征,因此,本研究通过高通量测序,探索凤阳山常绿阔叶林土壤微生物群落不同海拔梯度下的变化规律,以增加对土壤微生物群落组成和多样性的了解。

1 研究区概况与研究方法

1.1 研究区概况

研究区位于浙江省丽水市龙泉市凤阳山自然保护区(27°46′~27°58′N, 119°06′~119°15′E),面积约1.52万hm²,属中亚热带温暖湿润气候区。保护区年降水量为2400mm,年蒸发量为1100mm,年平均气温为12.3℃。主要天然植被为常绿阔叶林与针叶林,常绿阔叶林的优势属为木荷属 *Schima*、润楠属 *Machilus*、石栎属 *Lithocarpus*、栲属 *Castanopsis*、青冈属 *Cyclobalanopsis*。土壤类型以红壤、黄壤为主,800m以下为红壤,800m以上为黄壤^[17,21-22]。

1.2 土壤样品采集

选取4个不同海拔梯度下坡度、坡向、地上植被特征基本一致的常绿阔叶林地。海拔选择以土壤类型分界和凤阳山常绿阔叶林海拔分布范围为依据,分别为低海拔343m(EG₁)、中海拔765m(EG₂)、高海拔1364m(EG₃)、高海拔1611m(EG₄)。不同海拔的林分主要树种及郁闭度见表1。去除表面凋落物

后, 在每个海拔内设立 10 m×10 m 的样地 3 个, 间隔 10 m 以上, 在每个样地内沿对角线采集混合土壤样品, 用于土壤理化性质的测定 (表 2)。考虑到土壤微生物异质性可能更强, 在相同区域内按 5 m×5 m, 间隔 10 m 采集 4 个混合土样, -80 °C 冰箱保存, 用于土壤微生物的高通量测序分析。由于本研究没有直接在研究地内监测温度, 故采用凤阳山森林生态长期定位站设置的不同海拔梯度 (241、600、900、1 364 m) 温度监测数据进行拟合得到。年平均气温 (y) 随海拔 (x) 变化关系为 $y=-0.0063x+21.592$ ($R^2=0.9942$)。拟合得出 4 个海拔 (EG₁、EG₂、EG₃、EG₄) 的年平均气温分别为 19.43、16.77、13.15、11.44 °C。

表 1 不同海拔林分特征

Table 1 General Situation of the trees at different altitudes

海拔编号	树种组成	郁闭度/%
EG ₁	木荷 <i>Schima superba</i> 、甜槠 <i>Castanopsis eyrei</i> 、青冈 <i>Cyclobalanopsis glauca</i> 、石栎 <i>Lithocarpus glaber</i> 、 榿木 <i>Loropetalum chinense</i> 等	91
EG ₂	木荷、甜槠、青冈、榿木、山鸡椒 <i>Litsea cubeba</i> 等	87
EG ₃	木荷、甜槠、青冈、杨桐 <i>Cleyera japonica</i> 、马银花 <i>Rhododendron ovatum</i> 等	92
EG ₄	甜槠、青冈、马银花、尖叶山茶 <i>Camellia cuspidata</i> 、麂角杜鹃 <i>Rhododendron latoucheae</i> 等	90

表 2 不同海拔土壤理化性质

Table 2 Physical and chemical properties of soil at different altitudes

海拔编号	pH	土壤湿度/%	总碳/(mg·g ⁻¹)	全氮/(mg·g ⁻¹)	全磷/(mg·g ⁻¹)	全钾/(mg·g ⁻¹)
EG ₁	4.86±0.03 a	15.54±6.41 c	103.97±7.60 a	3.57±0.35 b	0.21±0.04 c	19.63±2.58 a
EG ₂	4.93±0.18 a	43.45±19.89 b	160.53±96.86 a	9.43±4.65 a	0.51±0.12 b	14.13±1.37 b
EG ₃	4.67±0.07 a	38.41±7.81 bc	117.23±25.94 a	7.13±1.12 ab	0.45±0.16 b	11.43±1.03 b
EG ₄	4.73±0.21 a	71.36±14.42 a	125.97±45.76 a	9.63±3.09 a	0.73±0.05 a	14.37±1.58 b

说明: 数值为平均值±标准差 ($n=3$), 不同小写字母表示不同海拔间差异显著 ($P<0.05$)

1.3 土壤理化性质测定

pH 采用电位法 (水土比为 2.5:1.0) 通过 pH 计测定; 土壤湿度采用环刀法测定; 土壤总碳、全氮采用德国 Element 公司的元素分析仪测定 (动态燃烧法); 土壤全磷采用酸溶-钼锑抗比色法, 通过分光光度计测定; 土壤全钾采用氢氧化钠熔融, 火焰光度计测定^[23]。

1.4 DNA 提取与高通量测序

采用土壤 DNA 试剂盒 (试剂盒名称为 MagPure Soil DNA KF Kit), 从 0.25 g 土壤样品中提取 DNA, 利用琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 检测 DNA 浓度。以基因组 DNA 为模板, 根据测序区域的选择, 使用带 barcode 的特异引物, Takara 公司的 TksGflex DNA Polymerase 进行聚合酶链式反应 (PCR)。细菌 16S rDNA V3-V4 扩增引物为 343F-5'-TACGGRAGGCAGCAG-3' 和 798R-5'-AGGGTATCTAATCCT-3', 真菌 ITS 扩增引物为 ITS1F-5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' 和 ITS2-5'-GCTGCGTTCTTCATCGA TGC-3'。测序委托中国上海欧易生物医学科技有限公司 Illumina MiSeq 平台进行。将获得的原始序列用一系列软件 Trimomatic^[24]、Flash^[25] 和 QIIME 中的 split_libraries^[26] 处理, 得到优化序列, 并使用 UCHIME 软件^[27] 去除嵌合体; 利用 Vsearch 软件^[28], 生成操作分类单元 (OTUs), 细菌、真菌相似度均为 97%。

1.5 数据分析

首先, 对所有数据进行正态分布检验和方差齐性检验, 结果均符合正态分布。对于土壤理化性质和微生物多样性指数的数据, 使用 SPSS 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 确定不同海拔下土壤理化性质和土壤微生物多样性的差异 (LSD 最小显著差异法, 显著性水平为 $P<0.05$), 其中土壤微生物覆盖度 (goods_coverage, C_{depth}) 指数表示测序的深度。其计算方法为: $C_{depth}=1-n_1/N$, 其中: n_1 为只含有 1 条序列的 OTU 数目; N 为抽样中出现的总的序列数; 对于门和属水平上各类群相对丰度的数据, 利用 Pearson 相关分析来确定海拔与门和属水平上微生物群落的相关性; 对于界、门、纲、目、科、属、种水平上土壤微生物相对丰度的数据, 利用组间群落差异 [LDA Effect Size (LefSe)] 分析 (LefSe:

<http://huttenhower.sph.harvard.edu/lefse/>。设置标准：LDA 大于 2, $P < 0.05$) 来研究不同海拔梯度下土壤微生物群落的差异类群^[29]，对于 OTU 水平上土壤微生物序列数的数据，使用 Canoco 5.0 进行主坐标分析 (PCoA)。由于微生物和土壤理化性质样品数量不一致，无法一一对应进行关联分析，故通过 Bootstrap 重采样方法，将每个海拔土壤微生物 ($n=4$) 与土壤理化性质 ($n=3$) 进行两两组合 (12 种可能)，从 12 种可能中随机抽取 3 个作为重复 ($n=3$)，4 个海拔共采集 12 个样品；重采样通过 Matlab 进行 1000 次，每次都计算土壤微生物与土壤理化性质的 Pearson 相关系数，得到相关系数的频率分布，最终计算得到平均相关系数。对照 Pearson 相关系数显著性检验表中 0.05 显著性水平下相关系数的临界值，采用双侧检验判断显著性。

2 结果与分析

2.1 不同海拔土壤微生物 OTU 数量

由图 1A 可知：细菌群落的 OTU 总数为 8408 个，共享 OTU 数 2828 个。其中 343、765、1364、1611 m 特有 OTU 个数分别占到细菌 OTU 总数的 7.67%、5.00%、6.24%、6.89%。两两比较中，中低海拔即 343 与 765 m 共有 OTU 数最多，为 4593 个。海拔变化同样引起土壤真菌群落 OTU 数量变化。如图 1B 所示：检测出的真菌群落 OTU 总数少于细菌群落，为 3985 个。不同海拔真菌群落共有的 OTU 占到真菌群落总数的 4.19%。无论是细菌群落或真菌群落，中低海拔 OTU 数均高于高海拔；两两比较中，343 与 765 m 共有的 OTU 数最多。这一结果表明 343 与 765 m 样地 OTU 组成相似。

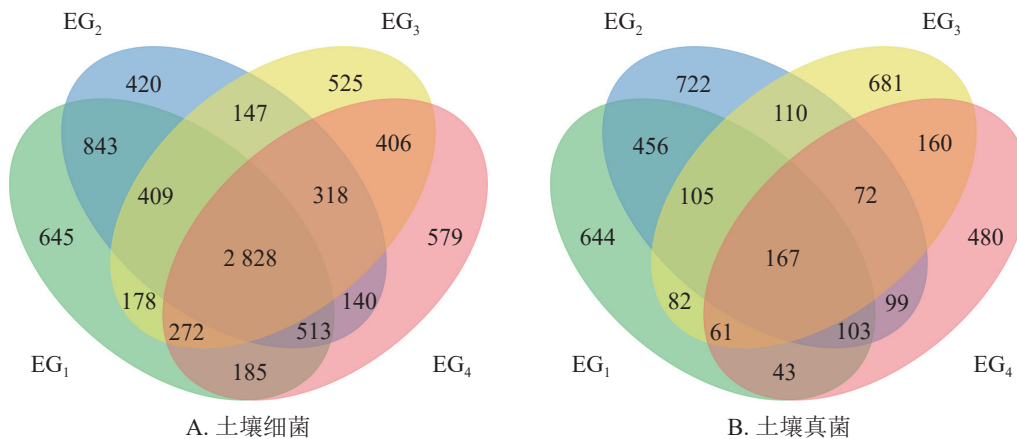


图 1 不同海拔土壤细菌 (A) 和真菌 (B) 群落维恩图

Figure 1 Venn diagram showing the unique and shared OTUs at different elevations in bacterial (A) and fungal (B) communities

2.2 不同海拔常绿阔叶林土壤微生物多样性

Chao 1 指数与 Shannon 指数分别反映了微生物群落的丰富度与多样性。细菌群落的多样性分析发现：中低海拔 Chao 1 指数显著高于高海拔 1364 与 1611 m，呈现出沿海拔增高逐渐减小的趋势 ($P < 0.05$) (表 3)。Shannon 指数在 343 m 处最高，显著高于 765 m 处 ($P < 0.05$)。真菌群落的多样性结果显示：高海拔 Chao 1 指数显著低于中低海拔 ($P < 0.05$)，Shannon 指数在 343 m 处最低，且显著低于 765 与 1364 m 处 ($P < 0.05$)。细菌群落与真菌群落覆盖度指数均在 0.97 以上，且中低海拔呈现较低的水平 ($P < 0.05$)，这说明测序结果可靠。

2.3 不同海拔常绿阔叶林土壤微生物群落分布特征

2.3.1 土壤微生物门水平上的群落组成 通过测序发现，4 个海拔土壤细菌群落共检测出 33 个门。图 2A 为门水平上相对丰度前 10 位的细菌群落。分析显示：凤阳山常绿阔叶林优势菌群为酸杆菌门 Acidobacteria、变形菌门 Proteobacteria 和放线菌门 Actinobacteria。其中，酸杆菌门相对丰度高达 43.77%~51.55%，是丰度最高的类群，其次是变形菌门 (31.18%~35.77%)、放线菌门 (5.24%~7.99%)。Pearson 相关性分析发现：芽单胞菌门 Gemmatimonadetes、硝化螺旋菌门 Nitrospirae、疣微菌门 Verrucomicrobia 与海拔呈极显著负相关 ($P < 0.01$)，厚壁菌门 Firmicutes 与海拔呈显著正相关 ($P < 0.05$) (表 4)。

表 3 不同海拔土壤微生物群落多样性

Table 3 Soil bacterial diversity indices at different altitudes

细菌				真菌			
海拔编号	Chao 1 指数	Shannon 指数	覆盖度	海拔编号	Chao 1 指数	Shannon 指数	覆盖度
EG ₁	4506.81±41.85 a	9.2622±0.246 8 a	0.9773±0.000 6 b	EG ₁	783.12±36.26 a	3.603 1±0.663 3 b	0.991 1±0.000 6 b
EG ₂	4255.62±295.74 b	8.878 1±0.214 4 b	0.9780±0.001 7 b	EG ₂	807.96±115.36 a	5.0242±0.6876 a	0.991 1±0.001 3 b
EG ₃	3688.80±100.61 c	9.0043±0.231 9 ab	0.9824±0.000 5 a	EG ₃	729.86±52.44 ab	4.6790±0.423 6 a	0.992 1±0.000 2 ab
EG ₄	3791.13±110.41 c	8.9974±0.176 5 ab	0.9815±0.000 8 a	EG ₄	653.00±67.50 b	4.5171±0.649 5 ab	0.9928±0.000 8 a

说明：数值为平均值±标准差(n=4)，不同小写字母表示不同海拔间差异显著(P<0.05)

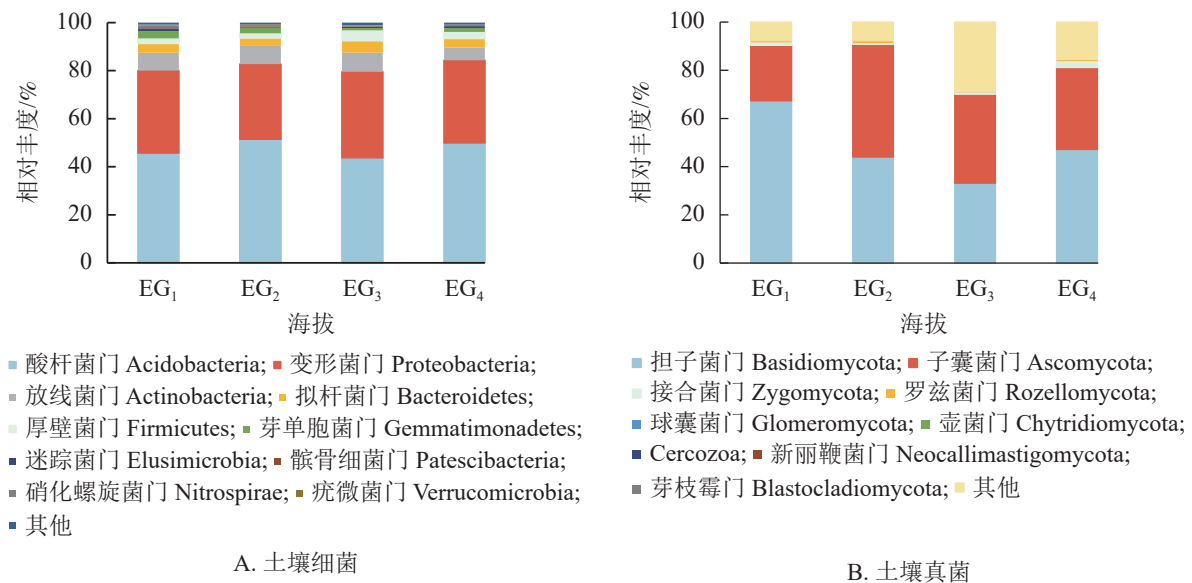


图 2 不同海拔门水平上土壤细菌 (A) 和真菌 (B) 群落相对丰度

Figure 2 Relative abundance of bacteria (A) and fungi (B) phylum at different altitudes

表 4 海拔与微生物门 Pearson 相关性系数

Table 4 Pearson correlation coefficient between altitude and soil bacterial phylum

细菌门	相关性系数	真菌门	相关性系数	细菌门	相关性系数	真菌门	相关性系数
酸杆菌门	0.032	担子菌门	-0.402	芽单胞菌门	-0.817**	壶菌门	-0.209
变形菌门	0.234	子囊菌门	0.173	迷踪菌门	-0.260	Cercozoa	-0.191
放线菌门	-0.417	接合菌门	0.437	骸骨细菌门	-0.490	新丽鞭菌门	-0.233
拟杆菌门	0.269	罗兹菌门	-0.308	硝化螺旋菌门	-0.723**	芽枝霉门	-0.236
厚壁菌门	0.525*	球囊菌门	-0.036	疣微菌门	-0.705**		

说明：*表示在0.05水平(双侧)上显著相关；**表示在0.01水平(双侧)上显著相关

图 2B 显示了所有鉴定出的已分类的门水平上的真菌群落。大部分类群隶属担子菌门 Basidiomycota (33.16%~67.35%) 与子囊菌门 Ascomycota (22.98%~46.78%)。343 m 处担子菌门最为丰富，相对丰度高达 65.07%。子囊菌门是中高海拔相对丰度最高的真菌类群。除上述优势菌群，相对丰度高于 1% 的为 343 与 1611 m 的接合菌门 Zygomycota。

2.3.2 土壤微生物属水平上的群落组成 细菌群落共检测出 708 个属。图 3A 展示了相对丰度前 15 位的细菌属，占 21.61%~24.52%。Candidatus_Solibacter 相对丰度最高，在 343、765、1611 m 超过 5%，Bryobacter 在 1611 m 最高，Acidibacter 在各海拔相对丰度为 2.25%~3.01%。相关性分析(表 5)显示：Acidibacter、Gemmatimonas、Sphingomonas、MND1 与海拔呈显著负相关(P<0.05)。

真菌群落共检测出 384 个属。图 3B 展示了相对丰度前 15 位的真菌属。红菇属 Russula 在 343 m 检出较多，相对丰度高达 52.30%，中高海拔红菇属相对丰度均低于 20%。Archeorhizomyces 相对丰度仅

次于红菇属,在中高海拔大量存在。相关性分析(表5)显示:红菇属与海拔呈显著负相关,被孢霉属 *Morlierella* 与海拔呈显著正相关($P<0.05$)。

表5 海拔与微生物属 Pearson 相关性系数

Table 5 Pearson correlation coefficient between altitude and soil bacterial genus

细菌属		真菌属		细菌属		真菌属	
属名	相关系数	属名	相关系数	属名	相关系数	属名	相关系数
<i>Candidatus_Solibacter</i>	-0.458	红菇属 <i>Russula</i>	-0.645**	<i>Granulicella</i>	0.719**	<i>Sebacina</i>	0.197
<i>Bryobacter</i>	0.088	<i>Archaeorhizomyces</i>	0.290	<i>Acidipila</i>	0.639**	鹅膏菌属 <i>Amanita</i>	0.250
<i>Acidibacter</i>	-0.520*	大团囊菌属 <i>Elaphomyces</i>	-0.234	芽单胞菌属 <i>Gemmatimonas</i>	-0.734**	<i>Rossbeevera</i>	-0.127
热酸菌属 <i>Acidothermus</i>	0.514*	<i>Xerocomus</i>	0.200	分枝杆菌属 <i>Mycobacterium</i>	0.035	丝盖伞属 <i>Inocybe</i>	0.190
<i>Candidatus_Koribacter</i>	-0.178	丝膜菌属 <i>Cortinarius</i>	0.182	鞘氨醇单胞菌属 <i>Sphingomonas</i>	-0.778**	地舌菌属 <i>Geoglossum</i>	-0.194
<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	0.648**	棉草菌属 <i>Tomentella</i>	-0.259	拟杆菌属 <i>Bacteroides</i>	0.224	<i>Lactarius</i>	0.311
<i>Clade_Ia</i>	0.472	湿伞属 <i>Hygrocybe</i>	-0.097	MND1	-0.743**	粉褶菌属 <i>Entoloma</i>	-0.209
<i>Pajaroellobacter</i>	0.740**	被孢霉属 <i>Morlierella</i>	0.702**				

说明: *表示在0.05水平(双侧)上显著相关; **表示在0.01水平(双侧)上显著相关

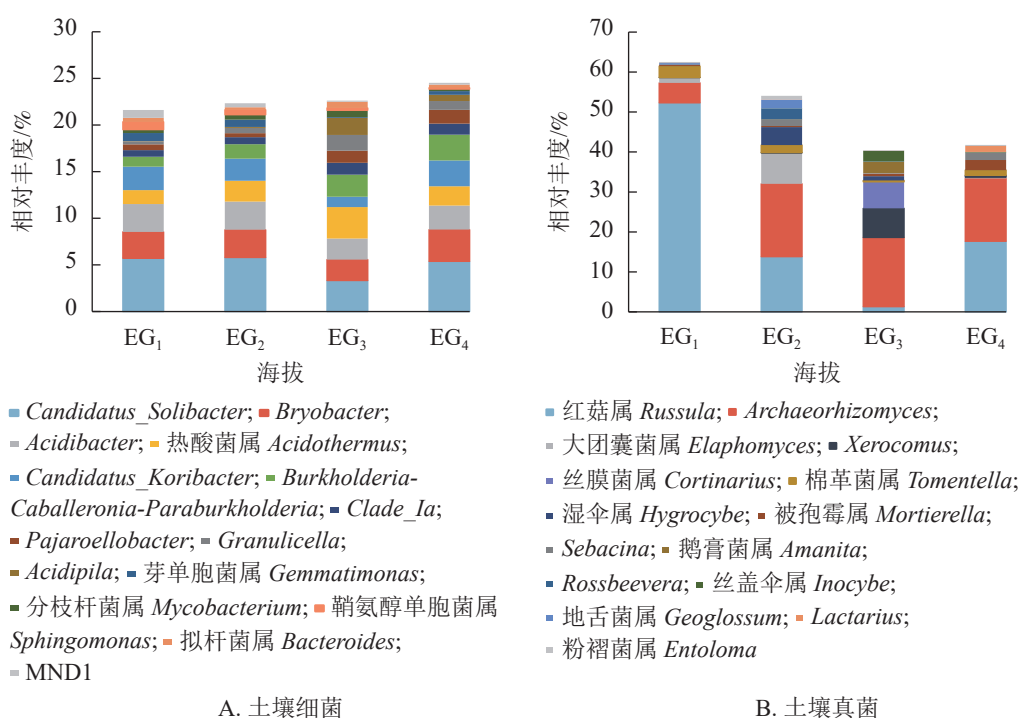


图3 不同海拔属水平上土壤细菌(A)和真菌(B)群落相对丰度

Figure 3 Relative abundance of bacteria (A) and fungi (B) genus at different altitudes

2.4 土壤微生物 LefSe 分析

为进一步了解不同海拔土壤微生物组成的差异性,对不同分类水平上差异类群进行分析。除去未鉴定的物种,根据 LefSe 的结果显示:土壤细菌群落共有 15 个差异类群。其中 1 364 m 具有最多的差异类群,包括厚壁菌门、放线菌门、放线菌纲 Actinobacteria、梭菌纲 Clostridia、热酸菌属等类群。765 m 处存在 5 个差异类群,包括细菌界 Bacteria、*Candidatus_Solibacter* 等类群。 δ -变形菌纲 Deltaproteobacteria 是 1 611 m 的差异类群(图 4A)。

土壤真菌群落共有 23 个差异类群。343 m 处具有最少的差异类群,包括红菇目 Russulales、红菇科 Russulaceae、红菇属。765 m 包括地舌菌纲 Geoglossomyeetes、湿伞属、大团囊菌属等差异类群; 1 364 m 包括锤舌菌纲 Leotiomyeetes、鹅膏菌属、*Xerocomus*、丝膜菌属等差异类群。1 611 m 包括接合菌门、被孢霉属等差异类群(图 4B)。

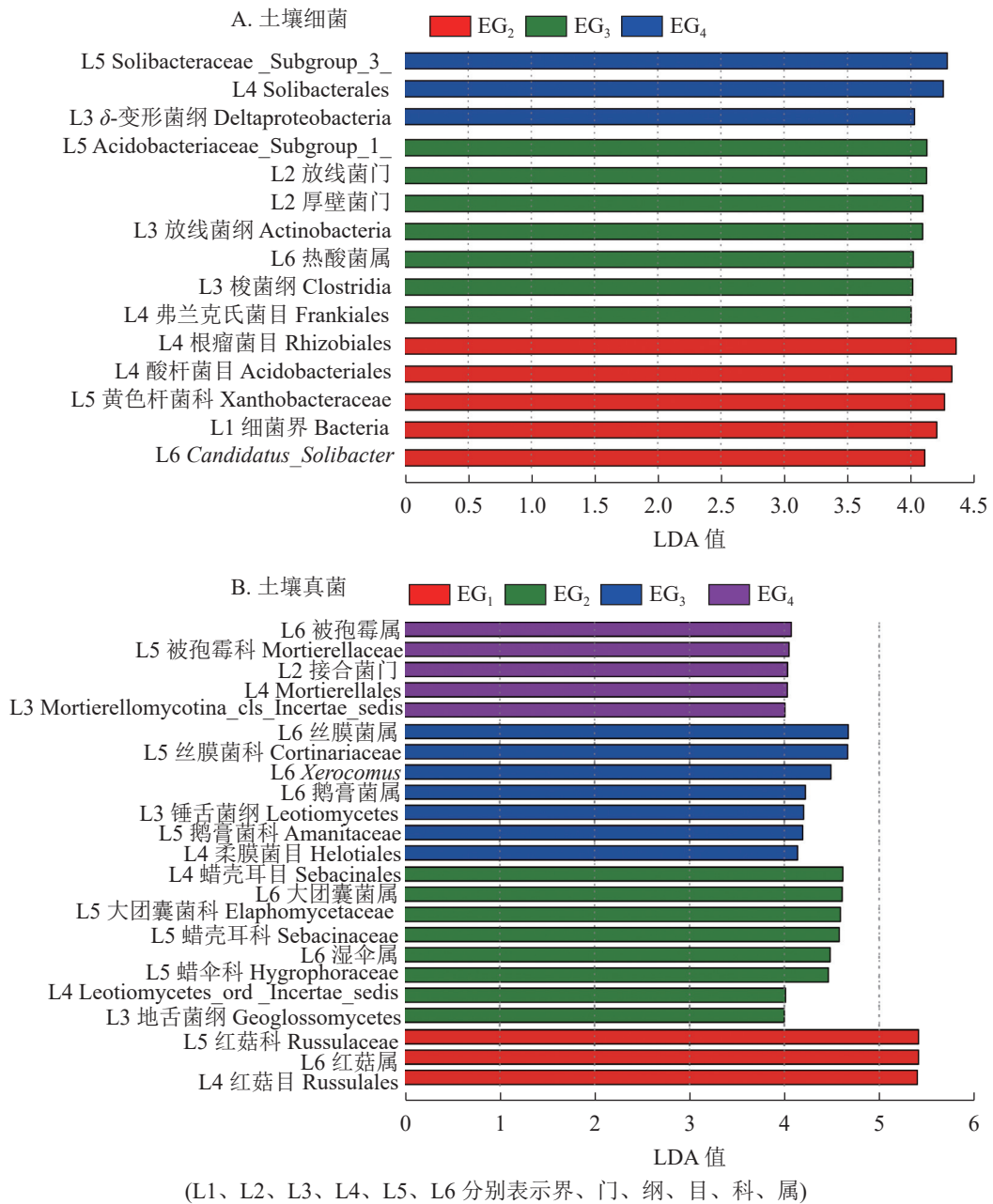


图 4 不同海拔土壤细菌 (A) 和真菌 (B) 群落 LefSe 分析
 Figure 4 LefSe analysis showing the significant differences at different bacteria (A) and fungi (B) taxonomic levels

2.5 OTU 水平上不同海拔微生物群落结构

采用主坐标分析 (PCoA) 法, 基于杰卡德距离 (binaryjaccard) 算法, 根据抽平后的 OTU 丰度分析不同海拔间微生物群落结构差异性, 以二维图的形式呈现。由图 5A 显示: 海拔引起了微生物群落的变化 ($P < 0.05$)。在土壤细菌群落中, 同一海拔高度内样本间的细菌群落组成相对接近。其次, 中低海拔细菌群落高度相似位于第 1 主轴 (PC1) 的负轴上, 高海拔细菌群落位于 PC1 正轴上。

对土壤真菌群落的 PCoA 分析中显示了与细菌群落基本一致的结果 (图 5B), 343 与 765 m 各样本集中于 PC1 轴的负轴上, 1364 与 1611 m 各样本集中于 PC1 正轴上, 343 与 765 m 真菌群落相似度高, 高海拔与中低海拔微生物多样性相似度低。

2.6 土壤理化性质对土壤微生物的影响

将土壤理化性质指标与微生物多样性、微生物群落结构 [各样点在 PC1、第 2 主轴 (PC2) 上的得分] 进行 Pearson 相关性分析。结果 (表 6) 表明: Chao 1 指数与温度呈显著正相关 (细菌的相关系数为 0.886, 真菌的相关系数为 0.603, $P < 0.05$)。微生物群落结构的相关性分析发现, PC1 轴与温度相关性最

强(细菌的相关系数为-0.944, 真菌的相关系数为-0.939), 呈显著负相关($P < 0.05$)。同时, 细菌、真菌群落的 PC1 轴也与土壤全磷、全钾、pH 显著相关($P < 0.05$)。

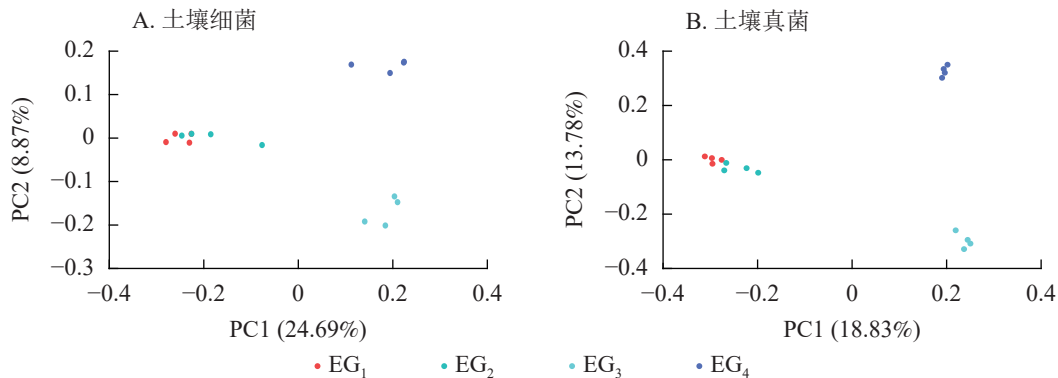


图5 不同海拔 OTU 水平上土壤细菌 (A) 和真菌 (B) 群落 PCoA 分析

Figure 5 PCoA analysis showing the first two principal coordinates at different altitudes in bacterial (A) and fungal (B) communities

表6 土壤理化性质与土壤微生物的 Pearson 相关性分析

Table 6 Pearson correlation between soil physical and chemical properties and soil microorganism

指标	细菌多样性		细菌群落结构		真菌多样性		真菌群落结构	
	Chao 1	Shannon	PC1	PC2	Chao 1	Shannon	PC1	PC2
温度	0.886*	0.320	-0.944*	-0.190	0.603*	-0.377	-0.939*	-0.241
总碳	-0.041	-0.208	-0.010	0.057	0.048	0.242	-0.026	0.033
全氮	-0.412	-0.415	0.380	0.262	-0.215	0.478	0.349	0.249
全磷	-0.588*	-0.394	0.618*	0.485	-0.448	0.435	0.581*	0.498
全钾	0.719*	0.427	-0.656*	0.325	0.207	-0.555	-0.671*	0.316
土壤湿度	-0.560	-0.360	0.600*	0.513	-0.461	0.382	0.562	0.530
pH	0.527	-0.016	-0.585*	0.176	0.343	-0.026	-0.616*	0.121

说明: *表示在0.05水平(双侧)上显著相关

3 讨论

本研究通过高通量测序对浙江凤阳山不同海拔常绿阔叶林的细菌和真菌群落进行调查和分析, 以探究海拔对土壤微生物分布的影响。 α 多样性分析结果显示: 海拔 343 m 细菌群落具有较高的丰富度指数, 随着海拔的上升, 丰富度指数下降, 高海拔地区细菌群落丰富度指数显著低于低海拔地区, 但多样性指数在低海拔与高海拔间并无显著差异。细菌群落的丰富度受海拔形成的地理梯度影响较大。SHEN 等^[30]在研究长白山不同海拔冻原生态系统的土壤细菌群落的多样性格局时发现: 细菌群落丰富度随海拔上升线性下降, 安前东等^[31]在西藏的研究也得出了一致的结果。海拔与年平均气温和年降水量高度相关, 因此土壤细菌群落受气候的影响大于受地球化学或土壤结构因素的影响^[32]。尽管如此, 也不能排除其他因素对细菌丰富度的影响, 比如土壤碳氮含量、pH 等土壤理化因子可能是造成这种差异性格局的主要因素^[30-31]。本研究中, 温度与丰富度指数相关性系数为 0.886, 是导致细菌群落丰富度沿海拔垂直分布的主要影响因子, 而全磷、全钾也与细菌丰富度指数有一定的联系。此外, 在部分研究中, 并未发现细菌群落丰富度的垂直梯度模式。如贺婧等^[33]发现: 太白山与朱雀山北坡的土壤细菌群落 Chao 1 指数无明显规律。与细菌群落不同的是, 真菌群落丰富度指数虽然存在沿海拔上升而下降的趋势, 但只在 1 611 m 处显著下降, 因此真菌群落丰富度指数与温度的相关性弱于细菌群落。目前, 大部分研究集中于对土壤细菌群落的海拔格局研究, 关于真菌群落的相关报道较少。WANG 等^[34]发现: 土壤真菌丰富度与海拔呈显著负相关。李敏等^[35]研究指出: 真菌丰富度指数与多样性指数在海拔 1 500 m 时较低, 但在海拔 1 800 m 时较高, 表明海拔对真菌多样性格局的影响尚不明确。

除土壤微生物群落的多样性格局, 本研究还关注群落中特定类群的变化。门水平上, 细菌群落以酸

杆菌门、变形菌门和放线菌门为主。这些类群在植物多糖物质降解过程中起到了关键性作用^[36]。属水平上，凤阳山常绿阔叶林的优势属为 *Candidatus_Solibacter*、*Bryobacter*、*Acidibacter*。其中，*Candidatus_Solibacter* 与 *Bryobacter* 能够有效地利用碳源，与有机质相关^[37]。在不同的分类水平上，不同海拔细菌群落相对丰度存在显著差异。LefSe 分析显示：细菌群落在 1 364 m 具有最多的差异类群，343 m 处不存在差异类群。细菌群落某一特定类群丰度并没有在 343 m 显著增加，但对于一些类群，如硝化螺旋菌门、*Acidibacter* 等，与海拔呈显著负相关 ($P < 0.05$)。这些个体类群与海拔之间的关系可能有助于整体细菌群落的海拔格局的形成^[30]。真菌群落的优势菌群为担子菌门与子囊菌门。两者在刘子涵等^[38]、薛晓敏等^[39]的研究中也具有较高的丰度，是全球范围内最主要的土壤真菌门^[14]。作为腐生菌，担子菌门和子囊菌门能够有效地分解植物残体^[40]。根据 LefSe 的分析结果，虽然真菌群落比细菌群落具有更多差异类群，但是差异类群集中在分类水平较低的科、属上，且属水平上的相关性分析显示仅有 2 个属呈现垂直梯度的变化，因此真菌群落组成差异较大但具体类群沿海拔梯度垂直分布的特征不明显。

PCoA 分析表明：无论是细菌群落还是真菌群落，海拔变化引起了土壤微生物群落组成的变化。343 与 765 m 群落结构相似，且中低海拔与高海拔间存在明显分界，这与凤阳山土壤类型分界一致。厉桂香等^[15]将其归结为微生物群落具有海拔分异性。本研究结果表明：343 与 765 m 处具有更多共享的 OTU 数目，从另一角度佐证了微生物群落的海拔分异性特征。细菌和真菌群落结构在 PC1 轴上与温度相关性最强。由于海拔 343 m 处土壤理化性质与其他海拔差异较大，当去除 343 m 的数据进一步做相关性分析发现，PC1 轴上，温度的影响并没有改变，但土壤理化性质与 PC1 轴的相关性明显减弱，土壤全磷、全钾、湿度、pH 不再与 PC1 轴显著相关；PC2 轴上，土壤理化性质的影响进一步增强，土壤全磷、全钾、湿度从弱相关变为显著相关（去除 343 m 后，细菌群落全磷、全钾、湿度与 PC2 轴相关系数绝对值均高于 0.710，真菌群落绝对值均高于 0.678）。这说明土壤微生物群落结构在 PC1 轴上主要受到温度的调控，而在 PC2 轴上由土壤理化性质起主导作用。在增温实验中，也同样验证了温度对微生物群落结构的重要性^[41]。因此，温度是影响土壤微生物群落结构变化的主要因子，其次为土壤理化性质。

4 结论

浙江凤阳山常绿阔叶林土壤微生物群落存在沿海拔梯度的变化规律，丰富度指数与相关性分析表明，细菌群落比真菌群落的垂直分布格局更明显。尽管真菌群落 OTU 数量少于细菌群落，但真菌群落具有更多的差异类群。此外，微生物的海拔效应表明，温度变化对土壤微生物群落空间结构的形成起着重要作用。

5 参考文献

- [1] CHANG E H, CHEN T H, TIAN G L, *et al.* The effect of altitudinal gradient on soil microbial community activity and structure in moso bamboo plantations [J]. *Appl Soil Ecol*, 2016, **98**: 213 – 220.
- [2] MA Yuhua, FENG Chun, WANG Zhaocheng, *et al.* Restoration in degraded subtropical broadleaved forests induces changes in soil bacterial communities [J/OL]. *Global Ecol Conserv*, 2021, **30**: e01775 [2021-11-20]. doi: 10.1016/j.gecco.2021.e01775.
- [3] SHAOPengshuai, LIANG Chao, RUBERT-NASON K, *et al.* Secondary successional forests undergo tightly-coupled changes in soil microbial community structure and soil organic matter [J]. *Soil Biol Biochem*, 2019, **128**: 56 – 65.
- [4] NELSON M B, MARTINY A C, MARTINY J B H. Global biogeography of microbial nitrogen-cycling traits in soil [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2016, **113**(29): 8033 – 8040.
- [5] WARING B G, AVERILL C, HAWKES C V. Differences in fungal and bacterial physiology alter soil carbon and nitrogen cycling: insights from meta-analysis and theoretical models [J]. *Ecol Lett*, 2013, **16**(7): 887 – 894.
- [6] SUN Junming, IRZYKOWSKI W, JEDRYCZKA M, *et al.* Analysis of the genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary populations from different regions and host plants by random amplified polymorphic DNA markers [J]. *J Integr Plant Biol*, 2005, **47**(4): 385 – 395.
- [7] ŽIFČÁKOVÁ L, VĚTROVSKÝ T, HOWE A, *et al.* Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter [J]. *Environ Microbiol*, 2016, **18**(1): 288 – 301.

- [8] FRAC M, HANNULA S E, BELKA M, *et al.* Fungal biodiversity and their role in soil health [J/OL]. *Front Microbiol*, 2018, **9**: 707 [2021-11-20]. doi:10.3389/fmicb.2018.00707.
- [9] MARGESIN R, NIKLINSKA M A. Editorial: elevation gradients: microbial indicators of climate change? [J/OL]. *Front Microbiol*, 2019, **10**: 2405 [2021-11-20]. doi:10.3389/fmicb.2019.02405.
- [10] SILES J A, CAJTHAML T, FILIPOVÁ A, *et al.* Altitudinal, seasonal and interannual shifts in microbial communities and chemical composition of soil organic matter in Alpine forest soils [J]. *Soil Biol Biochem*, 2017, **112**: 1 – 13.
- [11] WU Jiejun, ANDERSON B J, BUCKLEY H L, *et al.* Aspect has a greater impact on alpine soil bacterial community structure than elevation [J/OL]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2017, **93**(5): fiw253 [2021-11-20]. doi: 10.1093/femsec/fix032.
- [12] COLLINS H P, CAVIGELLI M A. Soil microbial community characteristics along an elevation gradient in the Laguna Mountains of Southern California [J]. *Soil Biol Biochem*, 2003, **35**(8): 1027 – 1037.
- [13] LOOBY C I, MARTIN P H. Diversity and function of soil microbes on montane gradients: the state of knowledge in a changing world [J/OL]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2020, **96**(9): fiaa122 [2021-11-20]. doi: 10.1093/femsec/fiaa122.
- [14] 周煜杰, 贾夏, 赵永华, 等. 森林生态系统土壤真菌群落及其影响因素研究进展[J]. 生态环境学报, 2020, **29**(8): 1703 – 1712.
ZHOU Yujie, JIA Xia, ZHAO Yonghua, *et al.* A review on soil fungal community and its affecting factors in forest ecosystem [J]. *Ecol Environ Sci*, 2020, **29**(8): 1703 – 1712.
- [15] 厉桂香, 马克明. 土壤微生物多样性海拔格局研究进展[J]. 生态学报, 2018, **38**(5): 1521 – 1529.
LI Guixiang, MA Keming. Progress in the study of elevational patterns of soil microbial diversity [J]. *Acta Ecol Sin*, 2018, **38**(5): 1521 – 1529.
- [16] 赵盼盼, 周嘉聪, 林开森, 等. 海拔梯度变化对中亚热带黄山松土壤微生物生物量和群落结构的影响[J]. 生态学报, 2019, **39**(6): 2215 – 2225.
ZHAO Panpan, ZHOU Jiacong, LIN Kaimiao, *et al.* Effect of different altitudes on soil microbial biomass and community structure of *Pinus taiwanensis* forest in mid-subtropical zone [J]. *Acta Ecol Sin*, 2019, **39**(6): 2215 – 2225.
- [17] 孟苗婧, 郭晓平, 张金池, 等. 海拔变化对凤阳山针阔混交林地土壤微生物群落的影响[J]. 生态学报, 2018, **38**(19): 7057 – 7065.
MENG Miaojing, GUO Xiaoping, ZHANG Jinchi, *et al.* Effects of altitude on soil microbial community in Fengyang Mountain coniferous and broad-leaved forest [J]. *Acta Ecol Sin*, 2018, **38**(19): 7057 – 7065.
- [18] LI Guixiang, XU Guorui, SHEN Congcong, *et al.* Contrasting elevational diversity patterns for soil bacteria between two ecosystems divided by the treeline [J]. *Sci China Life Sci*, 2016, **59**(11): 1177 – 1186.
- [19] DAI Zhongmin, ZANG Huadong, CHEN Jie, *et al.* Metagenomic insights into soil microbial communities involved in carbon cycling along an elevation climosequences [J]. *Environ Microbiol*, 2021, **23**(8): 4631 – 4645.
- [20] 金裕华. 武夷山不同海拔土壤微生物多样性的变化特征[D]. 南京: 南京林业大学, 2012.
JIN Yuhua. *Variations of Soil Microbial Diversity along an Elevation Gradient in the Wuyi Mountains* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2012.
- [21] 丁炳扬, 陈根荣, 程秋波, 等. 浙江凤阳山自然保护区种子植物区系的统计分析[J]. 云南植物研究, 2000, **22**(1): 27 – 37.
DING Bingyang, CHEN Genrong, CHENG Qiubo, *et al.* A floristic statistics and analyses of seed plants of Fengyangshan Nature Reserve in Zhejiang Province [J]. *Acta Bot Yunnan*, 2000, **22**(1): 27 – 37.
- [22] 徐筱芃. 浙江凤阳山常绿阔叶林树种多样性及其影响因素研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2017.
XU Xiaopeng. *Study on Plant Diversity and Its Influence Factors of the Evergreen Broad-leaved Forest in Fengyang Mountain* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2017.
- [23] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
LU Rukun. *The Analysis Method of Soil Agricultural Chemistry* [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000.
- [24] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, **30**(15): 2114 – 2120.
- [25] MAGOČ T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J].

- Bioinformatics*, 2011, **27**(21): 2957 – 2963.
- [26] 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.
- [27] EDGAR R C, HAAS B J, CLEMENTE J C, *et al.* UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection [J]. *Bioinformatics*, 2011, **27**(16): 2194 – 2200.
- [28] ROGNES T, FLOU T, NICHOLS B, *et al.* VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics [J/OL]. *Peer J*, 2016, **4**: 2409v1 [2021-11-20]. doi: 10.7287/peerj.preprints.2409v1.
- [29] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation [J/OL]. *Genome Biol*, 2011, **12**(6): R60 [2021-11-20]. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>.
- [30] SHEN Congcong, NI Yingying, LIANG Wenjun, *et al.* Distinct soil bacterial communities along a small-scale elevational gradient in alpine tundra [J/OL]. *Front Microbiol*, 2015, **6**: 582 [2021-11-20]. doi: 10.3389/fmicb.2015.00582.
- [31] 安前东, 徐梦, 张旭博, 等. 西藏色季拉山垂直植被带土壤细菌群落组成及功能潜势[J]. 应用生态学报, 2021, **32**(6): 2147 – 2157.
AN Qiangdong, XU Meng, ZHANG Xubo, *et al.* Soil bacterial community composition and functional potentials along the vertical vegetation transect on Mount Segri, Tibet, China [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2021, **32**(6): 2147 – 2157.
- [32] SINGH D, LEE-CRUZ L, KIM W S, *et al.* Strong elevational trends in soil bacterial community composition on Mt. Halla, South Korea [J]. *Soil Biol Biochem*, 2014, **68**: 140 – 149.
- [33] 贺婧, 闫冰, 李俊生, 等. 秦岭中段北坡不同海拔土壤中细菌群落的分布特征及区域差异比较[J]. 环境科学研究, 2019, **32**(8): 1374 – 1383.
HE Jing, YAN Bing, LI Junsheng, *et al.* Altitude distribution patterns and regional differences of soil bacterial community in northern slopes in the Middle Qinling Mountains [J]. *Res Environ Sci*, 2019, **32**(8): 1374 – 1383.
- [34] WANG Juntao, ZHENG Yuanming, HU Hangwei, *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]. *J Soil Sediment*, 2015, **15**(5): 1224 – 1232.
- [35] 李敏, 闫伟. 海拔对乌拉山油松根围真菌群落结构的影响[J]. 菌物学报, 2019, **38**(11): 1992 – 2006.
LI Min, YAN Wei. Effects of altitude on rhizosphere fungal community structure of *Pinus tabulaeformis* in Wula Mountain, China [J]. *Mycosystema*, 2019, **38**(11): 1992 – 2006.
- [36] KANOKRATANA P, UENGWETWANIT T, RATTANACHOMSRI U, *et al.* Insights into the phylogeny and metabolic potential of a primary tropical peat swamp forest microbial community by metagenomic analysis [J]. *Microb Ecol*, 2011, **61**(3): 518 – 528.
- [37] 杜思瑶, 于森, 刘芳华, 等. 设施种植模式对土壤细菌多样性及群落结构的影响[J]. 中国生态农业学报, 2017, **25**(11): 1615 – 1625.
DU Siyao, YU Miao, LIU Fanghua, *et al.* Effect of facility management regimes on soil bacterial diversity and community structure [J]. *Chin J Eco-Agric*, 2017, **25**(11): 1615 – 1625.
- [38] 刘子涵, 黄方园, 黎景来, 等. 覆盖模式对旱作农田土壤微生物多样性及群落结构的影响[J]. 生态学报, 2021, **41**(7): 2750 – 2760.
LIU Zihan, HUANG Fangyuan, LI Jinglai, *et al.* Effects of farmland and mulching patterns on soil microbial diversity and community structure in dryland [J]. *Acta Ecol Sin*, 2021, **41**(7): 2750 – 2760.
- [39] 薛晓敏, 王来平, 韩雪平, 等. 不同树盘覆盖对矮砧苹果园土壤微生物群落结构和多样性的影响[J]. 生态学报, 2021, **41**(4): 1528 – 1536.
XUE Xiaomun, WANG Laiping, HAN Xueping, *et al.* Effects of different tree disk mulching on soil microbial community structure and diversity in dwarfing rootstock apple orchard [J]. *Acta Ecol Sin*, 2021, **41**(4): 1528 – 1536.
- [40] BASTIDA F, TORRES I F, MORENO J L, *et al.* The active microbial diversity drives ecosystem multifunctionality and is physiologically related to carbon availability in Mediterranean semi-arid soils [J]. *Mol Ecol*, 2016, **25**(18): 4660 – 4673.
- [41] 陈岳民, 高金涛, 熊德成, 等. 土壤增温对中亚热带杉木幼林土壤微生物群落结构和有效氮的影响[J]. 亚热带资源与环境学报, 2016, **11**(4): 1 – 8.
CHEN Yuemin, GAO Jintao, XIONG Decheng, *et al.* Effects of soil warming on soil microbial community structure and soil available nitrogen in subtropical young Chinese fir plantation [J]. *J Subtrop Resour Environ*, 2016, **11**(4): 1 – 8.