

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2013.03.007

茶园根际土壤细菌群落结构及多样性

赵艳^{1,2}, 胡桂萍^{1,2}, 宋凤琴^{1,2}, 陈李林^{1,2}, 尤民生^{1,2*}

¹福建农林大学应用生态研究所, 福建 福州 350002;

²农业部闽台作物有害生物综合治理重点实验室, 福建 福州 350002

摘要:【背景】茶园根际土壤的细菌群落结构与茶园生境土壤营养循环密切相关,其组成及多样性可以作为健康茶园的一个生物指标。【方法】采用 PCR-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)分子指纹图谱技术,检测安溪铁观音种植区不同海拔茶园根际土壤样本的细菌群落结构,利用 Shannon-Wiener 多样性指数分析其多样性,采用非加权组平均法进行聚类分析得到其分布特征,利用蒙特卡罗检验和冗余分析分别揭示影响细菌群落分布的环境因子及细菌群落分布和环境变量之间的关系。【结果】茶园根际土壤细菌的 DGGE 结果显示,检测到的 14 种主要细菌中有 11 种细菌是不可培养的,3 种细菌是可培养的,分别属于根瘤菌属、中华根瘤菌属和苍白杆菌属。聚类分析得到,同一海拔梯度茶园根际土壤细菌群落结构相似。Shannon-Wiener 多样性指数分析表明,400 m 海拔处茶园根际土壤细菌群落多样性最高。蒙特卡罗检验分析得到环境因子协同作用对茶园根际土壤细菌群落结构贡献率为 59.6%。冗余分析显示,茶园根际土壤细菌群落结构与海拔密切相关。【结论与意义】茶园根际土壤细菌群落结构分布与海拔梯度密切相关,考虑不同海拔高度土壤细菌群落对茶园营养循环的影响,在铁观音的健康栽培和管理过程中具有重要意义。

关键词: 茶园; 根际土壤; 细菌; 群落结构; 多样性; 变性梯度凝胶电泳

Structure and diversity of bacterial communities in the rhizosphere soil of tea plantations

Yan ZHAO^{1,2}, Gui-ping HU^{1,2}, Feng-qin SONG^{1,2}, Li-lin CHEN^{1,2}, Min-sheng YOU^{1,2*}

¹Institute of Applied Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China;

²Key Laboratory of Integrated Pest Management for Fujian-Taiwan Crops, Ministry of Agriculture, Fuzhou, Fujian 350002, China

Abstract: 【Background】The structure and diversity of bacterial communities are closely related to the nutrient cycling in the rhizosphere soil of tea plantations, which can be used as a biological basis for assessing the health status of tea plantations. 【Method】The bacterial communities in the rhizosphere soil of tea plantations located at different altitudes in Anxi County, Fujian Province, were detected and analyzed by the molecular fingerprinting technology of PCR-degeneration gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). The diversity of bacterial communities was measured using the Shannon diversity index. The distribution patterns of bacterial communities were clustered using the unweighted pair-group method with arithmetic means, and the effects of environmental variables on the communities were tested using the method of Monte Carlo. The relationships between bacterial distributions and environmental variables were examined by redundancy analysis. 【Result】Among 14 species of bacteria obtained from the rhizosphere soil of tea plantations, 11 were unculturable species; the 3 culturable species were indentified as *Rhizobium* sp., *Sinorhizobium* sp. and *Ochrobactrum* sp.. The cluster analysis of DGGE profile revealed similar patterns of the bacterial communities isolated from tea plantations at the same altitude. The bacterial community with the highest Shannon diversity ($H' = 3.27$) appeared at the altitude of 400 m a.s.l.. The synergistic effects of environmental variables explained 59.6% of the variation of bacterial communities in the rhizosphere soil. Redundancy analysis demonstrated that the bacterial communities in the rhizosphere soil were closely related to the altitudes of tea plantations. 【Conclusion and significance】The structure and diversity of bacterial communities are significantly associated with the altitudes, which may affect the efficiency of nutrient cycling and tea production, and that, the total phosphorus was the strongest environment variable factor influencing diversity of bacterial communities. Therefore, management of tea plantations should be

收稿日期(Received): 2013-06-17 接受日期(Accepted): 2013-07-11

基金项目: 国际科技合作项目(2010DFB33030)

作者简介: 赵艳, 女, 研究方向: 应用微生物学。E-mail: zhaoyan20self@163.com

* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: msyou@iae.fjau.edu.cn

carried out in terms of their locations taking the effect of different altitudes on patterns of bacterial communities into account.

Key words: tea plantation; rhizosphere soil; bacteria; community structure; diversity; DGGE

铁观音是我国重要的茶品种,主要种植区为福建安溪地区,主要适生于亚热带酸性土壤。已有研究表明,由于茶园多为单一化种植,随着植茶年限的增加,茶园土壤 pH 值明显下降, Ca、Mg 等盐离子和微量元素相对缺乏,而 Al、F 和多酚类物质逐渐在茶园土壤中富集和积累,从而形成特有的茶园土壤微生态环境,包括微生物群落结构及土壤酶体系,土壤微生物呼吸作用等(Shi *et al.*, 1999; Tachibana *et al.*, 1995)。早在 1985 年,洪楨瑞等研究发现,茶树根际环境里有多种类群微生物,包括一些对增进土壤肥力有显著效益的种群,如固氮细菌、氮化细菌、纤维分解细菌等,且根际细菌群中以简单氨基酸类物质为养料的细菌占有很高比例,主要为假单胞菌属 *Pseudomonas*、短杆菌属 *Brevibacterium*、土壤杆菌属 *Agrobacterium* 和微球菌属 *Micrococcus* 等属的细菌(洪楨瑞等, 1985)。近年来,茶园土壤中固氮菌类等功能性微生物已有比较深入的研究。胡磊(2010)采用 *nifH* 基因对套种圆叶决明的茶园根际土壤进行 PCR-RFLP 分析,发现土壤中的固氮微生物群落结构丰富,主要为 α -、 β -、 γ -变形菌门及蓝细菌门。目前,对于茶园根际土壤微生物群落结构的研究报道较少,郑雪芳等(2010)分析得到不同海拔茶园土壤微生物磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acid, PLFA)组成差异大,且微生物群落 PLFA 组成与海拔具有相关性。

根际土壤微生物是一个复杂的群体,随着种植物的生长,会形成特有的根际微生物群落。根际土壤中存在的微生物具有一定的生理活性和功能多样性,能促进植物根部生长和营养物质的吸收利用,其群落结构组成及多样性与植物的生长相辅相成(郑雪芳等, 2010)。大量研究表明,根际土壤微生物群落结构对于植物的产量和质量具有重要的贡献(林生等, 2012)。研究茶园生境条件下根际土壤微生物群落结构及多样性,对于阐明茶园根际土壤微生物学特点和确立健康茶园土壤微生物学指标有重要意义。本试验通过变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)分析铁观音种植区不同海拔茶园根际土壤微生物中细菌的群落结构,结合 Shannon-Wiener 多样性指数分析不同海拔茶园根际土壤微生物中细菌群落的多样性,利用生态学统

计软件 Canoco(Braak, 1988)对安溪茶园根际土壤微生物群落结构和环境变量中的土壤理化性质进行蒙特卡罗检验(Monte Carlo Test)(Robert *et al.*, 1999),对影响茶园根际土壤细菌群落组成的环境因子进行冗余分析(redundancy analysis, RDA)(van den Wol- lenberg, 1977),获得茶园根际土壤细菌群落结构、分布特征及影响其分布的环境因子和主环境因子,进一步明确铁观音生长的微生态特点,为铁观音的健康生长和管理提供微观理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

2011 年 7 月 14 ~ 15 日,于福建省泉州市安溪县西坪镇上尧村、感德镇两地,采用 GPS 定位,分别从海拔 200 ~ 760 m 分梯度采集茶园根际土壤,共 15 处茶园(附表 1)。以茶树主茎为中心,在半径 20 ~ 30 cm 的范围内取土,去掉茶树根部表面土层,采集 0 ~ 20 cm 土壤。以 5 点取样法对各茶园根际土壤进行随机采样,然后将其混合到一个采集袋内,带回实验室,置于 4 °C 冰箱中保存。取 500 g 用于 DGGE 试验,其余 500 g 送至福建省农业科学院土壤肥料所进行土壤理化性质检测(附表 2)。

1.2 研究方法

1.2.1 茶园根际土壤总 DNA 的提取 采用 Fast DNA® SPIN Kit for Soil 试剂盒进行提取,500 mg 土样加入到 Lysing matrix 管中,按 Mahmoudi 的步骤进行提取(Araya *et al.*, 2006)。

1.2.2 茶园根际土壤 DNA 的 PCR 扩增 采用 16S 通用引物 8F 和 1492R(Ercolini, 2004)进行 PCR 扩增,得到细菌 16S 片段之后,再用 V3 区引物 R534 和 F341-GC(许爱清等, 2010)对细菌 V3 区进行扩增。所用引物序列见表 1,反应体系如下:(1) 16S rDNA 的 PCR 扩增体系:引物 8F (10 pmol· μL^{-1}) 1 μL ,引物 1492R (10 pmol· μL^{-1}) 1 μL ,土壤总 DNA 1 μL , *Taq* PCR Mastermix(天根生化科技有限公司,下同) 12.5 μL (1 $\times$), ddH₂O,总体积 25 μL 。(2) V3 区的 PCR 扩增体系:引物 R534 (10 pmol· μL^{-1}) 1 μL ,引物 F341-GC (10 pmol· μL^{-1}) 1 μL ,DNA 模板 1 μL , *Taq* PCR Mastermix 12.5 μL (1 $\times$), ddH₂O,总体积 25 μL 。

表1 用于PCR扩增的引物
Table 1 Primers for PCR amplification

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
8F	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492R	CTACGGCTACCTTGTACGA
R534	ATTACCGCGGCTGCTGG
F341-GC	GC 夹-CCTACGGGAGGCAGCAG

GC 夹:5'-CGCCCCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCAGG
GGGG-3'。
GC clamp: 5'-CGCCCCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGC
ACGGGGGG-3'.

反应程序如下:(1)16S rDNA 的 PCR 扩增反
应程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退
火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,30 个循环;72 ℃ 延伸
10 min;(2)V3 区的 PCR 扩增反应程序:94 ℃ 预变
性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸
30 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。

以上所有 PCR 产物均用 2.0% 琼脂糖进行凝
胶电泳检测。

1.2.3 茶园根际土壤细菌 V3 区扩增产物的 DGGE
分析 变性梯度凝胶电泳:选择聚丙烯酰胺凝胶浓
度为 8% (丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺的质量比为
37.5 : 1),变性梯度范围为 35% ~ 60% (100% 变性
剂含有 7 mol · L⁻¹ 尿素和 40% 甲酰胺)。采用 Bio-
Rad 变性梯度凝胶电泳系统进行电泳,DNA 扩增产
物的上样量为 20 μL,电泳缓冲液为 1 × TAE 缓冲
液,60 ℃ 条件 150 V 电泳 5 h 左右。电泳结束后用
SYBR Green I 染色,弃去浸泡液,再在 ddH₂O 中浸
泡冲洗 2 min,利用 UVP 凝胶成像分析系统照相。

DGGE 图谱分析:采用 Quantity One (Bio-Rad)
软件对 DGGE 条带进行数字化分析并采用 UPGMA
法进行聚类。DGGE 条带中 DNA 含量与其灰度
(范围 0 ~ 255,0 为最小值,255 为最大值)呈线性
关系,因此,用条带灰度来代替每个 DGGE 条带的
扩增量(N_i)用于计算。每个条带的相对含量 p_i 为
该条带的灰度值 N_i 与该列所有条带灰度值总和 N
的比值。细菌群落结构多样性指数 (H') 和均匀度
指数 (E) 的计算方法为:

Shannon-Wiener 多样性指数 (Shannon & Weav-
er, 1949) (H')
$$H' = - \sum_{i=1}^i (p_i \ln p_i)$$

Pielou 均匀度指数 (Peilou, 1977) (E)
$$E = H' / \lg S$$

其中, $p_i = N_i / N$, N_i 为样本 i 的每一单独条带的
灰度, N 为样本 i 所有条带灰度的总和; S 为
Richness 丰富度指数,即 DGGE 图谱中每一个样本
所含的条带数目;采用生态学软件 Canoco 对茶园
根际土壤细菌群落与土壤理化性质进行蒙特卡罗
检验,并对茶园根际土壤细菌群落结构与环境变量
之间的关系进行 RDA 分析。

1.2.4 DNA 的回收、克隆及测序 在紫外灯下切
割 DGGE 凝胶上不同位置的优势条带,置于 20 μL
TE buffer 中,4 ℃ 过夜。取 2 μL 为 DNA 模板进行
16S rDNA V3 可变区域扩增。PCR 产物经 DGGE
后,割胶回收,将其连接到 PMD-19T vector (宝生物
工程(大连)有限公司),转化到大肠杆菌 DH5α,摇
床培养,涂板,挑取阳性克隆子,送至上海生物工程
技术服务有限公司测序,利用 BLAST 对测序获得
的 DNA 序列进行比对分析 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。

2 结果与分析

2.1 土壤总 DNA 的提取及 PCR 扩增结果

经测定,15 个茶园根际土壤微生物总 DNA 的
 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 集中在 1.80 ~ 1.88 之间, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$
集中在 1.70 ~ 1.75 之间。电泳结果显示土壤 DNA
片段大小约为 2.30 kb (图 1);经过 PCR 扩增,得到
大小约为 1500 bp 的 16S rDNA 片段和 230 bp 的 V3 片
段(图 2 ~ 3)。

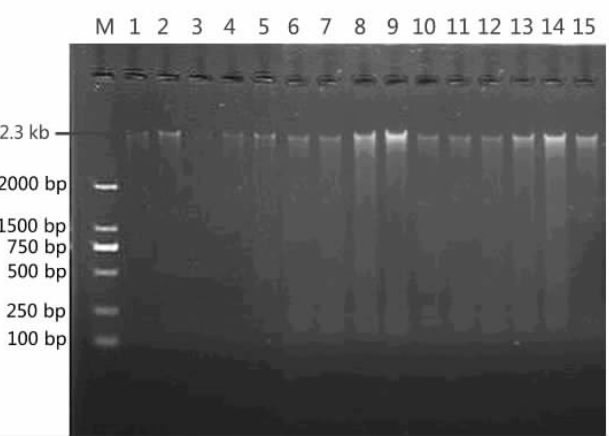


图1 土壤总 DNA 提取电泳图

Fig.1 Electrophoresis profiles of total DNA extracted from soil
M. DNA 标准分子质量;1 ~ 15. 样品名,见附表 1。
M. DNA marker; 1 ~ 15. Samples name, as shown in additional table 1.

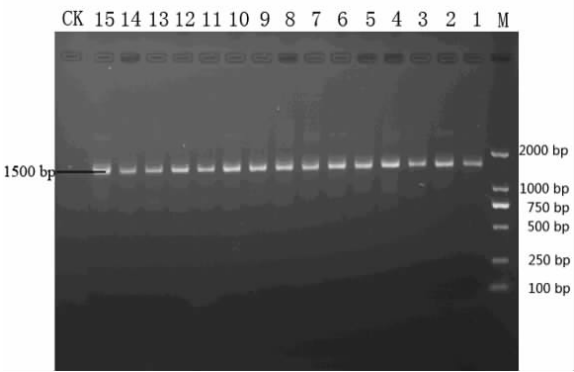


图 2 16S rDNA PCR 扩增产物电泳图

Fig.2 Electrophoresis profiles of the amplified 16S rDNA products

M. DNA 标准分子质量; 1 ~ 15. 样品名, 见附表 1;
CK. 阴性对照, 以水为模板扩增。
M. DNA marker; 1 ~ 15. Samples name, as shown in additional table 1; CK. Negative control, using water as the template for amplification.

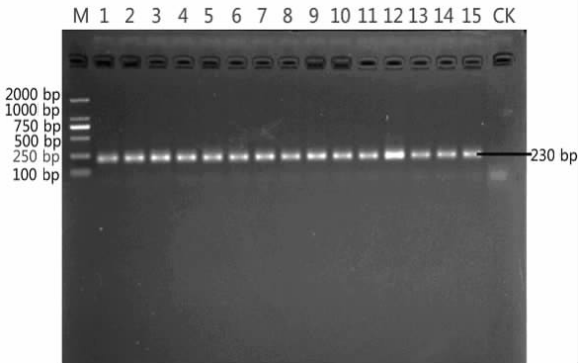


图 3 V3 区 PCR 产物电泳图

Fig.3 Electrophoresis profile of the V3 fragment PCR products

M. DNA 标准分子质量; 1 ~ 15. 样品名, 见附表 1;
CK. 阴性对照, 以水为模板扩增。
M. DNA marker; 1 ~ 15. Samples name, as shown in additional table 1; CK. Negative control, using water as the template for amplification.

2.2 茶园根际土壤细菌 V3 区的 DGGE 图谱

茶园根际土壤细菌 V3 区的 DGGE 图谱表明, 茶园根际土壤细菌的 16S rDNA 片段经 DGGE 分离为若干条带, Quantity One 图像软件对 DGGE 指纹图谱进行分析, 不同海拔梯度茶园根际土壤微生物中的 DGGE 条带数目集中在 19 ~ 28 条。其中, 条带数最少的为 5 号茶园, 海拔为 600 m; 条带数最多的有 28 条, 为 9 号和 11 号茶园, 海拔均为 400 m (图 4)。

对 DGGE 图谱中样本进行聚类分析 (图 5), 15 个样本共聚为 3 大类: 处于 200 m 海拔处的 14、15 号茶园和 300 m 海拔处的 12、13 号茶园聚为一类; 处于 500 m 海拔处的 6、7、8 号茶园和 400 m 海拔处的 9、10、11 号茶园聚为一类; 处于 760 m 海拔处的 1、2、3 号茶园和 600 m 海拔处的 4、5 号茶园聚为一类 (图 5)。由此可见, 茶园根际土壤细菌群落聚类特征与茶园所处海拔梯度紧密相关。

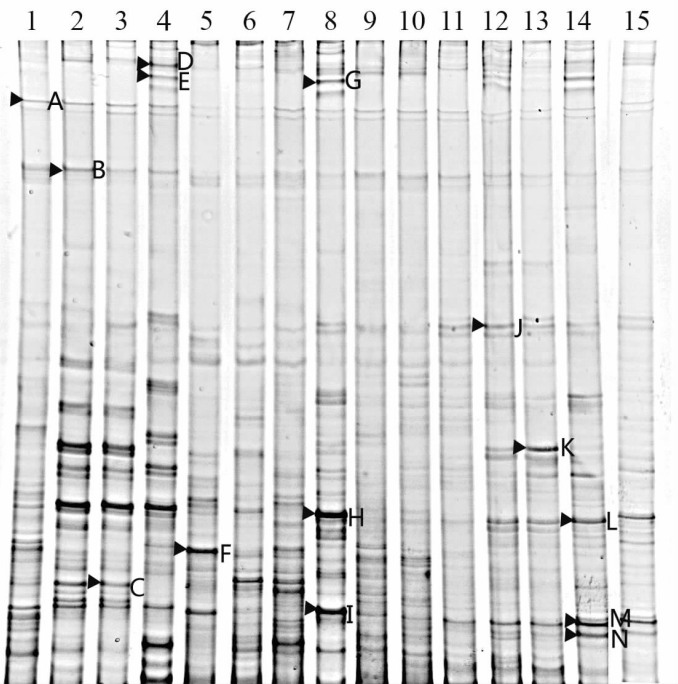


图 4 PCR 产物的 DGGE 电泳图谱

Fig.4 DGGE profiles of the PCR products
1 ~ 15 表示样品名, 见附表 1

1 ~ 15 stand for samples name, as shown in additional table 1.

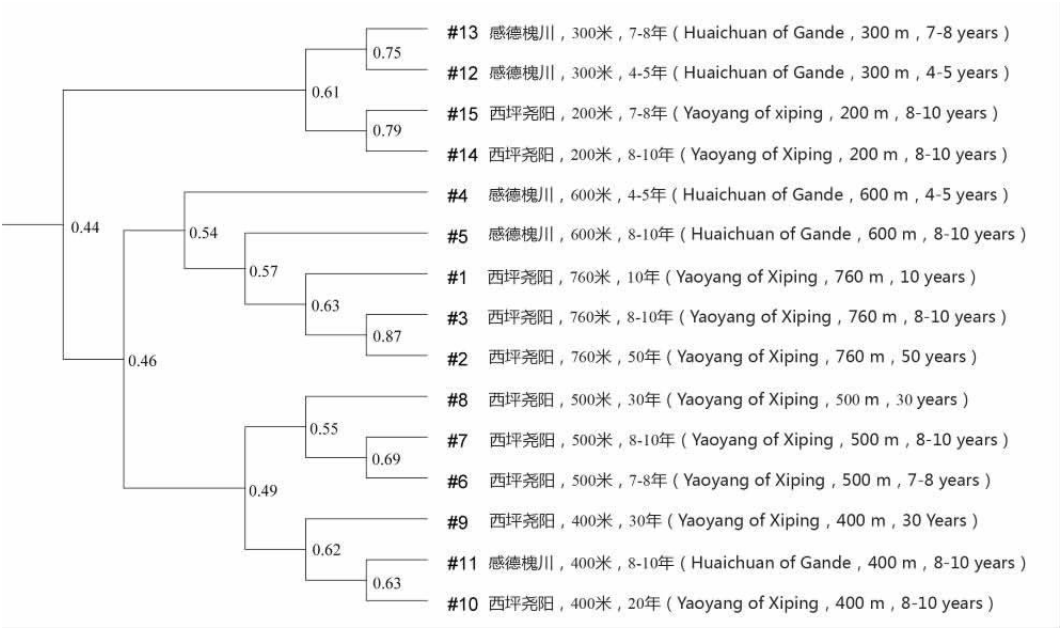


图5 DGGE 图谱的聚类分析

Fig.5 Clustering analysis of DGGE profiles

在紫外灯照射下,从 DGGE 胶片上面割下 14 个强信号的条带 (A ~ N) 进行 PCR 扩增、克隆、测序,并在 NCBI 中进行 BLAST 比对。结果可知,14 个被测序列与 NCBI 已知序列的相似度除 H 外均为 100% (表 2)。鉴定结果表明,茶园根际土壤优势细菌主要是非可培养细菌,占 80%;其余 20% 经鉴定为可培养细菌,分别隶属于根瘤菌属 *Rhizobium*、苜蓿中华根瘤菌属 *Sinorhizobium* 和苍白杆菌属 *Ochrobactrum*, 其登录号分别为 JN819573.1、JX133181.1 和 KC252620.1。

表2 测序比对结果

Table 2 Alignment of sequences

条带 Band	相似度 Similarity	最相似序列 Most similar sequence	系谱归属 Phylogenetic affiliation	登录号 Accession number
A	100%	Uncultured <i>Bacterium</i> clone G16 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	HQ121331.1
	100%	Uncultured soil <i>Bacterium</i> clone em_emp210 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	JN172809.1
	100%	Uncultured soil <i>Bacterium</i> clone em_emp208 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	JN172788.1
B	100%	Uncultured <i>Bacterium</i> clone G16 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	HQ121331.1
	100%	Uncultured soil <i>Bacterium</i> clone em_emp210 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	JN172809.1
	100%	Uncultured soil <i>Bacterium</i> clone em_emp208 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	JN172788.1
C	100%	Uncultured <i>Bacterium</i> clone G16 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	HQ121331.1
	100%	Uncultured soil <i>Bacterium</i> clone em_emp210 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	JN172809.1
	100%	Uncultured soil <i>Bacterium</i> clone em_emp208 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	JN172788.1
D	100%	Uncultured <i>Proteobacterium</i> clone Hmd02B56 16S ribosomal	<i>Proteobacterium</i>	EF196941.1
	100%	Uncultured <i>Bacterium</i> clone P2K19f 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	GU127729.1
	100%	Uncultured <i>Bacterium</i> clone PW188 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	GQ402681.1
E	100%	Uncultured <i>Bacterium</i> clone LG70 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	JX133525.1
	100%	Uncultured <i>Bacterium</i> partial 16S rRNA gene, clone SBD94	<i>Bacterium</i>	HE819608.1
	100%	Uncultured <i>alpha</i> <i>Proteobacterium</i> clone YZ52 16S ribosomal RNA gene	<i>Proteobacterium</i>	JQ957842.1
F	100%	<i>Rhizobium</i> sp. PA22 16S ribosomal RNA gene	<i>Rhizobium</i>	JN819573.1
	100%	<i>Rhizobium</i> sp. PA14 16S ribosomal RNA gene	<i>Rhizobium</i>	JN819567.1
	100%	<i>Rhizobium</i> sp. 2396 16S ribosomal RNA gene	<i>Rhizobium</i>	JX174273.1
G	100%	Uncultured <i>Bacterium</i> clone G16 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	HQ121331.1
	100%	Uncultured soil <i>Bacterium</i> clone em_emp210 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	JN172809.1
	100%	Uncultured soil <i>Bacterium</i> clone em_emp208 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	JN172788.1

续表 2

条带	相似度	最相似序列	系谱归属	登录号
Band	Similarity	Most similar sequence	Phylogenetic affiliation	Accession number
H	79%	Uncultured <i>Bacterium</i> clone G16 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	HQ121331.1
	79%	Uncultured soil <i>Bacterium</i> clone em_emp210 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	JN172809.1
	79%	Uncultured soil <i>Bacterium</i> clone em_emp208 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	JN172788.1
I	100%	Uncultured <i>Bacterium</i> clone G16 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	HQ121331.1
	100%	Uncultured soil <i>Bacterium</i> clone em_emp210 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	JN172809.1
	100%	Uncultured soil <i>Bacterium</i> clone em_emp208 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	JN172788.1
J	100%	Uncultured <i>Bacterium</i> clone G16 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	HQ121331.1
	100%	Uncultured soil <i>Bacterium</i> clone em_emp210 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	JN172809.1
	100%	Uncultured soil <i>Bacterium</i> clone em_emp208 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	JN172788.1
K	100%	Uncultured <i>Bacterium</i> , partial 16S rRNA gene	<i>Bacterium</i>	CU914828.1
	100%	<i>Sinorhizobium meliloti</i> strain UT10 16S ribosomal RNA gene	<i>Sinorhizobium</i>	JX133181.1
	100%	Uncultured <i>Bacterium</i> clone WT14H75 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	JX283609.1
L	100%	<i>Sinorhizobium meliloti</i> strain UT10 16S ribosomal RNA gene	<i>Sinorhizobium</i>	JX133181.1
	100%	Uncultured <i>Bacterium</i> clone WT14H75 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	JX283609.1
	100%	<i>Ensifer adhaerens</i> strain MM1-6 16S ribosomal RNA gene	<i>Sinorhizobium</i>	JX298811.1
M	100%	Uncultured <i>Bacterium</i> clone LG70 16S ribosomal RNA gene	<i>Bacterium</i>	JX133525.1
	100%	Uncultured <i>Bacterium</i> partial 16S rRNA gene, clone SBD94	<i>Bacterium</i>	HE819608.1
	100%	Uncultured <i>alpha Proteobacterium</i> clone YZ52 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Proteobacterium</i>	JQ957842.1
N	100%	<i>Ochrobactrum</i> sp. DZQ2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Ochrobactrum</i>	KC252620.1
	100%	<i>Ochrobactrum</i> sp. THG-DT39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Ochrobactrum</i>	KC252620.1
	100%	<i>Ochrobactrum grignonense</i> strain BU72 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Ochrobactrum</i>	KC153015.1

从茶园根际土壤细菌群落 Shannon-Wiener 多样性指数分析(表 3)结果来看,高海拔的茶园根际土壤细菌群落 Shannon-Wiener 多样性指数相对较低,低海拔的样本 Shannon-Wiener 多样性指数相对

较高,其中海拔为 400 m 的 3 个茶园(9、10、11)根际土壤细菌群落 Shannon-Wiener 多样性指数和丰富度均较高,分别为 3.27、3.20、3.32 和 28、26、29;均匀度指数也存在类似规律(表 3)。

表 3 茶园根际土壤细菌群落基因多样性指数
Table 3 Genetic diversity index of bacterial communities
in the rhizosphere soil of tea plantations

样本	Shannon-Wiener 多样性指数	丰富度	均匀度
Sample	Shannon-Wiener diversity index (H')	Richness (S)	Evenness (E)
1	3.12	25	0.969
2	2.99	22	0.967
3	2.98	22	0.964
4	2.96	21	0.972
5	2.82	19	0.958
6	2.97	21	0.976
7	2.98	22	0.964
8	3.04	23	0.970
9	3.27	28	0.981
10	3.20	26	0.982
11	3.32	29	0.986
12	3.08	23	0.982
13	3.13	26	0.961
14	3.01	23	0.960
15	2.90	21	0.953

2.3 茶园根际土壤细菌群落的环境特性

研究表明,土壤细菌群落结构组成受环境因素(如土壤 pH 值,C/N 值,有机质等)的影响。生态学上一般采用 Canoco 软件进行环境变量贡献率分析,

本研究利用 Canoco 对茶园根际土壤细菌群落和土壤理化性质进行蒙特卡罗检验,结果可知,磷(P)在所有环境因子中的贡献率最高,达到 10.64%;其次为 A-P,解释的变异率为 10.47%;其余环境变量对茶园根际细菌群落分布的贡献依次降低(表 4)。由此可知,土壤的理化性质中对茶园根际土壤细菌群落按照海拔能够聚类这一结果起主要解释作用的环境变量为 P。同时发现,所有环境因子协同作用对茶园根

际土壤细菌微生物群落结构的贡献率达到 59.60% (表 4)。从 p 值来看,虽然 P 在所有环境变量中贡献最大,但其 p 值并未达到显著水平($p < 0.05$)。由于茶园根际微环境较为复杂,茶树根际土壤营养循环的过程由各种因素共同决定的,从土壤理化性质方面来讲,P 起着主导作用,但它与其他环境变量协同作用,在茶园根际这个微域环境中对微生物的群落结构形成具有一定的影响作用。

表 4 蒙特卡罗检验结果
Table 4 Result of Monte Carlo test

参数 Parameters	特征值 Eigenvalue	变量解释的变异率 Ariation rate explained by variables (%)	F 值 F value	p 值 p value
P	0.1064	10.64	1.548	0.130
A-P	0.1047	10.47	1.520	0.164
K	0.0671	6.71	0.934	0.486
pH	0.0567	5.67	0.781	0.604
SOM	0.0548	5.48	0.754	0.638
N	0.0530	5.30	0.728	0.654
Ne	0.0527	5.27	0.723	0.688
A-K	0.0468	4.68	0.638	0.756
Total	0.5960	59.60	\	\

P: 总磷; A-P: 有效磷; K: 总钾; SOM: 有机质; N: 总氮; Ne: 碱解氮; A-K: 速效钾。
P: Total phosphorus; A-P: Available phosphorus; K: Total potassium; SOM: The organic matter; N: Total nitrogen; Ne: Effective nitrogen; A-K: Available kalium.

对茶园根际土壤细菌群落和环境变量 P 进行冗余分析(图 6),得到各个海拔梯度的茶园根际土壤细菌群落在环境因子 P 的方向上的分布情况。由分析结果可见,15 个茶园根际土壤细菌群落样本在 P 的方向上按照海拔特征依次聚类,其中海拔 600 m 的样本 4、5 聚为一类,海拔 500 m 的样本 6、7、8 聚为一类,海拔 400 m 样本 9、10、11 聚为一类,海拔为 300 和 200 m 的样本 12、13、14、15 聚为一类,海拔 760 m 的样本 1、2、3 聚为一类(图 6)。此结果与 DGGE 聚类的结果一致,共同说明茶园根际土壤细菌群落结构与海拔梯度密切相关。

3 讨论

近年来,茶园根际土壤微生物的研究及其功能微生物开发利用方面已经取得不少进展。Çakmakç *et al.* (2010) 研究发现茶园土壤中可培养的细菌主要有芽孢杆菌属 *Bacillus* (34.6%)、假单胞菌属 *Pseudomonas* (8.9%)、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas* (6.1%)、类芽孢杆菌属 *Paenibacillus* (5.9%) 和节杆菌属 *Arthrobacter* (4.8%)。Saikia *et al.* (2011) 已对从茶园根际土壤分离到的 25 种假单胞菌进行拮抗

活性和代谢产物的研究,发现了抗生素 2,4-di-acetylphloroglucinol (DAPG) 和 pyoluteorin (PLT) 的编码基因 *Pf12* 和 *Pf373*。本研究的试验结果表明,安溪茶园根际细菌中非可培养细菌居多,可培养的细菌较少,主要是根瘤菌、苜蓿中华根瘤菌和人苍白杆菌。有报道表明,苜蓿中华根瘤菌在土壤体系中具有强固氮作用(管凤贞等,2012),人苍白杆菌因其自身耐药性比较强而能够分解土壤中残留的农药(王伟霞等,2010)。因此,从安溪茶园根际土壤中鉴定到的苜蓿中华根瘤菌和人苍白杆菌是否同样具有相应的作用值得进行进一步研究。

茶园根际土壤微生物多样性的研究已有报道,郑雪芳等(2010)利用 PLFA 生物标记法研究了不同海拔梯度茶园根系土壤微生物群落多样性,得到不同的 PLFA 在不同海拔梯度茶树根系土壤分布差异明显,其中,高海拔(834 m)茶树根系土壤分布的 PLFA 种类和数量都最多。聚类分析和冗余分析结果共同表明,茶园根际土壤细菌群落结构与海拔分布紧密相关,中间海拔细菌丰富度相对低海拔和高海拔细菌更高,400 m 海拔处 Shannon-Wiener 多样

性指数最高,平均值为 3.26,细菌种类最丰富;本研究取样的茶园集中于福建省泉州市安溪县西坪镇和感德镇 2 个地方,土壤均为红壤,两地区气候条件相似,排除气候差异等的影响,结果分析表明,影响茶树根际微生物群落的主要因素为海拔梯度、肥力状况和土壤本身理化性质。相对于最高海拔 760 m 和最低海拔 200 m,处于中间梯度的 400 m 海拔梯度,其生态系统比较适宜更多的细菌类群生存。

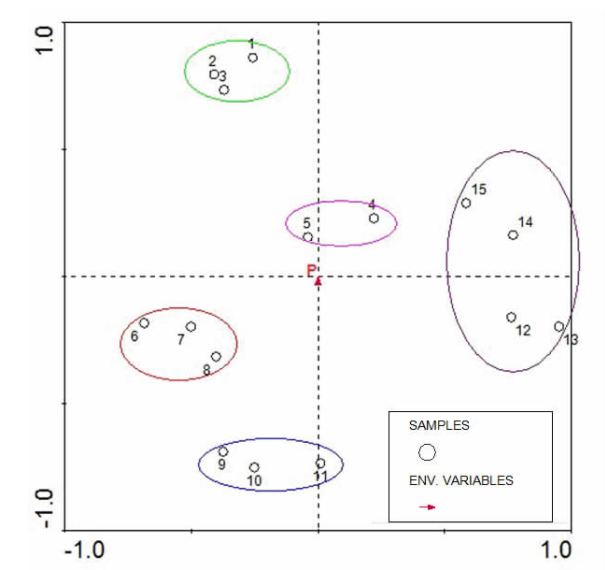


图 6 茶园根际土壤细菌群落的 RDA 分析

Fig.6 RDA analysis of bacterial communities in the rhizosphere soil of tea plantations

本研究结果还表明,P 是所有环境变量中影响安溪茶园根际细菌群落结构的主要因子,它对该地区茶园细菌群落分布的贡献达到 10.64%,所有环境因素协同作用对该地区细菌群落分布的影响占 59.6%。而 He *et al.* (2008)也证明 P 是所有茶园根际土壤环境因子中影响微生物群落分布的关键因子,同时 Zheng *et al.* (2012)发现有机质、速效磷、氮,与土壤中微生物种群分布有一定相关作用。

茶园根际土壤微生物群落结构是一个复杂的有机体,本研究主要明确了细菌群落结构分布与海拔梯度及土壤理化性质的关系,对于茶园根际环境中真菌、放线菌的研究也有待进一步进行,同时对于其他环境因子的研究也尚待深入。

参考文献

管凤贞,邱宏端,陈济琛,林新坚. 2012. 根瘤菌菌剂的研究与开发现状. 生态学杂志. 31(3): 755–759.
洪祯瑞,王益福,方月珍,董金甫,李能树. 1985. 茶树根

际微生物区系的研究. 茶叶科学, (2): 9–16.
胡磊. 2010. 套种圆叶决明和施肥对茶园土壤固氮微生物群落的影响. 福州: 福建农林大学.
石锦芹,丁瑞兴,刘友兆,孙玉华. 1999. 尿素和茶树落叶对土壤的酸化作用. 茶叶科学, (1): 7–12.
李福荣,周强,史峥贤,王彩丽. 2009. 信阳毛尖茶树根际微生物群落组成与茶叶质量的关系. 安徽农业科学, 37(22): 65.
王伟霞,李福后,王文锋. 2010. 微生物在土壤污染中的生物修复作用. 北方园艺, (4): 1208–1211.
许爱清,李宗军,王远亮,文杰宇. 2010. 应用 PCR-DGGE 技术检测发酵食品和饲料中真菌菌群. 食品科学, 31(7): 317–321.
郑雪芳,苏远科,刘波,蓝江林,杨述省,林营志. 2010. 不同海拔茶树根系土壤微生物群落多样性分析. 中国生态农业学报, 18(4): 886–871.
Araya R, Tani K, Takagi T, Yamaguchi N and Nasu M. 2006. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 111–119.
Braak C J. 1988. CANOCO-an extension of DECORANA to analyze species-environment relationships. *Plant Ecology*, 75, 159–160.
Çakmakç R, Dönmez M F, Ertürk Y, Erat M, Haznedar A and Sekban R. 2010. Diversity and metabolic potential of culturable bacteria from the rhizosphere of Turkish tea grown in acidic soils. *Plant and Soil*, 332: 299–318.
Ercolini D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56: 297–314.
Haq Q M R, Sharma G D, Huidrom P and Jan A T. 2011. Molecular characterization of endosulfan tolerant Rhizospheric microbes from tea gardens of Silchar assam India. *Journal of ExA-Primental Sciences*, 2(2): 12–15
He J Z, Zheng Y, Chen C R, He Y Q and Zhang L M. 2008. Microbial composition and diversity of an upland red soil under long-term fertilization treatments as revealed by culture-dependent and culture-independent approaches. *Journal of Soils and Sediments*, 8: 349–358.
Pielou E C. 1975. *Ecological Diversity*. New York: Wiley.
Robert C P, Casella G and Robert C P. 1999. *Monte Carlo Statistical Methods* (Vol. 58). New York: Springer.
Saikia R, Sarma R K, Yadav A and Bora T C. 2011. Genetic and functional diversity among the antagonistic potential fluorescent pseudomonads isolated from tea rhizosphere. *Current*

microbiology, 62: 434 – 444.

Shannon C E and Weaver W. 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. Urbana: University of Illinois Press.

Tachibana N, Yoshikawa S and Ikeda K. 1995. Influences of heavy application of nitrogen on soil acidification and root growth in tea [*Camellia sinensis*] fields. *Japanese Journal of Crop Science*, 64: 516 – 522.

van den Wollenberg A L. 1977. Redundancy analysis an alternative for canonical correlation analysis. *Psychometrika*, 42: 207 – 219.

Zheng Y , Tian X F, Shen J P and Zhang L M. 2012. Methanotrophic abundance and community fingerprint in pine and tea plantation soils as revealed by molecular methods. *African Journal of Biotechnology*, 11: 11807 – 11814.

Zou X M , Ruan H H, Fu Y, Yang X D and Sha L Q. 2005. Estimating soil labile organic carbon and potential turnover rates using a sequential fumigation-incubation procedure. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 1923 – 1928.

附表 1 土壤样本信息
Additional table 1 Information of samples

样本编号 Number of sample	采样地 Sampling site	海拔 Elevation (m)	茶龄 Age of cultivation (a)
1	西坪尧阳(Yaoyang of Xiping)	760	10
2	西坪尧阳(Yaoyang of Xiping)	760	50
3	西坪尧阳(Yaoyang of Xiping)	760	8 ~ 10
4	感德槐川(Huaichuan of Gande)	600	4 ~ 5
5	感德槐川(Huaichuan of Gande)	600	8 ~ 10
6	西坪尧阳(Yaoyang of Xiping)	500	7 ~ 8
7	西坪尧阳(Yaoyang of Xiping)	500	8 ~ 10
8	西坪尧阳(Yaoyang of Xiping)	500	30
9	西坪尧阳(Yaoyang of Xiping)	400	30
10	西坪尧阳(Yaoyang of Xiping)	400	20
11	感德槐川(Huaichuan of Gande)	400	8 ~ 10
12	感德槐川(Huaichuan of Gande)	300	4 ~ 5
13	感德槐川(Huaichuan of Gande)	300	7 ~ 8
14	西坪尧阳(Yaoyang of Xiping)	200	8 ~ 10
15	西坪尧阳(Yaoyang of Xiping)	200	7 ~ 8

附表 2 样本理化性质
Additional table 2 The physicochemical properties of samples

样本 Sample	pH	有机质(SOM) (%)	总氮(N) (%)	总磷(P) (%)	总钾(K) (%)	碱解氮(Ne) (mg·kg ⁻¹)	有效磷(A-P) (mg·kg ⁻¹)	速效钾(A-K) (mg·kg ⁻¹)
1	3.81	1.560	0.0740	0.0259	0.335	94.3	3.43	42.8
2	4.54	0.957	0.0527	0.0310	0.496	67.9	13.70	134.9
3	3.97	1.170	0.0645	0.0362	0.611	137.7	20.60	115.1
4	3.61	3.230	0.1680	0.1280	0.135	137.7	238.90	59.2
5	3.55	2.950	0.1460	0.0930	0.169	154.7	208.60	102.0
6	3.91	1.010	0.0543	0.0251	0.541	60.4	2.17	102.0
7	4.68	2.610	0.1200	0.0727	0.568	100.0	58.30	49.3
8	5.17	3.020	0.1210	0.0938	0.580	126.4	99.80	82.2
9	4.04	1.400	0.0882	0.0288	1.270	150.9	8.96	85.5
10	4.53	2.190	0.1200	0.0220	0.849	139.6	8.53	65.8
11	4.38	3.610	0.1730	0.0351	0.201	166.8	10.00	69.1
12	4.78	0.906	0.0422	0.0247	0.484	45.3	5.35	138.2
13	3.34	2.770	0.1390	0.0687	0.132	169.8	80.00	111.8
14	4.16	2.250	0.1160	0.0222	0.610	132.1	7.38	82.2
15	5.10	0.460	0.0338	0.0251	1.190	34.0	3.82	85.5

SOM: Soil organic matter; Ne: Effective nitrogen; A-P: Available phosphorus; A-K: Available kalium.

(责任编辑:彭露)

