

# 引黄灌区不同种植年限紫花苜蓿 土壤真菌群落多样性特征

牟红霞<sup>1</sup>, 张文文<sup>1</sup>, 刘秉儒<sup>2</sup>

(1.宁夏大学 西北退化生态系统恢复与重建教育部重点实验室, 银川 750021;

2.北方民族大学 生物科学与工程学院, 银川 750021)

**摘 要:**为了解引黄灌区紫花苜蓿土壤真菌结构及多样性特征随种植年限的演变规律与变化机理,为人工草地管理提供科学依据,采用 18SrDNA 高通量测序方法分析引黄灌区种植不同年限的紫花苜蓿(1~6 a)土壤真菌的物种群落组成和丰度、Alpha 多样性及 Beta 多样性与菌群所具有的结构,同时对土壤真菌群落组成与土壤理化因子进行了相关性分析。结果表明:在属水平下,毛壳属、镰孢属、赤霉菌属、*Lectera*、小画线壳属为优势菌属;多样性分析表明,种植时间为 5 a 时,土壤真菌菌群丰度和多样性均达到最高,种植时间为 2 a 与 3 a 时,物种多样性组成相似性达到最高;随着种植年限的变化,土壤真菌群落变化表现为先减小后增大的变化趋势,且与土壤理化性质具有显著相关关系。pH 值、速效氮和有机碳是影响紫花苜蓿土壤真菌群落组成的主要因子。

**关键词:**引黄灌区; 种植年限; 紫花苜蓿; 真菌群落; 多样性

中图分类号:S154.39

文献标识码:A

文章编号:1005-3409(2021)04-0091-06

## Soil Fungi Community Diversity in *Medicago sativa* Field of Different Planting Years at Yellow River Diversion Irrigation Area

MOU Hongxia<sup>1</sup>, ZHANG Wenwen<sup>1</sup>, LIU Bingru<sup>2</sup>

(1.Breeding Base of State Key Labpratory for Preventing Land Degradation and Ecological Restoration, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2.College of Biological Science and Engineering, North Minzu University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** In order to understand the soil fungal structure and diversity characteristics of *Medicago sativa* in Yellow River diversion irrigation area, change mechanism of planting years were studied, and the scientific basis for artificial grassland management was provided. The 18SrDNA high-throughput sequencing method was used to analyze the community composition and abundance, Alpha diversity, Beta diversity and the structure of the bacterial community of *Medicago sativa* (1~6 a) planted in the Yellow River irrigation area for different years. The composition of the fungal community was correlated with the soil physical and chemical factors relevant analysis. The results showed that the dominant genere of fungi detected were Chaetomium, Fusarium, Gibberella, Lectera, Monograph Ella at the genus level. The results of diversity analysis showed that the abundance and diversity of soil fungal flora reached the highest when the planting time was 5 years, and the similarity of species diversity composition reached the highest when the planting time was 2 years and 3 years. With the change of planting years, the changes of soil fungal communities showed a trend of first decreasing and then increasing, and had a significant correlation with soil physical and chemical properties. The pH value, available nitrogen, and organic carbon are the main factors affecting the composition of *Medicago sativa* fungal community.

**Keywords:** yellow river irrigation area; planting years; *Medicago sativa*; fungal communities; diversity

收稿日期:2020-08-27

修回日期:2020-09-21

资助项目:国家自然科学基金地区项目“封育年限对宁夏荒漠草原植物—土壤—微生物 C、N、P 生态化学计量特征的影响”(31660168)

第一作者:牟红霞(1996—),女,宁夏银川人,在读硕士,研究方向为土壤微生物多样性。E-mail:mou18309573621@163.com

通信作者:刘秉儒(1972—),男,甘肃庆阳人,研究员,主要从事生态修复与生物多样性研究。E-mail:bingru.liu@163.com

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)属于多年生草本植物,且这种植物的根系比较发达、抗盐碱、拥有较好的适应能力、能够防风固沙、改良土壤等多种特性<sup>[1]</sup>。因其具有高产、高品质,可用于放牧、青贮饲料和干草的制备等多种利用方式,因此将其作为牧草栽培中的优良品种。紫花苜蓿是我国种植面积居首位的牧草,具有十分重要的生态和经济效应。关于紫花苜蓿生长年限对土壤理化性状和肥力研究均有报道,比如,有研究已证明,生长年限对土壤理化性状和肥力均有影响,除 pH 值外不同种植年限间有着一定的差异性<sup>[2-3]</sup>,土壤中有有机质和全氮的含量随种植年限增加而增长,但其增长率会随种植年限增加而下降,这表示其增幅具有一定的周期性<sup>[4-5]</sup>。同时苜蓿地土壤中养分增长年限会因为区域的不同而有所不同,在中国黄土高原地区,通常其土壤有机质、全氮增长长期表现在 5~10 a<sup>[6]</sup>。但是在一些干旱地区,种植 4 a 左右,土壤养分含量相对来说比较高<sup>[7]</sup>。对“黑土滩”不同建植年限栽培草地的研究则发现土壤养分变化表现为 2 a 一个周期的变化规律<sup>[8]</sup>。土壤养分增加幅度和周期受到土壤微生物的调控,但是对苜蓿种植年限的土壤微生物群落结构变化及演变规律与影响因素知之甚少。

微生物是整个土壤生态系统之中最为关键的分解者,参与到了土壤碳氮养分循环的过程之中,是土壤中肥力的重要活性因子<sup>[9-10]</sup>。真菌是土壤中微生物的一个主要成分,大约占微生物总量的 90%<sup>[11]</sup>。而微生物量快速周转过程中逐步释放的供植物生长的有效营养,主要受真菌菌群的调控。同时在植物有机体分解的初期过程中,真菌是比较活跃的,因此真菌在生态系统营养循环中具有关键作用<sup>[12]</sup>。在降雨量只有 200 mm 左右的引黄灌区,紫花苜蓿种植有着得天独厚的优势,使其产量更高、品质更好,在这样的水土条件下,微生物真菌的群落结构和功能与其他地区有怎样的差异尚不清楚。因此,本研究从土壤微生物中真菌多样性特征入手,通过不同种植年限苜蓿地土壤肥力变化与真菌群落多样性变化之间的某种规律,寻找影响土壤肥力的主要真菌菌群,为引黄灌区紫花苜蓿连种提供一个稳定的土壤养分循环系统。

因其真菌的种类非常多,而且个体间的多态性不是非常明显,因此采用传统的方法对真菌进行正确的分类存在较大的困难<sup>[13]</sup>。本研究使用高通量测序的方法对其土壤中的真菌多样性进行全面的分析。深度测序的性能是高通量测序技术的优势<sup>[14]</sup>,同时也给微生物方面的研究提供了一定技术层面的便利。本研究以宁夏贺兰山人工紫花苜蓿农场种植时间为 1~6 a 的紫花苜蓿地为研究对象,研究其土壤养分分

布特征,并使用 18SrDNA 扩增子测序技术分析土壤中真菌结构及多样性特征。进而从土壤真菌群落变化和养分动态变化等角度筛选探索最佳的牧草种植期,并为西北地区紫花苜蓿土壤养分管理和大面积栽培及高质量生产提供科学指导<sup>[15]</sup>。

## 1 研究区概况

研究区位于宁夏银川市贺兰山的人工苜蓿农场(38°30'N,106°06'E),海拔高度为 1 135 m,位于我国西北内陆,是中温带干旱区<sup>[15]</sup>。昼夜温差较大,该地区年平均气温 8.4℃,年最低气温为-20℃,极端最高气温为 38℃,年平均降水量为 189.9~216.1 mm,年蒸发量为 2 250.0 mm 左右。年平均日照时间为 3 075.5 h,无霜期为 160 d。人工苜蓿农场从 2012 年开始,每一年都有新种植的同种苜蓿。

## 2 材料与方法

### 2.1 样品采集

本研究以种植年限为 1~6 a(2012—2017 年)的紫花苜蓿地为研究对象,苜蓿地的灌溉条件、灌溉制度、气候降水及土壤类型一致,均为地形平坦的灌区土壤环境,试验设置的 6 个不同年限处理中,每个处理设置 3 个面积为 30 m×30 m 的重复,在每个重复样地使用土壤钻按照 5 点混合法取 0—20 cm 深度的土壤<sup>[15]</sup>,每个土样采集 1 份,在试验样地将一小部分装入经高压灭菌后的冻存管,贴上标签,立即放入-4℃的保温箱。剩余样品装入自封袋,并对其进行相应的标记。随后将土样带回实验室,冻存管转移至-80℃冰箱保存,用于真菌群落的测定。自封袋中的样品在实验室自然风干,并将土壤中植物碎屑和细根等杂质剔除,按要求过筛后用于测定土壤的各项理化指标。

### 2.2 土壤理化性质的测定

土壤的 pH 值、电导率是通过水土比 2.5:1 的悬液,用 PHS-3C 酸度计和便携式电导率仪测定。土壤全氮采用 elementer 元素分析仪进行测定。采用碱解扩散法对碱解氮进行测定。用重铬酸钾氧化—外加热法测定土壤中的有机碳。全磷采用 NaOH 熔融—钼锑抗比色法。速效磷是用 NaHCO<sub>3</sub> 浸提—钼锑抗比色方法测定的<sup>[16]</sup>。最后采用 SPSS 19.0 对土壤理化数据进行方差分析和多重比较。

### 2.3 土壤基因组 DNA 提取及 HiSeq 测序

土壤在碾碎过 80 目筛后,第一步是先使用 SDS 对样本中的 DNA 进行提取,然后使用琼脂糖凝胶电泳测定样本中 DNA 的程度和浓度,取出一定量的样品,然后将其置于离心管内,使用无菌水稀释样品至

1 ng/ $\mu$ l<sup>[17]</sup>。以稀释后的基因组 DNA 为测序模板,根据测序区域的选择,使用 Barcode 的特异引物 528F 和 706R,New England Biolabs 公司的 Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和高效高保真酶进行 PCR 处理,确保扩增效率和准确性,之后通过 HiSeq 2500 PE 250 进行上机测序<sup>[18]</sup>。

2.4 生物信息学分析

下机数据通过预处理,将一些质量较低的 reads 移除,然后将成对 reads 拼接成一条序列,为得到高质量的 reads,对 tags 两端的 barcode 序列及引物序列进行去除,去除掉嵌合体以及短序列之后获得 clean tags。通过对经拼接过滤后的 clean tags 与物种注释数据库比对来检测嵌合体序列,同时去除其中的嵌合体序列<sup>[19]</sup>,得到最终的 Effective Tags,对所有样本的全部 Effective Tags 进行聚类,默认以 97% 的一致性 (Identity) 将序列聚类成为 OTU (Operational Taxonomic Units),同时依据其算法原则筛选出 OTU 中出现频数最高的序列作为 OTUs 的代表序列,对 OTU 代表序列进行物种注释,使用 Qiime 软件 (Version 1.9.1) 之中的 blast 方法<sup>[20]</sup> 与 Unit 数据库对物种进行注释分析,而且对于每个分类水平: kingdom (界), phylum (门), class (纲), order (目), family (科), genus (属), species (种) 进行分类统计,统计其群落组成以及各个样本的丰度信息。

2.5 多样性分析

Alpha 多样性分析是对单个样品中物种多样性分析,基于 OTU 的结果,同时利用 Qiime 软件 (Version 1.9.1) 计算出菌群丰度指数 (Chao1, ACE) 和菌群多样性指数的大小 (Shannon, Simpson)<sup>[21]</sup>; Beta 多样性是比较和分析不同样本的微生物群落构成。

同样是基于 OTU 的结果计算 Unifrac 距离,之后使用 OTU 的丰度信息对 Unifrac 距离进一步构建 Weighted Unifrac 距离<sup>[22]</sup>。最后,通过多变量统计学方法 PCA 主成分分析、PCoA 主坐标分析和 Beta 多样性指数组间的差异分析,从而发现不同样本 (组) 之间的差异。

2.6 环境因子关联分析

研究环境因子与物种之间,环境因子与物种丰富度 (alpha 多样性) 之间的相关性,目前常用的有 Spearman 相关性分析和 Mantel test 分析。Spearman 相关性分析以 Spearman 相关系数作为量度, Spearman 相关系数又被叫做秩相关系数。其基本原理也就是两变量所具有的秩次大小不同进行线性分析,对于数据的原始变量分布没有进行要求,这是一种非参数类型的分析办法,其适用范围比较广泛; Mantel test 是对两个矩阵相关关系的检验,总的来说,它是两个不同总体之间的相关关系,多用于生态学上, Mantel test 用于计算环境因子和微生物群落数据的相关性,是对两个矩阵相关关系的检验。

3 结果与分析

3.1 不同种植年限紫花苜蓿土壤基本理化指标分析

研究区 pH 值在 8.5~8.7,属于碱性土壤,第 1 年和第 6 年存在显著差异,但相差数值仅为 0.11,所以长期种植苜蓿对土壤酸碱度影响很小。对苜蓿地土壤样本进一步进行主要养分分析得到:电导率、有效磷和全磷含量均无显著变化,有机碳、全氮和碱解氮含量均呈先降后回升的趋势,且在第 5 年达到最大,说明随着种植年限的增加,苜蓿地土壤养分变化可能表现为循环往复的波浪式变化趋势 (表 1)。

表 1 不同种植年限紫花苜蓿土壤理化指标

种植年限/a	pH 值	电导率 (EC)/ ( $\mu$ S $\cdot$ cm <sup>-1</sup> )	有机碳 (SOC)/ (g $\cdot$ kg <sup>-1</sup> )	全氮 (TN)/ (g $\cdot$ kg <sup>-1</sup> )	碱解氮 (AN)/ (mg $\cdot$ kg <sup>-1</sup> )	全磷 (TP)/ (g $\cdot$ kg <sup>-1</sup> )	速效磷 (AP)/ (mg $\cdot$ kg <sup>-1</sup> )
1	8.67 $\pm$ 0.04a	166.41 $\pm$ 2.40a	18.33 $\pm$ 0.03a	0.13 $\pm$ 0.02b	34.36 $\pm$ 3.21a	0.33 $\pm$ 0.13a	11.30 $\pm$ 1.34a
2	8.56 $\pm$ 0.04b	177.22 $\pm$ 9.31a	18.73 $\pm$ 0.74a	0.15 $\pm$ 0.03b	21.46 $\pm$ 4.49b	0.26 $\pm$ 0.03a	11.58 $\pm$ 2.11a
3	8.58 $\pm$ 0.01ab	162.80 $\pm$ 3.50a	17.43 $\pm$ 1.16b	0.08 $\pm$ 0.03c	25.01 $\pm$ 5.02b	0.24 $\pm$ 0.04a	14.15 $\pm$ 4.81a
4	8.58 $\pm$ 0.04ab	170.00 $\pm$ 4.60a	16.65 $\pm$ 0.37b	0.08 $\pm$ 0.03c	26.08 $\pm$ 4.93b	0.24 $\pm$ 0.03a	10.91 $\pm$ 1.13a
5	8.63 $\pm$ 0.02a	163.58 $\pm$ 2.37a	18.00 $\pm$ 0.64a	0.22 $\pm$ 0.02a	34.41 $\pm$ 1.34a	0.28 $\pm$ 0.01a	7.89 $\pm$ 6.76a
6	8.56 $\pm$ 0.02b	173.22 $\pm$ 4.88a	18.34 $\pm$ 0.29a	0.11 $\pm$ 0.02bc	28.64 $\pm$ 5.06ab	0.26 $\pm$ 0.02a	11.18 $\pm$ 0.95a

注:平均数 $\pm$ 标准差 (n=3), 同列数据后小写字母不同表示差异达显著 (p<0.05)。

3.2 紫花苜蓿土壤真菌 OTU 水平分析

为了准确地认知各样本 OTU 聚类情况和注释情况,对 OTU 聚类及注释结果进行了综合统计和分析,其中 Total Tags 是每个样本的总 Tags 数目,用于 OTU 聚类等后续分析的有效数据; Taxon Tags 是用于构建 OTUs 并且获得注释信息的 Tags 数目;

Unclassified Tags 指的是没有获得注释信息的 Tags 数目; Unique Tags 是频数为 1,并且无法被聚类到 OTUs 的 Tags 数目,所以不对其进行后续分析,详细的统计数据如表 2 所示。在样本之中随机性的进行抽取测序量的数据,对他们的物种数目进行统计 (也就是 OTUs 数目),将测序数据量和其对应的物



种数来构建曲线,即稀释曲线,稀释曲线能够直观地反映出测序数据量是否科学合理,同时能够间接地反映出物种的丰富度,如图 1 所示,曲线倾向于平坦,表明测序数据的科学合理,而更多的数据量只会产生少量新的物种。

表 2 不同种植年限苜蓿地 OTU 聚类和解释情况统计

种植年限/a	Total tags	Taxon Tags	Unclassified Tags	Unique Tags	OTUs
1	48212	47400	443	369	432
2	55276	54337	662	277	375
3	55067	54019	733	316	421
4	61717	60335	1069	313	469
5	59370	57442	1509	419	548
6	53548	51729	1521	297	456

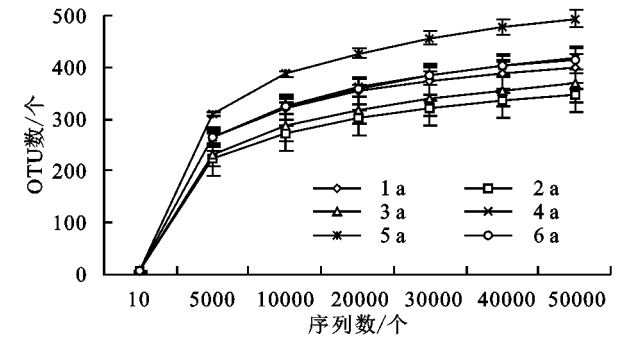


图 1 土壤真菌稀释曲线分析

3.3 不同种植年限苜蓿地土壤真菌群落组成

图 2 和图 3 分别展示了 6 组样品,在纲水平和属水平下丰度前 10 的真菌群落组成情况。在纲水平上,鉴定的丰度前 10 的菌占了总数中的 73%,其中包括粪壳菌纲(*Sordariomycetes*) (44%)、座囊菌纲(*Dothideomycetes*) (12%)、散囊菌纲(*Eurotiomycetes*) (6%)、盘菌纲(*Pezizomycetes*) (3%)、丝足虫纲(*Incertae*) (4%)为优势菌,所占比例高达 69%,不同菌随种植年限的变化呈现不同的变化规律(图 2)。在属水平上,共鉴定出 328 个属,丰度前 10 的菌占总数的 27%,其中毛壳属(*Chaetomium*) (8%)、镰孢属(*Fusarium*) (7%)、赤霉菌属 *Gibberella* (4%)、*Lectera* (1%)、小画线壳属(*Monographella*) (1%),除毛壳属随着种植年限的不同有较大变化外,其余菌属变化都较为稳定(图 3)。

3.4 不同种植年限苜蓿地土壤真菌生物多样性

3.4.1 单个样品 Alpha 多样性分析 对指示群落结构改变的 4 个 Alpha 多样性指数 Shannon, Simpson, Chao1 以及 ACE 指数展开组间差异性分析。表 3 结果表明, Simpson 指数随种植年限的不同并没有发生显著性变化, Shannon, Chao1 和 ACE 指数均在种植时间为 5 a 时达到最大, 2 a 时达到最小, 且差异达显

著水平, 由此可知在种植时间为 5 a 时, 土壤真菌菌群丰度和多样性均达到最高, 变化规律从大到小依次为 5 a>6 a>1 a>4 a>3 a>2 a。

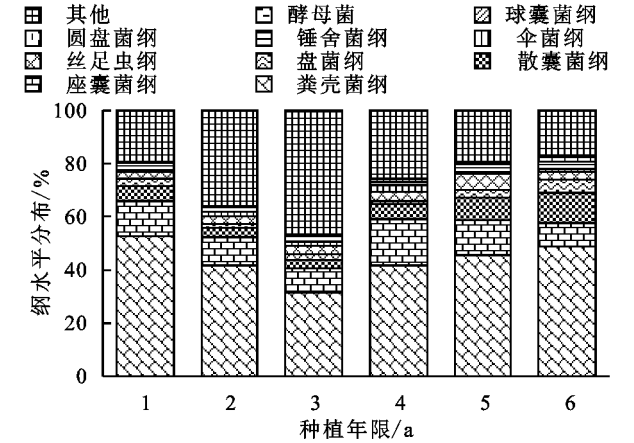


图 2 不同种植年限苜蓿地土壤真菌群落相对

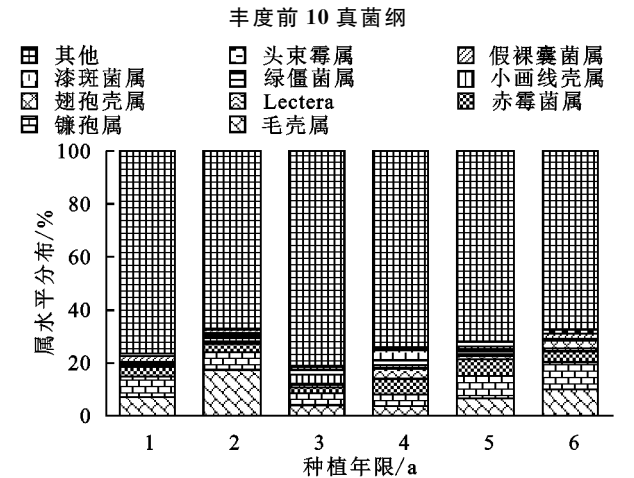


图 3 不同种植年限苜蓿地土壤真菌群落相对

表 3 不同种植年限苜蓿地土壤真菌 Alpha 多样性指数

种植年限/a	香农指数	辛普森指数	Chao1 指数	ACE 指数
1	5.52±0.61ab	0.92±0.07a	425.32±44.88b	430.16±41.06b
2	4.4±0.86b	0.83±0.09a	374.34±19.24b	377.17±19.89b
3	4.52±1.55ab	0.84±0.13a	421.88±111.36b	421.75±116.19b
4	5.38±0.93ab	0.91±0.08a	460.7±49.36ab	472.2±50.53ab
5	6.09±0.32a	0.96±0.01a	550.88±44.14a	560.62±43.59a
6	5.65±0.39ab	0.95±0.02a	446.72±51.79ab	461.34±60.98ab

注: 平均数±标准差(n=3), 同列数据后小写字母不同表示差异达显著( $p<0.05$ )。

3.4.2 复杂样品的真菌群落 Beta 多样性分析 Beta 多样性是指利用 Weighted Unifrac 距离对两个样品之间的相异系数进行衡量, 其数值越小, 表示两个样本在物种多样性方面差异性越小。Beta 多样性分析表明, 种植时间为 1 a 和 2 a, 3 a 和 4 a, 2 a 和 4 a 之间的相异系数从大到小分别为 0.554, 0.489, 0.482, 这 3 组样本物种多样性差异达到最大; 而 2 a 和 3 a,

已有研究表明,土壤真菌多样性和群落组成受多种因素影响,土壤环境是其中一个重要因素<sup>[30-31]</sup>,因此对属水平下真菌群落组成与土壤环境因子进行 Spearman 相关性分析,有助于探索影响不同种植年限苜蓿地土壤真菌群落结构及多样性的主要影响因子。结果表明土壤 pH 值,AN 和 SOC 与一部分真菌间存在显著或极显著相关性,EC、TP 和 TN 与个别真菌存在显著相关性,AP 与所有真菌不具有相关性。Liu 等<sup>[32]</sup>研究发现,速效磷对土壤真菌群落结构具有较大影响,且施磷肥会提高土壤真菌多样性<sup>[33]</sup>,而本研究中,速效磷变化范围为 7.89~14.15,随着种植年限的增加未发生显著性变化,因此未能体现影响程度。Beare 等<sup>[34]</sup>提出免耕少耕能增加真菌菌群的多样性,增加不稳定碳的固定积累,进而影响土壤有机碳含量,这与本研究 Spearman 相关性分析结果一致。本研究中 pH 值随着种植年限的变化第 1 年与第 6 年存在

土壤真菌数量大,种类多,是检测土壤质量变化的重要指标,在评价土壤生态系统等功能方面具有重要作用<sup>[23]</sup>。本研究通过对不同种植年限苜蓿地土壤在纲水平和属水平下真菌群落组成中丰度占比前 10 的菌类分析发现,粪壳菌纲、座囊菌纲、散囊菌纲、盘菌纲、丝足虫纲为优势菌纲,毛壳属、镰孢属、赤霉菌

显著性变化,且 pH 值与真菌属水平下存在显著或极显著相关性,这与韩世忠等<sup>[35]</sup>研究发现土壤 pH 值会对真菌群落结构组成造成影响的结果一致。

## 5 结论

毛壳属、镰孢属、赤霉菌属、*Lectera*、小画线壳属这是在不同的种植年限苜蓿地土壤中的优势菌群,随着种植年限的增加并无显著性变化;多样性指数分析结果显示,土壤中的养分以及真菌群落组成和丰度都在种植 5 a 的时间达到峰值;Simpson 指数随种植年限的增加无显著性变化;种植时间为 1~6 a 的苜蓿地土壤真菌的多样性组成相似度较低,土壤 pH 值、速效氮和有机碳是影响真菌群落组成及多样性的主要环境因子。

### 参考文献:

- [1] 岳彦红,齐晓,王彦荣,等.35 个 10 龄紫花苜蓿品种的持久性比较[J].草业学报,2014,23(1):58-64.
- [2] 胡发成.种植苜蓿改良培肥地力的研究初报[J].草业科学,2005,22(8):47-49.
- [3] 杨恒山,曹敏建,范富,等.紫花苜蓿生长年限对土壤理化性状的影响[J].中国草地学报,2006,28(6):29-32.
- [4] 任继周.主要牧草栽培及种子生产[M].成都:四川科学技术出版社,1986.
- [5] 马其东,高振生,洪绂曾,等.黄河三角洲地区苜蓿生态适应性研究[J].草地学报,1999,7(1):28-38.
- [6] 张春霞,郝明德,王旭刚,等.黄土高原地区紫花苜蓿生长过程中土壤养分的变化规律[J].西北植物学报,2004,24(6):1107-1111.
- [7] 徐丽君,王波,辛晓平.紫花苜蓿人工草地土壤养分及土壤微生物特性[J].草地学报,2011,19(3):406-411.
- [8] 齐文娟,龙瑞军,冯瑞章,等.江河源区不同建植年限人工草地土壤微生物及酶活性研究[J].水土保持学报,2007,21(4):145-149.
- [9] Schnitzer S A, Klironomos J N, Hillerislambers J, et al. Soil microbes drive the classic plant diversity - productivity pattern[J]. Plant Signaling & Behavior, 2014,6(8):296-303.
- [10] Schneider T, Keiblinger K M, Schmid E, et al. Who is who in litter decomposition? Metaproteomics reveals major microbial players and their biogeochemical functions[J]. The ISME Journal, 2012,6(9):1749-1762.
- [11] Anderson J P E, Domsch K H. Measurement of bacterial and fungal contributions to respiration of selected agricultural and forest soils[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1975,21(3):314-322.
- [12] Walley F L, Van Kessel C, Pennock D J. Landscape-scale variability of N mineralization in forest soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1996,28(3):383-391.
- [13] Cheung M K, Au C H, Chu K H, et al. Composition and genetic diversity of picoeukaryotes in subtropical coastal waters as revealed by 454 pyrosequencing[J]. The ISME Journal, 2010,4(8):1053-1059.
- [14] 于聘飞,王英,葛芹玉.高通量 DNA 测序技术及其应用进展[J].南京晓庄学院学报,2010,26(3):1-5.
- [15] 张文文,刘秉儒,牛宋芳.引黄灌区不同种植年限紫花苜蓿土壤养分与细菌群落特征研究[J].草业学报,2019,28(5):46-54.
- [16] 鲍士旦.土壤农化分析[M].北京:中国农业出版社,2000.
- [17] 饶程.喀斯特深水型湖泊湖岸缓冲带生物组成特征分析[D].贵阳:贵州大学,2018.
- [18] 林艳,何跃军,何敏红,等.喀斯特植被演替过程土壤丛枝菌根真菌 (AMF) 多样性[J].生态学报,2019,39(11):4127-4137.
- [19] Haas B J, Gevers D, Earl A M, et al. Chimeric 16SrRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons[J]. Genome Research, 2011,21(3):494-504.
- [20] Altschul S F, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool[J]. Journal of Molecular Biology, 1990,215(3):403-410.
- [21] 杨瑞平.西瓜连作障碍缓解技术及其机理研究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2016.
- [22] Lozupone C A, Hamady M, Kelley S T, et al. Quantitative and qualitative  $\beta$  diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007,73(5):1576-1585.
- [23] 任玉连,范方喜,彭淑娟,等.纳帕海沼泽化草甸不同季节土壤真菌群落结构与理化性质的关系[J].中国农学通报,2018,34(29):69-75.
- [24] 邢来君,李明春.普通真菌学[M].北京:高等教育出版社,2001.
- [25] 张玥,胡云飞,王树茂,等.茶园年限对根际土壤真菌群落结构及多样性的影响[J].应用与环境生物学报,2018,24(5):972-977.
- [26] 徐雪雪,王东,秦舒浩,等.沟垄覆膜连作马铃薯根际土壤真菌多样性分析[J].水土保持学报,2015,29(6):301-306,310.
- [27] Wal A, Veen J, Smant W, et al. Fungal biomass development in a chronosequence of land abandonment[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006,38(1):51-60.
- [28] 毕明丽,宇万太,姜子绍,等.利用 PLFA 方法研究不同土地利用方式对潮棕壤微生物群落结构的影响[J].中国农业科学,2010,43(9):1834-1842.