

苹果园生草对土壤微生物多样性、酶活性及碳组分的影响

刘业萍, 毛云飞, 胡艳丽, 张璐璐, 尹伊君, 庞会灵, 宿夏菲, 杨露, 沈向*

(山东农业大学园艺科学与工程学院/作物生物学国家重点实验室/
山东果蔬优质高效生产协同创新中心, 山东泰安 271018)

摘要:【目的】果园种植生草能够改善土壤肥力与土壤结构。研究种植不同生草对果园土壤微生物多样性和土壤生物学性状的影响, 为果园高效绿色管理提供理论依据。【方法】于 2017 年山东省泰安市马庄试验基地多年生苹果行间进行生草试验, 供试草种为白三叶草 (*Trifolium pratense*)、垂穗草 (*Bouteloua gracilis*)、沙画眉草 (*Eragrostis trichodes*)、弯叶画眉草 (*Eragrostis curvula*) 和加拿大披碱草 (*Elymus canadensis*), 以清耕自然生草为对照 (A_{ck}), 研究不同生草处理在连续 3 年内对果园土壤环境的影响。【结果】1) 从 6 个土壤样品中共得到 31459 个细菌操作分类单元和 5021 个真菌操作分类单元, 6 个土壤样品中共有 1019 个相同细菌群落 (OTUs) 和 108 个相同真菌群落 (OTUs)。Alpha 多样性分析可知, 弯叶画眉草处理后的土壤中细菌的 Shannon、Simpson 和 Chao1 指数高于 A_{ck} 处理, 比 A_{ck} 分别增加了 4.61%、7.01% 和 27.44%, 尤其加拿大披碱草处理后土壤真菌的 Chao1 指数是对照的 1.31 倍 ($P < 0.05$)。在门分类水平变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)、浮霉菌门 (Planctomycetes)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia) 是优势细菌, 这 8 个细菌门在各自处理中占比超过 95%, 子囊菌门 (Ascomycota)、担子菌门 (Basidiomycota)、球囊菌门 (Glomeromycota)、接合菌门 (Zygomycota) 是优势真菌, 这 4 个优势真菌门在各自处理中占比超过 80%。弯叶画眉草处理可提高土壤中细菌丰富度和多样性, 沙画眉草处理土壤中的细菌芽单胞菌门、浮霉菌门、绿弯菌门相对丰度降低; 5 个生草处理提高了土壤中真菌群落担子菌门的相对丰度, 垂穗草子囊菌门相对丰度降低明显, 垂穗草、弯叶画眉草和加拿大披碱草提高了土壤中的球囊菌门相对丰度。2) 果园生草提高了土壤中微生物的数量, 且随着生草时间的延长微生物数量增加明显, 2020 年 9 月份的弯叶画眉草处理土壤微生物数量高于清耕处理。3) 生草提高了果园土壤总有机碳和可溶性有机碳含量, 弯叶画眉草、加拿大披碱草和沙画眉草处理效果显著好于清耕, 弯叶画眉草的效果尤为突出, 而三叶草的效果不显著。相应地, 沙画眉草、弯叶画眉草和加拿大披碱草土壤脲酶、磷酸酶和过氧化氢酶活性显著高于清耕处理。4) 相关性分析结果表明, 果园生草处理土壤的碳组分 (除 DOC 外)、酶活性与微生物数量之间存在极显著或显著正相关。【结论】种植沙画眉草、弯叶画眉草和加拿大披碱草均可显著增加土壤中总有机碳和可溶性有机碳含量, 随着生草年限的增加, 提高幅度也在增加, 进而显著增加了土壤中微生物数量, 并不同程度地改变了细菌和真菌的丰富度和多样性。弯叶画眉草和加拿大披碱草对土壤影响效应优良, 极具推广价值。

关键词: 果园生草; 草种; 土壤微生物; 土壤酶活性; 土壤碳组分

Effects of grass planting in apple orchard on soil microbial diversity, enzyme activities and carbon components

LIU Ye-ping, MAO Yun-fei, HU Yan-li, ZHANG Lu-lu, YIN Yi-jun, PANG Hui-ling,

SU Xia-fei, YANG Lu, SHEN Xiang*

(College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University/State Key Laboratory of Crop Biology/Shandong Collaborative Innovation Center for Fruit and Vegetable Production with High Quality and Efficiency, Tai'an, Shandong 271018, China)

收稿日期: 2021-03-18 接受日期: 2021-08-26

基金项目: 农业农村部“948”项目 (2014-Z38); 山东省现代农业产业技术体系创新团队资助项目 (SDAIT-06-07); 山东省重点研发计划 (2018GNC113019)。

联系方式: 刘业萍 E-mail: 17865817482@163.com; * 通信作者 沈向 E-mail: guanshangguoshu@163.com

Abstract: [Objectives] Planting grasses in orchard improve soil fertility and structure. Hence, we studied soil biological properties and microbial structures as affected by grass species in orchard. **[Methods]** The field experiment was conducted at the Mazhuang experimental base in Tai'an City, Shandong Province, China. The test grass species were White clover (*Trifolium pratense*), Pith grass (*Bouteloua gracilis*), Brucella (*Eragrostis trichodes*), Curving thrush (*Eragrostis curvula*) and Canadian Elymus (*Elymus canadensis*). The five grass species were seeded in 2017 between the apple rows while no grass planting was taking as control. The microbial community and enzyme activities in soil were determined in three consecutive years. **[Results]** 1) A total of 31459 bacterial operating taxa (or 1019 OTUs) and 5021 fungal operating taxa (or 108 OTUs) were obtained from all the soil samples. The average Shannon, Simpson and Chao1 indices of bacteria diversity in the grass planting soils were 4.61%, 7.01% and 27.44% respectively higher than that of control. At the phylum classification level, Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Chloroflexi, Bacteroidetes and Verrucomicrobia were the dominant bacteria, accounting for more than 95% of the respective treatment. Ascomycota, Basidiomycota, Glomeromycota and Zygomycota were the dominant fungi, with their relative abundance accounting for over 80% of the respective treatment. Curving thrush increased soil bacteria abundance and diversity, but Brucella decreased the relative abundance of germ cell phylum, Phytophthora phylum and *Curvulariaviridis*. All the five grasses increased the relative abundance of Basidiomycota; Pith grass decreased the relative abundance of Ascomycota. Pith grass, Curving thrush and Canadian elymus increased the relative abundance of glomus. 2) The soil microbial population showed increasing trend with increase in years of the planted grasses, and the microbial population in three-year-old thrush soil was significantly higher than that in CK. 3) The activities of soil urease, phosphatase and catalase in the three years were all significantly higher than those of CK. Thrush, Canadian elymus and Curving thrush increased the soil organic carbon and soluble organic carbon contents. 4) The results of correlation analysis showed that the soil total organic carbon and enzyme activities were positively ($P < 0.05$) correlated with the number of microorganisms. **[Conclusions]** Curving thrush and Canadian elymus planting significantly increased the soil total and soluble organic carbon contents, soil enzyme activities, microbial populations, and changed the community of bacteria and fungi composition to different extents as the grass growing year increased. The other three grasses did not show such good effect. So, Curving thrush and Canadian elymus have great promotion value.

Key words: orchard grass; grass seed; soil microorganism; soil enzyme activity; soil carbon component

研究和实践证明, 果园种植生草可以有效地提高土壤肥力和土壤质量, 并减少土壤养分流失, 从而改善生态环境^[1-3]。如山核桃林种植白三叶、紫云英和油菜后, 石灰性土壤的微生物特性显著提高^[4]。长期种植黑麦草果园土壤中的有机碳含量显著提高^[5]。焦润安等^[6]、张林森等^[7]的试验研究也表明长期间作黑麦草能够有效提高土壤有机碳储量, 间作白三叶可明显提高表层土壤总有机碳 (TOC)、可溶性有机碳 (DOC)、微生物生物量碳 (MBC) 等含量, 而且间作后大量草根死亡还能在土壤中留下许多空隙, 增加土壤通透性, 提高土壤微生物活性。潘介春等^[8]研究发现龙眼果园生草能增加土壤中微生物数量, 提高碳、氮含量和磷循环相关酶活性, 改良土壤环境。研究还发现, 在酿酒葡萄园行间生草可提高土壤有机质、碱解氮、全氮、全钾含量, 有效提高土壤中微生物数量及脲酶、蔗糖酶、磷酸酶等活性,

促进碳氮循环和转化, 提高土壤肥力, 改善果实品质等^[9]。

研究从美国引进的几种果园生草对土壤生物和微生物学性状的影响, 为推动我国果园绿色管理技术的发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验在山东省泰安市马庄镇李家大坡村试验基地进行。该区域属温带大陆性季风气候, 年降水量 687.7 mm, 年均温 12.9℃, 极端最低气温 -27.5℃, 极端最高气温 41℃, 全年无霜期近 200 天。

1.2 试验设计

供试 5 个果园专用生草的草种均从美国引进, 包括白三叶草 (*Trifolium pratense*)、垂穗草 (*Bouteloua*

gracilis)、沙画眉草 (*Eragrostis trichodes*)、弯叶画眉草 (*Eragrostis curvula*) 和加拿大披碱草 (*Elymus canadensis*)，依次表示为 BT1、CT2、DT3、ET4、FT5，以清耕自然生草为对照，表示为 Ack。2017 年 3 月分别称取 5 个草种各 500 g，清水浸种 24 h 后分别以条播的方式播种于行距为 3 m 的一年生苹果幼树行间，每行树的两边 1 m 处播一个草种，每个生草试验小区长 100 m、宽 1 m。草种发芽后要及时去除杂草，每个草种设置 3 个生物学重复，随机区组设计，生草 3 年。清耕区进行人工除草，其他管理条件相同。

1.3 样品采集

2018、2019 和 2020 年的 7—9 月中旬进行样品的采集。土壤样品的采集采用“S”形取样法：分别在种植不同草种的每个小区按照“S”形取 10 个点 0—30 cm 土层土壤 1000 g，及时去除土壤中的杂质，同一个生草的小区土壤混合以后作为一个样本。将采集的土壤分成 3 份，装于自封袋中然后放置于冰盒里，及时带回实验室，一份于 4℃ 冰箱中用于测定土壤中的微生物数量，一份于 -80℃ 冰箱中用于分析土壤中的微生物种类，一份土样风干后过 0.15 mm 筛进行土壤的理化指标测定。

1.4 试验方法

1.4.1 不同草种的生物学指标测定 于 7 月中旬在草生长旺期，每种草选取 20 株生长健壮、长势一致、各方面良好的草置于冰盒中，带回实验室进行测定。将植株平展伸直，用钢卷尺测定植株的高度和根长，求其平均株高和平均根长。植株地上和地下部重于 105℃ 烘箱烘干至恒重，测干物重。

1.4.2 土壤理化指标测定 用凯氏定氮法测土壤全氮；碳酸氢钠—钼蓝比色法测定土壤有效磷含量；醋酸铵浸提—火焰光度法测定土壤有效钾含量；原子吸收分光光度计测定土壤中的铜、锌、铁、镁、钙含量^[10]。

土壤总有机碳 (TOC) 测定：称取过 2 mm 筛的风干土样 (0.15 ± 0.03) ~ (0.20 ± 0.05) g，置于 50 mL 三角瓶中，加水润湿，加 3 mL 浓硫酸，数滴双氧水，电炉加热至 340℃，消煮 20 min 至土样变白，冷却，过滤，滤液移入 50 mL 容量瓶中，加水定容，用 multi T/N 分析仪测定。土壤可溶性有机碳 (DOC) 的测定：称取 10 g 新鲜土样，按照土：水为 1：5 的比例混匀，在 25℃ 条件下，以 250 r/min 的速度振荡 1 h，接着在转速为 15000 r/min 离心 10 min，上部悬浮液过 0.45 μm 薄滤膜，用 multi T/N 分析仪

测定^[11]。土壤有机碳 (SOC) 的测定：采用重铬酸钾容量法—外加热法^[10]测定。蔗糖酶的活性采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定，以 24 h 后 1 g 土壤中所含葡萄糖的 mg 数表示；用磷酸苯二钠法测定碱性磷酸酶的活性，以 24 h 后 1 g 土壤中释放出酚的 mg 数表示；土壤中过氧化氢酶采用高锰酸钾滴定法测定；土壤脲酶采用苯酚钠-次氯酸钠比色法测定，以 24 h 后 1 g 土壤中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的质量 (mg) 表示土壤脲酶活性^[12]。

1.4.3 土壤微生物的测定 土壤微生物测定分两部分进行，一是在 7、8、9 月取 3 个年份生草处理后的土壤对细菌、真菌和放线菌数量进行测定。用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基培养细菌和真菌^[13]，用高氏 1 号培养基培养放线菌^[14]，采用平板梯度稀释培养法计数测定 3 种微生物^[15]。二是在 7 月中旬取 3 年生草处理后的土壤用高通量测序技术对细菌和真菌进行鉴定分析，进一步分析土壤中微生物群落多样性和丰富度。

1.5 数据处理

采用 Microsoft Excel 2010 处理数据，用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析。样品在 Illumina NovaSeq 平台上按照制造商的建议进行测序，由 LC-Bio 提供。根据样品独特的条形码，将配对端序列分配给样品，去除建库引入的 barcode 和引物序列。使用 FLASH 合并匹配端读取^[16]。根据 fqtrim (v0.94)，在特定条件下对原始读取数据进行质量过滤^[17]，以获得高质量的 Clean Tags 标签。使用 Vsearch 软件对嵌合序列进行过滤 (V2.3.4)。用 DADA2 进行解调得到特征序列和特征表。多样性通过归一化得到相同的随机序列来计算。然后根据 SILVA (release 132) 分类器，利用每个样本的相对丰度对特征丰度进行归一化。Alpha 多样性用于分析样本物种多样性的复杂性，用 QIIME2 计算 Chao1、Observed species、Goods coverage、Shannon、Simpson，标准曲线的绘制用 R 软件 (Version 2.15.3)。Beta 多样性由 QIIME2 计算，R 包绘制。采用 Blast 进行序列比对，每个代表性序列用 SILVA 数据库对特征序列进行注释。其他的图是使用 R 包实现的 (v3.5.2)。

2 结果与分析

2.1 供试草种生物量比较

试验中供试的草种植株地上和地下生物量见表 1。5 个草类的地上和地下生物量差异显著。ET4 处理草株高显著高于其余处理，FT5 处理地上部鲜

表 1 不同生草株高及生物量
Table 1 Plant height and biomass of different grasses

生草 Grass	处理号 Treatment code	株高 (cm) Height	根鲜重 (g) Fresh root weight	根干重 (g) Root dry weight	地上部鲜重 (g) Aboveground fresh weight	地上部干重 (g) Aboveground dry weight
三叶草 White clover	BT1	83.50±0.71 c	88.36±0.52 b	20.12±0.37 d	154.37±5.29 b	57.44±1.70 b
垂穗草 Pith grass	CT2	44.35±1.20 e	81.11±0.16 c	68.99±0.18 a	17.88±2.04 e	39.89±0.33 e
沙画眉草 Brucella	DT3	69.75±0.35 d	123.60±1.97 a	53.55±0.65 c	112.27±2.86 c	46.22±1.27 d
弯叶画眉草 Curving thrush	ET4	129.00±1.41 a	61.52±1.41 d	19.15±0.27 d	95.85±0.56 d	47.39±0.71 c
加拿大披碱草 Canadian elymus	FT5	91.00±0.71 b	120.68±0.76 a	62.98±0.76 b	171.20±0.90 a	105.02±0.51 a

注 (Note): 同列数据后不同小写字母表示不同生草间差异显著 ($P < 0.05$) Values followed by different small letters in same column are significantly different among grasses ($P < 0.05$).

重、地上部干重显著优于其余草种, CT2 处理根干重显著高于其余草类。

2.2 不同草种根际土壤微生物多样性 OTU 相关性分析

不同草种土壤环境不同, 微生物之间的群落结构存在较大的差异, 以 97% 核酸相似度水平, 得到细菌和真菌的操作分类单元 (OTU)。图 1 所示细菌和真菌的不同组间各自持有的 OTU 个数, 结合 OTU 代表的物种, 可得到细菌和真菌在不同生草土壤环境中的核心微生物。6 组土壤样品共得到 31459

个细菌操作分类单元 (OTUs), 共有的 OTU 个数为 1019 个。其中生草处理的土壤细菌 OTU 个数明显高于清耕处理 (Ack), 以生草 ET4 处理效果最好, 为 5688 个 OTU, 比清耕提高了 22.22% (图 1); 6 组土壤样品共得到 5021 个真菌操作分类单元 (OTUs), 共有的 OTU 个数为 108 个, 除 CT2、DT3 处理外, 经生草处理的土壤真菌操作分类单元 OTU 均高于 Ack 处理, BT1、ET4、FT5 处理分别增加了 1.07%、1.19% 和 4.28%, 其中以生草 FT5 处理真菌 OTU 个数最多 (图 1)。

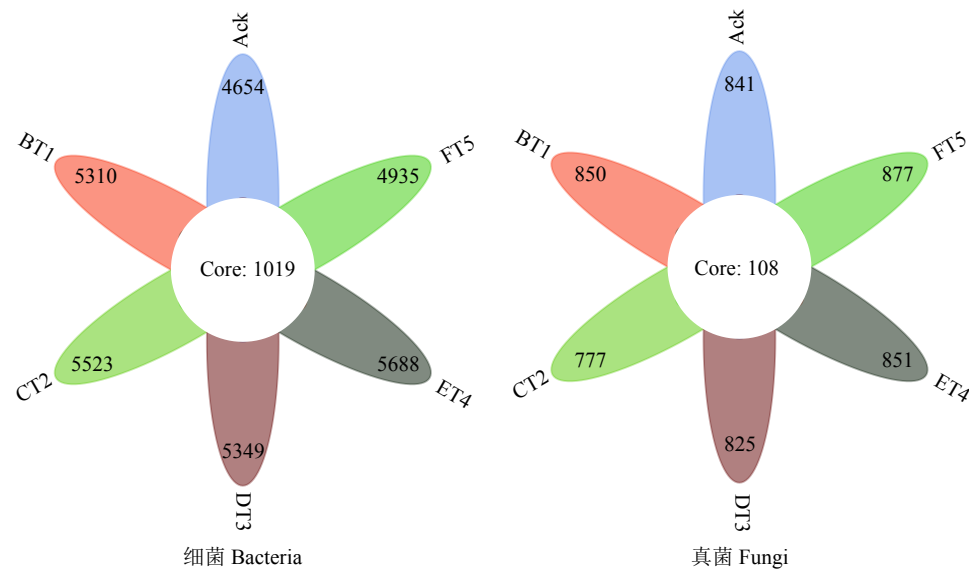


图 1 土壤细菌、真菌多样性的相关性分析

Fig. 1 Correlation analysis of bacteria and fungi diversity among soil samples

[注 (Note): 每个花瓣代表一组样品, 中心圆内数字代表所有样品共有的 OUT 个数, 花瓣内数字代表该组样品的 OUT 个数 Each petal represents one group of samples, the digitals inside the middle circle and each petal represent the OTU number common to all samples and within one group, respectively.]

2.3 不同草种根际土壤微生物 Alpha 多样性分析

Shannon 和 Simpson 指数反映微生物多样性^[18-19], 主要反映物种的均匀度和丰富度。由表 2 可知, 生草处理后的土壤细菌 Shannon、Simpson 和 Chao1 指数均高于清耕处理 (Ack), 弯叶画眉草效果较好, Shannon、Simpson、Chao 指数与 Ack 相比分别增加了 4.61%、7.01% 和 27.44%。生草加拿大披碱草土壤真菌 Shannon、Simpson、Chao1 指数均高于对照处理, Shannon、Chao1 指数显著高于对照, Chao1 是对照的 1.31 倍。

2.4 不同草种根际微生物群落的 Beta 多样性

Heatmap 是基于距离算法 (binary、bray、weighted、unweighted) 得到样品间的距离矩阵, 颜色梯度由蓝色到红色表示样品间距离由近到远, 可根据颜色梯度的变化直观看出两两样品间的差异性^[20]。由图 2 可知, 将各分类水平相对丰度最高 30 个的群落组成数据, 再根据分类单元的丰度分布加以聚类, 此热图经过 Z 值转化后将同一个菌的表达丰度进行归一化, 因此该热图仅能进行横向比较^[21]。图 2 (左), 选取在细菌门水平下分类 (单元>10), 如细菌变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria) 和芽孢杆菌门 (Gemmatimonadetes)。生草处理土壤样品中细菌经过横向聚类后, 样品从 Ack 处理组到生草土壤处理组颜色差异显著。以 ET4 处理的 Proteobacteria 和 FT5 处理的 Acidobacteria 相对丰度高于 Ack 处理, Ack 中细菌 Actinobacteria 和细菌 Gemmatimonadetes 相对丰度高于其余生草处理土壤。图 2 (右), 选取在真菌门水平下分类 (单元>10), 如子囊菌门 (Ascomycota)、担子菌门 (Basidiomycota)、球囊菌门 (Glomeromycota)。生草处理土壤样品中真菌经过横向聚类后, 样品从 Ack 处理组到生草土壤处理组颜色差异显著。FT5 处理中的 Glomeromycota 和 CT2 处理中的 Basidiomycota 群落丰度高于其他生草处理, 分别比对照提高了 1.08、2.16 倍。Ack 处理中的 Ascomycota 高于其余生草处理, 表明生草处理可使土壤中的微生物群落发生显著变化。

2.5 不同草种根际土壤中菌群相对丰度组成分析

根据测序结果对物种进行注释, 默认选择每个样品或者分组在各类水平 (Phylum、Class、Order、Family、Genus) 上丰度靠前 30 的优势物种, 将剩余的物种归为一类, 生成物种相对丰度柱状堆叠图, 便于直观查看各样品在不同分类水平上相对丰度较

高的物种及其比例, 选取门分类单元结果进行统计分析 (图 3)。

关于细菌, 如图 3 (a) 所示, 丰富度较高的前 8 个门分别为变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、芽孢杆菌门 (Gemmatimonadetes)、浮霉菌门 (Planctomycetes)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、疵微菌门 (Verrucomicrobia)。此 8 个细菌门在各自处理中占比超过 95%。6 个试验处理的土壤中, 优势菌群为变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、芽孢杆菌门 (Gemmatimonadetes)、浮霉菌门 (Planctomycetes)、绿弯菌门 (Chloroflexi), 这 6 种优势类群在各自处理中所占比例为 80%。5 个生草处理的土壤细菌丰富度与清耕土壤 Ack 相比, 土壤中变形菌门 (Proteobacteria) 和酸杆菌门 (Acidobacteria) 丰度增加较多, ET4 处理变形菌门增加最多, 比对照提高了 0.24 倍。有些菌门丰度降低, 如芽孢杆菌门 (Gemmatimonadetes)、浮霉菌门 (Planctomycetes)、绿弯菌门 (Chloroflexi), 其在 DT3 生草处理土壤中明显降低, 分别比清耕对照降低了 0.35、0.20 和 0.41 倍。

如图 3 (b) 所示, 真菌丰度较高的前 5 个门为子囊菌门 (Ascomycota)、担子菌门 (Basidiomycota)、球囊菌门 (Glomeromycota)、接合菌门 (Zygomycota)、壶菌门 (Chytridiomycota)。

如图 3 所示, 6 组处理中, 优势菌群为子囊菌门、担子菌门、球囊菌门和接合菌门, 此 4 个优势真菌门在各自处理中占比超过 80%, 与清耕对照比较, BT1、CT2、DT3、ET4、FT5 生草处理将土壤中的担子菌门相对丰度分别提高了 0.07、2.16、1.46、1.81 和 1.27 倍, 而子囊菌门相对丰度呈降低趋势, CT2 生草处理土壤降低明显, 降低了 1.83 倍; CT2、ET4 和 FT5 处理土壤中的球囊菌门相对丰度分别提高了 0.24、0.23、1.08 倍, 而 BT1 和 DT3 处理土壤中的球囊菌门相对丰度小。

2.6 不同生草处理对果园土壤中微生物数量的影响

由图 4 可知, 不同生草处理后的土壤细菌、真菌、放线菌的数量显著高于清耕处理。且随着生草生长时间的延长, 各生草处理土壤中的细菌、真菌、放线菌的数量呈上升趋势。9 月份生草处理土壤中 ET4 处理放线菌数量最多, 比清耕提高了 45.83%, FT5 处理中的真菌和细菌数量显著优于清耕处理, 真菌和细菌数量分别比清耕提高了 0.98 和

表 2 生草处理后土壤样本群落丰富度和多样性指数
Table 2 Indices of community richness and diversity of soil samples after raw grass treatment

生草 Grass	处理编码 Treatment code	细菌 Bacteria				真菌 Fungi			
		Shannon	Simpson	Chao1	覆盖度 (%) Coverage	Shannon	Simpson	Chao1	覆盖度 (%) Coverage
清耕 Clear tillage	Ack	10.20±0.02 b	0.97±0.02 b	2394.81±43 b	99.23	5.53±0.31 b	0.93±0.02 a	372.05±18.31 d	99.98
三叶草 White clover	BT1	10.53±0.14 a	1.00±0.01 a	3045.15±297 a	99.51	6.47±0.44 ab	0.95±0.01 a	451.01±5.77 bc	99.98
垂穗草 Pith grass	CT2	10.44±0.19 ab	1.00±0.01 a	2764.36±149 ab	99.30	6.30±0.10 ab	0.94±0.06 a	422.16±18.16 c	99.96
沙画眉草 Brucella	DT3	10.55±0.06 a	1.00±0.01 a	2895.91±97 a	99.38	6.46±0.66 ab	0.97±0.01 a	468.77±8.43 ab	99.99
弯叶画眉草 Curving thrush	ET4	10.67±0.03 a	1.00±0.01 a	3051.98±26 a	99.57	6.48±0.71 ab	0.95±0.01 a	448.59±4.32 bc	99.98
加拿大披碱草 Canadian elymus	FT5	10.41±0.15 ab	1.00±0.01 a	2805.79±170 a	99.23	6.79±0.11 a	0.98±0.00 a	488.67±1.09 a	99.98

注 (Note) : 同列数据后不同小写字母表示不同生草处理间差异显著 ($P < 0.05$) Values followed by different small letters in same column are significantly different among grasses treatments ($P < 0.05$).

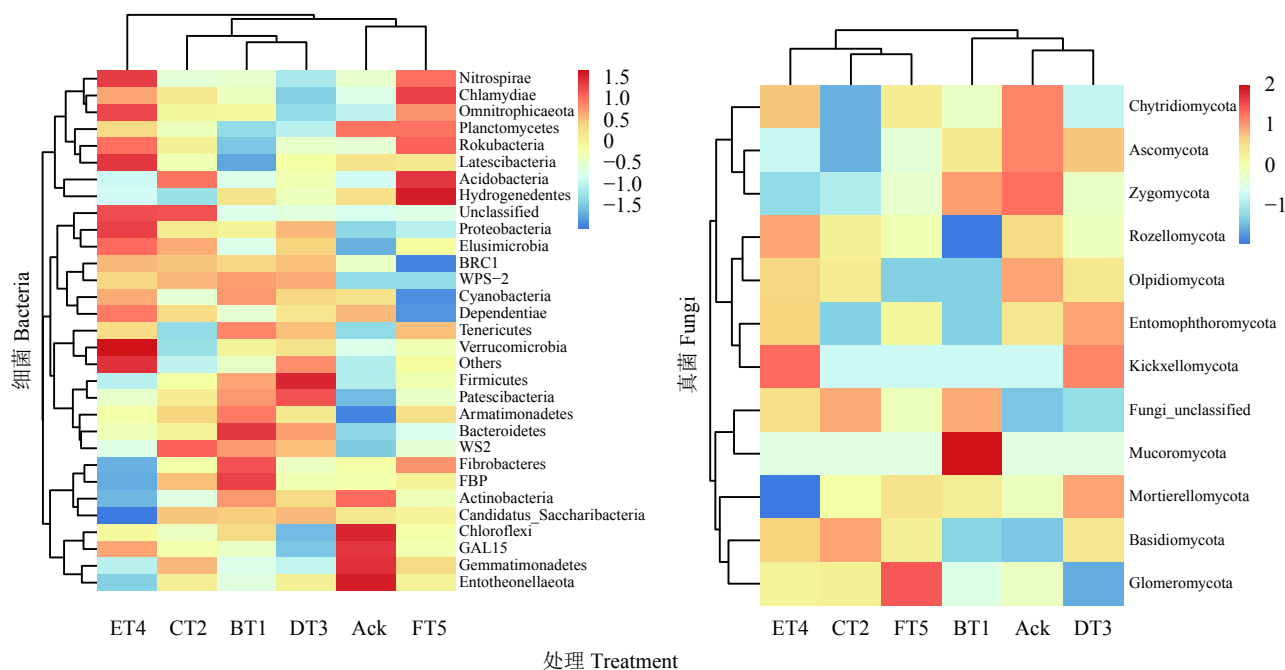


图2 土壤样品细菌、真菌热图分析

Fig. 2 Heatmap analysis of soil sample bacteria and fungi

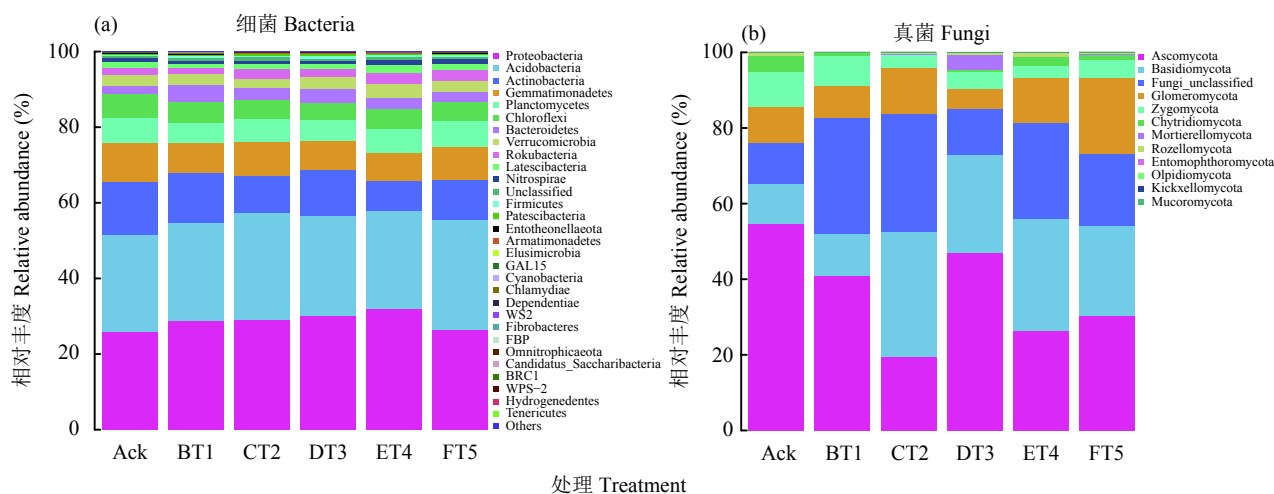


图3 土壤样品中细菌 (a)、真菌 (b) 门分类水平上相对丰度变化

Fig. 3 Changes in relative abundance of soil bacteria (a) and fungi (b) in soil samples at phylum level

[注 (Note): Others 表示图中这 30 个门之外的其他所有门的相对丰度之和; 在每组处理中, 细菌中相对含量低于 0.04, 真菌中相对含量低于 0.03, 未在图中列出其相对含量具体数值。Others represent the sum of the relative abundances of all other phyla excluding the 30 phyla. In each group of processing, values of the relative content are not shown in the figure when the relative content of bacteria is less than 0.04 and the relative content of fungi is less than 0.03.]

0.77 倍。

2.7 不同生草处理对果园土壤养分含量的影响

由表 3 可知, 2018 年 5 个生草处理的土壤全氮含量均低于清耕处理, 分别比清耕处理降低了 10.69%、8.80%、5.90%、3.89%、3.30%, 2019 和 2020 年 5 个生草处理中弯叶画眉草处理全氮含量显著高于其余处理, 分别比清耕对照增加了 33.13%、

52.60%, 2020 年生草处理的土壤全氮含量比 2019 年生草处理的土壤全氮含量有不同幅度增加。2018 年 5 个生草处理的土壤有效磷存在显著性差异, 2018 年生草处理中三叶草、垂穗草、弯叶画眉草、加拿大披碱草处理显著优于对照处理, 2019 年生草处理中以弯叶画眉草处理最好, 其土壤有效磷含量比清耕对照提高了 36.88%。2020 年 5 个生草处理的

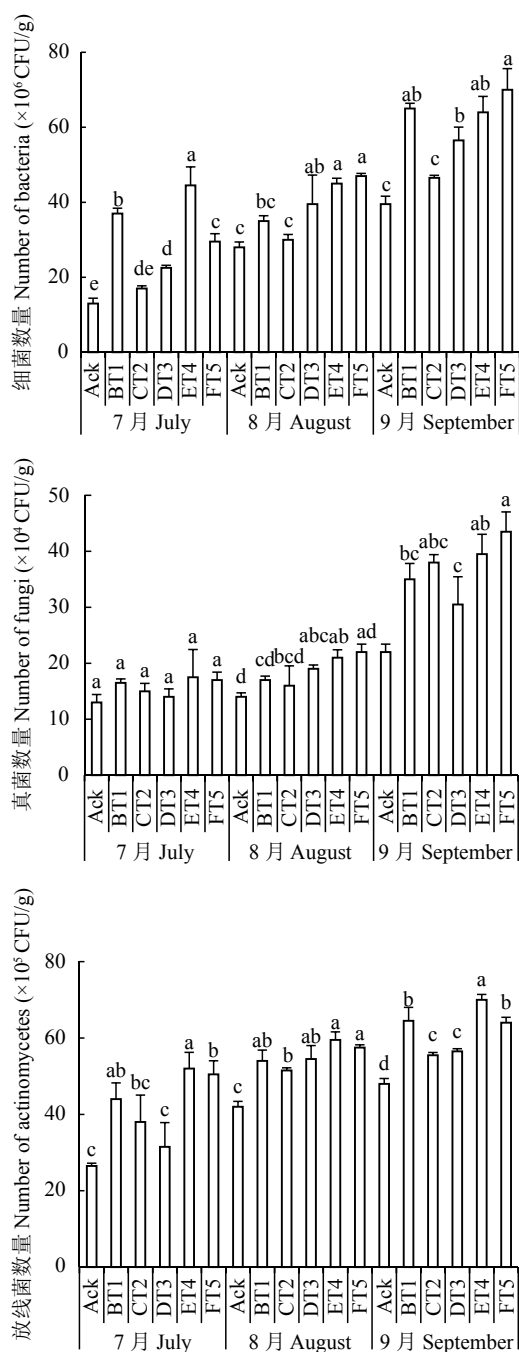


图4 不同生草果园土壤微生物数量

Fig. 4 Microbial population of orchard soils planted with different grass species

[注 (Note): 柱上不同字母表示同一月份不同处理间差异显著 ($P < 0.05$) Different letters above the bars mean significant difference among different treatments in the same month ($P < 0.05$).]

土壤有效磷含量均显著高于清耕对照。3个年份中5个生草处理的土壤有效钾含量显著优于清耕对照。以弯叶画眉草处理最佳,其土壤有效钾含量2018、2019、2020年分别比清耕对照提高了34.26%、36.56%、36.21%。且随着生草年限的增加,土壤中的有效钾含量呈上升趋势。

由表4可知,5个生草处理的土壤有效镁、有效铜、有效锌的含量均显著高于清耕对照处理。3个年份生草处理中,以加拿大披碱草处理土壤有效镁含量显著高于清耕对照,2018、2019、2020年分别比清耕对照提高了10.20%、10.42%、10.51%。3个年份生草处理均以弯叶画眉草处理有效铜含量最高,显著高于清耕对照处理,2018、2019、2020年分别是清耕对照的1.95、1.95、2.10倍。沙画眉草、弯叶画眉草、加拿大披碱草处理土壤有效锌含量显著高于其余处理,2020年生草处理中土壤有效锌含量以加拿大披碱草处理显著高于其余生草处理。

2.8 不同生草处理对果园土壤酶活性的影响

经果园生草处理后,土壤脲酶含量随着生草时间的延长而增加,3个年份生草处理土壤脲酶活性显著高于清耕处理(图5)。其中,DT3生草处理2018年土壤中的脲酶活性是清耕的2.13倍,2019年是清耕的2.07倍,2020年是清耕的2.47倍。3个年份生草处理与清耕处理相比土壤磷酸酶活性显著提高(图5)。其中,ET4生草处理的土壤磷酸酶活性高于其他生草处理,2018年高于清耕处理51.19%,2020年高于清耕处理61.92%,2020年高于清耕处理67.99%。与清耕相比,生草处理3个年份土壤过氧化氢酶活性提高,FT5生草处理2018、2019、2020年分别比清耕提高了3.46%、4.37%和5.14%。

2.9 不同生草处理对果园土壤碳组分的影响

2.9.1 对土壤有机碳含量的影响 由图6可知,2018年ET4、FT5和BT1生草处理土壤中的有机碳含量分别较清耕对照显著提高了38.50%、27.68%和27.51%。2019年各生草处理土壤有机碳含量比2018年高,2020年生草处理土壤有机碳含量显著高于2019、2018年生草处理。ET4处理的土壤有机碳含量最高,2020年生草比2019年生草有机碳含量提高了9.59%,2019年生草土壤有机碳较2018年生草提高了10.7%。

2.9.2 对土壤总有机碳含量的影响 由图7可知,3个年份生草处理与清耕对照相比,土壤全碳含量存在显著性差异且显著高于清耕对照。随着生草年份的增加土壤总有机碳含量呈增加趋势,尤以FT5处理的土壤总有机碳含量最高,2018年FT5处理土壤总有机碳含量为1.65 g/kg,比清耕对照提高了50.55%;2019年FT5处理的土壤总有机碳含量为1.68 g/kg,比清耕对照提高了53.22%;2020年FT5处理为1.96 g/kg,比清耕对照提高了79.17%。

表 3 2018—2020 年不同生草处理的土壤大量元素含量
Table 3 Macro element contents in soils under five grasses treatments from 2018 to 2020

生草 Grass	处理编码 Treatment code	全氮 Total N (mg/kg)			有效磷 Available P (mg/kg)			有效钾 Available K (mg/kg)		
		2018	2019	2020	2018	2019	2020	2018	2019	2020
清耕 Clear tillage	Ack	31.79±0.78 a	28.84±0.38 e	29.60±0.40 e	24.72±0.70 b	28.00±0.17 f	32.67±0.79 b	41.88±0.61 e	43.17±0.08 d	45.88±0.35 f
三叶草 White clover	BT1	28.72±0.70 c	32.99±1.13 d	37.02±0.33 d	30.60±0.08 a	36.18±0.06 b	38.38±0.05 a	49.72±0.71 c	52.77±0.58 c	55.67±0.31 d
垂穗草 Pith grass	CT2	29.22±0.15 c	34.46±0.33 cd	40.94±0.41 c	29.12±1.07 a	33.67±0.64 d	36.82±0.07 a	48.72±0.69 cd	52.47±0.49 c	54.20±0.11 e
沙画眉草 Brucella	DT3	30.02±0.19 c	36.02±0.79 b	44.42±0.13 a	26.29±1.49 b	31.05±0.23 e	36.72±2.13 a	47.21±1.34 d	53.31±0.21 c	57.27±1.34 c
弯叶画眉草 Curing thrush	ET4	30.60±0.08 ab	38.40±0.22 a	45.17±0.21 a	30.77±0.65 a	38.33±0.16 a	39.50±0.38 a	56.23±0.17 a	58.96±0.57 a	62.49±0.21 a
加拿大披碱草 Canadian elymus	FT5	30.77±0.65 ab	35.62±0.09 bc	42.87±0.97 b	29.32±0.00 a	35.33±0.16 c	37.67±0.01 a	52.67±0.77 b	56.22±0.33 b	59.10±0.32 b

注 (Note) : 同列数据后不同小写字母表示不同生草处理间差异显著 Values followed by different small letters in same column are significantly different among grasses treatments ($P < 0.05$).

表 4 2018—2020 年不同生草处理的土壤微量元素含量
Table 4 Trace element contents in soils under five grasses treatments from 2018 to 2020

生草 Grass	处理编码 Treatment code	有效镁 (mg/kg) Available Mg			有效铜 (g/kg) Available Cu			有效锌 (mg/kg) Available Zn		
		2018	2019	2020	2018	2019	2020	2018	2019	2020
清耕 Clear tillage	Ack	148.72±0.56 d	149.98±0.66 f	151.73±0.68 e	1.45±0.01 f	1.54±0.04 e	1.60±0.02 d	0.89±0.04 c	0.93±0.02 c	1.07±0.08 e
三叶草 White clover	BT1	156.32±2.83 bc	157.45±0.29 c	159.78±0.13 c	2.11±0.02 d	2.27±0.08 c	2.38±0.06 bc	1.28±0.08 b	1.34±0.11 b	1.36±0.03 d
垂穗草 Pith grass	CT2	154.97±0.49 c	156.27±0.08 d	158.65±0.46 c	2.38±0.04 c	2.44±0.04 b	2.54±0.04 b	1.27±0.08 b	1.31±0.04 b	1.35±0.06 d
沙画眉草 Brucella	DT3	146.29±1.52 d	151.29±0.10 e	156.16±0.40 d	1.81±0.04 e	2.07±0.08 d	2.22±0.01 c	1.50±0.06 a	1.56±0.03 a	1.62±0.01 c
弯叶画眉草 Curing thrush	ET4	160.84±3.38 ab	160.40±0.26 b	163.03±0.27 b	2.83±0.06 a	2.99±0.03 a	3.35±0.14 a	1.55±0.01 a	1.66±0.03 a	1.74±0.02 b
加拿大披碱草 Canadian elymus	FT5	163.88±0.51 a	165.60±0.54 a	167.68±0.66 a	2.60±0.08 b	2.90±0.08 a	3.28±0.10 a	1.51±0.06 a	1.59±0.03 a	1.86±0.02 a

注 (Note) : 同列数据后不同小写字母表示不同生草处理间差异显著 ($P < 0.05$) Values followed by different small letters in same column are significantly different among grasses treatments ($P < 0.05$).

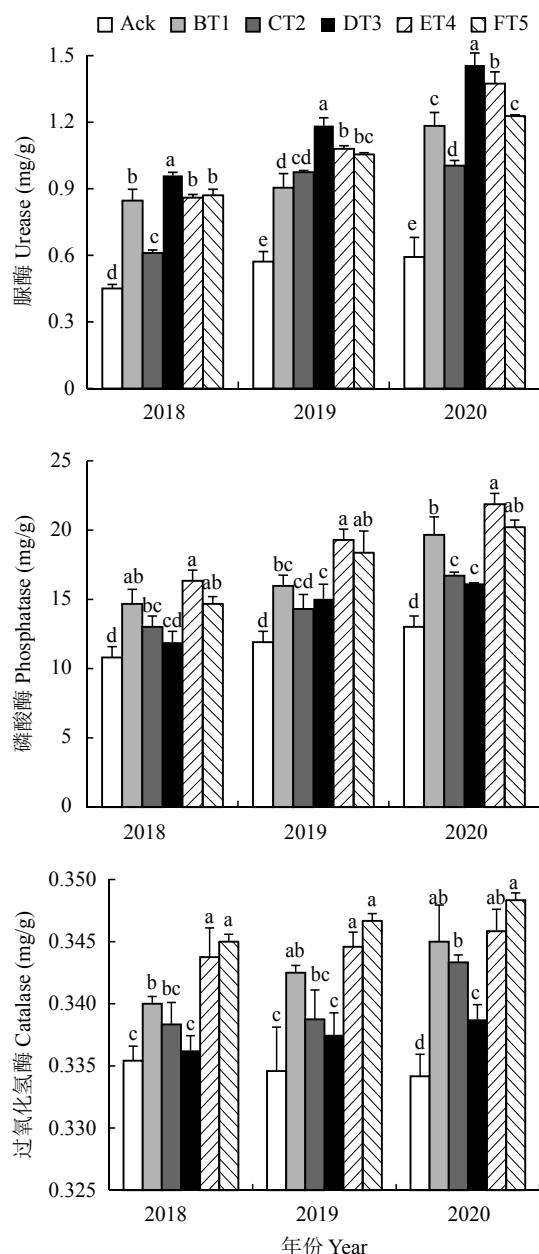


图 5 不同生草果园的土壤酶活性

Fig. 5 Enzyme activities in orchard soils planted with different grass species

[注 (Note): 柱上不同字母表示同一年处理间差异显著 ($P < 0.05$) Different letters above the bars mean significant difference among different treatments in the same year ($P < 0.05$).]

2.9.3 对土壤可溶性有机碳含量的影响 如图 8 所示, 不同生草处理的果园土壤可溶性有机碳含量随生草年限的增加而呈现上升趋势。2018 年生草处理中 DT3 处理土壤中可溶性有机碳含量显著高于其余生草处理, 比对照提高了 40.74%, 2019 和 2020 年 CT2 和 DT3 生草处理土壤中可溶性有机碳含量显著增加, 与对照相比, CT2 处理分别增加了 51.91% 和 52.35%, DT3 处理分别增加了 60.47% 和 63.41%。

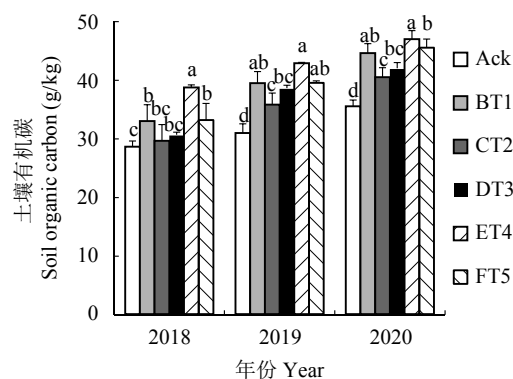


图 6 连续 3 年果园生草土壤有机碳含量

Fig. 6 Soil organic carbon content in orchard soils planted with different grass species over three consecutive growing seasons

[注 (Note): 柱上不同字母表示同一年处理间差异显著 ($P < 0.05$) Different letters above the bars mean significant difference among different treatments in the same year ($P < 0.05$).]

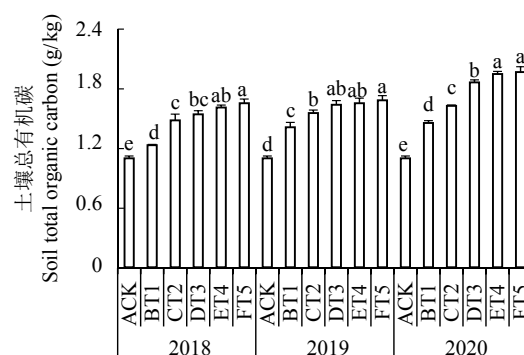


图 7 连续 3 年果园生草土壤总有机碳含量

Fig. 7 Soil total organic carbon content in soils planted with different grass species over three consecutive growing seasons

[注 (Note): 柱上不同字母表示同一年处理间差异显著 ($P < 0.05$) Different letters above the bars mean significant difference among different treatments in the same year ($P < 0.05$).]

2.9.4 土壤中酶活性和碳组分相关性分析 由表 5 可知, SOC 与脲酶、磷酸酶、过氧化氢酶、细菌、真菌和放线菌; 磷酸酶与过氧化氢酶、细菌、真菌和放线菌; 过氧化氢酶与细菌、真菌和放线菌; 真菌与放线菌极显著正相关 ($P < 0.01$), DOC 与 TOC 和脲酶极显著正相关, TOC 与 SOC、脲酶、磷酸酶、过氧化氢酶、细菌、真菌和放线菌极显著或显著正相关, 细菌与真菌和放线菌极显著或显著正相关。脲酶与磷酸酶、过氧化氢酶、细菌和放线菌极显著或显著正相关。上述结果表明, 果园生草处理中土壤的碳组分(除 DOC 外)、酶活性与微生物数量之间存在极显著或显著正相关。

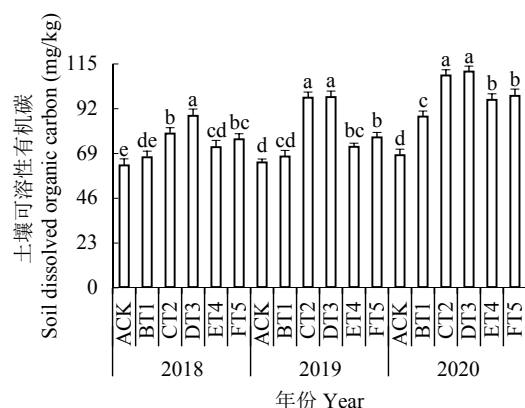


图 8 连续 3 年果园生草土壤可溶性有机碳含量

Fig. 8 The content of dissolved organic carbon in soils planted with different grass species over three consecutive growing seasons

[注 (Note): 柱上不同字母表示同一年处理间差异显著 ($P < 0.05$)
Different letters above the bars mean significant difference among different treatments in the same year ($P < 0.05$).]

3 讨论

土壤微生物作为土壤中最活跃的部分,直接或间接的参与大量的生化反应,对促进土壤物质循环、稳定与保持土壤的生产力和健康方面发挥着重要作用^[22-23]。微生物的多样性是维持生态系统稳定性和微生物功能的重要因素之一^[24]。微生物活动中碳源和氮源来源之一是植物,微生物又分解碳源和氮源,为植物提供养分从而达到互惠互利。本试验利用高通量测序技术,ET4 处理效果好,土壤细菌中 OTU 个数明显高于清耕对照,为 5688 个,比清耕对照提高了 22.22%;同时细菌总体的 OTU、丰富度和多样

性高于真菌。经 Alpha 多样性分析得知,ET4 和 FT5 处理土壤细菌 Shannon、Simpson 和 Chao1 指数高于清耕对照,这与 Beta 多样性分析结果相符,其组间微生物多样性差异大。有研究结果表明,土壤中由细菌主导转向真菌主导时,植株受病菌侵染性加大^[25]。ET4 处理,细菌数量增多,真菌数量减少,在一定情况下,降低了植株遭受病害的几率。尽管其余几个生草处理,对细菌和真菌的多样性和丰富度不如 ET4 生草和 FT5 处理影响效果显著,但一定程度上降低了真菌的 OTU,对植株仍有一定的保护作用。生草处理的根际土壤 Beta 多样性存在差异的原因有待进一步验证。

据物种注释结果,6 个土壤样品中细菌的优势类群为变形菌门、酸杆菌门、放线菌门、芽单胞菌门、浮霉菌门、绿弯菌门,这 6 种优势类群在各自处理中所占比例均超过 95%,其中,变形菌门和酸杆菌门的比例超过 50%。本试验中,生草处理提高了变形菌门、酸杆菌门和放线菌门丰度,其他菌门低于清耕对照。有研究结果表明,变形菌门和放线菌门等为土壤中的有益菌,各种有机物的碳氮代谢类型多样化,变形菌门参与其中,它还可作为生物因子治理代谢环境中的化学污染^[26]。同时也有研究表明变形菌门和放线菌门参与有机质分解^[27]。土壤中酸杆菌门大多是嗜酸菌,分布在不同土壤环境中,对土壤酸性有一定的影响^[28]。不同生草处理其微生物相对丰度的变化可能与土壤微环境的酸碱性有关,具体原因仍需后续进一步研究。

真菌优势种群为子囊菌门、担子菌门、球囊菌

表 5 土壤碳组分、酶活性和微生物数量的相关性

Table 5 Correlation of soil carbon components, enzyme activities and micro-organisms number

项目 Item	DOC	TOC	SOC	脲酶 Urease	磷酸酶 Phosphatase	过氧化氢酶 Catalase	细菌 Bacteria	真菌 Fungus	放线菌 Actinomycetes
DOC	1.000								
TOC	0.781**	1.000							
SOC	0.460	0.766**	1.000						
脲酶 Urease	0.738**	0.863**	0.804**	1.000					
磷酸酶 Phosphatase	0.342	0.697*	0.929**	0.676*	1.000				
过氧化氢酶 Catalase	0.433	0.663*	0.867**	0.581*	0.870**	1.000			
细菌 Bacteria	0.328	0.684*	0.911**	0.728**	0.873**	0.793**	1.000		
真菌 Fungus	0.568	0.758**	0.780**	0.566	0.765**	0.900**	0.645*	1.000	
放线菌 Actinomycetes	0.317	0.685*	0.920**	0.698*	0.976**	0.796**	0.867**	0.717**	1.000

注 (Note): **— $P < 0.01$; *— $P < 0.05$. SOC—土壤有机碳 Soil organic C; TOC—土壤总有机碳 Total organic C; DOC—可溶性有机碳 Dissolved organic carbon.

门和接合菌门,在各自处理中占比超过 80%,其中子囊菌门在 6 个处理中均超过 20%。虽然有研究结果显示,子囊菌门中的 2 个变种,即 *V.mali* var. *pyri* 和 *Valsa mali* var. *mali*, 是苹果腐烂病的主要病原菌之一^[29],但是也有结果显示,子囊菌门中的 *Incertae sedis* 27 还具有促进生根的作用^[30]。担子菌门数量多、分布广,可食用、也可药用,也可引起植物和园林病害^[31]。本试验中,5 个生草处理与清耕对照比较,提高了土壤中的担子菌门相对丰度,而子囊菌门相对丰度呈降低趋势,CT2 处理土壤降低明显,降低了 1.83 倍;CT2、ET4 和 FT5 处理提高了土壤中的球囊菌门相对丰度,而 BT1 和 DT3 处理土壤中的球囊菌门相对丰度小,引起生草处理中真菌群落相对丰度变化的原因还有待研究。

土壤酶来源于动物尸体、植物残体和土壤微生物,是表层土壤健康的关键指标。有研究结果表明,猕猴桃园套种吉祥草可增强土壤中的酶活性,过氧化氢酶参与各种化合物的氧化,磷酸酶促进有机磷化合物的水解,脲酶促进有机质分子中肽键的水解,蔗糖酶完成土壤有机体循环过程^[32-33]。徐凌飞等^[34]研究表明,梨园生草可不同程度的提高土壤酶活性。本试验研究结果表明生草处理与清耕相比,可显著提高土壤中过氧化氢酶活性、脲酶活性和磷酸酶活性,并在不同生草处理中酶活性存在显著性差异,这与徐凌飞等^[34]的试验研究结果一致。生草后显著提高了土壤中各类土壤酶活性,可能是生草后枯草凋落物还田腐解引起土壤微生物群落多样性和丰富度升高而间接影响土壤酶活性^[35]。土壤中的有机碳是土壤肥力的核心和重要来源,为植物生长提供多种营养,是促进果树生长发育、实现果树丰产的重要条件。研究表明,果园生草可提高土壤有机碳含量^[36]。另外,果园生草对土壤有机碳的影响还与生长年限有关^[37]。吴玉森等^[38]对梨园生草的研究结果表明,持续多年的自然生草有利于土壤表层脲酶和碱性磷酸酶等主要酶活性的提高,对土壤有机质含量提高均具有明显作用;随着生草年限的增加,自然生草对改善梨园土壤矿质营养状况同样具有良好效果。本试验中,ET4 处理 2018 年的土壤有机碳含量显著增加,5 个草种处理 2019 年的土壤有机碳含量较清耕均有显著增加,且 2020 年生草和 2019 年生草处理的土壤有机碳含量比 2018 年生草有明显的提高,说明果园生草可以提高土壤有机碳的含量,且随着生草年限的增加,有机碳含量提高的效果更明显。果园生草不但有利于诱集害虫到草中觅食、越

冬,降低地上害虫防治的难度,还有利于害虫天敌的生存和繁育,增加害虫天敌(如瓢虫、草蛉等)数量,减少病虫害发生、农药投入、农药残留、环境污染,但若干年后,园内是否会产生草与果树共患的病虫害风险甚至是生态危害尚不明确,有待进一步探讨^[39]。

4 结论

果园生草可改变土壤中细菌和真菌的丰富度和多样性,改变土壤中门水平的细菌和真菌的相对丰度。弯叶画眉草可提高土壤中细菌丰富度和多样性,沙画眉草处理土壤细菌中的芽单胞菌门、浮霉菌门、绿弯菌门相对丰度降低;5 个生草处理提高了土壤真菌中担子菌门的相对丰度,垂穗草处理子囊菌门相对丰度降低明显,垂穗草、弯叶画眉草和加拿大披碱草提高了土壤中的球囊菌门相对丰度。随着生草时间的延长,不同生草处理均不同程度地提高了土壤有机碳、酶活性和微生物的含量。综合来看,弯叶画眉草和加拿大披碱草处理对于改善土壤环境、土壤养分和微生物活性的效果较好。

参 考 文 献:

- [1] Zhong Z, Huang X, Feng D, *et al.* Long-term effects of legume mulching on soil chemical properties and bacterial community composition and structure[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2018, 268: 24–33.
- [2] Wang J, Huang J, Zhao X, *et al.* Simulated study on effects of ground managements on soil water and available nutrients in jujube orchards[J]. *Land Degradation & Development*, 2016, 27(1): 35–42.
- [3] 张钦, 于恩江, 林海波, 等. 连续种植不同绿肥作物耕层的土壤团聚体特征[J]. *西南农业学报*, 2019, 32(1): 148–153.
Zhang Q, Yu E J, Lin H B, *et al.* Soil aggregate characteristics in topsoil layer under continuity planting same green manure crop[J]. *South China Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 32(1): 148–153.
- [4] 吴家森, 黄坚钦. 生草栽培对山核桃林地土壤养分及微生物多样性的影响[J]. *生态学报*, 2014, 34(15): 4324–4332.
Wu J S, Huang J Q. Effects of grass cultivation on soil nutrient and microbial diversity in pecan woodlands[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(15): 4324–4332.
- [5] Poeplau C, Aronsson H, Myrbeck A, *et al.* Effect of perennial ryegrass cover crop on soil organic carbon stocks in southern Sweden[J]. *Geoderma Regional*, 2015, 4: 126–133.
- [6] 焦润安, 张舒涵, 李毅, 等. 生草影响果树生长发育及果园环境的研究进展[J]. *果树学报*, 2017, (12): 1610–1623.
Jiao R A, Zhang S H, Li Y, *et al.* Research progress on the effect of grass on the growth and development of fruit trees and orchard environment[J]. *Journal of Fruit Science*, 2017, (12): 1610–1623.
- [7] 张林森, 刘富庭, 张永旺, 等. 不同覆盖方式对黄土高原地区苹果园

- 土壤有机碳组分及微生物的影响[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(15): 3180–3190.
- Zhang L S, Liu F T, Zhang Y W, *et al.* Effects of different mulching methods on soil organic carbon components and microorganisms of apple orchard in Loess Plateau[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(15): 3180–3190.
- [8] 潘介春, 徐石兰, 丁峰, 等. 生草栽培对龙眼果园土壤理化性质和微生物学性状的影响[J]. *中国果树*, 2019, (6): 59–64.
- Pan J C, Xu S L, Ding F, *et al.* Effects of grass cultivation on soil physicochemical properties and microbiological properties of longan orchard[J]. *China Fruits*, 2019, (6): 59–64.
- [9] 惠竹梅, 岳泰新, 张瑾, 等. 西北半干旱区葡萄园生草体系土壤生物学特性与土壤养分的关系[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(11): 2310–2317.
- Hui Z M, Yue T X, Zhang J, *et al.* The relationship between soil biological characteristics and soil nutrients in the vineyard grass system in the semi-arid area of Northwest China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(11): 2310–2317.
- [10] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018.
- Bao S D. Soil and agrochemical analysis[M]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2018.
- [11] 刘富庭, 张林森, 李雪薇, 等. 生草对渭北旱地苹果园土壤有机碳组分及微生物的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2014, 20(2): 355–363.
- Liu F T, Zhang L S, Li X W, *et al.* Effects of grass growing on soil organic carbon components and microorganisms in apple orchard in Weibei dryland[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2014, 20(2): 355–363.
- [12] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- Lu R K. Analysis method of soil and agrochemistry[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000.
- [13] 林先贵, 王小明. 土壤微生物研究原理与方法[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010.30–47.
- Lin X G, Wang Y M. Principles and methods of soil microbial research[M]. Beijing: Higher Education Press, 2010. 30–47.
- [14] 程丽娟, 薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000.80–83.
- Cheng L J, Xue Q H. Microbiology experimental technology[M]. Xi'an: World Book Publishing Company, 2000. 80–83.
- [15] 寇建村, 杨文权, 韩明玉, 等. 行间种植豆科牧草对苹果园土壤微生物区系及土壤酶活性的影响[J]. *草地学报*, 2013, 21(4): 676–682.
- Kou J C, Yang W Q, Han M Y, *et al.* Effects of intercropping legumes on soil microflora and soil enzyme activities in apple orchard[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2013, 21(4): 676–682.
- [16] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957–2963.
- [17] Nicholas A B, Sathish S, Jeremiah J F, *et al.* Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(1): 57–59.
- [18] Pitta D W, Parmar N, Patel A K, *et al.* Bacterial diversity dynamics associated with different diets and different primer pairs in the rumen of kankrej cattle[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(11): 0111710–710.
- [19] Sun R, Zhang X X, Guo X, *et al.* Bacterial diversity in soils subjected to long-term chemical fertilization can be more stably maintained with the addition of livestock manure than wheat straw[J]. *Science Foundation in China*, 2015, 88(4): 9–18.
- [20] 赵晓红, 柴姗姗, 张曼曼, 等. 施用贝壳粉对酸化土壤微生物多样性及平邑甜茶幼苗生长的影响[J]. *林业科学*, 2020, 56(9): 153–163.
- Zhao X H, Chai S S, Zhang M M, *et al.* Effects of shell powder on microbial diversity in acidified soil and seedling growth of Pingyi sweet tea[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2020, 56(9): 153–163.
- [21] Avershina E, Frisli T, Rudi K. De novo semi-alignment of 16S rRNA gene sequences for deep phylogenetic characterization of next generation sequencing data[J]. *Microbes & Environments*, 2013, 28(2): 211–216.
- [22] 尹国丽, 李亚娟, 张振粉, 等. 不同草田轮作模式土壤养分及细菌群落组成特征[J]. *生态学报*, 2020, 40(5): 1542–1550.
- Yin G L, Li Y J, Zhang Z F, *et al.* Soil nutrients and bacterial community composition characteristics of different rotation patterns in different grass fields[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2020, 40(5): 1542–1550.
- [23] Peng L H, Chen G, Hu H L, *et al.* Direct and indirect effects of nitrogen additions on fine root decomposition in a subtropical bamboo forest[J]. *Plant and Soil*, 2015, 389(1–2): 273–288.
- [24] 陈悦, 吕光辉, 李岩. 独山子区优势草本植物根际与非根际土壤微生物功能多样性[J]. *生态学报*, 2018, 38(9): 122–129.
- Chen Y, Lü G H, Li Y. Functional diversity of microorganisms in rhizosphere and non rhizosphere soil of dominant herbs in Dushanzi District[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(9): 122–129.
- [25] Marschner P, Yang C H, Lieberei R, *et al.* Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(11): 1437–1445.
- [26] O'Mahony M M, Dobson A D W, Barnes J D, *et al.* The use of ozone in the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil[J]. *Chemosphere*, 2006, 63(2): 307–314.
- [27] Li X, Sun M, Zhang H, *et al.* Use of mulberry-soybean intercropping in salt-alkali soil impacts the diversity of the soil bacterial community [J]. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9(3): 293–304.
- [28] Meng H, Li K, Nie M, *et al.* Responses of bacterial and fungal communities to an elevation gradient in a subtropical montane forest of China[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2013, 97(5): 2219–2230.
- [29] 周玉霞, 张美鑫, 翟立峰, 等. 梨和苹果腐烂病菌不同培养表型菌株的致病性分析[J]. *植物病理学报*, 2014, 44(2): 217–220.
- Zhou Y X, Zhang M X, Zhai L F, *et al.* Comparison of pathogenicity of *Valsa mali* strains showing different culturing phenotypes[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2014, 44(2): 217–220.
- [30] 李发虎, 李明, 刘金泉, 等. 生物炭对温室黄瓜根际土壤真菌丰度和根系生长的影响[J]. *农业机械学报*, 2017, 48(4): 265–270,341.
- Li F H, Li M, Liu J Q, *et al.* Effect of biochar on fungal abundance of rhizosphere soil and cucumber root growth in greenhouse[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery*, 2017, 48(4): 265–270,341.
- [31] 戴玉成. 中国木本植物病原木材腐朽菌研究[J]. *菌物学报*, 2012, 31(4): 493–509.

- Dai Y C. Pathogenic wood-decaying fungi on woody plants in China[J]. *Mycosystema*, 2012, 31(4): 493–509.
- [32] 张承, 王秋萍, 周开拓, 等. 猕猴桃园套种吉祥草对土壤酶活性及果实产量、品质的影响[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(8): 1556–1567.
Zhang C, Wang Q P, Zhou K T, *et al.* Effects of interplanting Jixiang grass in kiwifruit orchard on soil enzyme activities and fruit yield and quality[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(8): 1556–1567.
- [33] Greg D, Tilston E L, Julie B, *et al.* Spatial structuring of soil microbial communities in commercial apple orchards[J]. *Applied Soil Ecology*, 2018, 130: 1–12.
- [34] 徐凌飞, 韩清芳, 吴中营, 等. 清耕和生草梨园土壤酶活性的空间变化[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(23): 4977–4982.
Xu L F, Han Q F, Wu Z Y, *et al.* Spatial variation of soil enzyme activities in pear orchard under clean and sod cultivation models[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(23): 4977–4982.
- [35] Zhang Z, Chen Q, Yin C, *et al.* The effects of organic matter on the physiological features of *Malus hupehensis* seedlings and soil properties under replant conditions[J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, 146: 52–58.
- [36] 徐明岗, 文石林, 高菊生. 红壤丘陵区不同种草模式的水土保持效果与生态环境效应[J]. *水土保持学报*, 2001, 15(1): 77–80.
Xu M G, Wen S L, Gao J S. Effects of different forage planting model on soil and water conservation and environments in red hilly regions[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2001, 15(1): 77–80.
- [37] 万素梅, 韩清芳, 贾志宽, 等. 黄土高原半湿润区苜蓿草地土壤氮素消耗特征研究[J]. *植物营养与肥科学报*, 2008, 14(1): 84–89.
Wan S M, Han Q F, Jia Z K, *et al.* Soil nitrogen consumption characteristics of alfalfa grassland in the semi-humid areas of the Loess Plateau[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2008, 14(1): 84–89.
- [38] 吴玉森, 张艳敏, 冀晓昊, 等. 自然生草对黄河三角洲梨园土壤养分、酶活性及果实品质的影响[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(1): 99–108.
Wu Y S, Zhang Y M, Ji X H, *et al.* Effects of natural grass on soil nutrients, enzyme activities and fruit quality of pear orchards in the Yellow River Delta[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(1): 99–108.
- [39] 曹群虎, 黎旭涛, 蔡宏兰. 渭北旱塬果园生草技术[J]. *西北园艺*, 2019, (6): 19–22.
Cao Q H, Li X T, Cai H L. The technology of growing grass in the orchard of Weibei dryland[J]. *Northwest Horticulture*, 2019, (6): 19–22.