科学通报 2019 年 第 64 卷 第 27 期: 2915 ~ 2927
专辑: 第二次青藏高原综合科学考察研究 论 文
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

青藏高原高寒草地土壤微生物群落及影响因子

薛凯[1,2], 张彪[3], 周姝彤[3], 冉沁蔚[3], 唐立[3,4], 车荣晓[4,5], 庞哲[3], 王芳[3,4], 王頔[3], 张静[3], 姜丽丽[6], 胡容海[1], 崔骁勇[2,3], 郝彦宾[2,3], 王艳芬[2,3*]

1. 中国科学院大学资源与环境学院, 北京 100049;
2. 中国科学院青藏高原地球科学卓越创新中心, 北京 100101;
3. 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049;
4. Environmental Futures Research Institute, Griffith University, Nathan QLD 4111, Australia;
5. 云南大学国际河流与生态安全研究院, 昆明 650091;
6. 中国科学院青藏高原研究所, 北京 100101
* 联系人, E-mail: yfwang@ucas.ac.cn

2019-05-23 收稿, 2019-08-31 修回, 2019-09-02 接受, 2019-09-25 网络版发表
第二次青藏高原综合科学考察研究(2019QZKK0304)、中国科学院A类战略性先导科技专项(XDA20050104)和中国科学院B类战略性先导科技专项(XDB15010201)资助

摘要 青藏高原是我国生态安全的重要屏障, 但目前青藏高原上大尺度上的微生物地理学研究还很缺乏. 因此, 采用高通量测序技术, 在跨越2121 km的尺度上针对高寒草地不同生态系统类型研究了土壤原核生物(细菌和古菌)微生物量、多样性和群落组成的分布格局, 及与气候、植物和土壤因子的关系. 在高寒草甸、高寒草原、高寒灌丛和高寒荒漠中, 高寒荒漠具有最低的微生物多样性, 而高寒草甸具有最高的微生物量碳. 高寒草地土壤微生物的多样性与大气温度而非降水显著相关, 说明其在高寒条件下可能受温度而非水分控制. 微生物多样性随耦合了水、热要素的干旱指数的增加而降低, 解释量比单一要素更高. 此外, 植物功能群多样性与微生物多样性有显著的正相关关系, 解释量比植物物种多样性更高. 结构方程模型显示, 干旱指数和年均温通过影响植物功能群多样性和地上生物量而改变土壤表层的碳氮比, 从而直接或间接影响到微生物多样性. 与多样性不同, 土壤微生物量碳与可溶性有机碳、氨态氮、速效磷及碳氮比等土壤营养指标和植物地上生物量具有显著的相关性. 这些结果意味着微生物多样性和微生物量可能有着不同的控制因子; 随着未来青藏高原的"暖湿化", 干旱指数的降低可能提高土壤微生物的多样性.

关键词 土壤微生物, 微生物多样性, 微生物量碳, 干旱指数, 植物功能群多样性

土壤微生物几乎驱动着所有的土壤生化过程[1~6], 对于生态系统的功能至关重要[7,8]. 开展微生物生物地理学的研究, 对于认识和利用土壤中的微生物资源具有重要意义, 也有助于回答微生物生态学的基础科学问题, 如微生物群落的空间分布规律和多样性维持机制. 然而, 由于土壤中微生物绝大多数不可培养和传统研究方法的局限, 微生物生物地理学的研究长期滞后于动、植物的生物地理学研究[9]. 近年来, 分子生物学技术的发展和新一代高通量测序等技术的突破克服了微生物传统研究方法的局限性, 极大地推动了微生物生物地理学的发展. 越来越多的研究表明, 如同动、植物群落一样[10,11], 土壤微生物群落很可能也存在着地

引用格式: 薛凯, 张彪, 周姝彤, 等. 青藏高原高寒草地土壤微生物群落及影响因子. 科学通报, 2019, 64: 2915–2927
Xue K, Zhang B, Zhou S T, et al. Soil microbial communities in alpine grasslands on the Tibetan Plateau and their influencing factors (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 2915–2927, doi: 10.1360/TB-2019-0090

© 2019《中国科学》杂志社

理分布格局[12~14].

土壤微生物群落分布格局的驱动机制或控制因子, 是微生物生物地理学和微生物生态学研究的核心内容之一. 尽管在一些研究中, 土壤微生物群落的组成或多样性被发现随生物因子(如植物多样性、生物量)以及气候(如降水、温度)和土壤理化性质(如pH, 营养水平)等非生物因子的变化而在空间上呈规律性分布[15~18]. 但是, 目前对微生物和生物及非生物因子之间是否存在关联, 以及存在何种关联, 还没有统一的结论[19]. 例如, 土壤pH是最受关注的非生物因子之一, 在全球尺度上被发现能驱动微生物的多样性、组成和生物量[20,21]. 但是, 在占全球陆地表面41%的干旱区, 微生物的多样性与土壤pH之间没有发现有显著的相关性[22]. 在北美洲际尺度上, 土壤pH对森林土壤微生物多样性的影响也比温度的影响小[23]. 由此可见, 生物和非生物因子对土壤微生物的影响很可能在不同的区域或生物区系下有着不同的规律.

作为地球的第三极, 青藏高原是气候和生态环境变化的指示器和调节器, 对区域乃至全球的气候都有着重要的调节作用[24], 对生态安全具有重要的屏障作用[25]. 青藏高原具有独特的生境, 可能蕴藏着丰富的土壤微生物资源. 土壤pH和降水等因子被发现同青藏高原土壤细菌多样性、群落组成的差异显著相关[26,27], 而土壤真菌的多样性与植物多样性显著相关[28]. 此外, 固氮菌的多样性被发现受生态系统类型的影响[29], 而优势植物根际AMF(arbuscular mycorrhizal fungi)群落的物种丰富度主要受降水量的影响[30]. 然而, 这些研究都在相对较小的尺度上开展, 或是针对特定的微生物功能群. 目前对青藏高原上大尺度、跨生态系统类型的微生物地理学研究还很缺乏. 因此, 本研究采用新一代高通量测序技术, 在最远距离达2121 km的尺度上, 跨越高寒草甸、高寒草原、高寒荒漠和高寒灌丛不同生态系统, 研究了土壤原核(细菌和古菌)生物的生物量、多样性和群落组成的分布格局, 以及与气候、土壤和植物等生物和非生物因子的关系.

1 材料和方法

1.1 土壤、植物样品的采集

本研究的采样样带位于青藏高原腹地(图1), 于2014年夏季(7月28日~8月13日)开展采样工作. 共采集了64个采样点, 来自青藏高原的主要草地类型有: 高寒灌丛、高寒草甸、高寒草原和高寒荒漠. 采样沿公路主干道进行, 采样点距离公路至少500 m, 采样点间最远距离为2121 km.

在每个采样点, 于100 m^2内布置4~5个1 m×1 m的样方, 在每个样方内分种剪下地上植物部分. 每个物种的生物量分别放置在不同信封中, 带回实验室后65°C烘干到恒重测定为地上植物生物量(aboveground biomass, AGB). 收集AGB后, 在样方内用直径7 cm的土钻随机采集3钻土壤表层(0~5 cm)和下层(5~20 cm)两层土壤样品, 各自合并及混合均匀. 土壤样品过2 mm筛后, 将植物根分离出来, 带回实验室后65°C烘干到恒重测定生物量作为地下植物生物量(belowground biomass, BGB). 将土壤样保存在−80°C冰箱用于微生物测序分析, 或风干保存以测定土壤理化性质.

1.2 环境参数的调查和测定

(ⅰ) 年均温和年均降水. 在样带上, 用GPS记录每个采样的地理位置. 采样点的气象数据(包括采样当年年均温和年均降水)通过经纬度从Worldclim数据库中提取当年数据[31].

(ⅱ) 归一化植被指数. 采样点的归一化植被指数(normalized difference vegetation index, *NDVI*)通过经纬度从遥感数据中获取. 如式(1)所示, 归一化植被指数为近红外波段与红光波段反射率之差与之和的商, 能反映植物生长、生态系统的活力与生产力等信息, 数值越大表示植物生长越好:

$$NDVI = \frac{NIR - R}{NIR + R}, \tag{1}$$

*NIR*为近红外波段反射率, *R*为红光波段反射率.

*NDVI*数据提取自MODIS全球植被指数产品(MOD13Q1.006), 时间分辨率为16 d, 空间分辨率为250 m, 月尺度数据通过最大合成法MVC(maxmum value composites)计算.

(ⅲ) 干旱指数. 采样点的干旱指数(aridity index, *AI*)通过经纬度从遥感数据中获取. 如式(2)所示, 干旱指数为潜在蒸散量与降水量的比值, 表示一个地区干湿程度, 数值越大表示越干旱:

$$AI = \frac{PET}{P}, \tag{2}$$

*PET*为潜在蒸散量, *P*为降水量.

蒸散量数据提取自MODIS全球地表蒸散发产品(MOD16A2)月尺度数据, 空间分辨率为1 km. 降水量基

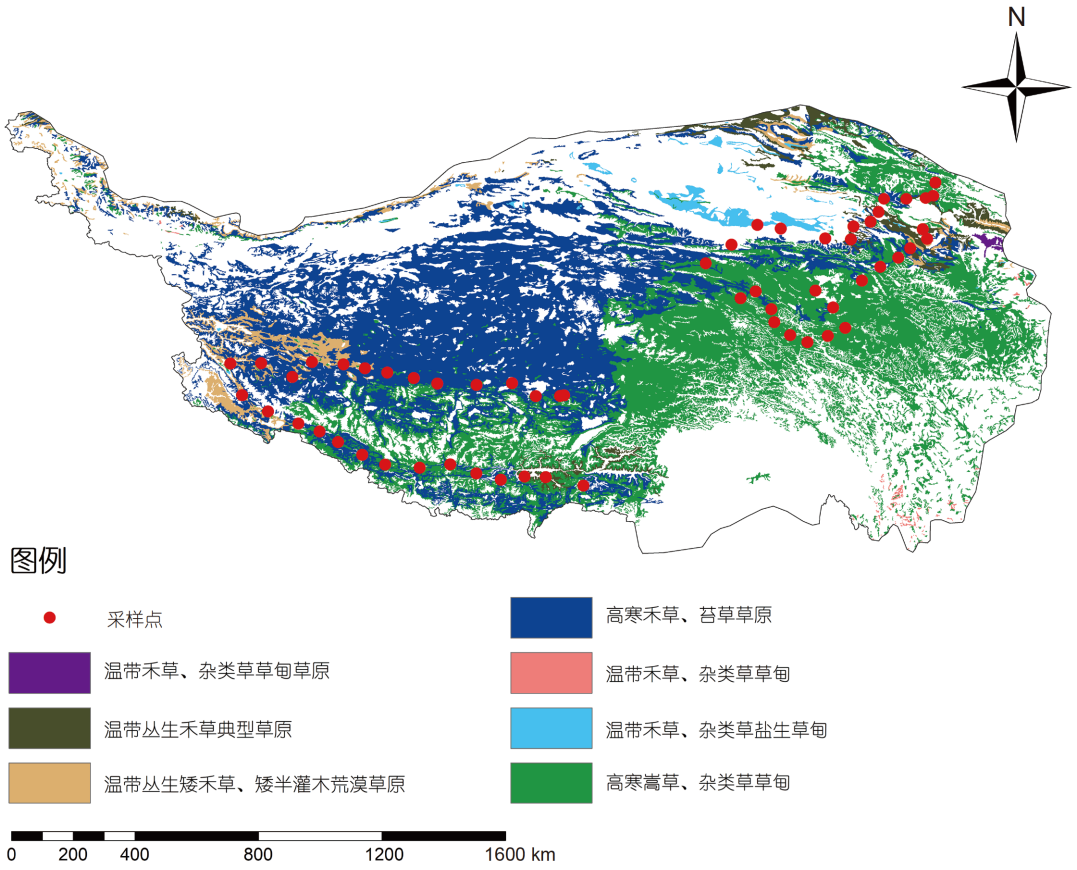


图 1 土壤样品采集点
Figure 1 Soil sampling sites

于中国气象数据网(https://data.cma.cn/)的台站降水数据, 通过空间插值获取.

(ⅳ) 土壤理化性质. 土壤的pH使用Delta pH计(STARTER3100, 奥克斯仪器公司, 中国)测量(10 g干土:50 g去离子水). 土壤含水量使用105°C铝盒烘干称重法测定. 使用2 mol/L的KCl提取土壤中的硝态氮和氨态氮(土壤和溶液的比率为1:5), 使用自动流式离子分析仪(SEAL Analytical GmbH, Norderstedt, 德国)测定土壤的有机质和有机碳. 土壤的有机质和有机碳使用TOC分析仪(Liqui TOC II, Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, 德国)测定, 而土壤的总氮使用自动分析仪测定; 土壤的碳氮比通过有机碳和总氮的比值计算. 使用0.5 mol/L的K_2SO_4提取土壤中的可溶性有机碳(土壤和溶液的比率为1:4), 振荡浸提 1 h, 静置20 min后使用TOC分析仪测定浸提液中的碳含量. 土壤速效磷采用钼锑抗分光光度法, 使用UV-VIS分光光度计(UV2700, SHIMADZU, 日本)测量.

微生物生物量碳采用氯仿熏蒸浸提. 即用无醇氯仿熏蒸土壤样品24 h之后, 在已熏蒸土壤(相当于10 g干土)中加入40 mL 0.5 mol/L K_2SO_4溶液(土壤和溶液的比率为1:4)振荡1 h, 静置20 min后, 滤纸过滤后的滤液使用TOC分析仪测定其中的碳含量, 与未熏蒸土壤的碳含量之差为土壤微生物生物量碳的含量.

1.3 土壤DNA的提取和高通量测序

采用PowerSoil™ DNA Isolation Kit(MOBIO Laboratories, Carlsbad, CA, 美国)从0.25 g冻土中提取DNA, 步骤遵照产品使用说明书. DNA浓度采用NanoDrop 2000(Thermo Scientific, Waltham, MA, 美国)测定.

针对原核微生物(细菌和古菌)16s RNA基因的V4~V5区, 选用引物515F(5′-GTGYCAGCMGCCGCGGTA-3′)和909R(5′-CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-3′)PCR(polymerase chain reaction)扩增. 在前引物的5′端加入条码序列(12 nt)以区分不同样品. PCR反应体系为50 μL, 含有0.5 μL Ex Taq™(Takara Bio Inc, Shiga, 日本), 4 μL Mg^{2+}, 4 μL dNTP, 5 μL缓冲液, 前后引物各

1 μL, 10 ng模板DNA. PCR反应条件: 94°C预变性30 s, 30个循环的94°C变性20 s, 53°C退火25 s, 68°C延伸45 s, 最后72°C延伸10 min. 将每个样品两次平行扩增的产物作为技术重复合并到一起, 使用5 μL的扩增产物在琼脂糖胶(1%)检测扩增是否成功, 与阴性对照进行对比. 证明扩增成功的PCR扩增产物用Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit(Thermo Scientific, Lithuania)试剂盒纯化. 将每个样品中的纯化产物调节到相同的摩尔数, 在位于中国科学院成都生物研究所的Illumina MiSeq平台使用Reagent Kit v3(2 × 300 bp)进行测序.

1.4 生物信息学分析

本研究主要通过UNOISE3的分析标准流程(USEARCH v10.0.240, Edgar, 2017)分析Miseq高通量测序数据. 在去掉singleton之后, 根据独特的代表序列得到ZOTU表. 在Mothur v1.27中调用classify.seqs命令, 以silva.nr_v128.align及其对应的分类文件为参比, 对上述所有的ZOTU进行注释. 利用R×64 3.5.0对所有样品进行重抽样到相同序列条数(样品序列条数之和的最小值为700).

1.5 统计分析

将植物种分成4大功能群, 即禾本科草本植物、非禾本科草本植物、豆科和莎草. 以样方内的植物功能群数目作为植物的功能群丰富度(plant functional richness, PFR). 以每种植物的地上生物量来计算植物的物种香农多样性(PS Shannon); 以四大功能群的地上生物量来计算植物的功能群香农多样性(plant functional shannon diversity, PF Shannon), 详见补充材料.

采用双因素方差分析(analysis of variance, ANOVA)检验土层和生态系统类型, 及两者交互作用对土壤微生物量碳、多样性和环境变量的影响, 并使用最小显著性差异法(least significant distance, LSD)检验对不同生态系统类型之间的差异进行多重比较. 使用非参数多元方差分析(Adonis)检验土层和生态系统类型, 及两者交互作用对土壤微生物群落结构的影响. 使用除趋势对应分析(detrended correspondence analysis, DCA)和非参数多元方差分析(Adonis)检验不同土层下生态系统类型对原核生物群落结构的影响. 利用皮尔森相关分析和线性回归模型揭示微生物量、多样性与环境变量之间的相关性. 利用典型相关分析(canonical correlation analysis, CCA)研究环境变量对微生物群落结构的影响. 利用基于CCA的方差分解分析(variance partitioning analysis, VPA)定量分析环境变量对微生物群落结构变化的贡献率. ANOVA, LSD, DCA, Adonis, CCA和VPA等分析都通过R×64 3.5.0实现. 此外, 利用Amos 24.0构建结构方程模型(structural equation modeling, SEM), 详见补充材料.

显著性检验水平设为α=0.05, 检验的P值也在结果中列出.

2 结果

2.1 土壤微生物生物量、群落多样性和组成

在青藏高原高寒草地采集到的样品中, 土壤微生物量碳在表层和下层之间没有显著差异(P = 0.65), 但生态系统类型的影响显著(P < 0.001). 表现为高寒草甸的微生物量碳显著高于其他三类高寒草地生态系统, 包括高寒灌丛、高寒草原和高寒荒漠(图2(a)). 微生物群落的丰富度和香农多样性受土层(P<0.001)和生态系统类型(P<0.001)的显著影响, 但两者之间没有交互作用. 表层的微生物丰富度和香农多样性均高于下层; 而高寒荒漠的微生物丰富度和香农多样性均低于其他三类高寒草地生态系统, 包括高寒灌丛、高寒草甸和高寒草原(图2(b), (c)).

在128个土壤样品中检测到了42个门(38个细菌和4个古菌门), 共857个属和17191个ZOTU. 微生物群落组成在门水平上的分布特征见图S1~S4等. 与微生物群落多样性的结果类似, 基于Bray-Curtis, Horn-Morisita和Euclidean距离的多元随机置换方差分析(Adonis)表明, 在ZOTU水平上微生物群落组成同样受土层(P = 0.001)和生态系统类型(P = 0.001)的显著影响, 但两者之间没有交互作用(表1). 土壤表层和下层样品的DCA分析均表明, 来自不同生态系统的微生物群落组成在ZOTU水平上差异明显(图3). 无论是表层还是下层样品, 在DCA1轴上从左到右都大致依次分布着高寒草甸、高寒草原和高寒荒漠的样品, 但存在着一定程度的重叠. 来自高寒灌丛的样品在DCA谱图上相对集聚, 在表层和底层都和高寒草原的样品重叠在一起.

2.2 土壤微生物生物量及群落多样性和非生物及生物因子的关系

土壤微生物量碳与气候因子之间, 仅土壤表层微

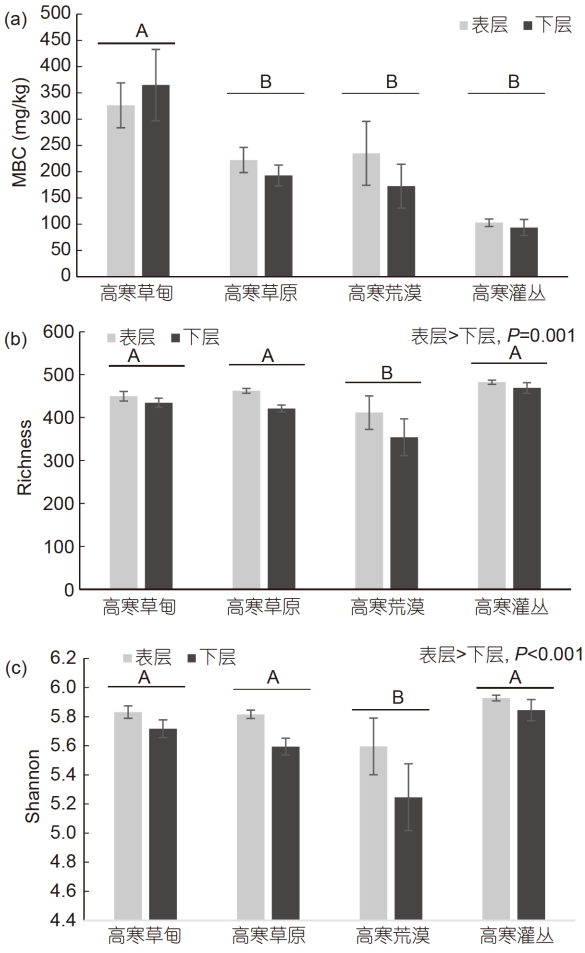


图 2 不同生态系统下的土壤微生物量碳(microbial biomass carbon, MBC)(a)、微生物丰富度(richness)(b)和香农多样性(Shannon)(c). 土层的影响在方差分析中若显著, 则在每个分图的右上角中标出; 生态系统类型的影响若显著, 则通过基于方差分析的最小显著性差异法进行多重比较, 在每个分图中用A, B代表生态系统类型间显著不同的微生物碳、丰富度或多样性

Figure 2 Soil microbial biomass carbon (MBC) (a), community richness (richness) (b), and Shannon diversity (Shannon) (c) in different ecosystem types. Significances of soil layer tested by ANOVA were labelled in the right corner of each panel, if significant. Different letters above bars (e.g. A and B) in each panel indicated significant differences among treatments (P<0.05), determined by *post-hoc* Least Significant Distance (LSD) test following ANOVA

生物量碳与年均降水间呈显著的正相关关系(P=0.011, R^2=11.7%, 图4(b)), 与年均温或干旱指数之间则没有显著的相关性(图4和S5). 但是, 微生物量碳与多个土壤因子之间具有显著的相关性(图5和S6). 无论土壤表层还是下层, 微生物量碳均与可溶性有机碳(dissolved organic carbon, DOC)、氨态氮(NH_4^+)和速效磷(AP)呈显著的正相关关系(P<0.05). 这些土壤因子对微生物量碳的解释量(R^2)在土壤表层为10.2%~16.1%; 在下层样品中, 可溶性有机碳和速效磷的解释量高达46.4%和41.9%, 氨态氮的解释量也达20.1%. 此外, 土壤碳氮比(C/N)与土壤表层的微生物量碳呈显著的正相关关系(P<0.001, R^2=24.7%), 但与下层的微生物量碳没有显著的相关性.

考虑到生物因子, 微生物量碳同植物生物量之间具有显著的相关性(图5和S6), 但同植物功能群多样性或物种多样性间没有显著的相关性. 无论是土壤表层还是下层的微生物量碳, 均与地上植物生物量和地下植物生物量具有显著的正相关关系(P<0.05). 这些反映植物生物量的指标对微生物量碳的解释量(R^2)在土壤表层为14.4%~15.0%, 在下层样品中为7.3%~19.8%. 细分到植物功能群, 莎草植物生物量与土壤表层和下层的微生物量碳均显著正相关(P<0.05), 解释量分别达18.3%和21.5%. 非禾本草本植物生物量仅与土壤下层微生物量碳具有显著的正相关关系(P=0.018, R^2=10.4%), 而与土壤表层微生物量碳无显著的相关性. 豆科和禾本科草本植物的生物量与土壤表层或下层微生物量碳均无显著相关性.

考虑到非生物因子, 土壤微生物群落的丰富度和香农多样性均同干旱指数显著(P<0.05)负相关(图4和S5), 且干旱指数在土壤表层对微生物多样性的解释量(27.0%~27.1%)高于在土壤下层的(17.0%~21.0%). 微生物群落的丰富度和香农多样性同年均温也呈显著负相关关系(P<0.05), 但解释量在土壤表面(16.1%~

表 1 基于Bray-Curtis, Horn-Morisita和欧式距离的多元随机置换方差分析

Table 1 Permutation multivariate analysis of variances (Adonis) using different distance matrices, including Bray-Curtis, Horn-Morisita and Euclidean

因素	Bray-Curtis		Horn-Morisita		Euclidean	
	F	*P*	*F*	*P*	*F*	*P*
土层	3.284	0.001	5.180	0.001	2.884	0.001
生态系统类型	3.256	0.001	5.096	0.001	3.056	0.001
土层:生态系统类型	0.983	0.547	0.867	0.766	0.820	0.848

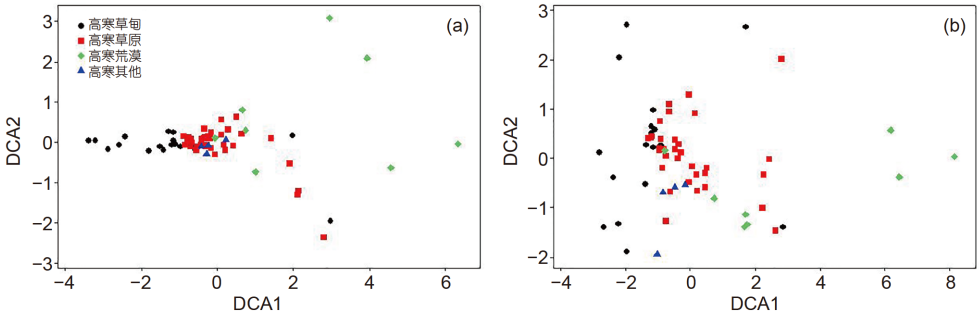


图 3 土壤表层(a)和下层(b)微生物群落结构的除趋势对应分析(DCA)
Figure 3 DCA analysis for microbial community composition in soil top (a) and sub (b) layers

17.7%)或下层(8.1%~10.0%)均小于干旱指数. 土壤表面或下层微生物群落的丰富度和香农多样性同年均降水无显著的相关性. 此外, 土壤表层微生物的丰富度与香农多样性和土壤碳氮比均呈显著负相关关系(P<0.05; 图S7), 解释量分别为9.3%和7.8%; 而土壤下层的土壤微生物生物量同土壤碳氮比或其他检测的土壤因子没有显著的相关性(图S8).

考虑到生物因子, 土壤微生物群落的多样性与植物多样性之间具有显著的正相关关系(P < 0.05; 图5和S8). 尤其是植物功能群的丰富度, 其作为自变量的线性模型对微生物多样性的解释量在土壤表层和下层分别为19.0%~22.1%和22.5%~25.0%; 基于植物功能群丰富度的二次函数模型对微生物多样性的解释量更高, 在土壤表层和下层分别达38.1%~42.8%和41.4%~43.8%. 植物的物种丰富度和物种香农多样性对土壤表层或下层微生物多样性的解释量较低, 为4.7%~14.0%. 此外, 土壤表层微生物的丰富度和香农多样性还同地下植物生物量具有显著的负相关关系(P < 0.05), 解释量分别为16%和9%; 但土壤下层微生物的多样性与植物生物量之间没有显著的相关性.

2.3 土壤微生物群落多样性的结构方程模型

针对土壤微生物的多样性, 开展了结构方程模型分析. 构建的结构方程模型显示, 干旱指数和年均温能影响到植物的功能群多样性和地上生物量(图6). 其中, 年均温的增加降低了植物的功能群多样性, 但提高了植物的地上生物量; 而干旱指数的增加降低了植物的地上生物量. 植物地上生物量的增加提高了土壤表层的碳氮比, 由此降低了土壤表层微生物的群落丰富度(图6(a)); 而植物功能群丰富度的增加直接提高了土壤下层微生物群落的香农多样性(图6(b)).

该结构方程模型的显著性概率值在表层和下层样品中分别为0.17和0.41, 均大于0.05. 拟合优度指数(goodness of fit index, GFI)在表层和下层样品中分别为0.94和0.95, 均大于0.90. 规范拟合指数(normed-fit index, NFI)在表层和下层样品中分别为0.93和0.94, 均大于0.90. 均方根误差(root mean square error of approximation, RMSE)在表层和下层样品中分别为0.08和0.03, 均小于或等于0.08. 这些指标均说明, 观测数据与构建的结构方程模型拟合较好.

3 讨论

在最远距离达2121 km的尺度上跨越高寒草甸、高寒草原、高寒荒漠和高寒灌丛不同生态系统, 发现青藏高原高寒草地土壤原核(细菌和古菌)生物的生物量碳、组成和多样性都受到生态系统类型的影响. 不同生态系统类型的生物和非生物因子差异显著, 在本研究中, 高寒草甸比起其他三类生态系统(高寒草原、高寒灌丛和高寒荒漠)具有更高的降水、地上和地下植物生物量、可溶性有机碳、氨态氮、硝态氮、速效磷及更低的干旱指数. 而高寒荒漠比起其他三类生态系统(高寒草原、高寒灌丛和高寒草甸)具有更低的降水、地上和地下植物生物量、植物多样性及更高的大气温度和干旱指数. 这些生物和非生物因子在不同生态系统的差异都可能导致了高寒草甸的高微生物量碳和高寒荒漠的低微生物群落多样性. 与之相似, 土壤固氮菌的多样性在青藏高原高寒草甸也被发现高于高寒草原和高寒荒漠[29].

对青藏高原高寒草地土壤微生物群落结构的进一步分析表明, DCA1轴上从左到右依次分布着高寒草甸、高寒草原和高寒荒漠的样品. 这些生态系统的干旱程度也依次增加, 这暗示着气候因子可能主导着微

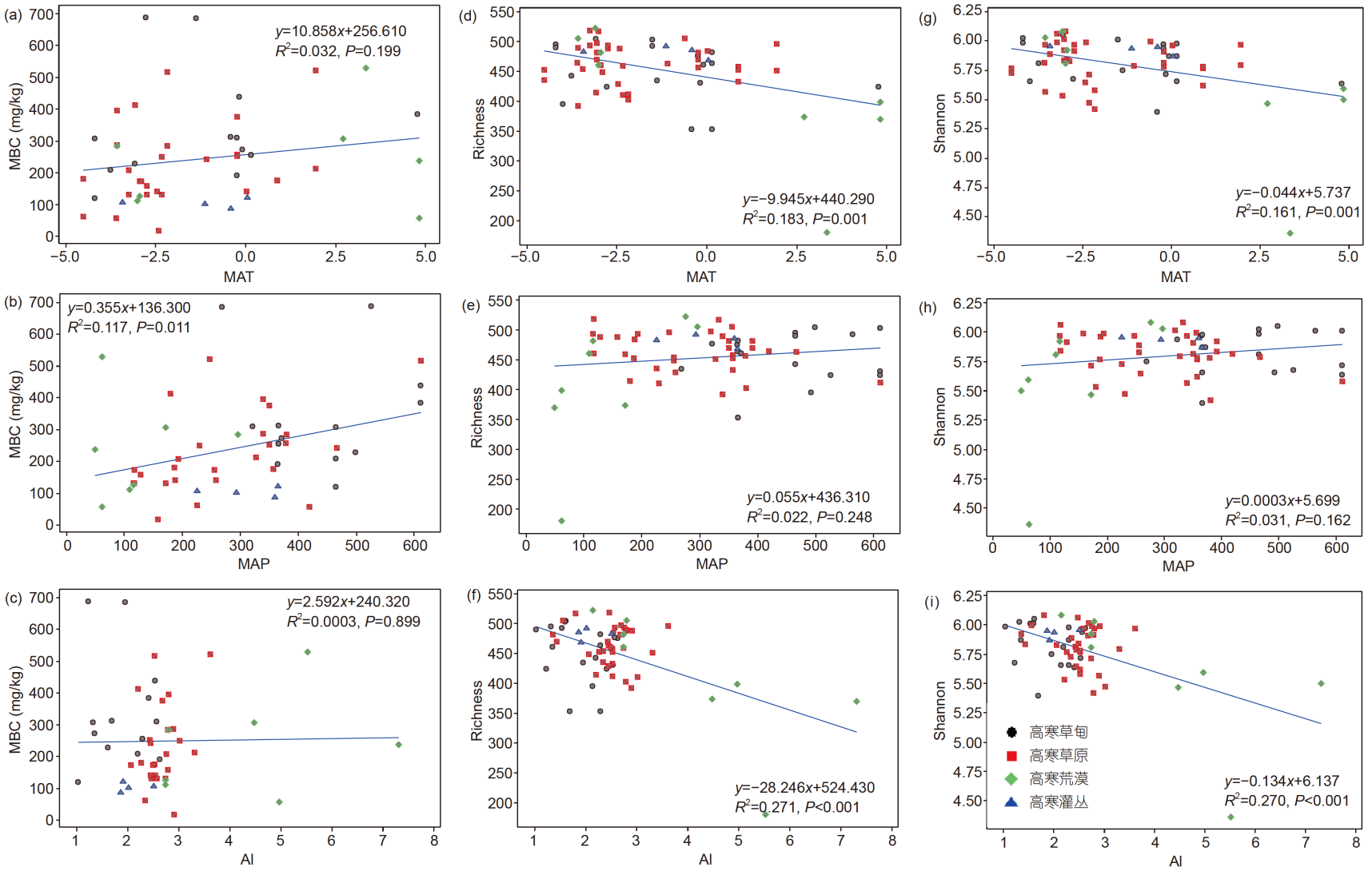


图 4 土壤表层微生物量碳(MBC)(a)~(c)、丰富度(richness)(d)~(f)和香农多样性(Shannon)(g)~(i)同气候因子的关系. 气候因子包括年均温(mean annual temperature, MAT)(a), (d), (g)、年均降水(mean annual precipitation, MAP)(b), (e), (h)和干旱指数(ridity index, AI)(c), (f), (i)

Figure 4 Scatter plots between climate factors and soil microbial biomass carbon (MBC) (a)–(c), community richness (richness) (d)–(f) or Shannon diversity (Shannon) (g)–(i) in top soil layer. Climate factors include mean annual temperature (MAT) (a), (d), (g), mean annual precipitation (MAP) (b), (e), (h) and aridity index (AI) (c), (f), (i)

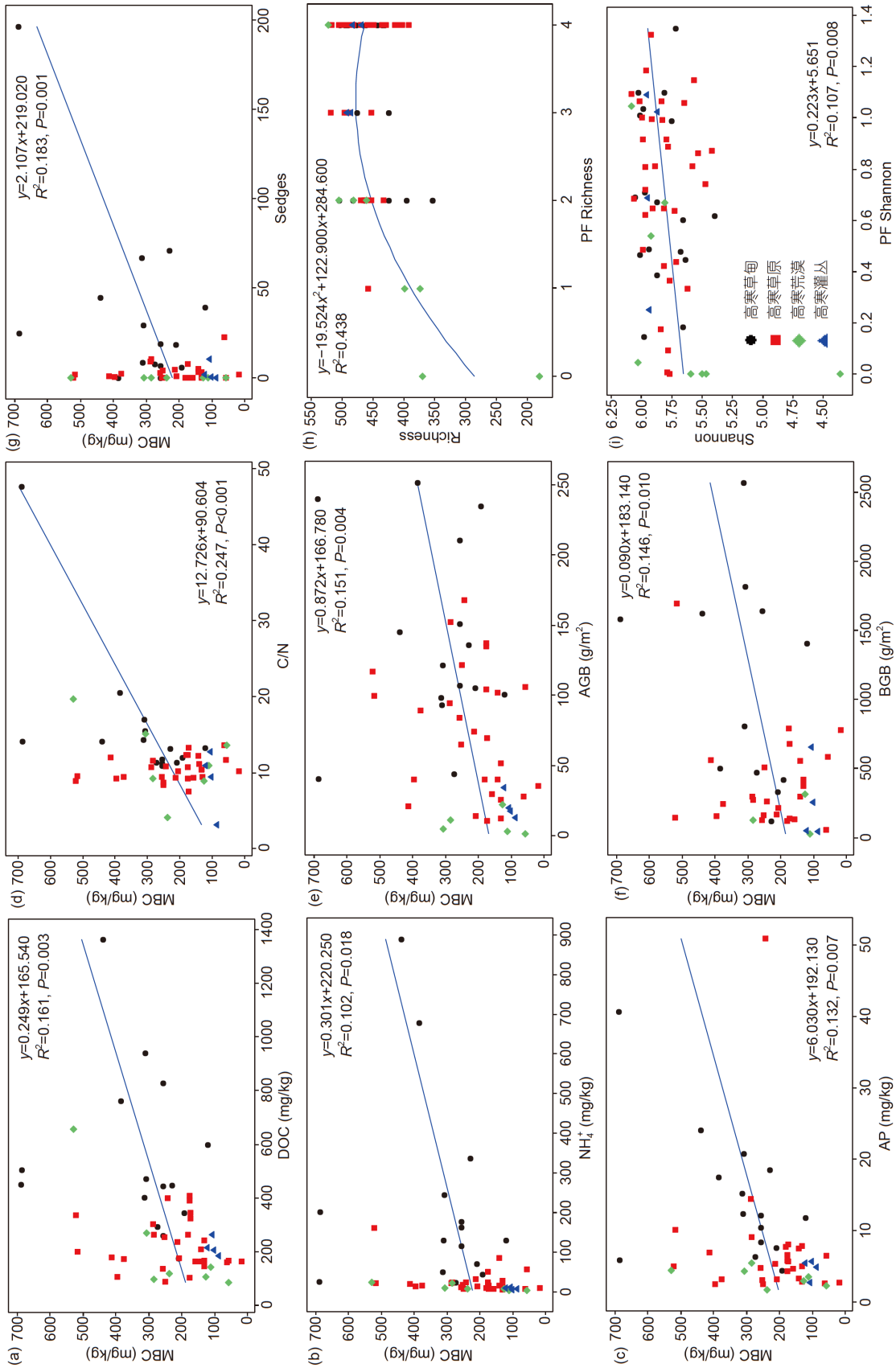


图 5 土壤表层微生物量碳(MBC)(a)~(g)、微生物群落丰富度(richness)(h)和香农多样性(Shannon)(i)同土壤和植物因子的关系. 土壤因子包括可溶性有机碳(DOC)(a)、氨态氮(NH_4^+)(b)、速效磷(AP)(c)、碳氮比(C/N)(d); 植物因子包括地上生物量(AGB)(e)、地下生物量(BGB)(f)、莎草生物量(sedges)(g)、植物功能群丰富度(PF richness)(h)和植物功能群香农多样性(PF Shannon)(i)

Figure 5 Scatter plots between soil microbial biomass carbon (MBC) (a)–(g), microbial richness (richness) (h) and Shannon diversity (Shannon) (i) in top soil layer and plant or soil variables. Soil variables include dissolved organic carbon (DOC) (a), NH_4^+ (b), available phosphorus (AP) (c), C/N (d). Plant variables include aboveground biomass (AGB) (e), belowground biomass (BGB) (f), sedge biomass (sedges) (g), plant functional group richness (PF richness) (h), and plant functional group Shannon diversity (PF Shannon) (i)

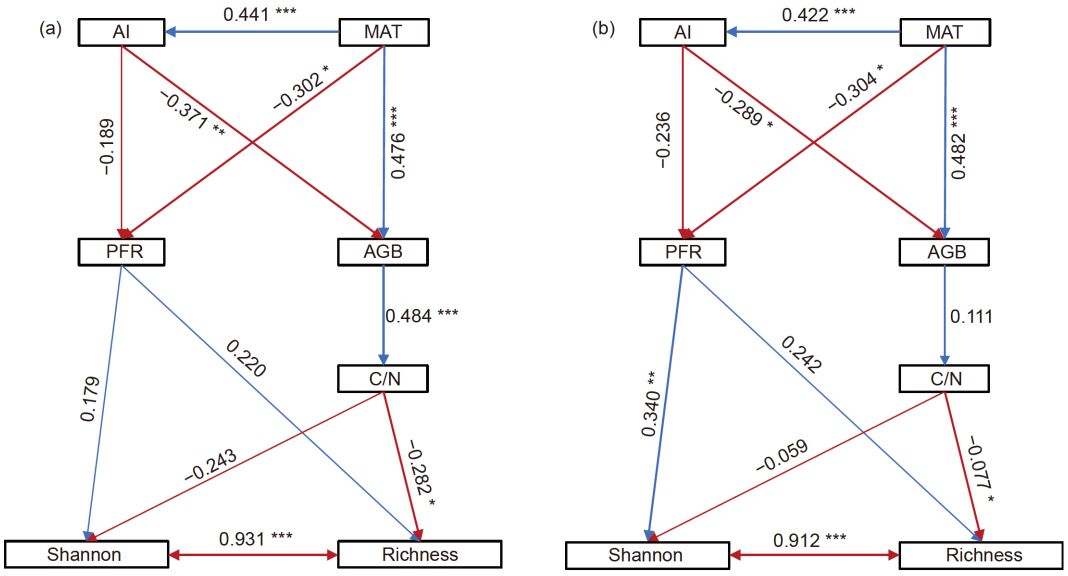


图 6 土壤表层(a)和下层(b)微生物多样性的结构方程模型. *, **和***分别代表P<0.05, 0.01和0.001

Figure 6 Structural equation model for microbial diversity in top (a) and sub (b) soil layers. *, ** and *** represent P<0.05, 0.01 and 0.001, respectively

生物群落结构的组成. 与之一致, 青藏高原高寒草地土壤微生物的多样性也被发现与干旱指数和年均温显著相关, 且干旱指数对表层样品微生物多样性的解释量达27%. 尽管降水或水分对土壤微生物多样性的影响被广为报道[27,32], 但本研究中土壤微生物的多样性与降水没有显著的相关性, 可能说明温度而非水分在低温下的高寒生态系统(高寒荒漠、高寒灌丛、高寒草甸和高寒草原的年均温分别为0.39, −1.23, −1.23和−1.94°C)更可能是微生物多样性的控制因子. 与其他研究[23,33]不同, 青藏高原高寒草地土壤微生物的多样性随大气温度的增加而减少, 可能是因为大气温度的增加在降水有限的条件下提高了干旱程度, 从而负面影响微生物的多样性. 事实上, 青藏高原高寒草地土壤微生物的多样性受耦合了水、热因素的干旱指数的影响更大, 随着其增加而显著降低, 解释量比单一的大气温度高约10%. 这说明水热耦合比单一的温度或降水更能反映微生物多样性的变化趋势. 与之一致, 前人研究了位于干旱区的80个样点, 也发现微生物的多样性随着干旱度的增加而减少[22].

青藏高原高寒草地土壤微生物的多样性与植物功能群多样性具有显著的正相关关系, 特别是植物功能群的丰富度, 其作为自变量的二次函数模型对微生物群落丰富度的解释量超过40%. 众多研究发现, 土壤微生物的多样性随植物多样性的增加而升高[34,35], 也有研究发现两者间的α多样性无显著相关性, 而β多样性则显著相关[36]. 植物多样性对土壤微生物多样性的促进作用很可能通过根系分泌物和凋落物实现, 即植物多样性的提高使根系分泌物和凋落物在数量、质量和时间分布上都更加多样化[37], 从而增加土壤底物和微生境的多样性, 促进了微生物多样性的提高[38~41]. 不过, 以前的研究更多关注植物的物种多样性. 基于分类、形态、生理和生活史等特征划分的植物功能群, 其群内物种对生态系统的作用可能类似, 具有某些特定的功能特征, 是研究环境变化下植物的基本单元, 在揭示植物多样性和生态系统功能的关系上起重要作用[42~44]. 在本研究中, 将植物物种划分为禾本、非禾本、豆科和莎草四大功能群, 其功能群多样性比物种多样性对土壤微生物有更高的解释量, 这可能意味着植物功能群多样性比物种多样性更适合揭示微生物多样性和植物多样性间的关系.

干旱指数和植物功能群丰富度等因子对微生物多样性的重要性也被结构方程模型和CCA分析(图S9等)所揭示. 结构方程模型显示, 干旱指数和年均温通过影响植物的功能群多样性和地上生物量而改变土壤的碳氮比, 从而直接或间接影响到土壤微生物的群落多样性. 对于土壤微生物的群落结构, CCA模型中未能解释其变化的解释量高达80%左右. 一方面, 可能是因为本研究中所检测的环境指标有限, 没有囊括其他对土壤

微生物群落间结构变化产生贡献的因子. 另一方面, 可能是因为随机等非确定性过程的作用所占比例较大. 生物群落的构建可能由环境过滤效应以及生物间的相互作用等确定性过程控制[45], 也可能由随机过程(如随机定殖、成种、灭绝和生态漂移等)控制[46]. 近年来, 越来越多的研究认为可能是两者共同发挥作用[47,48].

在DCA谱图上, 来自高寒灌丛的样品相对集聚, 在表层和底层都和高寒草原的样品重叠在一起. 本研究中高寒灌丛的水热条件更接近于高寒草原, 尤其是降水和干旱指数. 此外, 这些高寒灌丛多为低矮且稀疏的金露梅灌丛; 同时还分布着大量的草本植物, 优势种主要为二裂委陵菜、青藏苔草、黄芪和隐子草等, 这样的草本植物群落组成也与高寒草原更相似. 这些因素可能都导致了高寒灌丛的微生物群落结构与高寒草原的微生物群落结构更为相似, 在DCA图上高度重叠.

与青藏高原高寒草地土壤微生物碳具有显著相关性的环境因子, 与微生物群落结构和多样性的相关因子明显不同. 这可能意味着微生物量碳受到不同控制因子的调控. 土壤微生物量碳与干旱指数、年均温、植物物种或功能群多样性之间没有显著的相关性. 但是, 微生物量碳与多个土壤因子间呈显著的正相关关系, 包括可溶性有机碳(DOC)、氨态氮(NH_4^+)和速效磷(AP). 此外, 微生物量碳同植物生物量之间具有显著的正相关关系. 其中, 莎草植物的生物量与土壤表层和下层的微生物量碳均显著正相关, 而非禾本草本植物生物量仅与土壤下层微生物量碳具有显著的正相关关系. 莎草科的根系据观察集中分布在0~10 cm的土层, 可能由此对土壤表层(0~5 cm)和下层(5~20 cm)的微生物量碳都产生了影响; 而非禾本科草本植物的根系更倾向于向下延伸, 所以可能导致其生物量仅与土壤下层的微生物量碳具有显著的相关性.

4 结论和建议

在青藏高原上开展大尺度的土壤微生物调查, 共采集了64个样点, 样点间最远距离达2121 km. 包含了青藏高原的主要草地类型, 即高寒灌丛、高寒草甸、高寒草原和高寒荒漠. 结果发现土壤微生物的多样性同干旱指数和植物功能群的多样性间具有显著的相关关系. 温度而非水分在低温的高寒生态系统是微生物多样性的控制因子, 大气温度的增加在降水有限的条件下提高了干旱程度, 可能由此降低了土壤微生物的多样性. 耦合了水、热因素的干旱指数比单一的大气温度对青藏高原高寒草地的土壤微生物多样性具有更高的解释度. 此外, 本研究将植物物种划分为禾本、非禾本、豆科和莎草四大功能群, 植物的功能群多样性比物种多样性对土壤微生物的多样性有更高的解释量. 与土壤微生物多样性不同, 土壤微生物量碳与干旱指数、年均温、植物物种或功能群多样性间均没有显著的相关关系, 但同可溶性有机碳、氨态氮、速效磷及碳氮比等土壤营养状况和植物的地上生物量具有显著的相关性.

这一研究不仅揭示了青藏高原高寒草地上土壤微生物的分布特征, 加深了我们对生物和非生物因子影响的认识, 对预测未来气候变化下青藏高原土壤微生物的变化也有重要意义. 青藏高原未来可能呈现暖湿化的趋势[49~51], 由此可能带来干旱指数的降低, 有可能会促进土壤微生物多样性的提高.

在未来微生物生物地理学的研究中, 建议加强研究干旱指数和植物功能群多样性对微生物群落结构、多样性、生物量和功能的影响, 探讨其作用机制及尺度依赖关系. 同时, 不同的微生物种群或功能群可能存在着不同的空间分布格局, 建议深入挖掘它们空间分布格局的规律及形成机制特点.

参考文献

1 Glassman S I, Weihe C, Li J, et al. Decomposition responses to climate depend on microbial community composition. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115: 11994–11999

2 Bhatnagar J M, Peay K G, Treseder K K. Litter chemistry influences decomposition through activity of specific microbial functional guilds. Ecol Monogr, 2018, 88: 429–444

3 de Bruijn F J. Biological Nitrogen Fixation, in Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture. Cham: Springer International Publishing, 2015. 215–224

4 Vitousek P M, Cassman K, Cleveland C, et al. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. Biogeochemistry, 2002, 57: 1–45

5 Leininger S, Urich T, Schloter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. Nature, 2006, 442: 806–809

6 Francis C A, Beman J M, Kuypers M M M. New processes and players in the nitrogen cycle: The microbial ecology of anaerobic and archaeal

ammonia oxidation. ISME J, 2007, 1: 19–27
7 García-Parisi P A, Omacini M. Arbuscular mycorrhizal fungi can shift plant-soil feedback of grass-endophyte symbiosis from negative to positive. Plant Soil, 2017, 419: 13−23
8 Ke P J, Miki T, Ding T S. The soil microbial community predicts the importance of plant traits in plant-soil feedback. New Phytol, 2015, 206: 329–341
9 Chu H Y, Wang Y F, Shi Y, et al. Current status and development trend of soil microbial biogeography (in Chinese). Bull Chin Acad Sci, 2017, 32: 585−592 [褚海燕, 王艳芬, 时玉, 等. 土壤微生物生物地理学研究现状与发展态势. 中国科学院院刊, 2017, 32: 585−592]
10 Sanders N J, Rahbek C. The patterns and causes of elevational diversity gradients. Ecography, 2012, 35: 1–3
11 Adler P B, Seabloom E W, Borer E T, et al. Productivity is a poor predictor of plant species richness. Science, 2011, 333: 1750–1753
12 O'Brien S L, Gibbons S M, Owens S M, et al. Spatial scale drives patterns in soil bacterial diversity. Environ Microbiol, 2016, 18: 2039−2051
13 Martiny J B H, Bohannan B J M, Brown J H, et al. Microbial biogeography: Putting microorganisms on the map. Nat Rev Microbiol, 2006, 4: 102–112
14 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 Biol Biochem, 2009, 41: 1833–1840
15 Griffiths R I, Thomson B C, James P, et al. The bacterial biogeography of British soils. Environ Microbiol, 2011, 13: 1642–1654
16 Garcia-Pichel F, Loza V, Marusenko Y, et al. Temperature drives the continental-scale distribution of key microbes in topsoil communities. Science, 2013, 340: 1574–1577
17 Curd E E, Martiny J B H, Li H, et al. Bacterial diversity is positively correlated with soil heterogeneity. Ecosphere, 2018, 9: e02079
18 Juyal A, Otten W, Falconer R, et al. Combination of techniques to quantify the distribution of bacteria in their soil microhabitats at different spatial scales. Geoderma, 2019, 334: 165–174
19 Nemergut D R, Schmidt S K, Fukami T, et al. Patterns and processes of microbial community assembly. Microbiol Mol Biol Rev, 2013, 77: 342–356
20 Fierer N, Jackson R B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 626–631
21 Bahram M, Hildebrand F, Forslund S K, et al. Structure and function of the global topsoil microbiome. Nature, 2018, 560: 233–237
22 Maestre F T, Delgado-Baquerizo M, Jeffries T C, et al. Increasing aridity reduces soil microbial diversity and abundance in global drylands. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112: 15684−15689
23 Zhou J, Deng Y, Shen L, et al. Temperature mediates continental-scale diversity of microbes in forest soils. Nat Commun, 2016, 7: 12083
24 Yao T, Thompson L G, Mosbrugger V, et al. Third pole environment (TPE). Environ Dev, 2012, 3: 52–64
25 Sun H L, Zheng D, Yao T D, et al. Protection and construction of the national ecological security shelter zone on Tibetan Plateau (in Chinese). Acta Geogr Sin, 2012, 67: 3−12 [孙鸿烈, 郑度, 姚檀栋, 等. 青藏高原国家生态安全屏障保护与建设. 地理学报, 2012, 67: 3−12]
26 Chu H, Sun H, Tripathi B M, et al. Bacterial community dissimilarity between the surface and subsurface soils equals horizontal differences over several kilometers in the western Tibetan Plateau. Environ Microbiol, 2016, 18: 1523–1533
27 Duckworth J, Jager T, Ashauer R. Automated, high-throughput measurement of size and growth curves of small organisms in well plates. Sci Rep, 2019, 9: 10
28 Yang T, Adams J M, Shi Y, et al. Soil fungal diversity in natural grasslands of the Tibetan Plateau: Associations with plant diversity and productivity. New Phytol, 2017, 215: 756–765
29 Che R, Deng Y, Wang F, et al. Autotrophic and symbiotic diazotrophs dominate nitrogen-fixing communities in Tibet grassland soils. Sci Total Environ, 2018, 639: 997–1006
30 Zhang J, Wang F, Che R, et al. Precipitation shapes communities of arbuscular mycorrhizal fungi in Tibet alpine steppe. Sci Rep, 2016, 6: 23488
31 Hijmans R J, Cameron S E, Parra J L, et al. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. Int J Climatol, 2005, 25: 1965–1978
32 Delgado-Baquerizo M, Maestre F T, Reich P B, et al. Carbon content and climate variability drive global soil bacterial diversity patterns. Ecol Monogr, 2016, 86: 373–390
33 Li Y, Lin Q, Wang S, et al. Soil bacterial community responses to warming and grazing in a Tibet alpine meadow. FEMS Microbiol Ecol, 2016: fiv152
34 Spehn E M, Joshi J, Schmid B, et al. Plant diversity effects on soil heterotrophic activity in experimental grassland ecosystems. Plant Soil, 2000, 224: 217–230
35 Weidner S, Koller R, Latz E, et al. Bacterial diversity amplifies nutrient-based plant-soil feedbacks. Funct Ecol, 2015, 29: 1341–1349
36 Prober S M, Leff J W, Bates S T, et al. Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. Ecol Lett, 2015, 18: 85–95
37 Lange M, Habekost M, Eisenhauer N, et al. Biotic and abiotic properties mediating plant diversity effects on soil microbial communities in an

experimental grassland. PLoS One, 2014, 9: e96182
38 Hooper D U, Bignell D E, Brown V K, et al. Interactions between aboveground and belowground biodiversity in terrestrial ecosystems: Patterns, mechanisms, and feedbacks. BioScience, 2000, 50: 1049–1061
39 Wardle D A. The influence of biotic interactions on soil biodiversity. Ecol Lett, 2006, 9: 870–886
40 Millard P, Singh B K. Does grassland vegetation drive soil microbial diversity? Nutr Cycl Agroecosyst, 2010, 88: 147−158
41 Eisenhauer N, Milcu A, Sabais A C W, et al. Plant diversity surpasses plant functional groups and plant productivity as driver of soil biota in the long term. PLoS One, 2011, 6: e16055
42 Woodward F I, Cramer W. Plant functional types and climatic change: Introduction. J Veg Sci, 1996, 7: 306–308
43 Bonet A. Secondary succession of semi-arid Mediterranean old-fields in south-eastern Spain: Insights for conservation and restoration of degraded lands. J Arid Environ, 2004, 56: 213–233
44 Pausas J G, Austin M P. Patterns of plant species richness in relation to different environments: An appraisal. J Veg Sci, 2001, 12: 153–166
45 Mayfield M M, Levine J M. Opposing effects of competitive exclusion on the phylogenetic structure of communities. Ecol Lett, 2010, 13: 1085–1093
46 Rosindell J, Hubbell S P, He F, et al. The case for ecological neutral theory. Trends Ecol Evol, 2012, 27: 203–208
47 Dini-Andreote F, Stegen J C, van Elsas J D, et al. Disentangling mechanisms that mediate the balance between stochastic and deterministic processes in microbial succession. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112: E1326–E1332
48 Zhou J, Ning D. Stochastic community assembly: Does it matter in microbial ecology? Microbiol Mol Biol Rev, 2017, 81: e00002
49 Kang S, Xu Y, You Q, et al. Review of climate and cryospheric change in the Tibetan Plateau. Environ Res Lett, 2010, 5: 015101
50 Xu Z X, Gong T L, Li J Y. Decadal trend of climate in the Tibetan Plateau—Regional temperature and precipitation. Hydrol Process, 2008, 22: 3056–3065
51 Kuang X, Jiao J J. Review on climate change on the Tibetan Plateau during the last half century. J Geophys Res Atmos, 2016, 121: 3979–4007

补充材料

图S1 土壤表层和下层微生物群落在门水平上的平均相对丰度和在样品中出现的比例
图S2 高寒草甸土壤表层和下层微生物群落在门水平上的平均相对丰度和在样品中出现的比例
图S3 高寒草原土壤表层和下层微生物群落在门水平上的平均相对丰度和在样品中出现的比例
图S4 高寒荒漠土壤表层和下层微生物群落在门水平上的平均相对丰度和在样品中出现的比例
图S5 土壤下层微生物量碳、丰富度和香农多样性同气候因子的关系
图S6 土壤下层微生物量碳同土壤和植物因子的关系
图S7 土壤表层微生物丰富度和香农多样性同土壤和植物因子的关系
图S8 土壤下层微生物丰富度和香农多样性同土壤和植物因子的关系
图S9 土壤表层和下层土壤微生物样品的典型关联分析(CCA)及基于CCA的方差分解分析

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “青藏高原高寒草地土壤微生物群落及影响因子”

Soil microbial communities in alpine grasslands on the Tibetan Plateau and their influencing factors

Kai Xue[1,2], Biao Zhang[3], Shutong Zhou[3], Qinwei Ran[3], Li Tang[3,4], Rongxiao Che[4,5], Zhe Pang[3], Fang Wang[3,4], Di Wang[3], Jing Zhang[3], Lili Jiang[6], Ronghai Hu[1], Xiaoyong Cui[2,3], Yanbin Hao[2,3] & Yanfen Wang[2,3*]

[1] *College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;*
[2] *Center for Excellence in Tibetan Plateau Earth Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;*
[3] *College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;*
[4] *Environmental Futures Research Institute, Griffith University, Nathan QLD 4111, Australia;*
[5] *Institute of International Rivers and Eco-security, Yunnan University, Kunming 650091, China;*
[6] *Institute of Tibetan Plateau Research, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*
* Corresponding author, E-mail: yfwang@ucas.ac.cn

As an indicator and regulator of climate and environmental change, the Tibetan Plateau is an important barrier for ecological security. However, despite the importance of soil microbial communities in almost all soil biochemical processes and ecosystem functions, the biogeography of soil microbial communities on the Tibetan Plateau is poorly understood, especially at large scales over different ecosystem types. In this study, we collected samples from 64 sampling sites representing different grassland ecosystem types and spanning 2121 km across on the Tibetan Plateau. We then used next generation high-throughput sequencing to investigate the soil prokaryote community (i.e. bacteria and archaea) diversity and spatial patterns and to explore their relationship with biotic (e.g. plant functional group diversity and biomass) and abiotic (e.g. aridity index, soil carbon and nitrogen levels) factors. Among the four alpine grassland types (i.e. alpine meadow, alpine steppe, alpine shrub and alpine desert) sampled in this study, alpine meadow had the highest soil microbial biomass and alpine desert had the lowest soil microbial richness and Shannon diversity. The soil microbial diversity in the alpine grassland correlated with plant diversity and climate factors. Soil microbial diversity negatively correlated with the annual average air temperature, but was not correlated with the annual average precipitation, indicating that temperature, rather than precipitation, may be more important in controlling the soil microbial diversity in alpine grassland ecosystems at cold temperatures. Higher air temperature likely led to an intensified aridity under limited precipitation, and thus decreased microbial diversity. As a result, the aridity index combined with temperature and precipitation explained more of the variance in the soil microbial diversity than air temperature or precipitation did individually. Moreover, after separating plant species into four functional groups (grass, forb, legume and sedge), microbial diversity positively correlated with plant functional group diversity, explaining more of the variance in microbial diversity than plant species diversity did. Results of structural equation modeling revealed that the aridity index and annual air temperature affected soil microbial diversity, directly or indirectly, through influencing plant functional group diversity and aboveground biomass; while aboveground biomass changed the soil carbon to nitrogen ratio in the upper soil layers and thus impacted soil microbial diversity. However, in contrast to microbial diversity, soil microbial biomass carbon was not correlated with plant functional group diversity, plant species diversity, or the climate factors annual average air temperature, annual precipitation and aridity index, but were linked to soil nutrient status (e.g. soil dissolved organic carbon, ammonia, available phosphorus, and carbon to nitrogen ratio) and plant biomass of sedges and forbs, demonstrating that microbial biomass and diversity were likely controlled by different factors. In summary, this study investigated the spatial patterns of soil microbial communities across different alpine grassland ecosystem types on the Tibetan Plateau and enhanced our understanding of biotic and abiotic factors controlling microbial biomass and diversity, which will be important in predicting microbial changes on the Tibetan Plateau under future climate change. Under future warming and wetting scenarios on the Tibetan Plateau, it is possible that the aridity index would decrease, leading to increased soil microbial diversity. Results of this study also suggest a focus on the aridity index and plant functional group diversity in future microbial biogeography studies in order to further determine their roles in controlling or mediating soil microbial biomass and diversity.

soil microbial community, microbial diversity, microbial biomass carbon, aridity index, plant functional group diversity

doi: 10.1360/TB-2019-0090