

DOI: 10.5846/stxb201808141733

杨广容, 马燕, 蒋宾, 马会杰, 谢瑾, 吕才有, 李永梅. 基于 16S rDNA 测序对茶园土壤细菌群落多样性的研究. 生态学报, 2019, 39(22): - .

Yang G R, Ma Y, Jiang B, Ma H J, Xie J, Lü C Y, Li Y M. Analysis of the bacterial community and diversity in tea plantation soil via 16S rDNA sequencing. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(22): - .

基于 16S rDNA 测序对茶园土壤细菌群落多样性的研究

杨广容¹, 马 燕¹, 蒋 宾¹, 马会杰¹, 谢 瑾¹, 吕才有¹, 李永梅^{2,*}

¹ 云南农业大学龙润普洱茶学院, 昆明 650201

² 云南农业大学资源与环境学院, 昆明 650201

摘要: 土壤细菌群落组成和多样性, 对茶园土壤生态系统健康和肥力可持续性具有的重要理论意义。本文利用 Illumina 高通量测序技术测定分析 16S rDNA, 研究云南景迈山、布朗山和南糯山的现代茶园、古茶园(林)和森林土壤的细菌群落结构与多样性。结果表明: 古茶园土壤细菌的丰度和多样性高于现代茶园及森林; 研究土壤样本细菌共分属 47 个菌门、89 个目, 其中变形菌门、酸杆菌门、放线菌门、厚壁菌门与拟杆菌门是优势类群, 它们在森林、现代茶园和古茶园土壤中的相对丰度累计分别达 91.86%、82.48% 和 77.08%; 伯克霍尔德氏菌目、根瘤菌目是优势菌群, 其平均丰度分别达 13.91% 和 8.17%, 黄单胞菌目、红螺菌目、芽孢杆菌目、放线菌目和拟杆菌目等 12 个目的丰度较高, 达 2% 以上; PCA 分析表明: 森林、现代茶园和古茶园土壤的细菌群落结构差异明显, 除景迈山外, 主要优势细菌丰度依次为: 古茶园 > 现代茶园 > 森林, 古茶园土壤细菌多样性有增强趋势。

关键词: 茶园土壤; 细菌; 宏基因组; 高通量测序; 多样性

Analysis of the bacterial community and diversity in tea plantation soil via 16S rDNA sequencing

YANG Guangrong¹, MA Yan¹, JIANG Bin¹, MA Huijie¹, XIE Jin¹, LV Caiyou¹, LI Yongmei^{2,*}

¹ College of Longrun Pu-erh Tea, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

² College of Resources and Environment, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract: The structure and diversity of soil bacterial communities in tea plantation soil is important for maintaining a healthy, fertile, and sustainable soil ecosystem. In the present study, soil bacterial communities and their diversity in ancient and modern tea plantations and forests in Jingmai, Bulang, and Nannuo mountains in the Yunnan Province were analyzed via Illumina sequencing of 16S rDNA. Soil bacterial abundance and diversity in ancient tea plantations were higher than those in modern tea plantations and forests. Operational taxonomic units (OTUs) were assigned to 47 phyla and 89 orders. Furthermore, Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, and Bacteroidetes were the dominant phyla with relative abundances of 91.86%, 82.48% and 77.08% in forest, modern, and ancient tea plantations, respectively. At the order level, both Burkholderiales and Rhizobiales were dominant with average abundances of 13.91% and 8.17%, respectively. Moreover, the relative abundance of twelve orders including Xanthomonadales, Rhodospirillales, Bacillales, Actinomycetales, and Bacteroidales, etc., were greater than 2%. Principal component analysis revealed that soil bacterial community structures among forest, modern, and ancient tea plantations were significantly different. With the exception of the Jingmai mountain, the abundances of the primarily dominant soil bacteria were in order of ancient tea

基金项目: 国家自然科学基金 (NSFC:31660225); 国家自然科学基金 (NSFC:41461059) 和国家现代农业茶叶产业技术体系建设专项 (CARS-19)

收稿日期: 2018-08-14; **网络出版日期:** 2019-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: youngmaylee @ 126.com

plantation > modern tea plantation > forest. Thus, the soil bacterial diversity in ancient tea plantations showed an increasing trend.

Key Words: tea garden soil; bacterial; metagenomics; high-throughput sequencing; diversity

茶树[*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]是我国南方重要多年生木本经济作物,2016年,中国茶叶种植面积达 $293.3 \times 10^4 \text{ hm}^2$, 约占全球植茶面积的 60% 以上^[1]。茶园土壤环境质量是影响茶叶产量和品质的重要因素之一^[2]。茶树在长期连作栽培中不断适应热带和亚热带气候及土壤环境条件,逐渐进化形成了其特有的土壤生态环境特征,如喜温怕冷、喜酸怕碱、喜湿怕涝、喜铵厌硝、聚铝嫌钙、忌氯富锰等。茶树作为典型的喜酸作物,能在 pH 3.2—6.8 的土壤中生长^[3-4]。茶园土壤由于茶树长期单一化种植,作物根系分泌物多样性低,施肥、修剪和茶树凋落物归还等原因,致使茶园土壤随茶树种植时间延长而酸化^[5-6]。

土壤微生物是土壤中最活跃且多样性最为丰富的组分之一,其群落的组成结构、活性及多样性很大程度上决定了土壤中的营养元素循环和土壤的肥力,是反映土壤质量及评价土壤生态系统可持续性的重要生物学指标,对土壤养分、结构、稳定性上具有重要的影响^[5-8]。同时,植被类型和多样性、土壤水分、pH、土壤类型及其理化性状、土地利用方式、有机质、有效磷和速效钾均显著影响微生物群落结构^[6,9-11]。如 Lauber 等认为 pH 值是决定土壤微生物群落结构的主要因素^[12],有研究表明在 pH 小于 6.5 的土壤中,土壤微生物多样性随着 pH 的降低随之降低^[13]。已有学者证实,茶园土壤微生物及细菌群落结构受多种生态因子的影响,如:茶树品种及树龄、海拔、季节、施肥及修剪等^[5,14-17]。

王秀青等^[18]对茶园土壤微生物细菌、真菌和放线菌纯培养研究表明,茶园土壤微生物数量普遍高于森林土壤,并且现代茶园微生物的总数量高于古茶园。细菌是土壤中数量最多、分布最广的微生物,它占土壤微生物总数的 70%—90%,其干重约占土壤有机质的 1%^[4]。由于绝大多数土壤微生物难以培养分离,导致传统研究方法获得的土壤微生物信息较少,不能真实反映土壤微生物的群落结构及功能。采用现代分子生物学研究手段,从土壤中提取微生物宏基因组总 DNA,并通过 PCR 扩增及测序,准确鉴别土壤细菌群落结构及多样性^[3-4,19-21],能有效克服传统平板培养计数法的缺陷,也是目前土壤微生物研究的重要内容。本研究以 3 个古茶园土壤为研究对象,分别以森林和现代茶园土壤为对照,通过直接提取土壤微生物基因组总 DNA,采用 16S rDNA 基因的通用引物 PCR 扩增及 Illumina 平台 Miseq 高通量测序技术,鉴定和比较森林、现代茶园和古茶园土壤细菌的群落结构多样性与差异,为深入了解茶园土壤细菌种群结构演变规律、调节茶园土壤环境质量和改善土壤管理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 土壤采样与处理

1.1.1 采样茶园位点概况

选择云南西双版纳州勐海县代表性古茶山景迈山(大平掌)、布朗山(贺开村)和南糯山(半坡竹林小组)的现代茶园(J2、B2 和 N2)、古茶园(J3、B3 和 N3)及其附近森林(J1、B1 和 N1)。各茶园均为生态茶园,除景迈山和布朗山的现代茶园每年进行土壤翻耕外,其他茶园均处于免耕状况,所有茶园栽培管理均为不施肥、不施农药的有机茶园或生态茶园。采样茶园的生态环境概况见表 1。

1.1.2 土样采集与处理

土样采集时间为 2015 年 5 月中旬,云南春茶采摘末期。根据采样茶园的地形条件,在 $20 \times 20 \text{ m}$ 区域内,采用 3—5 点混合取样法,每个采样点沿着茶树树冠边缘垂直投影取样,适当清除地表的枯枝落叶,用土钻采集 0—20 cm 表层土壤,混合均匀,剔除杂质,形成一个土样,每一茶园重复取 3 个土样。一部分土样(约 20 g)装入无菌袋及时用液氮冷冻后 -86°C 保存,供分子生物学研究,另一部分土样(约 500 g)24 小时内室内自然风

干,过 2 mm 或 0.15 mm 筛用于土壤 pH 值、阳离子交换量(CEC)、有机质(SOM)、全氮(TN)、全磷(TP)、全钾(TK)、有效氮(碱解氮)、速效磷(Olsen-P)、速效钾及土壤矿质元素有效性钙镁铁铜锌锰的测定。

表 1 茶园采样位点基本情况

Table 1 The basic situation of soil sampling points of tea gardens									
茶园类型 Tea garden type	景迈山 Jingmai Mountain			布朗山 Bulang Mountain			南糯山 Nannuo Mountain		
	森林/J1	现代茶园/J2	古茶园/J3	森林/B1	现代茶园/B2	古茶园/B3	森林/N1	现代茶园/N2	古茶园/N3
植茶年龄 Ages of tea planted	/	— 50 年	> 1300 年	/	> 60 年	> 300 年	/	5—10 年	500—800 年
经度 E Longitude	100°02′	100°00′	100°00′	100°09′	100°29′	100°29′	100°36′	100°36′	100°36′
纬度 N Latitude	22°12′	22°12′	22°11′	21°48′	21°48′	21°47′	21°56′	21°56′	21°56′
海拔(m) Altitude	1416—1422	1601—1603	1594—1600	1664—1670	1594—1597	1748—1753	1577—1582	1576—1579	1553—1559
坡度 Slope	18—32°	19—24°	12—14°	20—22°	14—24°	18—30°	35—38°	5—10°	35—40°
备注		万亩有机台地茶园遮阴树很少	林下栽培型古茶园、成片集中分布,但不成行		老茶树树冠已经过台刈更新,茶园土壤偏沙质、偏干燥	林下栽培型古茶园、成片集中分布,但不成行,遮阴树很少		茶树为林下较平坦地方随机种植、分布稀疏,不成行	林下栽培型古茶园、成片集中分布,但不成行

1.2 土壤特性及养分含量测定

1.2.1 土壤 pH 值:采用 1:2.5 土水(质量)比,用玻璃复合电极法测定。

1.2.2 阳离子交换量(cation exchange capacity,CEC)用乙酸铵交换提取—蒸馏法。

1.2.3 土壤有机质(soil organic matter,SOM)用重铬酸钾容量法—外加热法。

1.2.4 全氮(total nitrogen,TN)用浓硫酸-双氧水消煮—凯氏定氮法;全磷(total phosphorous,TP)用硫酸-双氧水消煮—钼锑抗比色法;全钾(total potassium,TK)浓硫酸-双氧水消煮—火焰光度法。

1.2.5 有效氮磷钾:碱解氮(alkali-hydrolyzable nitrogen)用 1 mol/L NaOH 碱解扩散法;速效磷即 Olsen-P 用 0.5 mol/L NaHCO₃溶液浸提—钼蓝比色法;速效钾(available potassium)用乙酸铵浸提—火焰光度法。

1.2.6 土壤有效性铜(Cu)、锌(Zn)、锰(Mn)用火焰原子吸收分光光度计法^[22]。

各土壤样品的理化性状见表 2。

表 2 古茶园与现代茶园土壤基本化学性质比较(平均值±标准偏差,n=3)

Table 2 The soil physical and chemical properties(means ± standard deviation, n=3)									
茶园类型 Tea garden type	景迈山 Jingmai Mountain			布朗山 Bulang Mountain			南糯山 Nannuo Mountain		
	森林/J1	现代茶园/J2	古茶园/J3	森林/B1	现代茶园/B2	古茶园/B3	森林/N1	现代茶园/N2	古茶园/N3
pH	4.43±0.01B	4.64±0.02A	4.30±0.06C	4.86±0.01A	4.65±0.01C	4.75±0.03B	4.55±0.03C	4.75±0.03A	4.64±0.01B
CEC(cmol/kg)	9.28±0.02B	8.43±0.06C	10.46±0.03A	18.41±0.06A	6.54±0.04C	12.81±0.28B	20.37±0.01A	14.61±0.29C	16.65±0.29B
SOM(g/kg)	70.13±0.42B	58.39±0.27C	87.34±0.75 A	96.99±2.72A	55.40±2.04B	101.18±1.05A	85.19±1.16C	100.28±0.42B	104.06±0.96A
TN(g/kg)	1.36±0.01B	1.15±0.02C	1.55±0.03A	1.76±0.02B	0.84±0.01C	1.96±0.01A	2.07±0.01B	1.88±0.02C	2.44±0.01A
碱解氮(mg/kg)	112.07±2.23b	116.08±1.39a	110.03±2.05b	122.35±1.89B	87.14±1.64C	144.97±0.77A	150.69±0.81B	134.26±2.41C	172.03±1.45A
TP(g/kg)	0.19±0.01C	0.34±0.01B	0.54±0.01A	0.86±0.06A	0.29±0.06C	0.63±0.06B	0.92±0.01A	0.46±0.00C	0.71±0.01B
Olsen-P(mg/kg)	7.05±0.41C	10.86±0.49B	19.19±0.62A	45.68±0.58A	7.63±0.23C	20.81±0.11B	48.65±0.49A	16.03±0.19C	20.42±1.18B
TK(g/kg)	1.62±0.35B	6.30±0.00 A	2.43±0.35B	12.61±0.36A	7.73±0.35C	9.15±0.35B	3.04±0.35C	8.13±0.00A	4.67±0.35B
有效钾(mg/kg)	104.12±2.33B	145.77±2.33A	106.81±4.03B	359.36±0.24A	151.14±4.03C	227.71±4.03B	114.87±4.03C	210.25±2.33A	137.71±2.33B
有效铜(mg/kg)	0.37±0.01C	1.19±0.02A	0.56±0.01B	0.48±0.01A	0.43±0.02C	0.46±0.01B	0.62±0.01B	0.63±0.01B	1.02±0.01A
有效锌(mg/kg)	1.14±0.01A	0.64±0.01C	0.74±0.01B	0.65±0.02C	0.80±0.01B	1.49±0.01A	0.81±0.01B	0.85±0.01A	0.78±0.01C
有效锰(mg/kg)	2.88±0.19A	2.03±0.02B	3.01±0.03A	1.20±0.04C	2.64±0.04A	2.21±0.01B	8.55±0.01A	1.53±0.02C	4.57±0.01B
C:N	29.86±0.16B	29.39±0.52B	32.61±0.59A	31.99±0.65B	38.06±1.14A	29.88±0.09B	23.82±0.43C	30.94±0.39 A	26.89±0.16 B

不同大、小写字母表示同一茶山不同土壤间的差异极显著($P < 0.01$)和差异显著($P < 0.05$)

1.3 土壤细菌测序

1.3.1 土壤 DNA 提取

土壤 DNA 提取参照 Proteous 等^[23] 和杨建等^[24] 的方法,采用 SDS-GITC-PEG 法,并作适当修改。称取 0.5 g 土样于 2 ml 离心管中,所加试剂均按照比例减少 20 倍,加入氯仿-异戊醇后离心速度改为 15 000 g, 10 min。其他操作步骤基本不变。

1.3.2 16S rDNA 基因扩增与测序

16S rDNA 基因扩增:用 16S rDNA 基因通用引物 341F、806R(见表 3)以 50 μ L 体系进行 PCR 扩增。PCR 条件:用带有 barcode 的特异引物扩增样本 16S rDNA 特定的 V3-V4 区域,扩增体系为:50 μ L 反应体系中包含 5 μ L 的 10 $\times$ KOD Buffer, 5 μ L 的 2.5 mM dNTPs, 1.5 μ L 引物(5 μ M), 1 μ L 的 KOD 聚合酶,和 100 ng 模版 DNA。扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,随后 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 27 个循环,最后 68 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

表 3 研究中使用的引物
Table 3 PCR primers used in this study

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	目标基因 Objective gene	基因片段长度/bp Gene segment length
341F	5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'	16S rDNA	1400—1500
806R	5'-GGACTACHVGGGTATCTAAT-3'		

测序:对扩增产物切胶回收,用 QuantiFluorTM 荧光计进行定量。选择符合测序要求的样品 16S rDNA 送基迪奥生物科技有限公司(广州)对 V3 和 V4 区域进行细菌宏基因组测序,将纯化的扩增产物进行等量混合,连接测序接头,根据 Illumina 官方说明构建测序文库,HiSeq2500 的 PE250 模式上机测序^[25]。

数据质量控制:去除测序过程中产生的接头污染序列和一些低复杂度序列(如 poly A)及含有 N 的序列,若 reads 与接头序列可以连续比对上 15 bp 的长度,则认为该 reads 有接头污染;若 reads 中 poly 序列的长度 $\geq$ 10 bp,则为低复杂度序列的 reads。在进行后续分析之前,还需要对下机数据中质量值较低的碱基质量值小于 20 的碱基序列进行过滤,保证将一条 reads 上质量值高于 20 的碱基数占碱基总数的百分比小于 80% 的 reads 过滤掉。

通过重叠关系将双末端测序得到的成对序列组装成一条序列。拼接的条件是最小匹配长度为 50 bp,重叠区域允许的错配率为 0.02,符合条件的序列即为目标序列。每个样品测序深度,通过绘制 shannon 稀释曲线来评价测序量是否足够,并间接反映样品中物种的丰富程度。当曲线趋于平缓或者达到平台期时也就可以认为测序量趋于饱和,基本覆盖样品中所有物种,测序深度增加已经不影响物种多样性。

1.4 数据分析与处理

1.4.1 土壤基本性质的分析处理

用 SPSS 21.0 软件对实验数据进行分析,采用单因素方差分析(one-way-ANOVA)和多重比较(LSD)法进行差异显著性检验和多重比较分析($\alpha=0.05$ 和 0.01),图表中的数据均为 mean $\pm$ SD。

1.4.2 16S rDNA 基因组多样性的标准信息分析

16S rDNA 细菌宏基因组 V3 和 V4 区域测序结果通过 PE reads 过滤,获得符合条件的序列即为目标序列 tag,利用 Mothur^[25] (v.1.34.0) 软件包对 tag 序列进行了去冗余处理,从中挑选出 unique tag 序列,并对 unique tag 的丰度分布进行了统计;使用基于 Naive Bayesian 方法的分类器 rdp classifier 工具对 tag 进行物种注释^[26]。根据序列长度的变化,选择恰当的 Confidence Threshold(为 0.5)参数进行物种分类与丰度分析。

1.4.3 细菌宏基因组多样性的高级信息分析

为了更好地获得样品中物种的多样性信息,利用 Mothur 计算 0.03 距离下(97% 的相似度)的 OTU (Operating Taxonomic Unit)数量及其高级信息 OTU 丰度、Alpha 多样性及聚类等^[27-29]。

结合 OTU 的物种注释信息以及 OTU 在不同样品中的表达,统计界、门、纲、目、科、属和种每一个分类水平上各样品的表达情况,获得物种分类表达谱,根据物种的分类表达谱的数据,选取丰度较高的部分物种分类单元,用 Canoco5.0 进行主成分分析(principal component analysis,PCA)。

2 结果与分析

2.1 不同土壤细菌群落丰度及多样性分析

根据细菌 16S rDNA 的 V3—V4 区域测序结果,统计 9 个土壤样品细菌群落丰度及多样性的各项指标(表 4)。结果分析表明,所建立细菌文库的覆盖率,除景迈山古茶园土壤(coverage = 52.73%)外,其余样本达 73.66%—99.55%,平均为 83.56%。说明研究所建立的文库可比较真实有效地反映样本环境细菌多样性。森林、现代茶园与古茶园土壤的细菌 OTU 数目分别为 327—17009、5547—25866 和 10816—27837,表明 3 座茶山森林土壤的细菌 OTU 数目差异高达数十倍至数百倍。本研究 9 个土壤样本细菌群落的 Alpha 多样性统计表明,Chao1 和 ACE 指数变化趋势与 OTU 指数相一致;景迈山森林(J1)和南糯山森林(N1)与现代茶园(N3) Shannon 指数较低,分别为 3.17 和 4.77 与 4.69,而其他 6 个土壤的平均 Shannon 指数达 6.98—8.82,说明这 6 个土壤细菌群落多样性水平较高。一般高肥力土壤中细菌含量较多,本研究 3 种古茶园和 2 个树龄较长(50 年以上,表 1)土壤中细菌含量较为丰富(表 4),总体上,同一座茶山古茶园土壤细菌的 OTU 数、Shannon 指数、ACE 指数、Chao1 指数均高于森林和现代茶园土壤,说明古茶园土壤细菌多样性相对更为丰富。

表 4 样本细菌 Alpha 多样性统计

Table 4 Statistical analysis of bacterial Alpha diversity in samples

样品编号 Sample ID	操作分类单元数 Number of OTUs	覆盖率 Coverage	Chao1 指数 Chao1 index	ACE 指数 ACE index	香浓指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index
J1	327	99.55%	764.36	1040.23	3.17	0.078
J2	14330	89.35%	45979.72	78675.27	7.72	0.002
J3	10816	52.73%	58260.26	142095.51	8.59	0.001
B1	17009	86.90%	67851.60	143338.88	8.03	0.002
B2	25866	75.80%	108567.74	245480.12	8.69	0.001
B3	27837	73.66%	113139.39	258248.52	8.82	0.001
N1	7735	94.32%	19992.52	32033.74	4.77	0.078
N2	5547	96.00%	13181.69	19750.50	4.69	0.062
N3	14968	87.28%	50138.95	104603.17	6.98	0.005

2.2 不同土壤细菌在门水平上的分布

在门分类水平上,经微生物 16S rDNA 基因测序,检测到样品中共有 47 个菌门,平均丰度达 0.11% 及以上的菌门共计 21 个(表 5)。从中可知,不同茶山的森林土壤(J1、B1 和 N1)及同一茶山的森林、现代茶园和古茶园土壤细菌群落分布差异明显。首先,变形菌门(Proteobacteria)是明显的优势细菌类群,其在 9 个样品中所占丰度达 42.16—71.85%,平均为 50.63%,其次为酸杆菌门(Acidobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、WPS-2、绿弯菌门(Chloroflexi)、蓝藻细菌门(Cyanobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、AD3、疣微菌门(Verrucomicrobia)10 个菌门其相对丰度平均达 1.06% 以上,而其他菌门如芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、泉古菌门(Crenarchaeota)、绿菌门(Chlorobi)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)和梭菌门(Fusobacteria)等 10 个门的相对丰度低于 1.00%。其次,21 个主要菌门中,布朗山和南糯山森林土壤(B1 和 N1)细菌覆盖度达 20 个菌门,明显高于景迈山森林土壤(J1,仅 10 个菌门)。最后,除景迈山外,古茶园土壤细菌群落的门类丰度及均匀度均有增加趋势。

表 5 还表明,9 个土壤样本中茶园土壤细菌群落种群分布相对较为稳定,3 座茶山现代茶园和古茶园土壤优势菌门变形菌门的平均相对丰度为 51.30% 和 40.92%,其次为酸杆菌门 19.61% 和 19.78%、放线菌门 5.46%

和 7.19%、厚壁菌门 4.42% 和 3.16% 与拟杆菌门 1.26% 和 6.03%, 此 5 个菌门相对丰度之和分别为 82.48% 和 77.08%, 低于森林土壤 5 个菌门相对丰度之和的 91.86%。表明, 植茶和植茶年龄的增加将促进土壤细菌群落优势种群的形成, 构成茶园土壤特殊的微生物环境。

表 5 不同土壤细菌在门水平上的分布统计

Table 5 Soil bacterial communities at the phylum level

菌门 Bacterial Phylum	J1% J1-ratio	J2% J2-ratio	J3% J3-ratio	B1% B1-ratio	B2% B2-ratio	B3% B3-ratio	N1% N1-ratio	N2% N2-ratio	N3% N3-ratio	平均比例% Mean
Proteobacteria	71.85	48.14	17.68	44.32	42.16	55.13	65.82	63.60	46.96	50.63
Acidobacteria	0.03	22.09	38.57	28.46	23.43	20.57	2.93	13.30	0.20	16.62
Firmicutes	10.33	4.16	5.17	1.12	4.61	3.20	22.26	4.49	1.11	6.27
Actinobacteria	1.50	7.63	4.55	8.19	6.65	3.98	1.77	2.09	12.98	5.48
Bacteroidetes	14.94	1.26	2.13	2.09	2.22	3.04	0.05	1.60	12.39	4.41
WPS-2	0.00	4.97	2.86	3.74	5.01	3.29	2.01	0.48	0.01	2.49
Chloroflexi	0.00	1.72	7.39	2.59	3.45	1.72	2.05	2.02	0.75	2.41
Cyanobacteria	0.00	0.22	0.45	0.22	0.22	0.25	0.06	1.37	17.03	2.20
Planctomycetes	0.00	0.46	4.29	0.28	0.76	0.33	0.07	3.72	1.03	1.22
AD3	0.00	0.87	2.64	1.11	1.75	0.31	0.11	3.27	0.00	1.12
Verrucomicrobia	0.00	2.00	3.75	0.33	0.71	0.61	0.33	0.02	1.75	1.06
Gemmatimonadetes	0.01	1.48	0.50	1.56	1.40	1.29	0.21	1.99	0.11	0.95
TM7	0.00	0.76	0.26	0.85	0.61	0.96	0.07	0.03	0.12	0.41
Crenarchaeota	0.00	0.23	0.03	0.95	0.54	0.42	0.24	0.26	0.00	0.30
Chlorobi	0.00	0.12	0.05	0.18	0.08	0.06	0.02	0.00	2.13	0.29
TM6	0.00	0.49	0.09	0.52	0.71	0.25	0.18	0.05	0.06	0.26
Nitrospirae	0.00	0.30	0.24	0.18	0.17	0.18	0.01	0.63	0.02	0.19
Elusimicrobia	0.00	0.24	0.46	0.40	0.34	0.26	0.01	0.00	0.00	0.19
Fusobacteria	0.40	0.00	0.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.35	0.15
Armatimonadetes	0.00	0.08	0.26	0.15	0.36	0.08	0.04	0.00	0.08	0.12
Chlamydiae	0.00	0.16	0.14	0.11	0.16	0.20	0.07	0.14	0.04	0.11

2.3 不同土壤细菌在目水平上的最佳物种分类及聚类分析

为了确定最佳的物种分类水平, 我们统计了 9 个土壤样品在各个分类水平上的 tag 序列数及物种分类单元(从上往下)为: 界(100%) > 门(92.87%) > 纲(83.70%) > 目(76.76%) > 科(44.58%) > 属(10.11%) > 种(2.00%)。图 1 为 9 个样品测序量的 OTU 稀释曲线及样品间 bray 距离层级聚类, 间接反映样品中物种的丰富程度以及在 OTU 水平上各样品的相似性。从图 1(a) 可知, 景迈山森林(J1)和南糯山森林(N1)及现代茶园(N2)土壤的 OTUs 指数(即物种丰富程度)明显低于其他土壤, 同时景迈山森林(J1)及古茶园(J3)土壤的 OTUs 指数(即细菌数量)明显低于其他茶山土壤。图 1(b) 则表明, 布朗山 3 种土壤(B1、B2 和 B3)与景迈山现代茶园(J2)土壤细菌群落的物种结构比较相似, 而景迈山森林(J1)和南糯山古茶园(N3)土壤的细菌种群结构与其他土壤差异性最大。

图 2 是最佳分类水平(目)的物种表达谱热图, 它展示了不同的物种在样本间的表达变化情况, 热图上的聚类关系, 也可以反应样本关系。本研究在目最佳分类水平上总共检测到 89 个土壤细菌目, 它们从属于 17 个菌门。由于涉及细菌群落的种类很多, 图 2 仅对物种至少在一个样本中包含 tags 数量达到总 tags 数量的 1% 作为阈值的 43 个目进行作图。结果表明, 变形菌门的伯克霍尔德氏菌目(Burkholderiales)和根瘤菌目(Rhizobiales)为森林(J1、B1 和 N1)、现代茶园(J2、B2 和 N2)及古茶园(J3、B3 和 N3)的优势菌目, 其在 9 个土壤样品中的平均丰度分别达 13.91% 和 8.17%, 此外, Ellin329、黄单胞菌目(Xanthomonadales)、红螺菌目(Rhodospirillales)、红细菌目(Rhodobacterales)、鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales)、柄杆菌目

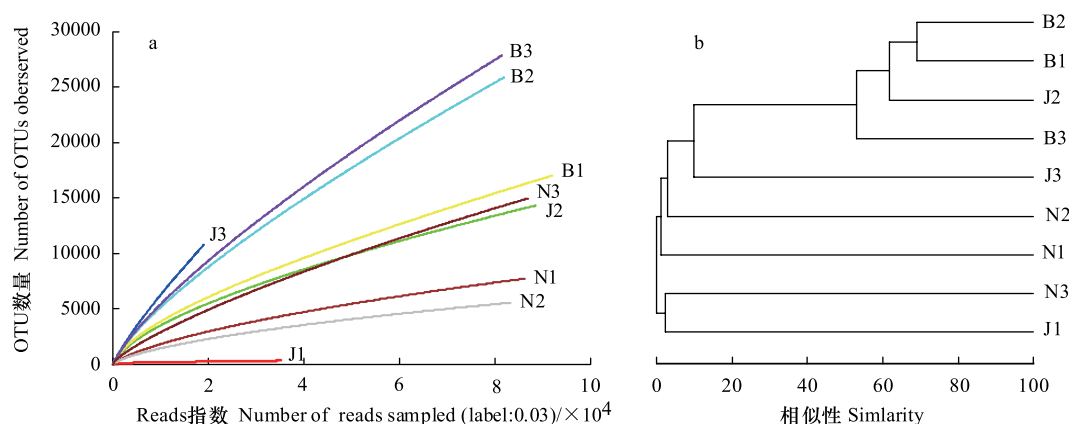


图 1 各土壤细菌在 97%相似性的 OTU 稀释曲线图及 OTU 的 bray 距离聚类分析图

Fig.1 Rarefaction curve at 97% similarity and clustering analysis of OTUs by bray distance

(Caulobacteriales)、假单胞菌目(Pseudomonadales)、奈瑟菌目(Neisseriales)和粘球菌目(Myxococcales)的平均丰度分别达 6.09%、4.52%、4.40%、3.64%、2.69%、2.20%、1.98%、1.82%和 1.56%,变形菌门这 11 个目的累计平均丰度为 50.99%;其次,酸杆菌门的酸杆菌目(Acidobacteriales)、Solibacteriales、Ellin6513 和 iii1-15,其平均丰度分别为 9.00%、4.62%、3.64%和 1.67%;第三,厚壁菌门的芽孢杆菌目(Bacillales)和乳杆菌目(Lactobacillales)平均丰度分别为 4.60%和 1.67%,放线菌门的放线菌目(Actinomycetales)和酸微菌目(Acidimicrobiales)则分别为 3.46%和 1.39%,拟杆菌门的拟杆菌目(Bacteroidales)为 2.09%。目最佳分类水平上样品间物种表达聚类结果与图 1(b) OTUs 最佳分类水平上的聚类分析结果相一致。

此外,本研究以 OTUs 为指标对 9 个土壤样本进行 PCA 统计分析(图 3),表明:9 个土壤 PC1=47.62%, PC2=15.97%,布朗山森林(B1)、现代茶园(B2)、古茶园(B3)和景迈山现代茶园土壤(J2)与其他 5 种土壤细菌种群结构差异可以区分开,南糯山古茶园土壤(N3)也明显区别于其他 4 种土壤,同理,同一座山不同类型茶园间土壤细菌种群结构也存在明显差异。与此同时,OTUs 的 PCA 分析土壤样本间的相互关系,与上述 OTUs 最佳分类水平聚类分析(图 1b)和热图上的物种表达谱的聚类分析(图 2)结果相一致。

3 讨论

茶树是广泛适应于热带亚热带酸性土壤的作物,邓欣等^[30]和王秀青等^[18]采用稀释平板涂抹法等对茶园土壤微生物的数量研究表明,茶园土壤的微生物数量普遍高于森林、农田和旱地土壤。薛冬等^[3]采用变性梯度凝胶电泳(DGGE)研究龙井茶产地梅家坞不同茶园、荒地和林地利用方式的土壤微生物群落基因多样性指数表明:荒地>茶园>林地。秦红灵等^[6]采用 RT-PCR 分析对红壤坡地不同土地利用方式对土壤细菌数量及结构的影响也表明,茶园>自然恢复区(不耕种、不施肥,植被自然演替)>农田,茶园土壤细菌数量丰富,并保持较高的多样性。本研究通过对 3 座茶山森林、现代茶园和古茶园土壤的细菌宏基因组 16S rDNA 测序及 OTUs 分子生物信息分析表明:9 种土壤样本的细菌数量及 Shannon 指数、ACE 指数、Chao1 指数(表 4)均为:古茶园>现代茶园>森林,说明茶园土壤的细菌种类普遍增加,古茶园土壤细菌多样性相对现代茶园更为丰富,与前人的研究结果基本一致。这可能与茶树长期栽培下,茶园土壤中茶树凋落物、根系分泌物及茶园施肥等使茶园土壤 pH 值变化及肥力提高(表 2)^[3-4,14-16,21]及古茶园林下栽培模式下良好的生态环境^[18]更有利与茶园土壤细菌的繁衍与生存。

目前国内针对茶园土壤的微生物群落结构的基因组学研究较少,仅卢开阳等^[20]采用平板涂布分离法和 16S rRNA 基因序列分析鉴定南糯山古茶树和台地茶根际土壤细菌群落结构的多样性表明:茶树根际土壤细菌分属于放线菌门、厚壁菌门和变形菌门,其中古茶树生境分离到 20 个属,台地茶生境则为 17 个属,在属一

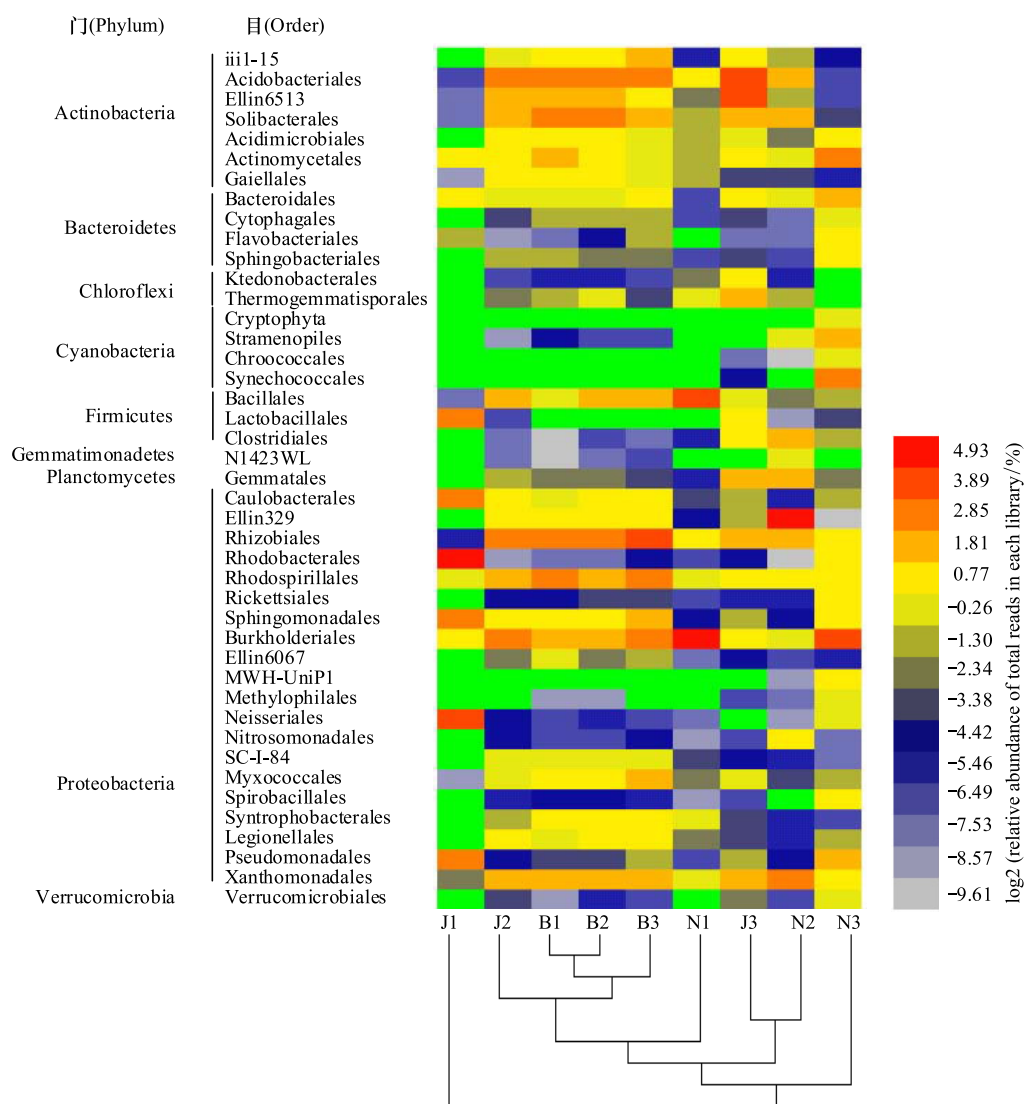


图2 目分类水平各土壤细菌群落结构

Fig.2 Soil bacterial communities at order level

级水平,古茶树根际土壤细菌群落的多样性和丰富度均高于台地茶。本研究利用高通量测序技术对森林和茶园土壤细菌群落组成的分子生物信息分析表明:在门分类水平上,9个土壤样本细菌共分属于47个菌门,其中,变形菌门是森林、现代茶园和古茶园土壤的明显优势类群,平均丰度达50.63%,其次,酸杆菌门、放线菌门、厚壁菌门与拟杆菌门,它们和变形菌门相对丰度之和占森林、现代茶园和古茶园的91.86%、82.48%和77.08%。尽管,研究角度和方法不同,但研究结果之间具有很大的相似性,共同表明:茶树栽培管理中,人为干预度较小的林下古茶园栽培模式土壤微生物多样性和丰富度高于人为干预度较大现代茶园。

本研究中关于茶园土壤细菌群落的物种表达热图(图2)说明:3座茶山土壤43个细菌目,从属于9个菌门,其中变形菌门平均丰度达50.99%;其次为酸杆菌门、厚壁菌门、放线菌门及拟杆菌门。这一研究结果与常安然等^[31]关于16S rDNA测序技术对烟草根际土壤细菌分类结构研究结果:烟草根际土壤共有25个菌门,其中变形菌门、拟杆菌门、酸杆菌门、疣微菌门四类菌门占明显优势,变形菌门是最为丰富的土壤细菌类群,在不同土壤类型中丰度占39.04%—53.71%相似。此外,国内关于森林及农田土壤细菌多样性的测序研究^[32-33]也表明,土壤中优势细菌门为变形菌门、放线菌门、酸杆菌门、厚壁菌门和芽单胞菌门。与其他作物栽培的土地利用方式相比,茶树作为高酚酸含量及根系分泌酚酸较高的多年生作物^[3-4],其生物学特性和耕作制度对土

壤细菌优势群落在门水平没有显著的影响。但是,从 OTUs 物种注释聚类分析(图 1)和 PCA 统计结果(图 3)则表明,每座茶山森林、现代茶园和古茶园 3 种土壤类型的细菌群落结构是有明显的差别的。Meta-群落假说认为^[34],细菌群落分布主要受内部环境和外部环境两类作用因子的影响,且本土环境特征是调节细菌组成与分布的主要因素。为揭示茶园土壤环境因子和细菌群落组分的内在联系,在今后研究中需要在明确季节、茶园土壤水分、pH 值、有机质及速效氮磷钾等因素对细菌群落的影响^[6,14-15,31]外,还要进一步扩大茶园土壤微生物研究区域范围、提高土壤微生物基因组的测序深度及物种注释与分类水平,在属或种水平上探明茶园土壤细菌种群结构,才能阐明茶园土壤细菌对土壤环境质量的调控机制。此外,本研究仅对细菌群落进行分析,对于茶园土壤其他种类的微生物类群,如真菌、古菌等的分布结构,还有待于进一步研究。

4 结论

1) 土壤细菌 16S rDNA 高通量测序表明:森林、现代茶园和古茶园土壤细菌群落的平均覆盖率分别为 93.59%、87.05%和 71.22%,Shannon 指数平均分别为 5.32、7.03 和 8.03,表明 3 座茶山不同土壤的细菌群落丰度为:古茶园 > 现代茶园 > 森林。

2) 在门分类水平上,变形菌门、酸杆菌门、放线菌门、厚壁菌门与拟杆菌门是森林、现代茶园和古茶园土壤的优势类群,它们的相对丰度占比分别达 91.86%、82.48%和 77.08%;在目最佳分类水平上,变形菌门的伯克霍尔德氏菌目、根瘤菌目为森林和茶园土壤的优势菌种,其平均丰度分别达 13.91%和 8.17%。

3) 3 座茶山 3 种土壤类型的最佳分类水平(目)和 OTUs 指数 PCA 统计分析均表明:森林、现代茶园和古茶园土壤类型的细菌群落结构差异明显,除景迈山外,古茶园土壤细菌群落的多样性和丰度均高于森林和现代茶园。

参考文献(References):

- [1] 刘丽芳. 国内外茶叶产业发展情况. 农学学报, 2018, 8(3): 87-92.
- [2] 邓西海, 蒋其鳌, 周凌云. 世界主要优质红茶化学成分与产地环境研究[J]. 土壤, 2008, 40(4): 672-675.
- [3] 薛冬, 姚槐应, 黄昌勇. 茶园土壤微生物群落基因多样性. 应用生态学报, 2007, 18(4): 843-847.
- [4] 韩文炎, 王皖蒙, 郭赞, 杨明臻, 贾仲君. 茶园土壤细菌丰度及其影响因素研究. 茶叶科学, 2013, 33(2): 147-154.
- [5] 赵杏, 钟一铭, 杨京平, 吕亚敏, 王小鹏. 不同植茶年限土壤碳氮养分及胞外酶对干旱胁迫的响应. 生态学报, 2017, 37(2): 387-394.
- [6] 秦红灵, 袁红朝, 张慧, 朱亦君, 吴敏娜, 魏文学. 红壤坡地利用方式对土壤细菌群落结构的影响. 土壤学报, 2011, 48(3): 594-602.
- [7] 林先贵, 胡君利. 土壤微生物多样性的科学内涵及其生态服务功能. 土壤学报, 2008, 45(5): 892-900.
- [8] Sharma S K, Ramesh A, Sharma M P, Joshi O P, Govaerts B, Steenwerth K L, Karlen D L. Microbial community structure and diversity as indicators for evaluating soil quality//Lichtfouse E, ed. Biodiversity, biofuels, Agroforestry and Conservation Agriculture. Dordrecht: Springer, 2010: 317-358.
- [9] Fierer N, Jackson R B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2006, 103(3): 626-631.
- [10] Wu T H, Chellemi D O, Graham J H, Martin K J, Rosskopf E N. Comparison of soil bacterial communities under diverse agricultural land management and crop production practices. Microbial Ecology, 2008, 55(2): 293-310.

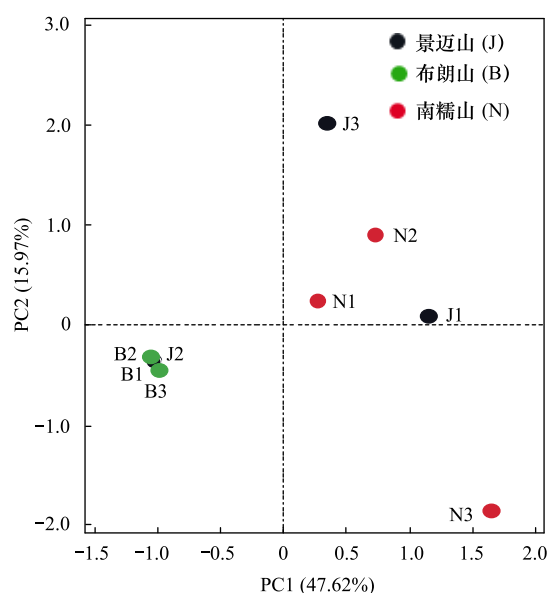


图3 各土壤细菌 OTU 相对丰度的 PCA 分析

Fig.3 PCA analysis of the soil bacterial communities based on the relative abundance of OTU

- [11] Carney K M, Matson P A. The influence of tropical plant diversity and composition on soil microbial communities. *Microbial Ecology*, 2006, 52 (2): 226-238.
- [12] Lauber C L, Hamady M, Knight R, Fierer N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(15): 5111-5120.
- [13] Hartman W H, Richardson C J, Vilgalys R, Bruland G L. Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(46): 17842-17847.
- [14] 林新坚, 林斯, 邱珊莲, 陈济琛, 王飞, 王利民. 不同培肥模式对茶园土壤微生物活性和群落结构的影响. *植物营养与肥料学报*, 2013, 19(1): 93-101.
- [15] 周才碧, 陈文品. 茶园土壤微生物的研究进展. *中国茶叶*, 2014, (3): 14-15.
- [16] 袁赛艳, 陈暄, 房婉萍, 王玉花, 朱旭君, 黎星辉. 茶树修剪物对茶园土壤真菌群落多样性影响研究. *茶叶科学*, 2015, 35(3): 255-262.
- [17] 李艳春, 李兆伟, 林伟伟, 蒋宇航, 翁伯琦, 林文雄. 施用生物炭和羊粪对宿根连作茶园根际土壤微生物的影响. *应用生态学报*, 2018, 29(4): 1273-1282.
- [18] 王秀青, 李永梅, 谢瑾, 吕才有, 杨广容. 古茶园和现代茶园土壤养分与微生物数量的研究. *西南大学学报: 自然科学版*, 2015, 37(10): 43-50.
- [19] 胡磊, 杨广, 尤民生. 茶园土壤微生物总 DNA 不同提取方法的比较. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29(2): 361-368.
- [20] 卢开阳, 张云峰, 贾曼, 高林瑞, 田飞, 唐蜀昆. 基于 16S rRNA 序列分析南糯山不同生境茶树根际土壤细菌群落分布多样性. *昆明理工大学学报: 自然科学版*, 2016, 41(2): 89-95.
- [21] 林斯, 邱珊莲, 邱宏端, 陈济琛, 王飞, 林新坚. 不同施肥模式对茶园红黄壤细菌群落基因多样性的影响. *中国土壤与肥料*, 2013, (1): 32-37.
- [22] 鲍士旦. 土壤农化分析(第三版). 北京: 中国农业出版社, 2000: 106-163.
- [23] Porteous L A, Armstrong J L, Seidler R J, Watrud L S. An effective method to extract DNA from environmental samples for polymerase chain reaction amplification and DNA fingerprint analysis. *Current Microbiology*, 1994, 29(5): 301-307.
- [24] 杨建, 洪葵. 红树林土壤总 DNA 不同提取方法比较研究. *生物技术通报*, 2006, (S1): 366-371.
- [25] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, Hall J R, Hartmann M, Hollister E B, Lesniewski R A, Oakley B B, Parks D H, Robinson C J, Sahl J W, Stres B, Thallinger G G, Van Horn D J, Weber C F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [26] Naive Bayesian 方法的分类器 rdp classifier 工具. <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>
- [27] Huse S M, Welch D M, Morrison H G, Sogin M L. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(7): 1889-1898.
- [28] Paul F K, Josephine Y A. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology* 2010, 47(2): 161-177.
- [29] Frosini B V. Descriptive measures of ecological diversity. In *Environmetrics*, El-Shaarawi A H and Jureckova J, eds. Encyclopedia of Life Support Systems. Oxford, UK: EOLSS Publishers, 2003. <http://www.eolss.net>
- [30] 邓欣, 谭济才, 尹丽蓉, 任佑华, 刘红艳. 不同茶园土壤微生物数量状况调查初报. *茶叶通讯*, 2005, 32(2): 7-9.
- [31] 常安然, 李佳, 张聿, 占俊文, 魏登辉, 王佩雯, 于建军. 基于宏基因组学 16S rDNA 测序对烟草根际土壤细菌群落组成分析. *中国农业科技导报*, 2017, 19(2): 43-50.
- [32] 王春香, 田宝玉, 吕睿瑞, 林伟铃, 徐燕, 黄钦耿, 黄建忠. 西双版纳地区热带雨林土壤酸杆菌(*Acidobacteria*)群体结构和多样性分析. *微生物学通报*, 2010, 37(1): 24-29.
- [33] 薛银刚, 刘菲, 周璐璐, 金珊, 姜逸, 王颖聪, 江晓栋, 王倩, 施昕澜, 薛柯. 基于高通量测序的工业园区地下水和土壤细菌群落结构比较研究. *生态毒理学报*, 2017, 12(6): 107-115.
- [34] Souza R C, Hungria M, Cantão M E, Vasconcelos A T R, Nogueira M A, Vicente V A. Metagenomic analysis reveals microbial functional redundancies and specificities in a soil under different tillage and crop-management regimes. *Applied Soil Ecology*, 2015, 86: 106-112.