

¹ 季节变化对喀斯特石山不同恢复阶段櫟木群落土壤微生物群落的影响

王楠^{1, 2}, 姜明^{1, 2, 3}, 梁月明⁴, 杨皓^{1, 2}

(1. 珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室, 广西 桂林 541006; 2. 广西漓江流域景观资源保育与可持续利用重点实验室, 广西 桂林 541006; 3. 广西师范大学可持续发展创新研究院, 广西 桂林 541006; 4. 中国地质科学院岩溶地质研究所自然资源部广西壮族自治区岩溶动力学重点实验室, 广西 桂林 541006)

摘要:【目的】探究季节变化对喀斯特石山不同恢复阶段櫟木群落土壤微生物群落的影响, 以期为深入解析喀斯特石山植被恢复过程中土壤生态环境对未来气候变化的反馈和响应机制提供科学依据。【方法】以雨季灌木林土壤(RS)、旱季灌木林土壤(DS)、雨季乔木林土壤(RA)和旱季乔木林土壤(DA)为研究对象, 应用高通量测序技术测定土壤微生物群落结构, 生理生化方法测定土壤化学性质和酶活性。研究不同季节和不同恢复阶段下土壤微生物群落结构特征、多样性变化及其与环境因子的关系。【结果】(1) RS、DS、RA 和 DA 的优势真菌群为子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、被孢霉门(Mortierellomycota)和未被定义菌门(unclassified_k__ Fungi); 优势细菌群为放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)。LEfSe 分析表明 RS、DS、RA 和 DA 共有 41 个真菌和 26 个细菌相对丰度存在显著差异(LDA > 2.0, $P < 0.05$), 季节变化对不同恢复阶段土壤真菌群落的物种差异影响更显著。(2) Shannon 指数表明, 无论旱雨季, 真菌和细菌的多样性均为灌木林 < 乔木林。同一恢复阶段下, 从雨季到旱季, 真菌多样性显著降低, 细菌多样性显著增加。PCoA 和 NMDS 分析表明季节变化对不同恢复阶段土壤细菌群落的组间差异影响更显著。(3) 微生物网络分析表明, 土壤真菌群落的微生物网络复杂性为 DS > RS 和 DA > RA; 土壤细菌群落的微生物网络复杂性为 DS > RS 和 DA < RA。无论灌木林还是乔木林, 从雨季到旱季过程中真菌和细菌各群落间的正相互作用增强, 表明逐渐以共生关系为主导, 竞争关系减弱来响应干旱胁迫。(4) CCA 分析和相关性分析表明, 驱动 RS、DS、RA 和 DA 的真菌群落发生变化的主要影响因子差异明显, 分别对应为 AK、URE、CEL、SUC、URE、pH、SWC; 影响 RS、DS、RA 和 DA 的细菌群落发生变化的关键因子差异也明显, 分别对应为 CAT、SUC 和 SWC, AK、TN、pH、CAT、CAT、URE。从雨季到旱季, 土壤微生物群落与环境因子的相互作用增强, 表现为灌木林土壤真菌 Basidiomycota 与 CEL、TC、SOM 都呈显著负相关; 乔木林土壤真菌 Calcarisporiellomycetes 与 TN 呈显著正相关。灌木林土壤细菌 Acidimicrobiia 与 SOM、TC、CEL 和 TN 呈显著正相关。【结论】不同恢复阶段土壤真菌群落对季节变化的敏感性强于细菌群落, 但细菌群落的网络复杂性要强于真菌群落, 群落结构更加稳定。

关键词: 季节变化; 土壤微生物; 喀斯特; 櫟木; 恢复阶段; 高通量测序

Effects of seasonal changes on soil microbial community of *Loropetalum chinense* community in different recovery stages of Karst Plateau rocky mountains

Wang Yanan^{1, 2}, Ma Jiangming^{1, 2, 3}, Liang Yueming⁴, Yang Hao^{1, 2}

Key Laboratory of Rare and Endangered Animal and Plant Ecology and Environmental Protection, Ministry of Education, Guilin 541006, Guangxi; 2. Key Laboratory of Landscape Resource Conservation and Sustainable Utilization in the Lijiang River Basin of Guangxi, Guilin 541006, China; 3. Institute of Sustainable Development and Innovation,

1 基金项目: 国家自然科学基金: 植被恢复背景下西南岩溶区土壤有机碳动态变化及其驱动机制(U21A201466) [Supported by the National Natural Science Foundation of China: Dynamic Changes and Driving Mechanisms of Soil Organic Carbon in Southwest Karst Regions under the Background of Vegetation Restoration (U21A201466)].

作者简介: 王雅楠(1998-), 女, 山东烟台人, 在读硕士研究生, 主要从事植物生态学研究, (E-mail) 18863093719@163.com。

通信作者: 马姜明, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事退化生态系统的恢复与重建研究, (E-mail) mjming03@163.com。

(1. Guangxi Normal University, Guilin 541006, Guangxi; 4. Key Laboratory of Karst Dynamics, Guangxi, Natural

Resources Department, Institute of Karst Geology, Chinese Academy of Geological Sciences, Guilin, Guangxi 541006)

Abstract: **【Objective】** To explore the impact of seasonal changes on soil microbial community of *Loropetalum chinense* community in different restoration stages of Karst Plateau rocky mountains, so as to provide scientific basis for in-depth analysis of the feedback and response mechanism of soil ecological environment to future climate change in the process of Karst Plateau rocky mountain vegetation restoration. **【Method】** The study focuses on the soil of rainy season shrub forests (RS), dry season shrub forests (DS), rainy season tree forests (RA), and dry season tree forests (DA). High throughput sequencing technology is used to determine the structure of soil microbial communities, and physiological and biochemical methods are used to determine soil chemical properties and enzyme activities. Study the structural characteristics and diversity changes of soil microbial communities under different seasons and recovery stages, as well as their relationship with environmental factors. **【Result】** (1) The dominant fungal groups of RS, DS, RA and DA were Ascomycota, Basidiomycota, Mortierellomycota and unclassified_k_Fungi; The dominant bacteria are Actinomycetota, Pseudomonadota, Acidobacteriota and Chloroflexota. LEfSe analysis showed that there were significant differences in relative abundance of 41 fungi and 26 bacteria among RS, DS, RA, and DA ($LDA > 2.0$, $P < 0.05$), and seasonal changes had a more significant impact on species differences in soil fungal communities at different recovery stages. (2) The Shannon index indicates that regardless of the dry and rainy season, the diversity of fungi and bacteria in shrubland forests is lower than that in tree forests. During the same recovery phase, from the rainy season to the dry season, fungal diversity significantly decreases and bacterial diversity significantly increases. PCoA and NMDS analysis showed that seasonal changes had a more significant impact on the inter group differences of soil bacterial communities at different recovery stages. (3) The analysis of microbial network showed that the complexity of microbial network of soil fungal community was $DS > RS$ and $DA > RA$; The complexity of microbial network of soil bacterial community is $DS > RS$ and $DA < RA$. Whether in shrub or tree forests, the positive interaction between fungal and bacterial communities increases from the rainy season to the dry season, indicating a gradual dominance of symbiotic relationships and a weakening of competitive relationships in response to drought stress. (4) CCA analysis and correlation analysis showed that the main influencing factors driving the changes in fungal communities of RS, DS, RA, and DA were significantly different, corresponding to AK, URE, CEL, SUC, URE, pH, and SWC, respectively; The key factors affecting the changes in bacterial communities of RS, DS, RA, and DA are also significantly different, corresponding to CAT, SUC, and SWC, AK, TN, pH, CAT, CAT, URE. From the rainy season to the dry season, the interaction between soil microbial communities and environmental factors has increased, manifested as a significant negative correlation between the shrub soil fungus Basidiomycota and CEL, TC, SOM; There is a significant positive correlation between soil fungi Calcarisporiellomycetes and TN in tree forests. There is a significant positive correlation between soil bacteria Acidimicrobia and SOM, TC, CEL, and TN in shrublands. **【Conclusion】** The sensitivity of soil fungal communities to seasonal changes during different recovery stages is stronger than that of bacterial communities, but the network complexity of bacterial communities is stronger than that of fungal communities, and the community structure is more stable.

Keywords: seasonal changes; Soil microorganisms; Karst Plateau; *Loropetalum chinense*; Recovery phase; High throughput sequencing

前言

土壤微生物作为土壤微环境中的重要生物因子,在土壤微环境能量流动和生态调控的过程中发挥着不可替代的作用(Zhu et al, 2022; Kappler et al, 2021),作为连接地上和地下的重要媒介,其对土壤微环境的改变极其敏感,是植被生态环境恢复过程的“指挥者”(Crowther et al, 2019)。在特定生境中和生态系统中对土壤微生物群落变化趋势或微生物生命机制进行研究时,季节(时间)是不可忽视的重要因素

之一。土壤微生物首先要面对湿度、温度等环境条件以及资源可用性的季节性变化,引起土壤微生物群落结构的季节性变化(Korada et al, 2013),其次,不同季节下植物的凋落物和根系分泌物的变化使得土壤中参与养分循环的功能微生物群落结构和多样差异,进而对土壤微生物群落产生影响。土壤微生物群落组成、多样性、丰度及其功能与土壤理化性质、土壤酶活性、植被类型及气候等因素密切相关(Gao et al, 2019)。细菌、真菌和放线菌作为土壤微生物的三大主要菌群,其群落结构和多样性的变化可作为描述土壤环境条件变化的重要预警及敏感指标,近年来已成为生态领域研究的热点问题(姜雪薇等, 2022)。

广西是我国具有典型的喀斯特地貌代表之一,属热带、亚热带季风气候,旱、雨季节降水差异极大。喀斯特地区石漠化景观突出,土层浅薄,土壤富钙且储水能力差,对季节变化响应敏感但承受能力弱(陈燕丽等, 2022)。其脆弱的生态系统一旦遭受破坏,将会面临植被易退化难修复等严重石漠化生态问题。与此同时,有研究表明(Wang et al, 2023)喀斯特石漠化演变是多种因素综合作用的结果,它与气候变化关系的探究目前主要集中在宏观层面,如果进一步细化到不同等级石漠化对月、季节甚至每日气候变化的响应,或者喀斯特区内林、草、微生物、动物、土壤养分对月、季气候因子的响应研究,将有助于人们在微观层次上对石漠化演变和气候作用机制有更深入了解。目前,国内外已有学者对季节变化下喀斯特土壤生态系统的调控进行研究。Wu et al. (2020)研究表明极端气候事件会显著降低喀斯特洼地土壤中的碳氮储量; Sonj et al. (2020)研究表明在全球气候变化下对中欧喀斯特地区温带山地森林的 NO_3^- 淋出容易受到夏季干旱的影响; Sheng et al. (2016)对喀斯特石漠化土壤水分季节变化的时空分布研究表明湿季水分的再分配和干季蒸散发的空间变化是控制露头周围土壤水分格局的因素等。

欆木(*Loropetalum chinensis*)作为喀斯特生境植被恢复的优势木本植物之一,在防治喀斯特石山石漠化、维持物种多样性和生态系统稳定等方面均有重要的生态学意义(盘远方等, 2023)。目前有关欆木的研究较多关注其本身的变化,如药用价值(Song et al., 2022)、生态位(Qin et al, 2017)、叶性状(Cai et al., 2023)等方面,而对欆木土壤环境的研究却鲜有报道。鉴于此,本研究以欆木灌木林和乔木林的林下土壤为研究对象,通过 Illumina HiSeq 高通量测序技术,研究不同季节和不同恢复阶段下土壤微生物群落结构特征、多样性变化及其与环境因子之间的关系,探寻出驱动土壤微生物群落变化的主要季节性影响因子,探讨季节变化对喀斯特石山不同恢复阶段欆木群落土壤微生物群落的影响作用,以期深入解析喀斯特石山植被恢复过程中土壤生态环境对未来气候变化的反馈和响应机制提供科学依据。

1 研究区概况

研究地位于广西壮族自治区桂林市象山区二塘乡西村(110° 15' E, 25° 12' N)和阳朔县兴坪镇小河背村(110° 31' E, 24° 55' N),地处广西东北部,海拔 150~280 m,具有典型的喀斯特地貌,属于中亚热带湿润季风气候,夏长冬短,年均气温 18.9 °C,最冷的 1 月份平均气温 7.8°C,最热的 7 月份平均气温 28°C;雨量充沛,年平均降水量 1800~2000mm,降水量年分配不均,旱雨季节差异明显;光照充足,全年无霜期 300d,年平均蒸发量 1490~1905mm。研究样地内植被因人为干扰程度和地形因子的综合影响而发生次生演替,现存的欆木群落中其他伴生种主要有粗糠柴 (*Mallotus philippensis*)、龙须藤 (*Bauhinia cjamponii*)、阴香 (*Cinnamomum burmanni*) 等。

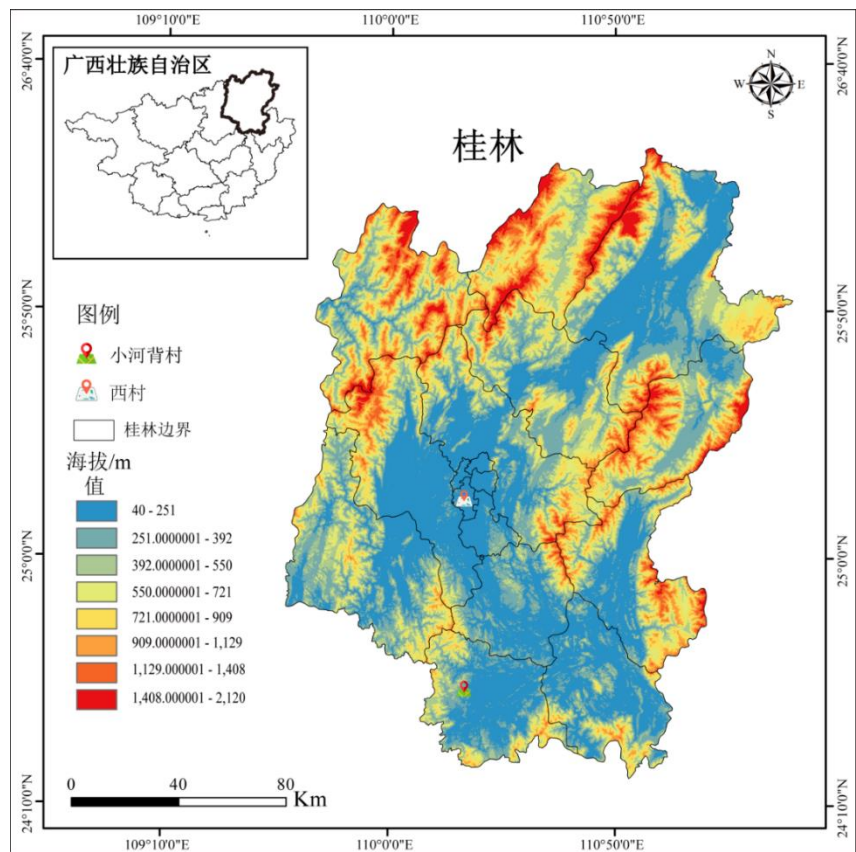


图 1 研究区概况图

Fig.1 Sketch map of the distribution of study area

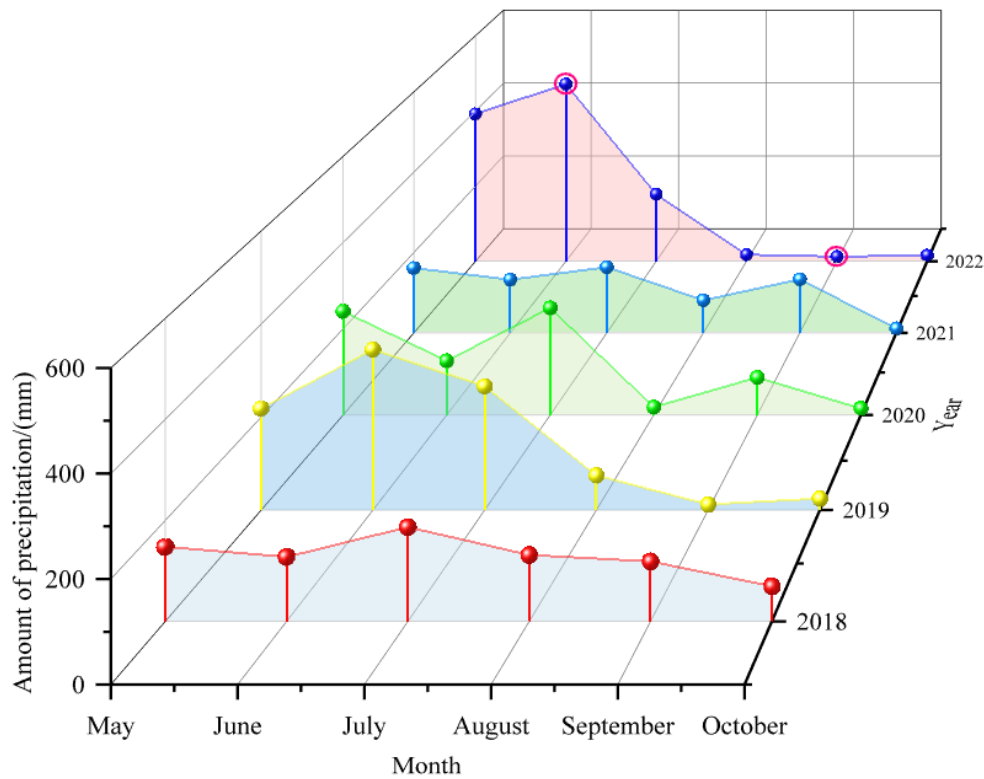


图 2 研究区 2018 年至 2022 年 5 月至 10 月月平均降水量(mm)

Fig.2 Monthly Average Precipitation from May to October in the Study Area from 2018 to 2022 (mm)

据气象站点检测数据可知(图 2), 2018~2022 年研究区内雨季(5~7 月)和旱季(8~10 月)的降水量分别在 2022 年 6 月和 10 月突破以往降雨量的最高峰值和最低峰值。鉴于此, 分别于 2022 年 6 月、10 月在广西壮族自治区桂林市象山区二塘乡西村(110° 15' E, 25° 12' N)和阳朔县兴坪镇小河背村(110° 31' E, 24° 55' N)样地内选择櫟木灌木林和乔木林土壤进行研究。

2 研究方法

2.1 土壤样品采集与处理

以櫟木灌木林和乔木林的表层土壤为研究对象, 在雨季(2022 年 6 月 10 日至 2022 年 7 月 10 日)和旱季(2022 年 10 月 5 日至 11 月 5 日)取样, 分别为雨季灌木林土壤(RS)、旱季灌木林土壤(DS)、雨季乔木林土壤(RA)和旱季乔木林土壤(DA)四类土壤样品。结合喀斯特石山土地利用类型、土壤类型和裸露岩石分布, 设计 20m×20m 栅格布点进行采样。用土钻收集 0~20cm 的土壤。所有新鲜土壤样品立即密封在无菌塑料袋中, 并在保温箱中冷藏, 直至转移到实验室中, 雨季和旱季共 120 个样品。所有土壤样品在实验室进行物理和化学分析之前都需进行动植物残体、石砾等其他杂物的去除, 并通过 2mm(10 目)筛子, 均匀分为三个部分的子样品: 测定土壤理化性质的土样经风干后研磨过 0.125mm(100 目)筛子常温保存; 测定土壤酶活性的新鲜土样放于 4℃冰箱保存; 测定土壤微生物群落结构和多样性的新鲜土样放于超低温冰箱(-80℃)保存。

2.2 样品分析

2.2.1 土壤化学性质测定

土壤 pH 值使用 pH 计(Mettler-Toledo, S40 SevenMulti™, Greifensee, Switzerland)测量, 水土比为 2.5:1(w/v)(Qian et al., 2015); 根据土壤理化分析测定土壤含水量(SWC); 土壤有机质(SOM)含量测定采用重铬酸钾稀释热法; 总碳(TC)含量和总氮(TN)含量采用元素分析仪测定; 土壤全磷(TP)含量的测定采用 HClO₄-H₂SO₄ 熔融——钼锑抗比色法, 分光光度计测定; 采用 0.5mol/L NaHCO₃ 溶液浸提, 分光光度计测定有效磷(AP); 采用 NH₄OAc 溶液浸提后, 火焰光度计测定有效钾(AK)(Qian et al., 2014)。

2.2.2 土壤酶活性测定

土壤脲酶存在于大多数细菌、真菌和高等植物里。土壤的脲酶活性与土壤的微生物数量、有机物质含量, 全氮含量呈正相关(关松荫, 1986)。土壤过氧化氢酶在一定程度上反映了土壤微生物学过程的强度, 可以表征土壤腐殖质化强度大小和有机质转化的速度(Narendra et al., 2023)。土壤蔗糖酶是研究最多的一种土壤酶, 其活性与环境土壤中的腐殖质、水溶性有机质和黏粒含量有关(Meng et al., 2005)。土

壤磷酸酶活性影响着土壤中有机磷的分解转化,微生物在土壤磷素循环中发挥着重要作用,对土壤磷素有效性起着调节作用(Yao et al., 2018);土壤纤维素酶活性可以指示土壤有机质含量、分解情况以及土壤肥力和熟化程度,与土壤微生物降解相互作用(高钰等, 2023)。对这五种土壤酶活性变化的研究,能为分析土壤微生物群落变化提供一定的理论依据。土壤蔗糖酶(SUC)、纤维素酶(CEL)活性采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定,其活性分别以以培养 24 h 后 1 g 干土生成葡萄糖毫克数表示 $[\text{mg}/(\text{g} \cdot 24 \text{ h})]$ 和培养 72 h 后 1 g 干土生成葡萄糖毫克数表示 $[\text{mg}/(\text{g} \cdot 24 \text{ h})]$;碱性磷酸酶(ALP)活性采用磷酸苯二钠比色法测定,其活性以培养 24 h 后每克风干土壤中释放出的酚的质量(mg)来表示 $[\text{mg}/(\text{g} \cdot 24 \text{ h})]$;脲酶(URE)活性采用苯酚钠一次氯酸钠比色法测定,其活性以培养 24 h 后每克风干土壤中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的毫克数来表示 $[\text{mg}/(\text{g} \cdot 24 \text{ h})]$;过氧化氢酶(CAT)活性采用胞外酶的方法测定(Chen et al., 2018)。

2.2.3 土壤 DNA 的提取和测序

利用 Illumina MiSeq 高通量测序技术对土壤细菌和真菌群落进行分析。在制造商说明书的指导下,使用土壤 DNA 试剂盒(OMEGA Bio-Tek, Inc., Norcross, Georgia, USA)从 0.5 g 混合土壤中提取基因组 DNA。利用 1% 琼脂糖凝胶进行检测 DNA 的完整性, NanoDrop2000 检测 DNA 的纯度和浓度。细菌引物(Fan et al., 2014)序列使用 338F(5' -ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R(5' -GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对 16SrRN 基因 V3+V4 区进行 PCR 扩增;真菌引物(Mukherjee et al., 2014)序列使用 ITS1F(5' -CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和 ITS2R(5' -GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')对 ITS1 区进行 PCR 扩增(PCR 型号为 ABI GeneAmp® 9700 型)。每个样本 3 个重复。在引物末端加上测序接头,进行 PCR 扩增并对其产物进行纯化、定量和均一化构建 PE 文库,将建好的文库先进行文库质检,质检合格的文库用 Illumina (上海美吉生物医药科技有限公司)进行测序。Illumina 测序得到的 PE reads 进行样本拆分后,首先根据测序质量对双端 Reads 进行质控和过滤,同时根据双端 Reads 之间的 overlap 关系进行拼接,获得质控拼接之后的优化数据。然后使用序列降噪方法(DADA2/Deblur 等)处理优化数据,获得 ASV (Amplicon Sequence Variant)代表序列和丰度信息,基于序列降噪结果进行微生物多样性分析,操作分类单元在 97% 的同一性基础上进行分类,然后对 ASVs 的序列进行物种注释用于后续分析。

2.2.4 数据分析

使用 Excel 2022 进行数据处理,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)的最小显著差法(LSD)检验和 Duncan 新复极差法多重比较法分析不同季节不同恢复阶段櫟木群落土壤主要化学性质、酶活性和微生物多样性的差异显著性($P < 0.05$),统计分析在 SPSS 23 软件中完成。表中所有数据均以平均值 $\pm$ SD 表示。 α 多样性(Shannon 指数、Simpson 指数)、丰富度(Chao1 指数)由软件 mothur-1.30 进行分析(Schloss et al., 2011);此外,使用 R 软件包 vegan(3.3.1)进行主坐标分析(PCoA)、非度量多维标度(NMDS)和线性判别分

析(LEfSe)分析,揭示不同季节不同恢复阶段土壤微生物群落结构差异;Cannoco 5.0 软件进行去趋势对应分析(DCA)和典范对应分析(CCA);微生物网络模型在 R 语言(V 3.3.1)进行分析后,用 Gephi 0.10.1 对网络进行可视化。

3 结果与分析

3.1 不同恢复阶段土壤主要化学性质和酶活性的季节变化

3.1.1 土壤化学性质

在旱、雨季节下不同恢复阶段櫟木群落的土壤化学性质除 SOM 和 TC 外均存在显著差异(表 1)。其中,雨季灌木林和乔木林土壤 pH、SWC、TN 含量均显著高于旱季($P < 0.05$)。雨季时不同恢复阶段下,土壤 SWC、TN 均为灌木林>乔木林,而土壤 pH、TP 均为灌木林<乔木林($P < 0.05$),旱季差异均不明显。此外,相同季节下土壤 AK 均表现为灌木林>乔木林。旱雨季节变化对灌木林土壤 TP、AK 均有显著影响,表现为旱季高于雨季的 56.88%和雨季高于旱季的 45.36%,而对乔木林影响不显著。而相比于其他因子,仅有土壤 AP 受季节变化和不同恢复阶段及其交互作用的显著影响。

表 1 不同恢复阶段櫟木群落土壤理化性质随旱季和雨季的变化
Table 1 Changes in soil physical and chemical properties of different recovery stages of *Loropetalum chinense* with dry and rainy seasons

林型	季节	土壤含水率	pH 值	土壤有机质	全碳	全氮	全磷	速效磷	速效钾
Forest	Season	SWC	pH value	SOM	TC	TN	TP	AP	AK
type		(%)		(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)
Scrub forest	Rainy season	28.70±2.56Aa	6.60±0.21Ba	72.87±8.19Aa	46.97±5.28Aa	7.63±1.00Aa	0.20±0.06Bb	8.34±3.95Bb	362.1±120.92Aa
	Dry season	12.08±2.03Ab	6.22±0.16Ab	84.20±26.61Aa	54.27±17.15Aa	3.29±1.20Ab	0.84±0.34Aa	11.75±4.79Aa	197.86±25.03Ab
Arboreal forest	Rainy season	25.46±3.67Ba	7.19±0.10Aa	85.33±26.04Aa	54.99±16.78Aa	5.99±1.47Ba	0.85±0.24Aa	13.50±5.21Aa	114.91±28.53Ba
	Dry season	12.50±2.00Ab	6.30±0.15Ab	79.27±26.82Aa	51.09±14.98Aa	4.12±1.55Ab	0.69±0.13Aa	7.18±1.92Bb	130.01±32.74Ba

注: 每个值代表平均值±标准差。不同的大写字母表示同一季节不同恢复阶段之间的显著差异($p<0.05$); 在同一恢复阶段, 不同季节的小写字母不同, 差异有统计学意义($p<0.05$)。
Note: Each value represents the average ± standard deviation. Different capital letters indicate significant differences among different recovery stages in the same season ($p<0.05$); Different Minusculer indicate that there is a significant difference between different seasons in the same recovery phase($p<0.05$).

3.1.2 土壤酶活性

由表 2 可以看出, 季节变化和不同恢复阶段及其交互作用显著影响了 SUC、CEL 和 CAT 活性($P < 0.05$), 而对 URE 和 ALP 活性并无显著影响。具体表现为: 不论灌木林还是乔木林, 雨季 SUC 活性都强于旱季, 且在季节相同情况下, SUC 活性都为灌木林>乔木林。雨季时, 乔木林的 CEL 活性显著高于灌木林, 且雨季乔木林的 CEL 活性显著高于旱季。此外, 无论旱季还是雨季, CAT 活性均为灌木林显著强于乔木林; 同一恢复阶段下, CAT 活性均为旱季显著强于雨季。以上表明, CAT 活性对季节和恢复阶段变化的响应更积极。

表 2 不同恢复阶段櫟木群落旱季和雨季土壤酶活性变化

Table 2 Changes in soil enzyme activity of different recovery stages of *Loropetalum chinense* during dry and rainy seasons

林型	季节	蔗糖酶	纤维素酶	脲酶	碱性磷酸酶	过氧化氢酶
Forest type	Season	SUC (mg·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	CEL (mg·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	URE (mg·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	ALP (mg·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	CAT (μmol·g ⁻¹ ·h ⁻¹)
Scrub forest	Rainy season	14.37±5.30Aa	0.23±0.11Ba	0.47±0.27Aa	1.43±0.20Aa	6.57±2.12Ab
	Dry season	11.92±4.35Aa	0.39±0.32Aa	0.47±0.15Aa	1.50±0.26Aa	22.65±2.93Aa
	Rainy season	13.52±4.94Aa	1.08±0.55Aa	0.47±0.14Aa	1.48±0.20Aa	4.11±1.03Bb
	Dry season	7.12±2.01Bb	0.31±0.20Ab	0.51±0.23Aa	1.47±0.18Aa	16.11±2.11Ba

注：每个值代表平均值±标准差。不同的大写字母表示同一季节不同恢复阶段之间的显著差异(p<0.05)；在同一恢复阶段，不同季节的小写字母不同，差异有统计学意义(p<0.05)。

Note: Each value represents the average ± standard deviation. Different capital letters indicate significant differences among different recovery stages in the same season (p<0.05); Different Minusculer indicate that there is a significant difference between different seasons in the same recovery phase (p<0.05).

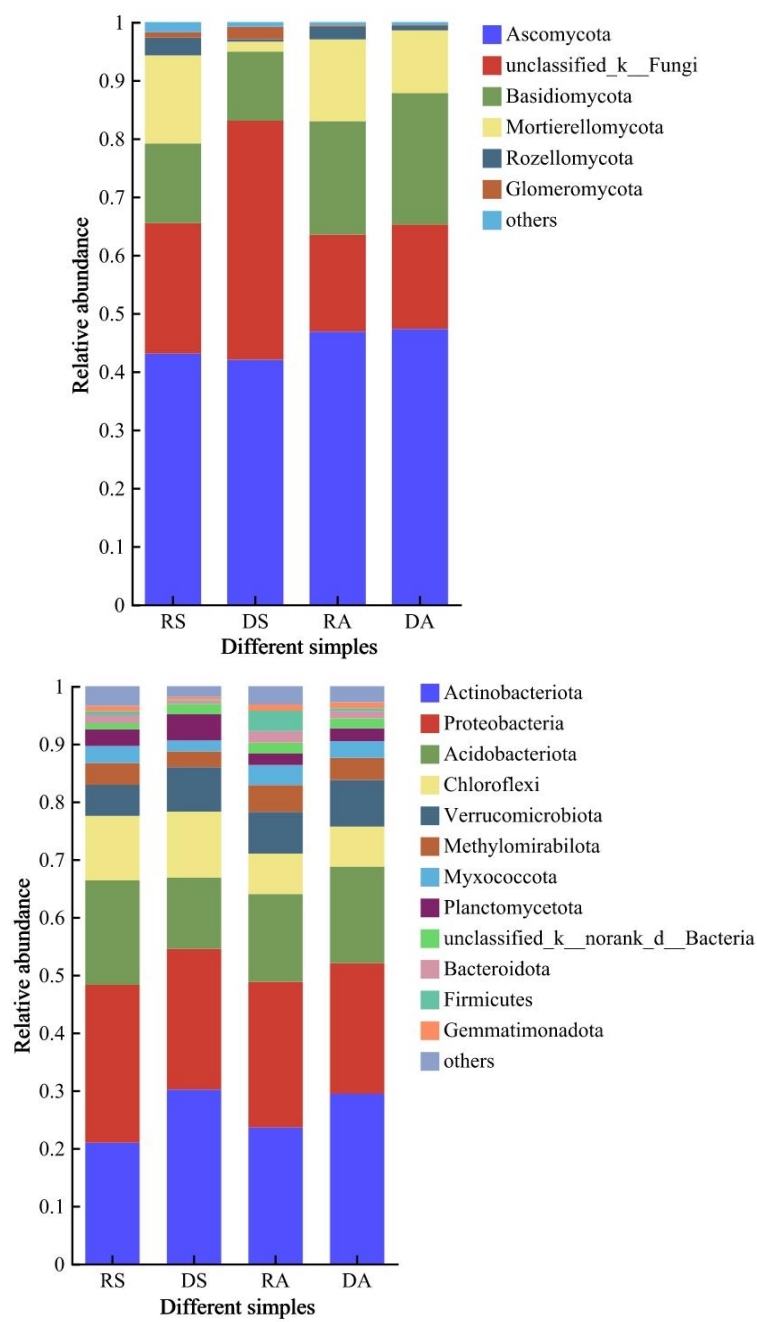
3. 2 不同恢复阶段土壤微生物群落季节动态变化

3. 2. 1 土壤微生物群落的相对丰度

对不同季节和不同恢复阶段下的土壤微生物群落丰度进行分析(图 3)。本研究在所有土样中共鉴定出真菌群落 15 门 53 纲 130 目 311 科 774 属，细菌群落 35 门 123 纲 291 目 452 科 803 属。

在真菌组成的门水平上(图 3a)，RS、DS、RA 和 DA 的 4 个最具优势菌群为 Ascomycota、Basidiomycota、unclassified_k__Fungi 和 Mortierellomycota，总和分别占 RS、DS、RA 和 DA 所有丰度的 94.26%、96.62%、97.01%和 98.55%。无论灌木林还是乔木林，旱季时 unclassified_k__Fungi 丰度高于雨季，而 Mortierellomycota 丰度则反之；旱、雨两季时 Ascomycota 和 Basidiomycota 丰度均为乔木林>灌木林。其中，DS 的 unclassified_k__Fungi 和 Mortierellomycota 丰度相比于 RS 和 DA 差异显著(P < 0.05)。在细菌组成的门水平上(图 3b)，RS、DS、RA 和 DA 的优势菌群为 Actinobacteriota(20.95%~30.16%)、Proteobacteria(22.62%~27.34%)和 Acidobacteriota(12.38%~18.09%)和 Chloroflexi(6.91%~11.42%)。在灌木林和乔木林中，旱季时 Actinobacteriota、Proteobacteria 和 Verrucomicrobiota 的丰度均高于雨季。

在真菌和细菌群落组成的属水平上(图 6c 和图 6d)，unclassified_k__Fungi 和 norank_f__Xanthobacteraceae 分别为 RS、DS、RA 和 DA 的第一优势真菌属和细菌属。在真菌群落中，相较于 RS 和 DA，DS 的 unclassified_k__Fungi 丰度最高(41.05%)，Morituerella 的丰度最低(1.6%)。而细菌群落各组间菌属差异不显著。由此可见，不同恢复阶段土壤真菌群落丰度比细菌群落对季节变化的响应更为积极。



(a)

(b)

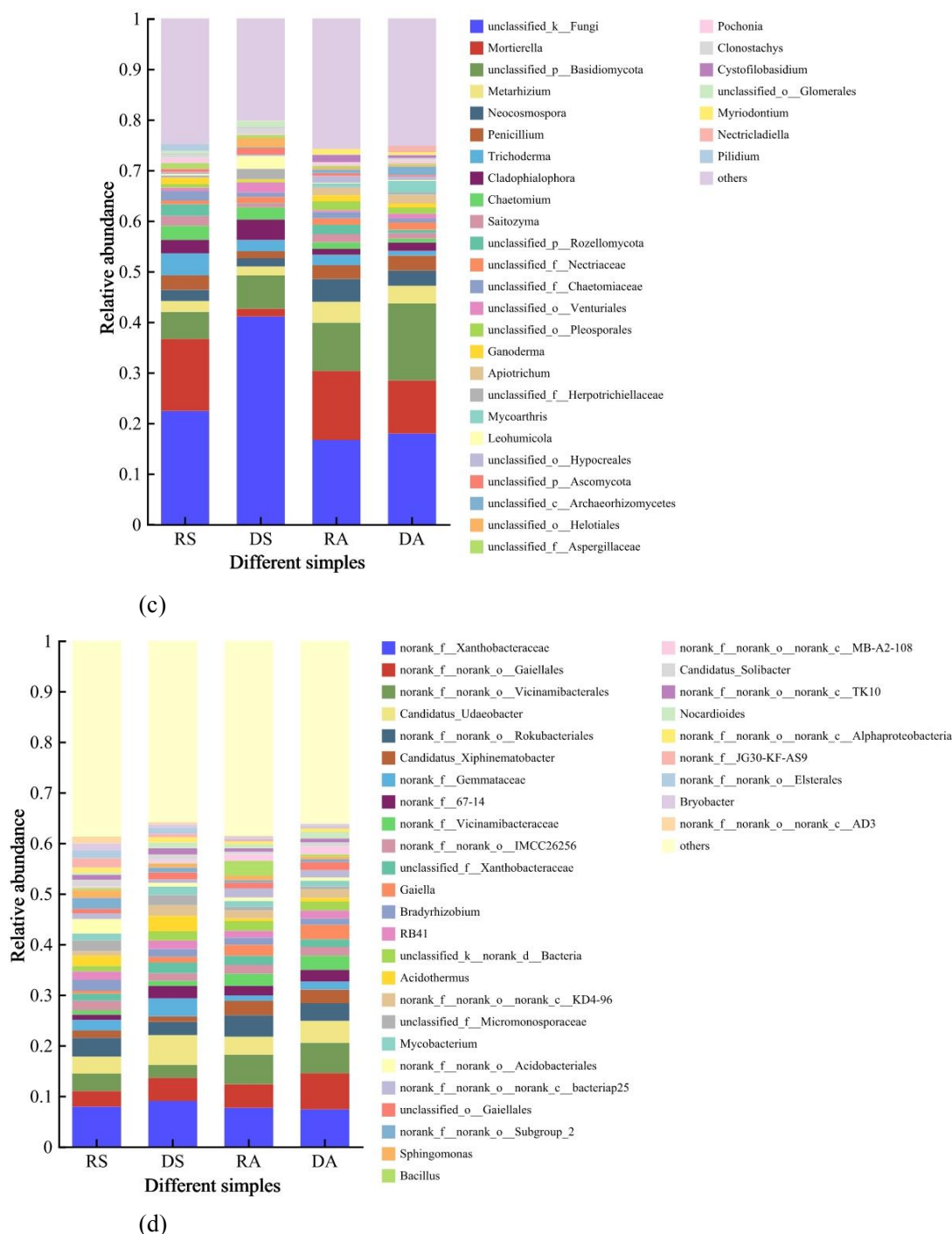


图3 微生物分类组成显示了门的微生物序列: (a)真菌, (b)细菌; 属: (c)真菌, (d)。分类丰度<1%的分类为“其他”

Fig.3 Microbial taxonomic compositions showing the microbial successions at phylum: (a) fungus, (b) bacteria; genus: (c) fungus, (d) bacteria level The taxonomic abundance <1% were classified into “others”

3.2.2 土壤微生物群落的物种差异

基于从门水平到种水平上的 LEfSe 分析, 结果如图 4 所示。RS、DS、RA 和 DA 四组间分别共有 41 个真菌和 26 个细菌相对丰度存在显著差异($LDA > 2.0$, $P < 0.05$)。RS 的主要差异真菌和细菌分别为 f_Chaetomiaceae 和 c_Acidobacteriales; DS 的主要差异真菌和细菌分别为 p_unclassified_k__Fungi、f_unclassified_k__Fungi、c_unclassified_k__Fungi、g_unclassified_k__Fungi 和 p_Actinobacteriota、c_Actinobacteria; RA 的主要差异真菌为 p_Mortierellomycota、g_Mortierella、f_Mortierellaceae、

c_Mortierellomycetes 和 o_Mortierellales, 主要差异细菌为 c_Gammaproteobacteria 之外的全部; DA 的主要差异真菌和细菌为 o_Hypocreales、f_Nectriaceae 和 o_Gaiellales。其中, DS 的差异真菌要显著多于 RS 和 DA, 而 DS 的差异细菌仅显著多于 DA; 相比于 RS、DS 和 DA, RA 的主要差异真菌和细菌最多, 且 RA 的差异真菌和细菌均显著多于 DA; 由此可见, 季节变化对不同恢复阶段土壤真菌群落的物种差异影响更为显著。

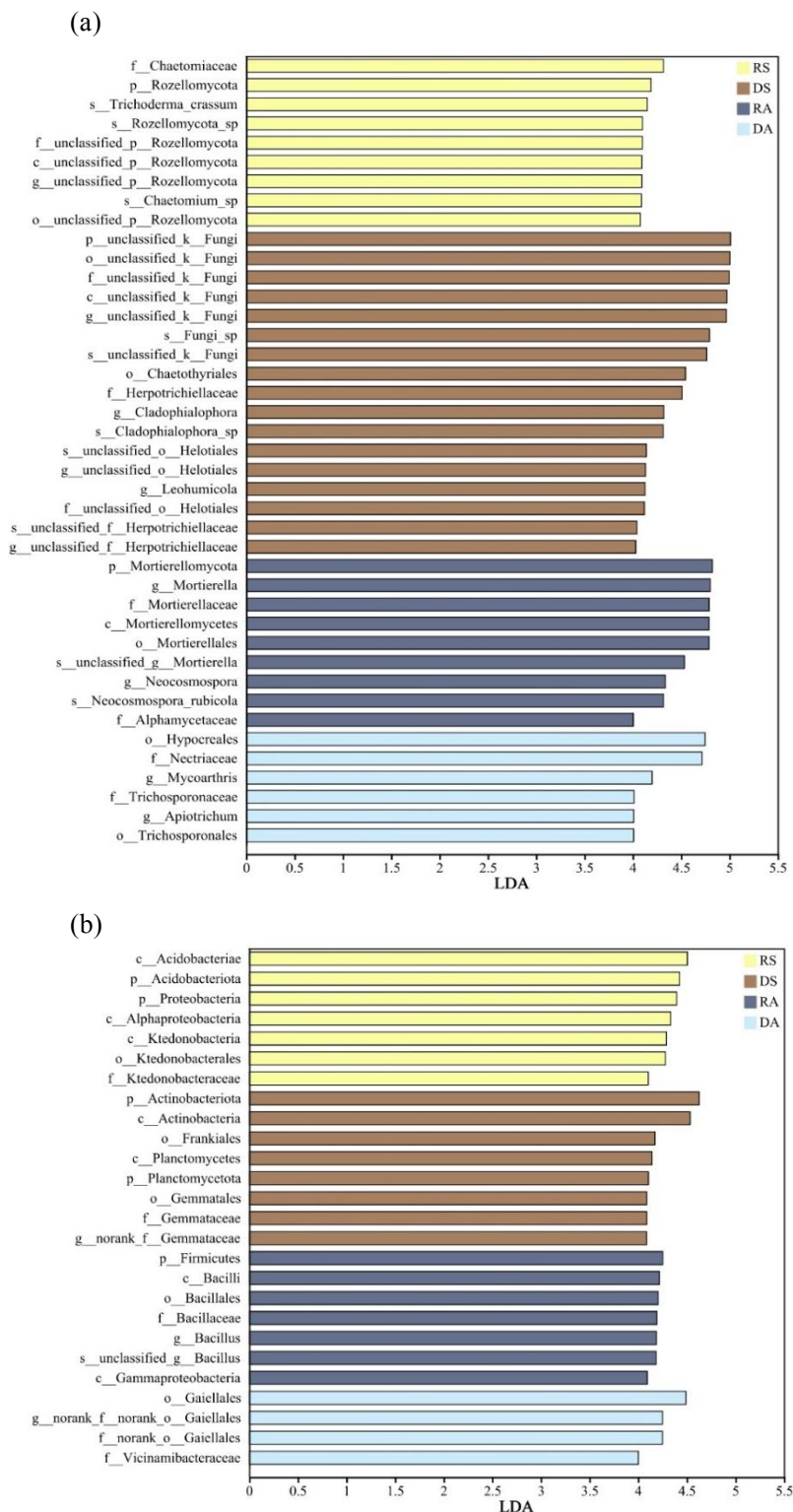


图4 土壤真菌(a)和细菌(b)群落从门到种水平的物种差异分析(LEfSe 分析)

Fig.4 Species difference analysis of soil fungal(a) and bacterial(b) communities from phylum to species level (LEfSe analysis)

3.3 不同恢复阶段土壤微生物群落多样性的季节变化

3.3.1 Alpha 多样性分析

在以 97%的序列鉴定进行修剪和过滤后，所有样本中共有 46631 个有效真菌序列和 19465 个有效细菌序列聚集成 786 个真菌 ASVs 和 2160 个细菌 ASVs。用 Chao1 指数衡量物种丰富度，Shannon 和 Simpson 指数衡量物种多样性(表 3)。Chao1 指数表明，细菌丰度在乔木林阶段受季节变化影响显著($P < 0.05$)，表现为旱季>雨季。但真菌丰富度在季节变化和恢复阶段变化过程中未观察到显著差异。Shannon 指数表明，无论旱季还是雨季，随着恢复阶段的不断演替，真菌和细菌的多样性都逐渐增加，但在旱季差异显著。此外，同一恢复阶段下，真菌多样性从雨季到旱季显著降低，细菌多样性从雨季到旱季显著增加。Simpson 指数进一步表明真菌群落比细菌群落更容易受到季节变化引起的降水和温度变化的影响。

表 3 不同恢复阶段櫟木群落土壤真菌和细菌群落多样性随旱季和雨季的变化

Table 3 Changes in Soil Fungal and Bacterial Communities Diversity of Different recovery stages of <i>Loropetalum chinensis</i> with Dry and Rainy Seasons					
林型	季节	Chao1 指数	Shannon 指数	Shannon 指数	
Forest type	Season	Chao1 index	Shannon index	Simpson index	
Fungi	Scrub forest	Rainy season	146.50±6.36Aa	3.28±0.03Aa	0.077±0.004Ab
		Dry season	130.38±3.00Aa	2.74±0.04Bb	0.173±0.005Aa
	Arboreal forest	Rainy season	155.56±17.77Aa	3.34±0.12Aa	0.065±0.006Ab
		Dry season	152.93±1.31Aa	3.02±0.05Ab	0.107±0.009Ba
Bacteria	Scrub forest	Rainy season	2125.08±108.47Aa	6.74±0.032Ab	0.0028±0.00052Aa
		Dry season	2378.37±199.91Aa	6.87±0.020Ba	0.0022±0.00050Aa
	Arboreal forest	Rainy season	2068.95±159.26Ab	6.75±0.003Ab	0.0032±0.00007Aa
		Dry season	2585.74±120.65Aa	7.05±0.049Aa	0.0018±0.00003Ab

注：每个值代表平均值±标准差。不同的大写字母表示同一季节不同恢复阶段之间的显著差异($p<0.05$)；在同一恢复阶段，不同季节的小写字母不同，差异有统计学意义($p<0.05$)。

Note: Each value represents the average ± standard deviation. Different capital letters indicate significant differences among different recovery stages in the same season ($p<0.05$); Different Minusculer indicate that there is a significant difference between different seasons in the same recovery phase ($p<0.05$).

3.3.2 Beta 多样性分析

为评估微生物 β 多样性，采用主坐标分析(PCoA)(图 5)和 NMDS 分析(图 6)方法对样本进行 ASV 水平聚类，使用 AMANOVA 进行组间差异检验，研究季节变化对喀斯特石山不同恢复阶段櫟木群落土壤真菌和细菌群落结构的总体差异。基于 Bray-Curtis 的 PCoA 研究发现，在土壤真菌群落(图 5a)和细菌群落(图 5b)中，RS 与 DS、RA 和 DA 在 PC1 轴方向上完全分离，DS 与 RS、RA 和 DA 在 PC1 轴方向上完全分离，而 RA 和 DA 重合度较大，说明灌木林土壤真菌群落和细菌群落受季节变化影响差异显著($P=0.001$)，而乔木林旱、雨季时土壤真菌和细菌群落相似性较高。此外，真菌群落($R=0.73$)<细菌群落($R=0.74$)，表明季节变化对不同恢复阶段土壤细菌群落结构组成差异性的影响更为显著。

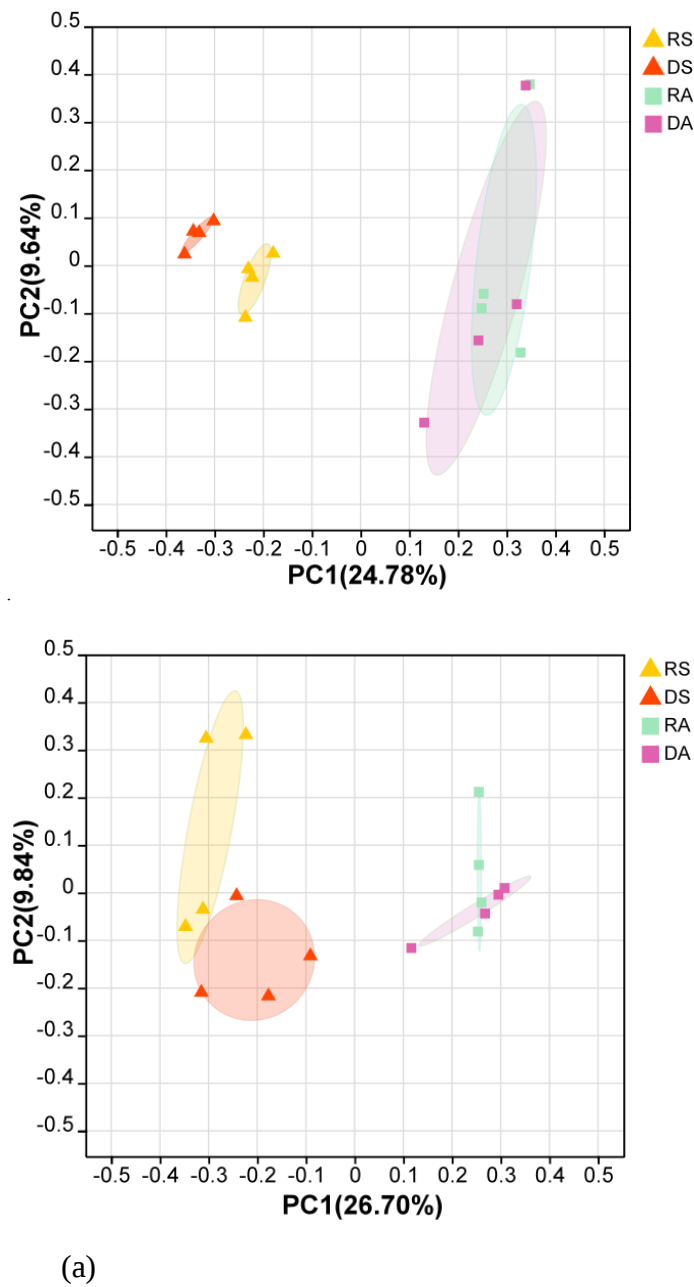


图 5 在旱季和雨季时土壤真菌群落(a)和细菌群落(b)的 PCoA 分析

Fig.5 The PCoA of soil fungal community (a) and bacterial community (b) depending on dry and rainy seasons

基于 Bray-Curtis 距离的 NMDS 分析显示，土壤真菌群落(图 6a)和细菌群落(图 6b) 的协强系数 Stress 分别为 0.082 和 0.063，说明拟合较好，且进一步表明土壤细菌群落的 β 多样性差异显著性更高。

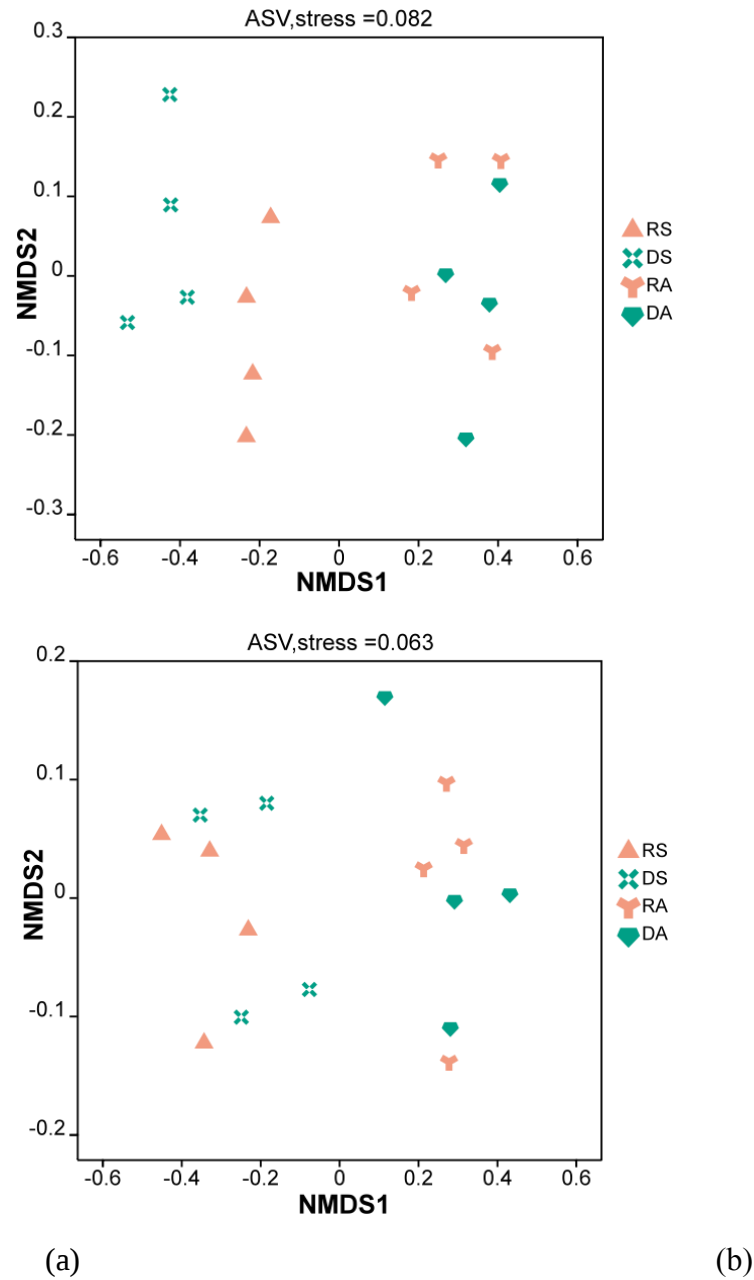


图 6 在旱季和雨季时土壤真菌群落(a)和细菌群落(b)的 NMDS 分析
Fig.6 The NMDS of soil fungal community (a) and bacterial community (b) depending on dry and rainy seasons

3.4 不同恢复阶段土壤微生物网络的季节变化

为了探究季节变化对不同恢复阶段土壤微生物群落间互作模式的影响,研究基于细菌和真菌纲水平(相对丰度>0.1%)之间的斯皮尔曼相关系数($P < 0.05$),分别在 RS、DS、RA 和 DA 中共构建了六组微生物网络(图 7)。真菌共生网络中(图 7a), RS 包含 41 个节点和 55 条边,其中正相关 54.55%,负相关 45.45%,平均聚类数为 0.662,平均度为 2.683,平均路径长度为 3.727(表 4); DS 包含 42 个节点和 89 条边,其中正相关 79.78%,负相关 20.22%,平均聚类数为 0.728,平均度为 4.238,平均路径长度为 2.163。表明相比雨季,旱季时期灌木林土壤真菌群落的网络复杂度增加,加强了真菌群落间的联系。同时观察可知,在乔木林中土壤真菌群落在旱季时期的网络复杂程度也强于雨季,表明随着恢复阶段的不断进行,土壤真菌群落间的

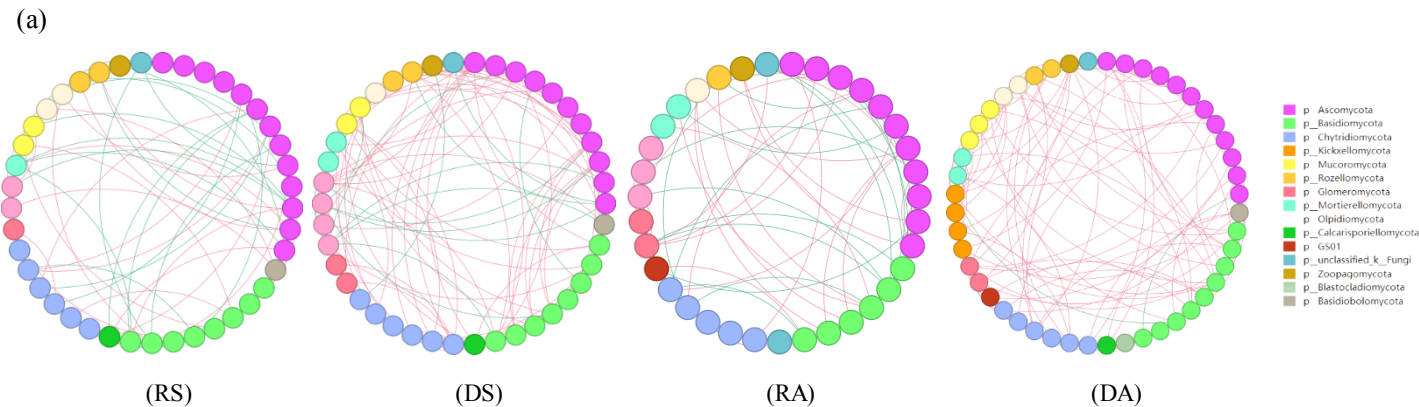
联系始终在旱季时期更加紧密。其次，相比于 RS，RA 的平均聚类数较高，而平均路径距离较短，表明 RS 真菌群落间响应速度快，易受外界环境的干扰，群落结构稳定性差。而旱季时乔木林真菌群落结构相对稳定。

细菌共生网络中(图 7b)，RS 包含 49 个节点和 117 条边，其中正相关 52.14%，负相关 47.86%，平均聚类数为 0.677，平均度为 4.776，平均路径长度为 4.337；DS 包含 45 个节点和 144 条边，其中正相关 56.94%，负相关 43.06%，平均聚类数为 0.567，平均度为 6.4，平均路径长度为 3.4。表明从雨季到旱季灌木林土壤细菌群落规模变小，但增强了群落间的密切程度，且使正相互作用的微生物增加。而在乔木林阶段，从雨季到旱季土壤细菌群落规模变大，且平均路径长度增加，使得细菌群落间联系减弱。此外，旱季时灌木林细菌群落结构的稳定性低于乔木林。

无论灌木林还是乔木林，从雨季到旱季过程中真菌和细菌各群落间的正相互作用增强，表明逐渐以共生关系为主导，竞争关系减弱，来适应干旱胁迫。且不同季节和不同恢复阶段作用下，土壤微生物网络差异明显,主要表现为真菌 GS01 仅在乔木林中参与群落间相互作用;细菌 Chloroflexi 在灌木林中占比最高，但在乔木林中则为 Acidobacteriota。

表 4 网络属性
Table 4 Network properties

	分组	点	边	平均度	平均聚类系数	平均路径长度	模块化
	Group	Node	Link	Average degree (avgK)	Average clustering coefficient (avgCC)	Average path distance (GD)	Modularity class
Fungi	RS	41	55	2.683	0.662	3.727	0.748
	DS	42	89	4.238	0.728	2.163	0.721
	RA	35	55	3.143	0.711	2.905	0.739
	DA	48	101	4.208	0.694	4.99	0.754
Bacteria	RS	49	117	4.776	0.677	4.337	0.594
	DS	45	144	6.4	0.567	3.4	0.533
	RA	47	116	4.936	0.589	4.296	0.614
	DA	50	107	4.28	0.486	5.102	0.615



(b)

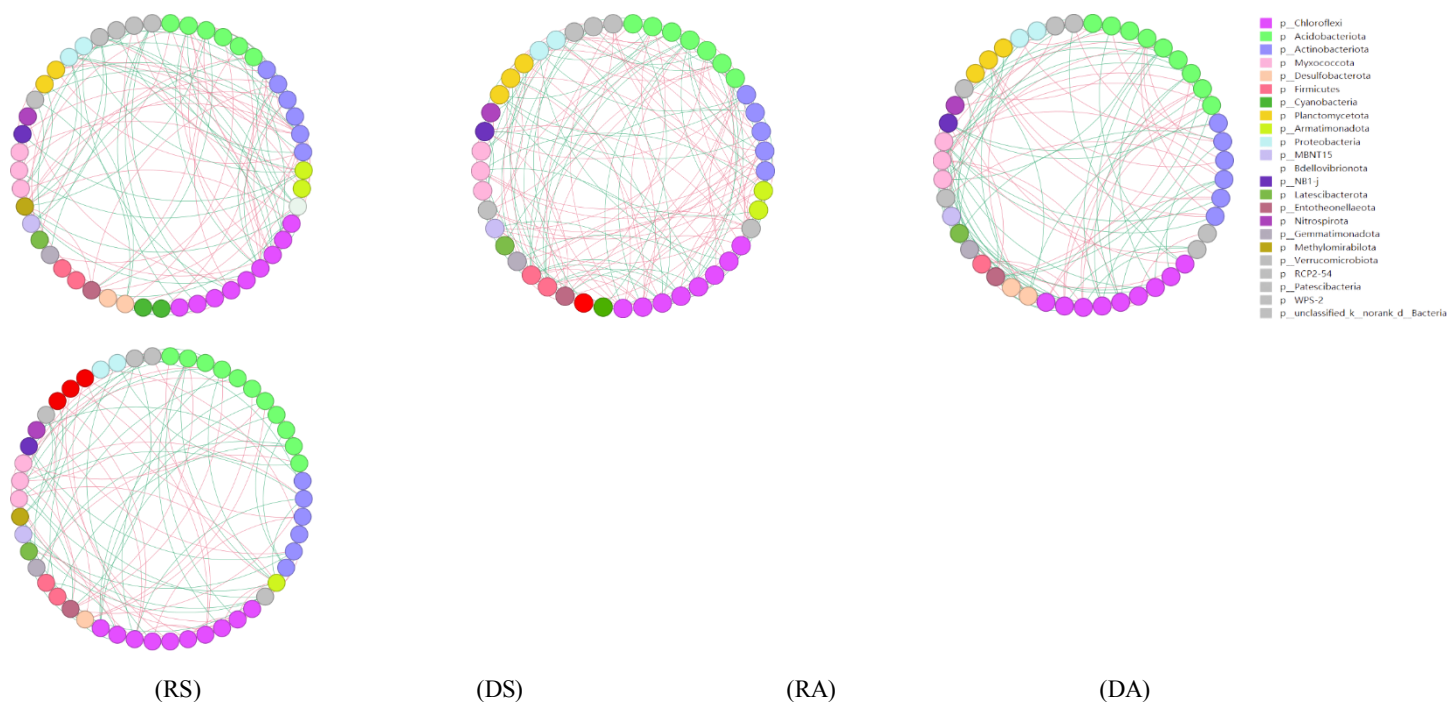


图 7 基于相关性分析的 4 类土壤真菌(a)和细菌(b)群落的共发生网络。网络中的节点按门着色。联系代表了强相关性(Spearman $\rho > 0.6$)和显著相关性($p < 0.05$)。边缘颜色表示正(红色)和负(绿色)相关性

Fig.7 occurrence network of fungal(a) and bacterial(b) communities across four species of the *Loropetalum chinense* soil based on correlation analysis. Nodes in the networks are colored by phylum. Connections represent strong (Spearman's $\rho > 0.6$) and significant ($p < 0.05$) correlations. The edge color represents positive (red) and negative (green) correlation

3.5 不同恢复阶段土壤微生物群落的季节性影响因子及相关性

如图 8 所示,采用 DCA 和 CCA 方法分析在季节变化下不同恢复阶段土壤主要化学性质、酶活性对微生物群落结构的影响,基于 ASV 水平进行 CCA 分析。DCA 的结果表明,真菌(梯度长度为 4.4614、2.8872、2.7184、2.0155)和细菌(梯度长度为 4.4614、2.8872、2.7184、2.0155)的轴的梯度长度都大于 3.5,因此,CCA 的单峰模型被认为是多元直接梯度分析的合适排序方法。真菌群落第一、第二排序轴的解釋率分别为 12.68% 和 8.3%,总解釋率为 20.98%,AK、pH、CEL、URE、TN、TC、CAT 和 SOM 在真菌群落构建过程中发挥关键作用(图 8a);细菌群落第一、第二排序轴的解釋率分别为 11.81%和 7.46%,总解釋率为 19.27%,SWC、pH、SOM、TC、TN、TP、AK 和 CEL 主要在细菌群落组成中起作用(图 8b)。AK、pH、CEL、TN、TC 和 SOM 对细菌和真菌群落的组成均有重要作用。

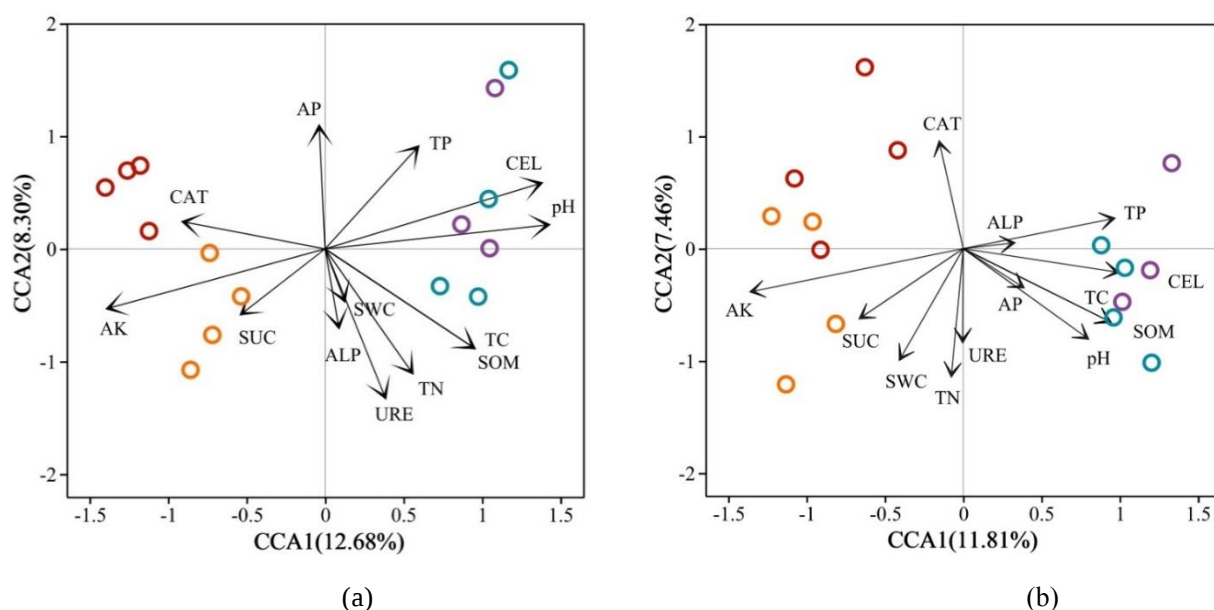


图 8 典型相关分析 (CCA) 显示在旱季和雨季期间, 灌木灌木林和乔木林中土壤真菌(a)和细菌(b)群落的 ASV 分布与环境因素之间的关系。红色代表旱季灌木土; 橙色代表雨季的灌木土; 蓝色代表雨季树木林的土壤; 紫色代表旱季树栖森林的土壤

Fig.8 Canonical Correlation analysis (CCA) shows the relationship between ASV distribution and environmental factors of soil fungal (a) and bacterial (b) communities in *Loropetalum chinense* shrub and arboreal forests during the dry and rainy seasons. Red represents dry season shrub soil; Orange represents the shrub soil during the rainy season; Blue represents the soil of the arboreal forest during the rainy season; Purple represents the soil of dry season arboreal forests.

通过计算环境因子与物种之间的皮尔森等级相关系数, 构建相关性网络图来更加明确雨季灌木林土壤 (RS)、旱季灌木林土壤(DS)、雨季乔木林土壤(RA)和旱季乔木林土壤(DA)的季节性影响因子, 如图 9 所示。驱动 RS 真菌群落发生变化的主要影响因子为 AK、URE, AK 与土壤真菌间的相互作用多为正相关, 而 URE 与土壤真菌间的相互作用多为负相关。DS 真菌群落变化的主要影响因子为 CEL(图 9a)。灌木林土壤真菌 Basidiomycota 和 Zoopagomycota 从雨季到旱季过程中受季节变化影响与环境因子作用增强, Basidiomycota 与 CEL、TC、SOM 和 Zoopagomycota 与 SUC、TN、URE 都呈负相关; Dothideomycetes 和 Ascomycota 与环境因子作用减弱; RA 真菌群落的主要影响因子为 SUC、URE, DA 真菌群落的主要影响因子为 pH、SWC, pH 与土壤真菌间的相互作用都为正相关, 而 SWC 与土壤真菌间的相互作用都为负相关(图 9b)。乔木林土壤真菌 GS10、Tremellomycetes 受季节变化影响与环境因子作用减弱, Calcarisporiellomyces 与环境因子作用增强, 与 TN 呈显著正相关。

相比之下, RS 细菌群落变化的关键因子为 CAT、SUC 和 SWC, SUC 与土壤细菌间的相互作用多均为负相关(图 9c); DS 细菌群落变化的关键因子为 AK、TN, 灌木林土壤细菌 Acidimicrobiia 和 norank_p_Desulfobacterota 受季节变化影响与环境因子作用增强, Acidimicrobiia 与 SOM、TC、CEL 和 TN 呈显著正相关, norank_p_Desulfobacterota 与 SOM、TC 和 CEL 呈显著正相关; RA 和 DA 细菌群落变化的关键因子为 pH、CAT 和 CAT、URE, 与土壤细菌间的相互作用多为正相关(图 9d)。乔木林土壤细菌群落受季节变化与环境因子的作用不显著。综上, 雨季时不论灌木林还是乔木林, URE 活性和 CAT 活性分别为调控土壤真菌群落变化和细菌群落变化的主要环境因子, 且乔木林中, 雨季和旱季土壤细菌群落变化都受 CAT 活性的显著影响。此外, RS、DS、RA 和 DA 的真菌群落和细菌群落变化的季节性影响因子差异明显。

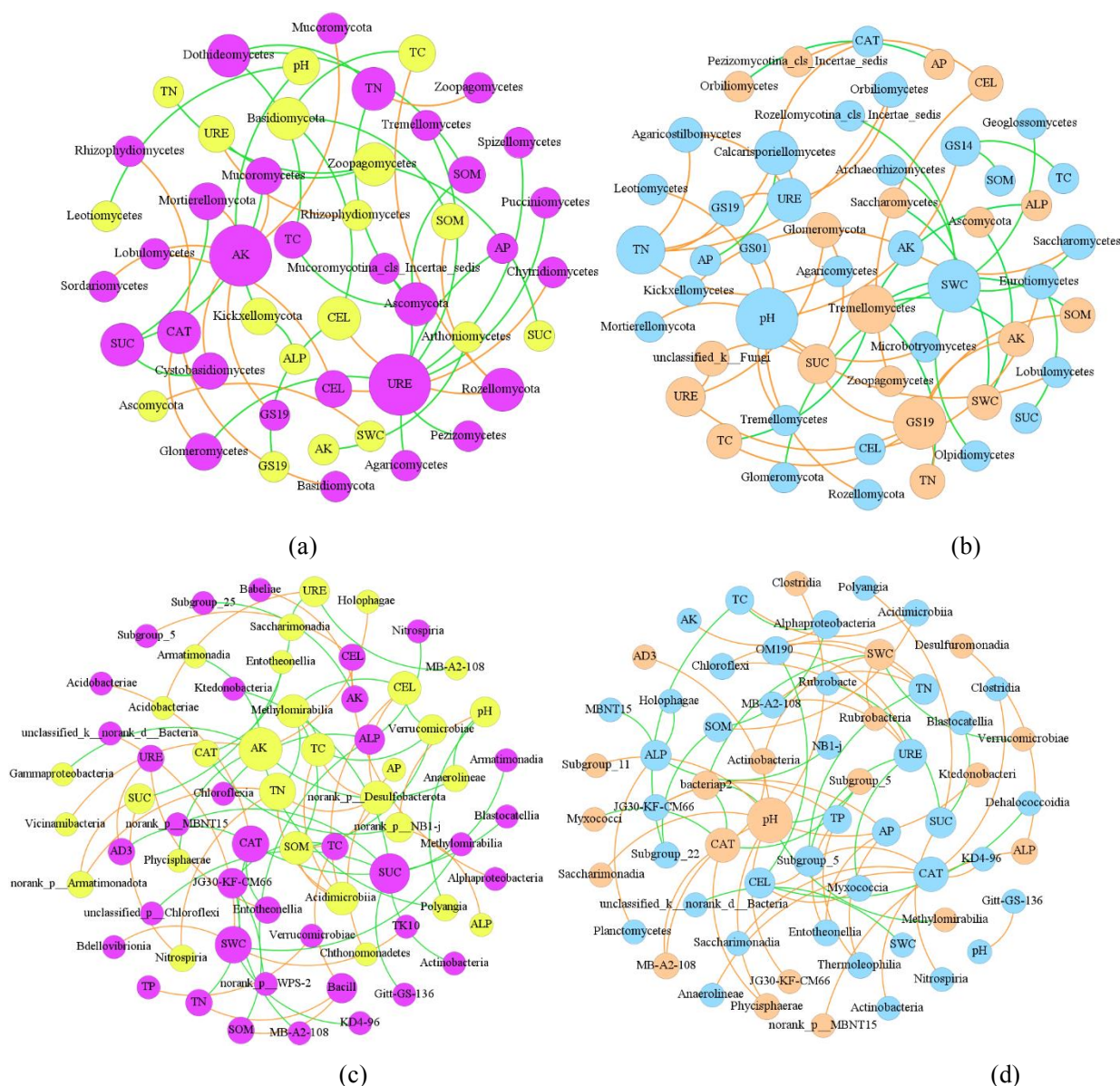


图9 土壤真菌(a)(b)和细菌(c)(d)群落(纲水平上)与环境因素的相关性。紫色代表在雨季灌木林土壤；黄色代表旱季灌木土壤；红色代表雨季乔木林土壤；蓝色代表旱季乔木林土壤。红线表示正相关，绿线表示负相关。

Fig.9 Correlation between soil fungal (a)(b) and bacterial (a)(b) communities (Class level) and environmental factors. Purple represents the soil of the shrub forest during the rainy season; Yellow represents the dry season shrub soil; Red represents the soil of the arboreal forest during the rainy season; Blue represents the soil of dry season arboreal forests. The red line indicates a positive correlation and the green line indicates a negative correlation.

4 讨论

4.1 季节变化对不同恢复阶段土壤微生物群落组成差异的影响

本研究结果证实，微生物的群落组成在 4 组样本间基本保持稳定，土壤优势真菌门为子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、被孢霉门(Mortierellomycota)和未被定义菌门(unclassified_k__Fungi)，这与 Ma et al.(2021)对榛属植物土壤微生物群落季节变化研究结果相似。子囊菌和担子菌为优势菌门是由于在土壤分解有机质的过程中起关键性作用，复杂有机质的降解和植物残体中木质纤维素的分解都离不开它们，但是相较于子囊菌门，担子菌门更适应贫瘠环境(He et al, 2022)。土壤优势细菌门为放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)。这与 Shen

et al.(2013)对长白山土壤菌群结构研究发现优势菌为变形菌门、酸杆菌门和放线菌门的研究结果一致。其中,变形菌门中包含着一种能够与植物产生共生作用的固氮细菌,能够增强土壤的固氮能力;酸杆菌门属于寡营养细菌门,可降解结构复杂的木质素与纤维素(Pankratov et al, 2011);绿弯菌门中的微生物主要为厌氧类细菌,可将糖和多糖发酵成有机酸和氢(Podosokorskaya et al, 2013),从而加快土壤中有机物料的分解与吸收。但土壤真菌和细菌群落物种丰度对季节变化的响应显著,并引起了各微生物群落组成的不同变化(图 3,图 4)。无论旱季还是雨季,乔木林土壤担子菌门和子囊菌门相对丰度高于灌木林,原因可能是乔木林凋落物良好的有机质条件,使得子囊菌门和担子菌门广泛存在。在灌木林和乔木林中,旱季时酸杆菌门和变形菌门的相对丰度均高于雨季。这是由于旱季胁迫使得土壤养分匮乏,需要增加细菌丰度来分解提供植物及自身生长所需的营养物质(Han et al, 2021a)。在属水平上,真菌群落相较于细菌群落对不同季节和不同恢复阶段的响应更为积极(图 3c,图 3d),且基于从门水平到种水平上的 LEfSe 分析,我们发现季节变化对不同恢复阶段土壤真菌群落的物种差异影响更为显著。由此可见,土壤真菌群落对季节变化的敏感性更强。这与 He et al.(2017)、陈湘淋(2022)等研究一致。

4.2 季节变化对不同恢复阶段土壤微生物群落多样性的影响

季节变化会影响微生物的多样性(Bossio et al, 1998; Keet et al, 2001; Mergel et al, 2001; Samaritani et al, 2017),主要通过温度和水分对微生物过程产生影响(Du et al, 2018)。通常情况下,同一栖息地的细菌丰富度高于真菌,本研究中细菌的多样性显著高于真菌(表 3),与前人的研究结果一致(Han et al, 2021b)。真菌和细菌多样性在不同季节之间存在显著差异,但真菌的显著差异性要强于细菌。原因可能是细菌的生命范围更广,经常在土壤环境中会形成生物膜(Kaisermann et al, 2015a)。因此,真菌比细菌群落更容易受到季节变化引起的降水和温度变化的影响。研究还发现,在相同恢复阶段下,从雨季到旱季,真菌多样性显著降低,而细菌多样性显著增加,说明真菌和细菌对环境变化的适应性不同(Fierer et al, 2003)。当前研究中真菌群落 Shannon 多样性的变化趋势与 Ren et al.(2018)相似,细菌多样性的改变趋势也与之之前的研究相似(Wenxu et al, 2021a)。土壤水分是土壤细菌和真菌所需的最基本条件,参与土壤细菌和真菌的各种代谢活动,较好的土壤水分条件可为细菌和真菌的生长繁殖提供更为优越的条件(陈秀波等, 2019)。雨季降水导致的土壤水分增加可能是真菌群落和细菌群落丰富度增加的原因之一(Chu et al, 2011)。旱季时期真菌群落多样性下降,这可能是由于干旱条件和有限的营养条件导致的(Smit et al, 2001)。先前研究表明,土壤呼吸和土壤温度的降低会导致微生物多样性降低(Högberg et al, 2001)。而在本研究中,细菌多样性在旱季相比雨季有所增加,这可能是由于喀斯特地形独特的水文二元结构,雨季降水过多使得土壤中细菌所需的养分淋失。同时,旱季时期降雨量显著减少,由于真菌比细菌更容易受到干旱胁迫的影响,所以真菌多样性明显减少(Kaisermann et al, 2015b)。细菌多样性增加且在灌木林阶段组间差异显著的另一个原因可能是人为干扰,增加了土壤中的有机质。另一个潜在解释是,植物对土壤养分的需求较少,细菌多样性和丰度将因可得养分增加而增加。

4.3 季节变化对不同恢复阶段土壤微生物网络的影响

利用微生物网络对不同季节和不同恢复阶段土壤微生物群落的相互作用关系进行分析,网络中存在的节点和边代表了网络的规模以及关系复杂程度。网络结构中微生物间正相关代表着互惠关系,而负相关则代表着竞争关系(Hernandez et al, 2021)。一个基本的生态学原理是复杂性导致稳定性,这表明生态稳定性与微生物网络的复杂性之间存在很强的相关性(Okuyama et al, 2008)。此外,相互作用增加可以

提高微生物之间物质交换的频率或效率,以及对外部压力的抵抗力(Faust et al, 2012),这可能有助于真菌和细菌抵抗季节变化带来的环境压力。本研究中,我们可以观察到季节变化和恢复阶段改变可以提高细菌和真菌的网络复杂性(表 4, 图 7)。相比于雨季,旱季时期灌木林和乔木林土壤真菌群落的网络复杂度增强,真菌群落间的联系更为密切。雨季灌木林土壤真菌群落比雨季乔木林响应速度快,但群落结构稳定性差。从雨季到旱季灌木林土壤细菌群落规模变小,但增强了群落间的密切程度,且使正相互作用的微生物增加,而乔木林则相反。此外,旱季时灌木林细菌群落结构的稳定性低于乔木林。一个有趣的现象是,复杂性的增加往往伴随着正边比、模块化和平均路径距离的减少,正边比率的减少意味着负相互作用的增加,如公认的负相互作用有捕食、竞争和寄生(Zhu et al, 2020)。此外,一些研究表明,微生物竞争相互作用可以增强微生物的稳定性(Banerjee et al, 2019)。研究发现,无论灌木林还是乔木林,旱季时土壤真菌和细菌各群落间的正相互作用强于雨季,表明旱季时土壤微生物群落以共生关系为主导,竞争关系减弱,来应对干旱胁迫。真菌群落间相互作用比细菌群落能更快响应季节变化。平均路径距离短意味着整合潜力大,而平均路径距离大则意味着网络内信息传输效率低。因此,较短的路径使得微生物群落更好地响应环境变化(Wanlin et al, 2023)。

4.4 季节变化对土壤微生物群落主要环境驱动因子及相关性的影响

土壤微生物群落结构与土壤养分代谢、土壤化学性质、土壤酶活性等生理生化过程密切相关(Xun et al, 2016)。前人研究表明 SWC 对土壤微生物的群落结构和代谢活力有重要影响(Wang et al, 2021),本研究中,经 CCA 分析(图 8)和相关性网络图分析(图 9)可知,SWC 分别为 DA 真菌群落和 RS 细菌群落的主要季节性影响因子之一。也有研究结果表明,土壤 pH 值对微生物的影响较大(Jiang et al, 2019),土壤 pH 值微小的变化均会对单细胞生物体施加压力,进而影响微生物的繁殖与代谢速率。pH 分别为 RA 真菌群落和 DA 细菌群落的主要季节性影响因子之一。其原因可能是乔木林土壤雨季到旱季 pH 值差异变化显著使微生物群落受到强烈影响。从雨季到旱季,土壤微生物群落与环境因子的相互作用增强,表现为灌木林土壤真菌 Basidiomycota 与 CEL、TC、SOM 都呈显著负相关,Zoopagomycota 与 SUC、TN、URE 也呈显著负相关;乔木林土壤真菌 Calcarisporiellomycetes 与 TN 呈显著正相关。灌木林土壤细菌 Acidimicrobiia 与 SOM、TC、CEL 和 TN 呈显著正相关,norank_p_Desulfobacterota 与 SOM、TC 和 CEL 呈显著正相关。季节变化改变土壤含水率,可以提高土壤 SUC、CEL 活性,进而调控土壤微生物的群落结构和相对丰度,改善土壤生态环境,提高土壤质量(Yang et al, 2021)。研究发现,驱动 RS、DS、RA 和 DA 的真菌群落发生变化的主要影响因子差异明显,分别对应为 AK、URE, CEL, SUC、URE, pH、SWC;同时,影响 RS、DS、RA 和 DA 的细菌群落发生变化的关键因子差异也明显,分别对应为 CAT、SUC 和 SWC, AK、TN, pH、CAT, CAT、URE。这与 Guo et al.(2019)、Liu et al.(2018)、Frossard et al.(2018)研究结果相似。影响土壤微生物群落的因素不只有土壤养分、不同恢复阶段、土壤水气热条件等环境因素,还有诸多环境因子与土壤微生物之间存在复杂的机制,有待进一步研究。

5 结论

利用 Illumina 高通量测序技术,通过研究季节变化对喀斯特石山不同恢复阶段櫟木群落土壤微生物群落的影响作用,有以下主要发现:

(1) 在不同季节和不同恢复阶段下,土壤优势真菌群均为子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、被孢霉门(Mortierellomycota)和未被定义菌门(unclassified_k__Fungi);优势细菌群为放线

菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)。LEfSe 分析表明季节变化对不同恢复阶段土壤真菌群落的物种差异影响更显著。

(2) Chao1 指数表明,细菌丰度在乔木林阶段受季节变化影响显著($P < 0.05$),表现为旱季 > 雨季。但真菌丰富度无显著差异。Shannon 指数表明,无论旱雨季,真菌和细菌的多样性均为灌木林 < 乔木林。同一恢复阶段下,从雨季到旱季,真菌多样性显著降低,细菌多样性显著增加。PCoA 和 NMDS 分析表明季节变化对不同恢复阶段土壤细菌群落的组间差异影响更显著。

(3) 微生物网络分析表明,季节变化改变了不同恢复阶段土壤真菌群落和细菌群落间的相互作用模式,从雨季到旱季,季节变化增加乔木林土壤真菌和细菌群落的网络规模和群落联系,减少了灌木林真菌和细菌群落的规模大小,但加强了群落间的协同合作。且不同季节和不同恢复阶段作用下,土壤微生物网络差异明显。不同恢复阶段土壤真菌群落对季节变化的敏感性强于细菌群落,但细菌群落的网络复杂性要强于真菌群落,群落结构更加稳定。

(4) 驱动雨季灌木林、旱季灌木林、雨季乔木林和旱季乔木林土壤真菌群落发生变化的主要影响因子差异明显,分别对应为 AK、URE, CEL, SUC、URE, pH、SWC; 影响雨季灌木林、旱季灌木林、雨季乔木林和旱季乔木林土壤细菌群落发生变化的关键因子差异也明显,分别对应为 CAT、SUC 和 SWC, AK、TN, pH、CAT, CAT、URE。

参考文献

- Zhu N, Wang J Q, Wang Y G, et al. 2022. Differences in geological conditions have reshaped the structure and diversity of microbial communities in oily soils[J]. *Environmental Pollution*, 306: 119-404.
- Kappler A, Bryce C, Mansor M, et al. 2021. An evolving view on biogeochemical cycling of iron[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 19(6): 360-374.
- Crowther T W, Hoogen J, Wan J, et al. 2019. The global soil community and its influence on biogeochemistry[J]. *Science*, 365(6455): 550.
- Koranda M, Kaiser C, Fuchslueger L, et al. 2013. Seasonal variation in functional properties of microbial communities in beech forest soil[J]. *Soil biology and biochemistry*, 60(100): 95-104.
- Gao Q, Yang Y F, Feng J J, et al. 2019. The spatial scale dependence of diazotrophic and bacterial community assembly in paddy soil[J]. *Global Ecology and Biogeography*, 28(8): 1093-1105.
- Jiang X W, Ma D L, Zang S Y, et al. 2021. Characteristics of soil bacterial and fungal community of typical forest in the Greater Khingan Mountains based on high-throughput sequencing[J]. *Microbiology China*, 48(4): 1093-1105.
- (姜雪薇, 马大龙, 臧淑英, 等. 2021. 高通量测序分析大兴安岭典型森林土壤细菌和真菌群落特征[J]. *微生物学通报*, 48(4): 1093-1105. [in Chinese])
- Chen Y L, Tang M R, Zhang H, et al. 2022. Differences in response of vegetation coverage and net primary productivity to SPEI drought index in karst areas of Guangxi[J]. *Journal of Arid Meteorology*, 40(06): 1042-1050.
- (陈燕丽, 唐梅蓉, 张会, 等. 2022. 广西喀斯特地区植被覆盖度和净初级生产力对 SPEI 干旱指数的响应差异[J]. *干旱气象*, 40(06): 1042-1050. [in Chinese])
- Wang J Q, Jiang J, Chi Y K, et al. 2023. Diversity and Community Structure of Typhlocybinae in the Typical Karst Rocky Ecosystem, Southwest China[J]. *Diversity*, 15(3).
- Wu F J, Liu N, Hu P L, et al. 2020. Soil carbon and nitrogen dynamics during vegetation restoration and their responses to extreme water-logging disasters in a typical karst depression[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 28(3): 429-437.
- Sonj A L, Thomas D, Johannes K, et al. 2020. Legacy effects of drought on nitrate leaching in a temperate mixed forest on karst[J]. *Journal of Environmental Management*, 262: 110338.

- Sheng L, Steffen B, Liangl X, et al, 2016. Seasonal changes in the soil moisture distribution around bare rock outcrops within a karst rocky desertification area (Fuyuan County, Yunnan Province, China)[J]. *Environmental Earth Sciences*, 75: 1482.
- Pan Y F, Zhou W H, Jiang Y, et al, 2023. Spatial distribution pattern and correlation analysis of dominant populations of *Cyclobalanopsis glauca* in karst rocky mountains of Guilin[J]. *Guihaia*, 43(03): 527-535.
- (盘远方, 卓文花, 姜勇, 等, 2023. 桂林岩溶石山青冈优势种群空间分布格局及关联分析[J]. *广西植物*, 43(03): 527-535.[in Chinese])
- Song J F, Jiang Z H, Wei X L, et al, 2022. Integrated transcriptomics and lipidomics investigation of the mechanism underlying the gastrointestinal mucosa damage of *Loropetalum chinense* (R.Br.) and its representative component[J]. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 114(114).
- Qin Y H, Ma J M, Mei J L, et al, 2017. Preliminary dynamics of litter decomposition in different recovery stages of *Loropetalum chinense* community in karst areas of the Lijiang River Basin[J]. *Acta Ecol Sin*, 37(20): 6792-6799.
- Cai W Q, Zhang D M, Zhang X, et al, 2023. Leaf color change and photosystem function evaluation under heat treatment revealed the stress resistance variation between *Loropetalum chinense* and *L. chinense* var. *rubrum*[J]. *PeerJ*, 11(11).
- Qian X, Gu J, Pan H J, et al. 2015. Effects of living mulches on the soil nutrient contents, enzymeactivities, and bacterial community diversities of apple orchard soils. *Eur. J. Soil Biol.* 70, 23–30.
- Qian X, Gu J, Sun W, et al. 2014. Changes in the soil nutrient levels, enzyme activities, microbial community function, and structure during apple orchard maturation. *Appl. Soil Ecol.* 77, 18–25.
- Guan S Y. 1986. *Soil Enzymes and Their Research Methods* [M]. Beijing: Agricultural Publishing House, 296-339.
- (关松荫.土壤酶及其研究法[M].北京:农业出版社, 1986.296-339.[in Chinese])
- Narendra K H K, Chandra M N, Rakshith D, et al. 2023.Multicomponent assessment and optimization of the cellulase activity by *Serratia marcescens* inhabiting decomposed leaf litter soil[J].*Sustainable Chemistry and Pharmacy*,31(31).
- Meng Y L, Wang L G, Zhou Z G, et al. 2005. Effect of the composite root population of wheat-cot-ton double cropping system on soil enzyme activity and soil nutrient content at the cotton rhizosphere and non-rhizosphere zones[J].*Sci Agric Sinica*,38:904-910.
- Yao Q M, Li Z, Song Y, et al. 2023. Community proteogenomics reveals the systemic impact of phosphorus availability on microbial functions in tropical soil[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2(3): 499-509.
- Gao Y, Yong S N, Wang J F. 2023. Effects of warming on soil enzyme activity in alpine swamp meadows of the Qinghai Tibet Plateau at different stages [J]. *Ecological Science*, 42 (01): 1-10.
- (高钰, 雍少宁, 王俊峰. 2023. 增温对青藏高原高寒沼泽草甸不同时期土壤酶活性的影响[J].*生态科学*,42(01):1-10.[in Chinese])
- Chen Y, Liu J, Liu S J P. et al, 2018. Effect of long-term mineral fertilizer application on soil enzyme activities and bacterial community composition. *Plant Soil Environ.*64, 571–577.
- Fan W, Tang Y, Qu Y, et al, 2014. Infant formula supplemented with low protein and high carbohydrate alters the intestinal microbiota in neonatal SD rats. *BMC Microbiol.*14:279.
- Mukherjee P K, Chandra J, Retuerto M, et al, 2014. Oral mycobiome analysis of HIV-infected patients: identification of *Pichia* as an antagonist of opportunistic fungi. *PLoS Pathog.*10:e1003996.
- Schloss P D, Gevers D, Westcott S L. 2011. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS One* 6:e27310.
- Wenxu M, Zhen Y, Lisong L, et al. 2021. Seasonal Changes in Soil Microbial Community and Co-Occurrence Network of Species of the Genus *Corylus*[J]. *Microorganisms*,9(11).
- He M Q, Zhao R L, Liu D M, et al. 2022. Species diversity of Basidiomycota[J].*Fungal Diversity*,114(1):281-325.
- Shen C C, Xiong J B, Zhang H Y, et al. 2013. Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain[J]. *Soil Biology and Biochemistry*,57:204-211.
- Pankratov T A, Ivanova A O, Dedysh S N, et al. 2011. Bacterial populations and environmental factors controlling cellulose degradation in an acidic Sphagnum peat[J].*Environmental Microbiology*,13(7):1800-1814.
- Podosokorskaya O A, Bonch-osmolovskaya E A, Novikov A A, et al. 2013. *Omatilinea apprima* gen. nov., sp.nov., a cellulolytic representative of the class *Anaerolineae*[J].*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,63(pt1):86-92.
- Han W, Wang G, Liu J, et al. 2021. Effects of vegetation type, season, and soil properties on soil microbial community in subtropical

forests. *Appl. Soil Ecol.*158.

He D, Shen W, Eberwein J, et al. 2017. Diversity and co-occurrence network of soil fungi are more responsive than those of bacteria to shifts in precipitation seasonality in a subtropical forest. *Soil Biol. Biochem.*115, 499–510.

Chen X L, Shen Y, Huang Y, et al. 2022. Responses of soil enzyme activities and microbial communities in camphor and *Pinus massoniana* plantations to dry and wet seasons [J]. *Journal of Central South University of Forestry and Technology*, 42 (07): 114-126. (陈湘淋, 沈燕, 黄怡等. 2022. 樟树和马尾松人工林土壤酶活性和微生物群落对干季和湿季的响应[J]. *中南林业科技大学学报*, 42(07):114-126.[in Chinese])

Bossio D A, Scow K M, Gunapala N, et al. 1998. Determinants of Soil Microbial Communities: Effects of Agricultural Management, Season, and Soil Type on Phospholipid Fatty Acid Profiles. *Microb. Ecol.*36, 1–12. 46.

Keet J H, Ellis A G, Hui C, et al. 2019. Strong spatial and temporal turnover of soil bacterial communities in South Africa's hyperdiverse fynbos biome. *Soil Biol. Biochem.*136.

Mergel A, Kloos K, Bothe H. 2001. Seasonal fluctuations in the population of denitrifying and N₂-fixing bacteria in an acid soil of a norway spruce forest. *Plant Soil*. 230, 145–160.

Samaritani E, Mitchell E A D, Rich J, et al. 2017. Soil bacterial communities and ecosystem functioning change more strongly with season than habitat in a restored floodplain. *Appl. Soil Ecol.*112, 71–78.

Du C, Xu C Y, Jian J S. et al. 2018. Seasonal dynamics of bacterial communities in a *Betula albosinensis* forest[J]. *European Journal of Soil Science*, 69(4):666-674.

Kaisermann A, Maron P A, Beaumelle L, et al. 2015. Fungal communities are more sensitive indicators to non-extreme soil moisture variations than bacterial communities. *Appl. Soil Ecol.*86, 158–164.

Fierer N, Schimel J P, Holden P A. 2003. Influence of drying-rewetting frequency on soil bacterial community structure. *Microb. Ecol.*45, 63–71.

Ren C, Chen J, Lu X, et al. 2018. Responses of soil total microbial biomass and community compositions to rainfall reductions. *Soil Biology and Biochemistry*, 116: 4-10.

Chen X B, Zhu D Q, Zhao C C, et al. 2019. Composition and diversity of soil fungal community in Korean pine forests of different forest types [J]. *Journal of Soil Science*, 56 (05): 1221-1234.

(陈秀波, 朱德全, 赵晨晨等. 2019. 不同林型红松林土壤真菌群落组成和多样性[J]. *土壤学报*, 56(05):1221-1234.[in Chinese])

Chu H, Neufeld J D, Walke V K, et al. 2011. The Influence of Vegetation Type on the Dominant Soil Bacteria, Archaea, and Fungi in a Low Arctic Tundra Landscape. *Soil Sci. Soc. Am. J.*75, 1756–1765.

Smit E, Leeflang P, Gommans S, et al. 2001. Diversity and Seasonal Fluctuations of the Dominant Members of the Bacterial Soil Community in a Wheat Field as Determined by Cultivation and Molecular Methods. *Appl. Environ. Microbiol.*67, 2284–2291.

Hernanaez D J, David A S, Menges E S, et al. 2021. Environmental stress destabilizes microbial networks[J]. *The ISME Journal*, (15):1722-1734.

Okuyama T, Holland J N. 2008. Network structural properties mediate the stability of mutualistic communities. *Ecol. Lett.*11, 208–216.

Faust K, Raes J. 2012. Microbial interactions: from networks to models. *Nat. Rev. Microbiol.*10, 538–550.

Zhu M, Jing Z, Zheng Q, et al. 2020. Microbial network succession along a current gradient in a bio-electrochemical system. *Bioresour. Technol.* 314, 123741.

Banerjee S, Walder F, Buchi L, et al. 2019. Agricultural intensification reduces microbial network complexity and the abundance of keystone taxa in roots. *ISME J.*13, 1722–1736.

Wanlin L, Yan X. 2023. Microplastics increase soil microbial network complexity and trigger diversity-driven community assembly[J]. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 333.

Xun W B, Zhao J, Xue C, et al. 2016. Significant alteration of soil bacterial communities and organic carbon decomposition by different long-term fertilization management conditions of extremely low-productivity arable soil in south China[J]. *Environmental Microbiology*, 18(6):1907–1917

Wang J Q, Shi X Z, Zhang C Y, et al. 2021. Different responses of soil bacterial and fungal communities to nitrogen deposition in a subtropical forest[J]. *Science of the Total Environment*, 755:142449-142478.

Jiang B, Adebayo A, Jia J L, et al. 2019. Impacts of heavy metals and soil properties at a Nigerian e-waste site on soil microbial

community[J]. *Journal of Hazardous Materials*,362:187-195.

Yang Y, Li T, Wang Y Q, et al. 2021. Negative effects of multiple global change factors on soil microbial diversity[J]. *Soil Biology and Biochemistry*,156:108229-108238.

Guo Q X, Yan L J, Korpelainen H, et al. 2019. Plant-plant interactions and N fertilization shape soil bacterial and fungal communities[J].*Soil Biology and Biochemistry*,128:127- 138.

Liu Y R, Delgado-Baquerizo M, Bi L, et al. 2018. Consistent responses of soil microbial taxonomic and functional attributes to mercury pollution across China[J].*Microbiome*,6(1).

Frossard A, Donhauser J, Mestrot A, et al. 2018. Long-and short-term effects of mercury pollution on the soil microbiome[J].*Soil Biology and Biochemistry*,120:191- 199.