



基于 Illumina MiSeq 测序平台分析长期不同施肥处理对黑土真菌群落的影响

武俊男^{1,2}, 刘昱辛^{1,2}, 周雪^{1,2}, 王天野^{1,2}, 高强^{1,2}, 高云航³, 刘淑霞^{1,2*}

¹吉林农业大学资源与环境学院, 吉林 长春 130118

²吉林省商品粮基地土壤资源可持续利用重点实验室, 吉林 长春 130118

³吉林农业大学动物科技学院, 吉林 长春 130118

摘要:【目的】不合理施肥所引发的土壤环境问题逐渐成为制约我国农业可持续发展的重要因素之一, 土壤真菌作为一类重要的土壤微生物, 研究长期施肥对土壤真菌多样性及群落分布格局, 探讨其理化因子对真菌群落结构的影响具有一定意义。【方法】本研究以东北黑土玉米田长期定位施肥试验(1984–2017)为基础, 通过常规分析和 Illumina MiSeq 高通量测序技术, 分析长期施肥对黑土玉米田土壤养分含量和真菌群落结构变化的影响。【结果】长期施用氮肥明显降低土壤 pH, 却增加了玉米产量, 秸秆与化肥配施可以增加土壤有机质和全氮的含量。稀释曲线结果表明长期施肥降低了土壤真菌序列的丰度和均匀度, 并且在秸秆与化肥配施中序列数最低; 在优势菌群中, 共检测出 5 个已知真菌门, 分别是子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、接合菌门(Zygomycota)、球囊菌门(Glomeromycota)和壶菌门(Chytridiomycota), 子囊菌门占总序列平均值的 57.0%, 并且在氮磷钾配施高量秸秆有机肥(NPK+S0.5)的土壤中, 子囊菌门丰度高达 70.35%。在土壤真菌属水平的物种丰度分析中, 共检测出 109 个已知真菌属, *Humicola*、*Fusarium*、*Verticillium*、*Mortierella* 这 4 个菌属为优势菌属; *Chaetomium*、*Trichocladium*、*Podospora*、*Preussia* 4 个菌属在秸秆与化肥配施处理中丰度较高, 并同属一个分支聚类。从多样性指数分析得出, 秸秆与化肥配施可以增加物种丰度和群落多样性; 从热图分析可知, 施用氮肥和不施用氮肥处理间真菌群落组成存在明显差异。RDA 分析中, 土壤理化性质影响着土壤真菌群落结构, 尤其是土壤的 pH、全量氮磷钾(T-N、T-P、T-K)、有效磷钾(A-P、A-K)和铵态氮(NH₄⁺-N)浓度是重要环境因素。【结论】因此, 施用氮肥虽然增加了产量, 但也造成土壤酸化, 真菌数量增加, 其丰富度和多样性明显降低。而秸秆与化肥配施可以维持土壤健康生态环境和真菌群落多样性。

关键词: 长期施肥, 黑土, 真菌群落, 高通量测序

基金项目: 国家重点研发计划子课题(2017YFD0300405-4); 吉林省自然科学基金(20170101077JC); 吉林省科技发展计划项目(20160307006NY); 现代农业产业技术体系建设专项(nycytx-38)

*通信作者。E-mail: liushuxia69@163.com

收稿日期: 2017-12-19; 修回日期: 2018-03-19; 网络出版日期: 2018-04-26

施肥是农业生产的主要措施之一,早在 19 世纪,面对全球人口急剧增加的压力,人类对粮食的需求迫切需要肥料。长期施肥将明显改变作物产量、土壤理化性质和微生物活性^[1-4],对土壤质量和可持续利用具有深远影响。目前,国内外已进行了大量的肥料试验,发现施肥对土壤的影响十分复杂,因土壤类型、生态条件和施肥技术等不同而存在差异^[5-8]。在单施化肥的土壤中,有机质含量通常降低,养分失调,作物病害加重^[9];相反,有机无机配施则提高土壤有机质和有效养分含量,增加作物产量,改善作物品质^[10]。

土壤微生物与种植制度、作物种类、土壤类型、施肥制度、田间水分管理等农业措施的关系密切,施肥是影响其功能多样性关键因素之一,土壤微生物功能多样性易受肥料的种类、施用时期和用量等影响。真菌是土壤微生物的重要组成,直接影响土壤有机质循环、养分转化、毒物降解和作物病害发生等^[11-13],是土壤肥力和健康的重要指标之一^[14]。研究表明,秸秆还田和施用 EM 菌(*Effective Microorganisms*)堆肥提高土壤真菌的 Shannon-Winner 多样性指数,大量施用化肥则相反^[15]。在种植烤烟的土壤中,真菌种类优势菌群包括子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、接合菌门(Zygomycota)、壶菌门(Chytridiomycota)和未知类型的真菌;单施化肥提高担子菌门、接合菌门和壶菌门等真菌的丰富度;在有机无机配施的土壤中,子囊菌的增幅显著高于单施化肥,说明施用化肥改变了土壤生态环境,有益于真菌生长繁殖,使真菌种群增加,密度增大,优势种群突出,导致土壤真菌化^[9]。在研究方法上,由于土壤中真菌数量庞大,种类繁多,且存在大量无法培养的真菌类群,采用传统的培养

方法,无法全面了解土壤真菌信息。高通量测序技术针对真菌 DNA 的保守性,通过先提取、扩增、纯化、定量和均一化真菌 DNA 序列,再经测序、过滤、优化、聚类,对比基因库中的已知序列,从而鉴别真菌种(属)类,是传统培养方法所获得微生物数量的数十倍甚至数百倍,能准确灵敏地检测土壤真菌^[16]。

目前国内外对长期施肥条件下真菌群落结构的研究集中于水稻土中^[17],然而对东北黑土研究较少,因此本文利用 ITS rDNA 高通量测序技术,研究长期不同施肥对东北黑土养分和真菌种群结构的影响,旨在了解其演变规律,为高产优质及构建良好的土壤生态环境提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验区概况

试验地点位于吉林农业大学长期定位试验田(43°47'42"N, 123°20'45"E)。试验始于 1984 年。试验地地势平坦,年平均降水量为 549.6 mm,蒸发量为 1390 mm,平均相对湿度为 65%, $\geq 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 积温 2850 $^{\circ}\text{C}$,年平均气温为 4.9 $^{\circ}\text{C}$,平均最高气温 28.3 $^{\circ}\text{C}$,最低气温-22.4 $^{\circ}\text{C}$,无霜 145 d,早霜一般在 9 月末。试验采用微区设计,每个小区用水泥槽隔开,微区面积为 2 m²,槽内土层厚度 \times 槽高为 150 cm \times 170 cm,土壤类型为草甸黑土,供试作物为玉米。

1.2 试验设计

试验共设置 14 个处理:(1) 不施肥的处理(CK);(2) 单施低量玉米秸秆(S0.25);(3) 单施高量玉米秸秆(S0.5);(4) 施用氮磷钾肥料(NPK);(5) 氮磷钾配施低量玉米秸秆(NPK+S0.25);(6) 氮磷钾配施高量玉米秸秆(NPK+S0.5);(7) 单施氮肥

(N); (8) 氮磷肥配施(NP); (9) 氮钾肥配施(NK); (10) 磷钾肥配施(PK); (11) 单施磷肥(P); (12) 单施钾肥(K); (13) 磷钾肥配施低量玉米秸秆(PK+S0.25); (14) 磷钾肥配施高量玉米秸秆(PK+S0.5)。田间试验采用完全随机区组设计, 每个处理 3 次重复, 共 42 个微区。施肥量 N-150、P₂O₅-75、K₂O-75 kg/hm² (详见表 1)。施肥方式: P、K 肥和玉米秸秆作为底肥一次性施入, N 肥的 1/3 为底肥, 其余 2/3 作为追肥施入。土壤样品采自 2015 年, 土壤的基本理化性状见表 2。

1.3 研究方法

1.3.1 土壤取样: 采集时间 2015 年 10 月份玉米成熟期, 每个微区随机取 3 棵植株, 运用抖落法采集粘附在玉米根系上的根际土, 装入已消毒的自封袋中, 放入冰盒中带回实验室, 每个小区土样分为两份, 一份去除杂质过 2 mm 筛子, 并将同一处理的 3 次平行混合到一起, -80 °C 保存用于 DNA 的提取, 另一份自然风干, 用于基础数据测定。

表 1. 试验区施肥处理方式

Table 1. The detailed experiment design and fertilizer application listed

Treatment	N/(kg/hm ²) Base fertilizer aftermanuring		P ₂ O ₅ / (kg/hm ²)	K ₂ O/ (kg/hm ²)	Com straw/ (kg/m ²)
CK	0	0	0	0	0
N	50	100	0	0	0
P	0	0	75	0	0
K	0	0	0	75	0
NK	50	100	0	75	0
PK	0	0	75	75	0
NP	50	100	75	0	0
NPK	50	100	75	75	0
S0.25	0	0	0	0	0.25
S0.50	0	0	0	0	0.50
NPK+S0.25	50	100	75	75	0.25
NPK+S0.50	50	100	75	75	0.50
PK+S0.25	0	0	75	75	0.25
PK+S0.50	0	0	75	75	0.50

Nitrogen is urea (46%), phosphate is superphosphate (14%) and potassium is potassium sulfate (52%).

表 2. 不同施肥处理土壤化学性质

Table 2. The physical-chemical properties of soil in different fertilization treatments

Treatment	pH	MC/%	SOM/%	A-P/(mg/kg)	A-K/(mg/kg)	NH ₄ ⁺ -N/(mg/kg)	NO ₃ -N/(mg/kg)	T-N/(g/kg)
CK	7.20±0.25ab	25.66±0.34bc	29.21±6.64ab	21.57±2.66d	211.36±4.50cdef	1.78±0.27ab	0.74±0.12abc	1.40±0.09ab
S0.25	7.28±0.19ab	27.70±1.01a	27.47±7.23b	37.35±3.53d	202.36±4.37defg	2.02±1.23ab	0.92±0.28abc	1.59±0.37ab
S0.50	7.44±0.21a	21.53±0.83f	32.08±2.04ab	32.22±4.20d	303.33±9.06ab	2.15±0.06ab	0.57±0.09d	1.50±0.09ab
NPK	6.55±0.13def	24.27±0.12cd	28.68±6.61ab	197.65±2.12ab	187.70±4.24efg	1.77±1.45ab	1.56±0.55a	1.55±0.07ab
NPK+S0.25	6.30±0.55ef	23.65±1.56de	36.44±2.23ab	189.06±3.85ab	220.36±3.17cdef	2.33±0.52ab	0.80±0.35abc	1.64±0.16ab
NPK+S0.50	6.82±0.31bcde	22.34±0.27ef	38.06±2.59a	109.33±7.16bcd	249.68±3.07bcde	2.05±0.46ab	0.60±0.25cd	1.66±0.30ab
N	6.18±0.27f	23.46±1.13def	28.59±9.77ab	17.69±6.80d	156.37±2.50fg	2.46±0.23ab	1.48±1.36abc	1.35±0.09b
NP	6.61±0.28cdef	24.43±1.08cd	32.14±2.61ab	198.20±2.16ab	141.71±1.53g	1.82±0.05ab	0.78±0.06abc	1.30±0.31b
NK	6.56±0.50def	23.16±1.22def	31.55±3.07ab	42.60±2.61cd	243.35±4.24bcde	2.10±0.21ab	0.64±0.11bcd	1.41±0.02ab
PK	7.11±0.12abc	25.82±0.66abc	30.93±6.60ab	168.57±5.12abc	273.67±1.52abc	1.48±0.58b	1.14±0.33abcd	1.64±0.40ab
P	7.14±0.25ab	26.49±1.48ab	26.44±5.15b	181.86±8.01ab	207.36±2.53def	2.59±0.67ab	1.46±0.41abc	1.46±0.03ab
K	7.04±0.02abcd	25.43±1.61abc	32.20±2.74ab	19.62±4.58d	289.34±2.10ab	1.84±0.77ab	1.00±0.21abc	1.49±0.05ab
PK+S0.25	7.18±0.19ab	26.66±1.40ab	33.24±7.04ab	153.35±6.12abcd	257.27±2.19bcd	3.09±0.55a	1.52±0.25ab	1.87±0.37a
PK+S0.50	7.27±0.36ab	21.94±0.51f	30.35±2.29ab	265.20±2.12a	325.70±3.81a	1.92±0.35ab	0.66±0.08bcd	1.41±0.36ab

1.3.2 基础数据的测定方法: 土壤含水量测定采用国家标准 LY/T1213-1999 森林土壤含水量的测定(烘干法); pH 测定采用酸度计法(土水比 1.0 : 2.5); 土壤全氮的测定采用半微量凯氏定氮法; 土壤铵态氮、硝态氮的测定采用 0.01 mol/L CaCl₂ 浸提-流动分析仪测定; 土壤有效磷的测定采用 0.5 mol/L NaHCO₃ 浸提-钼锑抗比色法; 速效钾的测定采用 1 mol/L NH₄Ac 浸提-原子吸收火焰光度法; 有机质测定采用浓硫酸-重铬酸钾消煮-硫酸亚铁滴定法^[18-19]。

1.3.3 土壤微生物 DNA 的提取: 土壤微生物 DNA 提取采用美国 MOBIO 公司的 Power Soil DNA Isolation Kit 试剂盒提取。称取 0.5000 g 保存于 -80 °C 冰箱中的土壤样品, 按试剂盒说明书过程提取总 DNA; 通过超微量分光光度计(Nanodrop 2000)检测 DNA 浓度 ≥ 20 ng/mL, $OD_{260/280}$ 为 1.8-2.0, $OD_{260/230}$ 为 1.8-2.0。提取的 DNA 在 -20 °C 条件下保存, 用于后续的测定。

1.3.4 DNA 文库的建立及上机测序: 高通量测序文库的构建和基于 Illumina MiSeq 平台的测序由 GENEWIZ 公司(苏州)完成。使用 Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA)检测 DNA 样品的浓度, 并使用 0.8%琼脂凝胶电泳检测 DNA 的完整性。以 5-50 ng DNA 为模板, PCR 扩增真菌 ITS rDNA 上的 ITS2 可变区。通过 PCR 向 ITS rDNA 的 PCR 产物末端加上带有 Index 的接头。使用 Agilent 2100 生物分析仪 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)检测文库质量, 并且通过 Qubit 和实时定量 PCR (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)检测文库浓度。DNA 文库混合后, 按 Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA)仪器使用说明书进行双端

测序(PE), 图像分析和碱基识别是通过 MiSeq 工具中的 MiSeq Control Software (MCS)进行的, 最后在 Illumina basespace 云端计算平台进行初始分类分析。

1.4 数据分析

双端测序得到的正反向 reads 首先进行两两组装连接, 过滤拼接结果中含有 N 的序列, 保留序列长度大于 200 bp 的序列。经过质量过滤, 去除嵌合体序列, 最终得到的序列用于 OTU 分析, 使用 VSEARCH (1.9.6)进行序列聚类(序列相似性设为 97%), 比对的 ITS rDNA 参考数据库是 UNITE ITS database (<https://unite.ut.ee/>)。然后用 RDP classifier (Ribosomal Database Program)贝叶斯算法对 OTU 的代表性序列进行物种分类学分析, 并在不同物种分类水平下统计每个样本的群落组成。基于 OTU 的分析结果, 采用对样本序列进行随机抽样的方法, 通过分析软件 Qiime (1.9.1)计算 Shannon、Chao1 等 α 多样性指数。通过 (Un)Weighted Unifrac 分析比较样本间是否有显著的微生物群落差异, 基于 (Un)Weighted Unifrac 样本间距离矩阵信息进行非度量多维尺度(NMDS)分析展示 β 多样性。利用 Canoco 5.0 软件对物种及环境之间进行相关性分析(RDA)。利用 Excel 2010、SPSS 19.0 进行数据统计与分析。

2 结果和分析

2.1 不同施肥处理对土壤养分及玉米产量的影响

不同施肥处理土壤的理化性质如表 2, 施用氮肥的处理(NPK, NP, NK, N, NPK+S0.25 和 NPK+S0.50)土壤的 pH (6.18-6.82)明显低于 CK (7.20)。与空白处理比较, 肥料的施用增加了土壤

有机质(SOM)和全氮(T-N)含量,特别是添加玉米秸秆的处理;然而对单施化肥(即 N, P, K, NK, NP, NPK, PK 和 NPK 处理)的 SOM 和 TN 含量影响不大。有效磷(A-P)和速效钾(A-K)在施肥处理(PK+S0.5)含量最多,分别为 265.20 mg/kg、325.70 mg/kg;铵态氮(NH₄⁺-N)和硝态氮(NO₃⁻-N)含量在 PK+S0.25 施肥处理下明显增多,其他处理之间差异不明显。

不同施肥处理下玉米产量如图 1,由图可知添加氮肥处理(NPK, NP, NK, N, NPK+S0.25 和 NPK+S0.5)的玉米产量(9180.7–10878.0 kg/ha)明显高于未添加氮肥(CK, S0.25, S0.50, PK, P, K, PK+S0.25, PK+S0.50)的处理($P<0.01$),并且在 NPK 施用的处理下玉米的产量最高为 10878.0 kg/ha,在空白处理 CK 下产量为 6111.8 kg/ha,说明施用氮肥明显可以增加玉米产量。

从表 3 我们可以看出,施用氮肥处理(NPK, NP, NK, N, NPK+S0.25 和 NPK+S0.50)与未添加氮肥(CK, S0.25, S0.50, PK, P, K, PK+S0.25, PK+S0.50)的处理之间在 pH 呈极显著正相关($P<0.01$),与土壤含水量(MC)有显著相关性($P<0.05$),但与产量之间有极显著负相关性($P<0.01$)。说明施用氮肥对土壤 pH 和产量有显著影响。

2.2 不同施肥处理下真菌群落组成

在测序数据初步统计后,从 14 个样品中获得总共 1930282 个真菌数,依据 97%的相似度划

分为 678482 个真菌 OTU 序列。经分析共检测出 5 个已知真菌门,109 个已知真菌属。随机抽取测序样品中的有效序列,以样品中的有效序列(Sequences Per Sample)为横坐标,以 OTU 数目(Observed OTU)为纵坐标,获得稀释曲线如图 2,通过稀释曲线不仅可以判断样品量是否充分,还可以在样品量充分前提下,对物种丰富度进行预测,结果表明,抽样 reads 在 10000 以下时,OTUs 数随着 reads 提高而迅速增加,在 10000–20000 之间缓慢增加,超过 20000 之后趋于平缓,说明测序量达到饱和,真菌数以 CK 处理最多, NPK+S0.50 最少。

不同施肥条件下,土壤真菌的群落门水平组成如图 3,由图可知丰度最高的真菌门是子囊菌门(Ascomycota),占总序列平均值的 57.0%,其次为担子菌门(Basidiomycota)、接合菌门(Zygomycota)、球

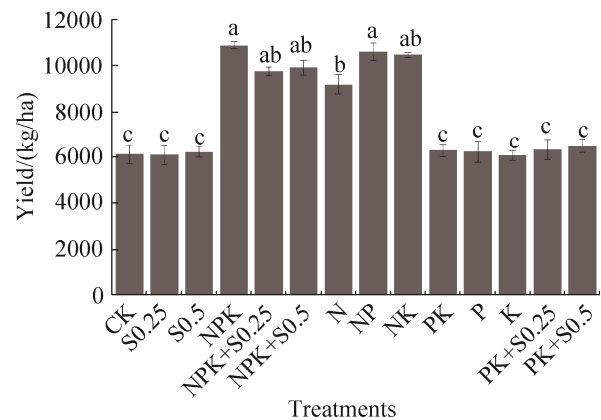


图 1. 不同施肥处理玉米产量

Figure 1. The corn yield with different fertilizer treatments.

表 3. 是否施用氮肥与土壤养分及产量之间的相关性分析

Table 3. Analysis of the correlation between N application and soil nutrient and yield

Treatment	pH	MC	SOM	A-P	A-K	NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N	T-N	Yield
N+/N-	0.779**	0.370*	-0.212	-0.088	0.494**	0.080	0.023	0.205	-0.937**

N+: Nitrogen fertilizer application; N-: No nitrogen fertilizer application. Values indicate correlation coefficient, “-” indicates negative correlation, * indicates significant ($P<0.05$). ** indicates extremely significant correlation ($P<0.01$).

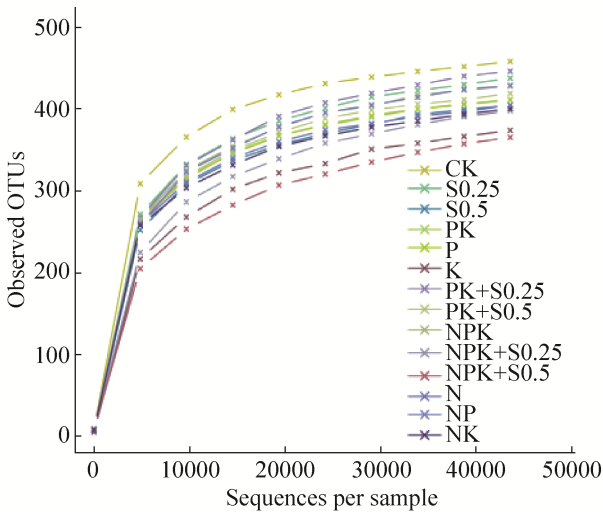


图 2. 土壤真菌的稀释曲线
Figure 2. The dilution curve of soil fungi.

囊菌门(Glomeromycota)和壶菌门(Chytridiomycota), 分别占总序列平均值的 18.0%、3.8%、1.1%和 0.9%, 未被分类到已知真菌(Unclassified)的序列也占有较高比例(19.2%)。从图中我们可以看出在施用玉米秸秆的处理中子囊菌门明显高于无机肥的处理, 然而单施钾肥(K)的土壤中担子菌门最高为 54.3%。

根据 OTU 的丰度数据, 热图可在属水平上将不同丰度的 OTU 分块聚类, 并根据颜色梯度反映不同样品的物种群落相似性、差异性, 物种聚类关系展示样本关系。在样品中共检测出 109 个已知真菌属, 本研究选择不同施肥处理的丰度高的前 30 个真菌属, 利用 R 语言绘制热图(图 4), 由图所知, 上侧为 OTU 聚类树, 右侧为样本聚类树; Unclassified (未知)的真菌属系占大多数, *Humicola*、*Fusarium*、*Verticillium*、*Mortierella* 这 4 个菌属为优势菌属, 并且同属相同的分支聚类。*Chaetomium*、*Trichocladium*、*Podospora*、*Preussia* 4 个菌属在 PK+S0.25、PK+S0.50、NPK+S0.25、NPK+S0.50 丰度较高, 并同属一个分支聚类。其余多数真菌属在不同样品中的丰度具有相似性。

2.3 不同施肥处理土壤真菌多样性分析

Alpha(α)多样性是指一个特定区域或生态系统内的多样性, 多样性指数是反映丰富度和均匀度的综合指标。其中, 群落丰富度指数包括 Chao1 指数和 ACE 指数, Chao1 或 ACE 指数越大, 说

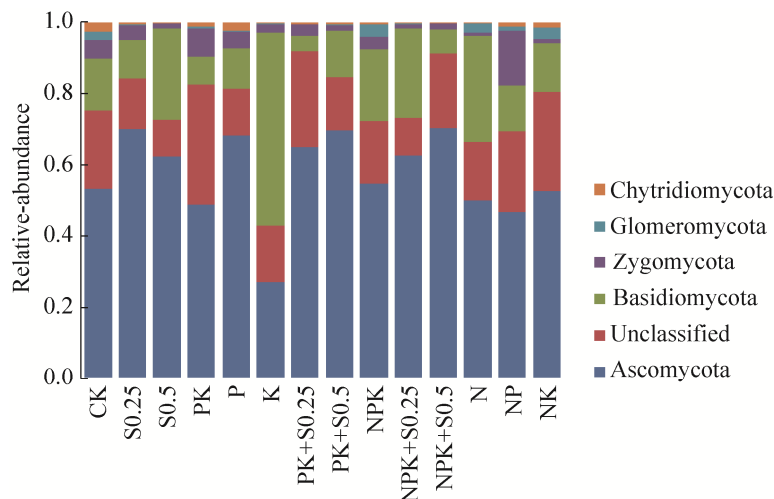


图 3. 不同施肥处理土壤真菌门水平物种丰富度

Figure 3. The composition and relative abundance of fungi communities at phyla-level in different fertilization treatments.

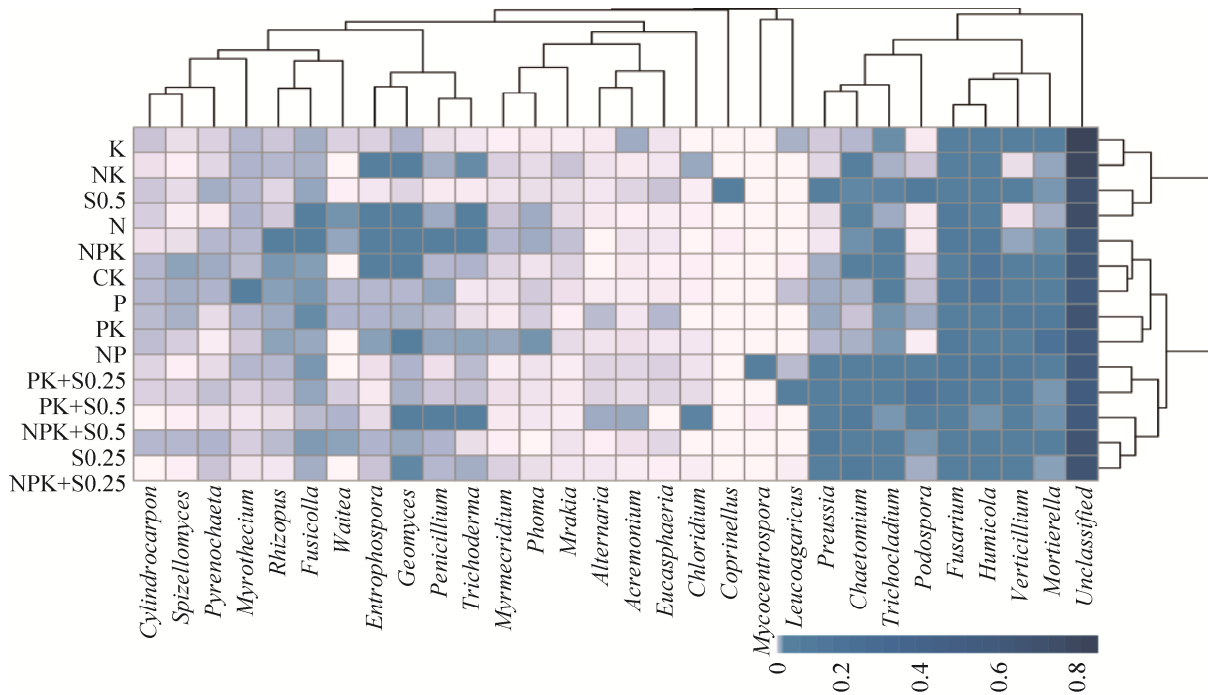


图 4. 不同施肥处理土壤真菌群落属水平物种分布热图

Figure 4. The Heatmap of relative abundance about soil fungi communities at genus-level in different fertilization treatments.

明群落丰富度越高; Shannon 指数是用来估算样品中微生物多样性指数之一, Shannon 指数越大, 说明群落多样性越高。Goods-coverage 指数是各样本文库的覆盖率, 数值越高, 表明样品中没有被测出的概率越低。不同施肥处理样本群落丰度及群落多样性指数如表 4, 由表可知在单施 K 肥处理下, ACE 指数和 Chao1 指数为最低, 说明此施肥处理下多样性指数最低, 说明群落多样性最低。Shannon 指数也在单施 K 肥处理下最低, 多样性指数最低, 说明此施肥处理下物种丰度最低。

Beta (β)多样性值为 2 个样本间的相异系数, 反映不同样本间的多样性差异, 利用各样本间的进化个丰度信息计算样本间的距离, 反映样本间是否有显著的微生物群落差异。绘制 Unweighted UniFrac 距离矩阵热图如图 5, 根据距离矩阵 Heatmap 分析可知, 单施钾肥(K)处理与其他处理

之间颜色较深相异系数较大, 说明土壤真菌群落结构与其他处理间差异较大。如图 5 所示 NPK+S0.25

表 4. 不同施肥处理土壤真菌 α 多样性指数统计表

Table 4. The number of fungi richness and diversity in different fertilization treatments

Treatment	ACE	Chao1	Shannon	Goods-coverage
CK	474.161	476.500	6.124	0.999
S0.25	472.220	476.553	5.902	0.999
S0.5	436.909	438.447	5.547	0.999
PK	438.979	442.906	5.772	0.999
P	441.446	448.364	5.731	0.999
K	411.185	416.263	3.877	0.999
PK+S0.25	487.142	498.026	5.776	0.999
PK+S0.50	444.073	447.763	5.887	0.999
NPK	463.276	466.875	5.892	0.999
NPK+S0.25	447.707	443.125	5.060	0.999
NPK+S0.50	444.630	446.023	5.428	0.998
N	434.211	437.286	5.726	0.999
NP	459.003	461.718	5.650	0.999
NK	437.222	437.784	5.891	0.999

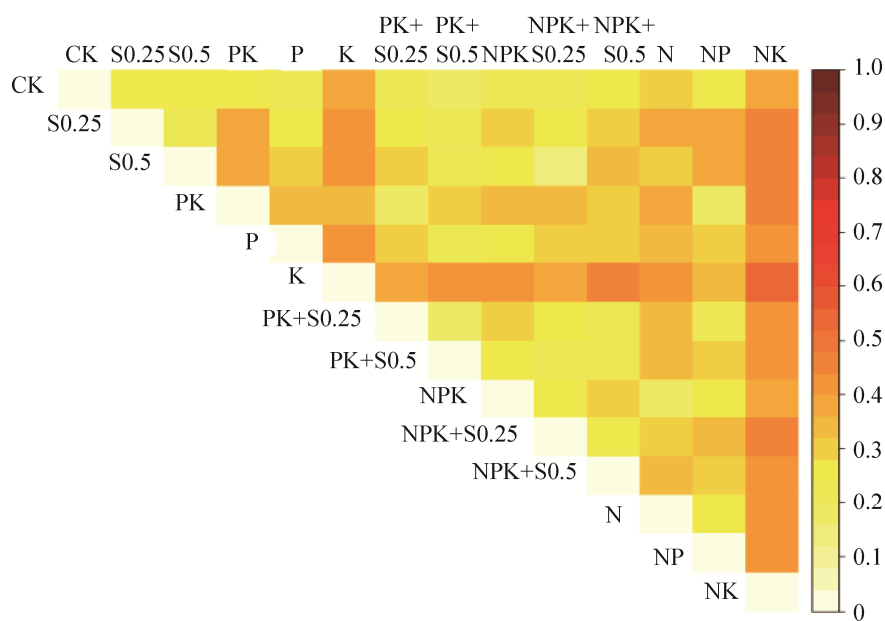


图 5. 基于 β -diversity 分析不同处理真菌群落结构

Figure 5. Pairwise comparison of β -diversity with all samples and annotations. Clustering and heatmap were computed using the weighted Unifrac scores.

与 NPK+S0.50 之间颜色较浅,两者相异系数较小; N、NP、NK 3 个处理之间,表示 4 个样本之间群落差异较小。PK+S0.25、PK+S0.50、S0.50 和 S0.25 四个样本之间相异程度也较小。而施用氮肥与未施用氮肥处理间差异较大,说明施用氮肥导致了真菌群落间存在较大的差异。

2.4 环境因子对不同施肥处理土壤真菌群落结构的影响

为了分析不同施肥处理间土壤理化因子对真菌群落格局的影响,本研究进行典型对应分析,结果如图 6 所示。如图所知,环境因子全钾(T-K)、全磷(T-P)、速效磷(A-P)、速效钾(A-K)矢量箭头之间夹角为锐角,表明这 4 种理化因子之间可能具有协同效应。样品 S0.25、S0.50、PK+S0.25 和 PK+S0.05 同铵态氮(NH_4^+ -N) 和全氮(T-N) 及 pH 相关性较高, NPK+S0.25 和 NPK+S0.50 同有机质

(SOM)相关性较高; 菌属 *Verticillium*、*Podospora*、*Preussia* 和 *Trichocladium* 同 S0.25、S0.50、PK+S0.25 和 PK+S0.50 这 4 个施肥处理间的相关性最高; 菌属 *Chaetomium* 同施肥处理 NPK+S0.25 和 NPK+S0.50 的相关性最高。

3 讨论

本研究结果表明,经过长期秸秆与化肥配施,土壤理化性质有一定的变化。此结果与以前研究相似^[20-21],肥料的施用增加了土壤总有机质和总氮浓度,特别是添加秸秆的处理。与空白(CK)处理比较,不同施肥皆可以增加土壤总有机质和总氮浓度。这些试验结果,证实了肥料施用会改变土壤理化性质^[22-23]。土壤经过长期施肥耕作,施用氮肥处理(NPK, NP, NK, N, NPK+S0.25, NPK+S0.50)的土壤 pH (6.18-6.82)明显低于未施

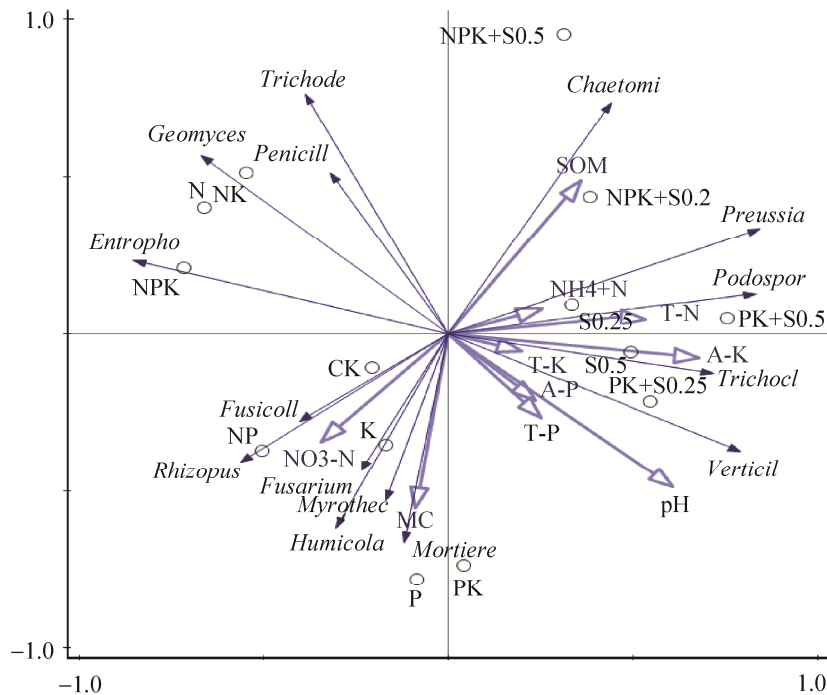


图 6. 真菌属水平物种与环境因子之间的 RDA 分析

Figure 6. Redundancy analysis (RDA) of fungi abundant genus and environmental variables for soil samples. Environmental factors are generally indicated by arrows. The length of arrow connection represents the degree of correlation between an environmental factor and community distribution and species distribution. The longer the connection, the greater the correlation and the smaller the other.

用氮肥的处理(CK, S0.25, S0.50, P, K, PK, PK+S0.25, PK+S0.50)的 pH (7.04–7.28), 尤其是以单施氮肥(N)的处理最低为 6.18, 氮磷钾肥配施高量秸秆(NPK+S0.50)的 pH 为 6.82, 说明单施氮肥加重了土壤酸化, 秸秆与化肥配施也会使土壤酸化, 但是没有单施氮肥明显; 在未施用氮肥的处理中, 土壤 pH 在单施高量秸秆(S0.5)的处理中最高为 7.44, 其次为低量秸秆(S0.25)处理的 pH 为 7.28, 相比于空白处理 CK 分别提高了 0.24 和 0.08, 说明单施秸秆不会使土壤酸化, 此结果与前人分析结果大致相同^[24]。与对照组(CK)处理对比, 秸秆与化肥配施处理(NPK+S0.25, NPK+S0.50, PK+S0.25, PK+S0.50)的土壤总有机质(30.35%–38.06%)明显高于 CK 的 29.21%, 说明

秸秆与化肥配施可以增加土壤有机质含量, 特别是 NPK+S0.50 处理为最高 38.06%, 增幅为 8.85%。秸秆与化肥配施(NPK+S0.25, NPK+S0.50, PK+S0.25, PK+S0.50)的土壤全氮(1.41–1.87 g/kg)高于对照组(CK)处理的 1.40 g/kg, 然而对单施无机肥的处理没有差异不明显。土壤是有效磷、速效钾、铵硝态氮也是秸秆与化肥配施的处理高于空白及单施无机肥的处理, 与林治安、徐祖祥、梁元振等研究结果类似^[25–27]。对于不同施肥处理玉米产量的研究, 添加氮肥的处理(NPK, NP, NK, N, NPK+S0.25, NPK+S0.50)玉米产量(9180.7–10878.0 kg/ha)明显高于未添加氮肥的(CK, S0.25, S0.50, PK, P, K, PK+S0.25, PK+S0.50)的处理, 并且在 NPK 施用的处理下玉米的产量最

高为 10878.0 kg/ha, 在空白处理 CK 下产量为 6111.8 kg/ha, 说明施用氮肥可以明显增加玉米产量。施用肥料的处理玉米产量都高于对照组(CK)表示施肥可以增加玉米产量, 此结果与刘志友、唐谷和卢红萍等研究一致^[28-30]。根据养分及产量的数据分析, 我们得出结论, 在东北黑土玉米种植区, 秸秆与化肥配施可以增强土壤供肥能力, 提高玉米产量。因此, 从 pH 和养分肥力角度看, 为了提高玉米产量并且不会严重破坏土壤, 提倡秸秆还田很有必要。

土壤环境变化会在一定程度上影响土壤微生物群落结构和多样性^[31]。我们运用 Illumina 高通量测序技术对不同施肥处理下东北黑土真菌群落结构进行了研究, 通过土壤真菌稀释曲线可知, 当真菌测序量达到饱和后, 真菌丰度和均匀度以空白 CK 处理最多, NPK+S0.50 最少。此结果与陈丹梅研究结果类似^[17]。根据结果我们可以得出结论, 土壤真菌丰度和均匀度在施肥以后会明显减少。

比较不同施肥处理土壤真菌门水平相对丰度可知, 土壤真菌优势菌群为子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、接合菌门(Zygomycota)、球囊菌门(Glomeromycota) 和壶菌门(Chytridiomycota), 与前人研究一致^[9], 在不同施肥处理下, 土壤真菌的子囊菌门在秸秆与化肥配施的(NPK+S0.25, NPK+S0.50, PK+S0.25, PK+S0.50)的处理与空白对照(CK)比较, 子囊菌门明显增多, 在氮磷钾配施高量秸秆(NPK+S0.50)处理下含量最高为 70.35%, 子囊菌门具有降解土壤中可溶性有机底物的功能^[32], 施用有机肥会增加土壤中有机物物质含量, 故而增加了土壤中子囊菌门数量。在整体来看子囊菌门占总序列的

57%, 需要指出的是, 子囊菌是自然界中最为丰富的真菌之一, 它们比担子菌具有更快的进化速率和更高的物种多样性^[33], 但大多数子囊菌的生物学功能尚不明确, 故很有必要进一步研究它们在土壤肥力、生产力和作物病害发生中的重要作用。在土壤真菌属水平的物种丰度分析中, 共检测出 109 个已知真菌属, 丰度前 30 热图分析中, Unclassified (未知)的真菌属在各个施肥处理中均占较大比例, 表明真菌属水平物种分类在现有的分析方法中还需进一步研究; *Humicola*、*Fusarium*、*Verticillium* 和 *Mortierella* 这 4 个菌属为优势菌属, 说明施肥对这 4 个菌属影响不大。*Verticillium* 菌属在 NK、N 两个施肥处理中相对丰度较低, 说明施用氮肥对 *Verticillium* 菌属影响较大; *Humicola* 在 NPK+S0.50 施肥处理条件下丰度较低, 其余多数真菌属在不同样品中的丰度具有相似性。*Chaetomium*、*Trichocladium*、*Podospora* 和 *Preussia* 4 个菌属在 PK+S0.25、PK+S0.50、NPK+S0.25、NPK+S0.50 丰度较高, 并同属一个分支聚类; 说明秸秆配施化肥对 *Chaetomium*、*Trichocladium*、*Podospora* 和 *Preussia* 4 个菌属影响大致相同。

在 Alpha(α)多样性分析结果显示, 在单施钾肥(K)处理下物种丰度和群落多样性最低, 表明长期单施 K 肥处理会降低土壤真菌的多样性。在 Bate(β)多样性分析中, 通过 Heatmap 分析可知, 单施钾肥(K)处理的真菌群落结构与其他处理之间存在较大的差异, 施用氮肥处理(N、NK、NP、NPK)的样本之间群落差异较小, 而与未施用氮肥处理间差异较大, 可以说明施用氮肥导致了真菌群落间存在较大差异。土壤微生物群落多样性及组成的变化与作物类型、施肥等因素相关^[34], 研

究表明,施用氮肥影响了土壤微生物群落的组成。

在 RDA 分析中,大量研究表明,环境中某些理化因子例如 pH、有机质(SOM)和全氮(T-N)等影响微生物群落结构^[35-37]。通过土壤理化性质与真菌组成的 RDA 分析,可以知道土壤理化性质影响土壤真菌群落结构,尤其是土壤的 pH、全量氮磷钾(T-N、T-P、T-K)、有效磷钾(A-P、A-K)和铵态氮(NH₄⁺-N)浓度是重要环境因素。影响真菌群落结构的主要理化性质为 pH,这可能是和土壤养分物质存在的形式有关系,土壤中养分物质存在形式又与施肥有相关性,施用氮肥影响了土壤的酸碱性,使土壤酸化严重。

4 结论

在长期施肥条件下通过分析得出以下结论,施用氮肥降低了土壤 pH,使土壤酸化,但可以明显增加玉米产量;秸秆与化肥配施增加土壤养分,特别是有机质和土壤全氮;长期施肥降低了土壤真菌序列的丰度和均匀度,并且在秸秆与化肥配施中序列数最低;在真菌门水平优势菌群中,子囊菌门(Ascomycota) 占总序列平均值的 57.0%,并且在氮磷钾配施高量秸秆(NPK+S0.50)的土壤中,子囊菌门高达 70.35%。在土壤真菌属水平的物种丰度分析中,共检测出 109 个已知真菌属, *Humicola*、*Fusarium*、*Verticillium* 和 *Mortierella* 这 4 个菌属为优势菌属; *Chaetomium*、*Trichocladium*、*Podospora* 和 *Preussia* 4 个菌属在 PK+S0.25、PK+S0.50、NPK+S0.25、NPK+S0.50 丰度较高,并同属一个分支聚类。多样性指数分析可知,秸秆与化肥配施可以增加物种丰度和群落多样性;热图分析可知,是否施用氮肥处理间真菌群落组成存在明显差异。RDA 分析中,土壤

理化性质影响着土壤真菌群落结构,尤其是土壤的 pH、全量氮磷钾(T-N、T-P、T-K)、有效磷钾(A-P、A-K)和铵态氮(NH₄⁺-N)浓度是重要环境因素。研究表明,施用氮肥虽然增加了产量,但也造成土壤酸化,真菌数量增加,其丰富度和多样性明显降低,而秸秆与化肥配施可以维持土壤健康生态环境和真菌群落多样性。

参考文献

- [1] Wang F, Lin C, Li QH, He CM, Li Y, Lin XJ. Effects of long-term fertilization on rice grain qualities and soil fertility factors in yellow paddy fields of southern China. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2011, 17(2): 283-290. (in Chinese)
王飞, 林诚, 李清华, 何春梅, 李昱, 林新坚. 长期不同施肥对南方黄泥田水稻子粒品质性状与土壤肥力因子的影响. *植物营养与肥料学报*, 2011, 17(2): 283-290.
- [2] Liang B, Yang XY, He XH, Zhou JB. Effects of 17-year fertilization on soil microbial biomass C and N and soluble organic C and N in loessial soil during maize growth. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47(2): 121-128.
- [3] Ma NN, Li TL, Wu CC, Zhang EP. Effects of long-term fertilization on soil enzyme activities and soil physicochemical properties of facility field. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(7): 1766-1771. (in Chinese)
马宁宁, 李天来, 武春成, 张恩平. 长期施肥对设施菜田土壤酶活性及土壤理化性状的影响. *应用生态学报*, 2010, 21(7): 1766-1771.
- [4] Ge GF, Li ZJ, Fan FL, Chu GX, Hou ZN, Liang YC. Soil biological activity and their seasonal variations in response to long-term application of organic and inorganic fertilizers. *Plant and Soil*, 2010, 326(1/2): 31-44.
- [5] Sun J, Liu M, Li LJ, Liu JH. The effect of different fertilization treatments on soil physical and chemical property. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2010, 25(4): 221-225. (in Chinese)
孙建, 刘苗, 李立军, 刘景辉. 不同施肥处理对土壤理化性质的影响. *华北农学报*, 2010, 25(4): 221-225.
- [6] Pan FX, Lu JW, Liu W, Geng MJ, Li XK, Cao WD. Effect of different green manure application on soil fertility. *Plant*

- Nutrition and Fertilizer Science*, 2011, 17(6): 1359–1364. (in Chinese)
潘福霞, 鲁剑巍, 刘威, 耿明建, 李小坤, 曹卫东. 不同种类绿肥翻压对土壤肥力的影响. *植物营养与肥料学报*, 2011, 17(6): 1359–1364.
- [7] Alijani K, Bahrani MJ, Kazemeini SA. Short-term responses of soil and wheat yield to tillage, corn residue management and nitrogen fertilization. *Soil Tillage Research*, 2012, 124: 78–82.
- [8] Li CF, Yang J, Zhang C, Zhang ZS, Zheng M, Ahmad S, Cao CG. Effects of short-term tillage and fertilization on grain yields and soil properties of rice production systems in central China. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 2010, 8(2): 577–584.
- [9] Chen DM, Duan YQ, Yang YH, Jin Y, Huang JG, Yuan L. Effects of long-term fertilization on flue-cured tobacco soil nutrients and microorganisms community structure. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(17): 3424–3433. (in Chinese)
陈丹梅, 段玉琪, 杨宇虹, 晋艳, 黄建国, 袁玲. 长期施肥对植烟土壤养分及微生物群落结构的影响. *中国农业科学*, 2014, 47(17): 3424–3433.
- [10] Yu XY, Zhai BN, Jin ZY, Li YG, Wang Y, Zhang HQ, Wang ZH. Effect of combined application of organic and inorganic fertilizers on winter wheat yield, water and fertilizer use efficiency and soil fertility in dryland. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2015, 29(5): 320–324. (in Chinese)
于昕阳, 翟丙年, 金忠宇, 李永刚, 王颖, 张昊青, 王朝辉. 有机无机肥配施对旱地冬小麦产量、水肥利用效率及土壤肥力的影响. *水土保持学报*, 2015, 29(5): 320–324.
- [11] Zhang W, Xu JJ, Zhang TY. Advancement on soil fungal research. *Journal of Fungus Research*, 2005, 3(2): 52–58. (in Chinese)
张伟, 许俊杰, 张天宇. 土壤真菌研究进展. *菌物研究*, 2005, 3(2): 52–58.
- [12] Kang ZS. Current status and development strategy for research on plant fungal diseases in China. *Plant Protection*, 2010, 36(3): 9–12. (in Chinese)
康振生. 我国植物真菌病害的研究现状及发展策略. *植物保护*, 2010, 36(3): 9–12.
- [13] Kennedy AC, Smith KL. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil*, 1995, 170(1): 75–86.
- [14] Alguacil MM, Torrecillas E, Caravaca F, Fernández DA, Azcón R, Roldán A. The application of an organic amendment modifies the arbuscular mycorrhizal fungal communities colonizing native seedlings grown in a heavy-metal-polluted soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(7): 1498–1508.
- [15] Wang Y, Li J, Cao ZP, Yang HF. Effects of long-term fertilization on soil fungi. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2014, 22(11): 1267–1273. (in Chinese)
王轶, 李季, 曹志平, 杨合法. 长期施肥对农田土壤真菌的影响. *中国生态农业学报*, 2014, 22(11): 1267–1273.
- [16] Duan Z, Xiao W, Wang YX, Lai YH, Cui XL. Application of 454 sequencing technique in microbial ecology. *Journal of Microbiology*, 2011, 31(5): 76–81. (in Chinese)
段翌, 肖炜, 王永霞, 赖泳红, 崔晓龙. 454 测序技术在微生物生态学研究中的应用. *微生物学杂志*, 2011, 31(5): 76–81.
- [17] Chen DM, Yuan L, Huang JG, Ji JH, Hou HQ, Liu YR. Influence of long-term fertilizations on nutrients and fungal communities in typical paddy soil of South China. *Acta Agronomica Sinica*, 2017, 43(2): 286–295. (in Chinese)
陈丹梅, 袁玲, 黄建国, 冀建华, 侯红乾, 刘益仁. 长期施肥对南方典型水稻土养分含量及真菌群落的影响. *作物学报*, 2017, 43(2): 286–295.
- [18] 中国土壤学会农业化学专业委员会. 土壤农业化学常规分析方法. 北京: 科学出版社, 1983: 105–107.
- [19] 史热和, 鲍士旦. 土壤农化分析. 北京: 农业出版社, 1980.
- [20] Wang JC, Zhang L, Lu Q, Raza W, Huang QW, Shen QR. Ammonia oxidizer abundance in paddy soil profile with different fertilizer regimes. *Applied Soil Ecology*, 2014, 84: 38–44.
- [21] Wang JC, Song Y, Ma TF, Raza W, Li J, Howland JG, Huang QW, Shen QR. Impacts of inorganic and organic fertilization treatments on bacterial and fungal communities in a paddy soil. *Applied Soil Ecology*, 2017, 112: 42–50.
- [22] Mazzoncini M, Sapkota TB, Barberi P, Antichi D, Risaliti R. Long-term effect of tillage, nitrogen fertilization and cover crops on soil organic carbon and total nitrogen content. *Soil and Tillage Research*, 2011, 114(2): 165–174.
- [23] Liu YJ, Shi GX, Mao L, Cheng G, Jiang SJ, Ma XJ, An LZ, Du GZ, Johnson NC, Feng HY. Direct and indirect influences of 8 yr of nitrogen and phosphorus fertilization on glomeromycota in an alpine meadow ecosystem. *New*

- Phytologist*, 2012, 194(2): 523–535.
- [24] Zhang BY, Chen TL, Wang B. Effects of long-term uses of chemical fertilizers on soil quality. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(11): 182–187. (in Chinese)
张北赢, 陈天林, 王兵. 长期施用化肥对土壤质量的影响. *中国农学通报*, 2010, 26(11): 182–187.
- [25] Lin ZA, Zhao BQ, Yuan L, Hwat BS. Effects of organic manure and fertilizers long-term located application on soil fertility and crop yield. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(8): 2809–2819. (in Chinese)
林治安, 赵秉强, 袁亮, Hwat BS. 长期定位施肥对土壤养分与作物产量的影响. *中国农业科学*, 2009, 42(8): 2809–2819.
- [26] Xu ZX. Influences of consecutive 13-year long-term fertilization on yields of rice and wheat and soil fertility in Xihu Plain. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2011, 17(1): 16–21. (in Chinese)
徐祖祥. 西湖平原区连续 13 年定位施肥对麦、稻产量及土壤肥力的影响. *植物营养与肥料学报*, 2011, 17(1): 16–21.
- [27] Liang YZ, Tong LP, Wu DL, Guo QK, Xu FH, Zhao JK. Effects of organic manure combined with inorganic fertilizer on soil nitrate, maize yield and N use efficiency. *Journal of Maize Sciences*, 2017, 25(4): 111–116 (in Chinese)
梁元振, 仝利朋, 吴德亮, 郭乾坤, 徐凤花, 赵京考. 有机无机肥配施对土壤硝态氮、玉米产量和氮素利用率的影响. *玉米科学*, 2017, 25(4): 111–116.
- [28] Liu ZY, Fang XQ, Du DH, Lv DC, Zhao FQ, Yu ZF, Wang ZG. Effects of different nitrogen rates on yield and output of Jidan 631 maize in Huadian City. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2017, (18): 13, 15. (in Chinese)
刘志友, 方向前, 杜佃河, 吕端春, 赵凤琴, 于钟富, 王兆刚. 桦甸市不同施氮量对吉单 631 玉米产量及产值的影响. *现代农业科技*, 2017, (18): 13, 15.
- [29] Tang G, Wang CM, Huang WC, Pan ZT, Zhang Y. Effects of application levels of nitrogen fertilizer and method of top dressing to yield, dry matter weight and LAI of maize. *Hunan Agricultural Sciences*, 2016, (8): 49–51, 54. (in Chinese)
唐谷, 汪朝明, 黄文彻, 潘中涛, 张毅. 氮肥施用量及追肥方式对玉米产量、干物质及 LAI 的影响. *湖南农业科学*, 2016, (8): 49–51, 54.
- [30] Lu HP. Effects of nitrogen dosage and density on yield singly planted maize. *Ningxia Journal of Agriculture and Forestry Science & Technology*, 2015, 56(12): 7–8. (in Chinese)
芦红萍. 氮肥施用量与密度对单种玉米产量的影响. *宁夏农林科技*, 2015, 56(12): 7–8.
- [31] Li J, Cooper JM, Lin ZA, Li YT, Yang XD, Zhao BQ. Soil microbial community structure and function are significantly affected by long-term organic and mineral fertilization regimes in the North China Plain. *Applied Soil Ecology*, 2015, 96: 75–87.
- [32] 张洋. 不同施肥条件下黄瓜连作土壤微生物多样性分析. 扬州大学硕士学位论文, 2016.
- [33] Wang HY, Guo SY, Huang MR, Lumbsch HT, Wei JC. Ascomycota has a faster evolutionary rate and higher species diversity than Basidiomycota. *Science China Life Sciences*, 2010, 40(8): 731–737.
王海英, 郭守玉, 黄满荣, Lumbsch HT, 魏江春. 子囊菌较担子菌具有更快的进化速率和更高的物种多样性. *中国科学: 生命科学*, 2010, 40(8): 731–737.
- [34] Berg G, Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 68(1): 1–13.
- [35] Kan JJ, Clingenpeel S, Dow CL, McDermott TR, Macur RE, Inskeep WP, Nealson KH. Geochemistry and mixing drive the spatial distribution of free-living Archaea and Bacteria in Yellowstone Lake. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 210.
- [36] Gao PK, Tian HM, Wang YS, Li YS, Li Y, Xie JX, Zeng B, Zhou JF, Li GQ, Ma T. Spatial isolation and environmental factors drive distinct bacterial and archaeal communities in different types of petroleum reservoirs in China. *Scientific Reports*, 2016, 6: 20174.
- [37] Garcia-Pichel F, Loza V, Marusenko Y, Mateo P, Potrafka RM. Temperature drives the continental-scale distribution of key microbes in topsoil communities. *Science*, 2013, 340(6140): 1574–1577.

Effects of long-term different fertilization on soil fungal communities in black soil based on the Illumina MiSeq platform

Junnan Wu^{1,2}, Yuxin Liu^{1,2}, Xue Zhou^{1,2}, Tianye Wang^{1,2}, Qiang Gao^{1,2}, Yunhang Gao³, Shuxia Liu^{1,2*}

¹ College of Resource and Environmental Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin Province, China

² Key Laboratory of Soil Resource Sustainable Utilization for Jilin Province Commodity Grain Bases, Changchun 130118, Jilin Province, China

³ College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin Province, China

Abstract: [Objective] Soil environmental problems caused by irrational fertilization are gradually becoming one of the important factors that restrict the sustainable development of agriculture in China. Soil fungi is a kind of important microorganisms in soil. Hence, it is significant to study the diversity and community distribution patterns of soil fungi under long-term fertilization and investigate the physical and chemical factors on the fungal community structure. [Methods] The black soil under the long-term fertilization experiment (1984–2017) in the northeast of China was adopted to be analyzed by routine analysis and Illumina MiSeq high-throughput sequencing. And then, the effects of long-term fertilization on soil nutrient contents and fungal community structures in black soil corn fields were studied. [Results] The results showed that the long-term application of nitrogen fertilizer significantly decreased pH in soil, but increased the yield of maize. The combined application of straw and fertilizer can increase the content of soil organic matter and total nitrogen. The results of operational taxonomic units (OTU) curves showed that the long-term fertilization reduced the abundance and evenness of soil fungal sequences, and there was the lowest sequence number in the combined application of straw and fertilizer. Among the dominant communities, it has been found a total of five known fungal Phylum, Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Chytridiomycota. Among of them, Ascomycota accounted for not only 57.0% in the average of the total sequence, but also 70.35% in the soils with Fertilizer add high amount of straw treatment (NPK+S0.5). In the analysis of species abundance in soil fungal genus level, it has detected 109 known fungi. *Humicola*, *Fusarium*, *Verticillium* and *Mortierella* were the dominant genus. In addition to that, it was found that the abundance of *Chaetomium*, *Trichocladium*, *Podospora* and *Preussia* were high in the combined application of straw and fertilizer, and it all belong to a branch cluster. According to the analysis of diversity index, it can suggest that the combined application of straw and fertilizer can increase species abundance and community diversity. According to the Heatmap analysis, it can indicate that there were obviously different in the fungal community between the nitrogenous and non-nitrogenous fertilizers. In Redundancy analysis (RDA), the soil physical and chemical properties affected the community structure of soil fungi, especially soil pH, total nitrogen, total phosphorus and total potassium (TN, TP, TK), available phosphorus and available potassium (AP, AK) and ammonium nitrogen ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) is an important environmental factor. [Conclusion] The application of nitrogen fertilizer increased the yield. however, it caused soil acidification. Meanwhile, the application of nitrogen fertilizer increase the number of fungi, but the richness and diversity of fungi was decreased. Nevertheless, the combined application of straw and fertilizer can maintain soil healthy ecological environment and fungal community diversity.

Keywords: long-term fertilization, black soil, fungal community, high-throughput sequencing

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Key R&D Project Sub-Project, China (2017YFD0300405-4), by the Natural Science Foundation of Jilin Province, China (20170101077JC), by the Jilin Province Science and Technology Development Plan Item (20160307006NY) and by the Modern Agricultural Industry Technology System (nycytx-38)

*Corresponding author. E-mail: liushuxia69@163.com

Received: 19 December 2017; Revised: 19 March 2018; Published online: 26 April 2018