

## 研究报告

攀西高原不同轮作制度下土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性与群落结构特征梁锦鹏<sup>1</sup>, 陈玉蓝<sup>1,2</sup>, 王勇<sup>2</sup>, 罗琳<sup>2</sup>, 雷善钰<sup>1</sup>, 杨沁閻<sup>1</sup>, 陈强<sup>1</sup>, 辜运富<sup>\*1</sup>

1 四川农业大学资源学院, 四川 成都 611134

2 四川省烟草公司凉山州公司, 四川 西昌 615050

梁锦鹏, 陈玉蓝, 王勇, 罗琳, 雷善钰, 杨沁閻, 陈强, 辜运富. 攀西高原不同轮作制度下土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性与群落结构特征[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 118-130.

LIANG Jinpeng, CHEN Yulan, WANG Yong, LUO Lin, LEI Shanyu, YANG Qinyan, CHEN Qiang, GU Yunfu. Effect of crop rotation system on diversity and community structure of soil microorganisms with *nifH* gene in Panxi Plateau, China[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 118-130.

**摘要:**【背景】关于高原生境轮作制度对土壤固氮微生物群落组成及多样性的影响研究尚少。

【目的】深入认识攀西高原不同轮作制度对农田土壤肥力及土壤固氮微生物 *nifH* 基因群落结构与多样性的影响, 以期建立合理的轮作制度。【方法】以凉山州冕宁县不同作物轮作制度[包括光叶紫花苕-烤烟(分轮作 15 年和 20 年两种, 分别为 G1 和 G2)、苦荞-烤烟(KQ)、大麦-烤烟(DM)和撂荒(CK)]的土壤为研究对象, 通过化学分析和 Illumina MiSeq 技术, 对土壤理化性质、土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性及群落组成进行分析。【结果】撂荒土壤全氮、铵态氮、硝态氮、有机碳和含水量最显著 ( $P<0.05$ )。KQ 轮作下土壤有效磷和速效钾分别提高了 43.0%和 2.60%, 而 DM 轮作下的土壤理化性质均下降。土壤固氮酶活以撂荒土壤最高, G2 轮作最低。土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性以 G1 轮作最高、G2 轮作最低, 门水平上以变形菌门(*Proteobacteria*)是优势共有 *nifH* 基因类群, 相对丰度占群落的 63.0%–92.4%; 属水平上, 偶氮氢单胞菌属(*Azohydromonas*)是不同轮作制度下的优势物种, 慢生根瘤属(*Bradyrhizobium*)是撂荒土壤中的优势物种。【结论】冗余分析发现, 土壤 pH 和含水量是驱动土壤固氮微生物 *nifH* 基因的群落组成的关键因子。本研究表明不同轮作制度可以明显改变土壤肥力状况和固氮微生物 *nifH* 基因群落组成, 其中以光叶紫花苕-烤烟轮作 15 年的影响最明显, 可以提高土壤养分含量, 增加土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性。

**关键词:** *nifH* 基因; 高通量测序; 多样性; 群落结构; 轮作制度

资助项目: 四川省烟草公司凉山州公司项目(SCYC202104)

This work was supported by the Liangshan Prefecture Project of Sichuan Tobacco Company (SCYC202104).

\*Corresponding author. E-mail: guyf@sicau.edu.cn

Received: 2022-04-23; Accepted: 2022-07-17; Published online: 2022-10-19

## Effect of crop rotation system on diversity and community structure of soil microorganisms with *nifH* gene in Panxi Plateau, China

LIANG Jinpeng<sup>1</sup>, CHEN Yulan<sup>1,2</sup>, WANG Yong<sup>2</sup>, LUO Lin<sup>2</sup>, LEI Shanyu<sup>1</sup>, YANG Qinyan<sup>1</sup>, CHEN Qiang<sup>1</sup>, GU Yunfu<sup>\*1</sup>

1 College of Resources, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611134, Sichuan, China

2 Sichuan Tobacco Company Liangshan Prefecture Company, Xichang 615050, Sichuan, China

**Abstract:** [Background] A few studies of the effect of rotation system on the community structure and diversity of soil nitrogen-fixing microorganisms on plateau are available. [Objective] To clarify the effect of rotation system on farmland soil fertility and diversity and community structure of soil microorganisms with *nifH* gene on Panxi Plateau and screen a reasonable rotation system. [Methods] Soil samples were collected from five crop rotation systems: 15-year *Vicia villosa* Roth-flue-cured tobacco rotation (G1), 20-year *V. villosa*-flue-cured tobacco rotation (G2), tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*)-flue-cured tobacco rotation (KQ), barley (*Hordeum vulgare* L.)-flue-cured tobacco rotation (DM), and abandoned soil (CK) in Mianning county, Liangshan prefecture. Through chemical analysis and high-throughput sequencing of *nifH*, soil physico-chemical properties and community structure and diversity of soil nitrogen-fixing microorganisms were analyzed. [Results] The total nitrogen content, ammonium nitrogen content, nitrate nitrogen content, organic carbon content, and water content were the highest in the CK ( $P<0.05$ ) and the pH value was below 7 in all rotation systems. Under KQ, content of soil available phosphorus and available potassium was 43.0% and 2.60% higher, respectively. Soil physico-chemical parameters were lower under DM rotation than in CK. Soil nitrogenase activity was highest in CK and lowest under G2. The diversity of nitrogen-fixing microorganisms was the highest under G1 and lowest under G2. At the phylum level, the relative abundance of *Proteobacteria* was the highest, accounting for 63.0%–92.4% of the total abundance. At genus level, *Azohydromonas* dominated the soils under crop rotation and *Bradyrhizobium* was most abundant in CK. Redundancy analysis revealed that soil pH and water content were the key factors driving the composition of soil nitrogen-fixing microorganisms. [Conclusion] Rotation systems obviously changed the soil fertility and the composition of *nifH* gene community, particularly the G1 which improved soil nutrient content and diversity of soil nitrogen-fixing microorganisms.

**Keywords:** *nifH* gene; high-throughput sequencing; diversity; community structure; crop rotation systems

作物轮作能够改善土壤理化性质，维持土壤氮素的良性循环及土壤肥力，增强土壤微生物群落结构稳定性，不同轮作制度对群落结构

的影响也不同<sup>[1]</sup>。固氮微生物作为农业生态系统中氮素的重要来源之一，能够对作物轮作产生正向响应<sup>[2]</sup>。因此，合适的轮作制度对土壤

固氮微生物群落结构稳定性具有重要意义。合理的轮作制度不仅能改变土壤环境、增加土壤养分积累,为作物生长创造有利的条件,而且影响土壤固氮微生物的活性和群落结构等<sup>[3]</sup>。刘会芳等<sup>[4]</sup>研究发现,轮作茄子和大白菜土壤中硝化细菌的丰度显著提高,有利于土壤中氮素代谢和利用,而轮作模式还会影响其代谢产物,促进土壤固氮菌的繁殖<sup>[5]</sup>。蔡树美等<sup>[6]</sup>选择连续4年进行水稻-紫云英轮作的上海滩涂盐碱地块,分析不同轮作方式下土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性变化,发现水稻-紫云英轮作的土壤固氮菌丰富度指数高于水稻-休闲。陈春兰等<sup>[7]</sup>以水稻土壤为样本,发现其能显著提高固氮基因 *nifH* 和氨氧化基因 *amoA* 拷贝数( $P<0.05$ )。

现有研究主要集中于低海拔区域,而关于高原生境轮作制度对土壤固氮微生物群落组成及多样性的影响研究不多<sup>[8-9]</sup>。四川攀西高原属亚热带季风气候,具有日照充足、雨量充沛、立体差异明显等特点,具有独特的农业生产条件,作物轮作制度普及<sup>[10]</sup>。但目前该区域作物轮作对土壤固氮微生物的影响缺乏深入系统的研究,制约了对区域农田轮作制度的优化及农田土壤保护和可持续利用。本研究以四川省凉山彝族自治州冕宁县5种不同作物轮作制度下的土壤为研究对象,分析不同轮作下的土壤理化性质差异,并采用高通量测序技术分析土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性与群落组成,以期深入认识不同作物轮作对土壤元素循环的影响,揭示高原生境不同作物轮作对土壤肥力及土壤 *nifH* 基因固氮微生物群落的影响,为改善区域农田土壤生态环境提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 采样地概况

研究区域为四川省凉山彝族自治州冕宁

县回坪乡大石板村(101°38′-102°25′E, 28°05′-29°02′N)。位于安宁河流域西北面,县境东部。前茬作物为烤烟。县内以山地地貌为主,地势北高南低,平均海拔为1800 m,平均起伏度为20 m;年降水为834 mm,年均气温为8.11℃;气温则随海拔的升高而递减,南部高于北部,西部高于东部。冕宁气温全年比较温和,年平均气温10-22℃。多年平均降雨量约1100 mm,属典型亚热带季风气候,因其独特的气候优势,是国内少有的烤烟生态最适宜区<sup>[11]</sup>。

### 1.2 供试材料与试验处理

供试大麦品种为隆大麦1号,苦荞品种为川荞1号,光叶紫花苕种子市售,烤烟品种为云烟87。试验始于2000年,共设置5个轮作制度,分别为对照组(CK)、大麦-烤烟轮作(DM)、苦荞-烤烟轮作(KQ)、光叶紫花苕1-烤烟轮作(G1)、光叶紫花苕2-烤烟轮作(G2),具体见表1,土壤类型为冲积土,试验田原初土壤的pH值为6.05,有机碳为6.24 g/kg,全氮1.40 g/kg,碱解氮90.21 mg/kg,有效磷35.70 mg/kg,速效钾198.01 mg/kg,含水量为16.11%。

### 1.3 土壤样品采集

于2021年3月14日采集CK、DM、KQ、G1和G2这5种不同轮作制度休闲期的农田非根际土壤,G1和G2处理中的光叶紫花苕在2020年9月初进行翻压。同一区域中,采样点间隔至少2 m,采样区面积为4 m×5 m,每个处理3个重复,按五点采样法采集表层0-20 cm土壤,除去根、砾石等杂质,混匀后装入无菌样品袋中,将土壤样品分为两部分:一部分带回实验室风干并磨碎后通过20目筛,以供土壤理化性质分析;另一部分立刻置于液氮罐中保存,用于土壤总DNA的提取。

### 1.4 主要试剂和仪器

FastDNA<sup>®</sup> Spin Kit for Soil, MP Biomedicals公司;PCR试剂、琼脂糖、通用引物ITS1和

表 1 试验设计

Table 1 Experiment design		
样品代号	轮作制度	种植制度简介
Sample codes	Crop rotation systems	Details of the rotation systems
CK	撂荒	无施肥
	Abandonment	No fertilization
DM	大麦-烤烟	农家肥 6.42 t/hm <sup>2</sup> , 复合肥 675 kg/hm <sup>2</sup> , 硝酸钾 225 kg/hm <sup>2</sup>
	Barley-flue-cured tobacco	Farm manure 6.42 t/hm <sup>2</sup> , compound fertilizer 675 kg/hm <sup>2</sup> , potassium nitrate 225 kg/hm <sup>2</sup>
KQ	苦荞-烤烟	农家肥 6.42 t/hm <sup>2</sup> , 复合肥 675 kg/hm <sup>2</sup> , 硝酸钾 225 kg/hm <sup>2</sup>
	Tartary buckwheat-flue-cured tobacco	Farm manure 6.42 t/hm <sup>2</sup> , compound fertilizer 675 kg/hm <sup>2</sup> , potassium nitrate 225 kg/hm <sup>2</sup>
G1	光叶紫花苕 1-烤烟	2000–2005 年为油菜和烤烟轮作, 2006 年起为光叶紫花苕 1-烤烟轮作。
	<i>Vicia villosa</i> 1-flue-cured tobacco	农家肥 6.42 t/hm <sup>2</sup> , 复合肥 675 kg/hm <sup>2</sup> , 硝酸钾 225 kg/hm <sup>2</sup> From 2000 to 2005, it was the rotation of rape and flue-cured tobacco, and from 2006, it was the rotation of <i>Vicia villosa</i> 1-flue-cured tobacco, farm manure 6.42 t/hm <sup>2</sup> , compound fertilizer 675 kg/hm <sup>2</sup> , potassium nitrate 225 kg/hm <sup>2</sup>
G2	光叶紫花苕 2-烤烟	农家肥 6.42 t/hm <sup>2</sup> , 复合肥 675 kg/hm <sup>2</sup> , 硝酸钾 225 kg/hm <sup>2</sup>
	<i>Vicia villosa</i> 2-flue-cured tobacco	Farm manure 6.42 t/hm <sup>2</sup> , compound fertilizer 675 kg/hm <sup>2</sup> , potassium nitrate 225 kg/hm <sup>2</sup>

农家肥主要成分为猪厩肥, 有机质含量 33.2 g/kg, 复合肥养分含量为 N:P:K=10:15:25, 施肥量仅为烤烟季施肥量  
The farmyard manure was mainly composed of pig manure with 33.2 g/kg organic matter content, the ratio of the N:P:K nutrient in the inorganic compound fertilizer was 10:15:25, the amount of fertilization is only the amount of fertilization in flue-cured tobacco season.

ITS4, 北京擎科生物科技有限公司; 乙炔、乙烯, 成都恒源气体有限公司。

恒温培养箱, 三洋电器股份有限公司; 台式离心机, Eppendorf 股份公司; 气相色谱仪, Phenomenex 公司; 血清瓶, 蜀牛玻璃仪器有限公司; 液氮罐, 四川中活低温设备有限公司。

1.5 固氮酶活性测定

固氮酶活性采用乙炔还原法进行测定<sup>[12]</sup>, 利用固氮酶将乙炔(C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>)还原为乙烯(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)的能力, 进而确定了固氮酶活性。取干重 15 g 新鲜土壤于 100 mL 血清瓶中, 橡皮塞密封, 抽出瓶中 10 mL 空气替换为等体积的乙炔气体, 置于恒温培养箱中, 28 ℃避光保温 2 d, 瓶中乙烯含量通过气相色谱仪测定, 用气相色谱法进行检测。固氮酶活性表示为每克干土每小时孵育时间产生的 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> nmol 量<sup>[13]</sup>。

1.6 总 DNA 提取及 *nifH* 基因高通量测序

称取 0.5 g 土壤样品, 参照试剂盒操作说明提取土壤总 DNA, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, -20 ℃保存。使用针对土壤游离型固氮微生物的特异性引物对 *nifH*-F (5'-AAAGGYGGWAT CGGYAARTCCACCAC-3')与 *nifH*-R (5'-TTGT TSGCSGCRATCATSGCCATCAT-3')对 *nifH* 基因片段进行扩增<sup>[14]</sup>。PCR 反应体系(25 μL): 2×*Taq* Master Mix 12.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL, DNA 模板 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。PCR 反应条件: 94 ℃ 4 min; 94 ℃ 45 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 40 s, 35 个循环; 72 ℃ 10 min; 4 ℃ 条件下结束。以 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 样品送至上海派森诺生物科技股份有限公司, 运用 Illumina MiSeq 测序平台进行测序。

在测序平台得到数据后, 通过 NCBI 数据



库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行比对, 利用 QIIME 1.9.0 软件计算 Chao1、Shannon-Wiener、Simpson、Pielou 指数和土壤固氮微生物 *nifH* 基因群落组成与结构。使用 CANOCO 5.0 软件进行非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS)及冗余分析(redundancy analysis, RDA)。

### 1.7 数据处理

基础数据运用 Excel 2019 进行计算。通过 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA)。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤理化性质及其与土壤固氮酶活间的相关性

不同作物轮作制度下土壤的理化性质见表 2。

利用 SPSS 26.0 对 5 种轮作土壤的理化性质进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。由原初土壤理化性质和 20 年后土壤理化性质可知(表 2), 20 年后土壤总体理化性质差异不大, 轮作后有机碳含量总体升高。5 种植物轮作后土壤均为酸性。G1、G2 轮作的 pH 值分别显著高于 CK、DM 和 KQ 轮作( $P<0.05$ ), 不同轮作制度土壤 pH 均有所降低。撂荒的全氮含量均显著高于 DM、G1、G2 和 KQ 轮作( $P<0.05$ )。撂荒的有机碳、含水量、碱解氮、硝态氮和铵态氮均显著高于其他轮作制度( $P<0.05$ )。KQ 轮作的速效钾均显著高于其他轮作制度( $P<0.05$ ), 为 200 mg/kg, G1 轮作最低。

由表 2 可知, 固氮酶活性变化范围为 3 126–6 032 nmol/(g·h), 表现出不同轮作制度下作物对固氮酶活性的影响。相关性分析表明, 固氮酶活性与土壤有机碳、全氮、有效磷的皮尔森相关系数分别为 0.867、0.694、-0.736

( $P<0.01$ ), 与含水量、碱解氮相关系数分别为 0.581、0.631 ( $P<0.05$ ), 与 pH、速效钾、铵态氮和硝态氮相关系数分别为 0.133、0.489、-0.087、0.157。可见固氮酶活性与土壤有机碳、含水量、碱解氮和全氮呈极显著正相关( $P<0.01$ ), 与有效磷呈极显著负相关( $P<0.01$ ), 与 pH、速效钾、硝态氮呈正相关, 与铵态氮呈负相关。

### 2.2 土壤固氮微生物 *nifH* 基因测序结果及 $\alpha$ 多样性指数分析

五种轮作制度土壤样品 CK、DM、G1、G2 和 KQ 轮作特有的 OTU 分别为 2 436、2 292、3 119、643 和 942 个, 5 种模式共有的 OTU 为 269 个。本研究采用 Chao1 指数、Shannon-Wiener 多样性指数、Pielou 均匀度指数对土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性进行分析。表 3 反映不同轮作制度下土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性指数。G1 轮作土壤 Chao1 指数与 Shannon-Wiener 指数最大, 显著高于 CK 轮作( $P<0.05$ ), 土壤固氮微生物 *nifH* 基因的群落组成复杂。关于 Pielou 指数, DM 轮作土壤固氮微生物 *nifH* 基因的群落均匀度最高, G2 轮作最低。

### 2.3 土壤固氮微生物 *nifH* 基因的群落组成与结构分析

由图 1 可知, 共检测到 9 个门的细菌, 分别为变形菌门(*Proteobacteria*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、绿菌门(*Chlorobi*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、广古菌门(*Euryarchaeota*)和螺旋体门(*Spirochaetes*)。

在 5 个轮作土壤中优势类群均是变形菌门(*Proteobacteria*), 其次是蓝藻门(*Cyanobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)。变形菌门相对丰度分别为 CK 处理 82.9%、DM 轮作 83.7%、G2

表 2 凉山州冕宁县 2021 年不同作物轮作下的土壤理化性质  
Table 2 Physico-chemical properties of soil under different rotation systems from Mianning county, Xichang City, China in 2021

样品代号 Sample codes	pH	有机碳 SOC (g/kg)	全氮 TN (g/kg)	碱解氮 AN (mg/kg)	硝态氮 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/kg)	铵态氮 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/kg)	有效磷 AP (mg/kg)	速效钾 AK (mg/kg)	含水量 MO (%)	固氮酶活 Nitrogenase activity (nmol/(g·h))
CK	5.50±0.23b	9.28±2.38a	2.70±0.34a	96.40±2.03a	22.5±0.94a	62.41±0.144a	38.83±1.39d	195.34±8.02b	16.35±1.33a	6 032±9.30a
DM	4.90±0.08c	8.36±2.18b	1.80±0.17b	87.31±15.70b	14.5±1.24b	58.6±0.98b	52.42±23.50b	173.17±38.90c	12.03±1.44b	3 126±3.53d
G1	6.00±0.04a	8.00±0.09d	0.70±0.19d	71.92±42.20d	5.09±1.16c	15.46±0.85d	48.55±16.70b	159.74±62.30d	3.20±0.38d	4 819±6.43c
G2	6.00±0.08a	7.60±0.24e	0.30±0.03e	68.14±48.90e	1.52±0.06d	10.3±0.45e	42.64±6.68c	148.64±80.70e	4.40±0.10c	4 987±2.41e
KQ	4.80±0.03c	7.89±0.88c	1.40±0.16c	84.52±20.40c	11.3±0.53b	42.87±1.14c	55.58±28.90a	200.80±11.80a	12.62±0.54b	4 891±8.57b

表中数字为平均值±标准误，数字后不同小写字母表示同一指标在不同处理间达到显著性差异( $P<0.05$ )。CK、DM、G1、G2、KQ 分别代表撂荒、大麦、光叶紫花苜(轮作 15 年)、光叶紫花苜(轮作 20 年)、苦荞  
The numbers in the table are the mean value±standard error, different lowercase letters after the numbers indicate that the same index has significant differences among different treatments ( $P<0.05$ ). The abbreviation CK, DM, G1, G2 and KQ represent abandonment, barley, *Vicia villosa* (15 years rotation), *Vicia villosa* (20 years rotation) and Tartary buckwheat, respectively.

表 3 攀西高原不同轮作制度下土壤固氮微生物 *nifH* 基因的多样性指数

Table 3 Diversity index of the nitrogen-fixing microorganisms *nifH* gene communities under different rotation systems in Panxi Plateau

样品编号 Sample code	Chao1 指数 Chao1 index	香农指数 Shannon-Wiener index	Pielou 指数 Pielou index
CK	2 485±157b	5.54±0.52b	0.52±0.06b
DM	2 395±159b	6.79±0.50a	0.63±0.04a
G1	3 404±520a	6.37±0.72a	0.58±0.05b
G2	1 397±417d	4.22±1.21c	0.44±0.11c
KQ	1 604±401c	5.04±0.29b	0.50±0.05b

表中数字为平均值±标准误, 数字后不同小写字母表示同一指标在不同处理间差异显著 ( $P<0.05$ )

The numbers in the table are the mean±standard error, different lowercase letters after the numbers indicate that the same index has significant differences among different treatments ( $P<0.05$ ).

轮作 92.4%、KQ 轮作 89.2%和 G1 轮作 63.0%。其中变形菌门 G2 轮作最高、G1 轮作最低。蓝藻门相对丰度分别为 CK 处理 12.30%、DM 轮作 0.58%、KQ 轮作 5.02%、G1 轮作 36.50%和 G2 轮作 6.35%。其中蓝藻门 G1 轮作和 CK 轮作最高, DM 轮作相对丰度最低。放线菌门相

对丰度最高是 YC 轮作, 分别为 21.90%。

在属水平上, 偶氮氢单胞菌属(*Azohydromonas*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、地杆菌属(*Geobacter*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、固氮细菌属(*Azotobacter*)、弗兰克氏菌属(*Frankia*)、红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)、斯克尔曼氏菌属(*Skermanella*)和伯克霍尔德菌(*Burkholderia*)为优势类群, 相对丰度范围介于 0.15%–19.10%, 除弗兰克菌属归属于放线菌门, 其余优势菌属均归属于变形菌门, 变形菌门的丰度最高(图 2)。

五种轮作制度下的群落组成和丰度在属水平上存在差异。在 G1、G2、DM 和 KQ 四种轮作制度土壤中, 变形菌门中的偶氮氢单胞菌属(*Azohydromonas*)是第一优势属, 相对丰度分别为 19.1%、17.1%、11.0%和 17.6%。在 CK 轮作土壤中, 变形菌门中的慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)是第一优势属, 相对丰度为 39.8%。在 G2 轮作土壤中, 变形菌门中的固氮螺菌属(*Azospirillum*)是第一优势属, 相对丰度为 16.9%。

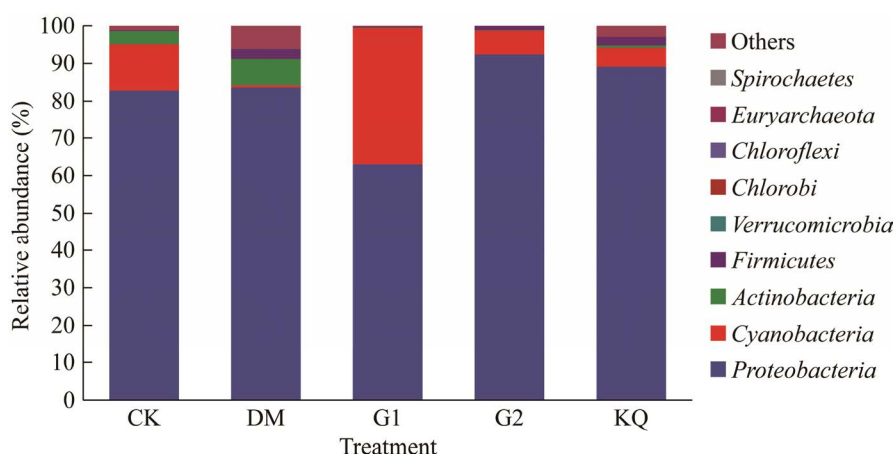


图 1 不同轮作制度下土壤固氮微生物 *nifH* 基因在门水平的群落组成

Figure 1 Soil nitrogen-fixing microorganisms *nifH* gene community composition at the phylum level under different crop rotation systems.

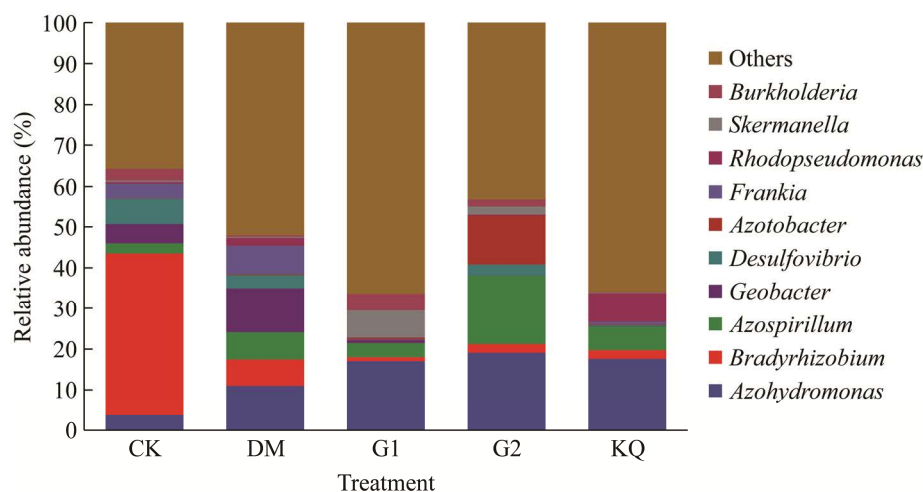


图 2 不同轮作制度下土壤固氮微生物 *nifH* 基因在属水平的群落组成

Figure 2 Soil nitrogen-fixing microorganisms *nifH* gene community composition at the genus level under different crop rotation systems.

## 2.4 不同轮作制度土壤固氮微生物 *nifH* 基因的群落结构变异

不同轮作制度下土壤固氮微生物 *nifH* 基因的群落结构变异见图 3。

基于 Bray-Curtis 距离 NMDS 分析结果(图 3)，5 种不同轮作制度下的土壤固氮微生物 *nifH* 基因群落总体聚在 2 个组里。组 1 包含 CK、KQ 和 DM 轮作，组 2 为 G1 和 G2 轮作。组 1 和

组 2 之间并无重合，说明组间群落结构差异较大( $P < 0.05$ )。

## 2.5 土壤理化性质对土壤固氮微生物 *nifH* 基因的群落影响

对不同轮作土壤中固氮微生物 *nifH* 基因的群落与土壤理化性质关联性进行冗余分析(图 4)，结果显示，在第 1 象限中，G1、G2 轮作与 pH、有效磷呈正相关。在第 2 象限中，CK

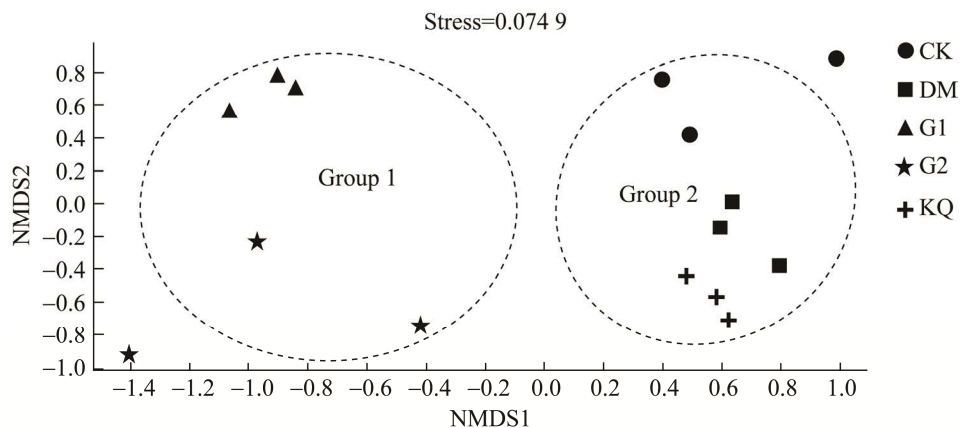


图 3 不同轮作制度土壤固氮微生物 *nifH* 基因的群落差异

Figure 3 Differences of soil nitrogen-fixing microorganisms *nifH* gene communities under different rotation systems.

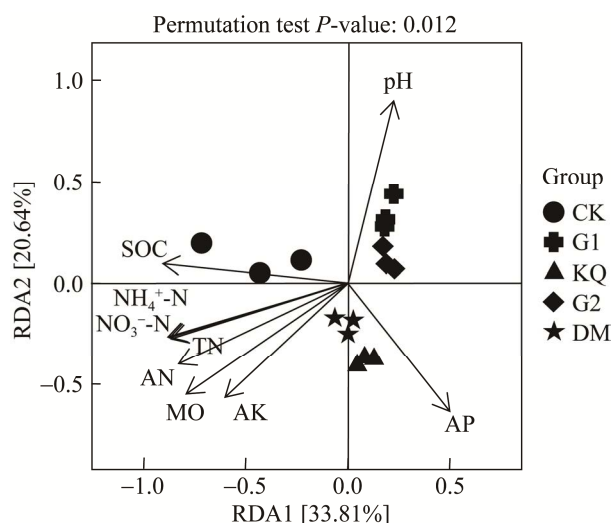


图4 土壤固氮微生物 *nifH* 基因群落结构与土壤理化因子的冗余分析

Figure 4 Redundancy analysis of nitrogen-fixing microorganisms *nifH* gene communities structure and soil physico-chemical properties. AP, AK, MO, AN, TN,  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_4^+$ -N, SOC represent available phosphorus, available K, water content, alkali-hydrolyzable nitrogen, total nitrogen, nitrate nitrogen, ammonium nitrogen and organic carbon, respectively.

与有机碳、铵态氮、硝态氮、全氮、碱解氮、含水量和速效钾呈正相关。在第3、4象限中, DM、KQ 轮作除 pH 呈负相关, 其余呈正相关。从箭头的连线长度可以看出影响土壤固氮微生物 *nifH* 基因的群落重要环境因子依次为: pH、含水量>有机碳、有效磷、碱解氮>速效钾、全氮、硝态氮、铵态氮。

### 3 讨论

#### 3.1 土壤理化性质和固氮酶活特征

农业生产中, 不同作物轮作会对土壤肥力产生显著影响<sup>[15]</sup>。从轮作模式看, 撂荒处理土壤的 pH、有机碳和全氮等含量最高。这是因为相较于撂荒处理, 其余轮作模式经过人为耕作, 随着年限的增加使土壤空隙增加, 土壤微生物

的活性增强, 促使土壤有机质分解<sup>[16]</sup>。此外, 人为耕作后, 土壤氧化还原电位升高, 有机质矿化, 也是轮作土壤有机质下降的另一原因<sup>[17]</sup>。从轮作年限来看, 经过长期轮作后, 土壤总体 pH 值下降, 有机碳和有效磷升高。这是因为随着种植时间增加, 土壤的养分和有机质的积累来自各种形式凋落物归还<sup>[18]</sup>, 并且施用的肥料含有大量的  $\text{NH}_4^+$ , 部分  $\text{NH}_4^+$  会在硝化细菌的作用下转化为  $\text{NO}_3^-$ , 同时释放出  $\text{H}^+$ , 导致轮作土壤 pH 值下降<sup>[19]</sup>。同时, 撂荒土壤的固氮酶活性均比其余轮作模式高, 固氮酶活与铵态氮呈负相关,  $\text{NH}_4^+$  浓度增加抑制了固氮酶活性。这与季华等<sup>[20]</sup>的研究结果不一致, 可能是因为长期撂荒处理土壤人为扰动少, 诱导了固氮酶活的增加及氮素积累。

#### 3.2 土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性

土壤固氮微生物群落多样性受轮作作物种类的影响较大<sup>[21]</sup>。在本研究中, 土壤固氮微生物 *nifH* 基因的 Chao1 指数、Shannon-Wiener 指数均表现出  $\text{G1} > \text{DM} > \text{CK} > \text{G2} > \text{KQ}$  的趋势。表明 G1 轮作能显著提高土壤固氮微生物 *nifH* 基因的  $\alpha$  多样性, 这是因为紫花苕子的根系能与固氮菌形成根瘤, 增加了土壤中联合固氮微生物, 导致土壤中固氮菌种类和数量发生变化, 提高了固氮微生物 *nifH* 基因的群落多样性<sup>[22]</sup>。同时, 本研究发现 G2 轮作比 G1 轮作的多样性丰度低, 表明轮作同种作物, 随着年限增加会降低土壤固氮微生物 *nifH* 基因的群落多样性, 这与前人一致<sup>[23]</sup>。随着轮作年限增加, 土壤有机碳、碱解氮、速效磷等养分含量降低, 以及作物本身的化感作用也会致使微生物多样性受到负面影响<sup>[24]</sup>。此外, 所有处理中, KQ 轮作微生物多样性丰度最低, 这是与苦荞富含对多种病原微生物具有很强的抗菌活性的黄酮类化合物有关<sup>[25]</sup>。微生物的数量和种类容易受不同轮作模

式的影响, 而轮作模式的不同导致作物对土壤养分的影响以及根际分泌物和植物残体对土壤微生物的影响不同, 土壤中微生物数量与多样性也就表现不同<sup>[26]</sup>。可见, G1 轮作在提升土壤固氮微生物群落多样性方面有一定的优势。

### 3.3 土壤固氮微生物 *nifH* 基因群落组成与结构特征

门水平上, 变形菌门(*Proteobacteria*)在 5 种不同轮作制度土壤固氮微生物 *nifH* 基因的群落中占据优势地位, 这与文都日乐等<sup>[27]</sup>的研究结果一致, 变形菌门(*Proteobacteria*)中许多类群可以进行固氮作用, 并且可以适应并普遍存在于各种复杂的环境<sup>[28]</sup>; 同时蓝藻门(*Cyanobacteria*)相对丰度有所升高, 蓝藻门在土壤中多具有固氮功能, 与土壤理化性质显著相关。在属水平上, 各处理的优势菌属存在差异, 土壤中偶氮氢单胞菌属(*Azohydromonas*)和固氮螺菌属(*Azospirillum*)是优势属, 偶氮氢单胞菌属(*Azohydromonas*)被认为能够利用氢气自养生长并固定氮的菌群, 对于改变土壤氮形式有重要作用<sup>[29]</sup>; 固氮螺菌属(*Azospirillum*)是光叶紫花苕属豆科植物, 大量根瘤菌富集, 根瘤菌将空气中的氮气转变成含氮化合物, 满足豆科植物对氮素营养的需求<sup>[30]</sup>。非度量多维尺度分析(NMDS)显示, 不同轮作制度下土壤固氮微生物 *nifH* 基因的群落结构分布差异明显, G1、G2 与 CK、DM、KQ 轮作的群落结构差异较大, 总而言之, 光叶紫花苕轮作可以显著提高变形菌门、偶氮氢单胞菌属和慢生根瘤菌属的群落丰度, 这表明不同作物对土壤微生物的选择具有差异性, 不同作物具有不同敏感微生物的选择倾向<sup>[31]</sup>。

### 3.4 环境因子对土壤固氮微生物 *nifH* 基因的群落影响特征

本研究发现, 主要影响攀西土壤固氮微生物 *nifH* 基因群落组成的土壤理化因子为 pH 和

含水量。其中, 影响 G1 和 G2 轮作的主要环境因子为 pH。王静等<sup>[32]</sup>研究认为, 宁夏银北不同草田轮作中影响细菌群落结构组成最显著的环境因子是碱性磷酸酶活性和 pH, 影响 DM 和 KQ 轮作的主要环境因子是含水量。孙艳丽等<sup>[33]</sup>研究认为, 华北平原冬小麦/夏玉米轮作中影响土壤 N<sub>2</sub>O 通量特征的主要因子为含水量和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, 影响撂荒处理的主要环境因子为有机碳。杜思瑶等<sup>[34]</sup>研究发现, 叶茄轮作中影响土壤细菌群落主要因子为有机碳。这些都表明影响因子随轮作模式有所变化, 这与以前的研究结果<sup>[35]</sup>基本一致。

## 4 结论

攀西高原不同轮作制度对土壤肥力和固氮微生物种群产生了明显影响。光叶紫花苕 1-烤烟轮作中土壤固氮微生物 *nifH* 基因的群落多样性表现最显著( $P < 0.05$ )。变形菌门(*Proteobacteria*)中偶氮氢单胞菌属(*Azohydromonas*)和慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)为不同轮作制度下的优势物种。土壤 pH 和含水量是驱动土壤固氮微生物 *nifH* 基因群落组成的关键因子。

## REFERENCES

- [1] QIN SH, YEBOAH S, CAO L, ZHANG JL, SHI SL, LIU YH. Breaking continuous potato cropping with legumes improves soil microbial communities, enzyme activities and tuber yield[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0175934.
- [2] 李旭, 董伟灵, 宋阿琳, 李艳玲, 卢玉秋, 王恩召, 刘雄舵, 王萌, 范分良. 秸秆添加量对土壤生物固氮速率和固氮菌群落特征的影响[J]. 中国农业科学, 2021, 54(5): 980-991.  
LI X, DONG WL, SONG AL, LI YL, LU YQ, WANG EZ, LIU XD, WANG M, FAN FL. Effects of straw addition on soil biological N<sub>2</sub>-fixation rate and diazotroph community properties[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(5): 980-991 (in Chinese).
- [3] 兰鸿珠, 胡文革, 杨扬, 何园, 高岩. 艾比湖湿地盐节木土壤固氮微生物群落结构和丰度的环境异质性特点[J]. 微生物学通报, 2019, 46(7): 1597-1610.

- LAN HZ, HU WG, YANG Y, HE Y, GAO Y. Environmental heterogeneity of the nitrogen-fixing microbial community structure and abundance in the soil surrounding *Halocnemum strobilaceum* in Ebinur Lake wetland[J]. Microbiology China, 2019, 46(7): 1597-1610 (in Chinese).
- [4] 刘会芳, 韩宏伟, 王强, 庄红梅, 王浩. 不同蔬菜与番茄轮作对设施土壤微生物多样性、酶活性及土壤理化性质的影响[J]. 微生物学报, 2021, 61(1): 167-182.
- LIU HF, HAN HW, WANG Q, ZHUANG HM, WANG H. Effect of vegetables-tomato rotation on soil microbial diversity, enzyme activity and physicochemical properties of vegetables in greenhouse[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(1): 167-182 (in Chinese).
- [5] 徐正金, 罗明, 王卫霞, 王纯利. 3种典型荒漠灌木内生固氮菌及固氮酶基因 *nifH* 多样性分析[J]. 中国沙漠, 2014, 34(2): 472-480.
- XU ZJ, LUO M, WANG WX, WANG CL. The molecular diversity of endophytic diazotrophic bacteria from three typical desert shrubs and PCR-RFLP analysis of their nitrogenase gene *nifH*[J]. Journal of Desert Research, 2014, 34(2): 472-480 (in Chinese).
- [6] 蔡树美, 徐四新, 张翰林, 张德闪, 吕卫光, 顾富家, 诸海焘. 滩涂土壤固氮菌群落与环境因子的典范对应分析[J]. 土壤, 2017, 49(6): 1159-1165.
- CAI SM, XU SX, ZHANG HL, ZHANG DS, LV WG, GU FJ, ZHU HT. Canonical correspondence analysis of relationship between characteristics of nitrogen-fixing microbes community and environmental factors in mudflat soil[J]. Soils, 2017, 49(6): 1159-1165 (in Chinese).
- [7] 陈春兰, 吴敏娜, 魏文学. 长期施用氮肥对土壤细菌硝化基因多样性及组成的影响[J]. 环境科学, 2011, 32(5): 1489-1496.
- CHEN CL, WU MN, WEI WX. Effect of long-term application of nitrogen fertilizer on the diversity of nitrifying genes (*amoA* and *hao*) in paddy soil[J]. Environmental Science, 2011, 32(5): 1489-1496 (in Chinese).
- [8] 曹瑞, 吴福忠, 杨万勤, 徐振锋, 谭波, 王滨, 李俊, 常晨晖. 海拔对高山峡谷区土壤微生物生物量和酶活性的影响[J]. 应用生态学报, 2016, 27(4): 1257-1264.
- CAO R, WU FZ, YANG WQ, XU ZF, TAN B, WANG B, LI J, CHANG CH. Effects of altitude on soil microbial biomass and enzyme activities in alpine canyon area[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2016, 27(4): 1257-1264 (in Chinese).
- [9] 阳祥, 李先德, 刘吉龙, 林少颖, 尹晓雷, 王维奇, 张永勋. 不同轮作模式的土壤真菌群落结构及功能特征分析[J]. 环境科学学报, 2022, 42(4): 432-442.
- YANG X, LI XD, LIU JL, LIN SY, YIN XL, WANG WQ, ZHANG YX. Analysis on the structure and function of soil fungi community in different crop rotation modes[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2022, 42(4): 432-442 (in Chinese).
- [10] 吕小娜, 庞夙, 李廷轩, 王永东, 郑子成, 王勇, 邢小军. 四川省凉山州新植烟区土壤养分状况分析及综合评价[J]. 土壤通报, 2013, 44(3): 691-697.
- LV XN, PANG S, LI TX, WANG YD, ZHENG ZC, WANG Y, XING XJ. Analysis and comprehensive evaluation of soil fertility status for tobacco-planted areas in Liangshan, Sichuan Province[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2013, 44(3): 691-697 (in Chinese).
- [11] 曹楠, 申太丽, 罗水莲, 李俊, 鲜镇糠. 西昌市地质灾害发育分布规律及防灾建议[J]. 中国地质灾害与防治学报, 2010, 21(1): 127-132.
- CAO N, SHEN TL, LUO SL, LI J, XIAN ZK. Development and distribution patterns of geologic hazards in Xichang City and prevention suggestion[J]. The Chinese Journal of Geological Hazard and Control, 2010, 21(1): 127-132 (in Chinese).
- [12] 樊惠. 乙炔还原法测定固氮作用的限制因素[J]. 微生物学通报, 1995, 22(4): 235-238.
- FAN H. Limiting factors of determining nitrogen fixation by acetylene reduction method[J]. Microbiology, 1995, 22(4): 235-238 (in Chinese).
- [13] 郑俊强, 韩士杰, 任飞荣, 周玉梅, 张岩. 长期高浓度 CO<sub>2</sub> 处理对长白赤松土壤硝化酶、反硝化酶和固氮酶活性的影响(英文)[J]. Journal of Forestry Research, 2008(4): 283-287, 349.
- ZHENG JQ, HAN SJ, REN FR, ZHOU YM, ZHANG Y. Effects of long-term elevated CO<sub>2</sub> on N<sub>2</sub>-fixing, denitrifying and nitrifying enzyme activities in forest soils under *Pinus sylvestris* in Changbai Mountain[J]. Journal of Forestry Research, 2008(4): 283-287, 349 (in Chinese).
- [14] RÖSCH C, MERGEL A, BOTHE H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3818-3829.
- [15] 郝旺林, 梁银丽, 朱艳丽, 吴兴, 林兴军, 罗安荣. 农田粮-菜轮作体系的生产效益与土壤养分特征[J]. 水土保持通报, 2011, 31(2): 46-51.



- HAO WL, LIANG YL, ZHU YL, WU X, LIN XJ, LUO AR. Production efficiency and soil nutrient characteristics in food-vegetable rotation systems[J]. Bulletin of Soil and Water Conservation, 2011, 31(2): 46-51 (in Chinese).
- [16] 唐莉娜, 熊德中. 有机肥与化肥配施对烤烟生长发育的影响[J]. 烟草科技, 2000, 33(10): 32-34.
- TANG LN, XIONG DZ. Effect of combining application of organic and chemical fertilizers on the growth and development of flue-cured tobacco[J]. Tobacco Science & Technology, 2000, 33(10): 32-34 (in Chinese).
- [17] 杨钙仁, 童成立, 肖和艾, 吴金水. 水分控制下的湿地沉积物氧化还原电位及其对有机碳矿化的影响[J]. 环境科学, 2009, 30(8): 2381-2386.
- YANG GR, TONG CL, XIAO HA, WU JS. Effects of water content on redox potential and carbon mineralization of wetland sediments[J]. Environmental Science, 2009, 30(8): 2381-2386 (in Chinese).
- [18] 王清奎, 田鹏, 孙兆林, 赵学超. 森林土壤有机质研究的现状与挑战[J]. 生态学杂志, 2020, 39(11): 3829-3843.
- WANG QK, TIAN P, SUN ZL, ZHAO XC. Research on soil organic matter in forest ecosystems: status and challenge[J]. Chinese Journal of Ecology, 2020, 39(11): 3829-3843 (in Chinese).
- [19] 蔡泽江, 孙楠, 王伯仁, 徐明岗, 张会民, 张璐, 李冬初, 卢昌艾. 几种施肥模式对红壤氮素形态转化和 pH 的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(14): 2877-2885.
- CAI ZJ, SUN N, WANG BR, XU MG, ZHANG HM, ZHANG L, LI DC, LU CA. Experimental research on effects of different fertilization on nitrogen transformation and pH of red soil[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(14): 2877-2885 (in Chinese).
- [20] 季华, 潘存德, 周俊, 罗明, 王卫霞, 罗达. 荒漠灌木内生固氮菌对环境因子的适应性研究[J]. 中国沙漠, 2011, 31(4): 942-947.
- JI H, PAN CD, ZHOU J, LUO M, WANG WX, LUO D. Adaptability of endophytic diazotrophic bacteria strains from desert shrubs to diverse environment factors[J]. Journal of Desert Research, 2011, 31(4): 942-947 (in Chinese).
- [21] 杨亚东, 冯晓敏, 胡跃高, 任长忠, 曾昭海. 豆科作物间作燕麦对土壤固氮微生物丰度和群落结构的影响[J]. 应用生态学报, 2017, 28(3): 957-965.
- YANG YD, FENG XM, HU YG, REN CZ, ZENG ZH. Effects of legume-oat intercropping on abundance and community structure of soil N<sub>2</sub>-fixing bacteria[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2017, 28(3): 957-965 (in Chinese).
- [22] RUTTO KL, MIZUTANI FS, MOON DG, CHO YS. Nitrogen fixation and N-balance studies of candidate legume cover crops for use in orchards[J]. Journal of the Japanese Society of Agricultural Technology Management, 2019, 10(1): 29-35.
- [23] LIU ZX, LIU JJ, YU ZH, YAO Q, LI YS, LIANG AZ, ZHANG W, MI G, JIN J, LIU XB, WANG GH. Long-term continuous cropping of soybean is comparable to crop rotation in mediating microbial abundance, diversity and community composition[J]. Soil and Tillage Research, 2020, 197: 104503.
- [24] 钊有聪, 张立猛, 焦永鸽, 罗丽芬, 方玉婷, 廖静静, 计思贵, 朱书生, 杨敏. 大蒜与烤烟轮作对烟草黑胫病的防治效果及作用机理初探[J]. 中国烟草学报, 2016, 22(5): 55-62.
- CHUAN YC, ZHANG LM, JIAO YG, LUO LF, FANG YT, LIAO JJ, JI SG, ZHU SS, YANG M. Control effects of tobacco and garlic rotation on tobacco black shank and a preliminary study on the inhibition mechanism[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2016, 22(5): 55-62 (in Chinese).
- [25] GÓRNIK I, BARTOSZEWSKI R, KRÓLICEWSKI J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids[J]. Phytochemistry Reviews, 2019, 18(1): 241-272.
- [26] 张慧, 马连杰, 杭晓宁, 朱金山, 卢文才, 廖敦秀. 不同轮作模式下稻田土壤细菌和真菌多样性变化[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(4): 804-810.
- ZHANG H, MA LJ, HANG XN, ZHU JS, LU WC, LIAO DX. Changes of soil bacterial and fungal diversity in paddy soils under different rotation patterns[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2018, 34(4): 804-810 (in Chinese).
- [27] 文都日乐, 李刚, 杨殿林, 张静妮, 易津. 呼伦贝尔草原土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性与群落结构[J]. 生态学杂志, 2011, 30(4): 790-797.
- WEN DRL, LI G, YANG DL, ZHANG JN, YI J. *nifH* gene diversity and community structure of soil nitrogen-fixing bacteria in Hulunbeier grassland, Inner Mongolia[J]. Chinese Journal of Ecology, 2011, 30(4): 790-797 (in Chinese).
- [28] DELMONT TO, QUINCE C, SHAIKBER A, ESEN ÖC, LEE ST, RAPPÉ MS, MCLELLAN SL, LÜCKER S, EREN AM. Nitrogen-fixing populations of *Planctomycetes* and *Proteobacteria* are abundant in



- surface ocean metagenomes[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3(7): 804-813.
- [29] XUE H, PIAO CG, BIAN DR, GUO MW, LI Y. *Azohydromonas aerea* sp. nov, isolated from air[J]. *Journal of Microbiology*, 2020, 58(7): 543-549.
- [30] RADWAN ED, MOHAMED ZK, REIS VM. Effect of inoculation with *Azospirillum* and *Herbaspirillum* on production of indolic compounds and growth of wheat and rice seedlings[J]. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 2004, 39(10): 987-994.
- [31] 唐杰, 陈知青, 郭安南, 裘琼芬. 不同作物根际土壤微生物的群落结构特征分析[J]. *核农学报*, 2021, 35(12): 2830-2840.
- TANG J, CHEN ZQ, GUO AN, QIU QF. Characteristics of microbial community structure in the rhizosphere soil of different crops[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2021, 35(12): 2830-2840 (in Chinese).
- [32] 王静, 程昱润, 肖国举, 毕江涛, 张峰举, 许兴. 宁夏银北不同草田轮作模式对细菌群落组成特征的影响[J]. *农业机械学报*, 2021, 52(7): 283-292.
- WANG J, CHENG YR, XIAO GJ, BI JT, ZHANG FJ, XU X. Effect of grass-crop rotation patterns on soil bacterial community composition in northern Ningxia[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2021, 52(7): 283-292 (in Chinese).
- [33] 孙艳丽, 陆佩玲, 李俊, 于强, 孙善彬, 王吉顺, 欧阳竹. 华北平原冬小麦/夏玉米轮作田土壤  $N_2O$  通量特征及影响因素[J]. *中国农业气象*, 2008, 29(1): 1-5, 15.
- SUN YL, LU PL, LI J, YU Q, SUN SB, WANG JS, OUYANG Z. Characteristics of soil  $N_2O$  flux in a winter wheat-summer maize rotation system in north China plain and analysis of influencing factors[J]. *Chinese Journal of Agrometeorology*, 2008, 29(1): 1-5, 15 (in Chinese).
- [34] 杜思瑶, 于淼, 刘芳华, 肖雷雷, 张洪霞, 陶军, 顾卫, 顾京晏, 陈茜. 设施种植模式对土壤细菌多样性及群落结构的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2017, 25(11): 1615-1625.
- DU SY, YU M, LIU FH, XIAO LL, ZHANG HX, TAO J, GU W, GU JY, CHEN X. Effect of facility management regimes on soil bacterial diversity and community structure[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2017, 25(11): 1615-1625 (in Chinese).
- [35] 苟久兰, 顾小凤, 张萌, 魏全全, 柳玲玲. 不同烤烟种植模式对贵州土壤养分、酶活性及细菌群落结构的影响[J]. *核农学报*, 2022, 36(7): 1475-1484.
- GOU JL, GU XF, ZHANG M, WEI QQ, LIU LL. Effects of different flue-cured tobacco planting patterns on nutrients, enzyme activities and bacterial community structure in soil of Guizhou Province[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2022, 36(7): 1475-1484 (in Chinese).