

DOI: 10. 11686/cyxb2024369

http://cyxb. magtech. com. cn

李若璇, 李升郅, 陈奕彤, 等. 保护播种下紫花苜蓿根际土壤氨氧化和反硝化微生物群落对糜子种植比例变化的响应. 草业学报, 2025, 34(6): 110—121.

LI Ruo-xuan, LI Sheng-zhi-can, CHEN Yi-tong, *et al.* Effects of different planting ratios of broomcorn millet (*Panicum miliaceum*) on ammonia-oxidizing and denitrifying microorganisms in rhizosphere soil of alfalfa (*Medicago sativa*). Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(6): 110—121.

保护播种下紫花苜蓿根际土壤氨氧化和反硝化微生物群落对糜子种植比例变化的响应

李若璇, 李升郅, 陈奕彤, 孙雨豪, 杨培志, 崔彦农, 龙明秀, 何树斌*

(西北农林科技大学草业与草原学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:为研究保护播种下糜子种植比例对紫花苜蓿根际土壤因子、氨氧化微生物[氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)和氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)]和反硝化微生物(*nirK*、*nirS*和*nosZ*)的影响,以黄土高原旱作农业区紫花苜蓿根际土壤为对象,设置4种糜子—紫花苜蓿种植比例[1:1(1P1M), 1:2(1P2M), 1:3(1P3M)和2:3(2P3M)]并以紫花苜蓿单播(M)为对照,利用高通量测序分析紫花苜蓿根际土壤中氨氧化和反硝化微生物群落多样性、结构、组成、共现网络及其与土壤因子的相关性。结果表明:随着糜子种植密度的增加,保护播种提高了土壤总氮含量和稳定碳氮同位素值,且在保护播种2P3M中显著增加($P<0.05$),土壤有机碳含量先降低后增加,且在2P3M中显著下降($P<0.05$)。保护播种提高了土壤氨氧化和*nosZ*微生物的丰富度,降低了*nirK*微生物的丰富度,其中,AOA微生物 α 多样性对种植比例变化更敏感。 β 多样性分析发现,不同保护播种比例之间,土壤氨氧化和反硝化微生物群落结构差异均不明显。AOA和AOB微生物分别以亚硝化球菌属和亚硝化螺菌属为优势属,其含量均超过85%;而反硝化微生物表现为富集促进植物生长发育和养分转化的菌属,如*nirK*微生物中无色杆菌属和*nirS*微生物中固氮弧菌属等。共现网络分析表明,保护播种2P3M处理的土壤氨氧化和反硝化微生物群落具有更复杂的共现网络,主要体现在网络复杂性和模块化系数指标。相关性分析进一步显示,全氮、钙离子、镁离子与AOA微生物多样性显著相关,土壤有机碳和镉离子均与AOB和*nirS*微生物多样性显著相关。综上所述,饲草与杂粮保护播种会影响饲草根际土壤氨氧化和反硝化微生物多样性、组成和共现网络,揭示了保护播种技术下氮素高效利用的微生物机制,且以2:3的比例种植作物可能会发挥出保护播种技术最佳优势。

关键词:保护播种;氨氧化;反硝化;功能基因;多样性;共现网络

Effects of different planting ratios of broomcorn millet (*Panicum miliaceum*) on ammonia-oxidizing and denitrifying microorganisms in rhizosphere soil of alfalfa (*Medicago sativa*)

LI Ruo-xuan, LI Sheng-zhi-can, CHEN Yi-tong, SUN Yu-hao, YANG Pei-zhi, CUI Yan-nong, LONG Ming-xiu, HE Shu-bin*

College of Grassland Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract: Companion planting of broomcorn millet (*Panicum miliaceum*) with alfalfa (*Medicago sativa*) can improve nitrogen utilization. To explore the mechanism of this effect, we investigated the impact of different planting

收稿日期:2024-09-26;改回日期:2024-11-11

基金项目:国家重点研发计划项目(2022YFD1300803)和国家自然科学基金(32071878)资助。

作者简介:李若璇(2001—),女,黑龙江绥化人,在读硕士。E-mail: 3141196690@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: heshubin@nwsuaf.edu.cn

ratios of broomcorn millet and alfalfa on ammonia-oxidizing archaea (AOA), ammonia-oxidizing bacteria (AOB), denitrifying microorganisms (*nirK*-, *nirS*-, and *nosZ*-containing microbes), and other soil factors in alfalfa rhizosphere soil under companion planting in the dry farming area of the Loess Plateau. Four broomcorn millet-alfalfa planting ratios [1:1 (1P1M), 1:2 (1P2M), 1:3 (1P3M), and 2:3 (2P3M)] were established with alfalfa monoculture (M) as the control. The diversity, structure, composition, and co-occurrence network of ammonia-oxidizing and denitrifying microorganisms in alfalfa rhizosphere soil were determined by high-throughput sequencing, and their correlations with soil factors were analyzed. The results showed that, as the ratio of broomcorn millet increased, the soil total nitrogen content and stable carbon and nitrogen isotope values increased, and significantly increased in 2P3M ($P < 0.05$); and the soil organic carbon content first decreased and then increased, with a significant decrease in 2P3M ($P < 0.05$). Companion planting increased the richness of ammonia-oxidizing and *nosZ*-containing microorganisms, but decreased the richness of *nirK*-containing microorganisms. The alpha diversity of AOA was sensitive to the planting ratio. However, a beta diversity analysis revealed no significant differences in ammonia-oxidizing and denitrifying community structures among the different planting ratios. *Nitrososphaera* and *Nitrospira* were the dominant genera of AOA and AOB, respectively, accounting for over 85% of their communities based on abundance. The denitrifying microbial community was enriched in genera that promote plant growth and nutrient transformation, such as *Achromobacter* among the *nirK*-containing microorganisms and *Azoarcus* among the *nirS*-containing microorganisms. A co-occurrence network analysis revealed a more complex co-occurrence network of soil ammonia-oxidizing and denitrifying communities in 2P3M than in the other treatments, and this was mainly evident in the network complexity and modularity indicators. The contents of total nitrogen and calcium and magnesium ions were significantly correlated with AOA microbial diversity, and the contents of soil organic carbon and cadmium ions were significantly correlated with AOB and *nirS* microorganisms. In summary, companion planting affected the diversity, composition, and co-occurrence network of ammonia-oxidizing and denitrifying microorganisms in the rhizosphere soil of alfalfa, revealing the microbial mechanism of efficient nitrogen utilization under this technology. Based on these results, the broomcorn millet: alfalfa planting ratio of 2:3 appears to be the most effective for exploiting the advantages of companion planting.

Key words: companion planting; ammonia oxidation; denitrification; functional gene; diversity; co-occurrence network

在全球气候变化的背景下,我国黄土高原地区单一的农业系统由于长期依赖大量氮肥的输入而处于氮损失加剧、作物产量低、生物多样性减少等不可持续的状态^[1-3]。紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是一种在我国西北地区栽培面积最大的豆科牧草,具有营养价值高、产量高及适应性广等优点^[4]。紫花苜蓿在建植初期面临苗期生长缓慢、杂草多、光照和土壤养分等资源利用率低及生产收益低等问题^[5]。在我国北方的实际农业生产中,禾本科作物通过竞争刺激紫花苜蓿使其增加根际共生固氮和氮利用,有效地利用了作物之间的互补和促进作用,提高牧草年总产量,因此,选择生育期短的一年生禾本科植物与紫花苜蓿进行保护播种是弥补牧草生产初期生产效益低的有效措施^[6-7]。糜子(*Panicum miliaceum*)是中国黄土高原地区广泛种植的杂粮作物,具有生育期短、抗旱能力强的特点,在西北地区实际生产中常与豆科作物共同种植,宜作为伴播作物^[8]。在实际生产中,作物的种植比例能够通过改变土壤因子和微生物来调节土壤微环境,最终影响作物生长,并且合理、适宜的种植栽培模式会更好地促进作物对土地、光、热及土壤养分的有效利用^[9-10]。因此,明确保护播种的比例,并阐明其对紫花苜蓿根际土壤因子的影响机制有助于进一步发展保护播种的生产技术与理论。

氮循环微生物具有矿化养分,促进植物生长的功能^[11]。硝化和反硝化作用作为土壤氮循环的关键过程分别受氨氧化微生物[氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)和氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria,

AOB)]介导和反硝化微生物(*nirK*、*nirS*和*nosZ*)调控^[12]。研究表明,由氨氧化古菌和氨氧化细菌进行氨氧化作用将铵态氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)转化成反硝化作用底物亚硝态氮($\text{NO}_2^-\text{-N}$)和硝态氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$),再经反硝化微生物产生一氧化二氮(N_2O)或氮气(N_2)^[2]。氨氧化和反硝化微生物容易受到土壤因子、植物种类、施肥等因素影响,例如,土壤因子驱动改变根际氨氧化和反硝化微生物生长和活性,这一过程因作物种类不同而产生不同效果^[8]; *nirK*微生物群落多样性受全氮和硝态氮影响^[13];长期施用绿肥可以提高氮循环功能进而实现作物增产^[14]。研究表明, AOB微生物可通过竞争限制 AOA微生物增长,且 *nirS*微生物群落与土壤因子的相关性高于 *nirK*微生物群落^[15]。由于当前农业对肥料依赖严重,田间试验中氨氧化和反硝化微生物群落对氮肥的响应得到了更多的关注^[12],然而,氨氧化和反硝化微生物参与紫花苜蓿根际土壤氮循环的机制,以及对保护播种比例的响应还不清楚。系统阐释和评估土壤中氨氧化和反硝化微生物群落多样性、结构、组成、共现网络对保护播种比例的响应,对掌握保护播种中氮高效循环利用的微生物学机制具有重要意义。因此,本研究以黄土高原地区保护播种中不同糜子种植比例下紫花苜蓿的根际土壤为材料,研究5种不同保护播种比例下紫花苜蓿根际土壤中各因子的变化及氨氧化和反硝化微生物群落多样性、结构、组成和共现网络及其与土壤因子之间的关系。研究结果可为深入阐明保护播种氮循环变化机制,进一步发展紫花苜蓿保护播种的理论与技术提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验区概况

该试验基地位于陕西省延安市农业科学研究所安塞试验基地($36^\circ48'10''\text{N}$, $109^\circ20'58''\text{E}$),海拔为1007.6 m,属于半干旱季风气候,年均气温8.8℃,年均降水量581.1 mm,年蒸发量1645.4 mm。年日照时数为2489.5 h。

1.2 试验材料

紫花苜蓿品种选用休眠级为2级的‘中苜1号’,种子来源于唯特蓝图(北京)农业科技有限公司。糜子品种选用‘榆糜1号’,由西北农林科技大学农学院小杂粮团队提供种子。

1.3 试验方法

1.3.1 试验设计 本试验设置5个处理:以紫花苜蓿单播(M)为对照,糜子与紫花苜蓿分别以1:1(1P1M)、1:2(1P2M)、1:3(1P3M)、2:3(2P3M)的比例进行保护播种。将样地随机划分为20个小区,每个处理重复4次,每个小区面积为40 m²,小区之间设置50 cm的缓冲带。紫花苜蓿行间距保持为30 cm,保护播种处理下将糜子种植在紫花苜蓿行间。糜子种植密度大小顺序为1P3M<1P2M<2P3M<1P1M。在播种作物前的整地中,加入适量基肥补充有机质。2022年4月上旬以15~20 kg·hm⁻²的播种量播种紫花苜蓿,1个月后以60~70 kg·hm⁻²的播种量播种糜子。分别于7月中旬和9月中旬在紫花苜蓿处于初花期时进行刈割,留茬5 cm。从饲草播种到收获,所有处理均无额外添加肥料和人工灌溉。

1.3.2 样品采集及测定 土壤样品于2022年9月18日第2次刈割后进行采集。采用5点取样法,挖出被选中的紫花苜蓿根系,抖落根系上的疏松土壤,采集根际黏附土壤作为样品。将5个样品均匀混合成复合样品,密封于塑料袋中。土壤样品分为两部分,一部分冷冻干燥, -80℃保存,用于DNA提取和微生物分析;另一部分保存在4℃冰箱中,用于土壤因子分析。

1.4 指标测定

1.4.1 紫花苜蓿根际土壤化学性质、金属离子和稳定碳氮同位素指标 采用传统方法^[16]测定土壤化学性质。采用重铬酸钾外加热法测定土壤有机碳(soil organic carbon, SOC)含量。采用凯氏定氮法测定全氮(total nitrogen, TN)含量;采用紫外分光光度计法测定硝态氮、铵态氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$, $\text{NH}_4^+\text{-N}$)含量。采用乙酸铵交换原子吸收分光光度法测定钙离子(Ca^{2+})、镁离子(Mg^{2+})含量。采用DTPA-TEA浸提-AAS法结合原子吸收分光光度计测定镉离子(Cd^{2+})含量。由中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所分析测试中心使用Isoprime 100稳定同位素质谱仪(ATC-185稳定同位素质谱仪)测定土壤稳定碳氮同位素($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$)值。土壤稳定碳氮同位素计算公式如下:

$$\delta^{13}\text{C}=\left(\frac{R_{\text{样品}}}{R_{\text{标准}}}-1\right)\times 1000\text{‰}$$

(1)

$$\delta^{15}\text{N}=\left(\frac{R_{\text{样品}}}{R_{\text{标准}}}-1\right)\times 1000\text{‰}$$

(2)

式中:R 为同位素比值,R_{样品}、R_{标准}分别表示样品和标准物¹³C/¹²C 或¹⁵N/¹⁴N 的值。

1.4.2 紫花苜蓿根际土壤 DNA 提取、氨氧化和反硝化功能基因扩增及 Illumina Miseq 测序 用试剂盒(D5625 Soil DNA Kit,美国 Omega biotek 公司)提取样品中的 DNA。以定量、纯化后提取的 DNA 作为模板,根据不同引物扩增氨氧化(AOA 和 AOB)和反硝化(*nirK*、*nirS* 和 *nosZ*)微生物的功能基因。本研究使用的扩增引物见表 1。扩增体系由 5×Reaction Buffer、GC buffer、dNTP(2.5 mmol·L⁻¹)、正反向引物、DNA 模板、ddH₂O 和 Q5 DNA 聚合酶组成。扩增过程包括初始变性、退火、延伸和最后延伸。

将获取的 PCR 产物委托上海派森诺生物科技股份有限公司进行功能基因微生物群落分析的 Illumina MiSeq 高通量测序。通过双末端 DNA 测序获得的原始数据使用 Vsearch 进行引物去除、拼接、去重和聚类等步骤,获得操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)表。随后,使用 FrameBot 对序列进行校对,以去除可能引入的非目的片段。采用 Nilsson 等^[17]的方法通过与 NCBI 分类学数据库中的核酸序列比对并使用 BROCC 算法进行物种注释。最后,以最低样本序列量的 95% 为标准抽平后获得 OTUs 及其相对丰度。

表 1 Illumina 测序分析中使用的扩增引物和扩增片段大小

Table 1 Amplification primers and amplification sizes used in Illumina sequencing analysis

功能基因 Functional genes	引物 Primers	引物序列 Primer sequences (5'—3')	长度 Length (bp)	参考文献 Reference
AOA	Arch-amoA26F	GACTACATMTTCTAYACWGAYTGGGC	417	[18]
	Arch-amoA417R	GGKGTCA TRTATGGWGGYAA YGTTGG		
AOB	amoA1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	500	[19]
	amoA2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
<i>nirK</i>	NIRK-F	TCATGGTGCTGCCGCGYGANGG	400	[20]
	NIRK-R	GAACTTGCCGGTKGCCAGAC		
<i>nirS</i>	CD3AF	GTSAACG TSAAGGARACSGG	400	[21]
	R3CDR	GASTTCGGRTGSGTCTTGA		
<i>nosZ</i>	NOSZ-1126F	GGGCTBGGGCCRTTGCA	400	[22]
	NOSZ-1381R	GAAGCGRTCCTTSGARA ACTTG		

1.5 数据分析

采用 Excel 2010 进行数据整合,利用 SPSS 25 对土壤因子进行单因素方差分析(one way ANOVA)和邓肯法(Duncan's)多重检验。采用 Origin 2020 和 Adobe Illustrator 2020 构建图形。用 Kruskal-Wallis 检验和 Dunn'test 检验评估微生物群落 α 多样性。采用 95% 置信区间 Bray-Curtis 距离算法的主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)描述微生物群落 β 多样性。使用 R 包“psych”和“Hmisc”分析微生物群落的共现网络,并导入 Gephi 0.10.1 进行可视化。利用 Bray-Curtis 距离算法和 Mantel 检验对微生物 Shannon 指数和土壤因子矩阵进行相关性分析,并利用 R 包“linkET”关联相关热图和网络图。表中数据均为“平均值±标准差”,n=4。

2 结果与分析

2.1 保护播种比例对紫花苜蓿根际土壤因子的影响

由表 2 可知,不同的保护播种比例对土壤因子产生的影响不同。相比于对照(M),保护播种下随糜子密度增加 SOC 含量先降低后增加,且在 2P3M 和 1P3M 发生显著变化(P<0.05)。保护播种处理 2P3M 显著提高 TN 含量(P<0.05),而其他处理与对照没有显著差异。δ¹³C 和 δ¹⁵N 在 2P3M 均显著高于 M(P<0.05),并达到了最大

值,而其他处理表现出不同程度的增加,但是差异均不显著。不同处理下 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 含量没有表现出显著变化。随着糜子种植密度增加,4种处理的 Mg^{2+} 含量逐渐降低。与 M 相比,1P3M 显著提高 Ca^{2+} 含量 ($P < 0.05$),并达到最大值,其余3组处理的 Ca^{2+} 含量随着种植密度的增加逐渐降低。 Cd^{2+} 含量在 1P2M 显著降低 ($P < 0.05$)。

表2 不同保护播种比例下土壤因子变化

Table 2 Changes of soil factors in different companion planting ratios

处理 Treatments	土壤有机碳 SOC ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	总氮 TN ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	铵态氮 NH_4^+ -N ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	硝态氮 NO_3^- -N ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	稳定碳同位素 $\delta^{13}\text{C}$ (‰)	稳定氮同位素 $\delta^{15}\text{N}$ (‰)	钙离子 Ca^{2+} ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	镁离子 Mg^{2+} ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	镉离子 Cd^{2+} ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
M	5.49±0.55a	0.27±0.07bc	4.98±0.92a	2.96±0.50a	-7.20±0.08b	26.35±2.12b	4.59±0.27c	35.83±0.01ab	0.040±0.00a
1P3M	4.18±0.87b	0.22±0.02c	4.22±0.49a	3.02±0.70a	-7.03±0.38ab	26.71±4.51ab	5.42±0.26a	39.92±2.43a	0.039±0.00ab
1P2M	4.44±0.97ab	0.25±0.05bc	4.63±1.04a	2.89±0.44a	-6.81±0.44ab	26.81±1.77ab	5.20±0.43ab	38.93±3.02ab	0.033±0.01b
2P3M	4.23±0.57b	0.41±0.04a	4.67±1.03a	2.99±0.98a	-6.62±0.22a	32.12±3.89a	4.73±0.47bc	36.27±3.43ab	0.039±0.00ab
1P1M	5.16±0.66ab	0.31±0.08b	4.52±0.83a	3.01±0.38a	-6.99±0.34ab	27.33±2.25ab	4.39±0.07c	34.84±2.57b	0.036±0.01ab

SOC: Soil organic carbon; TN: Total nitrogen; NH_4^+ -N: Ammonium nitrogen; NO_3^- -N: Nitrate nitrogen; $\delta^{13}\text{C}$: Stable carbon isotopes; $\delta^{15}\text{N}$: Stable nitrogen isotopes. M: 紫花苜蓿单播 Alfalfa monoculture; 1P3M: 糜子保护播种紫花苜蓿的种植比例为 1:3 The planting ratio of broomcorn millet companion planting with alfalfa is 1:3; 1P2M: 糜子保护播种紫花苜蓿的种植比例为 1:2 The planting ratio of broomcorn millet companion planting with alfalfa is 1:2; 2P3M: 糜子保护播种紫花苜蓿的种植比例为 2:3 The planting ratio of broomcorn millet companion planting with alfalfa is 2:3; 1P1M: 糜子保护播种紫花苜蓿的种植比例为 1:1 The planting ratio of broomcorn millet companion planting with alfalfa is 1:1. 不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上处理间差异显著。Different lowercase letters indicate significant differences among different planting ratio treatments at the $P < 0.05$ level.

2.2 保护播种比例对紫花苜蓿根际土壤氨氧化和反硝化微生物群落特征的影响

2.2.1 保护播种比例对紫花苜蓿根际土壤氨氧化和反硝化微生物群落多样性的影响

由图1可知,保护播种处理提高了 AOA 的 Chao1 指数,1P3M、2P3M 分别较 M 显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),并在 2P3M 达到最高值;保护播种处理降低了 AOA 的 Good's coverage 指数,1P3M、2P3M 分别较 M 产生了显著性变化 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),并在 2P3M 达到最低值;Shannon 指数并没有随着种植密度增加而产生规律性变化。保护播种处理提高了 AOB 和 *nosZ* 微生物群落 Chao1 指数,降低了 *nirK* 微生物群落 Chao1 指数,但这些差异均不显著。*nirK* 微生物的 Shannon 指数在 1P3M 和 1P1M 之间存在显著差异 ($P < 0.05$)。不同处理下的 *nirS* 微生物群落 α 多样性没有显著差异,但其 Chao1 和 Good's coverage 指数随着保护播种比例变化的趋势与 *nirK* 微生物相反。由图2的主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)可知,5个微生物的第一主坐标轴和第二主坐标轴之和均不超过50%,且保护播种比例间没有明显分离,说明不同保护播种比例间氨氧化和反硝化微生物群落结构差异不明显。整体上看,AOA 是氨氧化和反硝化微生物群落中对种植比例变化最敏感的微生物群落,但其 Chao1 指数和 Shannon 指数远小于其他微生物;反硝化微生物群落的 Chao1 和 Shannon 指数均高于氨氧化微生物群落,说明反硝化微生物具有较高的丰富度和多样性。

2.2.2 保护播种比例对紫花苜蓿根际土壤氨氧化和反硝化微生物群落组成的影响

由图3A可知,AOA 群落中检测到3种不同属的微生物,以亚硝化球菌属(*Nitrososphaera*)为主,占88.07%~90.17%,且在1P3M和2P3M中相对丰度高于M;其次是 *Candidatus Nitrosocosmicus*,占8.92%~10.60%。AOB 微生物群落有亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)、亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)和亚硝化弧菌属(*Nitrosovibrio*)3个主要菌属,其中,亚硝化螺菌属是优势属,占86.02%~95.00%,且在1P3M和2P3M中相对丰度高于M;亚硝化单胞菌属属于条件稀有类群(图3B)。德沃斯氏菌属(*Devosia*)是 *nirK* 微生物群落中相对丰度最高的可分类菌属,并在1P2M相对丰度达到最大;相比于其他处理,2P3M较大程度增加了无色杆菌属(*Achromobacter*)相对丰度(图3C)。在 *nirS* 微生物群落可分类的属中,以假单胞菌属(*Pseudogulbenkiania*)为主;2P3M中固氮弧菌属(*Azoarcus*)相对丰度高于其他处理(图3D)。在 *nosZ* 微生物群落中,1P2M和1P3M中芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)相对丰度超过25%,高于其他处理;2P3M中草螺菌属(*Herbaspirillum*)相对丰度最高(图3E)。

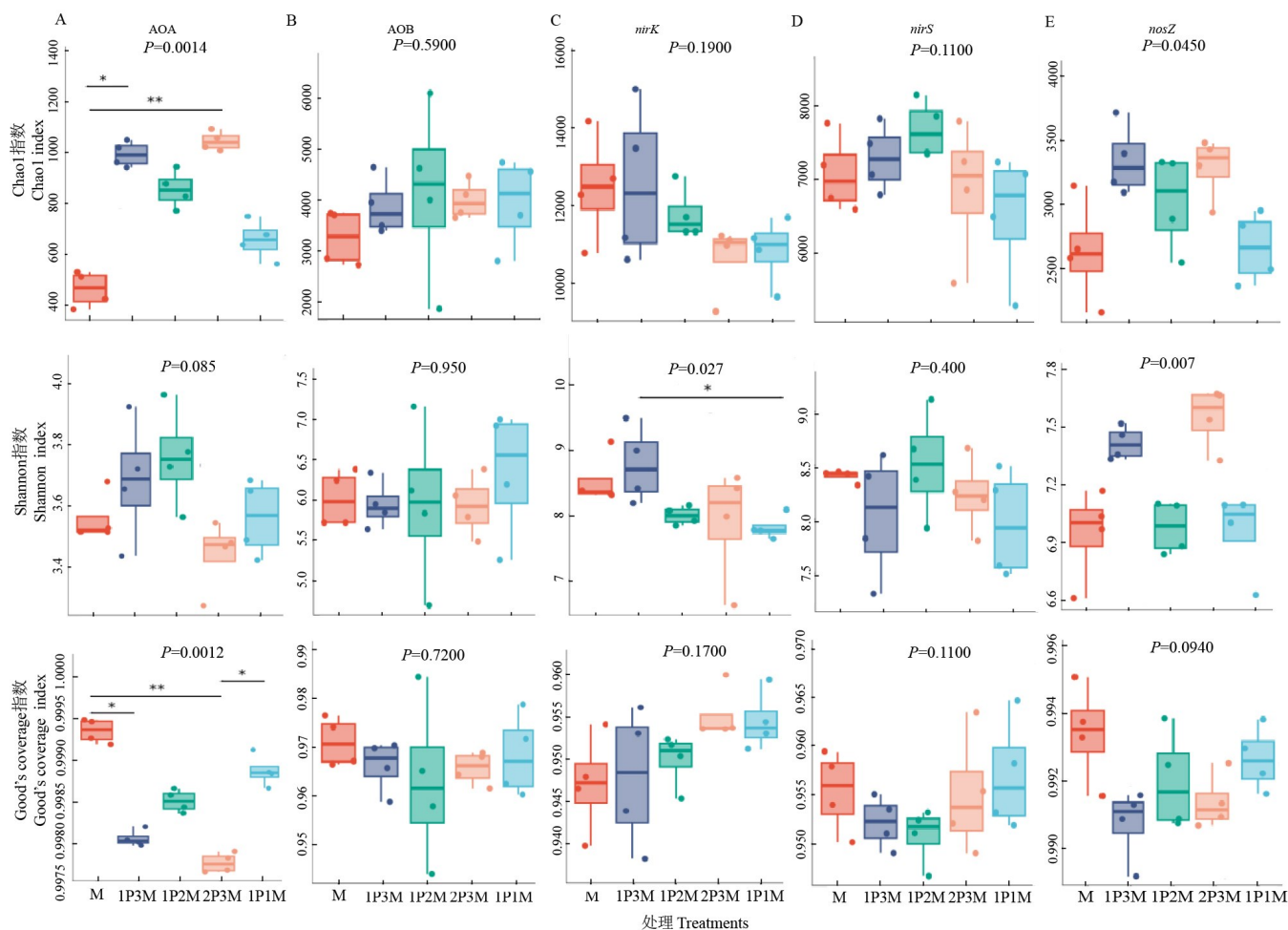


图1 不同保护播种比例下氨氧化和反硝化微生物群落 α 多样性

Fig. 1 Alpha diversity of the alfalfa rhizosphere soil ammonia-oxidizing and denitrifying microbial communities in different companion planting ratios

AOA: 氨氧化古菌 Ammonia-oxidizing archaea; AOB: 氨氧化细菌 Ammonia-oxidizing bacteria; *nirK*: *nirK* 微生物群落 *nirK*-containing microorganisms; *nirS*: *nirS* 微生物群落 *nirS*-containing microorganisms; *nosZ*: *nosZ* 微生物群落 *nosZ*-containing microorganisms. 下同 The same below.
*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$.

2.2.3 保护播种比例对紫花苜蓿根际土壤氨氧化和反硝化微生物共现网络的影响 土壤氨氧化和反硝化微生物的共现网络随保护播种比例变化而呈现不同的共现模式(图4)。网络节点数和边数在1P1M和1P2M减少,而在1P3M和2P3M则有不同程度的增加。2P3M和1P2M分别有最多和最少的正相关关系,但所有处理的正相关占比都不超过60%。2P3M还表现出较高的平均度、平均加权度和密度,而氨氧化微生物占整体微生物的比例最低(19.94%)。与M相比,1P2M和2P3M的模块化系数均下降,且2P3M的模块化系数最低。整体来看,2P3M处理的共现模式具有较高的网络复杂性,但微生物群落处于不稳定状态。

2.3 紫花苜蓿根际土壤因子与氨氧化和反硝化微生物的相关性分析

通过对紫花苜蓿根际土壤因子与氨氧化和反硝化微生物进行 Mantel 检验(图5)表明,AOA 群落多样性与 TN、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 显著相关($P < 0.05$);AOB 和 *nirS* 微生物群落多样性均与 SOC 和 Cd^{2+} 表现出显著相关性($P < 0.05$);*nirK* 和 *nosZ* 微生物群落多样性与土壤因子均无显著相关性。整体上看,氨氧化微生物比反硝化微生物更容易受到土壤因子的影响。

3 讨论

氮素是限制植物生长发育的关键因子之一^[2]。本研究中保护播种 2P3M 处理下紫花苜蓿根际土壤的 TN 含

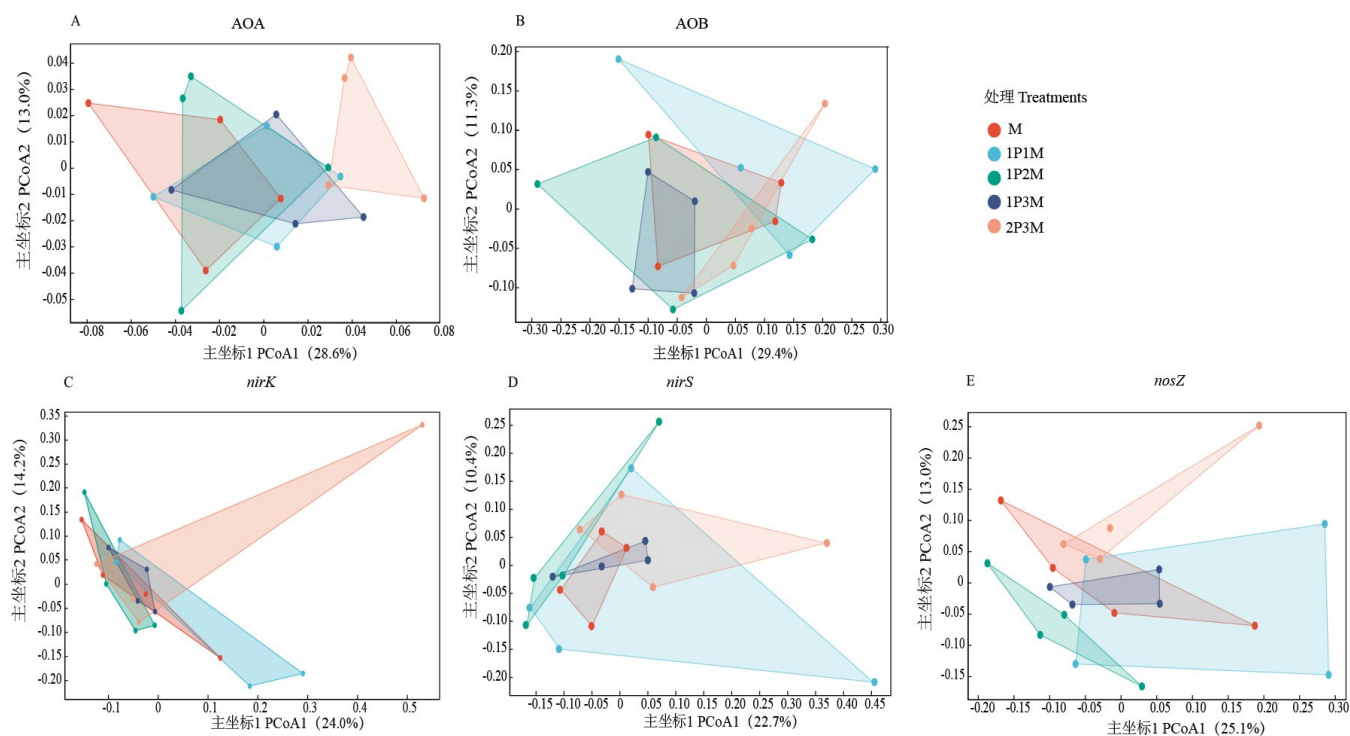


图2 不同保护播种比例下紫花苜蓿根际土壤氨氧化和反硝化微生物群落的主坐标分析

Fig. 2 Principal coordinates analysis of the alfalfa rhizosphere soil ammonia-oxidizing and denitrifying microbial communities in different companion planting ratios

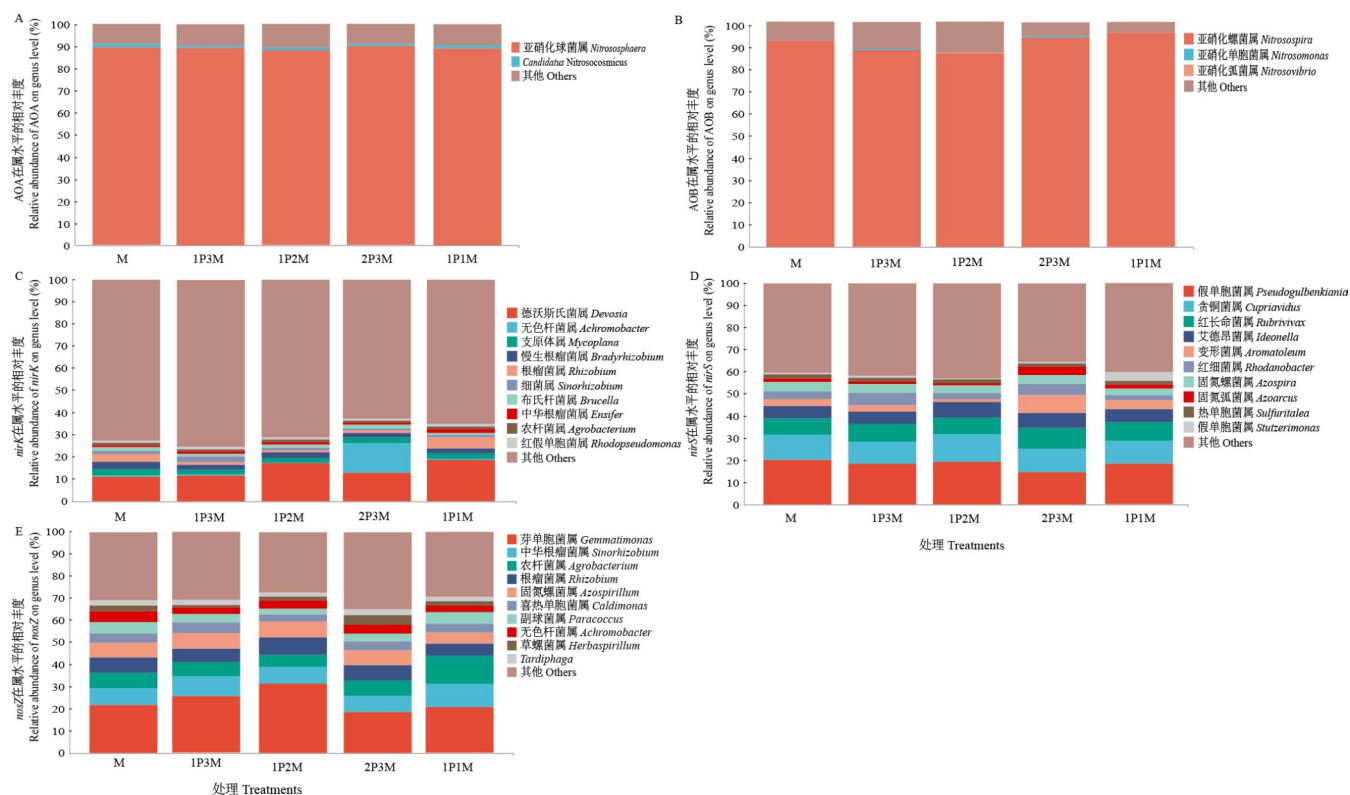


图3 不同保护播种比例下紫花苜蓿根际土壤氨氧化和反硝化微生物群落在属水平上的群落组成

Fig. 3 Community composition at the genus levels of the alfalfa rhizosphere soil ammonia-oxidizing and denitrifying microbial communities in different companion planting ratios

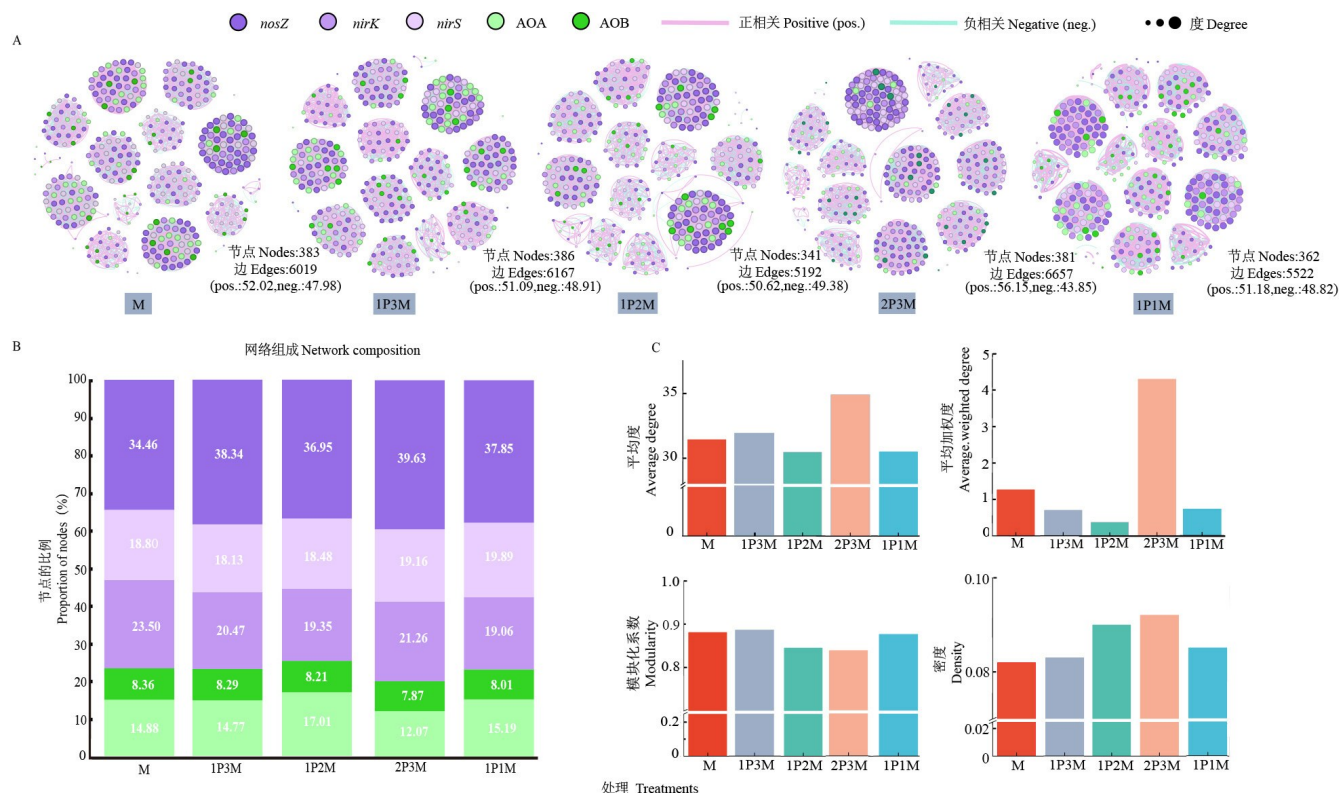


图 4 不同保护播种比例下氨氧化和反硝化微生物群落在共网络的可视化网络(A)、网络组成(B)及拓扑学性质(C)

Fig. 4 Visual network (A), network composition (B) and topology properties (C) of microbial co-occurrence network in ammonia-oxidizing and denitrifying communities in different companion planting ratios

节点间的连接代表它们之间有强且显著的相关性。网络(A)中的点代表 OTUs。A connection represents a strong (Spearman's $\rho > 0.60$) and significant ($P < 0.05$) correlation. Different dots in (A) represent the OTUs in the network.

量显著高于其他处理且 $\delta^{15}\text{N}$ 值显著高于 M, 表明这种种植比例下的保护播种能有效增强紫花苜蓿的共生固氮能力并促进土壤的硝化速率^[23], 这可能是保护播种栽培模式下紫花苜蓿建植初年实现增产效益, 资源高效利用的潜在机制之一。Lai 等^[7]发现, 由于谷物对氮素的吸收能力较强, 导致其与豆科作物复合栽培时降低了豆科作物根际土壤的氮含量从而促进了豆科作物生物固氮。本研究中的 NO_3^- -N 含量没有显著变化, 但这并不意味着 NO_3^- -N 对种植比例变化不敏感, 可能是因为复合栽培模式下豆禾植物根系在氮的吸收与转化之间存在复杂的动态平衡关系, 这与 Egbeagu 等^[24]的研究结果相似。Zhou 等^[25]发现 SOC 作为微生物生长繁殖的供能物质, 它的分解通常会消耗贫化 ^{13}C 而导致 $\delta^{13}\text{C}$ 富集。此外, 研究表明, 作物受荫蔽导致光能利用率的下降会限制其光合速率和根际碳输入^[26], 从而影响作物根际中 SOC 的含量。本研究发现不同于 1P3M 中 SOC 含量显著降低而 $\delta^{13}\text{C}$ 值无显著性变化, 2P3M 中 $\delta^{13}\text{C}$ 值显著增加, 表明 1P3M 处理发生了复合栽培模式下常见的荫蔽胁迫^[27], 而 2P3M 处理下微生物生长活动旺盛。

微生物调控的氨氧化和反硝化作用在土壤氮素转化过程中起到关键作用^[2]。微生物群落 α 多样性的 Chao1 指数常用来表征物种丰富度, 是微生物丰度的最佳预测因子^[28]。在本研究中, 保护播种增加了氨氧化微生物的 Chao1 指数, 表明保护播种促进了紫花苜蓿根际土壤中氨氧化微生物的生长, 增强了土壤氨氧化作用^[29], 这与土壤因子 TN 和 $\delta^{15}\text{N}$ 的结果一致。相比于其他微生物群落, AOA 微生物群落 α 多样性对种植比例变化更敏感, 表明种植比例的变化驱动了作物间对养分的互补利用^[30]; 而氨氧化和反硝化微生物群落的结构没有明显分离, 一方面表明氨氧化和反硝化微生物群落结构变化可能受限于种植时间; 另一方面表明不同保护播种比例间氨氧化和反硝化微生物没有产生空间异质性^[31]。反硝化微生物中 *nirK* 微生物群落丰富度和多样性高于 *nirS* 和 *nosZ* 微生物群落, 说明 *nirK* 微生物在反硝化微生物中可能占主导地位, 这与在宁夏荒漠开展的一项针对豆科灌丛根际微生物特征的研究结果相似^[32]。

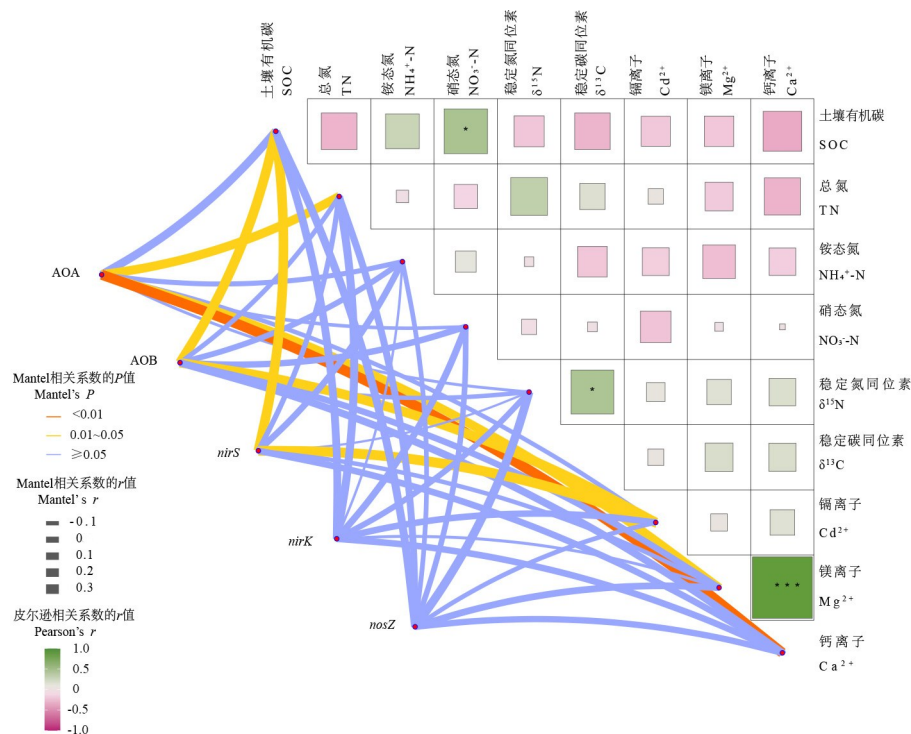


图5 紫花苜蓿根际氨氧化和反硝化微生物群落与土壤因子的关系

Fig. 5 Relationship of ammonia-oxidizing and denitrifying microbial community diversity with alfalfa rhizosphere soil factors

热图颜色和网格大小代表了相关性大小。绿色和粉色方框分别代表正相关和负相关。线条粗细映射相关性值。节点与土壤因子之间连线的颜色具有统计意义。Heat map color and grid size represent the size of correlation value. Green boxes represent positive correlations, and pink boxes represent negative correlations. The thickness of each line is mapped in this interval according to the correlation value. The color of the connection between the nodes and the soil factors indicate statistical significance. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$.

高通量测序结果表明在 AOA 微生物群落中亚硝化球菌属是相对丰度最高的属,这与 Zhalnina 等^[33]探究土地管理对硝化微生物群落影响的研究结果相同,表明该菌属在紫花苜蓿根际氮转化中可能起着重要的作用。2P3M 中, AOB 微生物群落会招募亚硝化单胞菌属,通过微生物自我调节来使其适应环境的变化^[34];反硝化微生物能够富集一些促进植物生长发育的属,如 *nirK* 微生物群落中无色杆菌属和 *nosZ* 微生物群落中草螺菌属^[35-36]。本研究还发现大量存在于苜蓿根际土壤、具有促进养分转化功能的一些菌属,如 *nirK* 微生物群落中德沃斯氏菌属, *nirS* 微生物群落中固氮弧菌属和假单胞菌属,以及 *nosZ* 微生物群落中芽单胞菌属^[37-39]。此外,在紫花苜蓿根际土壤中包括许多未分类的反硝化微生物,表明黄土高原土壤蕴含着较多未知的反硝化微生物菌属^[32]。

共现网络是分析微生物群落间相互作用的重要方法,而网络稳定性和复杂性是评价微生物共现网络的关键指标^[40-42]。研究表明,具有较高网络复杂性共现模式的微生物群落处于富营养的状态,利于微生物多样性的增加、加快物质循环和信息传递^[43-44]。本研究中,2P3M 和 1P3M 的共现模式有较多的节点数和边数,表明它们具有较高的网络复杂性。此外,模块性和微生物群落稳定性相关,较低模块性的共现模式中微生物群落趋向不稳定,处于应激状态^[41]。本研究中,相比其他处理,1P2M 和 2P3M 处理中模块化系数在下降,并在 2P3M 达到最低值,表明 2P3M 的微生物群落整体处于不稳定的状态;所有共现模式中正相关关系占比都不超过 60%,而在 2P3M 处理下正相关关系占比有小幅度的提高,表明保护播种有一定的调节氨氧化和反硝化微生物之间关系的作用^[45],2P3M 模式减弱了氨氧化和反硝化微生物之间的竞争。

研究表明,土壤因子是驱动参与氮转化的微生物群落产生变化的主要因素^[46-47]。本研究发现,相比反硝化微生物群落,氨氧化微生物群落多样性更容易受土壤因子影响(图 5)。AOA 群落多样性与 Ca^{2+} 显著相关,这可能与 AOA 微生物群落自养、混养或异养的不同生活方式有关^[48-49]。此外,不同于 *nirK* 和 *nosZ* 微生物,本研究中 *nirS* 微生物群落多样性与 SOC 显著相关,表明 *nirS* 微生物是一种对土壤环境变化较敏感的反硝化微生物^[50]。而

nirK 和 *nirS* 微生物群落中多样性和土壤因子的相关性对保护播种比例表现出的不同响应,证实了 *nirK* 和 *nirS* 微生物之间存在生态位差异^[51]。

4 结论

适宜种植比例的保护播种提高了紫花苜蓿根际总氮含量和稳定碳氮同位素值,促进了紫花苜蓿生物固氮。保护播种通过增加氨氧化微生物的丰富度,增强了土壤氨氧化作用,且 AOA 微生物 α 多样性对种植比例变化敏感。尽管氨氧化和反硝化微生物群落结构相对稳定,但 2P3M 处理下反硝化群落招募了更多有利于植物生长发育和养分转化的菌属。由共现网络可知,2P3M 的共现模式具有较高的网络复杂性且相对减弱了氨氧化和反硝化微生物之间的竞争。因此,保护播种调控土壤因子,影响氨氧化微生物和反硝化微生物的多样性和群落组成,实现氮的高效利用,是丰产的重要机制之一。综合来看,2P3M 具有最佳的氮周转利用,所以 2:3 种植作物可能是黄土高原地区保护播种的最佳比例。

参考文献 References:

- [1] Feng W L, Liu Y S, Li Y R, *et al.* Feasibility analysis of a double-cropping system for the efficient use of farmland on China's Loess Plateau. *Journal of Geographical Sciences*, 2023, 33(6): 1271—1286.
- [2] Zhang W, Lu J S, Bai J, *et al.* Introduction of soybean into maize field reduces N₂O emission intensity via optimizing nitrogen source utilization. *Journal of Cleaner Production*, 2024, 442: 141052.
- [3] Gong X W, Dang K, Liu L, *et al.* Intercropping combined with nitrogen input promotes proso millet (*Panicum miliaceum* L.) growth and resource use efficiency to increase grain yield on the Loess plateau of China. *Agricultural Water Management*, 2021, 243: 106436.
- [4] Feng Y P, Shi Y, Zhao M Y, *et al.* Yield and quality properties of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and their influencing factors in China. *European Journal of Agronomy*, 2022, 141: 126637.
- [5] Sowiński J. The effect of companion crops management on biological weed control in the seeding year of lucerne. *Biological Agriculture & Horticulture*, 2013, 30(2): 97—108.
- [6] Li P, Zhang H, Guo T T, *et al.* Effects of companion crop on weed suppression and forage growth in the early establishment stage of legume-grass mixture in Hulunbuir area. *Acta Prataculturae Sinica*, 2022, 30(12): 3423—3432.
李沛, 张浩, 郭童天, 等. 保护播种对呼伦贝尔混播草地建植初期杂草抑制和牧草生长的影响. *草业学报*, 2022, 30(12): 3423—3432.
- [7] Lai H L, Gao F Y, Su H, *et al.* Nitrogen distribution and soil microbial community characteristics in a legume-cereal intercropping system: A review. *Agronomy*, 2022, 12(8): 1900.
- [8] Gong X W, Liu C J, Li J, *et al.* Responses of rhizosphere soil properties, enzyme activities and microbial diversity to intercropping patterns on the Loess Plateau of China. *Soil and Tillage Research*, 2019, 195: 104355.
- [9] Cuartero J, Pascual J A, Vivo J M, *et al.* A first-year melon/cowpea intercropping system improves soil nutrients and changes the soil microbial community. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2022, 328: 107856.
- [10] Zhang G Z, Yang H, Zhang W P, *et al.* Interspecific interactions between crops influence soil functional groups and networks in a maize/soybean intercropping system. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2023, 355: 108595.
- [11] Zhang J, Lin X G, Yin R. Advances in functional gene diversity of microorganism in relation to soil nitrogen cycling. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2009, 17(5): 1029—1034.
张晶, 林先贵, 尹睿. 参与土壤氮素循环的微生物功能基因多样性研究进展. *中国生态农业学报*, 2009, 17(5): 1029—1034.
- [12] Grassmann C S, Mariano E, Diniz P P, *et al.* Functional N-cycle genes in soil and N₂O emissions in tropical grass-maize intercropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 2022, 169: 108655.
- [13] Han B, Ye X H, Li W, *et al.* The effects of different irrigation regimes on nitrous oxide emissions and influencing factors in greenhouse tomato fields. *Journal of Soils and Sediments*, 2017, 17(10): 2457—2468.
- [14] Zhou G P, Fan K K, Gao S J, *et al.* Green manuring relocates microbiomes in driving the soil functionality of nitrogen cycling to obtain preferable grain yields in thirty years. *Science China Life Sciences*, 2023, 67(3): 596—610.
- [15] Liu B, Ahnemann H, Arlotti D, *et al.* Impact of diversified cropping systems and fertilization strategies on soil microbial

- abundance and functional potentials for nitrogen cycling. *Science of the Total Environment*, 2024, 932: 172954.
- [16] Bao S D. Soil and agricultural chemistry analysis (the third edition). Beijing: China Agriculture Press, 2000: 106–108.
鲍士旦. 土壤农化分析(第3版). 北京: 中国农业出版社, 2000: 106–108.
- [17] Nilsson R H, Ryberg M, Kristiansson E, *et al.* Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLoS One*, 2006, 1(1): e59.
- [18] Park S J, Park B J, Rhee S K. Comparative analysis of archaeal 16S rRNA and *amoA* genes to estimate the abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea in marine sediments. *Extremophiles*, 2008, 12(4): 605–615.
- [19] Weiner A M, Maizels N. A deadly double life. *Science*, 1999, 284(5411): 63–64.
- [20] Mosier A C, Francis C A. Denitrifier abundance and activity across the San Francisco Bay estuary. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, 2(5): 667–676.
- [21] Michotey V, Méjean V, Bonin P. Comparison of methods for quantification of cytochrome *cd₁*-denitrifying bacteria in environmental marine samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1564–1571.
- [22] Chen Z, Liu J B, Wu M N, *et al.* Differentiated response of denitrifying communities to fertilization regime in paddy soil. *Microbial Ecology*, 2011, 63(2): 446–459.
- [23] Jensen E S, Carlsson G, Hauggaard-Nielsen H. Intercropping of grain legumes and cereals improves the use of soil N resources and reduces the requirement for synthetic fertilizer N: A global-scale analysis. *Agronomy for Sustainable Development*, 2020, 40(1): 5.
- [24] Egbeagu U U, Liu W Y, Zhang J N, *et al.* The activity of ammonia-oxidizing bacteria on the residual effect of biochar-compost amended soils in two cropping seasons. *Biochemical Engineering Journal*, 2023, 191: 108778.
- [25] Zhou X Q, Chen C R, Wang Y F, *et al.* Effects of warming and increased precipitation on soil carbon mineralization in an Inner Mongolian grassland after 6 years of treatments. *Biology and Fertility of Soils*, 2012, 48(7): 859–866.
- [26] De Vries F T, Caruso T. Eating from the same plate? Revisiting the role of labile carbon inputs in the soil food web. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 102: 4–9.
- [27] Cheng B, Wang L, Liu R J, *et al.* Shade-tolerant soybean reduces yield loss by regulating its canopy structure and stem characteristics in the maize-soybean strip intercropping system. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 848893.
- [28] Laughlin D C, Hart S C, Kaye J P, *et al.* Evidence for indirect effects of plant diversity and composition on net nitrification. *Plant and Soil*, 2010, 330: 435–445.
- [29] Yu Y J, Zhu B, Wang X G, *et al.* N₂O emission from rice-rapeseed rotation system in Chengdu Plain of Sichun Basin. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(6): 1277–1282.
于亚军, 朱波, 王小国, 等. 成都平原水稻—油菜轮作系统氧化亚氮排放. *应用生态学报*, 2008, 19(6): 1277–1282.
- [30] Zhang X L, Teng Z Y, Zhang H H, *et al.* Nitrogen application and intercropping change microbial community diversity and physicochemical characteristics in mulberry and alfalfa rhizosphere soil. *Journal of Forestry Research*, 2021, 32(5): 2121–2133.
- [31] Franklin R B, Mills A L. Importance of spatially structured environmental heterogeneity in controlling microbial community composition at small spatial scales in an agricultural field. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(9): 1833–1840.
- [32] Liu S, Yao J N, Zhang J J, *et al.* Functional gene abundance and community diversity of ammonia-oxidizing and denitrifying microorganisms in the rhizosphere soil of desert leguminous shrubs. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33(5): 115–127.
刘爽, 姚佳妮, 张钧杰, 等. 荒漠豆科灌丛根际土壤氨氧化和反硝化微生物功能基因丰度及群落多样性特征. *草业学报*, 2024, 33(5): 115–127.
- [33] Zhálnina K, de Quadros P D, Gano K A, *et al.* *Ca*. Nitrososphaera and *Bradyrhizobium* are inversely correlated and related to agricultural practices in long-term field experiments. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 104.
- [34] Park S, Cho K, Lee T, *et al.* Improved insights into the adaptation and selection of *Nitrosomonas* spp. for partial nitrification under saline conditions based on specific oxygen uptake rates and next generation sequencing. *Science of the Total Environment*, 2022, 822: 153644.
- [35] Danish S, Zafar-ul-Hye M, Mohsim F, *et al.* ACC-deaminase producing plant growth promoting rhizobacteria and biochar mitigate adverse effects of drought stress on maize growth. *PLoS One*, 2020, 15(4): e0230615.
- [36] Kandel S L, Joubert P M, Doty S L. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms*, 2017, 5(4): 77.
- [37] Chen S M, Waghmode T R, Sun R B, *et al.* Root-associated microbiomes of wheat under the combined effect of plant

- development and nitrogen fertilization. *Microbiome*, 2019, 7(1): 136.
- [38] Li X M, Qiao J T, Li S, *et al.* Bacterial communities and functional genes stimulated during anaerobic arsenite oxidation and nitrate reduction in a paddy soil. *Environmental Science & Technology*, 2019, 54(4): 2172–2181.
- [39] Xun W B, Liu Y P, Li W, *et al.* Specialized metabolic functions of keystone taxa sustain soil microbiome stability. *Microbiome*, 2021, 9(1): 35.
- [40] Ling N, Wang T T, Kuzyakov Y. Rhizosphere bacteriome structure and functions. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 836.
- [41] Hernandez D J, David A S, Menges E S, *et al.* Environmental stress destabilizes microbial networks. *ISME Journal*, 2021, 15(6): 1722–1734.
- [42] Ma B, Wang Y L, Ye S D, *et al.* Earth microbial co-occurrence network reveals interconnection pattern across microbiomes. *Microbiome*, 2020, 8(82): 1–12.
- [43] Banerjee S, Walder F, Büchi L, *et al.* Agricultural intensification reduces microbial network complexity and the abundance of keystone taxa in roots. *ISME Journal*, 2019, 13(7): 1722–1736.
- [44] Jiao S, Lu Y H, Wei G H. Soil multitrophic network complexity enhances the link between biodiversity and multifunctionality in agricultural systems. *Global Change Biology*, 2021, 28(1): 140–153.
- [45] Feng J Y, Ma H X, Wang C Y, *et al.* Water rather than nitrogen availability predominantly modulates soil microbial beta-diversity and co-occurrence networks in a secondary forest. *Science of the Total Environment*, 2024, 907: 167996.
- [46] Hou S P, Ai C, Zhou W, *et al.* Structure and assembly cues for rhizospheric *nirK*- and *nirS*-type denitrifier communities in long-term fertilized soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 119: 32–40.
- [47] Castellano-Hinojosa A, Correa-Galeote D, González-López J, *et al.* Effect of nitrogen fertilisers on nitrous oxide emission, nitrifier and denitrifier abundance and bacterial diversity in closed ecological systems. *Applied Soil Ecology*, 2020, 145: 103380.
- [48] Stahl D A, De La Torre J R. Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea. *Annual Review of Microbiology*, 2012, 66(1): 83–101.
- [49] Hatzenpichler R. Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(21): 7501–7510.
- [50] Sun H S, Jiang S X. A review on *nirS*-type and *nirK*-type denitrifiers via a scientometric approach coupled with case studies. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 2022, 24(2): 221–232.
- [51] Azziz G, Monza J, Etchebehere C, *et al.* *nirS*- and *nirK*-type denitrifier communities are differentially affected by soil type, rice cultivar and water management. *European Journal of Soil Biology*, 2017, 78: 20–28.