



•研究报告•

# 不同经营模式山核桃林地土壤pH值、养分与细菌多样性的差异

张 媚 林马水 曹秀秀 赵树民 蒋达青 王冰璇  
汪石莹 樊炎迪 郭 明 林海萍\*

(浙江农林大学生物农药高效制备技术国家地方联合工程实验室, 浙江临安 311300)

**摘要:** 为探究土壤细菌多样性及其功能对山核桃(*Carya cathayensis*)经营模式的指导作用, 本文采用16S rRNA基因高通量测序技术检测并比较了生态经营和过度经营的山核桃林土壤中的细菌群落, 分析了山核桃干腐病发病期干腐病感病指数、土壤pH值、养分与细菌多样性的相关性。结果表明: (1)生态经营山核桃林的感病指数( $3.3 \pm 3.35$ )显著低于过度经营山核桃林( $81.9 \pm 1.27$ )。 (2)生态经营山核桃林土壤pH ( $6.64 \pm 0.06$ )显著高于过度经营山核桃林( $5.80 \pm 0.04$ )。 (3)过度经营山核桃林土壤的速效磷、速效钾和速效氮含量分别为 $18.10 \pm 0.58$  mg/kg、 $698.63 \pm 11.24$  mg/kg和 $227.13 \pm 3.81$  mg/kg, 均分别显著高于三者生态经营山核桃林土壤中的含量( $14.94 \pm 0.27$  mg/kg、 $497.13 \pm 6.19$  mg/kg和 $195.28 \pm 6.01$  mg/kg)。 (4)生态经营和过度经营山核桃林土壤分别有14和21个主要细菌属, 其中鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、*Gaiella*和溶杆菌属(*Lysobacter*)为生态经营山核桃林土壤的优势属, 其相对多度显著高于过度经营山核桃林; 而*Bryobacter*、*Candidatus Solibacter*和慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)为过度经营山核桃林土壤中的优势属, 其相对多度显著高于生态经营山核桃林。两种经营模式下山核桃林土壤的OTUs、Ace指数、Chao指数、Shannon指数和Simpson指数无显著差异。RDA分析与蒙特卡罗检验表明, pH值、速效磷和速效氮均对土壤细菌优势菌群落结构有显著影响( $P < 0.05$ )。

**关键词:** 生态经营; 过度经营; 山核桃干腐病; 细菌多样性; pH值; 土壤养分

## Difference in pH value and nutrient and bacterial diversity in the *Carya cathayensis* forest soil under different management models

Mei Zhang, Mashui Lin, Xiuxiu Cao, Shumin Zhao, Daqing Jiang, Bingxuan Wang, Shiyang Wang, Yandi Fan, Ming Guo, Haiping Lin\*

Local and National Joint Engineering Laboratory of Biopesticide High-Efficient Preparation, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300

**Abstract:** To optimize management of the *Carya cathayensis* forest through the diversity and function of soil bacteria, disease index, soil pH, and nutrient and soil bacterial diversity were investigated under ecological management and excessive management during the *Botryosphaeria dothidea* infected period using 16S rRNA gene high-throughput sequencing technology. The correlations between each interrelationship factors were also analyzed. Results showed that the disease index of the ecologically managed forest was  $3.3 \pm 3.35$ , which was significantly lower than that of the excessively managed forest with  $81.9 \pm 1.27$ . Moreover, ecological management significantly improved the ability of hickory forest resistant to *B. dothidea*. The soil pH value of the ecologically managed forest was near neutral with a reading of  $6.64 \pm 0.06$ , which was significantly higher than that of excessively managed forest soil with  $5.80 \pm 0.04$ . The contents of available phosphorus, available potassium, and available nitrogen in the excessively managed forest soil were  $18.10 \pm 0.58$  mg/kg,  $698.63 \pm 11.24$  mg/kg and  $227.13 \pm 3.81$  mg/kg, which were significantly higher than those in the ecologically

收稿日期: 2017-10-11; 接受日期: 2018-03-08

基金项目: 浙江省科技厅公益技术研究农业项目(2015C32078)、杭州市社会发展科研主动设计项目(20172015A01)和浙江省-中国林科院省院合作科技项目(2015SY11)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: zjlxylhp@163.com

managed forest respectively, with  $14.94 \pm 0.27$  mg/kg,  $497.13 \pm 6.19$  mg/kg and  $195.28 \pm 6.01$  mg/kg. There were 14 and 21 major bacterial genera found in the ecologically and excessively managed forest soil samples, respectively. In ecologically managed forest soils, the dominant genera were *Sphingomonas*, *Gaiella* and *Lyrobacter*, and the relative abundance of these was significantly higher than excessively managed forest soils. *Bryobacter*, *Candidatus Solibacter*, and *Bradyrhizobium* were the dominant genera in the excessively managed forest soils, and their relative abundance was significantly higher than the ecologically managed forest soils. There was no significant difference of OTUs or Ace, Chao, Shannon and Simpson indices between ecologically and excessively managed forest soils. Redundancy analysis (RDA) and Monte Carlo testing showed that pH value, available phosphorous and available nitrogen had significant effects on the bacterial flora of the dominant bacterial species in the soil ( $P < 0.05$ ). Our results can provide valuable references for the sustainable management of hickory forests.

**Key words:** ecological management; excessive management; *Carya cathayensis* canker disease; bacterial diversity; pH value; soil nutrient

土壤是农林业最基本的自然资源和物质基础,对植物的生理健康和抵抗病虫害的能力起着决定作用,因此也是植物病虫害生态防治的根本。土壤pH值直接影响植物生长、生理代谢及其对营养元素的利用率(陈平等, 2017); 三大元素氮、磷、钾对植物生长至关重要(张志勇等, 2009); 土壤微生物数量巨大, 种类繁多, 在能量流动和物质循环过程中起着重要作用, 亦与植物的生长发育联系密切(Wang et al, 2017)。研究发现, 不同的种植和施肥方式均影响土壤微生物区系(于寒, 2015; 邢鹏飞, 2016<sup>①</sup>), 如薛超(2015)分离出了香蕉土传枯萎病的拮抗菌株NJN-6, 并将其发酵液与有机肥混合发酵制成有机菌肥。通过施用该菌肥, 形成了一个以拮抗菌为主的微生物区系, 大大降低了发病率, 同时还提高了香蕉的产量。任慧爽等(2017)研究发现桑树含有丰富的内生细菌, 其中存在很多具抑菌活性的菌株, 帮助桑树对抗病虫害。陈雯等(2015)发现胡杨根际土壤中含有丰富的重金属抗性细菌, 能帮助胡杨抵御外界的不良环境。

山核桃(*Carya cathayensis*)是我国特有的木本油料树种(郑万钧, 1985), 主要分布在浙皖交界的天目山区, 是产区脱贫致富、建设新农村和小康社会的主要经济支柱(吕秋菊等, 2012)。近年来, 为了增加经济收益, 很多山核桃农户采取了过度经营模式, 片面追求产量, 一味扩大山核桃纯林面积, 大量使用农药、化肥、除草剂等, 导致山核桃林地植被遭到破坏、水土流失严重、土壤肥力下降(陈世权,

2012)、微生物多样性减少(吴家森等, 2014), 山核桃干腐病、根腐病、褐斑病、蚜虫等各种病虫害日趋严重(张璐璐等, 2013; 巨云等为, 2015), 特别是山核桃干腐病的暴发和大面积蔓延已对山核桃产业可持续发展构成严重威胁(郑宏兵, 2004)<sup>②</sup>。目前在生产上, 主要采取刮除病斑后涂抹或喷施化学农药的方法治疗山核桃干腐病(杨淑贞等, 2009; 戴德江等, 2015), 不仅收效甚微且存在严重的环境与食品污染问题。因此, 摒弃高投入高产高污染的过度经营模式, 推广促进山核桃产业可持续发展的生态经营模式, 通过改善山核桃林生态环境减少病虫害的发生迫在眉睫。生态经营是一种复合型生产经营模式, 通过生草栽培(钱进芳等, 2014)、林间套种(余琳等, 2011)、测土配方(沈一凡等, 2016)等生态经营措施进行生态修复, 恢复土壤肥力、提高生物多样性、控制病虫害发生, 从而促进山核桃林可持续健康生长(沈月琴等, 2010)。

本研究比较了生态经营和过度经营的山核桃林中的干腐病感病指数、土壤细菌多样性、pH值及养分差异, 并与经营模式进行了相关性分析, 以期探寻山核桃树健康生长的关键因子, 建立科学的可持续经营模式, 促进山核桃产业稳定发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 样地选择

选择浙江省临安区太阳镇武村(29–30° N, 118–120° E)为实验地点, 山核桃林平均林龄为30年, 林分密度为380株/ha, 主要分布在坡向西南、坡度25°、海拔340 m的山腰。该地点属于亚热带季风气候区, 季节分明、气候温和、雨量充沛, 年均气温

① 邢鹏飞 (2016) 不同施肥处理调控农田土壤微生物区系研究. 硕士学位论文, 沈阳农业大学, 沈阳.

② 郑宏兵 (2004) 山核桃抗溃疡病的机理及相关因素的研究. 硕士学位论文, 安徽农业大学, 合肥.

17.2℃, 年均日照时数 1,837.9 h, 年均降水量 1,613.9 mm, 土壤类型为红壤。

选择坡向、坡度、坡位、海拔等自然条件基本一致的山核桃林, 设置生态经营和过度经营模式样地各3个, 每个样地面积为0.2 ha, 水平间距500 m。其中1、2、3为生态经营模式样地, 地理位置分别为: 29°40'21" N, 118°16'16" E, 海拔336 m; 29°40'25" N, 118°16'33" E, 海拔333 m; 29°40'30" N, 118°16'50" E, 海拔344 m。4、5、6为过度经营模式样地, 分别为: 29°40'37" N, 118°16'14" E, 海拔349 m; 29°40'31" N, 118°17'09" E, 海拔341 m; 29°40'46" N, 118°16'48" E, 海拔337 m。

生态经营模式具体措施为: 人工除草, 施专用配方肥(1 kg/株, N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O = 15:11:12), 不使用农药, 山核桃林间套种中草药三七(*Panax notoginseng*), 林下生草覆盖率达80%, 果实采收措施为自然落果、张网采收。过度经营模式具体措施为: 采用除草剂除草, 每667 m<sup>2</sup>喷施10%草甘膦水剂1.5 kg, 稀释50倍喷施; 大量施用复合肥(5 kg/株, N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O = 15:15:15); 每667 m<sup>2</sup>喷施农药43%戊唑醇45 g, 稀释1,000倍喷施; 山核桃林间无套种, 林下无生草覆盖, 果实采收措施为人工采果。

## 1.2 山核桃干腐病感病指数统计分离鉴定

在每个样地里随机选取30棵山核桃树, 统计每棵树的干腐病病斑数量, 根据山核桃干腐病分级标准与感病指数计算公式(郑宏兵, 2004)<sup>①</sup>, 计算每个样地的感病指数。分级标准为: 山核桃树健康无病斑为I级, 代表值为0; 1-5个病斑为II级, 代表值为1; 6-10个病斑为III级, 代表值为2; 11-15个病斑为IV级, 代表值为3; 16个病斑及以上为V级, 代表值为4; 山核桃树死亡为VI级, 代表值为5。

感病指数计算公式为:

$$\text{感病指数} = \frac{\sum (\text{每级株数} \times \text{该级代表值})}{\text{调查总株数} \times \text{最高一级代表值}} \times 100$$

## 1.3 土样采集

在山核桃干腐病发病期(2016年7月), 在生态经营和过度经营各3块样地中, 各随机选5棵山核桃树, 在离每棵树主干距离50 cm处的东、西、南、北

4个方向各设置1个采样点, 采集0-20 cm土壤剖面土样。每个样地中每棵树采集4个土样, 5棵树共采集20个土样。将这些土样充分混合均匀, 即得到这个样地的土样。共采集混合得到生态经营和过度经营模式各3个土样。除去土壤中的杂物, 过2 mm筛, 用四分法将土样分为两部分, 一部分自然风干后用来测定土壤的pH值和养分, 另外一部分新鲜土样用来测定细菌多样性, 保存在-80℃环境中。

## 1.4 仪器与试剂

HiSeq 2500 测序仪购自美国 Illumina 公司, Bio-rad T100梯度PCR仪购自上海然泰生物科技有限公司, PHB-1型便携式pH计购自上海三信仪表厂, 高保真PCR Master Mix购自New England Biolabs公司, 引物由杭州擎科梓熙生物技术有限公司合成。

## 1.5 土壤pH值、养分的测定

采用2.5:1的水土比样品, 便携式pH计测定pH值; 采用重铬酸钾容量法测定有机碳(OC); 采用碱解扩散法测定速效氮(AN); 采用钼蓝比色法测定速效磷(AP); 采用CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>浸提-火焰光度法测定速效钾(AK)(中国科学院南京土壤研究所, 1978; 周桔和雷霆, 2007)。

## 1.6 土壤细菌多样性测定

### 1.6.1 基因组DNA提取

采用CTAB法提取土壤基因组DNA, 1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA浓度与纯度。根据DNA的浓度, 用无菌水将其稀释成1 ng/μL, 送浙江天科高新技术发展有限公司测序。

### 1.6.2 基因组DNA测序

使用带Barcode的特异引物、高效高保真酶对16S rRNA基因的V3、V4区域进行扩增, 引物序列为341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') (Yu et al, 2005), 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') (Yu et al, 2005)。PCR反应体系为30 μL: DNA模板10 μL, Phusion Master Mix (2×) 15 μL, 上下引物各1.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 2 μL。反应条件为: 98℃预变性1 min; 30个循环包括: 98℃变性10 s; 50℃复性30 s; 72℃延伸30 s; 最后72℃延伸5 min。PCR扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 选取长度在400-450 bp之间的清晰条带, 用Thermo Scientific公司的GeneJET胶回收试剂盒进行回收。通过Illumina测序仪进行测序。

① 郑宏兵 (2004) 山核桃抗溃疡病的机理及相关因素的研究. 硕士学位论文, 安徽农业大学, 合肥。



### 1.6.3 细菌多样性分析

测序所得数据截去Barcode和引物序列后, 利用FLASH等对每个样本进行拼接、过滤、去嵌合体处理, 最后得到有效的数据(Caporaso et al, 2010; Mago et al, 2011)。通过Uparse等对所有样品的有效tags进行聚类分析, 以97%序列一致性将序列聚类成OTUs, 再利用Silva.nr\_v123数据库在各个分类水平对代表序列进行物种注释分析(Edgar, 2013)。以样品中最低数据量作为均一化处理的标准, 使用R version 3.2.2 (<https://cran.r-project.org/>)分析 $\alpha$ 多样性和 $\beta$ 多样性(王月霞, 2016)<sup>①</sup>。

### 1.7 数据处理与分析

使用SPSS 19.0对所得数据进行单因素方差分析, 进而分析差异显著性。

## 2 结果

### 2.1 不同经营模式山核桃林感病指数、土壤pH值与养分含量的差异

生态经营模式和过度经营模式山核桃林感病指数的统计分析表明, 生态经营山核桃林感病指数为 $3.3 \pm 3.35$ , 显著低于过度经营山核桃林( $81.9 \pm 1.27$ ) ( $P < 0.05$ )。

表1列出了不同经营模式山核桃林土壤pH值与养分含量, 经单因素方差分析可见, 两种经营模式的山核桃林土壤pH值和速效磷、速效钾、速效氮含量差异均为显著( $P < 0.05$ )。生态经营山核桃林土壤pH值显著高于过度经营山核桃林( $P < 0.05$ ); 过度经营山核桃林土壤的速效磷、速效钾与速效氮含量均显著高于生态经营山核桃林。生态经营和过度经营山核桃林土壤的有机碳含量无显著差异。

### 2.2 $\alpha$ 多样性分析

高通量测序结果NCBI序列号为SRP127701。在拼接、过滤和去嵌合体处理后, 生态经营山核桃林土壤的总序列数、有效tags和OTU数目分别为 $64,777 \pm 4,595$ 、 $54,667 \pm 4,084$ 和 $3,786 \pm 82$ , 均高于过度经营山核桃林(分别为 $60,555 \pm 1,634$ 、 $51,470 \pm 1,754$ 、 $3,569 \pm 128$ ), 但差异均不显著。通过SPSS软件对不同样品在97%序列一致性水平下OTUs的 $\alpha$ 多样性指数进行单因素方差分析, 所得结果如表1

表1 不同经营模式山核桃林土壤pH值、养分含量与细菌多样性指数差异

Table 1 The comparison of pH value, nutrient contents and bacterial diversity indices of hickory forest under different management models

指标 Item	生态经营 Ecological management	过度经营 Excessive management
pH	$6.64 \pm 0.06$ a	$5.80 \pm 0.04$ b
速效磷 AP (mg/kg)	$14.94 \pm 0.27$ b	$18.10 \pm 0.58$ a
速效钾 AK (mg/kg)	$497.13 \pm 6.19$ b	$698.63 \pm 11.24$ a
速效氮 AN (mg/kg)	$195.28 \pm 6.01$ b	$227.13 \pm 3.81$ a
有机碳 OC (g/kg)	$36.27 \pm 1.58$ a	$37.57 \pm 6.13$ a
OTUs	$3,786 \pm 82$ a	$3,569 \pm 128$ a
Ace指数 Ace index	$4,198 \pm 136.80$ a	$4,044 \pm 320.22$ a
Chao指数 Chao index	$4,117 \pm 152.61$ a	$4,032 \pm 304.55$ a
Shannon指数 Shannon index	$9.861 \pm 0.116$ a	$9.648 \pm 0.079$ a
Simpson指数 Simpson index	$0.9969 \pm 0.0003$ a	$0.9965 \pm 0.0003$ a

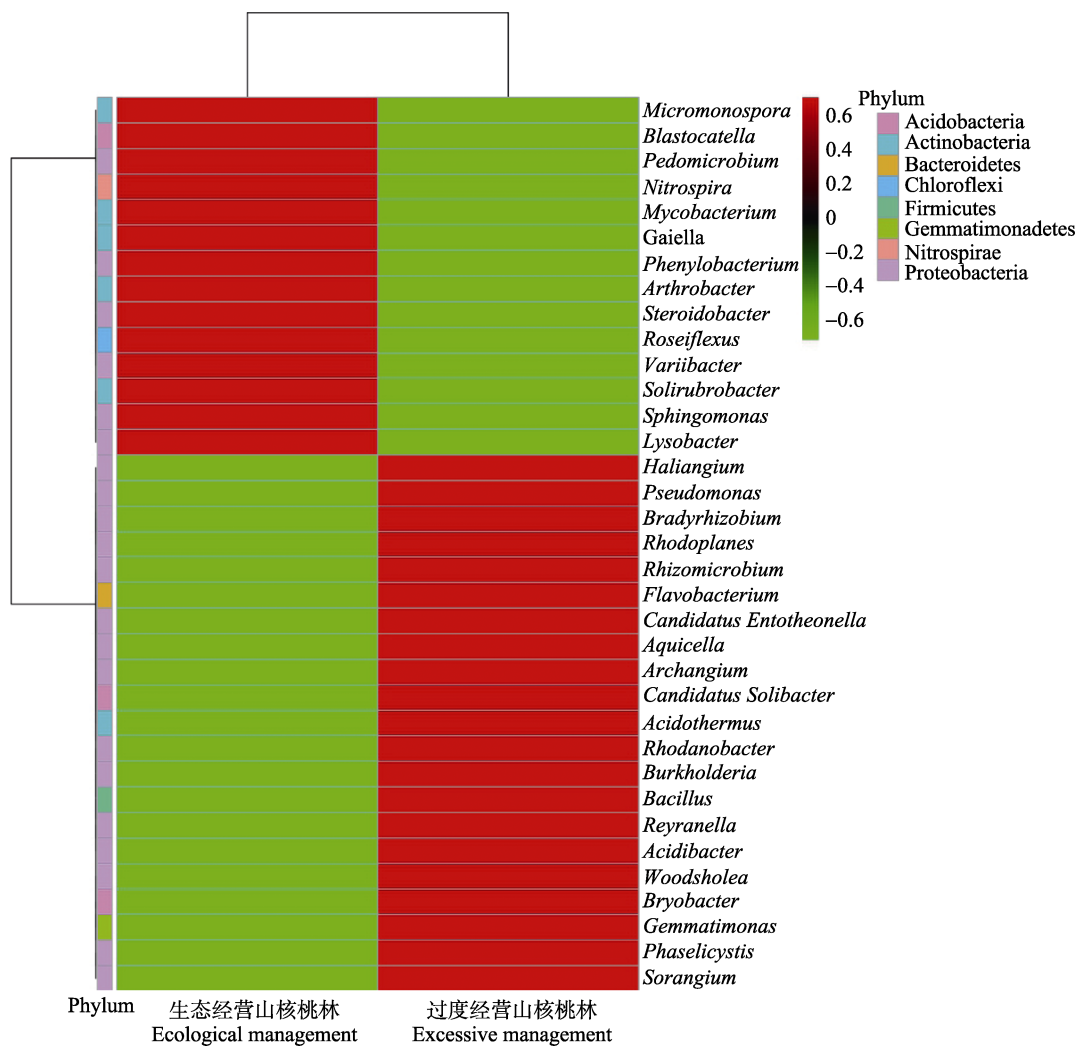
表中数据为平均值  $\pm$  标准差( $n = 3$ ), 同一行不同小写字母表示在0.05水平下差异显著( $P < 0.05$ )。

Data in the table are the average value  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ), and different lowercase letters in the same column mean significant difference at 0.05 level ( $P < 0.05$ ).

所示。可知, 生态经营山核桃林土壤的Ace、Chao、Shannon以及Simpson指数均高于过度经营山核桃林土壤, 但差异均不显著。

根据所有样品在属水平的物种注释及多度信息, 选取相对多度大于0.05%的属, 从物种和样品两方面进行聚类, 绘制成热图(图1)。由图1可知, 在属水平上, 生态经营山核桃林土壤有14个主要菌群, 分别为小单孢菌属(*Micromonospora*), *Blastocatella*, 土微菌属(*Pedomicrobium*), 硝化细菌属(*Nitrospira*), 分支杆菌属(*Mycobacterium*), *Gaiella*, 苯基杆菌属(*Phenyllobacterium*), 节细菌属(*Arthrobacter*), *Steroidobacter*, 玫瑰弯菌属(*Roseiflexu*), *Variibacter*, *Solirubrobacter*, 鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*), 溶杆菌属(*Lysobacters*); 过度经营山核桃林有21个主要菌群, 分别为*Haliangium*, 假单胞菌属(*Pseudomonas*), 慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*), 红杆菌属(*Rhodanobacter*), *Rhizomicrobium*, 黄杆菌属(*Flavobacterium*), *Candidatus Entotheonella*, *Aquicella*, 原囊菌属(*Archangium*), *Candidatus Solibacter*, 热酸菌属(*Acidothermus*), 红游动菌属(*Rhodoplanes*), 伯克氏菌属(*Burkholderia*), *Bacillus*, *Reyranella*, *Acidibacter*, 木洞菌属(*Woodsholea*), *Bryobacter*, 芽单胞

① 王月霞 (2016) 浙江省主要亚热带森林群落类型的物种和谱系 $\alpha$ 和 $\beta$ 多样性研究。硕士学位论文, 浙江大学, 杭州。



**图1** 不同经营模式山核桃林土壤细菌物种相对多度聚类热图(热图对应的值为每一行物种相对多度经过标准化处理后得到的Z值)

**Fig. 1** Species relative abundance clustering heatmap of bacteria of hickory forest soil under different management models. The corresponding values in heatmap are Z values which are obtained after standardized treatment of the relative abundance of each row of the species.

菌属(*Gemmatimonas*), *Phaselicystis*, 堆囊菌属(*Sorangium*)。

由图1可知不同经营模式山核桃林土壤细菌相对多度高于0.5%的主要菌群在门水平上的分布情况, 经单因素方差分析可知两种经营模式山核桃林土壤细菌主要菌门所占比例差异显著( $P < 0.05$ )。生态经营山核桃林土壤中, 放线菌门、硝化螺旋菌门、绿弯菌门所占比例分别为35.7%、7.1%、7.1%, 均显著高于该3个菌门在过度经营山核桃林土壤细菌中所占的比例( $P < 0.05$ ); 而过度经营山核桃林土壤中的变形菌门、酸杆菌门、芽单胞菌门、拟杆菌门、厚壁菌门所占比例分别为71.4%、9.5%、4.8%、4.8%、

4.8%, 均显著高于该5个菌门在生态经营山核桃林土壤细菌中所占的比例( $P < 0.05$ )。

**2.3  $\beta$ 多样性分析**

**2.3.1 不同经营模式山核桃林土壤细菌主要菌群的差异**

在不同分类水平上对两种经营模式下的山核桃林土壤细菌物种多度进行单因素方差分析。结果表明, 在目水平上, 生态经营山核桃林土壤细菌中黄单胞菌目、鞘氨醇单胞菌目、酸杆菌目、Acidobacteria (Subgroup 3)、Acidobacteria (Subgroup 2)、酸微菌目、SC-I-84这7个目的相对多度分别为3.53%、3.31%、1.98%、1.81%、1.64%、1.53%、

1.43%，均显著高于该7个目在过度经营林土壤中的相对多度( $P < 0.05$ )。在科水平上，生态经营山核桃林土壤细菌中鞘氨醇单胞菌科、Acidobacteriaceae (Subgroup 1)、黄单胞菌科这3个科的相对多度分别为2.51%、1.98%、1.23%，均显著高于该3个科在过度经营山核桃林土壤中的相对多度( $P < 0.05$ )。

在属水平上对不同经营模式下山核桃林土壤细菌进行单因素方差分析，得到相对多度较高的优势菌群(表2)。两种经营模式山核桃林土壤细菌优势菌群在种类和多度上均存在差异。在生态经营山核桃林土壤中，*Sphingomonas*、*Gaiella*和*Lysobacter*为3个优势属，相对多度均显著高于过度经营山核桃林( $P < 0.05$ )。而在过度经营山核桃林土壤中，*Bryobacter*、*Candidatus Solibacter*和*Bradyrhizobium*为3个优势属，相对多度分别为1.03%、1.40%、0.95%，均显著高于该3个属相对多度分别为0.8%、0.87%、0.67%的生态经营山核桃林( $P < 0.05$ )。

### 2.3.2 不同经营模式山核桃林土壤细菌优势菌群与pH值、养分的相关性

分别对不同经营模式山核桃林土壤细菌优势属与pH值、养分进行冗余分析(redundancy analysis, RDA)得到图2。图2中的第一排序轴可解释土壤细菌优势属的76.25%，第二排序轴可解释20.03%。第一排序轴与OC、AN、AK、AP呈正相关，与pH呈负相关；第二排序轴与OC、pH呈正相关，与AN、AK、AP呈负相关。生态经营山核桃林与土壤pH呈正相关，过度经营山核桃林与AN、AK、AP、OC

表2 不同经营模式下山核桃林土壤细菌优势菌群及相对多度差异

Table 2 The differences of dominant bacterial flora and relative abundance of hickory forest soil under different management models

菌群 Bacterial flora	生态经营 Ecological management (%)	过度经营 Excessive management (%)
<i>Sphingomonas</i>	2.29 ± 0.18 a	1.47 ± 0.27 b
<i>Gaiella</i>	0.61 ± 0.07 a	0.41 ± 0.06 b
<i>Lysobacter</i>	0.57 ± 0.10 a	0.26 ± 0.05 b
<i>Bryobacter</i>	0.80 ± 0.08 b	1.03 ± 0.03 a
<i>Candidatus Solibacter</i>	0.87 ± 0.02 b	1.40 ± 0.07 a
<i>Bradyrhizobium</i>	0.67 ± 0.09 b	0.95 ± 0.07 a

表中数据为平均值 ± 标准差 ( $n = 3$ )，同一行不同小写字母表示在0.05水平下差异显著( $P < 0.05$ )。  
Data in the table are the average value ± standard deviation ( $n = 3$ ), and different lowercase letters in the same column mean significant difference at 0.05 level ( $P < 0.05$ ).

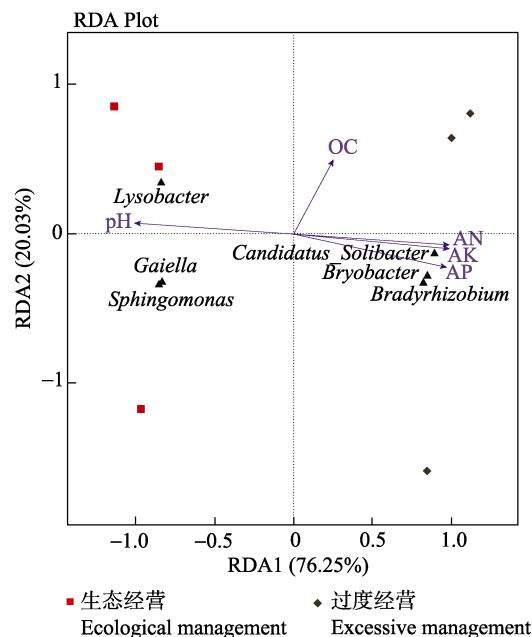


图2 不同经营模式下山核桃林土壤细菌优势菌群与pH值和养分的相关性。AN: 速效氮; AP: 速效磷; AK: 速效钾; OC: 有机碳。

Fig. 2 Correlation of the dominant bacterial flora between the genus level and environmental variables of hickory forest soil under different management models. AN, Available nitrogen; AP, Available phosphorus; AK, Available potassium; OC, Organic carbon.

呈正相关。因此，pH值、AN、AP、AK、OC均为两种经营模式下山核桃林土壤细菌优势菌群的主要影响因子。其中，*Lysobacter*、*Gaiella*和*Sphingomonas*这3种生态经营山核桃林优势属与pH值呈正相关，*Candidatus Solibacter*、*Bryobacter*和*Bradyrhizobium*这3种过度经营山核桃林优势属与AN、AK、AP、OC浓度均呈正相关。这与不同经营模式下山核桃林地土壤pH、养分的差异结果相一致。

为探究pH值、AN、AP、AK、OC是否都对细菌优势属有显著影响( $P < 0.05$ )，对两种经营模式下山核桃林土壤细菌优势属与影响因子进行蒙特卡罗检验。结果表明，pH、AP与AN均为显著性影响因子，三者对土壤细菌优势属影响显著( $P < 0.05$ )；而AK和OC对土壤细菌优势属的影响不显著。

## 3 讨论

本研究表明：生态经营山核桃林土壤pH值显著高于过度经营山核桃林，而感病指数显著低于过度经营山核桃林( $P < 0.05$ )。张璐璐(2013b)研究发现土壤酸性越强，山核桃干腐病越严重；高圣超等



(2017)报道长期单施化肥与除草剂的使用会导致土壤pH值降低、原有生态环境破坏、土壤结构改变、微生物多样性降低等一系列不良后果,从而导致山核桃树体的抗虫抗病能力减弱。本研究结果与上述研究一致。本研究选取的6个样地地理位置接近,自然条件基本一致。过度经营山核桃林土壤呈酸性,且pH值显著低于生态经营山核桃林( $P < 0.05$ ),可能是施用复合肥和除草剂造成的,其土壤速效磷、速效钾、速效氮、有机碳含量均高于生态经营山核桃林,可能是施用大量复合肥引起的。

钱进芳等(2014)研究表明,土壤微生物群落Shannon指数最高的是林下种植白三叶(*Trifolium repens*)的山核桃林地,为3.786。吴家森等(2014)研究发现,山核桃的过度经营降低了土壤微生物功能多样性,经营时间为0年时,Shannon指数最高,为3.61。而本研究中生态经营和过度经营山核桃林土壤的Shannon指数分别为9.861与9.648,均高于这两篇文献。这表明本研究两种经营模式下的山核桃林土壤都有较高的细菌物种多样性。

自然环境(如pH值、水分、植被、温度等)和人类活动(如喷施农药、化肥和土壤耕作方法等)都会对土壤微生物的多样性产生影响(周桔和雷霆,2007)。本研究表明生态经营与过度经营山核桃林地的优势菌群在种类和多度上均存在显著差异( $P < 0.05$ )。过度经营山核桃林地土壤的21个主要菌属中,15个菌属为变形菌门。宋兆齐等(2016)研究发现,变形菌门在酸性最弱的热泉中数量最少,在酸性最强的热泉中数量最多,由此推测可能是过度经营山核桃林地土壤pH呈酸性,导致变形菌门菌属显著多于生态经营山核桃林地土壤( $P < 0.05$ ),其土壤细菌属的数量也高于后者。韩文炎等(2013)发现pH值不同的土壤环境会造成土壤微生物数量和多样性的改变,与本研究的结论一致。此外,经RDA分析和蒙特卡罗检验可知,pH、AN、AP均对土壤微生物优势菌群群落结构有显著影响( $P < 0.05$ )。陆海飞等(2015)发现不同肥料的结合可以提高土壤微生物多样性,生草栽培能改善土壤微生物多样性。本研究生态经营和过度经营山核桃林间套种、林下生草覆盖率的差异,可能是导致生态经营山核桃林土壤细菌多样性高于过度经营山核桃林的主要原因。

*Lysobacter*和*Sphingomonas*均为生态经营山核桃林土壤优势菌群。已有研究表明,*Lysobacter*是一

类极具潜力的生防菌(张丽辉,2011),可抑制细菌、真菌、线虫等生长(Christensen, 1978)。例如,产酶溶杆菌(*Lysobacter enzymogenes*)能分泌多种胞外水解酶,具有广谱抑菌作用(Li et al, 2008; 姬广海,2011),在生防领域具有潜在的应用价值(年美玉,2015)<sup>①</sup>。*Lysobacter enzymogenes* OH11的适宜pH范围为7~9,且高盐环境不利于其生长(王云霞,2008)<sup>②</sup>,而生态经营山核桃林土壤适宜*Lysobacter*生长。国外学者(Adhikari et al, 2001)发现了一种既可抵抗植物病害,又能促进植物生长的*Sphingomonas*。有研究表明*Sphingomonas*具有降解芳香化合物(苟敏等,2008)、产IAA和GA等功能(Khan et al, 2014)。邓维琴(2015)发现*Sphingomonas* sp. SC-1在pH为7时对苯酚的降解效果最好。张俊(2015)<sup>③</sup>对嗜盐少动鞘氨醇单胞菌(*Halobacterium S. paucimobilis* QHZJUJW)的发酵条件进行优化,发现pH为7时发酵效果最好。可见生态经营山核桃林土壤适宜*Sphingomonas*生长。根据本研究中生态经营山核桃林干腐病感病指数显著低于过度经营山核桃林的结果( $P < 0.05$ ),推测*Lysobacter*和*Sphingomonas*这2种生态经营山核桃林土壤中的优势菌群可能具有抑制山核桃干腐病发生的作用。下一步可通过这两种菌与山核桃干腐病原菌的对峙培养等作进一步探索。

综上所述,不用化肥与除草剂,保持土壤弱碱性,适量配施生物肥料,增加林下生草种植等生态经营管理措施,可能有利于提高山核桃树体的抗病性,从而减少干腐病等的发病率。下一步,我们将进一步探明土壤理化性质、优势菌群等关键因子与山核桃林健康的关系,以期通过栽培林下生草、施用生物菌肥、生物农药等科学的生态经营措施,优化土壤pH值、养分与微生物多样性,为山核桃干腐病的生态化防治提供借鉴,促进山核桃产业可持续发展。

## 参考文献

Adhikari TB, Joseph CM, Yang G, Phillips DA, Nelson LM (2001) Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease

① 年美玉 (2015) 溶杆菌 *Lysobacter* sp.SNNU513 潜在抑菌活性蛋白的鉴定. 硕士学位论文, 陕西师范大学, 西安.

② 王云霞 (2008) 产酶溶杆菌 OH11 菌株摇瓶发酵条件优化和色素突变体筛选、基因克隆及特性的研究. 硕士学位论文, 南京农业大学, 南京.

③ 张俊 (2015) 嗜盐少动鞘氨醇单胞菌发酵产结冷胶的研究及其应用初探. 硕士学位论文, 浙江大学, 杭州.

of rice. Canadian Journal of Microbiology, 47, 916–924.

- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature methods, 7, 335–336.
- Chen PP, Guo LL, Tang LZ, Lu HY, Yuan ZG, Yang J, Yi ZX, Tu NM (2017) Effect of soil pH on nitrogen utilization efficiency and biological characters of rhizosphere soil of rice varieties with different acid-sensitivity. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 31, 757–767. (in Chinese with English abstract) [陈平平, 郭莉莉, 唐利忠, 卢浩宇, 袁珍贵, 杨晶, 易镇邪, 屠乃美 (2017) 土壤pH对不同酸性敏感型水稻品种氮利用效率与根际土壤生物学特性的影响. 核农学报, 31, 757–767.]
- Chen SQ (2012) Study on the Nutrient Diagnosis and Ecological Management of the *Carya cathayensis* Plantation. PhD dissertation, Nanjing Forestry University, Nanjing. (in Chinese with English abstract) [陈世权 (2012) 山核桃人工林养分诊断及生态经营技术研究. 博士学位论文, 南京林业大学, 南京.]
- Chen W, Ouyang LM, Kong PJ, Yang ZY, Wu W, Zhu DL, Zhang LL (2015) Rhizospheric bacteria of *Populus euphratica* improve resistance of wood plants to heavy metals. Chinese Journal of Applied Ecology, 26, 2811–2816. (in Chinese with English abstract) [陈雯, 欧阳立明, 孔沛筠, 杨泽宇, 吴蔚, 朱冬林, 张利莉 (2015) 胡杨根际细菌提高木本植物对重金属胁迫的耐受性. 应用生态学报, 26, 2811–2816.]
- Christensen P, Cook FD (1978) *Lysobacter*, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio. International Journal of Systematic Bacteriology, 28, 367–393.
- Dai DJ, Ma HQ, Shen Y, Zhang CQ, Wang HD (2015) Application and screening of fungicides for controlling carya tree canker caused by *Botryosphaeria dothidea*. Agrochemicals, 54, 217–230. (in Chinese with English abstract) [戴德江, 马海芹, 沈瑶, 张传清, 王华弟 (2015) 几种杀菌剂对山核桃干腐病的室内活性筛选与应用. 农药, 54, 217–230.]
- Deng WQ, Liu SL, Yao K, Li JL, Han XF, Liang JF, Wang ZL, Luo PW, Jia QS (2015) Study on the influence of environmental conditions and intermediates of phenol degradation by a 3-phenoxybenzoic acid degrading strain *Sphingomonas* sp. SC-1. Microbiology China, 42, 497–503. (in Chinese with English abstract) [邓维琴, 刘书亮, 姚开, 李建龙, 韩新锋, 梁金凤, 王志龙, 罗佩文, 贾秋思 (2015) 3-苯氧基苯甲酸降解菌 *Sphingomonas* sp. SC-1 降解苯酚环境条件及其降解中间产物的研究. 微生物学通报, 42, 497–503.]
- Edgar RC (2013) UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. Nature Methods, 10, 996–998.
- Gao SC, Guan DW, Ma MC, Zhang W, Li J, Shen DL (2017) Effects of fertilization on bacterial community under the condition of continuous soybean monoculture in black soil in Northeast China. Scientia Agricultura Sinica, 50, 1271–1281. (in Chinese with English abstract) [高圣超, 关大伟, 马鸣超, 张伟, 李俊, 沈德龙 (2017) 大豆连作条件下施肥对东北黑土细菌群落的影响. 中国农业科学, 50, 1271–1281.]
- Gou M, Qu YY, Yang H, Zhou JT, Li A, Guan XY, Ai FF (2008) *Sphingomonas* sp.: A novel microbial resource for biodegradation of aromatic compounds. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 14, 276–282. (in Chinese with English abstract) [苟敏, 曲媛媛, 杨桦, 周集体, 李昂, 关晓燕, 艾芳芳 (2008) 鞘氨醇单胞菌: 降解芳香化合物的新型微生物资源. 应用与环境生物学报, 14, 276–282.]
- Han WY, Wang WM, Guo Y, Yang MZ, Jia ZJ (2013) Bacterial Abundance of Tea Garden Soils and Its Influencing Factors. Journal of Tea Science, 33, 147–154. (in Chinese with English abstract) [韩文炎, 王皖蒙, 郭赞, 杨明臻, 贾仲君 (2013) 茶园土壤细菌丰度及其影响因子研究. 茶叶科学, 33, 147–154.]
- Ji GH (2011) Advances in the study on *Lysobacter* spp. bacteria and their effects on biological control of plant Diseases. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 26, 124–130. (in Chinese with English abstract) [姬广海 (2011) 溶杆菌属及其在植物病害防治中的研究进展. 云南农业大学学报(自然科学), 26, 124–130.]
- Ju YW, Zhao PP, Huang L, Cao X, Liang Y, Ye J, Gao J (2015) Analysis of *Carya illinoensis* main diseases occurrence and control. Journal of Nanjing Forestry University, 39(4), 31–36. (in Chinese with English abstract) [巨云为, 赵盼盼, 黄麟, 曹霞, 梁艳, 叶健, 高瑾 (2015) 薄壳山核桃主要病害发生规律及防控. 南京林业大学学报, 39(4), 31–36.]
- Khan AL, Waqas M, Kang SM, Al-Harrasi A, Hussain J, Al-Rawahi A, Al-Khiziri S, Ullah I, Ali L, Jung HY, Lee IJ (2014) Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. Journal of Microbiology, 52, 689–695.
- Li S, Jochum CC, Yu F, Zaletarivera K, Du L, Harris SD, Yuen GY (2008) An antibiotic complex from *Lysobacter enzymogenes* strain C3: Antimicrobial activity and role in plant disease control. Phytopathology, 98, 695–701.
- Lu HF, Zheng JW, Yu XC, Zhou HM, Zheng JF, Zhang XH, Liu XY, Cheng K, Li LQ, Pan GX (2015) Microbial community diversity and enzyme activity of red paddy soil under long-term combined inorganic-organic fertilization. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 21, 632–643. (in Chinese with English abstract) [陆海飞, 郑金伟, 余喜初, 周惠民, 郑聚锋, 张旭辉, 刘晓雨, 程琨, 李恋卿, 潘根兴 (2015) 长期无机有机肥配施对红壤性水稻土微生物群落多样性及酶活性的影响. 植物营养与肥料学报, 21, 632–643.]
- Lv QJ, Shen YQ, Gao YL, Huang JQ (2012) Development process, agents and prospect of hickory industry. Zhejiang Province. Journal of Zhejiang A & F University, 29, 97–103. (in Chinese with English abstract) [吕秋菊, 沈月琴, 高宇列, 黄坚钦 (2012) 山核桃产业的发展过程、动因及展望. 浙江农林大学学报, 29, 97–103.]



- Nanjing Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences (1978) Soil Physical and Chemical Analysis. Shanghai Science and Technology Press, Shanghai. (in Chinese) [中国科学院南京土壤研究所 (1978) 土壤理化分析. 上海科学技术出版社, 上海.]
- Qian JF, Wu JS, Huang JQ (2014) Effects of sod-cultural practices on soil nutrients and microbial diversity in the *Carya cathayensis* forest. *Acta Ecologica Sinica*, 34, 4324–4332. (in Chinese with English abstract) [钱进芳, 吴家森, 黄坚钦 (2014) 生草栽培对山核桃林地土壤养分及微生物多样性的影响. *生态学报*, 34, 4324–4332.]
- Ren HS, Xu WF, Wang AY, Zuo WD, Xie J (2017) Research on biodiversity of endophytic bacteria and the antagonistic endophytes in mulberry. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 39, 36–45. (in Chinese with English abstract) [任慧爽, 徐伟芳, 王爱印, 左伟东, 谢洁 (2017) 桑树内生细菌多样性及内生拮抗活性菌群的研究. *西南大学学报(自然科学版)*, 39, 36–45.]
- Shen YF, Qian JF, Zheng XP, Yuan ZQ, Huang JQ, Wen GS, Wu JS (2016) Spatial-temporal variation of soil fertility in Chinese walnut (*Carya cathayensis*) plantation. *Science Silvae Sinicae*, 52(7), 1–12. (in Chinese with English abstract) [沈一凡, 钱进芳, 郑小平, 袁紫倩, 黄坚钦, 温国胜, 吴家森 (2016) 山核桃中心产区林地土壤肥力的时空变化特征. *林业科学*, 52(7), 1–12.]
- Shen YQ, Zhu Z, Wu WG, Gao YL, Lin JH, Huang JQ (2010) Farmers' willingness to management way of non-wood forest products and its influencing factors. *Journal of Nature Resources*, 25, 192–199. (in Chinese with English abstract) [沈月琴, 朱臻, 吴伟光, 高宇列, 林建华, 黄坚钦 (2010) 农户对非木质林产品经营模式的选择意愿及其影响因素分析. *自然资源学报*, 25, 192–199.]
- Song ZQ, Wang L, Liu XH, Liang F (2016) The diversities of Proteobacteria in four acidic hot springs in Yunnan. *Journal of Henan Agricultural University*, 50, 376–382. (in Chinese with English abstract) [宋兆齐, 王莉, 刘秀花, 梁峰 (2016) 云南4处酸性热泉中的变形菌门细菌多样性. *河南农业大学学报*, 50, 376–382.]
- Wang J, Song Y, Ma T, Raza W, Li J, Howland JG, Huang Q (2017) Impacts of inorganic and organic fertilization treatments on bacterial and fungal communities in a paddy soil. *Applied Soil Ecology*, 112, 42–50.
- Wu JS, Qian JF, Tong ZP, Huang JQ, Zhao KL (2014) Changes in soil organic carbon and soil microbial functional diversity of *Carya cathayensis* plantations under intensive managements. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 25, 2486–2492. (in Chinese with English abstract) [吴家森, 钱进芳, 童志鹏, 黄坚钦, 赵科理 (2014) 山核桃林集约经营过程中土壤有机碳和微生物功能多样性的变化. *应用生态学报*, 25, 2486–2492.]
- Xue C (2015) Manipulation of Microbial Community in Banana Rhizosphere to Suppress Fusarium Wilt of Banana. PhD dissertation, Nanjing Agricultural University, Nanjing. (in Chinese with English abstract) [薛超 (2015) 香蕉根际土壤微生物区系特征与土传枯萎病防控研究. 博士学位论文, 南京农业大学, 南京.]
- Yang SZ, Ding LZ, Lou JF, Zhang QY, Wu JL, Hu GL (2009) Occurrence regularity of *Carya cathayensis* canker disease and its control. *Journal of Zhejiang Forestry College*, 26, 228–232. (in Chinese with English abstract) [杨淑贞, 丁立忠, 楼君芳, 张秋月, 吴继来, 胡国良 (2009) 山核桃干腐病发生发展规律及防治技术. *浙江林学院学报*, 26, 228–232.]
- Yu H (2015) Regulation Effect of Straw Returning Mode into Field on Soil Microorganism and Growth Properties in Maize. PhD dissertation, Jilin Agricultural University, Changchun. (in Chinese with English abstract) [于寒 (2015) 秸秆还田方式对土壤微生物及玉米生长特性的调控效应研究. 博士学位论文, 吉林农业大学, 长春.]
- Yu L, Chen J, Chen LJ, Cheng JB, Wu JS, Xia GH (2011) Effect of interplantation of green manure varieties on yield of hickey forests. *Journal of Forestry Engineering*, 25(3), 92–95. (in Chinese with English abstract) [余琳, 陈军, 陈丽娟, 程建斌, 吴家森, 夏国华 (2011) 山核桃投产林林下套种绿肥效应. *林业工程学报*, 25(3), 92–95.]
- Yu Y, Lee C, Kim J, Hwang S (2005) Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 89, 670–679.
- Zhang LH, Wang YJ, Liao L, Ji GH (2011) Biocontrol effect of *Lysobacter antibioticus* 06-4 on soft rot pathogen of *Amorphophallus konjac* its mechanism. *Journal of Hunan Agricultural University*, 37, 286–289. (in Chinese with English abstract) [张丽辉, 王永吉, 廖林, 姬广海 (2011) 生防菌 06-4 对魔芋软腐病的防治及机理的初步研究. *湖南农业大学学报*, 37, 286–289.]
- Zhang LL, Jia GM, Ye JF, Ma LJ (2013) Frequency of *Carya cathayensis* canker disease in Lin'an City, Zhejiang Province. *Journal of Zhejiang A & F University*, 30, 148–152. (in Chinese with English abstract) [张璐璐, 贾桂民, 叶建丰, 马良进 (2013) 浙江临安山核桃干腐病发生发展规律. *浙江农林大学学报*, 30, 148–152.]
- Zhang ZY, Tang JX, Wang SF, Wang QL (2009) Effects of N, P, K on growth and development of plants and its physiological mechanisms. *Guangdong Agricultural Sciences*, 36(5), 89–92. (in Chinese with English abstract) [张志勇, 汤菊香, 王素芳, 王清连 (2009) 氮磷钾对植物侧根生长发育的影响及其生理机制. *广东农业科学*, 36(5), 89–92.]
- Zheng WJ (1985) *Sylva Sinica* (2). China Forestry Publishing House, Beijing. (in Chinese) [郑万钧 (1985) 中国树木志 (2). 中国林业出版社, 北京.]
- Zhou J, Lei T (2007) Review and prospects on methodology and affecting factors of soil microbial diversity. *Biodiversity Science*, 15, 306–311. (in Chinese with English abstract) [周桔, 雷霆 (2007) 土壤微生物多样性影响因素及研究方法的现状与展望. *生物多样性*, 15, 306–311.]

(责任编辑: 东秀珠 责任编辑: 时意专)