



# 供磷水平和根际效应协同影响含碱性磷酸酶基因细菌群落的网络复杂性和稳定性

苏卫华<sup>1,3</sup>, 李昊明<sup>1</sup>, 张春燕<sup>1</sup>, 陈新平<sup>1,2</sup>, 郎明<sup>1,2\*</sup>

1 西南大学资源环境学院 重庆市土肥资源高效利用重点实验室, 重庆 400715

2 西南大学长江经济带农业绿色发展研究中心, 重庆 400716

3 中国科学院南京土壤研究所, 江苏 南京 210008

苏卫华, 李昊明, 张春燕, 陈新平, 郎明. 供磷水平和根际效应协同影响含碱性磷酸酶基因细菌群落的网络复杂性和稳定性[J]. 微生物学报, 2023, 63(7): 2776-2790.

SU Weihua, LI Haoming, ZHANG Chunyan, CHEN Xinping, LANG Ming. Phosphorus gradient fertilization and rhizosphere effect co-determine *phoD*-harboring bacterial network complexity and stability[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2776-2790.

**摘要:**【目的】通过研究长期不同供磷水平下根际、土体土壤中编码碱性磷酸酶基因(alkaline phosphatase gene, *phoD*)细菌群落特征、网络复杂性、群落的稳定性及其与磷酸酶活性之间的关系, 揭示供磷水平和根际效应在调控土壤有机磷矿化中的微生物学机制。【方法】选取华北平原长期施磷的小麦-玉米轮作体系石灰性土壤为基质土壤, 开展根箱试验。选取的试验处理包括3个供磷水平, 分别是0、50.0、200.0 kg P/hm<sup>2</sup> (分别表示为P0、P50、P200)。玉米种子播种30 d后, 采集玉米的根际土和土体土。采用高通量测序技术分析根际和土体土壤中编码碱性磷酸酶基因(*phoD*)细菌群落, 探究施肥及根际效应对含*phoD*基因细菌的群落特征、网络特征的影响及其与磷酸酶活性的关系。【结果】随着施磷量的增加, 速效磷(available P, AP)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性在根际、土体土壤中均显著提高, 且两者呈显著正相关。*phoD*基因丰度在P0、P200处理的根际土壤中显著高于土体土壤。含*phoD*基因细菌群落的α多样性在P50处理下的根际土壤显著高于土体土壤。冗余分析(redundancy analysis, RDA)表明, 土壤中AP、有机磷(organic P, Po)和全磷(total P, Pt)是影响微生物群落的主要因素。与不施磷处理(P0)相比, 施磷处理(P50、P200)下根际土壤中网络节点数和连接数降低, 而土体土壤中网络节点数和连接数增加; 同

资助项目: 国家自然科学基金(32002126, 32272800); 中央高校基本科研业务费(SWU-KR22010); 国家玉米产业体系(CARS-02)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32002126, 32272800), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (SWU-KR22010), and the National Maize Production System in China (CARS-02).

\*Corresponding author. E-mail: langming@swu.edu.cn

Received: 2022-10-27; Accepted: 2023-01-11; Published online: 2023-02-22

时, 施磷处理含 *phoD* 基因细菌群落的鲁棒性(robustness)在根际土壤中显著提高, 而在土体土壤中显著降低。Mantel 检验表明, 含 *phoD* 基因微生物群落中的优势物种在根际土壤与 AP、酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)、内聚力(cohesion)和网络的鲁棒性显著相关, 在土体土壤中无显著性。

【结论】供磷水平及根际效应协同影响 *phoD* 基因丰度、含 *phoD* 基因细菌群落的  $\alpha$  多样性、群落结构、优势物种、网络的复杂性及群落的稳定性, 进而影响磷酸酶活性, 调控了土壤中有机磷的矿化。

关键词: 磷肥; 根际; *phoD* 基因; 网络特征; 群落稳定性

## Phosphorus gradient fertilization and rhizosphere effect co-determine *phoD*-harboring bacterial network complexity and stability

SU Weihua<sup>1,3</sup>, LI Haoming<sup>1</sup>, ZHANG Chunyan<sup>1</sup>, CHEN Xinping<sup>1,2</sup>, LANG Ming<sup>1,2\*</sup>

1 Chongqing Key Laboratory of Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources, College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Interdisciplinary Research Center for Agriculture Green Development in Yangtze River Basin, Southwest University, Chongqing 400716, China

3 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, Jiangsu, China

**Abstract:** [Objective] This study explored the characteristics, network complexity and stability of the bacterial community harboring the alkaline phosphatase gene (*phoD*) and the phosphatase activity in rhizosphere and bulk soils under long-term gradient phosphorus (P) fertilization, aiming to reveal the microbial mechanism of P fertilization and rhizosphere effect in regulating soil organic P mineralization. [Methods] The calcareous soil of wheat-maize rotation system with long-term gradient P application in North China Plain was selected for the rhizobox experiments. We designed three P fertilization levels: 0, 50, and 200 kg P/hm<sup>2</sup> (P0, P50, and P200, respectively). The rhizosphere and bulk soils were collected 30 days after the sowing of maize seeds. High-throughput sequencing was carried out to analyze the *phoD*-harboring bacterial community, which helped reveal the effects of P gradient fertilization and rhizosphere effect on the community and network characteristics of *phoD*-harboring bacteria and their relationship with phosphatase activity. [Results] With the increase in P application, available P (AP) and alkaline phosphatase (ALP) activity increased significantly, which were significantly positively correlated with each other. Under P0 and P200 treatments, the abundance of *phoD* in the rhizosphere soil was significantly higher than that in the bulk soil. Under P50 treatment, the alpha diversity of the *phoD*-harboring bacterial community in the rhizosphere soil was significantly higher than that in the bulk soil. The redundancy analysis (RDA) showed that AP, organic P (Po), and total P (Pt) were the main factors affecting the *phoD*-harboring bacterial community. Compared with P0 treatment, P50 and P200 reduced the total nodes and edges and increased the robustness of the bacterial network in rhizosphere soil,

while they increased the total nodes and edges and decreased the robustness of the bacterial network in the bulk soil. The Mantel test showed that the dominant taxa of *phoD*-harboring bacteria were significantly correlated with AP, acid phosphatase (ACP), cohesion, and network robustness in rhizosphere soil, while the correlations were not significant in the bulk soil. **[Conclusion]** P gradient fertilization and rhizosphere effect co-affected the abundance of *phoD*, alpha diversity, community structure, dominant taxa, network complexity, and stability of *phoD*-harboring bacteria, which further affected phosphatase activity and consequently regulated the mineralization of organic P.

**Keywords:** phosphorus fertilizer; rhizosphere; *phoD*; network characteristics; community stability

磷素是农田系统中限制作物产量提高的重要因素之一<sup>[1-2]</sup>, 磷肥施用是保证粮食安全及农业可持续发展的重要措施<sup>[3]</sup>。然而, 集约化农田生态系统中长期过量的磷肥投入且当季利用率低, 造成土壤中磷素的大量积累, 导致土壤中全磷含量高, 其中有机磷约占土壤全磷的 40%<sup>[4-5]</sup>。与无机磷相比, 有机磷的形态组成复杂, 其矿化和利用与土壤微生物紧密相关。深入理解微生物在有机磷矿化过程的调控作用, 是高效利用土壤累积磷的关键。

微生物分泌的碱性磷酸酶是土壤中有机磷矿化的重要酶类<sup>[6]</sup>。其中, *phoD* 是微生物编码碱性磷酸酶的关键基因, 在陆地生态系统中占主导地位<sup>[7]</sup>。研究表明, 供磷水平显著影响含 *phoD* 基因细菌群落, 在筒育淋溶土中, 随着供磷水平的提高(0、30、60 kg P/hm<sup>2</sup>), 含 *phoD* 基因细菌群落的  $\alpha$  多样性显著提高<sup>[8]</sup>; 在石灰性土壤中, 长期适磷处理(50 kg P/hm<sup>2</sup>)提高了含 *phoD* 基因细菌群落的  $\alpha$  多样性, 而高磷处理(200 kg P/hm<sup>2</sup>)则降低了含 *phoD* 基因细菌群落的  $\alpha$  多样性<sup>[9]</sup>; 在黄壤中, 随着供磷水平的提高(0、50、100、150、200 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/hm<sup>2</sup>), 含 *phoD* 基因细菌群落的  $\alpha$  多样性不变<sup>[10]</sup>。表明供磷水平对含 *phoD* 基因细菌群落的影响还和土壤类型或其他因素有关。此外, 根际是微生物分布的热点区域, 植物根系通过分泌物质形成独特

的生态位招募特定的微生物<sup>[11-12]</sup>。利用酶谱法原位测定土壤酶活性, 同时采集相应的土壤样品, 测定土壤中功能微生物的群落和丰度特征, 可以相对准确地揭示功能微生物群落结构和丰度与酶活性之间的关系<sup>[13-15]</sup>。之前的研究发现, 在种植大豆的酸性土壤中, 根际 *phoD* 丰度与碱性磷酸酶的活性呈显著正相关<sup>[16]</sup>。因此, 在特定的体系下, 明确供磷水平和根际效应对含 *phoD* 基因微生物的丰度和群落结构特征的影响, 是高效利用土壤中有机磷的基础。

土壤微生物之间复杂的相互作用可用网络结构表征, 网络结构的复杂性会进一步影响微生物群落的稳定性<sup>[17]</sup>。研究表明, 供磷水平和根际效应显著影响含 *phoD* 细菌群落的生态网络特征。相比施磷处理(120 kg P/hm<sup>2</sup>), 在缺磷(0 kg P/hm<sup>2</sup>)水稻土中, 含 *phoD* 基因细菌群落的生态网络连接数、负相关关系增多<sup>[18]</sup>。在长期种植玉米的黄壤中发现, 相比低磷处理(0、50 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/hm<sup>2</sup>), 根际高磷处理(150、200 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/hm<sup>2</sup>)下含 *phoD* 基因细菌群落的生态网络拓扑系数(topological coefficient)及连接数更高<sup>[10]</sup>。在喀斯特土壤种植玉米、苜蓿、莎草的根箱试验中, 根际含 *phoD* 细菌群落网络的连接数、正相关关系显著大于土体土壤<sup>[13]</sup>。另外, 微生物网络的复杂性与群落的稳定性密切相关<sup>[19]</sup>, 有研究发现, 相比于根际土壤, 小麦

土体土壤中微生物网络节点数、连接数、模块数更高,但鲁棒性(robustness)更低,表明微生物间复杂的相互作用可能减弱了群落的稳定性<sup>[20]</sup>。因此,明确供磷水平及根际效应对含 *phoD* 基因细菌群落的复杂性与稳定性的影响,进而探究其对磷酸酶活性的影响,对于深入理解含 *phoD* 基因细菌群落对有机磷矿化的调控作用至关重要。

本研究以河北曲周潮土为研究对象,选取长期不同供磷水平的土壤开展根箱试验,探究长期不施磷、适量施磷、高磷处理下根际、土体土壤中含 *phoD* 基因细菌群落的多样性、结构、组成、网络的复杂性、群落的稳定性及其与磷酸酶活性之间的关系,为利用生物学手段提高磷素的利用率提供科学依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验地概况

根箱试验土壤采集于河北省曲周县长期定位试验站(始于2008年)。当地属于暖温带大陆性季风气候,土壤类型为石灰性土壤。试验开始时,耕层土壤的基本理化性质为:土壤质地为砂壤,土壤pH 7.3,有机质 10.3 mg/kg,全氮 0.67 g/kg,有效磷(Olsen P)<sup>[21]</sup> 7.0 mg/kg,交换性钾 74 mg/kg。试验地为冬小麦-夏玉米轮作体系。2008–2009年冬小麦施磷量 0、12.5、25、50、75 和 100 kg P/hm<sup>2</sup>,夏玉米施磷量为 0、6.25、12.5、25、37.5 和 50 kg P/hm<sup>2</sup>。2009年7月之后调整为小麦季 0、25、50、100、200 和 400 kg P/hm<sup>2</sup>,玉米季 0、12.5、25、50、100 和 200 kg P/hm<sup>2</sup>。所有磷肥均为过磷酸钙。每个处理有4个重复,随机区组试验设计,小区面积为 43.2 m<sup>2</sup> (5.4 m×8 m)。播种前分别施 75 kg/hm<sup>2</sup> 尿素和 50 kg/hm<sup>2</sup> 硫酸钾,小麦在拔节期追施 150 kg/hm<sup>2</sup> 尿素,玉米在12叶期追施等量尿素,不同磷肥处理小区施用的氮肥量、钾肥量保持一致。本

研究以2009年7月以后夏玉米施磷量为基础划分采集样品的供磷水平。

### 1.2 样品采集

土壤样品采集于2019年玉米V6期(拔节期),采集施磷量为 0 (P0)、50 (P50)、200 (P200) kg P/hm<sup>2</sup> 三个供磷水平耕层(0–20 cm) 土样,每个小区采用S型取样法,采集5个点混合后作为1个样品。新鲜土壤运回实验室后风干,过2 mm 筛,用作根箱试验基质土。

### 1.3 试验设置

将3个供磷水平(P0、P50和P200)基质土壤装在根箱(25 cm×25 cm×2.3 cm)中,每个处理设置4个重复。玉米品种为郑单958。采用称重法选取大小一致的玉米种子,用10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液消毒30 min后,浸泡于通气的饱和CaSO<sub>4</sub> 中48 h,取出后放置在湿润的滤纸盘中,避光催芽72 h后播种,每个根箱种植1颗玉米种子,于日光温室中进行培养。根箱保持45°倾斜使根系沿下板生长(贴壁生长),方便采集根际土壤和土体土壤。试验过程中每天采用称重法浇水,保证土壤水分含量为田间最大持水量的60%。

### 1.4 根箱试验土壤样品采集及指标测定

#### 1.4.1 土壤样品采集

参考Ma等<sup>[22]</sup>和刘玉槐等<sup>[23]</sup>在玉米、水稻中区分根际和土体的方法,认定离根2–3 mm 区域为根际微生物活动的热点区域,并定义为根际土,其余为土体土。玉米生长30 d后,打开根箱侧壁,用消毒后的镊子和刀片采集根际土和土体土,避免交叉污染。将采集的土样分为两部分,其中一部分风干过筛后用于化学性质和酶活性的测定;另一部分土样保存于–80 °C,用于后续微生物功能基因的定量和高通量测序。

#### 1.4.2 土壤化学性质及磷酸酶测定

将土壤样品风干,过1 mm 筛用于土壤化学性质[包括速效磷(available P, AP)、全氮(total N, TN)、Po、Pt]的测定,过0.25 mm 筛用作土

壤有机碳(soil organic carbon, SOC)的测定。AP用0.5 mol/L NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.5)浸提后,用钼锑抗比色法测定<sup>[21]</sup>; Pt用硫酸-高氯酸消煮,钼锑抗比色法测定; Po用灼烧法测定<sup>[24]</sup>; 土壤 TN用改进克氏法和外加热法测定,土壤 SOC用重铬酸钾容量法-外加热法测定。参考 Tabatabai<sup>[25]</sup>描述的方法,通过测定对硝基苯基磷酸盐(PNPP)的释放量来估算土壤酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)和碱性磷酸酶活性(alkaline phosphatase, ALP)活性。

#### 1.4.3 土壤 DNA 抽提及 *phoD* 基因荧光定量 PCR 分析

称取0.5 g新鲜土壤样品,采用FastDNA<sup>®</sup> Spin Kit (MP Biomedicals)试剂盒提取土壤 DNA,用1%的琼脂糖凝胶电泳检验提取的 DNA 质量,使用 NanoPhotometer 检测 DNA 的浓度和纯度,放入-20 °C冰箱用于后续分析。

使用 ABI 7500 Cycle 实时荧光定量系统 (Applied Biosystems)定量分析 *phoD* 基因的丰度。用于 *phoD* 基因 qPCR 的引物分别为 ALPS-F730 (5'-CAGTGGGACGACCACGAGGT-3')和 ALPS-1101 (5'-GAGGCCGATCGGCATGTCTG-3')<sup>[7,26]</sup>, 扩增片段大小为 371 bp。每个 qPCR 反应体系为 20 μL, 包括 2 μL 总 DNA 模板, 10 μL SYBR Premix Ex Taq<sup>™</sup>, 0.8 μL 正向引物, 0.8 μL 反向引物, 0.4 μL ROX Reference Dye II (50×)和 6 μL 灭菌水(ddH<sub>2</sub>O)。qPCR 反应条件为 95 °C 30 s, 其后 40 个循环的反应条件为 95 °C 5 s, 60 °C 34 s。将扩增的 *phoD* 基因片段连接在载体上克隆, 测序验证后选取质粒作为标准品, 之后用 ddH<sub>2</sub>O 进行连续 10 倍的稀释制作标准曲线。*phoD* 基因扩增的效率为 95%–110%,  $R^2$  为 0.994–0.998。

#### 1.4.4 Illumina MiSeq 测序

使用 Illumina MiSeq 平台对引物 ALPS-F730、ALPS-1101 扩增的 PCR 产物进行双端测序, 利

用 Trimmomatic 软件对原始测序序列质控。利用 DADA2 对优化序列进行序列降噪, 获得扩增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV)。利用 RDP Classifier (ribosomal database project)为每个 ASV 序列代表序列分类注释。原始序列已保存在 NCBI 数据库中, 登记号为 PRJNA890879。

#### 1.5 数据处理

采用单因素方差分析分别计算根际、土体土壤在不同供磷水平下土壤化学性质(SOC、TN、TP、Po、AP)、ACP、ALP、*phoD* 基因拷贝数、微生物群落组成的相对丰度和  $\alpha$  多样性的显著性; 同时, 用对照样本  $t$  检验比较根际和土体土壤相应指标的显著性差异, 在 5%水平上利用 Duncan 检验比较。统计分析基于 SPSS (version 20)和 R 软件(3.3.1 版本)。基于 ASV 丰度矩阵, 利用 R 软件的“Vegan”包计算  $\alpha$  多样性数据, 包括 *phoD* 的丰富度(ASV number)和香农指数(Shannon)。在 ASV 水平上基于 Bray-Curtis 距离进行含 *phoD* 基因的群落结构的主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)。利用“Vegan”包, 在细菌的 ASV 水平上进行冗余分析(redundancy analysis, RDA), 研究土壤化学性质与含 *phoD* 基因的群落结构之间的关系。

筛选出相对丰度大于 0.01%的 ASV 在根际、土体土壤中 3 个供磷水平下构建网络, 并用 SparCC 计算相关系数, 筛选出  $|R|>0.65$ ,  $P<0.05$  的数据进行网络构建, 并在 Gephi 中可视化。计算网络的拓扑参数, 包括节点数、连接数、模块化、平均聚类系数(average clustering coefficient)、平均路径长度(average path length)等。此外, 用内聚力(cohesion)可以计算微生物群落中的连通性<sup>[27]</sup>。模拟随机去除微生物网络 50%节点后, 计算剩余分类群的比例, 用鲁棒性指数来表示微生物群落的稳定性<sup>[28]</sup>。

将相对丰度大于 1%的物种定义为优势物

种, 利用 Spearman 分析磷酸酶活性与土壤化学性质之间的相关性, 利用 Mantel 检验分析含 *phoD* 基因细菌的优势物种与 ACP、ALP 活性、土壤化学性质、内聚力(正负 cohesion 比)、鲁棒性指数的相关性。以 R 中的“Vegan”“plsrm”包构建偏最小二乘路径模型(artial least squares path model, PLS-PM), 明确供磷水平、土壤化学性质、含 *phoD* 细菌群落结构、内聚力、网络稳定性与磷酸酶活性之间的关系。其中, 以 PCoA 分析的第一主成分(PC1)、第二主成分(PC2)作为含 *phoD* 细菌群落结构的指标, 内聚力以正负 cohesion 比值代表, 鲁棒性指数代表网络稳定性。

## 2 结果与分析

### 2.1 供磷水平和根际效应对土壤化学性质及磷酸酶活性的影响

随着施磷量的增加, AP 和 Pt 呈显著增加的趋势, Po 呈先不变后显著增加的趋势; TN 随供磷水平的增加, 先增加后不变; SOC 在不同磷水平下无显著性变化(表 1)。随着施磷量增加, ALP 呈现先不变后显著增加的趋势, 土体土壤中 ALP 显著高于根际土壤(图 1A)。ACP 在不同磷水平下无显著性差异, 根际土壤中 ACP 活性高于土体土壤(图 1B)。

表 1 不同磷水平下根际、土体的化学性质

Table 1 Soil properties under different P fertilization rates

Soil type	P level	SOC (g/kg)	TN (mg/kg)	AP (mg/kg)	Po (mg/kg)	Pt (mg/kg)
Rhizosphere soil	P0	9.94±1.46a	0.97±0.01b	1.75±0.96c	131.99±34.15ab	531.58±20.66c
	P50	9.61±0.46a	1.03±0.02a	29.31±1.79b	71.21±13.75b	890.08±52.14b
	P200	9.69±0.80a	1.05±0.02a	45.19±2.83a	238.78±83.06a	1 954.42±331.87a
Bulk soil	P0	9.34±0.49a	0.95±0.01b	1.63±1.12c	138.21±31.20b	578.00±50.43c
	P50	9.85±0.69a	1.02±0.06a	29.16±2.01b	161.46±12.93b	877.28±47.27b
	P200	10.24±0.91a	1.05±0.03a	48.57±4.10a	227.01±15.25a	2052.97±81.98a

Values are means±SD of four replicates. Different lower case letters in the same column indicate significant differences between samples ( $P<0.05$ ). Abbreviations: P0, P50 and P200 represent 0, 50 and 200 kg P/hm<sup>2</sup>, respectively.

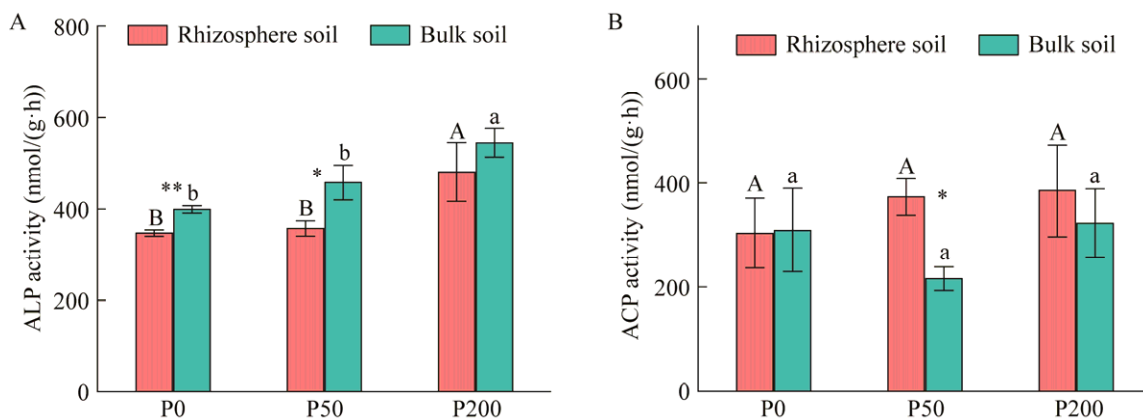


图 1 不同磷水平下根际、土体土壤碱性(A)、酸性(B)磷酸酶活性

Figure 1 Alkaline phosphatase (ALP) activity (A), acid phosphatase (ACP) activity (B) in rhizosphere and bulk soils treated with different P fertilizations. Different lower case letters denote significantly different on  $P<0.05$ . The asterisks in each fertilizer treatment indicate significant differences between rhizosphere and bulk soils at  $P<0.01$  and  $P<0.05$ . Abbreviations: P0, P50 and P200 represent 0, 50 and 200 kg P/hm<sup>2</sup>, respectively.

## 2.2 供磷水平和根际效应对含 *phoD* 基因细菌的丰度和群落特征的影响

随着供磷水平的增加，根际土壤中 *phoD* 拷贝数呈显著降低后升高的趋势，土体土壤中 *phoD* 拷贝数无显著变化(图 2A)。将高通量测序后经过质量控制得到的序列与数据库比对注释，用 ASV 数量和 Shannon 指数表征含 *phoD* 细菌群落的  $\alpha$  多样性。结果表明，随着供磷水平的增加，根际土壤中 ASV 数量和 Shannon 指

数先不变后显著降低，土体土壤中不同磷水平下无显著变化(图 2B、2C)。不同磷水平下根际 *phoD* 拷贝数、ASV 数量、Shannon 指数均高于土体(图 2A–2C)。冗余分析(RDA)结果表明，土壤化学性质及磷酸酶活性解释了含 *phoD* 细菌差异的 27.71%，RDA1 轴解释了 15.22%，RDA2 轴解释了 12.49%。其中 TN、AP、Po、Pt、ALP 是显著影响含 *phoD* 基因细菌群落的因素(图 2D)。

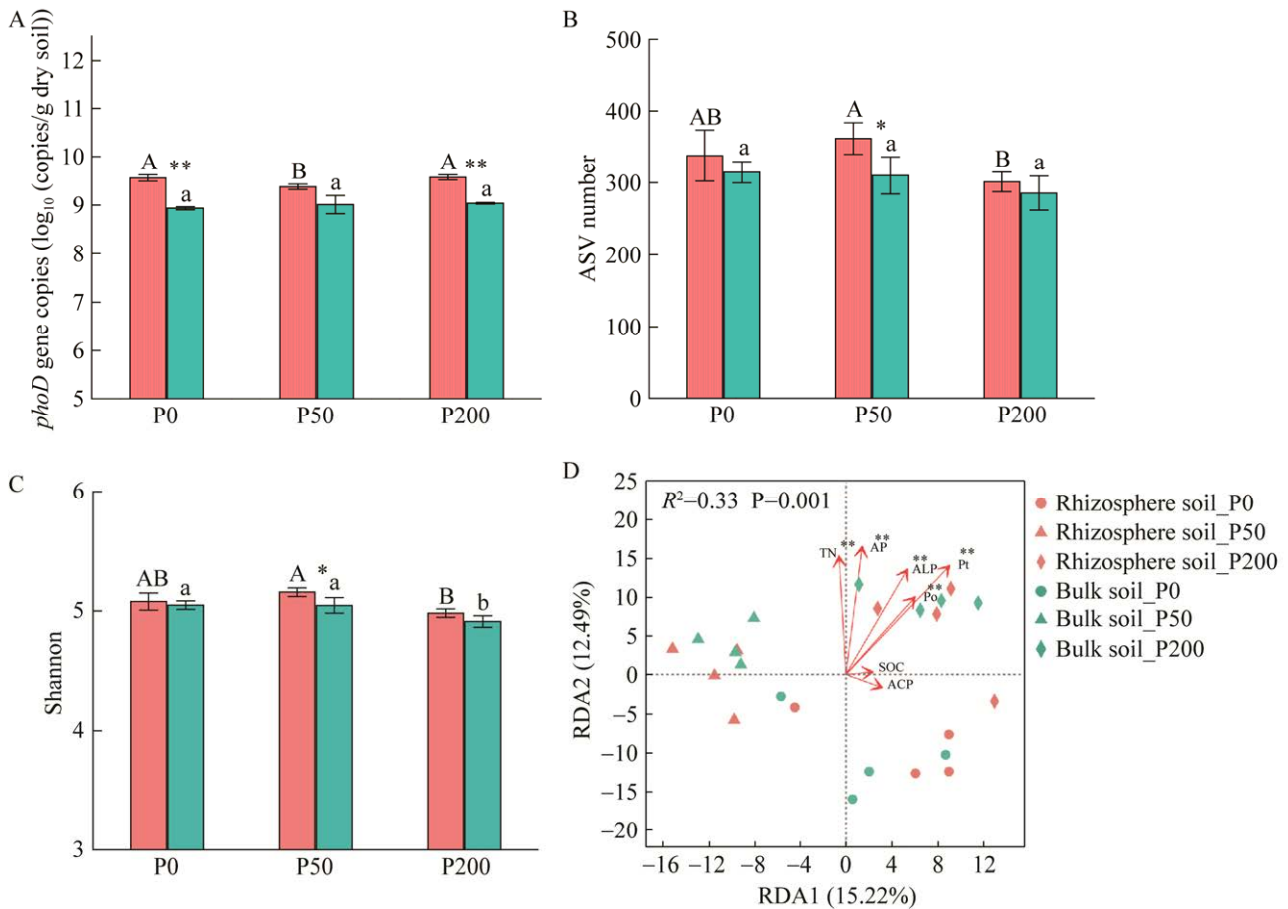


图 2 不同磷水平下根际、土体土壤 *phoD* 基因丰度(A)、ASV 数量(B)、香农指数(C)及含 *phoD* 基因细菌群落与土壤因子冗余分析(D)

Figure 2 *phoD* gene abundance (A), ASV number (B), Shannon index (C), and redundancy analysis of *phoD*-harboring bacterial community and soil factors (D) in rhizosphere and bulk soils treated with different P fertilizations. Different lower case letters denote significantly different on  $P<0.05$ . The asterisks in each fertilizer treatment indicate significant differences between rhizosphere and bulk soils at \*\*:  $P<0.01$  and \*:  $P<0.05$ . Abbreviations: P0, P50 and P200 represent 0, 50 and 200 kg P/hm<sup>2</sup>, respectively.

### 2.3 供磷水平及根际效应对含 *phoD* 基因细菌群落的网络结构的影响

网络拓扑性质结果表明, 在根际土壤中, 施磷处理(P50、P200)降低了网络节点数, 减少了网络连接数; 在土体土壤中, 施磷处理增加了网络节点数及网络连接数; 根际和土体土壤 P0 处理下, 网络平均聚类系数最大, 平均路径

长度最小, 表明 P0 处理下网络连接得更加紧密。在根际土壤 P50 处理下模块性最高, 土体土壤 P200 处理下模块性最高(图 3)。根际正负内聚力比在 P200 处理下显著高于土体(图 4A)。与不施磷处理(P0)相比, 施磷处理下根际含 *phoD* 细菌群落的鲁棒性显著提高, 土体含 *phoD* 细菌群落的鲁棒性显著降低(图 4B)。

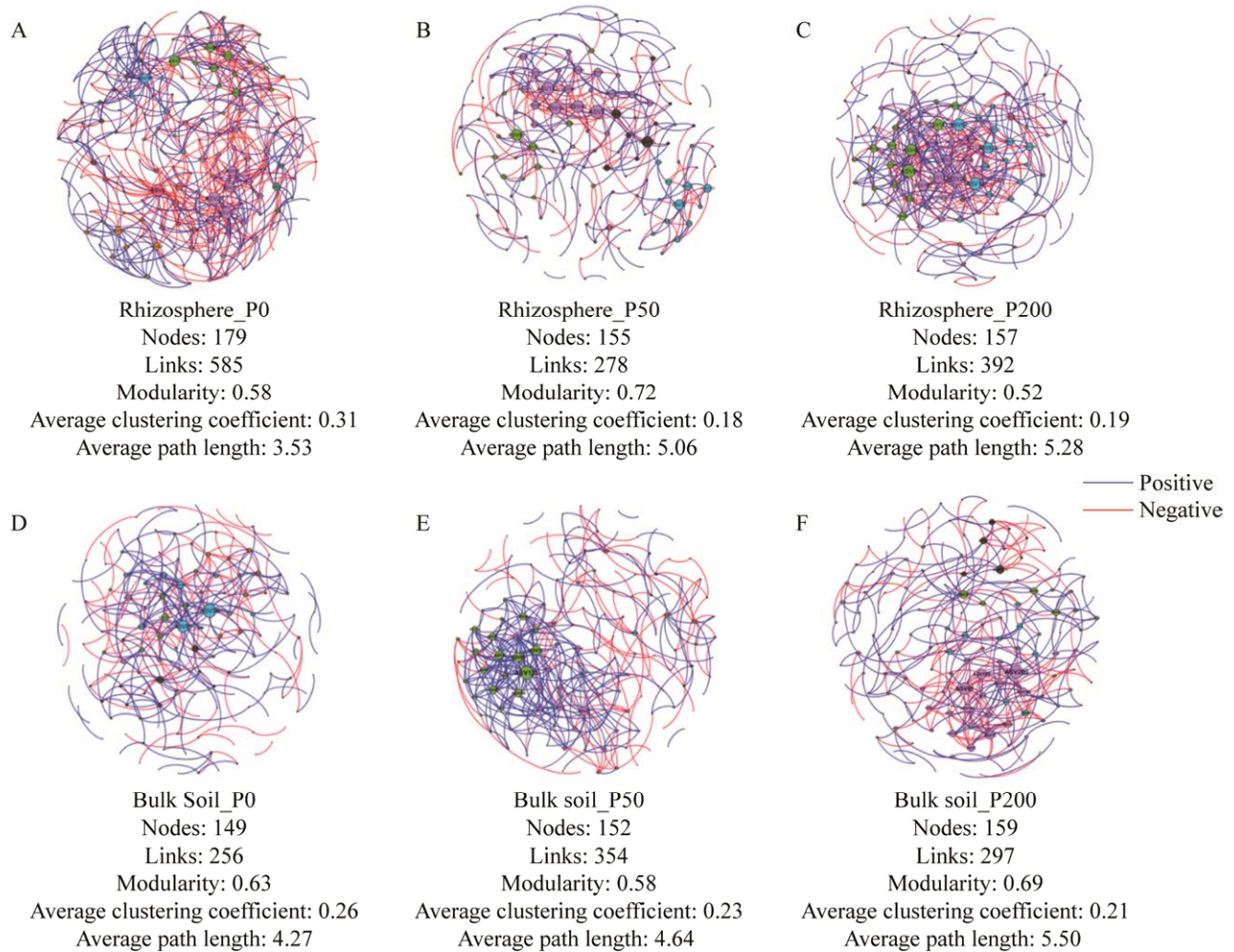


图 3 不同磷水平下根际土体含 *phoD* 基因微生物群落的共现网络

Figure 3 Co-occurrence networks of *phoD*-harboring bacterial communities between rhizosphere and bulk soils under different P fertilization rates. Different colors indicate different modules. The node size is weighted based on node degree. Edges represent significant Spearman correlations ( $|R| > 0.65$  and  $P < 0.01$ ). The red and blue links represent negative and positive correlations, respectively. Abbreviations: P0, P50 and P200 represent 0, 50 and 200 kg P/hm<sup>2</sup>, respectively.



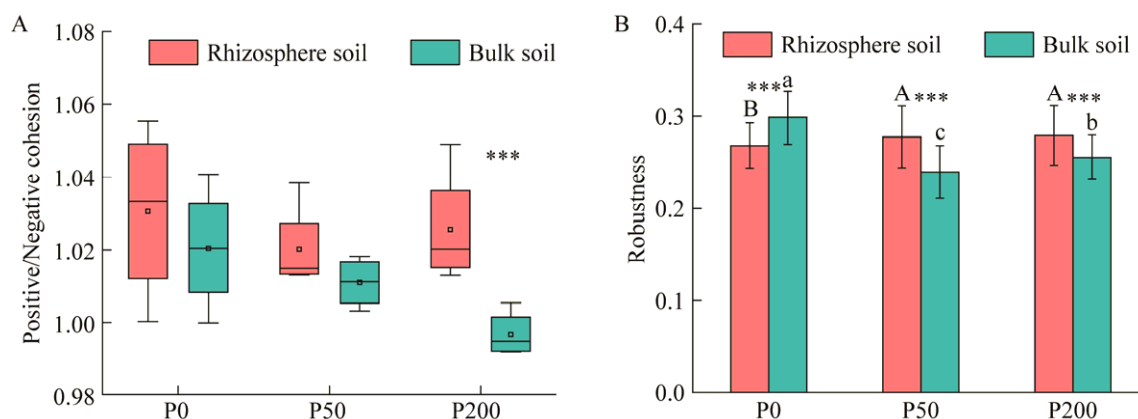


图 4 不同磷水平下根际土体正负内聚力比(A)及网络鲁棒性(B)

Figure 4 Positive/Negative cohesion (A) indexes and robustness (B) for different P fertilization rates between rhizosphere and bulk soils. Different lower case letters denote significantly different on  $P < 0.05$ . The asterisks in each fertilizer treatment indicate significant differences between rhizosphere and bulk soils at \*\*\*:  $P < 0.001$ , \*\*:  $P < 0.01$  and \*:  $P < 0.05$ . Abbreviations: P0, P50 and P200 represent 0, 50 and 200 kg P/hm<sup>2</sup>, respectively.

#### 2.4 含 *phoD* 基因细菌群落的优势物种组成及其与土壤化学性质、网络特征及磷酸酶活性的相关性

含 *phoD* 基因细菌群落的优势物种分别是中间根瘤菌(*Mesorhizobium* sp.)、苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)、斯科尔曼氏菌(*Skermanella pratensis*)、*Bradyrhizobium lablabi*、施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)和格木慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium erythrophlei*) (图 5A–5F), 均从属于变形菌门(*Proteobacteria*)。供磷水平显著影响根际和土体土壤中优势类群种水平的相对丰度, 其中 *Mesorhizobium* sp. 在根际 P0 处理下显著高于 P50 和 P200 处理, 而在土体则无显著差异(图 5A)。 *Sinorhizobium meliloti* 在根际无显著性差异, 在土体 P200 处理最高、P50 处理下最低(图 5B)。 *Skermanella pratensis*、*Bradyrhizobium lablabi* 和 *Pseudomonas stutzeri* 在根际和土体的各处理中无显著差异(图 5C–5E)。 *Bradyrhizobium erythrophlei* 在根际 P200 处理在最高, 在 P0 处理下相对丰度最低, 而在土体的

3 个处理下无显著性差异(图 5F)。 Mantel 分析表明, 优势物种在根际土壤中与 AP、ACP、内聚力、网络鲁棒性具有显著相关性, 而在土体土壤中无显著相关。 Spearman 相关性分析表明, 在根际土壤中, ALP 与 TN、AP、Pt 具有显著相关性; 网络鲁棒性与 TN、AP、Pt、ACP 之间具有显著相关性(图 5G); 而在土体土壤中, ALP 与 AP、Po、Po 具有显著相关性; 网络鲁棒性与 TN、AP、Pt、ACP 之间无显著相关(图 5H)。

#### 2.5 供磷水平和根际效应对含 *phoD* 基因细菌群落特征的影响及其对磷酸酶活性的调控作用

偏最小二乘模型阐明了根际、土体土壤中不同供磷水平下土壤化学性质及含 *phoD* 基因细菌群落特征、网络特征及磷酸酶之间的关系。 在根际土壤中, 施磷显著影响了 AP 和 TN, 进而对网络的鲁棒性及磷酸酶活性产生显著正效应; 而群落结构、内聚力对磷酸酶活性分别产生显著的负效应和正效应(图 6A)。 在土体土壤中, 施磷显著影响了 AP、TN 和 Pt, 进而影响

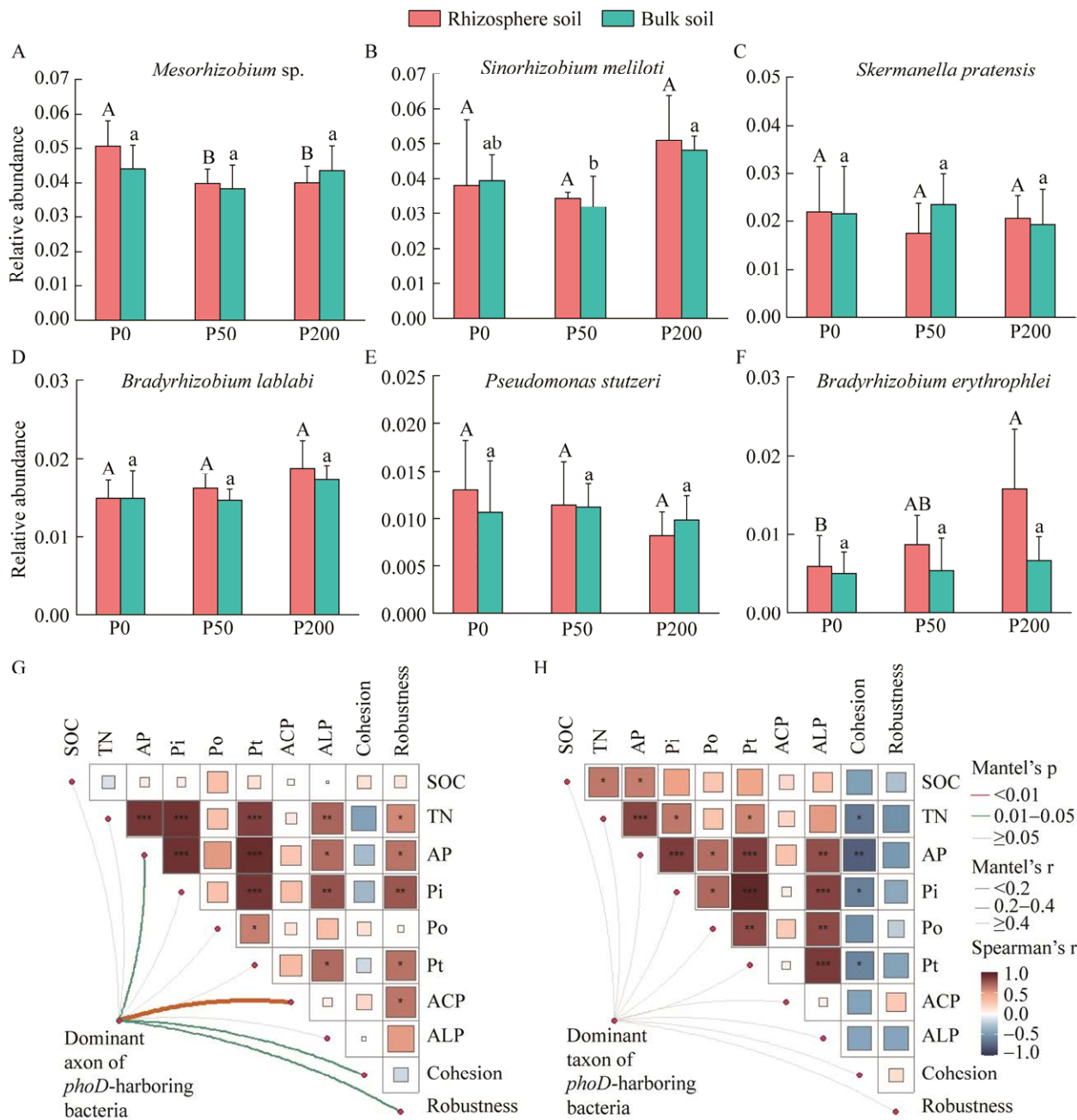


图 5 不同供磷水平下优势物种的相对丰度(A-F)和根际(G)土体(H)优势物种、土壤化学性质、磷酸酶与网络复杂性及鲁棒性之间的相关性

Figure 5 The relative abundance of *phoD*-harboring bacterial with different phosphorus fertilization rates (A-F). Correlations of the dominant taxon of *phoD*-harboring bacteria with soil properties, phosphatase activity, cohesion and robustness in rhizosphere (G) and bulk soils (H) under different P fertilization rates. Edge width corresponds to the Mantel's r value, and the edge colour denotes the statistical significance. Pairwise correlations of these variables are shown with a colour gradient denoting Spearman's correlation coefficients. The asterisks in each fertilizer treatment indicate significant differences between rhizosphere and bulk soils at \*\*\*, \*:  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . Abbreviations: P0, P50 and P200 represent 0, 50 and 200 kg P/hm<sup>2</sup>, respectively.

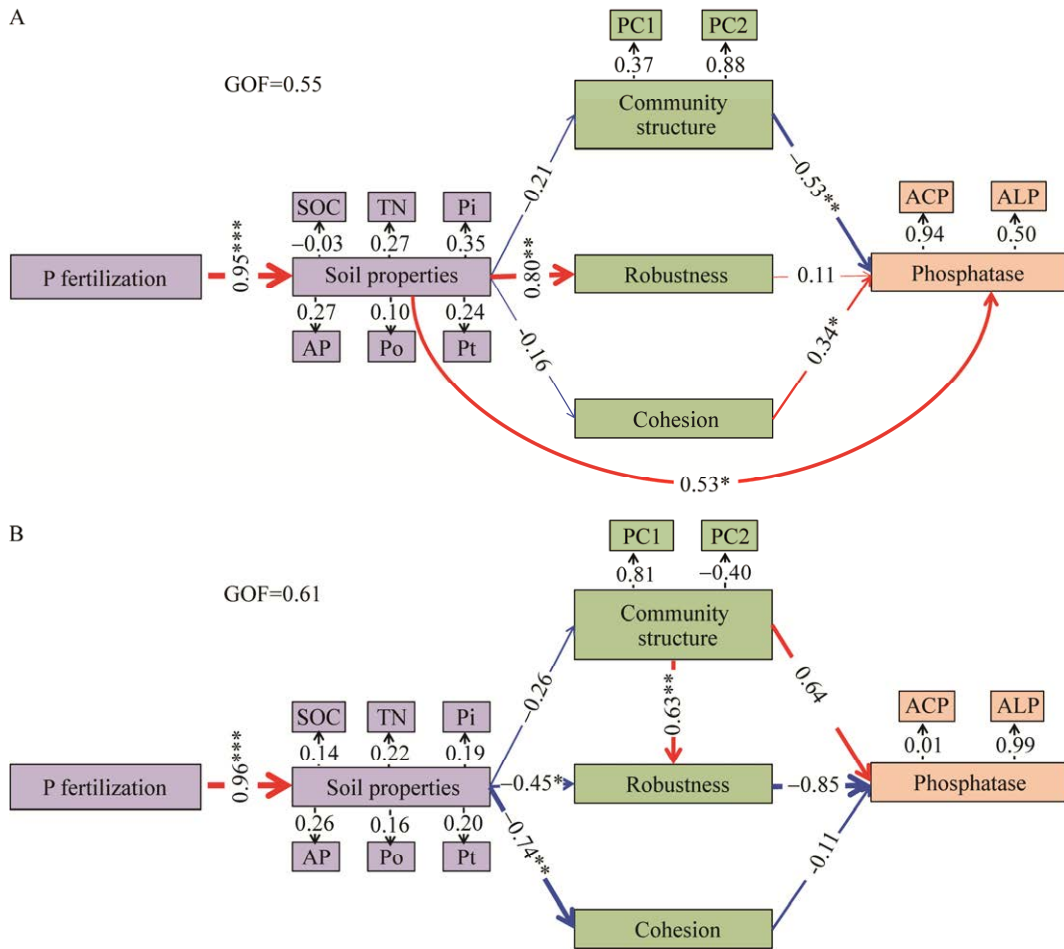


图 6 不同供磷水平下根际(A)、土体(B)土壤化学性质与含 *phoD* 细菌群落的  $\alpha$  多样性、群落结构及网络特征、磷酸酶活性之间关系的偏最小二乘路径模型

Figure 6 The partial least squares path model of the influences for different P fertilization rates on the correlations among soil properties (including SOC, TN, AP, Pt, Po), and community structure (including PC1, PC2), networks structure (including cohesion and robustness), phosphatase (including ALP and ACP) in rhizosphere (A) and bulk soils (B). The width of the arrow indicates the strength of the causal effect. The red and blue arrows indicate the positive and negative relationships between the indicators. The number above the arrow indicates the path coefficient. \*\*\*, \*\* and \* represent significant path.

了内聚力及网络鲁棒性，同时群落结构对网络鲁棒性产生显著正效应，进而影响磷酸酶活性(图 6B)。

### 3 讨论

#### 3.1 供磷水平与根际效应对含 *phoD* 基因细菌群落特征的影响

之前的研究发现，在喀斯特土壤和水稻土

中土壤 AP 含量与 ALP 活性呈显著正相关<sup>[18,29]</sup>，与我们的研究结果一致(表 1，图 1)，表明 ALP 促进了有机磷矿化，土壤中的 AP 增加。但也有研究表明，磷肥施用会抑制 ALP 的分泌<sup>[30]</sup>，原因是长期施肥导致土壤 pH 的降低，且施用无机肥通常会降低 ALP 的活性。研究还发现施用磷肥对 ALP 无显著影响<sup>[6]</sup>，表明土壤中 AP 与 ALP 之间的关系是复杂的，ALP 的分泌还可

能受到其他因素的影响, 如土壤类型、施肥方式等。

之前的研究发现根际效应能够促进含 *phoD* 基因细菌群落的生长, 这与根系分泌物能够刺激微生物的繁殖生长密切相关<sup>[18]</sup>。但同时受到供磷水平的调控, 研究表明, 具有较低 AP 含量的根际环境有利于特定的含 *phoD* 细菌的生长和繁殖<sup>[31]</sup>, 这也是本研究中低磷条件下, *phoD* 丰度显著升高的原因之一。本研究还发现 AP、Po 和 Pt 含量随供磷水平的提高显著提高(表 1), 并且是影响含 *phoD* 基因细菌群落的主要因素(图 2D), 与之前的研究结果一致<sup>[8,18,32]</sup>。原因可能是 Po 和 AP 分别作为磷酸酶作用的底物及最终产物, 其浓度可能会通过对 *phoD* 群落组成的影响来调节磷酸酶的分泌<sup>[33]</sup>。本研究中含 *phoD* 基因微生物群落的优势类群大多参与氮循环, 表明土壤中的氮、磷循环密切相关<sup>[34-35]</sup>。例如 *Bradyrhizobium lablabi*、*Mesorhizobium* sp.、*Sinorhizobium meliloti*、*Bradyrhizobium erythrophlei* 在共生固氮方面具有重要功能<sup>[36]</sup>, *Pseudomonas stutzeri* 在土壤反硝化作用方面具有重要作用<sup>[37]</sup>。长期来看, 微生物与植物在氮素竞争中处于劣势<sup>[38]</sup>。编码 *phoD* 基因的主要属通过固定大气中的 N<sub>2</sub> 来缓解自身生长过程中的氮限制<sup>[39]</sup>。根际是微生物和酶分布的热点区<sup>[12]</sup>, 有研究发现, 根际土壤中磷酸酶活性和 *phoD* 基因丰度呈显著正相关<sup>[16]</sup>。本研究中根际土壤中含 *phoD* 基因细菌群落的优势物种与磷酸酶活性与 AP 均呈显著相关(图 5G), 表明根际效应可能通过调控磷酸酶活性影响土壤中有有机磷的矿化, 进而对根际土壤中 AP 的含量产生显著影响。

### 3.2 供磷水平与根际效应对含 *phoD* 基因细菌网络复杂性和稳定性的影响

微生物共现性网络可以揭示物种之间复杂

的相互作用, 深入理解微生物组的复杂性<sup>[40]</sup>。微生物网络复杂性可以通过计算网络拓扑参数(如节点数、连接数、聚类系数、模块化等)来评估<sup>[41]</sup>。相比土体土壤, 根际土壤中的碳源更丰富, 研究发现植物通过光合作用固定的碳约有 17% 通过根系渗出释放到根际土壤中<sup>[42]</sup>。施肥条件下, 这些额外的碳源促进了物种的共存, 减少了物种之间的竞争<sup>[43-44]</sup>, 这也与我们计算的正负内聚力比一致(图 4A)。网络的复杂性还会影响到微生物群落的稳定性<sup>[45]</sup>。本研究中施肥处理微生物网络的鲁棒性在根际土壤中增强, 而在土体土壤中减弱(图 4B), 与之前的研究一致<sup>[20,46-47]</sup>, 即复杂的相互作用减弱了网络的稳定性。原因可能是物种间相互作用的增强会导致微生物互作过程中不稳定性的耦合, 削弱物种间的相互作用通常会促进群落的稳定性<sup>[19,47]</sup>, 因此, 弱相互作用形成的生态网络比强相互作用形成的生态网络更稳定。也有相似的研究表明, 食物网中一些关键类群相互作用强度的增加会破坏营养级之间的稳定性<sup>[48]</sup>。但也有研究表明, 微生物生态网络越复杂, 群落的结构与功能也更稳定<sup>[49]</sup>。因此, 土壤微生物群落中网络复杂性与群落稳定性的关系仍需深入探究。

微生物群落的稳定性与多种因素密切相关。本研究中含 *phoD* 基因细菌群落的优势物种及土壤化学性质(包括 TN、AP、Pt)在根际土壤中与群落的稳定性显著正相关, 而在土体土壤中则无相关, 表明根际效应和供磷水平在提高磷有效性和网络稳定性方面可能发挥协同且关键的作用。网络的稳定性与生态系统的功能之间存在密切联系<sup>[19]</sup>。根际微生物在提高作物耐受胁迫及营养元素转化方面具有重要作用, 之前的研究发现, 根际微生物最主要的功能是提高植物的非生物/生物抗逆性, 其次是参与土

壤养分循环<sup>[50]</sup>。本研究发现,根际微生物群落的稳定性与酸性磷酸酶呈显著正相关,而土体土壤中含 *phoD* 基因细菌群落的网络稳定性与磷酸酶之间具有较强的负相关(图 5G, 图 6B),表明含 *phoD* 基因细菌群落在根际土壤中可能以提高作物抗逆性为主,进而促进根际酸性磷酸酶的分泌,然而在土体土壤中面临磷胁迫时,可能以提高自身的稳定性、抗性为主;随着碱性磷酸酶的分泌,土壤中的 AP 增加,磷限制得到缓解,微生物群落的稳定性减弱,此时主要承担养分循环的功能。

## 4 结论

在长期玉米-小麦轮作的石灰性土壤中,随着供磷水平的提高,AP 和 ALP 在根际和土体均显著提高。在相同供磷水平下,根际土壤中 *phoD* 基因丰度和含 *phoD* 基因细菌群落的  $\alpha$  多样性高于土体土壤。AP、Po 和 Pt 是影响含 *phoD* 基因细菌群落的主要因素。相比于不施磷肥处理(P0),施磷肥处理(P50、P200)条件下,根际土壤中含 *phoD* 基因细菌群落在网络结构简单但更稳定,而在土体土壤中网络结构复杂但不稳定。含 *phoD* 基因微生物群落的优势类群与磷酸酶活性、网络的复杂性和群落的稳定性在根际土壤中显著相关,然而在土体土壤中不相关。因此,供磷水平及根际效应协同影响 *phoD* 基因丰度、含 *phoD* 基因细菌群落的  $\alpha$  多样性、优势物种、网络的复杂性及群落的稳定性进而影响土壤中磷酸酶的分泌。这为利用生物学途径提高土壤中有磷的利用率提供科学依据。

## 参考文献

- [1] 张俊伶. 植物营养学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2021.  
ZHANG JL. Plant Nutrition[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2021 (in Chinese).
- [2] GEORGE TS, HINSINGER P, TURNER BL. Phosphorus in soils and plants-facing phosphorus scarcity[J]. *Plant and Soil*, 2016, 401: 1-6.
- [3] 张福锁, 王激清, 张卫峰, 崔振岭, 马文奇, 陈新平, 江荣风. 中国主要粮食作物肥料利用率现状与提高途径[J]. *土壤学报*, 2008, 45(5): 915-924.  
ZHANG FS, WANG JQ, ZHANG WF, CUI ZL, MA WQ, CHEN XP, JIANG RF. Nutrient use efficiencies of major cereal crops in China and measures for improvement[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2008, 45(5): 915-924 (in Chinese).
- [4] MENEZES-BLACKBURN D, GILES C, DARCH T, GEORGE TS, BLACKWELL M, STUTTER M, SHAND C, LUMSDON D, COOPER P, WENDLER R, BROWN L, ALMEIDA DS, WEARING C, ZHANG H, HAYGARTH PM. Opportunities for mobilizing recalcitrant phosphorus from agricultural soils: a review[J]. *Plant and Soil*, 2017, 427: 5-16.
- [5] STUTTER MI, SHAND CA, GEORGE TS, BLACKWELL MSA, BOL R, MACKAY RL, RICHARDSON AE, CONDRON LM, TURNER BL, HAYGARTH PM. Recovering phosphorus from soil: a root solution?[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(4): 1977-1978.
- [6] FRASER TD, LYNCH DH, BENT E, ENTZ MH, DUNFIELD KE. Soil bacterial *phoD* gene abundance and expression in response to applied phosphorus and long-term management[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 88: 137-147.
- [7] SAKURAI M, WASAKI J, TOMIZAWA Y, SHINANO T, OSAKI M. Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2008, 54(1): 62-71.
- [8] CHEN XD, JIANG N, CONDRON LM, DUNFIELD KE, CHEN ZH, WANG JK, CHEN LJ. Impact of long-term phosphorus fertilizer inputs on bacterial *phoD* gene community in a maize field, Northeast China[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 669: 1011-1018.
- [9] 郎明, 李佳颖, 苏卫华, 邹温馨, 刘于, 陈新平. 长期施磷对石灰性土壤中编码碱性磷酸酶基因的细菌群落的影响[J]. *微生物学报*, 2022(1): 242-258.  
LANG M, LI JY, SU WH, ZOU WX, LIU Y, CHEN XP. Effects of long-term phosphorus application on *phoD* harboring bacterial community in calcareous soil[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022(1): 242-258 (in Chinese).

- [10] LIU JS, MA Q, HUI XL, RAN JY, MA QX, WANG XS, WANG ZH. Long-term high-P fertilizer input decreased the total bacterial diversity but not *phoD*-harboring bacteria in wheat rhizosphere soil with available-P deficiency[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 318: 213-225.
- [11] BERENDSEN RL, PIETERSE CMJ, BAKKER PAHM. The rhizosphere microbiome and plant health[J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(8): 478-486.
- [12] KUZUYAKOV Y, BLAGODATSKAYA E. Microbial hotspots and hot moments in soil: concept & review[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 83: 184-199.
- [13] LIU S, ZHANG XY, DUNGAIT JAJ, QUINE TA, RAZAVI BS. Rare microbial taxa rather than *phoD* gene abundance determine hotspots of alkaline phosphomonoesterase activity in the karst rhizosphere soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2021, 57(2): 257-268.
- [14] CAO TT, FANG Y, CHEN YR, KONG XS, YANG JB, ALHARBI H, KUZUYAKOV Y, TIAN XJ. Synergy of saprotrophs with mycorrhiza for litter decomposition and hotspot formation depends on nutrient availability in the rhizosphere[J]. *Geoderma*, 2022, 410: 115662.
- [15] MA XF, LI HG, ZHANG JL, SHEN JB. Spatiotemporal pattern of acid phosphatase activity in soils cultivated with maize sensing to phosphorus-rich patches[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 650436.
- [16] FRASER TD, LYNCH DH, GAIERO J, KHOSLA K, DUNFIELD KE. Quantification of bacterial non-specific acid (*phoC*) and alkaline (*phoD*) phosphatase genes in bulk and rhizosphere soil from organically managed soybean fields[J]. *Applied Soil Ecology*, 2017, 111: 48-56.
- [17] MONTOYA JM, PIMM SL, SOLÉ RV. Ecological networks and their fragility[J]. *Nature*, 2006, 442(7100): 259-264.
- [18] WEI XM, HU YJ, RAZAVI BS, ZHOU J, SHEN JL, NANNIPIERI P, WU JS, GE TD. Rare taxa of alkaline phosphomonoesterase-harboring microorganisms mediate soil phosphorus mineralization[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 131: 62-70.
- [19] COYTE KZ, SCHLUTER J, FOSTER KR. The ecology of the microbiome: networks, competition, and stability[J]. *Science*, 2015, 350(6261): 663-666.
- [20] FAN KK, WEISENHORN P, GILBERT JA, CHU HY. Wheat rhizosphere harbors a less complex and more stable microbial cooccurrence pattern than bulk soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 125: 251-260.
- [21] OLSEN SR, SOMMERS LE. Part 2 Chemical and Microbiological Properties, Phosphorus Methods of Soil Analysis[M]. 2nd ed. Agronomy, No.9. ASA, SSSA, Madison, WI, 1982.
- [22] MA XM, RAZAVI BS, HOLZ M, BLAGODATSKAYA E, KUZUYAKOV Y. Warming increases hotspot areas of enzyme activity and shortens the duration of hot moments in the root-detritusphere[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 107: 226-233.
- [23] 刘玉槐, 魏晓梦, 魏亮, 祝贞科, 葛体达, 张艳杰, 鲁顺保, 吴金水. 水稻根际和非根际土磷酸酶活性对碳、磷添加的响应[J]. *中国农业科学*, 2018(9): 1653-1663.
- LIU YH, WEI XM, WEI L, ZHU ZK, GE TD, ZHANG YJ, LU SB, WU JS. Responses of extracellular enzymes to carbon and phosphorus additions in rice rhizosphere and bulk soil[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018(9): 1653-1663 (in Chinese).
- [24] SAUNDERS WMH, WILLIAMS EG. Observations on the determination of total organic phosphorus in soils[J]. *European Journal of Soil Science*, 1955, 6(2): 254-267.
- [25] TABATABAI MA. Soil Enzymes[M]//MILLER R, KEENEY D. Methods of Soil Analysis. Madison: American Society for Agronomy, 1982.
- [26] LAGOS LM, ACUÑA JJ, MARUYAMA F, OGRAM A, de la LUZ MORA M, JORQUERA MA. Effect of phosphorus addition on total and alkaline phosphomonoesterase-harboring bacterial populations in ryegrass rhizosphere microsites[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2016, 52(7): 1007-1019.
- [27] HERREN CM, MCMAHON KD. Cohesion: a method for quantifying the connectivity of microbial communities[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(11): 2426-2438.
- [28] MONTESINOS-NAVARRO A, HIRALDO F, TELLA JL, BLANCO G. Network structure embracing mutualism-antagonism continuums increases community robustness[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2017, 1(11): 1661-1669.
- [29] HU YJ, XIA YH, SUN Q, LIU KP, CHEN XB, GE TD, ZHU BL, ZHU ZK, ZHANG ZH, SU YR. Effects of long-term fertilization on *phoD*-harboring bacterial community in karst soils[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 628/629: 53-63.
- [30] WEI XM, GE TD, ZHU ZK, HU YJ, LIU SL, LI Y, WU JS, RAZAVI BS. Expansion of rice enzymatic rhizosphere: temporal dynamics in response to

- phosphorus and cellulose application[J]. *Plant and Soil*, 2018, 445: 169-181.
- [31] GUO L, WANG C, SHEN RF. Stronger effects of maize rhizosphere than phosphorus fertilization on phosphatase activity and phosphorus-mineralizing-related bacteria in acidic soils[J]. *Rhizosphere*, 2022, 23: 100555.
- [32] LUO GW, LING N, NANNIPIERI P, CHEN H, RAZA W, WANG M, GUO SW, SHEN QR. Long-term fertilisation regimes affect the composition of the alkaline phosphomonoesterase encoding microbial community of a vertisol and its derivative soil fractions[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2017, 53(4): 375-388.
- [33] NANNIPIERI P, GIAGNONI L, LANDI L, RENELLA G. Role of Phosphatase Enzymes in Soil[M]. Berlin Heidelberg: Phosphorus in Action, Springer, 2011.
- [34] ZHANG T, LI YF, CHANG SX, JIANG PK, ZHOU GM, LIU J, LIN L. Converting paddy fields to Lei bamboo (*Phyllostachys praecox*) stands affected soil nutrient concentrations, labile organic carbon pools, and organic carbon chemical compositions[J]. *Plant and Soil*, 2013, 367: 249-261.
- [35] XU XY, LIU XR, LI Y, RAN Y, LIU YP, ZHANG QC, LI Z, HE Y, XU JM, DI HJ. High temperatures inhibited the growth of soil bacteria and archaea but not that of fungi and altered nitrous oxide production mechanisms from different nitrogen sources in an acidic soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 107: 168-179.
- [36] DELGADO MJ, CASELLA S, BEDMAR EJ. Chapter 6-denitrification in rhizobia-legume symbiosis[M]// BOTHE H, FERGUSON SJ, NEWTON WE. Eds. *Biology of the Nitrogen Cycle*. Amsterdam: Elsevier, 2007.
- [37] ZUMFT WG, KÖRNER H. Chapter 5-Nitrous oxide reductases[M]//*Biology of the Nitrogen Cycle*. Amsterdam: Elsevier, 2007.
- [38] KUZYAKOV Y, XU XL. Competition between roots and microorganisms for nitrogen: mechanisms and ecological relevance[J]. *New Phytologist*, 2013, 198(3): 656-669.
- [39] AUMAN AJ, SPEAKE CC, LIDSTROM ME. nifH sequences and nitrogen fixation in type I and type II methanotrophs[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(9): 4009-4016.
- [40] FAUST K, RAES J. Microbial interactions: from networks to models[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(8): 538-550.
- [41] DENG Y, JIANG YH, YANG YF, HE ZL, LUO F, ZHOU JZ. Molecular ecological network analyses[J]. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13: 113.
- [42] NEHLS U, DAS A, NEB D. Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizal symbiosis[J]. *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*, 2016, 10: 161-178.
- [43] COSTELLO EK, STAGAMAN K, DETHLEFSEN L, BOHANNAN BJ, RELMAN DA. The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome[J]. *Science*, 2012, 336(6086): 1255-1262.
- [44] HUBBELL SP. Neutral theory in community ecology and the hypothesis of functional equivalence[J]. *Functional Ecology*, 2015, 19(1): 166-172.
- [45] WAGG C, SCHLAEPPI K, BANERJEE S, KURAMAE EE, van der HEIJDEN MGA. Fungal-bacterial diversity and microbiome complexity predict ecosystem functioning[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4841.
- [46] de VRIES FT, GRIFFITHS RI, BAILEY M, CRAIG H, GIRLANDA M, GWEON HS, HALLIN S, KAISERMANN A, KEITH AM, KRETZSCHMAR M, LEMANCEAU P, LUMINI E, MASON KE, OLIVER A, OSTLE N, PROSSER JI, THION C, THOMSON B, BARDGETT RD. Soil bacterial networks are less stable under drought than fungal networks[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3033.
- [47] NEUTEL AM, HEESTERBEEK JA, de RUITER PC. Stability in real food webs: weak links in long loops[J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1120-1123.
- [48] KUIPER JJ, van ALTENA C, de RUITER PC, van GERVEN LPA, JANSE JH, MOOIJ WM. Food-web stability signals critical transitions in temperate shallow lakes[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7727.
- [49] YUAN MM, GUO X, WU LW, ZHANG Y, XIAO NJ, NING DL, SHI Z, ZHOU XS, WU LY, YANG YF, TIEDJE JM, ZHOU JZ. Climate warming enhances microbial network complexity and stability[J]. *Nature Climate Change*, 2021, 11(4): 343-348.
- [50] REN Y, XUN WB, YAN H, MA AY, XIONG W, SHEN QR, ZHANG RF. Functional compensation dominates plant rhizosphere microbiota assembly[J]. *Soil Biology and Biochemistry*. 2020, 150: 107968.