

亚热带四种主要植被类型土壤细菌群落结构分析*

刘卜榕 徐秋芳[†] 秦 华 郭 帅 石慧丽

(浙江农林大学环境与资源学院, 浙江农林大学-中国科学院土壤研究所森林土壤与环境联合实验室, 浙江临安 311300)

摘 要 应用 PCR-DGGE 方法分别对天目山和玲珑山的 4 种典型森林土壤细菌群落结构进行了研究分析。结果表明,阔叶林、杉木林、马尾松林和毛竹林在天目山土壤中的 DGGE 条带数分别为 49、45、51 和 51 条,在玲珑山土壤中的 DGGE 条带数分别为 42、42、44 和 48 条。不同森林植被土壤 DGGE 带谱差异不明显,天目山和玲珑山 4 种森林土壤分别有 31 条和 23 条共性条带,分别占总数的 61% 和 48% 以上,然而每种林分也有各自的特征条带。相对而言,两个样地杉木林与其他 3 种林分的土壤细菌群落结构相似度较低,相似值分别为 0.72 和 0.68,其土壤细菌多样性指数也明显低于其他 3 种林分,而毛竹林和马尾松林多样性指数则没有显著差异。同时分析两个采样区的土壤细菌 DGGE 发现,土壤性质对细菌群落结构的影响大于植被。

关键词 植被类型;土壤;细菌群落结构;生物多样性;PCR-DGGE

中图分类号 Q938 **文献标识码** A

土壤微生物是森林生态系统的重要组成,其在森林土壤中的数量、分布与代谢特征反映了土壤肥力状况,对林木生长发育起着重要的作用^[1],而微生物的生长、繁殖是多种环境因子综合作用的结果。目前,国内有关农田土壤微生物的研究较多,主要是针对不同土地利用方式^[2-4]、不同作物品种^[5]及土壤污染^[6]等对土壤微生物多样性影响的研究。研究结果表明长期的不同施肥措施改变了土壤微域生境条件,不同的种植制度和作物品种改变作物根基细菌群落结构,从而引起土壤微生物群落结构的变化;重金属污染土壤中细菌的多样性指数随着污染程度的升高,大体呈现出先升高后降低的趋势。而森林土壤微生物,由于其 DNA 提取相对困难,一些种属在天然森林土壤中数量较少难以分析,因此关于森林土壤微生物的研究较少。

植被类型可能强烈影响土壤微生物结构与功能,一般认为绝大多数土壤微生物为异养型,植物的根系分泌物和凋落物是微生物的主要碳源和能源。夏北成等^[7]应用 PCR-RFLP 研究了不同土壤及覆盖其上的植被与土壤微生物群落结构和多样性的关系,表明植物的分泌物可能作为底物促进土壤微生物的生长;植被覆盖使得土壤湿度更适于微生物群落的生存与生长。Zak 等^[8]利用磷脂脂肪酸

(PLFA)证明,土壤中细菌和放线菌的数量与植物多样性成反比,但真菌数量是成正比的。就我国的森林土壤而言,对于森林植被演替、退化等变化对土壤微生物群落多样性影响的研究较多。如杨喜田等^[9]通过传统的稀释平板法和熏蒸-浸提法测定微生物生物量碳、氮,研究了太行山区不同植被群落土壤微生物特征,何寻阳等^[10]运用分子生物学方法对岩溶区植被演替过程中土壤细菌和真菌群落的遗传多样性进行研究。植被对于细菌和真菌群落的多样性具有不同程度的显著影响。然而,对亚热带不同森林植被对土壤微生物群落结构及多样性研究较少。

细菌是土壤中多样性最丰富的微生物类群,占土壤微生物总数的 70%~80%^[11],在土壤养分循环中起着至关重要的作用。由于从环境样品中分离和培养细菌的困难,不经微生物分离培养步骤,直接从土壤中抽提总 DNA 并分析其基因片段的分子生物学方法已发展用来描述和鉴定微生物群落。近年来基于 DNA 方法的群落分析如 PCR 扩增技术、克隆文库法、荧光原位杂交法、限制性酶切片长度多态性法,变性和温度梯度凝胶电泳法等得到了迅速的发展^[12]。其中变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术已广泛应用于不同生态环境中微生物群落组

* 浙江省自然科学基金项目 (Y3100578) 资助

[†] 通讯作者, E-mail: xuqiufang@zafu.edu.cn

作者简介: 刘卜榕 (1987—), 女, 江苏盐城人, 硕士研究生, 主要从事土壤生物与生物化学研究。E-mail: liu1364205@163.com

收稿日期: 2011-11-26; 收到修改稿日期: 2012-03-20

成、多样性及种群动态变化的研究^[13]。阮晓东等^[14]应用 PCR-DGGE 技术分析了油松阔叶混交林不同层次优势植被根区土壤真菌的群落结构。王奇赞等^[15]采用 DGGE 法分析了天目山毛竹入侵阔叶林后土壤细菌群落结构的变化。Marschner 等^[16]利用 DGGE 技术分析比较了植物根围真核细菌群落结构在不同植物种类、土壤类型和根区位置情况下所引起的差异,并且研究了土壤中真菌群落结构随有机和无机肥施用情况的演变。王新洲等^[17]通过 DGGE 图谱的聚类和相关性分析比较了喀斯特生态系统中乔木和灌木林根际土壤微生物生物量及其多样性。

阔叶林、杉木林、马尾松林和毛竹林是亚热带代表性森林类型,本文将应用 PCR-DGGE 技术,在天目山保护区和玲珑山两个地区,分别采集 4 种林分的土壤,比较研究 4 种林分对土壤细菌多样性的影响。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究区一位于浙江省临安市天目山国家级自然保护区,地处北纬 30°18'30"~30°21'37",东经 119°24'11"~119°27'11",海拔 300~1 500 m。年均温度 8.8℃~14.8℃,年均降水量 1 390~1 870 mm。该区属亚热带季风气候。不同海拔分别分布着红壤、黄壤、黄红壤或棕黄壤。

研究区二位于浙江省临安市玲珑山,地处北纬 30°14',东经 119°42',海拔 50~353 m。年平均气温 9℃~15.8℃,年均降水量 1 377~1 424 mm。该区同属中亚热带季风气候。土壤为发育于凝灰岩的黄红壤。

1.2 样品采集与处理

2010 年 8 月,于天目山自然保护区,在母岩一致(钙质泥岩)但植被类型不同的林区,选择典型的阔叶林、杉木林、马尾松林和毛竹林 4 种林分,分别在每种林分的下坡位、中坡位、上坡位确定采样区,在采样区 10 m×20 m 范围内按 X 型 5 个样点采集 0~20 cm 的混合土壤样品各一份,共得 12 个(4×3)混合土壤。样品采集区阔叶林、杉木林和马尾松林下均有丛生灌木,有蕨类植物。毛竹林下植被很少,仅有稀疏的草本植物。在玲珑山 4 种相同林分下,按照同样方法采集土壤样品。样品带回室内去除土壤中的植物、石块等过 2 mm 筛后分成 2 份,一

份新鲜土样供土壤微生物分子实验,另一份风干处理后用于土壤理化性质测定。

1.3 主要试剂与引物

Power Soil™ Total DNA Isolation Kit 试剂盒购于美国 Mo Bio 公司, Taq DNA 聚合酶购于大连 TaKaRa 公司, 荧光染料 SYBR green I 购于美国 Invitrogen 公司, 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.4 分析方法

1.4.1 土壤基本性质分析 所采样品其中部分自然风干后,过 2 mm 和 0.25 mm 钢筛,测定土壤质地(国际分类标准)和基本理化性质。依据常规土壤农化分析方法分析^[18],土壤质地采用比重计法,土壤 pH 采用酸度计法测定(土:水比为 1:5);土壤有机质采用重铬酸钾-硫酸外加热法;碱解氮采用碱解扩散法;有效磷测定采用 Bray 法,盐酸-氟化铵溶液浸提、钼锑抗比色;速效钾采用乙酸铵浸提、火焰光度计法。

1.4.2 土壤细菌总 DNA 的提取 采用 Power Soil™ Total DNA Isolation Kit 试剂盒提取土壤总 DNA,按试剂盒说明书操作,通过琼脂糖电泳对所提取 DNA 效果进行鉴定。

1.4.3 土壤 DNA 的 PCR 扩增 土壤 DNA 的 PCR 扩增采用一对通用引物 F338-GC 和 518r 扩增细菌 16S rDNA 基因 V3 区的一段长约 260 bp 的片段, F338-GC: 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGCGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'; 518r: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3', 使用 Bio-Rad 公司的 PTC-200 对土壤总 DNA 进行扩增。50 μl 反应体系如下: 10×PCR Buffer(缓冲液) 5.0 μl, 25 mmol L⁻¹ MgCl₂ 3.0 μl, 2.5 mmol L⁻¹ dNTP 1.0 μl, 10 μmol L⁻¹ 引物各 0.5 μl, 5 U μl⁻¹ Taq DNA 聚合酶 0.2 μl, 模板 DNA 1.0 μl, 用无菌双蒸水补足至 50 μl。反应参数: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 50℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。取 3 μl PCR 反应产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 检测产物及其长度。

1.4.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析 使用 Dcode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad), 细菌 16S rDNA V3 区片段 PCR 产物检测是在变性剂梯度为 30%~65% 的 8% 聚丙烯酰胺凝胶上进行变性梯度凝胶电泳。电泳前上样需使 PCR 产物上样量一致。在 60℃、80V 条件下电泳 13 h, 使用 SYBR green I 染色 0.5 h, 染色结果于 Gel Doc™

EQ (Bio-Rad) 凝胶成像系统成像, 使用 Quantity One 4.4 软件 (Bio-Rad) 进行图像分析。

1.5 数据处理

利用 Quantity One 4.4 软件进行图谱分析时, 主要采用 UPGMA 法 (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages) 对 DGGE 图谱进行聚类分析, 一般认为相似值高于 0.60 的两个群体具有较好的相似性。使用 Shannon 多样性指数 (H)、Margalef 丰富度指数 (D) 以及 Pielou 均匀度指数 (E) 对土壤细菌微生物群落多样性进行分析^[19], 其计算公式为:

$$H = - \sum (n_i/N) \ln(n_i/N)$$

$$D = (S - 1) / \ln S$$

$$E = H / \ln S$$

式中, n_i 为每条电泳条带光密度峰值, N 为同一泳道中所有条带光密度峰值总和。电泳条带光密度的峰值通过分析软件 Quantity one 进行读取。S 为每一泳道总的条带数。

2 结果与分析

2.1 供试土壤的理化性质

不同林地土壤理化性质见表 1。天目山相同林分的土壤样品间 pH 相差不大, 不同林分间杉木林的 pH 显著低于其他林分 (表 1); 土壤有机质同一

林分不同坡位间一般下位坡高于上位坡, 毛竹林有机质的平均值明显高于其他 3 种林分, 但林地不同位置样品的变异系数 > 0.1, 导致差异检验不显著; 阔叶林和毛竹林土壤的碱解氮含量显著高于杉木林和马尾松林; 不同林分土壤有效磷含量差异不显著; 杉木林和毛竹林土壤的速效钾含量显著高于阔叶林和马尾松林, 阔叶林又显著高于马尾松林地。

玲珑山同一林分不同样点以及不同林分之间土壤 pH 均无显著差异, 但普遍较天目山的 pH 低, 即玲珑山土壤样品的酸性更强 (表 1)。阔叶林和马尾松林地土壤有机质含量相对较高, 但重复之间差异较大, 其变异系数 0.47 和 0.38, 因此 4 种林分土壤有机质的差异检验不显著 (表 1)。土壤碱解氮的情况与有机质类似, 同一林分不同坡位间含量差别较大, 其中阔叶林土壤变异系数 0.37。同一林分不同坡位间土壤有效磷和速效钾含量的变异也很大, 尤其是阔叶林土壤有效磷变异系数高达 1.19。比较 4 种林分, 纯自然的阔叶林和马尾松林土壤性质的空间变异性较大, 阔叶林下坡位以及马尾松林上坡位样品各项指标均明显高于其他 2 个重复。对于地形较均一的林地, 一般下位坡土壤质量优于上位坡, 阔叶林属于此类情况。而先锋树种马尾松林的立地条件较差, 土层较薄、且坡地不均匀, 因此土壤质量并非下坡位最好, 本次上坡位样品反而各项指标最好。

表 1 天目山和玲珑山不同森林土壤理化性质

Table 1 Physico-chemical properties of the different forest soils in the Tianmu and Linglong Mountains

研究区 Location	样地 Plots	pH (H ₂ O)	有机质 Organic matter (g kg ⁻¹)	碱解氮 Hydrolyzed N (mg kg ⁻¹)	有效磷 Available P (mg kg ⁻¹)	速效钾 Available K (mg kg ⁻¹)
天目山 Tianmu Mountain	阔叶林 Broad-leaved forest	4.92 ± 0.16a	52.78 ± 9.51a	218.7 ± 29.8 ab	2.58 ± 0.20a	54.33 ± 5.13bc
	杉木林 Chinese fir forest	4.45 ± 0.12b	45.85 ± 4.74a	195.6 ± 22.4b	3.56 ± 0.86a	89.00 ± 16.52a
	马尾松林 Mason pine forest	4.70 ± 0.19ab	47.30 ± 12.32a	185.8 ± 41.4b	2.48 ± 1.48a	43.33 ± 5.77c
	毛竹林 Bamboo grove	4.90 ± 0.11a	62.55 ± 11.88a	268.2 ± 10.3a	2.44 ± 0.28a	70.00 ± 10.00ab
玲珑山 Linglong Mountain	阔叶林 Broad-leaved forest	4.16 ± 0.01a	71.61 ± 33.85a	207.46 ± 77.1a	5.16 ± 6.12a	96.67 ± 20.82ab
	杉木林 Chinese fir forest	4.11 ± 0.03a	48.40 ± 4.38a	148.1 ± 29.2a	3.89 ± 1.01a	93.33 ± 5.77b
	马尾松林 Mason pine forest	4.14 ± 0.07a	76.96 ± 29.25a	167.5 ± 42.2a	3.08 ± 1.29a	110.0 ± 17.3a
	毛竹林 Bamboo grove	4.07 ± 0.06a	56.52 ± 1.34a	165.9 ± 19.6a	1.62 ± 0.24a	143.3 ± 40.4ab

注: 同列不同字母代表差异达显著水平 ($p < 0.05$) Note: Different letters in the same column mean significant difference by Duncan's multiple range tests at 0.05 level

2.2 天目山土壤细菌群落结构及多样性分析

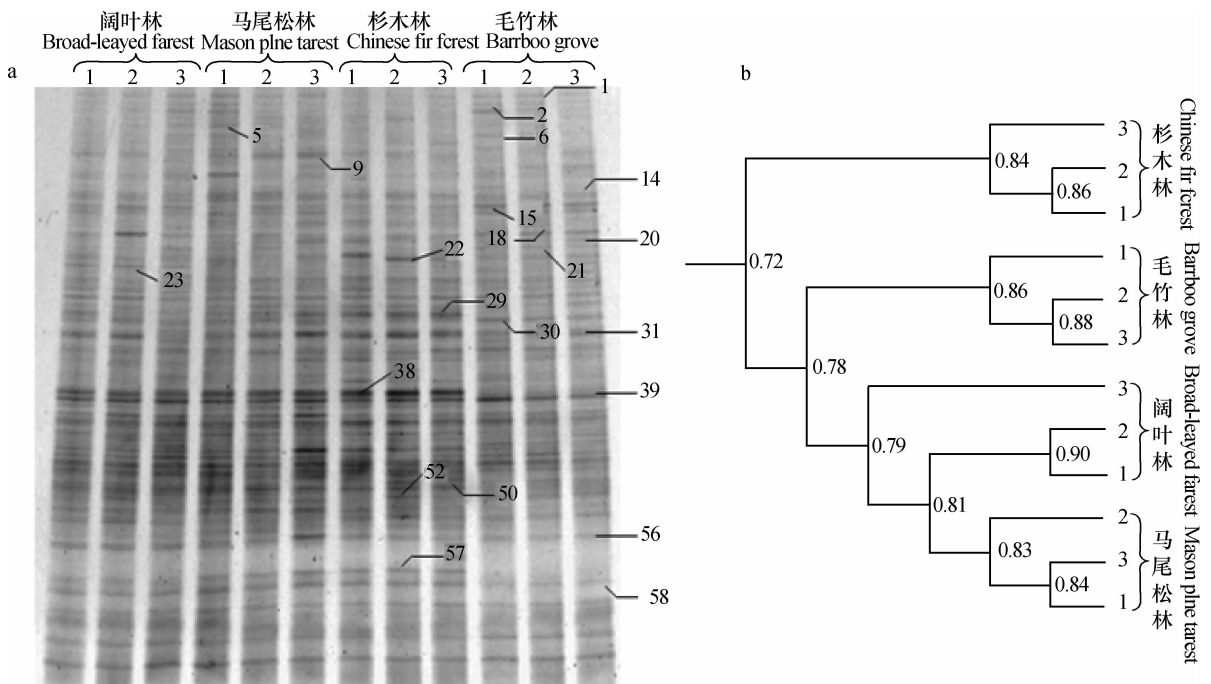
土壤微生物总 DNA 经过 PCR 扩增后,均获得特异性较强目标条带。对 PCR 产物进行 DGGE 分析,Quantity one 软件能识别肉眼无法看清和区分的条带图谱结果见图 1a。统计结果表明,天目山不同林分土壤中细菌多样性丰富,阔叶林土壤样品平均有 49 条条带,马尾松林约为 51 条,杉木林有 45 条,毛竹林地约有 51 条。各泳道相同位置条带的差异不大,所有样品共 31 条共同条带,占总条带数的 61% 以上;另外还有一些条带(如条带 21、23、29、52)是大多数样品的共有条带,说明不同森林植被下土壤细菌物种的差异不显著。由图中条带亮度判断可知,除毛竹外,其他 3 种森林土壤之间大多数细菌的优势条带差别不明显,大部分优势条带集中在 38~56 范围内。

DGGE 条带 31、38、39 和 58 为阔叶林、杉木林、马尾松林土壤的优势条带,但在毛竹林地土壤中则相对较弱,而条带 15 则相反。条带 18 为阔叶林和毛竹林地土壤的特有条带,但条带较弱;共同条带 9 是马尾松林土壤的优势条带,而条带 22 和 50 则是杉木林土壤的优势条带。毛竹林土壤中大部分条带亮度均较其他 3 种林分弱,但在 14~30 之间条带数较多。杉木林土壤在条带 1~30 之间条带数较

少,且与其他林分的差异也较大,如其他 3 种林分的共性条带 3、5、6 和 30 在杉木林土壤中则不存在。

以阔叶林下坡位样品为基准,应用 Quantity one 软件定量分析 DGGE 图谱,与基准样品相似度越高,说明细菌群落结构越相似。结果表明,同一林分的中坡位和上坡位与基准样之间的相关性最为相近,表明重复性较好。杉木林与阔叶林的相似度最低。通过未加权算术平均对群法(UPGMA)进行聚类分析表明,同一林分的土壤样品各自被聚为一大类,相似性达到 0.8 以上(图 1b),说明同一林地 3 个重复间相似度高于不同林分之间,土壤细菌的群落在同一植被下比较稳定。阔叶林和马尾松林之间相似性最高为 0.79,其次为毛竹林地,杉木林与他们的相似性最低。四种林地间的相似性为 0.72,这说明不同的植被对天目山土壤细菌群落相似性有着一定程度的影响,但影响不大。

Shannon 多样性指数反映了群落中物种的变化度或差异度,受样本总数和均匀度的影响,一般而言,物种丰富度高且分布较均匀的群落 Shannon 多样性指数较高^[20]。对天目山不同土壤的 DGGE 条带进行的 Shannon 多样性指数分析结果表明(表 2),阔叶林、毛竹林和马尾松土壤的细菌多样性显著高于杉木林($p < 0.05$)。



注: 1、2、3 分别代表下坡位、中坡位、上坡位 Note: 1, 2 and 3 represents, respectively, downhill, mesoslope and uphill

图 1 天目山土壤样品细菌 16S rDNA V3 区扩增片段的 DGGE 分析结果(a)以及 DGGE 条带图谱的聚类分析(b)

Fig. 1 DGGE analysis (a) and cluster analysis (b) of the DGGE band profiles of 16S rDNA V3 fragment of the soil bacteria in soil samples from the Tianmu Mountain

表 2 天目山和玲珑山土壤细菌群落结构多样性指数

Table 2 Diversity indices of community structures of the soil bacteria in Tianmu and Linglong Mountains

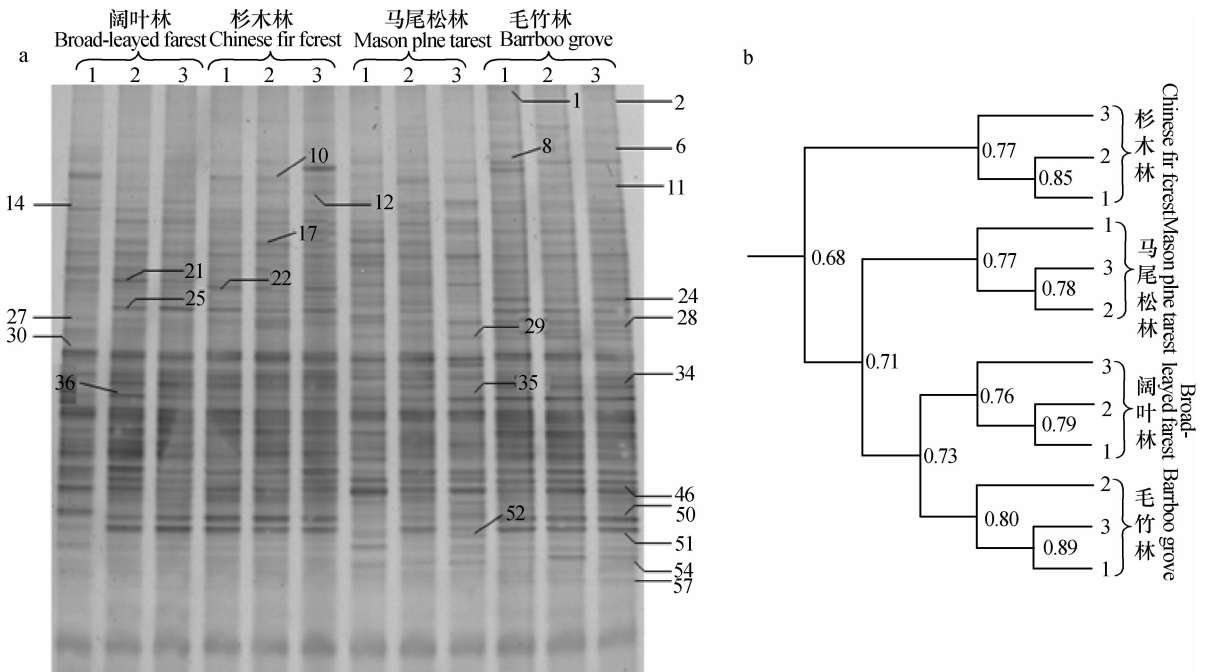
研究区 Location	样地 Plots	Shannon 多样性指数 Shannon diversity index (<i>H</i>)	Margalef 丰富度指数 Margalef richness index (<i>D</i>)	Pielou 均匀度指数 Pielou evenness index (<i>E</i>)
天目山 Tianmu Mountain	阔叶林 Broad-leaved forest	3.895 a	4.123 a	0.999 a
	杉木林 Chinese fir forest	3.783 b	3.807 b	0.992 a
	马尾松林 Mason pine forest	3.903 a	4.242 a	0.993 a
	毛竹林 Bamboo grove	3.936 a	4.303 a	0.999 a
	阔叶林 Broad-leaved forest	3.697b	3.523 b	0.990 a
	杉木林 Chinese fir forest	3.695 b	3.518 b	0.989 a
玲珑山 Linglong Mountain	马尾松林 Mason pine forest	3.744ab	3.715ab	0.992 a
	毛竹林 Bamboo grove	3.837 a	4.074 a	0.990 a

注：同列不同字母代表差异达显著水平 ($p < 0.05$) Note: Different letters in the same column show significant difference by Duncan's multiple range tests at 0.05 level

2.3 玲珑山土壤细菌群落结构及多样性分析

应用 DGGE 技术分离 PCR 产物可以看到 (图 2a), 土样中细菌多样性丰富, 阔叶林土壤样品平均有 42 条条带, 杉木林有 42 条, 马尾松林约为 44 条, 毛竹林地约有 48 条。比较不同林分之间的条带发

现, 所有样品共 23 条共性条带, 占总条带数的 48% 以上; 另外也有部分条带 (如条带 24、25、34、51、52) 是大多数样品的共有条带, 说明不同森林植被下土壤细菌物种的差异不显著。由图中条带亮度判断可知, 大部分优势条带集中在 30~50 范围内。



注：1、2、3 分别代表下坡位、中坡位、上坡位 Note: 1, 2 and 3 represents, respectively, downhill, mesoslope and uphill soil samples from the Linlong Mountain

图 2 玲珑山土壤样品细菌 16S rDNA V3 区片段 DGGE 的分析结果 (a) 以及 DGGE 条带图谱的聚类分析 (b)
Fig. 2 DGGE analysis (a) and cluster analysis (b) of the DGGE band profiles of 16S rDNA V3 fragment of the soil bacteria in

DGGE 条带 25、50 和 51 为阔叶林、杉木林、毛竹林土壤的优势条带,但在马尾松林中则相对较弱;条带 12 和 22 在杉木林土壤样品中相对较亮,而条带 36 和 46 则相反;条带 8、11、24、54 和 57 是毛竹林土壤样品的特有带,且 8 和 24 为优势条带;条带 35 是马尾松林的特有带,也是非优势条带。同时还有一些条带在不同林分中会消失,如条带 29 在是除了杉木林以外其他林分所共有的条带;条带 6 是除了阔叶林以外其他林分所共有的条带,但是在其他林分中条带亮度也很弱。条带 22 和 28 则是除了马尾松林以外其他林分所共有的。

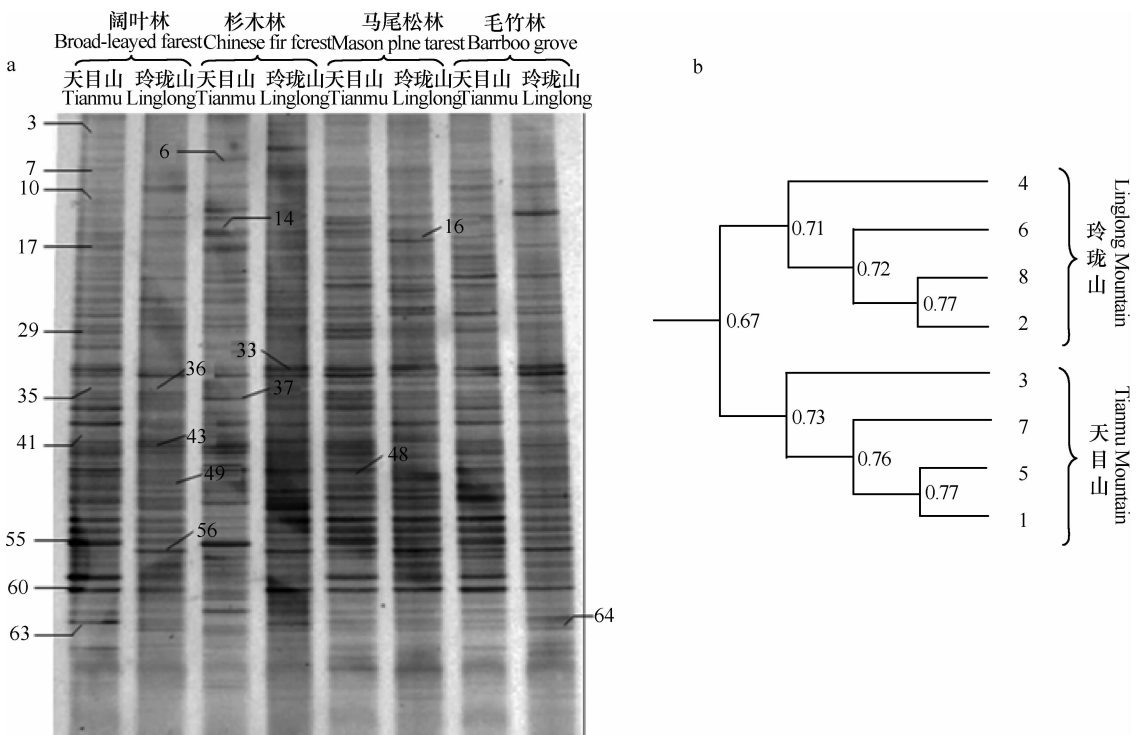
以阔叶林下坡位样品为基准,应用 Quantity one 软件定量分析 DGGE 图谱,结果表明,同一林分的两个样品与基准样之间的相关性较为相近。通过聚类分析发现,玲珑山土壤样品同一林分的 3 个重复同样先聚为一类,相似性均达到 0.75 以上(图 1b),说明样品 3 个重复间差异性不大。不同林分土壤细菌的相似度关系和顺序与天目山类似,阔叶

林和毛竹林之间相似性最高为 0.73,其次是马尾松林地,杉木林与他们的相似性最低。将 12 个样品归为一类的相似值达 0.68,说明玲珑山不同森林土壤细菌群落多样性并没有显著差异。

对玲珑山不同土壤样品的 DGGE 条带进行的 Shannon 多样性指数分析结果表明,毛竹林土壤细菌的多样性最高,其次为马尾松林,前两者没有显著差异;而阔叶林和杉木林较低(表 2)。玲珑山毛竹林和天目山毛竹林类似,均由毛竹入侵阔叶林形成,因此玲珑山毛竹林地土壤细菌群落多样性也较高。

2.4 相同林分不同采样区土壤细菌群落结构及多样性比对分析

为了揭示不同土壤类型对细菌群落结构的影响,选择每个林分的第 1 个重复,应用 DGGE 技术分离 PCR 产物可以看到(图 3a),相同林分不同土壤的细菌的 DGGE 条带有差别,比对发现,天目山阔叶林的细菌多样性高于玲珑山,而毛竹林土壤则正好相反,差异较小的是马尾松林。



注: 1、3、5、7分别为天目山的阔叶林、杉木林、马尾松林和毛竹林, 2、4、6、8分别为玲珑山的阔叶林、杉木林、马尾松林和毛竹林 Note: 1, 3, 5 and 7 stands for the sampling site in the broad-leaved forest, Chinese fir forest, mason pine forest and bamboo groves, respectively, on the Tianmu Mountain; 2, 4, 6 and 8 stands for the sampling site in the broad-leaved forest, Chinese fir forest, mason pine forest and bamboo groves on the Linglong Mountain

图 3 不同质地土壤样品的细菌 16S rDNA V3 区片段的 DGGE 的分析结果(a)以及 DGGE 条带图谱的聚类分析(b)

Fig. 3 DGGE analysis (a) and cluster analysis (b) the DGGE band profiles of 16S rDNA V3 fragment of the bacteria in soil samples different in soil texture

以天目山阔叶林为基准,应用 Quantity one 软件定量分析 DGGE 图谱,结果表明,土壤相同的 4 个样品与基准样之间的相关性较为相近。使用 UPGMA 算法进行聚类分析,所有样品被分为两大类,同类土壤样品被聚为一类,他们聚为一类的相似值分别为 0.73(天目山)和 0.71(玲珑山),说明在本研究中土壤性质对细菌的影响可能大于植被类型(图 3b)。然而两类土壤样品被聚为一类的相似值为 0.67,说明土壤类型对其细菌群落结构和多样性有影响。

3 讨 论

3.1 植被对土壤细菌群落结构的影响

影响土壤微生物的因素错综复杂,从微生物群落多样性的全球格局来看,植物群落类型可能强烈影响了微生物群落的组成^[7],植被通过影响土壤环境,进而影响土壤微生物群落结构和多样性。土壤微生物多样性与覆盖于土壤上的植物群落多样性呈正相关^[21],因为植物种类多,提供微生物代谢的碳源种类就多。天目山 4 种不同植被类型土壤细菌有 31 条共性条带,占总条带数的 61% 以上,12 个样品归为一类的相似值达 0.72,而同类植被 3 个重复的相似性达到 0.8 以上。虽然同一林分下土壤的性质变异较大,以至于不同植被之间的差异性被掩盖(表 1),但同类植被土壤细菌群落结构相似度则高于不同植被之间。不同林分土壤各项养分的高低顺序没有一致的规律,如阔叶林和毛竹林土壤有机质和碱解氮含量较高,而有效磷、速效钾则杉木林土壤高,说明土壤性质对细菌群落结构的影响不是某 1 个或 2 个因子作用的结果。天目山土壤除有效磷偏低外,其余指标丰度较高,因此,土壤养分浓度的变化对物种多样性影响可能不大,而土壤有机质提供的碳源多样性对其影响更重要。本调研区阔叶林、杉木林和马尾松林(林下许多阔叶树灌木)地上植被的多样性均较丰富,而毛竹林下植物稀少,植被的多样性较低,但毛竹林地土壤总条带总数并不少,说明土壤细菌多样性也并非最低(图 1a 和表 2)。原因是天目山毛竹林是毛竹入侵阔叶林、逐渐替代阔叶后形成的,成林历史仅有 30 多年,而土壤有机质的循环缓慢,可能阔叶林碳源还存在于毛竹林土壤中,因此毛竹林地的碳源较阔叶林更为丰富些,从而土壤细菌群落多样性也较高。玲珑山植被及土壤性质对细菌群落结构的影响与天目山类似;毛竹林也是由于毛竹入侵阔叶林后逐渐形成的,土

壤细菌群落多样性最高(表 2)。杉木林由于其根系分泌出酚类物质以及枯枝落叶的分解导致土壤 pH 降低,不利于土壤中的微生物的生长^[22],因此其土壤细菌多样性相对较低。

3.2 土壤类型对细菌群落结构的影响

比较两处样地即不同土壤类型对细菌群落结构和多样性影响发现,土壤类型的影响大于植被类型,且玲珑山 4 种林分土壤样品的细菌多样性总体上低于天目山。这与其他研究者的结果类似,Gelsomino 等^[23]通过比较不同地理位置的 16 种土壤微生物 DGGE 图谱发现土壤类型是决定土壤微生物群落结构的主要因素。天目山和玲珑山土壤分别由钙质石灰岩和凝灰岩发育而来,形成了不同特性的土壤,主要表现在土壤的质地(前者为重壤土,后者为中壤土)、pH 以及土壤养分等理化性质的不同(表 1)。玲珑山土壤有机质、有效磷、速效钾含量普遍高于天目山,从土壤提供养分和能源角度分析,玲珑山土壤的多样性应高于天目山;导致玲珑山土壤的细菌多样性低于天目山的原因可能是土壤酸度的影响,玲珑山土壤样品 pH 普遍低于天目山,而土壤细菌对土壤酸度较敏感。对不同地区土壤微生物的研究均表明土壤 pH 是影响其微生物多样性的重要因子^[24],Staddon 等^[25]对加拿大西部不同气候带的土壤微生物多样性和结构的研究结果表明,土壤微生物功能多样性与土壤 pH 呈正相关。徐永刚等^[2]对中国暖温带潮棕壤研究结果也表明土壤微生物生物量和细菌群落多样性指数均与土壤 pH 呈显著正相关。Chu 等^[26]对北极土壤细菌研究发现细菌群落结构和多样性根据土壤 pH 的局部变化而变化。

4 结 论

综上所述,天目山和玲珑山不同林分土壤中细菌 DGGE 条带明显多于人工湿地^[27]、草地^[28]、农田土壤^[29]和红树林地^[30]。天目山阔叶林、杉木林、马尾松林和毛竹林土壤检测到的 DGGE 条带数分别为 49、45、51 和 51 条,玲珑山阔叶林、杉木林、马尾松林和毛竹林土壤检测到的 DGGE 条带数分别为 42、42、44 和 48 条。不同林分下土壤 DGGE 带谱差异不大,天目山和玲珑山 4 种森林土壤分别有 31 条和 23 条共性条带,分别占总数的 61% 和 48% 以上,然而每种林分也有各自的特征条带,但大都并非优势种。天目山和玲珑山 4 种林分土壤细菌群落结构相似值分别为 0.72 和 0.68,说明不同植被对土壤细

菌结构有一定的影响但影响不大。相对而言,杉木林与其他3种林分的土壤细菌群落结构相似度较低,其土壤细菌多样性指数也明显低于其他3种林分,而毛竹林和马尾松林多样性指数则没有显著差异,总体而言天目山土壤细菌多样性指数要高于玲珑山。同时对两个采样区的土壤细菌群落结构进行分析发现,土壤性质对细菌群落结构的影响大于植被。

参考文献

- [1] 梁理勇. 雷州林业局桉树人工林地土壤微生物的分布规律. 中南林业学院学报, 2004, 24(4):59—61. Liang L Y. The distribution law of soil microbes in eucalyptus plantations of Leizhou Forestry Bureau (In Chinese). Journal of Central South Forestry University, 2004, 24(4):59—61
- [2] 徐永刚, 宇万太, 马强, 等. 长期不同施肥制度对潮棕壤微生物生物量碳、氮及细菌群落结构的影响. 应用生态学报, 2010, 21(8):2 078—2 085. Xu Y G, Yu W T, Ma Q, et al. Effects of long-term fertilizations on microbial biomass C and N and bacterial community structure in an Aquic Brown Soil (In Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 2010, 21(8):2 078—2 085
- [3] 孟庆杰, 许艳丽, 李春杰, 等. 不同施肥/土地利用方式对黑土细菌多样性的影响. 大豆科学, 2008, 27(3):480—486. Meng Q J, Xu Y L, Li C J, et al. Effects of different fertilization and land use history on the bacterial diversity in black soils (In Chinese). Soybean Science, 2008, 27(3):480—486
- [4] 宋亚娜, 包兴国, 李隆, 等. 利用 DGGE 法研究不同种植体系中根际微生物群落结构. 生物学杂志, 2006, 23(5):12—16. Song Y N, Bao X G, Li L, et al. Study of rhizosphere microbial community composition in different cropping systems by DGGE (In Chinese). Journal of Biology, 2006, 23(5):12—16
- [5] 赵爽, 胡江, 沈其荣. 两个水稻品种根际土壤细菌和氨氧化细菌的群落结构差异. 土壤学报, 2010, 47(5):939—945. Zhao S, Hu J, Shen Q R. Difference in community structure of bacteria and ammonia-oxidizing bacteria in rhizosphere between two different rice cultivars (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2010, 47(5):939—945
- [6] 鲁海燕, 曹靖, 杨鑫, 等. 白银地区污灌对农田土壤细菌多样性的影响. 长春理工大学学报:自然科学版, 2010, 33(2):110—117. Lu H Y, Cao J, Yang X, et al. Influence of sewage irrigation on bacterial diversity at Northwest China (In Chinese). Journal of Changchun University of Science and Technology: Natural Science Edition, 2010, 33(2):110—117
- [7] 夏北成, Zhou Jizhong, James M Tiedje. 植被对土壤微生物群落结构的影响. 应用生态学报, 1998, 9(3):296—300. Xia B C, Zhou J Z, James M T. Effect of vegetation on structure of soil microbial community (In Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 1998, 9(3):296—300
- [8] Zak D R, Holmes W E, White D C, et al. Plant diversity, soil microbial communities and ecosystem function: Are there any links? Ecology, 2003, 84:2 042—2 050
- [9] 杨喜田, 宁国华, 董惠英, 等. 太行山区不同植被群落土壤微生物学特征变化. 应用生态学报, 2006, 17(9):1 761—1 764. Yang X T, Ning G H, Dong H Y, et al. Soil microbial characters under different vegetation communities in Taihang Mountain Area (In Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 2006, 17(9):1 761—1 764
- [10] 何寻阳, 王克林, 于一尊, 等. 岩溶区植被和季节对土壤微生物遗传多样性的影响. 生态学报, 2009, 29(4):1 763—1 769. He X Y, Wang K L, Yu Y Z, et al. The responses of soil microbial taxonomic diversity on vegetation communities and seasons in Karst area (In Chinese). Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(4):1 763—1 769
- [11] 黄昌勇. 土壤学. 北京: 中国农业出版社, 2000: 50—51. Huang C Y. Soil science (In Chinese). Beijing: China Agriculture Press, 2000: 50—51
- [12] 马悦欣, Carola Holmström, Jeremy Webb, 等. 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 在微生物生态学中的应用. 生态学报, 2003, 23(8):1 561—1 569. Ma Y X, Holmström C, Webb J, et al. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology (In Chinese). Acta Ecologica Sinica, 2003, 23(8):1 561—1 569
- [13] 李丹, 王秋玉. 变性梯度凝胶电泳及其在土壤微生物生态学中的应用. 中国农学通报, 2011, 27(3):6—9. Li D, Wang Q Y. Denaturing gradient gel electrophoresis and its application in soil microbial ecology (In Chinese). Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(3):6—9
- [14] 阮晓东, 张惠文, 孙冬雪, 等. 油松阔叶混交林不同层次优势植被根区土壤真菌的群落结构. 东北林业大学学报, 2009, 37(5):48—50. Ruan X D, Zhang H W, Sun D X, et al. Fungal community structures in root zone of dominant vegetations of different layers in *Pinus tabulaeformis* broad-leaved mixed forest in Qianshan by PCR-DGGE (In Chinese). Journal of Northeast Forestry University, 2009, 37(5):48—50
- [15] 王奇赞, 徐秋芳, 姜培坤, 等. 天目山毛竹入侵阔叶林后土壤细菌群落 16S rDNA V3 区片段 PC 的 DGGE 分析. 土壤学报, 2009, 46(4):662—669. Wang Q Z, Xu Q F, Jiang P K, et al. DGGE analysis of PCR of 16S rDNA V3 fragments of soil bacteria community in soil under natural broadleaf forest invaded by *Phyllostachy pubescens* in tianmu mountain nature reserve (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2009, 46(4):662—669
- [16] Marschner P, Yang C H, Lieberei R, et al. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(11):1 437—1 445
- [17] 王新洲, 胡忠良, 杜有新, 等. 喀斯特生态系统中乔木和灌木林根际土壤微生物生物量及其多样性的比较. 土壤, 2010, 42(2):224—229. Wang X Z, Hu Z L, Du Y X, et al. Comparison of microbial biomass and community structure of rhizosphere soil between forest and shrubbery in Karst ecosystems (In Chinese). Soils, 2010, 42(2):224—229
- [18] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 146—195. Lu R K. Analytical methods for soil and agro-chemistry (In Chinese). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000: 146—195

- [19] 张金屯. 数量生态学. 北京: 科学出版社, 2004. Zhang J T. Quantitative ecology (In Chinese). Beijing: Science Press, 2004
- [20] Magurran A E. Ecological diversity and its measurement. Princeton: Princeton University Press, 1988
- [21] 杜玮超, 袁霞, 曲同宝. 土壤微生物多样性与地上植被类型关系的研究进展. 当代生态农业, 2011(1/2):14—18. Du W C, Yuan X, Qu T B. Research progress of the relationship between soil microbial diversity and above-ground vegetation types (In Chinese). Contemporary Eco-Agri Culture, 2011(1/2):14—18
- [22] 杨玉盛, 俞新妥, 邱仁辉, 等. 不同栽杉代数根际土壤肥力及生物学特性变化. 应用与环境生物学报, 1999, 5(3):254—258. Yang Y S, Yu X T, Qiu R H, et al. Variation of rhizospheric soil fertility under different Chinese fir rotations (In Chinese). Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 1999, 5(3):254—258
- [23] Gelsomino A, Keijzer-Wolters A C, Cacco G, et al. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. Microbiology Methods, 1999, 38:1—15
- [24] O'Donnell A G, Seasman M, Macrae A, et al. Plants and fertilizers as drivers of changes in microbial community structure and function in soils. Plant and Soil, 2001, 23(2):135—145
- [25] Staddon W J, Trevors J T, Duchesne L C, et al. Soil microbial diversity and community structure across a climatic gradient in western Canada. Biodiversity and Conservation, 1998, 7: 1 081—1 092
- [26] Chu H Y, Fierer N, Lauber C L, et al. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. Environmental Microbiology, 2010, 12(11): 2 998—3 006
- [27] 赵庆节. 种植不同植物的人工湿地土壤微生物群落研究. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2011, 29(3): 47—52. Zhao Q J. Study on the soil microbial diversity in the running constructed wetland cultivated with four plants (In Chinese). Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science, 2011, 29(3): 47—52
- [28] 周小奇, 王艳芬, 蔡莹. 内蒙古典型草原细菌群落结构的 PCR-DGGE 检测. 生态学报, 2007, 27(5):1 684—1 689. Zhou X Q, Wang Y F, Cai Y. PCR-DGGE detection bacterial community structure in the Inner Mongolia steppe with two different DNA extraction methods (In Chinese). Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(5):1 684—1 689
- [29] 黄进勇, 岳彩鹏, 周伟. 麦田土壤细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析. 河南农业大学学报, 2007, 41(4):396—400. Huang J Y, Yue C P, Zhou W. Analysis of bacterium community in winter wheat soil using DGGE of 16SrDNA V3 fragment PCR products (In Chinese). Journal of Henan Agricultural University, 2007, 41(4): 396—400
- [30] 刘慧杰, 杨彩云, 田蕴. 基于 PCR-DGGE 技术的红树林区微生物群落结构. 微生物学报, 2010, 50(7):923—930. Liu H J, Yang C Y, Tian Y. Analysis of microbial community structure in mangrove sediments by PCR-DGGE technique (In Chinese). Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(7):923—930

BACTERIAL COMMUNITY STRUCTURE IN SOILS UNDER FOUR MAIN TYPES OF VEGETATION IN SUBTROPICAL AREA

Liu Burong Xu Qiufang[†] Qin Hua Guo Shuai Shi Huili

(School of Environmental and Resources Sciences, Joint Lab of Forest Soils and Environment, Zhejiang Agriculture and Forestry University & ISSCAS, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300, China)

Abstract Broad-leaved forest, Chinese fir forest, Mason pine forest and Bamboo grove are widely distributed in subtropical areas of South China. To investigate more information of soil bacterial community structures of natural forests, PCR-DGGE technology was applied to study structures of the soil bacterial communities in these four types of natural forests distributed in from the Tianmu Mountains and Linglong Mountains. Results show that the number of DGGE strips detected in the four kinds of forest soils in the Tianmu Mountains was 49, 45, 51 and 51, and in the Linglong Mountains, it was 42, 42, 44 and 48, respectively. DGGE analysis reveals little variation between the soils in fingerprint. The four soils in the Tianmu Mountains had 31 DGGE strips in common, while the soils in the Linglong Mountains had 23, accounting for 61% and 48% or more, respectively, of the total strips detected, and what is more, each type of forest had its own characteristic strips; Relatively speaking, the two sample lots of Chinese fir forest were both quite low in similarity to the other sample lots of other forest stands in soil bacterial structure, being 0.72 and 0.68 respectively in value, and diversity indices of their soil bacterial communities were obviously lower than the others'. However, Bamboo groves and Mason pine forests were not much different in soil bacteria diversity. DGGE analysis of soil bacteria from two sampling sites revealed that the effect of soil properties was greater than that of vegetation on soil bacterial community structure.

Key words Vegetation type; Soil; Bacterial community structure; Biodiversity; PCR-DGGE