



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116369192 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 04

(21) 申请号 202310164144.X

(22) 申请日 2023.02.24

(71) 申请人 中国科学院华南植物园

地址 510000 广东省广州市天河区兴科路
723号

申请人 广东省林业科学研究院

(72) 发明人 李旭 瞿超 杨世福 程严

唐旭利 罗焯毓 刘菊秀

(74) 专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限
公司 44001

专利代理师 刘明星 朱聪聪

(51) Int. Cl.

A01H 1/02 (2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图9页

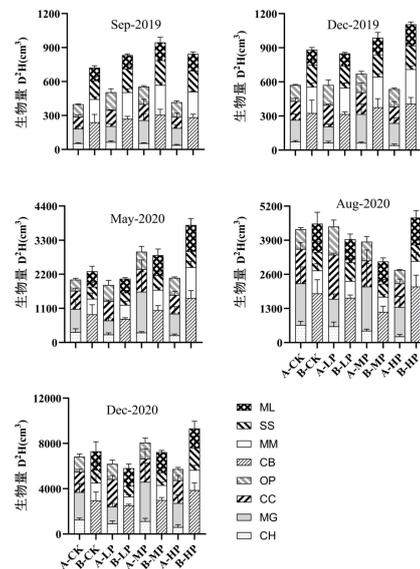
(54) 发明名称

一种相思纯林混交化快速构建的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种相思纯林混交化快速构建的方法。相思纯林林地的选择：选择在华南赤红壤地区的已经明显退化的相思纯林；选择竹节树、醉香含笑、木荷 (*Schima superba*) 和壳菜果进行混交；对相思纯林进行间伐；在种植混交树种前挖种植穴、挖环状沟施肥；在春季的阴雨天气或下透雨之后栽植混交的树种；施肥管理；对套种幼树的抚育管理。本发明可以增汇植物种类、种植密度，构建适宜本底乡土的混交林，缓解10年左右相思纯林退化带来的一系列问题，可总体提高相思纯林植被生物多样性及固碳潜力，提升土壤肥力和微生物活性。通过采样和实验室分析，我们发现间伐套种处理对马占相思人工林土壤理化性质产生了一定的影响。

CN 116369192 A



1. 一种相思纯林混交快速构建的方法,其特征在于,包括如下步骤:
 - 步骤1、相思纯林林地的选择:选择在华南赤红壤地区的已经明显退化的相思纯林;
 - 步骤2、确定混交方式:选择竹节树(*Carallia brachiata*)、醉香含笑(*Michelia macclurei*)、木荷(*Schima superba*)和壳菜果(*Mytilaria laosensis*)进行混交;
 - 步骤3、林地准备:对相思纯林进行间伐;
 - 步骤4、林地准备:在种植混交树种前挖种植穴、挖环状沟施肥;
 - 步骤5、套种:在春季的阴雨天气或下透雨之后栽植混交的树种;
 - 步骤6、施肥管理;
 - 步骤7、对套种幼树的抚育管理。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的竹节树、醉香含笑、木荷和壳菜果按照数量比1:1:1:1混交,在种植穴中随机栽植。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述的已经明显退化的相思纯林是林龄约10年左右的相思纯林。
4. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述的间伐,其间伐率为66%,即3排砍伐2排。
5. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述的林地准备是间隔为2m×2m挖种植穴,在种植混交树种前挖种植穴、对种植的土地施加基肥;离马占相思树冠垂直投影外缘,宽30cm的环状沟施肥,深达根系分布层。
6. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述的在春季的阴雨天气或下透雨之后栽植混交的树种,其种苗是1年生实生苗。
7. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述的施肥管理是当混交幼苗移栽的生长初期,需要追加肥料,此时采用的肥料为磷肥;用喷雾器均匀喷洒磷肥在混交树中出的生长过程中持续追加施肥,每两个月施加1次,磷肥添加水平是:150kg P ha⁻¹yr⁻¹NaH₂PO₄。
8. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述的对套种幼树的抚育管理,每半年进行一次人工除草。
9. 权利要求1或2所述的方法在促进树种生长,增加生物量,显著地改变了土壤理化性质、土壤酶活性和土壤微生物群落组成中的应用。
10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,所述的改变土壤微生物群落组成是增加酸杆菌门、变形菌门和WPS-2的相对丰度,降低放线菌门、疣微菌门、浮游菌门和广古菌门的相对丰度。

一种相思纯林混交化快速构建的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及相思类人工纯林的提质增效技术领域,更具体涉及一种相思纯林混交化快速构建的方法,尤其适用于华南赤红壤地区。

背景技术

[0002] 马占相思(*Acacia mangium*)是豆科速生常绿阔叶乔木树种,20世纪80年代被引入我国,由于其具有生长速度快、适应性强和耐干旱贫瘠等特点,成为我国南方地区荒山造林的优良先锋树种。据广东省森林资源连续清查报告(2013~2018年)显示,全省相思类纯林面积为12.3万公顷,是广东分布面积最大的豆科植物林地(<http://lyj.gd.gov.cn/>)。然而,由于马占相思人工林林分结构单一、管理方式粗放,成熟的马占相思人工林出现了生产力、植物多样性、群落叶面积指数和蒸腾、土壤肥力显著降低等明显的衰退现象,这些问题的出现严重制约了相思类人工林的发展。

[0003] 间伐是常用的人工林管理措施,被认为是提升森林质量的最有效方式之一。间伐通过除去一定比例的树木来降低林分密度,可以改善林内的水热条件和光照条件,提升土壤养分的有效性,从而促进树木的生长,增加植物多样性。利用间伐后引入乡土植物进行补种的方式,可以将结构单一的人工纯林改建为结构复杂的混交林。间伐套种被认为是目前将人工纯林转变为混交林的最优策略之一,逐渐成为人工林管理中最常用的经营策略。

[0004] 林分改造是针对现存生产力过低、生态功能较差或由单一树种组成的一些低效林,在自然条件下采取一定的人工促进恢复的方法,结合乡土树种进行结构优化或再造林,建立起具有良好生态功能、抗逆性及适应性较强、且具有一定经济效益的混交林。近年来华南地区大力开展人工林改造活动,许多乡土树种被用于人工林改造。在人工林中种植乡土树种通常可增加树种密度,有利于生态系统物种组成和多样性的恢复,加速生态系统的演替。改造后形成的混交林能够更加充分的利用空间,得到更充足的光照和养分,从而改善林内小气候,蓄积量和生物量都会高于纯林,而且其树种与伴生树种协同生长,主干也会更加通直。林分改造会随着林分改造方式、范围及位置的不同而表现出不同的特点,然而,我们对热带亚热带地区成熟人工林生态系统改造过程的认识较为薄弱。

[0005] 磷是生命活动必需的营养元素,参与植物新陈代谢并调控生长过程,因此,磷的持续有效供应对植物生长有重要意义。然而,人类活动导致的全球变化可能极大地改变磷循环,进一步影响生态系统的生产力和功能。目前,国内外开展了一系列磷添加对树木生长的实验,但由于磷添加水平、树种功能型、林龄和菌根类型等因素不同所得到的结果也不一致。有研究发现磷添加可通过促进固氮植物的结瘤和共生固氮作用来促进植物的生长。植物地上生物量随着磷添加量的增加而增加,且促进植物的生长发育和增加各器官的磷含量,但磷添加达到一定量时,树木生长就不再发生变化。此外,磷添加可以改变土壤养分浓度,进而影响植物叶片氮和磷含量,改变叶片氮磷比,从而影响植物生长与土壤动物的各类生命活动。磷添加对树木生长和养分的影响也会随实验处理时间而发生变化。然而,磷添加对树木生长的研究存在较大的地域差异,而且处理条件和时间也不尽相同,限制了我们对

磷添加对树木生长影响的深层认识。

[0006] 马占相思是华南地区常见的人工林树种,因生长迅速、巨大的冠层、和增加土壤氮和土壤有机质以及耐贫瘠等特点被广泛种植。然而人工林结构较为单一,且多为单一树种组成的同龄纯林,生态系统稳定性较差,物种多样性较低,抗灾害能力弱。为此,国内外学者针对人工林现状进行了一系列研究,例如,方怡然等(2018)通过引入加勒比松进行林分改造可明显提高森林的土壤肥力。明安刚(2017)对南亚热带针叶人工林的近自然化改造显著改善了林分结构,提升了林分生物量和生产力。以往国内外关于对成熟人工林改造的研究主要集中在抚育间伐和带状混交以及针对树木病虫害的改造,少有结合养分添加的改造措施。

发明内容

[0007] 鉴于此,本发明的目的在于提供一种相思纯林混交化快速构建的方法。本发明实现了植物结构的多层配置和资源的多层利用,构建更为合理而稳定的混交林结构。同时,极大提升了土壤肥力以及土壤微生物活性,提高华南赤红壤地区的土地利用率,为解决相思纯林退化的问题提供了一种可靠的方案。

[0008] 本发明基于2019年在广东省龙眼洞林场马占相思成熟林中修建的“马占相思成熟林功能提升关键技术与应用”实验平台,选择间伐套种和磷添加处理,通过测定马占相思及间伐后套种乡土植物的生长指标和叶片养分含量、土壤理化性质、土壤酶活性、微生物群落等指标,评价磷添加和不同林分改造模式对马占相思人工林改造效果,筛选相思林适宜的磷添加水平以及混交树种选择方向和优化配置模式,以期为未来马占相思人工林的科学管理提供理论依据。

[0009] 根据不同的土壤条件选择乡土树种快速构建相思纯林混交林的方案。本发明所要解决的技术问题是提供一种华南地区相思纯林混交快速构建方法,马占相思生长迅速,能固氮荷改良土壤,但易早衰,生长10年左右后生产力下降,大面积低效的马占相思成熟林已严重阻碍了该地区林业的可持续发展,因而迫切需要大面积改善其林分结构,构建可持续发展的马占相思人工林生态体系。此外,由于南亚热带是氮富集而磷匮乏的地区,磷通常被认为是热带亚热带森林生态中的限制性元素,磷缺乏会导致土壤肥力下降和植物生长受到抑制,从而对森林生态系统服务功能的稳定性造成影响。本发明通过设置混交2组乡土树种(每组4种),和3种磷添加梯度,筛选出最适宜华南赤红壤地区的混交树种竹节树(*Carallia brachiata*)+醉香含笑(*Michelia macclurei*)+木荷(*Schima superba*)+壳菜果(*Mytilaria laosensis*)模式并施加磷肥(高磷处理, $150\text{kg P ha}^{-1}\text{yr}^{-1}\text{NaH}_2\text{PO}_4$)。通过测量改造前后的马占相思生长状况、混交植物的生长状况以及土壤养分和微生物活性,我们发现本种改造方式实现了植物结构的多层配置和资源的多层利用,构建更为合理而稳定的混交林结构。同时,极大提升了土壤肥力以及土壤微生物活性,提高华南赤红壤地区的土地利用率,为解决相思纯林退化的问题提供了一种可靠的方案。

[0010] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0011] 本发明的一种相思纯林混交化快速构建的方法,包括如下操作步骤:

[0012] 步骤1、相思纯林林地的选择:选择在华南赤红壤地区的已经明显退化的相思纯林;

- [0013] 步骤2、确定混交方式:选择竹节树 (*Carallia brachiata*)、醉香含笑 (*Michelia macclurei*)、木荷 (*Schima superba*) 和壳菜果 (*Mytilaria laosensis*) 进行混交;
- [0014] 步骤3、林地准备:对相思纯林进行间伐;
- [0015] 步骤4、林地准备:在种植混交树种前挖种植穴、挖环状沟施肥;
- [0016] 步骤5、套种:在春季的阴雨天气或下透雨之后栽植混交的树种;
- [0017] 步骤6、施肥管理;
- [0018] 步骤7、对套种幼树的抚育管理。
- [0019] 优选,所述的竹节树、醉香含笑、木荷和壳菜果按照数量比1:1:1:1混交,在种植穴中随机栽植。
- [0020] 优选,所述的已经明显退化的相思纯林是林龄约10年左右的相思纯林。
- [0021] 优选,所述的间伐,其间伐率为66%,即3排砍伐2排。
- [0022] 优选,所述的林地准备是间隔为2m×2m挖种植穴,在种植混交树种前挖种植穴、对种植的土地施加基肥;离马占相思树冠垂直投影外缘,宽30cm的环状沟施肥,深达根系分布层。
- [0023] 优选,所述的在春季的阴雨天气或下透雨之后栽植混交的树种,其种苗是1年生实生苗。
- [0024] 优选,所述的施肥管理是当混交幼苗移栽的生长初期,需要追加肥料,此时采用的肥料为磷肥(磷酸二氢钠);用喷雾器均匀喷洒磷肥在混交树中出的生长过程中持续追加施肥,每两个月施加1次,磷肥添加水平是:150kg P ha⁻¹yr⁻¹NaH₂PO₄。
- [0025] 优选,所述的对套种幼树的抚育管理,每半年进行一次人工除草。
- [0026] 本发明还提供了上述方法在促进树种生长,增加生物量,显著地改变了土壤理化性质、土壤酶活性和土壤微生物群落组成中的应用。
- [0027] 优选,所述的改变土壤微生物群落组成是增加酸杆菌门、变形菌门和WPS-2的相对丰度,降低放线菌门、疣微菌门、浮游菌门和广古菌门的相对丰度。
- [0028] 本发明通过乡土树种套种竹节树 (*Carallia brachiata*)、醉香含笑 (*Michelia macclurei*)、木荷 (*Schima superba*) 和壳菜果 (*Mytilaria laosensis*),具有立体性、复杂性、广泛性的特征,突破了相思纯林原有植物生长易退化的局限性,形成高效、立体的复合种植结构模式,提高土地资源的生产效率。本发明方法可操作性强,效果显著,具有广阔的应用前景,对于加快相思纯林林分改造、土壤质地改良和微生物活性具有重要意义。
- [0029] 本发明在所述步骤(3)中,所述相思纯林林地的选择:选取华南赤红壤地区广东省龙眼洞林场帽峰山相思纯林作为种植间伐和套种改造的区域,利用卷尺、细绳和木棍,按2m×2m的标准放线定好种植点,做到株行距基本一致。
- [0030] 本发明与现有技术相比,具有以下如下优点和效果:
- [0031] 本发明采用间作栽培方法,经过扎实有效的实地试验和土壤理化性质的测定,获得了最佳的间作栽培方法,通过在相思纯林套种竹节树 (*Carallia brachiata*)、醉香含笑 (*Michelia macclurei*)、木荷 (*Schima superba*) 和壳菜果 (*Mytilaria laosensis*),增汇植物种类、种植密度,构建适宜本底乡土的混交林,缓解10年左右相思纯林退化带来的一系列问题,可总体提高相思纯林植被生物多样性及固碳潜力,提升土壤肥力和微生物活性。通过采样和实验室(中国科学院华南植物园)分析,我们发现间伐套种处理对马占相思人工林土

壤理化性质产生了一定的影响。

附图说明

[0032] 图1是相思林间伐套种处理实验设计示意图；

[0033] 图2是相思林间伐套种处理实验设计及实施过程,注:(a)样地建立;(b)样地示意图(俯视图);(c)样地示意图(剖面图)。CT:对照;LP:低磷;MP:中磷;HP:高磷。A组:红锥(*Castanopsis hystrix*)+灰木莲(*Magnoliaceae glauca*)+樟(*Cinnamomum camphora*)+海南红豆(*Ormosia pinnata*);B组:竹节树(*Carallia brachiata*)+醉香含笑(*Michelia macclurei*)+木荷(*Schima superba*)+壳菜果(*Mytilaria laosensis*);

[0034] 图3是不同P添加强度对改造树种生长量的影响;

[0035] 图4是不同改造方式下树种的生长量;

[0036] 图5是不同P添加强度对改造树种碳氮磷含量的影响;

[0037] 图6是不同P添加强度对改造树种碳氮磷计量比的影响;

[0038] 图7是间伐套种处理对马占相思叶片养分含量及化学计量比的影响,(A)碳含量;(B)氮含量;(C)磷含量;(D)碳氮比;(E)氮磷比;(F)氮磷比;

[0039] 图8是间伐套种处理对土壤酶活性的影响,(A) β -葡萄糖苷酶;(B) β -1,4-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶;(C)酸性磷酸酶;

[0040] 图9是间伐套种处理对土壤细菌和真菌多样性的影响,(A)细菌Shannon指数;(B)真菌Shannon指数;(C)细菌Chao 1指数;(D)细菌Chao1指数;

[0041] 图10是基于Bray-Cutis距离的土壤细菌(A)和真菌(B)群落的PCoA排序分析;

[0042] 图11是间伐套种处理对土壤细菌主要门类的的影响;

[0043] 图12是间伐套种处理对土壤真菌主要门类的的影响;

[0044] 图13是土壤细菌群落与土壤理化性质的RDA分析。

具体实施方式:

[0045] 以下实施例是对本发明的进一步说明,而不是对本发明的限制。

[0046] 实施例1:

[0047] 步骤1、相思纯林林地的选择:选择在华南赤红壤地区(广东省广州市广东省龙眼洞林场)选择林龄约10年左右的相思纯林(已有明显退化);

[0048] 步骤2、确定混交方式:选择南亚热带乡土树种红锥(*Castanopsis hystrix*)、灰木莲(*Manglietia glauca*)、樟(*Cinnamomum camphora*)和海南红豆(*Ormosia pinnata*)为A组,竹节树(*Carallia brachiata*)、醉香含笑(*Michelia macclurei*)、木荷(*Schima superba*)和壳菜果(*Mytilaria laosensis*)为B组进行混交;

[0049] 步骤3、林地准备(间伐66%):通过多次实地踏查和每木调查,间伐华南地区广东省龙眼洞林场的马占相思纯林(约10年林龄,已出现林质退化现象),用皮尺、草绳和小木棍确定间隔,间伐强度为66%(每3排砍伐2排),间伐方式见图1。

[0050] 步骤4、林地准备(整地):用皮尺、草绳和小木棍确定间隔为2m \times 2m种植穴,在种植混交树种前挖种植穴、对种植的土地施加基肥(图1,图2);离马占相思树冠垂直投影外缘,宽约30cm的环状沟,深达根系分布层,当混交幼苗移栽的生长初期,需要追加肥料,此时采

用的肥料为磷肥(磷酸二氢钠);用喷雾器均匀喷洒磷肥在混交树中出的生长过程中持续追加施肥(每两个月施加1次);

[0051] 步骤5、套种:在春季的阴雨天气或下透雨之后栽植(2019年5月),使用长势基本一致的1年生实生苗进行人工植苗造林,分作红锥(*Castanopsis hystrix*)、灰木莲(*Manglietia glauca*)、樟(*Cinnamomum camphora*)和海南红豆(*Ormosia pinnata*)按照数量比1:1:1:1混交(在种植穴中随机栽植),为A组,竹节树(*Carallia brachiata*)、醉香含笑(*Michelia macclurei*)、木荷(*Schima superba*)和壳菜果(*Mytilaria laosensis*)按照数量比1:1:1:1混交(在种植穴中随机栽植),为B组,在4列的3个坡(上坡位、中坡位和下坡位)按照保留带-A组-B组进行栽植(图2);

[0052] 步骤6、施肥管理:磷肥添加水平参照李建(2014)在小良、朱晓敏(2016)在鹤山、毛庆功(2017)和郑棉海(2018)在鼎湖山等的P添加实验设置,选取4个P添加水平(对照(CT): $0\text{ kg P ha}^{-1}\text{ yr}^{-1}\text{ NaH}_2\text{PO}_4$ 、低P(LP): $50\text{ kg P ha}^{-1}\text{ yr}^{-1}\text{ NaH}_2\text{PO}_4$ 、中P(MP): $100\text{ kg P ha}^{-1}\text{ yr}^{-1}\text{ NaH}_2\text{PO}_4$ 、高P(HP): $150\text{ kg P ha}^{-1}\text{ yr}^{-1}\text{ NaH}_2\text{PO}_4$),设置处理类型8种,重复3个样方进行实验布置(图2)。2019年9月进行P添加处理,每2个月1次。

[0053] 步骤7、对套种幼树的抚育管理,每半年进行一次人工除草。

[0054] 在2019年的9月和12月以及2020年的5月、8月和12月,分别测定每个小样方中每棵树的基径(D, cm)和树高(H, cm)。其中,基径用游标卡尺测定,树高用卷尺测量。植物生物量用 $D^2H(\text{cm}^3)$ 表示。

[0055] 2019年3月在样地未建立前,使用内径4cm的不锈钢土钻,在每个土层(0-10cm、10-20cm和20-30cm)随机采集5份土壤样品混合为1个土样,装入保鲜袋后带回实验室,代表未改造前的本底水平(表2);2019年8月在施肥前,在每个小样方内使用土钻在每个土层(0-10cm、10-20cm和20-30cm)随机采集5份土壤样品混合为1个土样,装入保鲜袋后带回实验室,代表P添加处理前的本底水平(表2)。在2020年5月、8月和12月进行正式采样,土壤样品采集前去除土壤表面凋落物,用土钻在每个样方随机选取5个点,采集0-10cm层土壤样品,然后混合为一个样品,装入保鲜袋后带回实验室。在每次采集土壤的同时,利用土壤温湿度计原位测定0-10cm层土壤的温湿度。2020年的8月和12月,从每个样方的每棵树种随机采集5-10片成熟叶片,同时每个样带收集凋落物样品,每个样品3个重复。

[0056] 土壤样品剔除沙石、细根和动植物残体后过2mm筛,保存于4℃冰箱,并尽快在2周内完成土壤含水量、铵态氮($\text{NH}_4\text{-N}$)、硝态氮($\text{NO}_3\text{-N}$)、微生物和酶活等相关的湿土指标;另外取部分样品进行冷冻干燥,用于测定磷脂脂肪酸;取部分样品进行风干,用于化学性质分析;取部分湿土样品储存于-80℃条件下以备。植物叶片带回实验室(中国科学院华南植物园科研区一号实验楼)冲洗,置于65℃烘箱烘干至恒重。植物烘干样品用粉碎机粉碎,过60目筛,放入密封袋中保存,用于测定养分含量。

[0057] 表2为马占相思人工林样地未进行林分改造之前的土壤本底理化性质。随着土壤深度的增加,各处理下的土壤 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、土壤pH、土壤有机质、土壤全N和土壤有效P显著降低($P<0.05$),而土壤全P从表层到深层呈降低趋势,但不显著。

[0058] 土壤含水量用烘干称重法测定;土壤pH用风干以水土比1:2.5测定;土壤和植物有机碳采用重铬酸钾氧化-外加加热法测定;土壤和植物全N和全P采用浓 H_2SO_4 消煮后用酶标法测定;土壤 $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的浓度通过1M KCl浸提后用比色法测定;有效P采用氟化铵-盐酸浸

提后用酶标法测定。

[0059] 土壤微生物生物量碳、氮 (MBC、MBN) 测定采用氯仿熏蒸浸提法 (Vance等, 1987; Brookes等, 1985)。称取过2mm筛的新鲜土样15g两份, 精确至0.01g, 放入100mL玻璃瓶中, 一份置于真空干燥器中用水洗氯仿避光熏蒸24h, 另一份同样避光24h, 但不进行熏蒸处理。熏蒸结束后, 两份样品均加入50mL 0.5M K_2SO_4 浸提液, 在振荡机上振荡1h, 过滤样品获取上清液, 并保存于-20℃。上清液用总有机碳分析仪 (TOC-VCSH, Shimadzu, Japan) 测定。

[0060] 土壤微生物生物量磷 (MBP) 测定采用氯仿熏蒸浸提法 (Vance等, 1987; Brookes等, 1985)。称取过2mm筛的新鲜土样6g三份, 精确至0.01g, 置于玻璃瓶中, 将其中一份置于真空干燥器中用水洗氯仿避光熏蒸24h, 另一份同样避光24h, 但不进行熏蒸处理。熏蒸结束后, 两份样品同时加入30mL Bray-one溶液 (0.025M HCl与0.03M NH_4F) 浸提, 另外一份不进行熏蒸, 同样避光24h, 与前两份一样加入30mL Bray-one溶液 (0.025M HCl与0.03M NH_4F) 后, 再加入0.6mL KH_2PO_4 , 在振荡机上振荡30min, 然后过滤获上清液, 上清液用等离子体发射光谱仪 (Optima 2000DV) 测定。

[0061] 土壤酶活性采用改进比色法 (Tabatabai, 1994) 测定。称取2.0g新鲜土样加入30mL 醋酸钠缓冲液 (pH=5), 振荡15min后, 吸取0.75mL混合液至96深孔板, 然后对应加入0.75mL 5mM对硝基苯磷酸二钠 (pNP-phosphate) 底物。两组对照分别为0.75mL混合液+0.75mL醋酸钠缓冲液和0.75mL醋酸钠缓冲液+0.75mL底物, 每种处理每个样品3个重复。在20℃培养箱中避光培养 [磷酸酶 (ACP) 和β葡萄糖苷酶 (BG) 为1h, 乙酰氨基葡萄糖苷酶 (NAG)、多酚氧化酶 (PPO) 和过氧化氢酶 (POD) 为4h, 纤维二糖酶 (CBH) 为24h], 使用湘仪L550-酶标转子, 4000rpm离心3min。水解酶 (ACP、BG、NAG和CBH): 96微孔板所有孔加20uL 1N NaOH (终止反应并显色), 吸取200uL上清液对应于96微孔板, 用酶标仪 Thermo Scientific Multiskan 在405nm测定吸光度, 同时, 用对硝基苯酚 (p-NP) 标准溶液配制工作曲线, 酶活性以每单位干土释放的p-NP来表示; 氧化酶 (PPO和POD): 吸取200uL上清液对应于96微孔板, 用酶标仪在450nm处测定吸光度。酶活性以每小时每克干物质产生底物的摩尔数 ($\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}$) 计算。

[0062] 土壤微生物群落组成用磷脂脂肪酸 (Phospholipid fatty acids, PLFAs) 法测定 (Bossio和Scow, 1998)。土壤样品冷冻干燥后称取8g, 加入磷酸缓冲液、氯仿 ($CHCl_3$) 和甲醇 (MeOH) (体积比为5:6:12) 的混合液震荡浸提。用气相色谱 (Agilent GC7890A) 和结合MIDI微生物鉴定系统来确定微生物的类群。单个微生物类群的脂肪酸种类用n mol g^{-1} 来表示, 每种脂肪酸的浓度基于碳内标19:0的浓度来计算。根据 (Jiang等, 2013; Schindlbacher等, 2011) 对微生物群落进行分类: 14:0、15:0、i15:0、a15:0、i16:0、16:1 ω 7c、a17:0、i17:0、cy17:0、18:0、18:1 ω 7和cy19:0用来代表细菌; i15:0、a15:0、i16:0、a17:0和i17:0用来代表革兰氏阳性菌, 16:1 ω 7c、cy17:0、18:1 ω 7和cy19:0用来代表革兰氏阴性菌; 18:1 ω 9c、18:2 ω 6, 9c和18:3 ω 3c用来代表真菌; 16:1 ω 5c用来代表丛枝菌根真菌 (AMF); 18:2w6c用来代表外生菌根真菌 (EMF)。其他种类如16:0, 17:1 ω 9c, 18:0, 18:1 ω 9c等仍然用来计算微生物的总量和群落组成。真菌细菌比用真菌磷脂脂肪酸的量和各细菌磷脂脂肪酸的总量比来计算 (Streit等, 2014)。

[0063] 土壤微生物测序的土壤样品于2021年7月采集。土壤样品采集前, 先将土壤表面的凋落物移除, 然后使用内径5cm的土钻在每个样方内随机选取9个点, 采集0~20cm土层的土壤样品, 将从9个点收集到的土壤均匀混合为一个土壤样品。土壤样品采集后放入4℃便携

式保温箱保存,运回实验室后立即放入-20℃冰箱中保存。所有土壤剔除沙石、细根以及动植物残体后,过2mm筛。将过完筛的土壤样品分为3份,用于提取DNA,在提取之前一直保存于-20℃冰箱。本研究使用Fast DNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals,Santa Ana,CA)试剂盒,根据说明书提取土壤总DNA。然后使用1%琼脂糖凝胶电泳来检测DNA的完整性,用NanoDrop2000来检测DNA的纯度和浓度。将合格的样品放置于-80℃冰箱保存。

[0064] (1) PCR扩增与产物纯化:采用通用引物338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')和806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')扩增细菌16S rRNA的V3和V4区域。采用通用引物ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和ITS2R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGA TGC-3')或ITS5F (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')和ITS2R (5'-GCTGCGTTCTTCA TCGATGC-3')扩增真菌的ITS1区域。间伐套种处理实验的土壤样品扩增真菌所采用的引物为ITS5F和ITS2R。磷添加实验的土壤样品扩增真菌所采用的引物为ITS1F和ITS2R。扩增程序如下:95℃预变性3min,27个循环(95℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸30s),然后72℃稳定延伸10min,最后在4℃进行保存(PCR仪:ABI GeneAmp® 9700型)。PCR反应体系为:5×TransStart FastPfu缓冲液4μL,2.5mM dNTPs 2μL,上游引物(5uM)0.8μL,下游引物(5uM)0.8μL,TransStart FastPfu DNA聚合酶0.4μL,模板DNA 10ng,补足至20μL。每个样本3个重复。将同一样本的PCR产物混合后使用2%琼脂糖凝胶回收PCR产物,利用AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences,Union City,CA,USA)试剂盒进行回收产物纯化,用2%琼脂糖凝胶电泳检测,并使用Quantus™ Fluorometer (Promega,USA)对回收产物进行检测定量。

[0065] (2) Illumina测序:纯化的DNA使用Illumina公司的Miseq PE300或NovaSeq PE250平台进行上机测序。间伐套种处理实验的样品在NovaSeq PE250平台上机测序(广州美格基因科技有限公司),磷添加实验样品在Miseq PE300平台上机测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。

[0066] (3) 高通量数据处理:使用QIIME2对原始测序数据进行处理(Bolyen等,2019)。用fastp(v 0.20.0)对原始测序数据进行质控(Chen等,2018),用FLASH(v 1.2.7)进行拼接(Magoc和Salzberg,2011)。根据97%的相似度,使用UPARSE(v 7.1)软件对序列进行可操作分类单元(operational taxonomic units,OTU)聚类并剔除嵌合体(Edgar,2013)。利用RDP classifier(v 2.2)对每条序列进行物种分类注释,比对Silva(v 138)数据库或UNITE(v 8.0)数据库,设置比对阈值为70%(Nilsson等,2019;Wang等,2007)。为了减少各样品微生物量之间的差异,所有样品按最小样本序列进行抽平,得到的标准化序列数据用于后续分析。

[0067] 结果表明:经过16个月的磷添加和林分改造后,B模式树种竹节树(*Carallia brachiata*)、醉香含笑(*Michelia macclurei*)、木荷(*Schima superba*)和壳菜果(*Mytilaria laosensis*)生物量整体高于A模式($P<0.05$):红锥(*Castanopsis hystrix*)、灰木莲(*Manglietia glauca*)、樟(*Cinnamomum camphora*)和海南红豆(*Ormosia pinnata*) (图3,图4)。8个树种的生长量排序为竹节树(*Carallia brachiata*)>灰木莲(*Manglietia glauca*)>樟(*Cinnamomum camphora*)>壳菜果(*Mytilaria laosensis*)>醉香含笑(*Michelia macclurei*)>海南红豆(*Ormosia pinnata*)>木荷(*Schima superba*)>红锥(*Castanopsis hystrix*),其中灰木莲(*Manglietia glauca*)更适合在中磷添加条件下生长,竹节树(*Carallia brachiata*)和醉香含笑(*Michelia macclurei*)在高磷添加下生长更佳(图3,图

4)。与对照相比,B模式下湿季竹节树(*Carallia brachiata*)、醉香含笑(*Michelia macclurei*)、木荷(*Schima superba*)和壳菜果(*Mytilaria laosensis*)4个树种叶片氮含量随着磷添加水平增加呈现增加趋势,且干湿季树种叶片磷含量分别比A模式高47.98%和38.08%(图5,表1)。与对照相比,B模式干季低磷添加下竹节树(*Carallia brachiata*)叶片磷含量增加了80.06%,高磷添加增加了竹节树(*Carallia brachiata*)叶片磷含量76.57%,醉香含笑(*Michelia macclurei*)叶片磷含量在低磷添加下增加了68.56%($P < 0.05$)。干季高磷添加下B模式4个树种叶片碳氮比相比于对照呈现降低趋势,且树种叶片碳氮比比A模式高38.64%;干季B模式3种磷添加处理4个树种叶片碳氮比相比于对照均呈现降低趋势,湿季中B模式树种叶片的碳磷比比A模式低35.84%;干季4个树种叶片氮磷比均随着磷添加水平的增加呈降低趋势,B模式树种叶片氮磷比比A模式低39.75%($P < 0.05$)。综上,B模式下4个树种在高磷添加下整体长势较好(图6,表1)。

[0068] 经过16个月的磷添加和林分改造后,与未间伐套种的对照样地相比,间伐套种处理下,土壤有机碳和铵态氮的含量分别显著降低了25.84%、60.68% ($p < 0.05$);土壤硝态氮的含量显著增加了34.70% ($p < 0.05$);土壤含水量、全氮、速效氮和有效磷的含量略有下降,分别降低了3.05%、9.56%、4.16%和12.5%,但是均未达到统计学上的显著水平(图7,表3)。与未间伐套种的对照样地相比,间伐套种显著降低了酸性磷酸酶的活性,由 $285.57 \pm 20.36 \mu\text{mol dry soil h}^{-1}$ 下降到 $219.91 \pm 5.73 \mu\text{mol dry soil h}^{-1}$,降低了22.30% ($p < 0.05$)。与碳获取相关的 β -葡萄糖苷酶的活性相比于对照降低了12.18%,与氮获取相关的 β -1,4-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的活性相比于对照增加了106.68%,但存在较大变异,因此碳、氮获取相关的酶活性变化均未达到统计学上的显著水平(图8)。与未间伐套种的对照样地相比,间伐套种处理下,土壤细菌群落的 α 多样性显著下降,Shannon指数和Chao 1指数分别显著降低了8.62%和28.59% ($p < 0.05$) (图9)。土壤真菌群落 α 多样性变化较小,Shannon指数降低了1.62%,而Chao 1指数增加了5.64%,且均未达到统计学上的显著水平。基于Bray-Cutis距离的PCoA分析(图10)。结果表明,间伐套种处理和对照之间的土壤细菌群落结构差异显著($p < 0.05$),且在第一轴上明显分开,而土壤真菌群落结构差异不显著。在马占相思人工林中,相对丰度大于1%的为细菌的主要门类,包括酸杆菌门(Acidobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verucomicrobia)、浮游菌门(Planctomycetes)、WPS-2、广古菌门(Euryarchaeota)以及拟杆菌门(Bacteroidetes)(图10,图11)。与未间伐套种的对照样地相比,间伐套种处理显著地增加了酸杆菌门、变形菌门和WPS-2的相对丰度,增加的幅度分别为73.07%、36.08和127.17% ($p < 0.05$);间伐套种处理显著降低了放线菌门、疣微菌门、浮游菌门和广古菌门的相对丰度,降低幅度分别为50.03%、43.89%、68.62%和97.01% ($p < 0.05$)。子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)是马占相思人工林中土壤真菌的优势门。和对照相比,间伐套种处理使子囊菌门的相对丰度降低了7.10%,担子菌门、球囊菌门和Mortierellomycota的相对丰度分别增加了10.52%、168.00%和30.65%,但均未达到统计学上的显著水平(图12,图13)。

[0069] 本发明结果表明,间伐套种处理2年后,处理显著地改变了土壤理化性质、土壤酶活性和土壤微生物群落组成,但对马占相思的胸径、叶片养分含量和化学计量特征未产生明显的影响。间伐套种处理降低了土壤有机碳和铵态氮的含量,增加了硝态氮的含量,但没

有显著改变土壤的含水量、pH值、全氮、全磷、速效氮和有效磷。这些结果说明,间伐套种处理短期内降低了土壤养分有效性,但随着立地密度降低,土壤养分条件仍然能够满足较低密度植物生长的需求。间伐套种处理下土壤细菌群落的多样性显著降低,提示我们对人工林应用间伐措施改造时可以用细菌多样性指示改造措施对微生物多样性的影响。此外,由于南亚热带森林土壤贫磷,如果不添加养分,则马占相思人工林需要较大的间伐强度才能缓解磷限制的影响。

[0070] 综上,马占相思林成熟林经过间伐和混交改造后P添加整体上促进了改造树种的生长,高P添加($150\text{kg P ha}^{-1}\text{yr}^{-1}\text{NaH}_2\text{PO}_4$)和B模式竹节树(*Carallia brachiata*)+醉香含笑(*Michelia macclurei*)+木荷(*Schima superba*)+壳菜果(*Mytilaria laosensis*)较适宜南亚热带成熟马占相思林的改造。

[0071] 2、本发明方法通过B模式:竹节树(*Carallia brachiata*)+醉香含笑(*Michelia macclurei*)+木荷(*Schima superba*)+壳菜果(*Mytilaria laosensis*)加高磷施肥处理,是最适宜华南赤红壤地区的成熟马占相思林的改造,提供了一种解决华南赤红壤地区相思林退化的方案。

[0072] 表1磷添加、林分改造和季节对改造树种叶片碳氮磷化学计量特征的影响

参数 Parameters	磷添加 T	林分改 造 F	季节 S	磷添加×林分 改造 T×F	磷添加× 季节 T×S	林分改造× 季节 F×S	磷添加×林分改造 ×季节 T×F×S
C	2.02	3.11	437.71**	0.40	1.60	2.49	0.54
N	9.00***	1.30	71.59***	5.17**	5.31**	5.71*	3.61*
P	5.23**	24.11***	5.08*	4.75**	6.41***	0.01	1.92
C:N	5.04**	3.77	7.23**	4.46**	5.41***	13.85***	2.92*
C:P	5.12**	3.16	52.25***	4.88**	6.81***	0.82	3.84*
N:P	3.27*	16.36***	71.44***	1.38	5.19**	2.91	0.88
df	3	1	1	3	3	1	3

[0074] 注:表中数字和df分别表示F值和自由度,星号表示达到显著水平(* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$)。C表示碳,N表示氮,P表示磷。

[0075] 表2林分改造前样地基本理化性质

		参数 Parameter						
土层 Soil layer (cm)	有机质 Organic matter/ (g kg ⁻¹)	全氮 Total N/ (g kg ⁻¹)	全磷 Total P/ (g kg ⁻¹)	有效磷 Available phosphorus (mg kg ⁻¹)	硝态氮 NO ₃ -N (mg kg ⁻¹)	铵态氮 NH ₄ -N (mg kg ⁻¹)	pH	
[0076] 0-10	36.12 (2.69)a	1.10 (0.07)a	0.13 (0.00)a	2.57 (0.27)a	5.04 (0.95)a	12.59 (0.79)a	4.27 (0.08)b	
10-20	17.03 (0.92)b	0.64 (0.05)b	0.12 (0.00)a	0.72 (0.12)b	3.09 (0.98)a	8.16 (0.31)b	4.51 (0.03)a	
20-30	10.82 (0.82)c	0.32 (0.06)c	0.11 (0.01)a	0.15 (0.01)c	2.30 (0.49)b	6.38 (0.28)b	4.54 (0.03)a	

[0077] 注:括号内的数值代表均值的标准误 (n=5)。不同小写字母表示土层间存在显著差异 (P<0.05)。

[0078] 表3间伐套种处理对土壤理化性质的影响

指标 Index	对照 CK	间伐套种处理 T	p 值 p values
pH	4.36 ± 0.01	4.35 ± 0.04	ns
SWC (%)	10.81 ± 0.66	10.48 ± 1.18	ns
SOC (g kg ⁻¹)	19.70 ± 1.32	14.61 ± 0.83	p < 0.05
[0079] TN (g kg ⁻¹)	1.98 ± 0.28	1.79 ± 0.10	ns
TP (g kg ⁻¹)	0.23 ± 0.01	0.20 ± 0.02	ns
NO ₃ ⁻ -N (mg kg ⁻¹)	5.59 ± 0.37	7.53 ± 0.63	p < 0.05
NH ₄ ⁺ -N (mg kg ⁻¹)	10.63 ± 0.94	4.18 ± 1.20	p < 0.05
Available N (mg kg ⁻¹)	115.53 ± 8.34	110.72 ± 4.81	ns
Available P (mg kg ⁻¹)	1.44 ± 0.24	1.26 ± 0.17	ns

[0080] 注:pH:土壤pH值;SWC:土壤含水量;SOC:土壤有机碳;TN:全氮;TP:全磷;NO₃⁻-N:硝态氮;NH₄⁺-N:铵态氮;Available N:速效氮;Available P:有效磷。对照和间伐套种处理之间的显著差异用p值来进行标记。ns表示处理之间显著无差异。

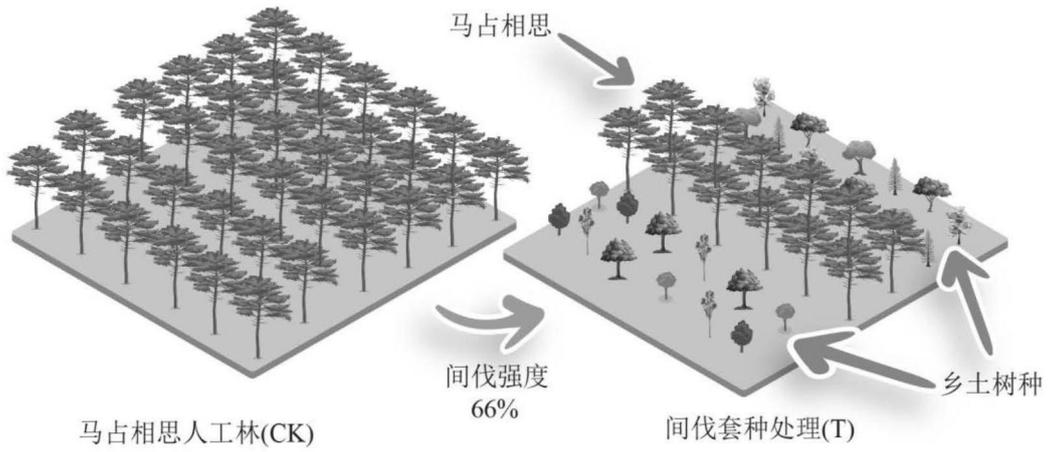


图1

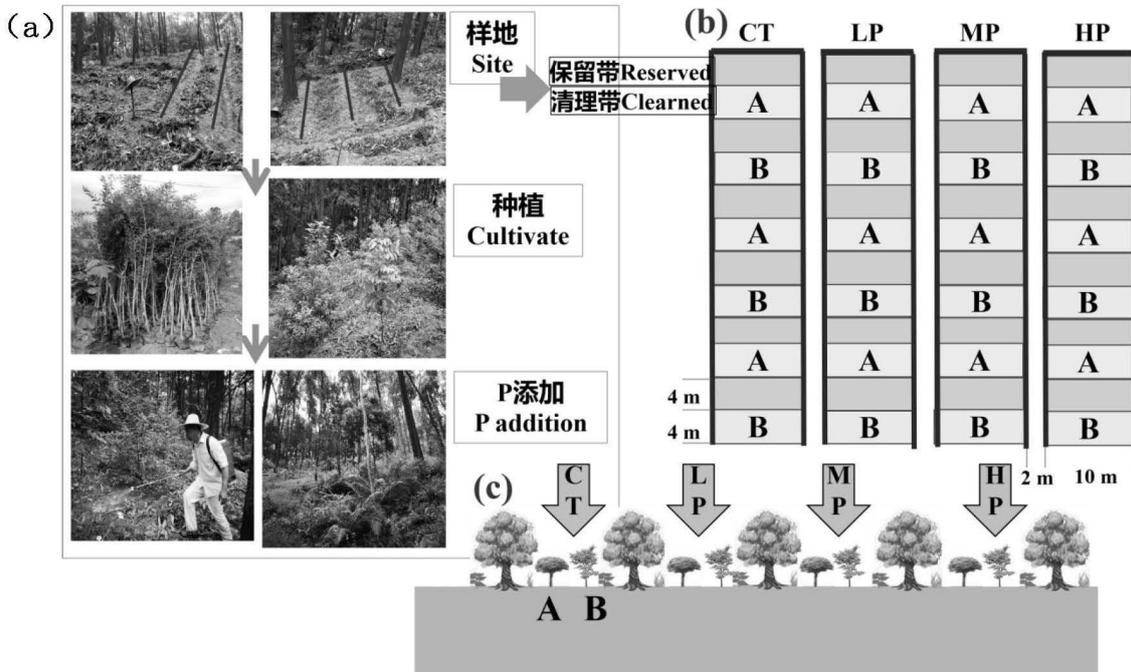


图2

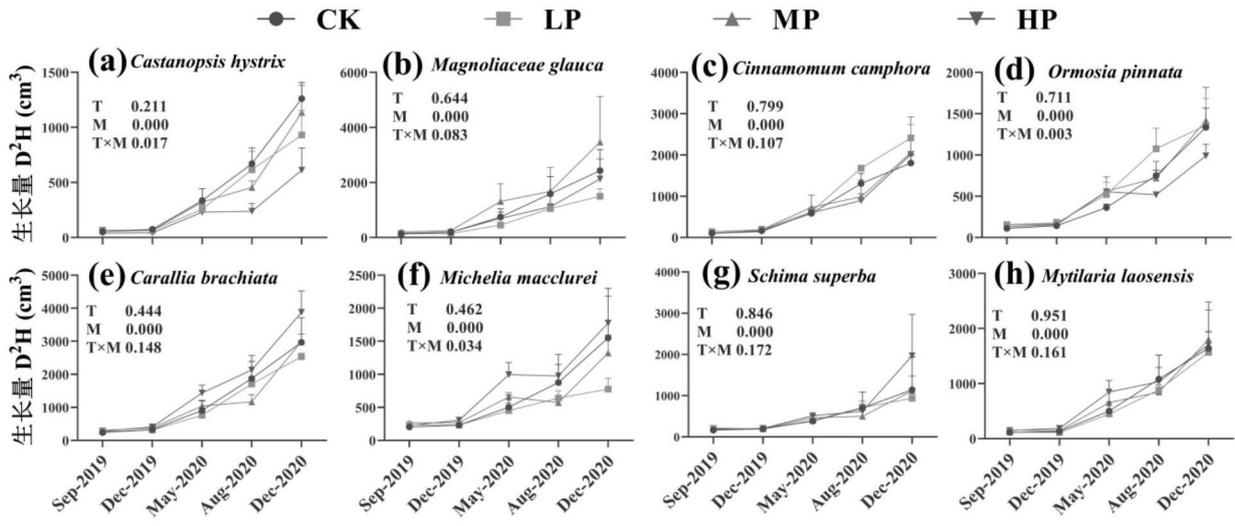


图3

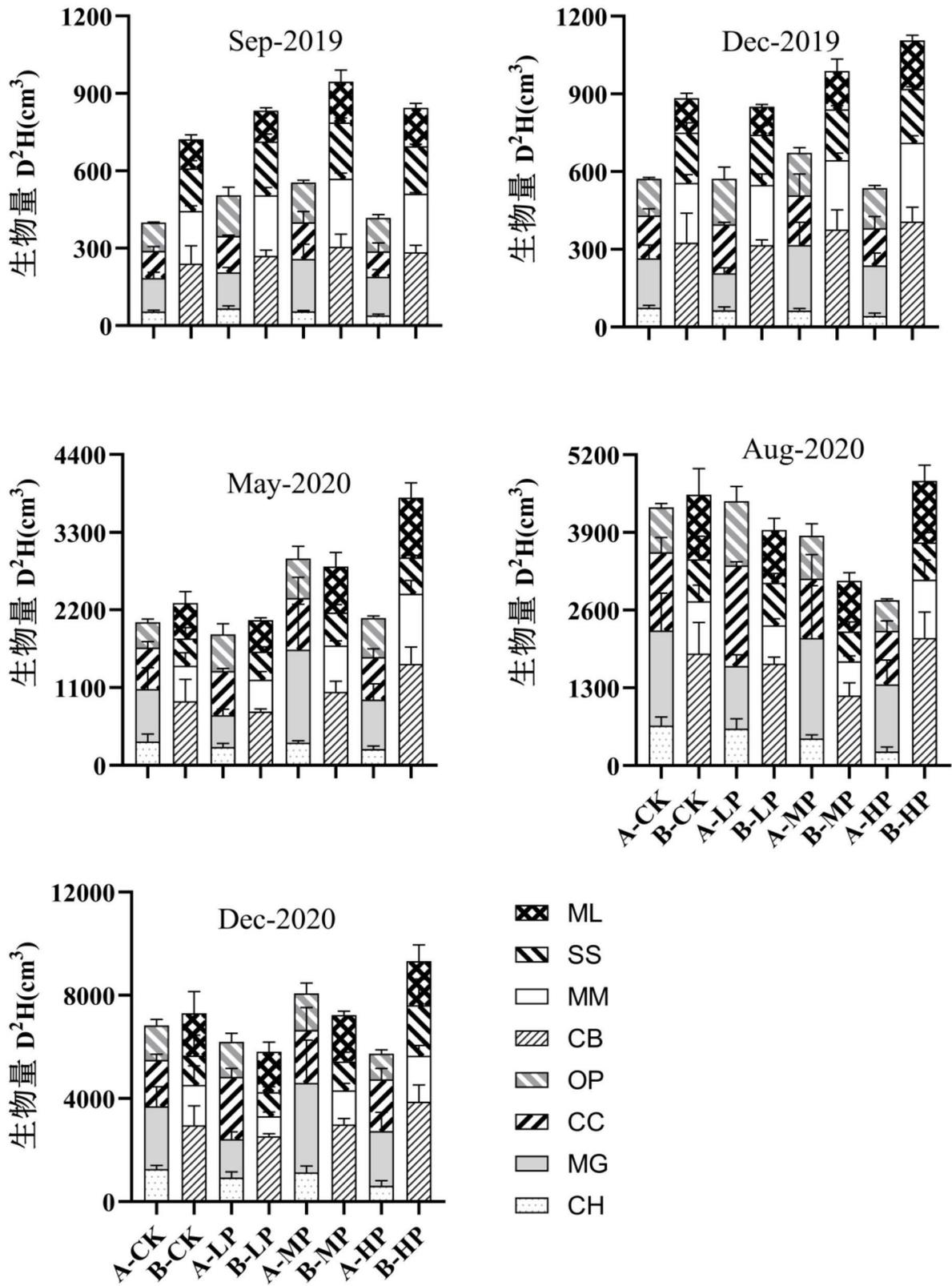


图4

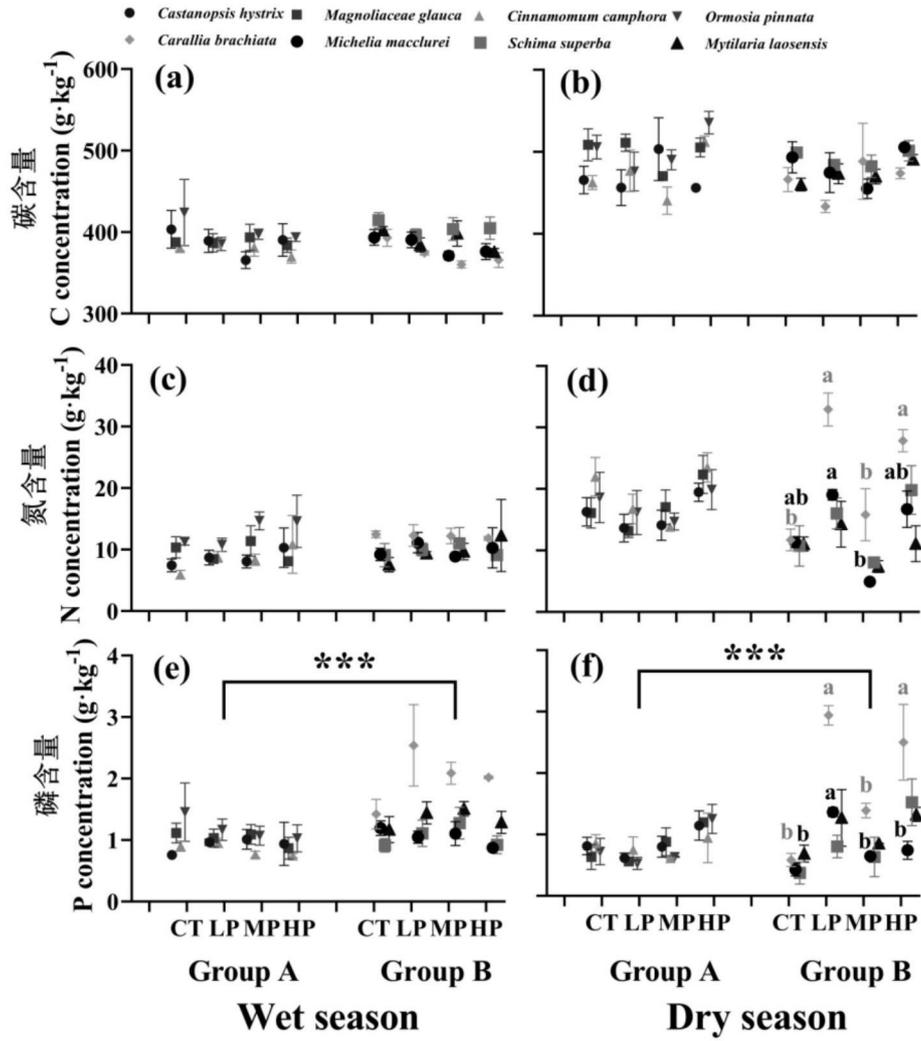


图5

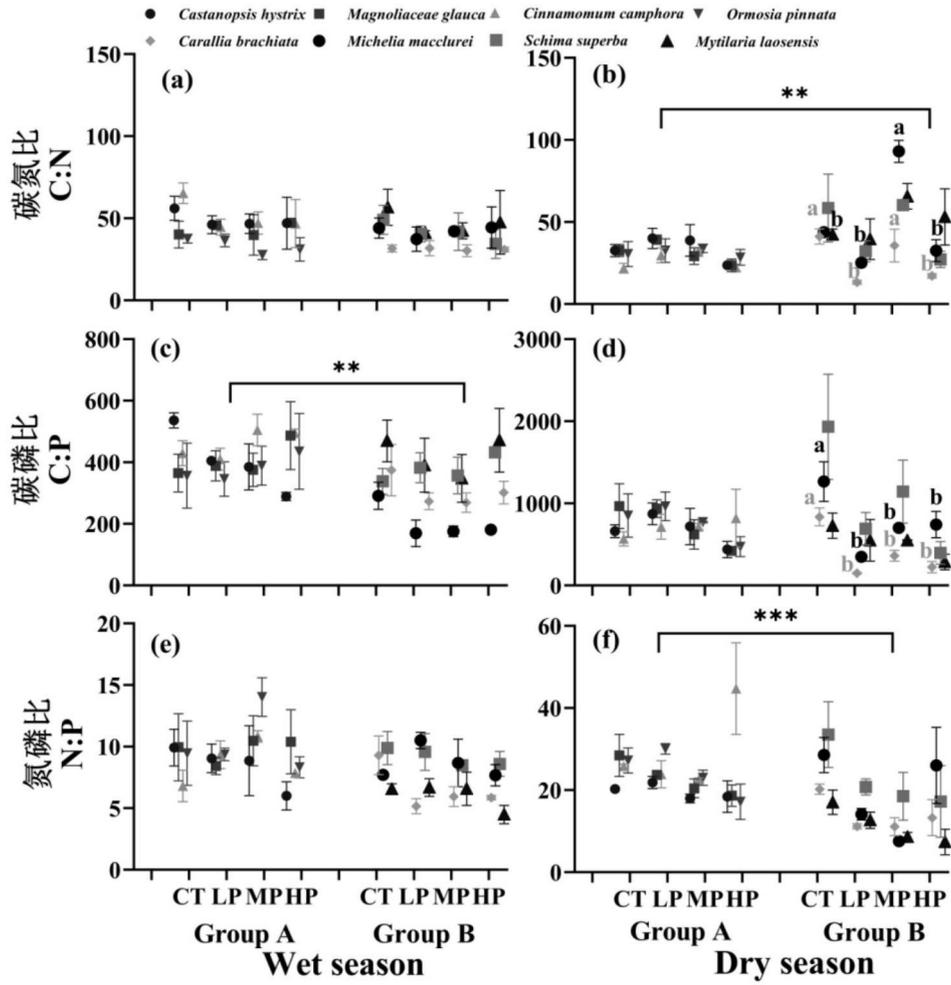


图6

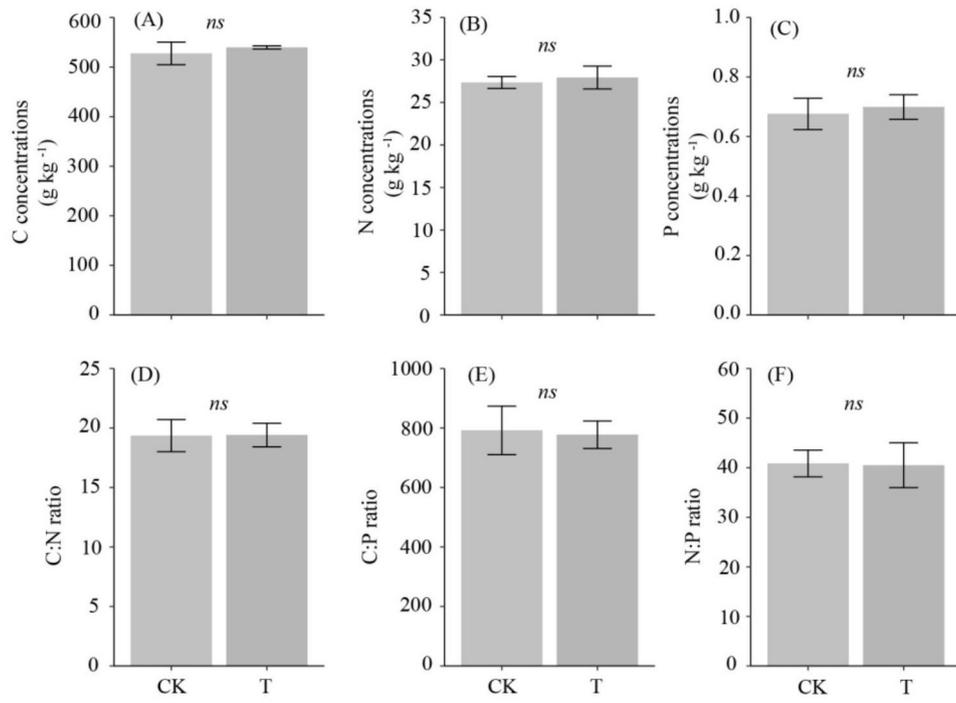


图7

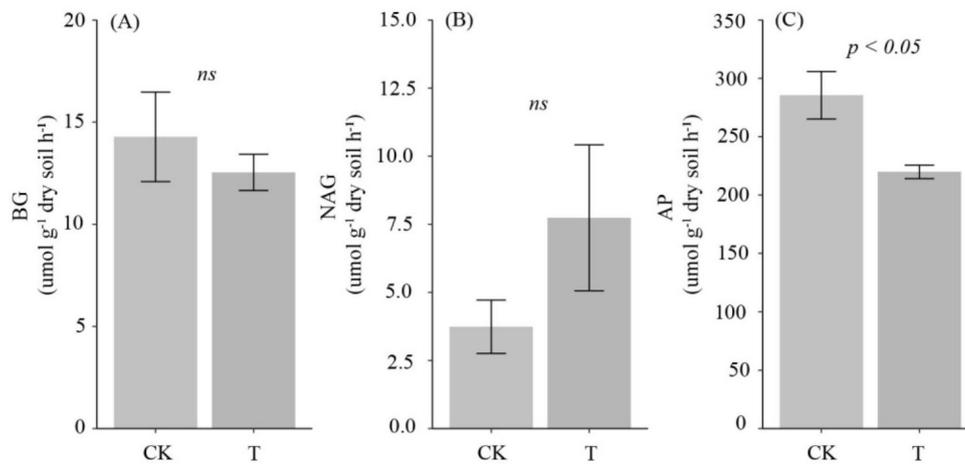


图8

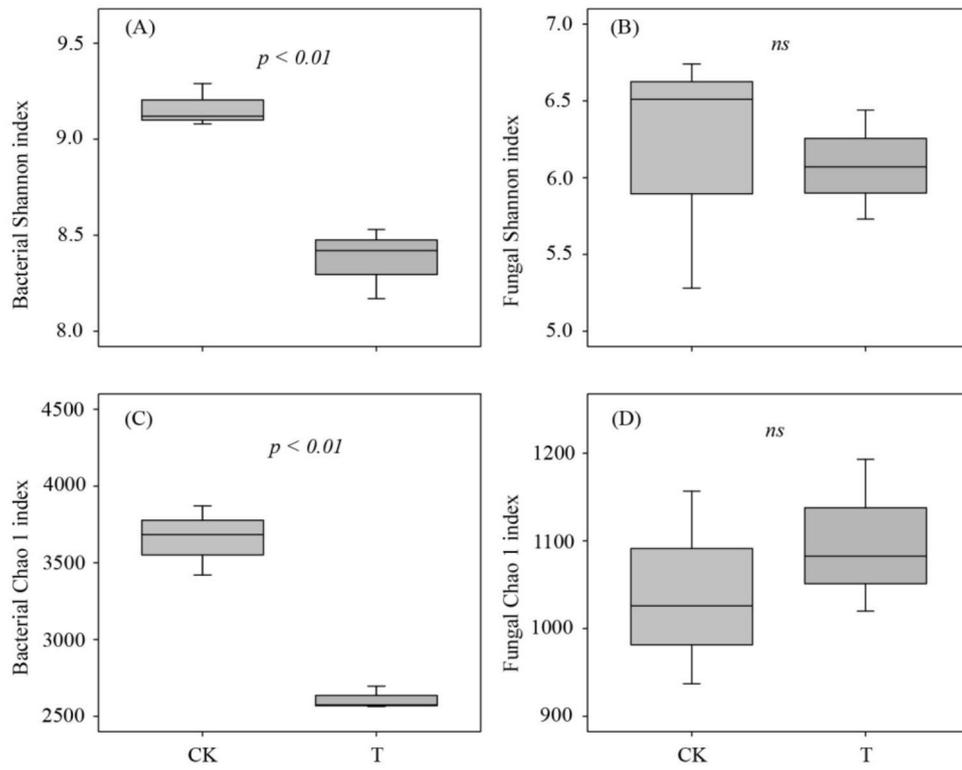


图9

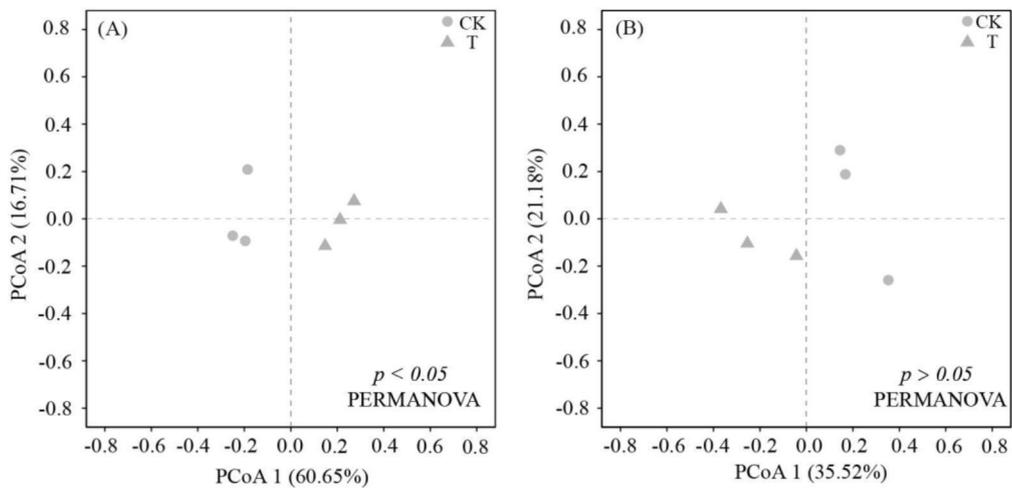


图10

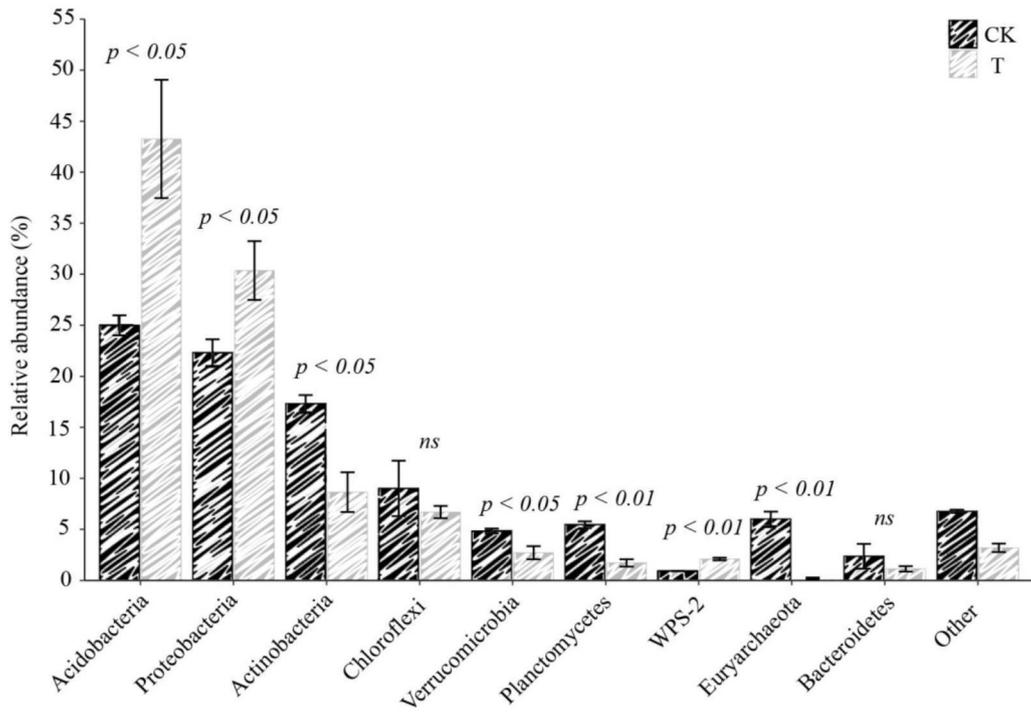


图11

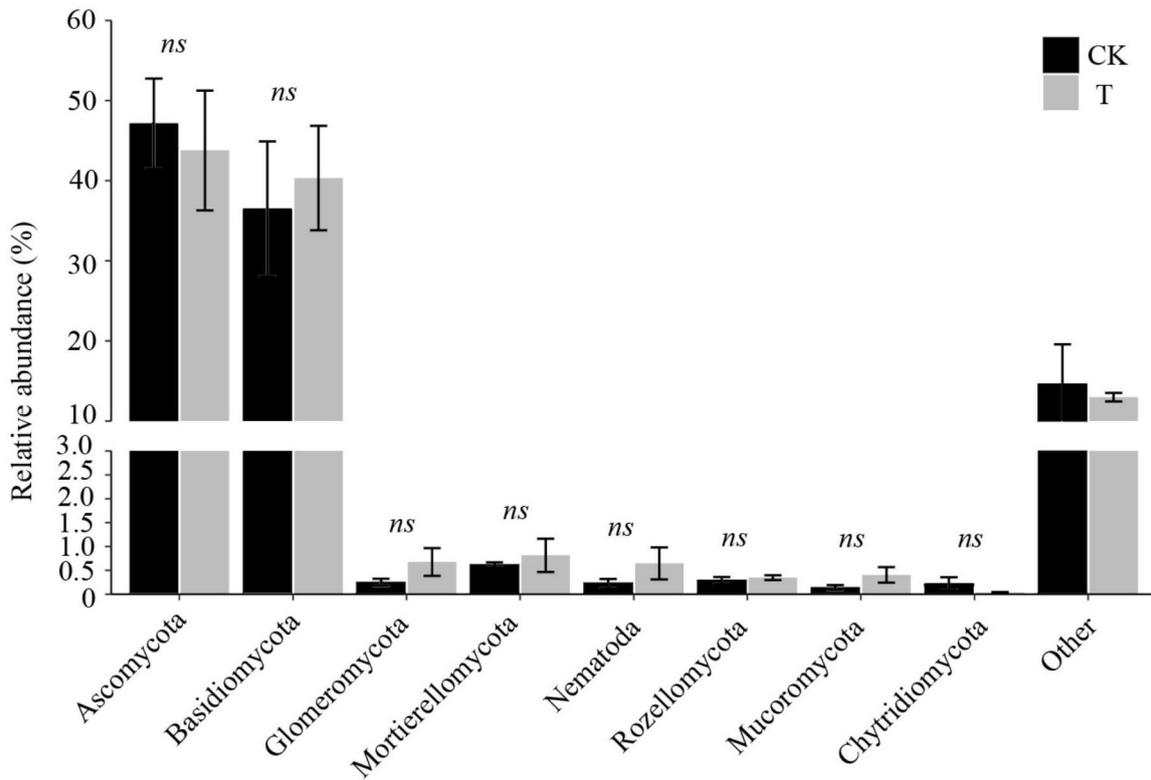


图12

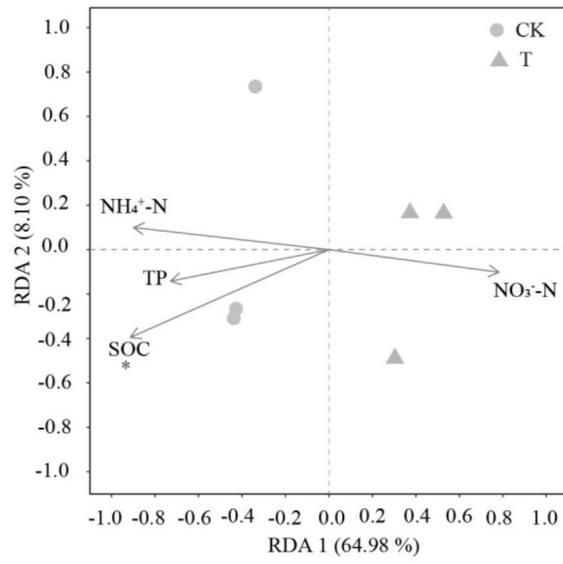


图13