

DOI: 10.5846/stxb201808041663

吴则焰, 赵紫檀, 林文雄, 李建鹏, 刘书影, 周柳婷, 罗 扬, 刘金福. 基于 T-RFLP 方法的连栽杉木根际土壤细菌群落变化研究. 生态学报, 2019, 39 (19): - .

Wu Z Y, Zhao Z T, Lin W X, Li J J, Liu S Y, Zhou L T, Luo Y, Liu J F. Analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms in soil bacterial communities in Chinese fir plantations that have undergone continuous cultivation. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(19): - .

基于 T-RFLP 方法的连栽杉木根际土壤细菌群落变化研究

吴则焰^{1,2,3,4}, 赵紫檀⁵, 林文雄¹, 李建鹏⁵, 刘书影¹, 周柳婷¹, 罗 扬¹, 刘金福^{4,5,*}

1 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002

2 福建省农业生态过程与安全监控中重点实验室, 福州 350002

3 作物生态与分子生理学福建省高校重点实验室, 福州 350002

4 福建农林大学海峡自然保护区研究中心, 福州 350002

5 福建农林大学林学院, 福州 350002

摘要:运用末端限制性片段长度多态性技术(T-RFLP),研究福建省尤溪国有林场的多代连栽杉木根际土壤细菌群落变化特征。结果表明:杉木多代连栽后根际微生态失衡,表现为碳循环菌和氮循环菌等有益菌数量减少,病原菌数量增加。在不同代数杉木土壤中,4种内切酶消化后产生的末端限制性片段(T-RFs)数量具有显著差异,第一代杉木(first Chinese fir rotation plantation, FCP)最高,第二代杉木(second Chinese fir rotation plantation, SCP)次之,第三代杉木(third Chinese fir rotation plantation, TCP)最少。土壤理化性质结果表明连栽导致土壤养分逐代降低,除土壤碳氮比与细菌群落多样性呈显著负相关外,土壤养分含量指标与细菌群落多样性呈显著正相关。T-RFLP实验共鉴定出细菌门类12门,其中厚壁菌门、蓝藻门、放线菌门和变形菌门是主要优势菌群。随栽植代数的增加,变形菌门细菌比例递增,而厚壁菌门细菌比例递减。土壤细菌群落多样性指数,表现为随栽植代数增长而减少,呈现 FCP > SCP > TCP 趋势,与 T-RFs 片段数量变化趋势基本一致,表明多代连栽降低了杉木根际土壤细菌群落多样性。依据功能性不同,可将鉴定出的细菌划分为5类:碳循环功能菌、硫循环功能菌、氮循环功能菌、纤维降解菌及病原菌。连栽导致碳循环菌和氮循环菌相对含量降低,硫循环菌和纤维降解菌相对含量提高,病原菌相对含量随栽植代数增加而上升。

关键词:连栽;杉木;土壤微生物;群落多样性;末端限制性片段长度多态性

Analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms in soil bacterial communities in Chinese fir plantations that have undergone continuous cultivation

WU Zeyan^{1,2,3,4}, ZHAO Zitan⁵, LIN Wenxiong¹, LI Jianjuan⁵, LIU Shuying¹, ZHOU Liuting¹, LUO Yang¹, LIU Jinfu^{4,5,*}

1 Life Sciences College of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

2 Fujian Provincial Key Laboratory of Agroecological Processing and Safety Monitoring, School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

3 Key Laboratory of Crop Ecology and Molecular Physiology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

4 Research Center of Strait Natural Conservation Area, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

5 Forestry College of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

基金项目:国家自然科学基金(31500443);福建省自然科学基金(2018J01617);福建农林大学杰出青年项目(XJQ201718)

收稿日期:2018-08-04; **网络出版日期:**2019-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: fjlj110@sina.com

Abstract: To analyse variations in soil bacterial communities in Chinese fir plantations that have undergone continuous cultivation, terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) technique was used to assess the soil microbial community structure, diversity, and function in Youxi National Forest Farm. The results showed that continuous cultivation resulted in an imbalance in the soil microbial communities in the Chinese fir plantations. The pathogenic bacteria increased, whereas the carbon-cycling and nitrogen-cycling bacteria gradually decreased to a significant extent. The number of terminal restriction fragments (T-RFs) was significantly different among three rotations of continuous cultivation in the Chinese fir plantations. The T-RFs were the highest in first Chinese fir rotation plantation (FCP), followed by second Chinese fir rotation plantation (SCP) and third Chinese fir rotation plantation (TCP). The soil chemical properties were significantly and positively correlated with bacterial community diversity, except C/N and pH. A total of 12 bacterial families were identified, and *Firmicutes*, *Cyanophyta*, *Actinomyces*, and *Proteobacteria* were the four main types of bacteria in all the samples. The proportion of *Proteobacteria* increased with the increase in cultivation rotations, whereas the proportion of *Firmicutes* decreased with the increase in cultivation rotations. The soil bacterial community diversity indexes showed a trend of FCP > SCP > TCP, which was consistent with the number of T-RFs and indicated that the long-term pure plantation pattern exacerbated the microecological imbalance in the rhizospheric soils of the Chinese fir and markedly decreased the soil microbial community diversity. On the basis of function, we classified the bacteria into five categories: carbon-cycling bacterium, sulphur-cycling bacterium, nitrogen-cycling bacterium, fibrinolytic bacterium, and pathogenic bacterium. Overall, the relative numbers of carbon-cycling and nitrogen-cycling bacteria gradually decreased in the Chinese fir plantations. Conversely, the relative numbers of sulphur-cycling, fibrinolytic, and pathogenic bacteria increased in the Chinese fir plantations.

Key Words: Continuous cultivation; Chinese fir; Soil microorganism; Community diversity; T-RFLP

杉木(*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.)是我国南方重要用材树种,分布遍及16个省(区),因其速生、丰产、优质等特点,与国计民生关系极为密切^[1]。杉木林属于人为严格控制下达到相对稳定并保持生态平衡的一种偏途顶级群落,在森林演替过程中具有不可替代的作用^[2-4]。然而,杉木存在严重的连栽障碍问题,表现为在同一林地上多代栽植后,平均木生物量、林分生物量及林分净生产力均呈逐渐下降趋势,植株生长发育不良,病虫害严重,造成产量、品质下降,严重制约着用材林资源的可持续发展^[5-9]。我国南方林区20世纪80—90年代营造的大面积杉木速生丰产林,目前多已进入主伐阶段,均面临多代更新问题。面对如何维持连栽杉木高产高质这一科学难题,连栽障碍机制及其调控是当前杉木人工林栽培亟待解决的重要内容,成为国内外同行研究的前沿热点。

杉木人工林连栽障碍的研究历史较长,期间得到的结论较多,不同的学者观点不一。从生态学角度出发,前人指出杉木人工林多代连栽后,在林分稳定性、抗御病虫害和人为干扰能力以及发挥森林生态效益等方面表现出明显不足,认为引起植物连栽障碍的原因主要有三方面:(1)土壤理化性质恶化、土壤肥力下降^[10];(2)植物化感自毒作用^[11-12];(3)土壤微生态环境恶化^[13-14]。针对土壤肥力下降方面,王忠营等^[15]、吴鹏飞等^[16]研究发现,通过施肥手段防治连栽杉木林地力衰退问题不具可持续性,不宜在生产上大面积推广应用。在植物化感自毒方面,马祥庆^[17]、陈龙池等^[18]认为自毒作用是杉木连栽障碍的主要原因。然而自毒物质并非在前后代植物之间直接发挥作用,其存在只是诱因,释放到土壤后势必受到微生物的加工、分解、转化等。因此,越来越多的学者认为,自毒物质生态效应的间接作用及其造成土壤微生物区系紊乱是导致植物连栽障碍形成的主要因素^[19]。

根际作为植物体的一个重要组成部分,根际微生物群落的宏基因组被认为是植物体的第二基因组,因此根际土壤微生物群落多样性与植物生长发育密切相关^[11]。笔者前期运用磷脂脂肪酸技术(PLFA)和变性梯度凝胶电泳技术(DGGE),对不同连栽代数下杉木根际土壤微生物区系开展了研究,发现随着连栽年限的增

加,土壤微生物群落真菌数量显著增加,连栽根际土壤中真菌生物多样性提高,特别是镰刀属真菌(*Fusarium* spp.)等致害真菌所占比例显著提高^[20]。此外,笔者前期综合运用 Biolog 微平板法和高通量测序技术对湿地松(*Pinus elliottii*)连栽地土壤微生物群落开展研究,发现湿地松连栽后土壤细菌显著减少,致病真菌显著增加,从而加剧土壤微生态失衡^[21]。据此,我们推测杉木连栽可能打破根际土壤微生物平衡,导致细菌群落多样性降低,致病菌增加。尽管许多学者开展了植物连栽障碍研究,但目前研究主要集中在土壤养分和化感自毒方面^[22-24],有关连栽杉木根际微生物群落变化的研究较少。本研究运用 T-RFLP 技术探索连栽杉木根际土壤细菌群落结构变化,旨在从土壤微生态角度揭示连栽杉木根际微生态的变化规律,试图从新的视角揭示杉木连栽障碍机理,为杉木人工林经营管理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究区自然概况连栽杉木样地位于福建省尤溪县国有林场,该林场占地面积 21.5 Km²,地处中亚热带气候区(25°48'N—26°24'N,117°48'E—118°36'E),归属我国杉木南方主产区。该地区终年温暖湿润,夏冬两季较长而春秋两季较短,冬季有霜期但持续时间短,年均温 18.9 ℃(极端低温-7.8 ℃,极端高温 40.3 ℃),年均相对湿度为 83.0%,年均降水量达 1599.6 mm。土壤质地为砾质轻壤土,土层厚度均在 100 cm 以上。该林场栽植有 3 个不同代数的杉木人工纯林,其中第一代杉木林(First Chinese fir rotation plantation, FCP)栽植于 1988 年,在杂木林皆伐后,采用火烧炼山后用实生杉木苗造林,调查时林龄 29a;第二代杉木林(Second Chinese fir rotation plantation, SCP)栽植于 1989 年,在一代杉木林(32a 生)采伐迹地上用实生杉木苗造林,调查时林龄 28a;第三代杉木林(Third Chinese fir rotation plantation, TCP)栽植于 1992 年,在二代杉木林(30a 生)采伐迹地上用实生杉木苗造林,调查时林龄 25a。

1.2 土壤样品采集与处理

2017 年 8 月,分别在一代杉木林(FCP)、二代杉木林(SCP)和三代杉木林(TCP)设立 3 个海拔、坡度、坡向、林分密度相近的 20 m×20 m 实验样地,每代 3 个样方重复,一共设置 9 个样方,实验地概况见表 1。因根际是土壤-根系-微生物作用最明显的区域,进行着活跃的物质转化和流通以及动力学过程,直接影响着植物的生长发育、养分吸收利用、有益和有害微生物的存活与繁殖,本研究参照张守仕等^[25]方法,采用“抖落取样法”采集不同代数杉木根际土壤。先铲去落叶层,用土壤刀挖去上层覆土,剪下细根分枝,轻轻抖动,落下的松散土壤为非根际土;仍黏在根上的为根际土,用毛刷收集后装入自封袋。采用“S”形取样法,每个样方取 20 株接近平均胸径和树高的杉木根际土,再均匀混合为 1 份土壤样品。9 个样方共获得 9 个混合后的土壤样品。土样通过 2 mm 筛选后,一部分冷冻于-80 ℃冰箱;一部分在 4 ℃冰箱保存,用于土壤微生物多样性测定;另一部分风干用于土壤理化性质测定。

表 1 实验样地概况
Table 1 Characteristics of experimental plots

特征 Characteristics	第一代杉木 First Chinese fir rotation plantation (FCP)	第二代杉木 Second Chinese fir rotation plantation (SCP)	第三代杉木 Third Chinese fir rotation plantation (TCP)
海拔 Altitude/m	228—234	274—276	237—241
坡度 Slope	29°—30°	30°—31°	25°—28°
坡向 Slope aspect	ES38°—ES42°	ES33°—ES37°	ES38°—ES42°
平均胸径 Average diameter at breast height/cm	17.39	13.27	11.94
平均树高 Average height/m	13.61	10.52	9.03
林分密度 Stand density /(stem/ha)	930	945	945

1.3 土壤理化性质测定

土壤理化性质测定方法参照林大仪^[26]方法。用电位法测定土壤 pH(水:土壤为 2.5:1)。土壤全氮(TN)

用 $K_2Cr_2O_7-H_2SO_4$ 消化法测定,全磷 (TP) 采用 $H_2SO_4-KClO_4$ 消煮法测定,速效磷 (AP) 采用 $NaHCO_3$ 法测定,速效钾 (AK) 采用 CH_3COONH_4 —火焰光度计法测定,全钾 (TK) 采用 $NaOH$ 熔融—火焰光度计法测定,速效氮 (AN) 采用碱扩散法测定,总有机碳 (TOC) 采用 TOC-SSM-5000A 有机碳固体分析仪测定。

1.4 土壤微生物 T-RFLP 测定

T-RFLP 实验步骤参见牟文婷等^[27]、林伟铁等^[28]。采用 SDS-高盐缓冲溶液抽提法提取土壤微生物总 DNA,用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收纯化后,用带荧光标记的通用引物 8-27F 和 926-907R 进行其保守区目的片段扩增,PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,再用胶回收试剂盒纯化回收目的条带。因双酶切具有局限性,本研究采用 4 种限制性内切酶 (*Msp*I、*Hae*III、*Alu*I 和 *Afa*I),对纯化后的 PCR 产物进行酶切消化。酶切产物脱盐后与上样缓冲液和标准 Maker 混合,在 ABI 自动测序分析仪上进行毛细管电泳。因样品经酶切消化后产生的末端限制性片段 (T-RFs) 数量太多,本研究选择长度在 0—600 pb,荧光强度高于 50 的片段进行统计分析^[29-31]。由于 4 种酶切产生的 T-RFs 数量不同,在计算多样性指数时,统一选取产生 T-RFs 数量最多的 *Alu* I 酶切作为分析对象。图谱采用 GeneMakerV1.2 软件进行分析,并与数据库比对,鉴定末端限制性片段 (T-RFs) 对应的微生物类群。

1.5 数据处理

采用 Excel 2003 进行数据初处理和制图,采用 DPS7.05 与 SSPS13 统计软件进行方差分析、主成分

分析及多样性指数计算。其中,用 Duncan 法进行样本间差异显著性分析,多样性指数计算公式如下: Simpson 指数: $D = 1 - \sum (P_i)^2$; Shannon 指数: $H = -\sum (P_i) \log_2 P_i$; Evenness 指数: $E = H / H_{\max}$, $H_{\max} = \log_2(S)$ 。式中 P_i 表示相对峰面积,即各个峰面积占总峰面积的比值; S 表示丰富度指数,即 T-RFs 的个数。

2 结果与分析

2.1 不同栽植代数杉木根际土壤理化性质差异

土壤理化性质测定结果见表 2。除总有机碳 (TOC)、速效磷 (AP) 两个指标外,土壤的全氮 (TN)、速效氮 (AN)、全磷 (TP)、全钾 (TK)、速效钾 (AK) 均呈现出 FCP > SCP > TCP 的趋势,即连栽导致土壤养分和肥力逐年降低。其中全氮 (TN) 从 FCP 的 1.23 g/kg 下降到 TCP 的 0.96 g/kg,降幅达 21.95%;速效氮 (AN) 下降了 27.15%,全磷 (TP) 下降了 26.67%,全钾 (TK) 下降了 14.96%,速效钾下降了 12.35%,即杉木生长所需氮磷钾营养元素均呈下降趋势,其中氮元素下降尤其剧烈。从土壤碳氮比 (C/N) 来看,TCP 土壤最高而 FCP 土壤最低,整体呈现 FCP < SCP < TCP 趋势。

表 2 土壤主要理化性质

Table 2 The soil physical and chemical properties of different rotation Chinese fir plantations

理化性质 Physical and chemical properties	第一代杉木 FCP	第二代杉木 SCP	第三代杉木 TCP
土壤酸碱度 Soil pH	5.83±0.26a	5.64±0.33a	5.28±0.21a
总有机碳 Total organic carbon (TOC, g/kg)	23.54±0.30a	20.09±0.46c	21.37±0.15b
全氮 Total nitrogen (TN, g/kg)	1.23±0.01a	0.98±0.01b	0.96±0.01b
速效氮 Available nitrogen (AN, mg/kg)	35.84±0.88a	30.42±0.97b	26.11±1.28c
全磷 Total phosphorus (TP, g/kg)	0.45±0.01a	0.40±0.01a	0.33±0.01b
速效磷 Available phosphorus (AP, mg/kg)	3.28±0.11ab	3.56±0.14a	2.97±0.15b
全钾 Total potassium (TK, g/kg)	18.51±0.45a	17.38±0.29a	15.74±0.38b
速效钾 Available potassium (AK, mg/kg)	140.66±2.65a	125.17±3.17b	123.29±1.97b
碳氮比 C/N	19.13c	20.50b	22.26a

同一列不同的小写字母表示差异达 0.05 显著水平

2.2 不同栽植代数杉木根际土壤细菌 T-RFs 分析

分别利用 *Hae* III、*Msp* I、*Afa* I 和 *Alu* I 限制性内切酶,对扩增后的 16S rRNA 产物进行酶切消化。在 FCP

样品中找到有效 T-RF 片段为 *Hae* III 249 个、*Msp* I 187 个、*Afa* I 158 个、*Alu* I 288 个;在 SCP 样品中找到有效 T-RF 片段为 *Hae* III 179 个、*Msp* I 143 个、*Afa* I 113 个、*Alu* I 229 个;在 TCP 样品中找到有效 T-RF 片段为 *Hae* III 180 个、*Msp* I 123 个、*Afa* I 103 个、*Alu* I 204 个。总体而言,末端限制性片段数(T-RFs)在不同代数杉木土壤中呈现 FCP >SCP >TCP 趋势。相对 FCP 土壤而言,TCP 土壤中的 *Hae* III 酶切片段数降低了 27.71%,*Msp* I 酶切片段数降低了 34.22%;*Afa* I 酶切片段数降低了 34.81%;*Alu* I 酶切片段数降低了 29.17%。

2.3 不同栽植代数杉木根际土壤细菌群落多样性差异

根据 T-RFs 数量计算得到土壤细菌群落多样性(表 3)。不同多样性指数均表现为:杉木根际土壤细菌群落多样性随栽植代数增长而减少,呈现 FCP >SCP >TCP 趋势,与 T-RFs 片段数量变化趋势基本一致。Shannon-Weiner 指数显示 FCP 最高(5.79 ± 0.02),是 TCP(5.47 ± 0.03)的 105.85%倍,表明 FCP 土壤细菌多样性更高;Simpson 指数显示 FCP 最高(0.96 ± 0.02),是 TCP(0.83 ± 0.01)的 115.66%倍;均匀度指数显示 FCP 最高(0.78 ± 0.01),是 TCP(0.70 ± 0.01)的 114.43%倍。可见,多代连栽降低了杉木根际土壤细菌群落多样性。

表 3 不同连栽代数杉木根际土壤中细菌群落多样性指数

Table 3 The diversity index of soil bacteria community in different rotation Chinese fir plantations

样本 Sample	香浓维纳 Shannon-Weiner Index (H)	辛普森 Simpson index (D)	均匀度 Evenness index (E)
FCP	$5.79 \pm 0.02a$	$0.96 \pm 0.02a$	$0.78 \pm 0.01a$
SCP	$5.58 \pm 0.03b$	$0.91 \pm 0.01b$	$0.72 \pm 0.01b$
TCP	$5.47 \pm 0.03c$	$0.83 \pm 0.01c$	$0.70 \pm 0.01b$

同一列不同的小写字母表示差异达 0.05 显著水平

2.4 不同栽植代数杉木根际土壤细菌群落组成与结构

利用 GeneMarkerV1.2 并结合网上数据库(<http://wdec.nig.ac.jp/RDP/trflp/#program>)分析得到连栽杉木根际土壤细菌群落结构(图 1)。不同栽植代数杉木根际土壤共发现细菌 12 个门类,分别是:变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、浮霉菌门(*Planctomycetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、蓝藻门(*Cyanophyta*)、螺旋体门(*Spirochaete*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、热微菌门(*Thermomicrobia*)、柔膜菌门(*Tenericutes*)、梭杆菌门(*Fusobacteria*)、梭菌门(*Clostridium*)、纤维菌门(*Fiber*)、其他(others)。其中 FCP 土壤中,比例超过 10%的细菌门类分别是 *Firmicutes* (34.97%)、*Cyanophyta* (24.04%)、*Actinobacteria* (12.57%) 和 *Proteobacteria* (10.93%);SCP 土壤中,比例超过 10%的细菌门类分别是 *Cyanophyta* (31.51%)、*Firmicutes* (28.77%)、*Proteobacteria* (14.16%) 和 *Actinobacteria* (10.96%);TCP 土壤中,比例超过 10%的细菌门类分别是 *Cyanophyta* (30.56%)、*Firmicutes* (20.47%)、*Proteobacteria* (20.18%) 和 *Actinobacteria* (17.51%)。

此外,变形菌门在 TCP 土壤比例最高达 20.18%,在 FCP 和 SCP 土壤中分别为 10.93%和 14.61%,呈现随栽植代数增加而递增趋势;厚壁菌门在 FCP、SCP 和 TCP 土壤比例分别为 34.97%、28.77%和 20.47%,呈现随栽植代数增加而递减趋势;放线菌门在 TCP 土壤比例最高达 17.51%,而在 FCP 和 SCP 土壤中比例较为接近,分别为 12.57%和 10.96%。

2.5 不同栽植代数杉木根际土壤功能细菌变化

通过把酶切消化产生的 T-RFs 片段和标准数据库比对,将匹配到的细菌进行整理,并按照功能性分为 5 类:碳元素循环菌、硫元素循环菌、纤维降解与循环菌、氮元素循环菌及病原菌^[32-34],见表 4。由表 4 可知,碳元素循环菌包括黄杆菌属和嗜甲基菌属;硫元素循环菌包括硫化杆菌属;纤维降解和循环菌包括二氧化碳嗜纤维菌属、梭菌属和嗜纤维菌属;氮元素循环菌包括芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属及弗兰克氏菌属;致病菌包括梭杆菌属和梭菌属。与碳循环相关的柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)相对含量从一代到三代分别为 0.28%、0.16%和 0,呈下降趋势;甲基弯曲菌(*Methylophilus* LW3)相对含量亦呈下降趋势,可见连栽导致参与土壤碳循环的细菌数量减少。与氮元素有关的细菌相对含量,在连栽杉木土壤中均呈现下降趋势。在 FCP、SCP、TCP 土壤中,芽孢杆菌属的巴氏芽孢杆菌(*Bacillus pasteurii*)相对含量分别为 0.83%、0 和 0;类芽孢杆菌

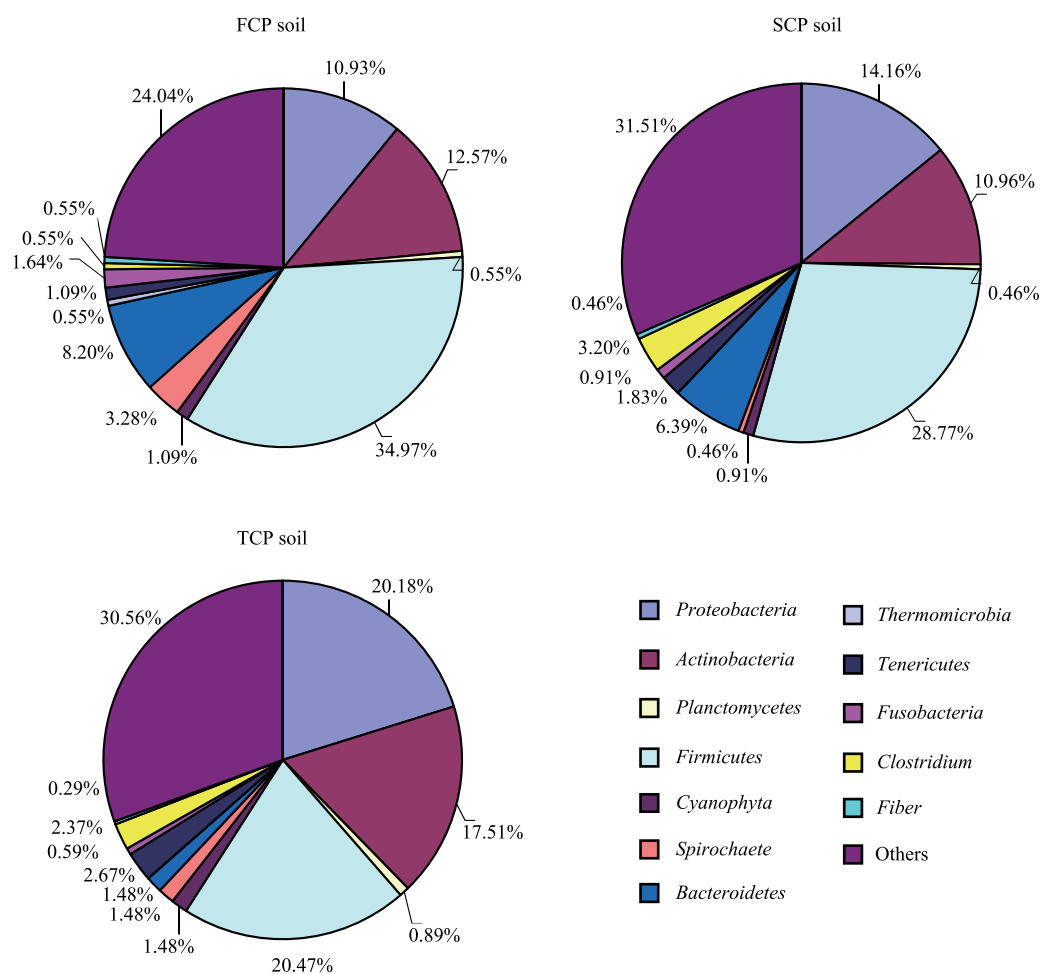


图1 连栽杉木根际土壤中细菌门类比例

Fig.1 The proportion of rhizospheric soils bacteria phyla in different rotation Chinese fir plantations

变形菌门 *Proteobacteria*; 放线菌门 *Actinobacteria*; 浮霉菌门 *Planctomycetes*; 厚壁菌门 *Firmicutes*; 蓝藻门 *Cyanophyta*; 螺旋体门 *Spirochaete*; 拟杆菌门 *Bacteroidetes*; 热微菌门 *Thermomicrobia*; 柔膜菌门 *Tenericutes*; 梭杆菌门 *Fusobacteria*; 梭菌门 *Clostridium*; 纤维菌门 *Fiber*; 其他 *others*

属的马阔里类芽孢杆菌 (*Paenibacillus macquariensis*) 相对含量分别为 0.25%、0.14% 和 0.06%; 弗兰克氏菌属的弗兰克氏菌 (*Frankiaceae*) 相对含量分别为 0.45%、0.30% 和 0.16%。

与硫循环有关的热氧化硫化杆菌 (*Sulfobacillus thermosulfidooxidans*) 和氧化二硫化物硫化杆菌 (*Sulfobacillus disulfidooxidans*) 相对含量呈现上升趋势, 反映出连栽在一定程度上导致参与硫元素循环的细菌数量增加。纤维降解是土壤养分循环的重要一环, 与纤维降解有关的二氧化碳嗜纤维菌属 (*Capnocytophaga*) 和嗜纤维菌属 (*Cytophaga*) 相对含量均有所增长但幅度不大, 可见连栽对杉木根际土壤纤维降解菌影响不明显。病原菌鉴定出棒杆菌属 1 种和梭菌属 2 种, 在连栽杉木土壤中均呈现上升趋势。在 FCP、SCP、TCP 土壤中, 棒杆菌属的解葡萄糖苷棒杆菌 (*Corynebacterium genitalium*) 相对含量分别为 5.13%、5.57% 和 7.46%; 梭菌属的产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 相对含量分别为 0.13%、0.33% 和 0.54%; 溶组织梭菌 (*Clostridium histolyticum*) 相对含量分别为 3.63%、4.33% 和 5.01%。

2.6 土壤理化性质与微生物群落多样性相关性分析

连栽杉木土壤理化性质和微生物多样性相关性分析见表 5。由表 5 可知, 除 pH 外, 其他所有多样性指数均与土壤化学性质呈相关关系。总有机碳 (TOC)、速效氮 (AN) 与土壤微生物群落多样性呈极显著相关。相反, 碳氮比 (C/N) 与土壤微生物群落多样性呈极显著负相关。此外, 全氮 (TN) 与 Simpson 指数、Shannon-Weiner 指数、均匀度指数显著相关; 全磷 (TP) 与 Shannon-Weiner 指数、均匀度指数显著相关; 速效磷 (AP) 与

Simpson 指数极显著相关;全钾(TK)与 Simpson 指数显著相关;速效钾(AK)与所有指数相关性不显著。

表 4 不同栽植代数杉木根际土壤功能菌相对含量分析
Table 4 Changes in the relative content of functional bacteria in different rotation Chinese fir plantations

功能分类 Functions	种名 Species	属名 Genus	末端限制性 片段数 T-RFs	相对含量 Relative content/%		
				FCP	SCP	TCP
碳循环 Carbon cycling	柱状黄杆菌 <i>Flavobacterium columnare</i>	黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i>	71	0.28a	0.16b	0c
	甲基弯曲菌 <i>Methylophilus</i> LW3	噬甲基菌属 <i>Methylophilus</i>	143	1.3a	1.1b	0.74c
硫循环 Sulfur cycling	热氧化硫化杆菌 <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	硫化杆菌属 <i>Sulfobacillus</i>	229	0.67c	0.78b	1.35a
	氧化二硫化物硫化杆菌 <i>Sulfobacillus disulfidooxidans</i>	硫化杆菌属 <i>Sulfobacillus</i>	232	1.91c	2.15a	2.09b
纤维降解 Cellulose degradation	黄褐二氧化碳噬纤维菌 <i>Capnocytophaga ochracea</i>	二氧化碳噬纤维菌 属 <i>Capnocytophaga</i>	200	0.3c	0.4b	0.58a
	解多糖梭菌 <i>Clostridium polysaccharolyticum</i>	梭菌属 <i>Clostridium</i>	160	0.64a	0.28b	0.32b
	生孢噬纤维菌 <i>Sporocytophaga</i>	噬纤维菌属 <i>Cytophaga</i>	72	0b	0.12a	0.13a
氮循环 Nitrogen cycling	巴氏芽孢杆菌 <i>Bacillus pasteurii</i>	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	248	0.83a	0b	0b
	马阔里类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus macquariensis</i>	类芽孢杆菌属 <i>Paenibacillus</i>	76	0.25a	0.14b	0.06c
	弗兰克氏菌 <i>Frankiaceae</i>	弗兰克氏菌属 <i>Frankia</i>	118	0.45a	0.3b	0.16c
病原菌 Pathogens	解葡萄糖苷棒杆菌 <i>Corynebacterium genitalium</i>	棒杆菌属 <i>Corynebacterium</i>	237	5.13c	5.57b	7.46a
	产气荚膜梭菌 <i>Clostridium perfringens</i>	梭菌属 <i>Clostridium</i>	67	0.13c	0.33b	0.54a
	溶组织梭菌 <i>Clostridium histolyticum</i>	梭菌属 <i>Clostridium</i>	239	3.63c	4.33b	5.01a

同一列不同的小写字母表示差异达 0.05 显著水平

表 5 土壤理化性质与微生物群落多样性相关分析 (n=9)
Table 5 Correlation analysis of microbial community diversity and soil physical and chemical properties

土壤理化性质 Soil physical and chemical properties	辛普森 Simpson index (D)	香浓维纳 Shannon-Weiner Index (H)	均匀度 Evenness index (E)
pH	-0.395	-0.347	-0.384
总有机碳 TOC/(g/kg)	0.948 **	0.977 **	0.965 **
全氮 TN/(g/kg)	0.859 *	0.8062 *	0.725
速效氮 AN(mg/kg)	0.953 **	0.937 **	0.918 **
全磷 TP/(g/kg)	0.734	0.887 *	0.891 *
速效磷 AP/(mg/kg)	0.911 **	0.766	0.721
全钾 TK/(mg/kg)	0.862 *	0.810	0.715
速效钾 AK/(mg/kg)	0.537	0.682	0.705
碳氮比 C/N	-0.934 **	-0.927 **	-0.919 **

* :P<0.05,显著相关; * * :P<0.01,极显著相关

3 结论与讨论

3.1 连栽对杉木根际土壤微生物多样性的影响

除土壤 pH 外,土壤养分含量指标均与微生物群落多样性相关,且 TOC、AN 与土壤微生物群落多样性指

数呈极显著相关,表明土壤有机质及碳氮含量会影响土壤微生物群落多样性,这和钟文辉等^[35]提出的观点一致。土壤 TN 与 Simpson 指数、Shannon-Weiner 指数、均匀度指数显著相关;TP 与 Shannon 指数、均匀度指数显著相关;TK 与 Simpson 显著相关,可见土壤养分变化导致微生物群落多样性产生相应变化。C/N 指数作为土壤重要的指标,影响植物的生长和土壤微生物的平衡。本研究发现土壤微生物群落多样性与 C/N 显著负相关,与 Izumi 等^[36]研究结果相一致。SCP 和 TCP 土壤 C/N 显著高于 FCP,较高的碳氮比可导致细菌代谢不平衡,从而抑制细菌活性,导致细菌群落多样性降低。

3.2 连栽对杉木根际土壤细菌群落结构的影响

本研究采用 T-RFLP 技术共鉴定出细菌门类 12 类,其中占据优势的三大类细菌门类是变形菌门、放线菌门和厚壁菌门。土壤细菌数量和群落多样性从一代到三代呈现下降趋势,与部分学者的研究结果相似。如杜国坚等^[37]在浙江开化的杉木人工林连栽试验表明,连栽土壤微生物总数比第一代减少 23.4%,其中细菌、放线菌分别减少 24.7%和 34.0%,真菌却增加 10.4%。李茂延等^[38]采用经典土壤微生物平板计数法对湖南会同森林生态实验站的连栽杉木根际土壤进行了分析,结果发现连栽杉木根际土壤中细菌和放线菌数量呈现明显减少。但上述实验采用传统的微生物平板培养法,且环境中 99%的微生物都是不可或者难以培养的,因此传统的微生物平板培养法存在重大缺陷。T-RFLP 方法具有高通量、可重复性及快速性等优势,我们采用该技术验证并拓展了前人开展的初步研究结论,取得了理想结果。然而,T-RFLP 技术属于半定量研究,对群落特征分析仍存在一定程度的偏差,精确性略差。在后续研究中,我们将综合高通量测序、实时定量 PCR 技术,进一步深入开展连栽杉木根际土壤微生物群落变化研究。

3.3 连栽对杉木根际土壤功能细菌的影响

将细菌按照功能分类后,本研究发现碳循环功能菌和氮循环功能菌含量在连栽杉木土壤中均呈现下降趋势。其中,柱状黄杆菌对土壤碳转化起关键作用;甲基弯曲菌是兼有甲基营养和甲烷营养特性的革兰氏阴性菌,可利用葡萄糖或其他复杂营养物作碳源;芽孢杆菌属能产生芽孢,从而适应恶劣或极端环境,提高微生物对环境的抗性,可利用无机氮作为生长繁殖的氮源,能够促进硝化作用、氨化作用^[39];类芽孢杆菌属能产生内生孢子,影响病原菌的细胞壁和细胞膜的结构,干扰蛋白互作,从而达到抵抗病原菌的作用^[40]。弗兰克氏菌属作为一种根瘤菌,和寄主植株体产生互利共生关系,该属细菌具有固氮作用,能有效促进植物生长^[41]。病原菌鉴定出棒杆菌属和梭菌属,均广泛分布于植物土壤中,通常能够化能自养或者异养,且分解糖类和蛋白质类物质后产生混合有机酸和醇类物质甚至毒素,从而对植物体生长发育及有益菌的群落结构造成不良影响^[42]。病原菌数量随栽植代数增加逐渐增多,这种现象可能与连栽后杉木根系分泌化感物质有关。化感物质可影响根际微生物的正常生长发育,甚至改变土壤微生物群落结构^[43-45]。张新慧等^[46]研究发现,化感物质 2,4-二叔丁基苯酚在特定浓度下会抑制啤酒花(*Humulus lupulus*)根际土壤细菌和真菌,造成土壤中微生物数量减少,多样性降低;李瑞琴等^[47]在对马铃薯(*Solanum tuberosum*)连栽化感物质的研究发现,马铃薯连作根际土壤有 2 种病原菌呈现上升趋势,鉴定为镰刀属真菌迅速繁殖造成产量下降。

土壤微生物对于森林生态系统的物质循环和能量流动至关重要,不同营林管理措施将会改变土壤微生物群落结构和功能,从而间接影响植物生长。我们推测杉木单一化多代连栽使得植物-土壤生态系统结构简单化、自我调节能力下降。本研究证实了由于杉木多代连栽,确实导致根际微生物群落结构发生了显著变化。然而,连栽障碍形成原因是复杂的,导致其发生的因素是相互关联又相互影响的,是植物-土壤-微生物系统内多种胁迫因子综合作用的结果。此外,植物体在整个生长周期中会释放大量的化学物质,是介导植物与土壤进行物质交换和能量流动的重要载体物质,也是构成植物不同根际微生态特征的关键因素,是植物-微生物互作关系建立的基础。越来越多的学者研究发现,化感物质对根际微生物群落结构有选择塑造作用,不同植物体的根际微生物群落结构具有其独特性与代表性^[48-49];反过来,根际微生物群落结构变化对植物化感物质释放、土壤营养循环、能量流动、信息传递有重要影响,进而影响植物生长发育过程^[50]。前人研究发现,杉木多代连栽地中存在多酚类物质积累,根际土及杉木各器官中均存在酚酸类化感物质^[4,18]。化感物质在根际

土壤中长期大量累积,是否抑制了土壤有益菌的生长,促进了致病菌的繁殖,从而使土壤生态系统陷入恶性循环?此外,土壤作为一个极其复杂的“黑匣子”,杉木根际土壤化感物质如何介导土壤微生物结构发生变化,哪些化感物质起主导作用以及关键的特异微生物如何在连栽障碍形成的根际生态学过程中扮演重要角色,导致杉木土壤生长环境灾变,仍需进一步开展深入研究。

参考文献 (References):

- [1] 李红军,周国英,吴毅,闫法领,董文统,汤钦冷.杉木人工林化感作用研究综述.中南林业科技大学学报,2013,33(1):31-34,89-89.
- [2] 俞新妥.杉木人工林地力和养分循环研究进展.福建林学院学报,1992,12(3):264-276.
- [3] 盛炜彤,范少辉.杉木人工林长期生产力保持机制研究.北京:科学出版社,2005:115-120.
- [4] Chen L C, Wang S L, Wang P, Kong C H. Autoinhibition and soil allelochemical (cyclic dipeptide) levels in replanted Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) plantations. Plant and Soil, 2014, 374(1/2): 793-801.
- [5] 马祥庆.杉木人工林连栽生产力下降研究进展.福建林学院学报,2001,21(4):380-384.
- [6] 杨玉盛,何宗明,陈光水,谢锦升,俞新妥.杉木多代连栽后土壤肥力变化.土壤与环境,2001,10(1):33-38.
- [7] 林思祖,杜玲,曹光球.化感作用在林业中的研究进展及应用前景.福建林学院学报,2002,22(2):184-188.
- [8] 范少辉,盛炜彤,马祥庆,林开敏,卓仕安,张小泉.多代连栽对不同发育阶段杉木人工林生产力的影响.林业科学研究,2003,16(5):560-567.
- [9] 田大伦,杨超,闰文德,项文化,方晰,梁小翠.连栽杉木林不同生育阶段林下植被生物量.林业科学,2011,47(5):145-149.
- [10] Asadu C L A, Dixon A G O. Soil nutrient and cassava yield variations under continuous cultivation of three crop mixtures in south-eastern Nigeria. Tropical Agriculture, 2005, 82(1/2): 1-7.
- [11] Vikane J H, Vandvik V, Vetaas O R. Invasion of *Calluna* heath by native and non-native conifers: the role of succession, disturbance and allelopathy. Plant Ecology, 2013, 214(7): 975-985.
- [12] Weston L A, Alsaadawi I S, Baerson S R. Sorghum allelopathy—from ecosystem to molecule. Journal of Chemical Ecology, 2013, 39(2): 142-153.
- [13] Jie W G, Liu X R, Cai B Y. Diversity of rhizosphere soil arbuscular mycorrhizal Fungi in various soybean cultivars under different continuous cropping regimes. PLoS One, 2013, 8(8): e72898.
- [14] Zhang W, Long X Q, Huo X D, Chen Y F, Lou K. 16S rRNA-based PCR-DGGE analysis of actinomycete communities in fields with continuous cotton cropping in Xinjiang, China. Microbial Ecology, 2013, 66(2): 385-393.
- [15] 王忠营.杉木人工林对施肥的响应[D].福州:福建农林大学,2008.
- [16] 吴鹏飞. P 高效利用杉木无性系适应环境磷胁迫的机制研究[D].福州:福建农林大学,2009.
- [17] 马祥庆,刘爱琴,黄宝龙.杉木人工林自毒作用研究.南京林业大学学报:自然科学版,2000,24(1):2-16.
- [18] 陈龙池,汪思龙.杉木根系分泌物化感作用研究.生态学报,2003,23(2):393-398.
- [19] 林文雄,陈婷,周明明.农业生态学的新视野.中国生态农业学报,2012,20(3):253-264.
- [20] Wu Z Y, Li J J, Zheng J, Liu J F, Liu S Y, Lin W X, Wu C Z. Soil microbial community structure and catabolic activity are significantly degenerated in successive rotations of Chinese fir plantations. Scientific Reports, 2017, 7(1): 6691.
- [21] Wu Z Y, Haack S E, Lin W X, Li B L, Wu L K, Fang C X, Zhang Z X. Soil microbial community structure and metabolic activity of *Pinus elliottii* plantations across different stand ages in a subtropical area. PLoS One, 2015, 10(8): e0135354.
- [22] 李秋红,吴凤芝,景芳毅.套作对黄瓜根际土壤细菌群落结构的多样性影响.土壤通报,2010,41(1):47-52.
- [23] 杨亚东,张明才,胡君蔚,张凯,胡跃高,曾昭海.施氮肥对华北平原土壤氨氧化细菌和古菌数量及群落结构的影响.生态学报,2017,37(11):3636-3646.
- [24] 郑李军,傅明辉.水葫芦根际细菌群落结构多样性分析.微生物学通报,2015,42(11):2115-2125.
- [25] 张守仕,谢克英,乔宝营,张娜.果树根际土壤取样分析技术研究.落叶果树,2015,47(6):25-27.
- [26] 林大仪.土壤学实验指导.北京:中国林业出版社,2004:188-192.
- [27] 牟文婷,张涛,孙建,曾军,徐赢华,吴尊凤,胡雯,姜恺.新疆特殊生境岩石内生细菌末端限制性片段长度多态性技术分析.微生物学报,2012,52(3):381-388.
- [28] 林炜铁,朱雅楠.末端限制性片段长度多态性技术分析硝化细菌微生物多样性.生物工程学报,2010,26(4):483-488.
- [29] 李红.末端限制性酶切片段长度多态性分析技术进展.安徽师范大学学报:自然科学版,2006,29(6):582-585.
- [30] Edel-Hermann V, Dreumont C, Pérez-Piqueres A, Steinberg C. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal RNA genes to assess changes in fungal community structure in soils. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(3): 397-404.

- [31] Bastias B A, Anderson I C, Xu Z, Cairney J W G. RNA- and DNA-based profiling of soil fungal communities in a native Australian eucalypt forest and adjacent *Pinus elliotii* plantation. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(12): 3108-3114.
- [32] 侯海军, 秦红灵, 陈春兰, 魏文学. 土壤氮循环微生物过程的分子生态学研究进展. *农业现代化研究*, 2014, 35(5): 588-594.
- [33] 贺纪正, 张丽梅. 土壤氮素转化的关键微生物过程及机制. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 98-108.
- [34] Berendsen R L, Pieterse C M J, Bakker P A H M. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(8): 478-486.
- [35] 钟文辉, 蔡祖聪. 土壤管理措施及环境因素对土壤微生物多样性影响研究进展. *生物多样性*, 2004, 12(4): 456-465.
- [36] Izumi H, Cairney J W G, Killham K, Moore E, Alexander I J, Anderson I C. Bacteria associated with ectomycorrhizas of slash pine (*Pinus elliotii*) in south-eastern Queensland, Australia. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 282(2): 196-204.
- [37] 杜国坚, 洪利兴, 陈福祥, 杨演, 戴慈荣, 刘春芳. 杉木连栽地力衰退效应研究. *林业工程学报*, 2001, 15(4): 11-13.
- [38] 李延茂, 胡江春, 张晶, 汪思龙, 王书锦. 杉木连栽土壤微生物多样性的比较研究. *应用生态学报*, 2005, 16(7): 1275-1278.
- [39] 李国庆, 郭华春. 连作对马铃薯根际土壤细菌群落结构的影响. *分子植物育种*, 2014, 12(5): 914-928.
- [40] 鲁红学, 周赅. 类芽孢杆菌在植物病害防治和环境治理中的应用研究进展. *安徽农业科学*, 2008, 36(30): 13244-13247.
- [41] 张维, 张利平, 杨润蕾, 吕志堂. 几株弗兰克氏菌的固氮活性. *河北大学学报: 自然科学版*, 2006, 26(1): 21-24.
- [42] 王祖忠, 王朝阳, 张迪骏, 司开学, 董丽莎, 张红燕, 崔晨茜, 韩姣姣, 周君, 苏秀榕. 宁波沿海陆源排污口弓形杆菌属 (*Arobacter* sp.) 和梭菌属 (*Clostridium* sp.) 的分布特点. *海洋与湖沼*, 2016, 47(4): 864-867.
- [43] West P W. *Growing Plantation Forests*. Berlin: Springer-Verlag, 2006: 82-90.
- [44] Wang Q K, Wang S L, Zhang J W. Assessing the effects of vegetation types on carbon storage fifteen years after reforestation on a Chinese fir site. *Forest Ecology and Management*, 2009, 258(7): 1437-1441.
- [45] 夏志超, 孔垂华, 王朋, 陈龙池, 汪思龙. 杉木人工林土壤微生物群落结构特征. *应用生态学报*, 2012, 23(8): 2135-2140.
- [46] 张新慧, 王霞霞, 张恩和. 2, 4-二叔丁基苯酚对啤酒花根际土壤微生物数量的化感效应研究. *中国生态农业学报*, 2008, 16(6): 1606-1608.
- [47] 李瑞琴, 刘星, 邱慧珍, 张文明, 张春红, 王蒂, 张俊莲, 沈其荣. 连作马铃薯根际干腐病优势病原菌荧光定量 PCR 快速检测及在根际的动态变化. *草业学报*, 2013, 22(6): 239-248.
- [48] Paterson E, Gebbing T, Abel C, Sim A, Telfer G. Rhizodeposition shapes rhizosphere microbial community structure in organic soil. *New Phytologist*, 2007, 173(3): 600-610.
- [49] Wu F Z, Wang X Z, Xue C Y. Effect of cinnamic acid on soil microbial characteristics in the cucumber rhizosphere. *European Journal of Soil Biology*, 2009, 45(4): 356-362.
- [50] Eisenhauer N, Scheu S, Jousset A. Bacterial diversity stabilizes community productivity. *PLoS One*, 2012, 7(3): e34517.