

鼎湖山不同演替阶段森林土壤细菌多样性

柳春林, 左伟英, 赵增阳, 邱礼鸿*

中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510275

摘要: 【目的】了解鼎湖山早、中、后 3 个演替阶段的 3 类森林(针叶林、混交林、阔叶林)土壤细菌群落结构及其多样性, 为下一步研究不同演替阶段森林土壤微生物的功能及其与植物的相互作用提供依据。【方法】在代表性林区采集土样, 从中提取总 DNA, 利用细菌通用引物 27F 和 1492R PCR 扩增 16S rDNA 并构建文库。从所构建的 3 个文库中各挑取 150 个阳性克隆子并对插入片段进行测序, 利用 Mothur 软件对所得序列进行分析。【结果】从针叶林、混交林和阔叶林文库中分别得到 122、118 和 120 条有效 16S rDNA 序列, 各代表 70、64、72 个 OTUs (operational taxonomic units, 以 97% 相似性为划分标准)。分析结果显示, 共检测到 8 个细菌门类, 其中酸杆菌门 (Acidobacteria) 在针叶林、混交林和阔叶林土样中分别占 53.3%, 67.8% 和 60%; 变形杆菌门 (Proteobacteria) 分别占 29.5%, 20.3% 和 32.5%; 其它如厚壁菌, 放线菌等均不超过 10%。3 类森林土壤细菌群落结构差异显著 ($P < 0.05$), 3 者两两间共有的 OTU 数量占检测到的 OTU 总数的比例均低于 25%, 其中阔叶林土壤细菌有着最高的 Chao 指数 (414.2) 和 Shannon 指数 (3.90), 及最低的 Simpson 优势度指数 (0.0249)。【结论】鼎湖山针叶林、混交林和阔叶林 3 类林区土壤细菌在种群构成上差异显著, 其中阔叶林土壤细菌丰富度及多样性相对较高, 但 3 者在大类组成方面比较相似, 均为酸杆菌占绝对优势, 变形杆菌次之。

关键词: 细菌多样性, 16S rDNA, 鼎湖山, 不同演替阶段森林

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 12-1489-08

鼎湖山自然保护区 (DHSBR) 位于广东省肇庆市东北部, 是中国第一个国家自然保护区, 也是中国第一批加入联合国科教文组织“人与生物圈”计划的世界生物圈保护区, 是国际性的学术交流和研究基地。鼎湖山植被类型是亚热带森林演替过程典型的代表: 处于早、中、后 3 个演替阶段的代表性森林, 分别为马尾松林 (简称针叶林, pine forest, PF) 一针阔混交林 (简称混交林, pine-broadleaf mixed forest, MF) 一季风常绿阔叶林 (简称阔叶林,

monsoon evergreen broadleaf forest, MEBF)^[1]。目前关于鼎湖山土壤微生物的研究甚少, 尚未见到对该地不同演替阶段森林土壤细菌群落结构及多样性方面的研究报道。

土壤微生物群落结构是土壤生态功能的基础, 它通过参与土壤有机质积累和矿化等过程影响土壤养分循环及其有效性^[2], 调节和指示土壤功能^[3], 对整个生态系统也有一定的调节作用。在土壤微生物中, 以细菌的种类和数量最多^[4], 细菌在土壤营

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (31030015); 中山大学重大项目培育和新兴、交叉学科资助计划项目 (2010330003165003)

* 通信作者。Tel: +86-20-84113009; E-mail: qiuilh@mail.sysu.edu.cn

作者简介: 柳春林 (1989-), 男, 江西省萍乡人, 硕士研究生, 研究方向为资源微生物学。E-mail: liuchunlin19890206@163.com

收稿日期: 2012-06-15; **修回日期:** 2012-07-29

养元素循环、有机质的形成与分解、土壤结构成分的形成、生态环境的改善、植物的生长发育和作物病虫害防治等方面均起着极其重要的作用^[5]。近年来的研究表明,细菌在抗金属污染方面也发挥着重要作用,且细菌群落结构的差异及其变化规律可反映土壤现状与变化趋势,可用来指示土壤生态功能和衡量环境治理措施的效果^[6]。因此土壤细菌多样性的研究具有重要的意义。

过去对细菌的研究大多是建立可培养基础上,而 95%–99% 的细菌还未能被培养^[7],因此绝大多数土壤细菌还未被研究。近年来随着分子生物学技术的发展及其在微生物生态学中的应用,人们对微生物多样性的研究有了很大的进步,克服了微生物传统培养技术对研究造成的限制,鉴定出大量未被认知的微生物新种。16S rDNA 因其保守性和特异性,常被用作微生物分类系统研究的主要依据,用于细菌的分类鉴定。16S rDNA 文库的建立及其序列分析能够比较系统地揭示生态环境中原核微生物的多样性及其结构,已成为微生物分子生态学中用来研究各类生态环境中原核微生物群落组成结构的主要方法之一^[8–9]。本实验采用构建 16S rDNA 文库的方法对鼎湖山不同演替阶段森林土壤细菌群落的多样性进行分析,为进一步研究鼎湖山自然保护区森林生态系统提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究区概况及土样采集

鼎湖山国家自然保护区位于广东省中部(112°33'E, 23°10'N),面积约 1100 hm²,为低山丘陵地貌,土壤为赤红壤(其中阔叶林的土壤为水化赤红壤),pH 呈酸性^[10]。该地区属亚热带季风湿润型气候,季节性气候交替明显,年均降水量为 1927 mm,75% 分布在 5 至 9 月,12 至 2 月仅占 6%^[11],年均相对湿度为 80%,年均气温为 21℃,最冷月(1 月)和最热月(7 月)的平均气温分别是 12.6℃ 和 28.0℃^[12]。

试验土壤样品采于 2011 年 6 月 12 日。在每类林地中分别选取 10 个样点采集土样,采样深度 0–20 cm,每个样点采集约 1 kg 土样,将 10 个样点的土样混匀后取约 1 kg 装入保鲜袋,–20℃ 保存。

1.2 土样总 DNA 的提取与检测

首先将土壤样品用 TENP buffer (50 mmol/L Tris, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 0.01 g/mL PVP, pH 10) 预处理,然后用蛋白酶 K/SDS 法提取土壤微生物的总 DNA^[13],并在 0.8% 的琼脂糖凝胶中电泳检测提取到的 DNA 质量。

1.3 土样细菌 16S rDNA 的扩增和文库的构建

用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACCTTGTACGACTT-3') 扩增 3 种土样总 DNA 中的细菌 16S rDNA 片段。扩增反应体系: 10 × Buffer 5 μL, 模板 DNA 5 μL, Taq 酶 (5 U/μL) 1 μL, dNTP (各 2.5 mmol/μL) 8 μL, 引物 27F 和引物 1492R (20 pmol/μL) 各 1 μL, 补水至 50 μL。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 40 s, 53℃ 50 s, 72℃ 2 min, 32 循环; 72℃ 延伸 20 min。每种样品重复扩增 5 次,将 5 次的扩增产物混合均匀以消除单次扩增的偏向性。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物丰度及其特异性,按 E. Z. N. A.® Gel Extraction Kit 说明书切胶回收目的片段。

回收纯化后的 16S rDNA 片段通过 TA 克隆连接 pMD18-T vector 并转化到 *E. coli* DH5α 中,氨苄青霉素 (100 μg/mL) 抗性筛选阳性克隆,每个文库分别挑取 150 个单克隆,用引物 M13-47, RV-M 进行菌落 PCR 并电泳检测,阳性克隆的 PCR 产物片段大小约为 1.6 kb (16S rDNA 片段约 1.5 kb,载体两端约 0.1 kb)。将阳性克隆送测序。

1.4 16S rDNA 文库多样性分析

利用 Mallard 软件对测序所得序列进行嵌合体检验并去除嵌合体序列。用 Mothur^[14] 对所得序列进行分析,以 97% 相似性为标准划分操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU),用 Chao^[15] 的方法对物种丰富度进行估算,并计算 Shannon 指数和 Simpson 优势度指数。采用 Parsimony 和 Unifrac unweighted 检验方法对样本间细菌群落结构差异性进行比较。

2 结果和分析

2.1 土壤总 DNA 的提取

本实验采用直接提取法提取土壤总 DNA,因而更具代表性,能够比较全面地反映土壤微生物的多样性。在提取土壤 DNA 之前对土壤进行预处理,预处理的缓冲液中加入 PVP (聚乙烯吡咯烷酮),有

利于去除土壤中部分腐植酸类物质，同时加入的 EDTA 能够通过络合金属离子从而有效地抑制核酸酶的活性。从经过预处理的土样中提取得到的 DNA 比较纯净，DNA 片段大小约为 23 kb(图 1)，适合进行后续反应。

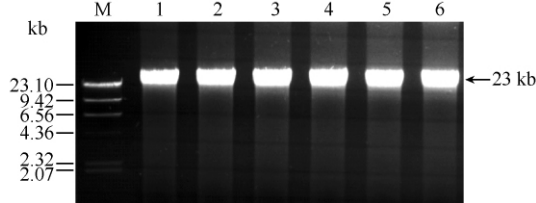


图 1 土壤总 DNA 电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis of total DNA extracted from soil samples. M: λ DNA/*Hind* III; 1–6: soil samples.

2.2 土壤细菌 16S rDNA 的扩增

每种土壤总 DNA 样品做 5 组重复的 16S rDNA PCR 扩增，将扩增产物混合均匀后用 1% 琼脂糖电泳检测，结果显示得到约 1.6 kb 的条带(图 2)，与预期大小一致。

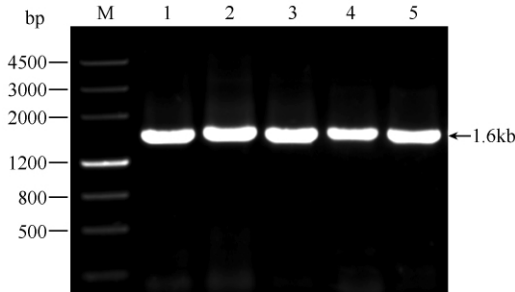


图 2 16S rDNA PCR 扩增结果电泳检测

Fig. 2 PCR amplification of 16S rDNA. M: Marker; 1–5: PCR products.

2.3 土壤细菌 16S rDNA 文库的构建和序列分析

通过 TA 克隆将目的片段连接 pMD18-T 并电转 *E. coli* DH5a 构建 16S rDNA 文库。分别挑选 150 个克隆，对插入片段进行测序，去除嵌合体序列后，针叶林、混交林和阔叶林分别得到 122、118 和 120 条有效序列，将序列上传 GenBank，获序列号 JQ973233-JQ973592。通过 Mothur 分析，以 97% 相似性水平为标准划分 OTU。结果如表 1 所示，针叶林、混交林和阔叶林分别得到 70、64 和 72 个 OTUs，Coverage C 分别为 63.3%、67.3% 和 60.7%，稀缺性曲线(图 3)显示 OTU 数目随克隆子数增多而增加，但增幅逐渐变小，曲线渐渐开始平缓，表明挑取的克隆数已基本能够反映样品文库中优势细菌类群的数

量关系。

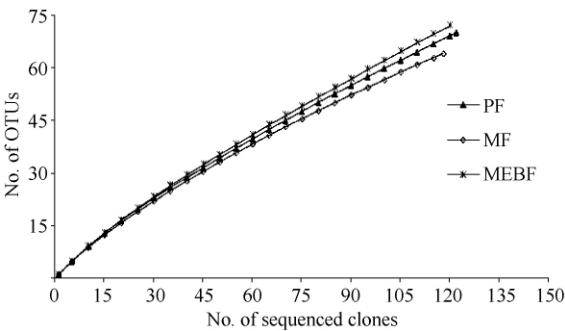


图 3 细菌 16S rDNA 稀缺性曲线(克隆分型相似性 $\geq 97\%$)

Fig. 3 Rarefaction curves generated for 16S rDNA libraries at a level of sequence similarity $\geq 97\%$.

表 1 基于 16S rDNA 序列的三类森林土壤细菌生态多样性指数

Table 1 The ecological indexes of bacterial communities of three forest soils based on 16S rDNA sequences					
Sample	OTU	Coverage (%)	Chao	Shannon (H)	Simpson index
PF	70	63.3	218.3	3.84	0.0276
MF	64	67.3	299.2	3.70	0.0371
MEBF	72	60.7	414.2	3.90	0.0249

登录 NCBI，将测序得到的序列进行 Blast 分析，并将比对结果进行统计分析(表 2)。酸杆菌门(Acidobacteria)在 3 类土壤细菌中均占绝对优势，在混交林克隆文库中优势最为明显，有 80 个克隆子，占 67.8%，在针叶林和阔叶林克隆文库中分别有 65 和 72 个克隆子，分别占 53.3% 和 60%；针叶林，混交林和阔叶林克隆文库中各有 29.5%，20.3% 和 32.5% 的克隆子属于变形杆菌门(Proteobacteria)，其中 α -变形杆菌最多，分别占 22.1%，13.6% 和 24.2%。除 Acidobacteria 和 Proteobacteria 外，针叶林、混交林和阔叶林克隆文库还都含有厚壁菌门(Firmicutes)，所占比例分别为：6.6%，4.2%，2.5%；浮游菌门(Planctomycetes)所占比例分别为：0.8%，3.4%，0.8%；疣微菌门(Verrucomicrobia)：1.6%，2.5%，0.8%。针叶林和阔叶林文库中还有放线菌门(Actinobacteria)，所占比例分别为 4.1% 和 1.7%。在针叶林中还发现的 2.5% 绿弯菌门(Chloroflexi)和 1.6% 热微菌门(Thermomicrobia)。

2.4 土壤细菌 16S rDNA 文库序列多样性分析

采用 Mothur 对文库序列多样性进行分析(表 1)，用 Chao 的方法对文库的物种丰富度进行估算，

阔叶林土壤细菌文库 Chao 指数为 414.2, 高于针叶林 (218.3) 和混交林 (299.2); 通过计算 Shannon 指数及 Simpson 优势度指数来分析细菌的多样性, 阔

叶林土壤细菌 Shannon 指数 (3.90) 最高, 且 Simpson 优势度指数 (0.0249) 最低, 表明阔叶林土壤细菌多样性最高。

表 2 基于 16S rDNA 序列的三类森林土壤细菌群落结构

Table 2 The community structure of bacteria from three forest soils based on 16S rDNA sequence analysis

Bacterial division	No. (%) of sequences; No. (%) of OTUs		
	PF	MF	MEBF
Acidobacteria	65 (53.3); 31 (44.3)	80 (67.8); 34 (53.1)	72 (60); 35 (48.6)
<i>Holophaga</i> sp.	50 (35.4); 19 (27.1)	50 (42.4); 15 (23.4)	28 (23.3); 10 (13.9)
Acidobacteriaceae	17 (13.9); 8 (11.4)	21 (17.8); 13 (20.3)	31 (25.8); 13 (18.1)
Unknown	5 (4.1); 4 (5.7)	9 (7.6); 6 (9.4)	13 (10.8); 12 (16.7)
Proteobacteria	36 (29.5); 22 (31.4)	24 (20.3); 20 (31.2)	39 (32.5); 28 (38.9)
Alphaproteobacteria	27 (22.1); 14 (20)	16 (13.6); 12 (18.8)	29 (24.2); 21 (29.2)
Rhizobiales	10 (8.2); 5 (7.1)	6 (5.1); 4 (6.25)	13 (10.8); 7 (9.7)
Hyphomicrobiace	8 (6.6); 3 (4.3)	3 (2.5); 1 (1.6)	7 (5.8); 3 (4.2)
Methylocystaceae	1 (0.8); 1 (1.4)	3 (2.5); 3 (4.7)	6 (5); 4 (5.6)
Bradyrhizobiaceae	1 (0.8); 1 (1.4)	0; 0	0; 0
Rhodospirillales	17 (13.4); 9 (12.9)	8 (6.8); 6 (9.4)	11 (9.2); 9 (12.5)
Rhodospirillaceae	15 (12.3); 7 (10)	8 (6.8); 6 (9.4)	8 (6.7); 6 (8.3)
Acetobacteraceae	2 (1.6); 2 (2.9)	0; 0	3 (2.5); 3 (4.2)
Caulobacteriales	0; 0	0; 0	3 (2.5); 3 (4.2)
Unknown	0; 0	2 (1.7); 2 (3.1)	2 (1.7); 2 (2.8)
Betaproteobacteria	2 (1.6); 2 (2.9)	1 (0.9); 1 (1.6)	2 (1.7); 2 (2.8)
Gammaproteobacteria	6 (4.9); 5 (7.1)	4 (3.3); 4 (6.3)	6 (5); 3 (4.2)
Xanthomonadales	3 (2.5); 2 (2.9)	3 (2.5); 3 (4.7)	6 (5); 3 (4.2)
Legionellales	3 (2.5); 3 (4.3)	1 (0.9); 1 (1.6)	0; 0
Deltaproteobacteria	1 (0.8); 1 (1.4)	3 (2.5); 3 (4.7)	2 (1.7); 2 (2.8)
Firmicutes	8 (6.6); 5 (7.1)	5 (4.2); 3 (4.7)	3 (2.5); 3 (4.2)
Actinobacteria	5 (4.1); 5 (7.1)	0; 0	2 (1.7); 2 (2.8)
Planctomycetes	1 (0.8); 1 (1.4)	4 (3.4); 2 (3.1)	1 (0.8); 1 (1.4)
Verrucomicrobia	2 (1.6); 2 (2.9)	3 (2.5); 3 (4.7)	1 (0.8); 1 (1.4)
Chloroflexi	3 (2.5); 3 (4.3)	0; 0	0; 0
Thermomicrobia	2 (1.6); 1 (1.4)	0; 0	0; 0
Unknown	0; 0	2 (1.7); 2 (3.1)	2 (1.7); 2 (2.8)
Total	122 (100); 70 (100)	118 (100); 64 (100)	120 (100); 72 (100)

2.5 三种土壤样品细菌群落结构比较

采用 Mothur 计算 3 种土壤细菌群落间的 Jaccard 相似性系数, 再用 Parsimony 和 Unifrac unweighted 两种假设性检验方法分析 3 种土壤细菌群落结构间的差异显著性 (表 3)。细菌群落间 Jaccard 相似性系数为 0.308 – 0.460, 为中等不相似水平, 其中针叶林与混交林土壤细菌群落相似度最

低 (0.308), 说明从针叶林向混交林演替过程中土壤细菌群落结构变化最大, 而混交林与阔叶林细菌群落最为相似 (0.460)。Shared OTUs 和 Jaccard similarity 表明 3 种土壤细菌群落具有一定的相似性, 但 Parsimony 检验 ($P < 0.05$) 和 Unifrac unweighted ($P < 0.001$) 表明 3 种森林土壤细菌群落结构差异显著。

表 3 三类森林土壤细菌群落结构相似性比较

Table 3 Comparison on similarities among three bacterial community structures from soils

Sample	Shared OTUs	Jaccard similarity	Parsimony (P)	Unifrac, unweighted (P)
PF-MF	13	0.308	0.002	< 0.001
PF-MEBF	16	0.433	0.009	< 0.001
MF-MEBF	15	0.460	0.034	< 0.001

3 讨论

目前,鼎湖山自然保护区动植物群落结构和土壤理化性质等方面已有比较详细深入的研究,但土壤微生物多样性方面还未见报道。本研究采用构建细菌 16S rDNA 克隆文库和挑选克隆直接测序的方法,对鼎湖山处于不同演替阶段的代表性森林:针叶林、混交林及阔叶林的土壤细菌群落结构进行了分析研究。本研究分别从每种土壤细菌 16S rDNA 文库中随机挑选 150 个克隆进行测序分析,得到的 Coverage C 分别为 63.3%,67.3% 和 60.7%,稀缺性曲线未达到明显平台期,是由于本实验采用直接挑选克隆进行测序的方法,而通常采用的 DGGE、RFLP 等方法筛选差异性核苷酸序列可能排除了一些亲缘关系比较相近的克隆,造成少量的 OTU 也能到达稀缺曲线平台期和 Coverage C 虚高的假象。直接挑选克隆测序能够避免亲缘性相近序列的遗漏,且随机挑选的克隆能够代表细菌群落中占优势地位的基因类型,所获得的细菌多样性信息能够大致反映出相应土壤细菌群落结构的基本状况。

本试验 3 种林地土壤细菌中 Acidobacteria 均占绝对优势,在混交林中优势最为明显,占 67.8%,高于针叶林(53.3%)和阔叶林(60%)。该结果与很多类似研究结果不同,Tait 等^[16]在对美国马萨诸塞州礁湖土壤细菌的研究中发现,72% 的细菌属于 Proteobacteria,未发现 Acidobacteria;Axelrood 等^[17]发现英国哥伦比亚森林土壤细菌中 46% 为 Proteobacteria,只有约 9% 为 Acidobacteria。Fierer 等^[18]通过对不同条件下的林地土壤微生物多样性进行分析比较后,发现土壤 pH 值和含水量等性质对土壤细菌多样性有着重要影响。据以上分析,本研究揭示的鼎湖山森林土壤中酸杆菌占绝对优势的现象可能与鼎湖山土壤呈较强酸性(pH 值为 3 - 4.5)有关^[10],酸性土壤环境有利于酸杆菌的生长。酸杆菌主要分布于陆地、海洋沉积物和活性淤泥中^[19],是基于分子生态学新近划分出的一类细菌,其中绝大部分为不可培养的。本实验测序得到的酸杆菌序列,Blast 显示,相似性较高的序列大多数属于是未被培养的种类。目前关于酸杆菌的研究报道

较少,但其在试验土壤细菌中占如此大的比例,推测酸杆菌在整个微生物生态甚至是整个森林生态环境中有着非常重要的作用。酸性土壤有利于酸杆菌,但不利于某些细菌类群的生长,造成细菌多样性的降低^[18]。与其它类似研究相比^[9],本研究发现的细菌类群相对较少,尤其是一些在土壤中普遍存在的类群,如放线菌(Actinobacteria),只在针叶林和阔叶林中有少量发现。

本研究发现的酸杆菌大部分是全噬菌属细菌(*Holophaga* sp.),其次是酸杆菌科细菌(Acidobacteriaceae)。*Holophaga* sp. 在混交林中所占比例最高(42.4%),而 Acidobacteriaceae 在阔叶林含量最高(25.8%)。从针叶林演替到混交林,土壤中 Acidobacteria 从 53.3% 增长到 67.8%,主要体现在 *Holophaga* sp. 从 35.4.% 增长到 42.4% 上;但从混交林向阔叶林演替过程中,*Holophaga* sp. 所占比例又降至 23.3%,造成 Acidobacteria 所占比例降至 60%;整个演替过程中,Acidobacteriaceae 细菌逐渐增加,从 13.9% (针叶林)到 17.8% (混交林),再到 25.8% (阔叶林)。*Holophaga* sp. 目前被鉴定和全面描述的只有 *Holophaga foetida*^[20],是一类严格厌氧,革兰氏阴性细菌,能够通过氧化多种有机酸、硝酸盐及腐植酸等物质来获取能量,而大部分 Acidobacteriaceae 好氧,嗜酸,且只能利用部分糖类,不能利用有机酸和腐植酸等物质作为碳源^[21]。鼎湖山酸性土壤中包含各种有机酸及腐植酸,可作为 *Holophaga* sp. 的碳源,促进其生长,因此 *Holophaga* sp. 要多于 Acidobacteriaceae。随着森林的演替,受土壤理化性质及其地上植被的影响,各类细菌含量也会发生变化。

除了酸杆菌之外,还发现较大比例的 Proteobacteria,其在阔叶林中所占比例最大,为 32.5%,在针叶林和混交林中分别占 29.5% 和 20.3%。其中 α -变形杆菌(Alphaproteobacteria)最多,在阔叶林中含量占 24.2%,接近混交林(13.6%)的两倍,在针叶林中占 22.1%。本研究发现的 Alphaproteobacteria 主要是根瘤菌目(Rhizobiales)和红螺菌目(Rhodospirillales),两个目在阔叶林中所占比例分别为 10.8% 和 9.2%;Rhizobiales 和 Rhodospirillales 中大部分细菌都能固

氮,为地上植物提供营养。早前研究证明鼎湖山不同演替阶段森林中阔叶林土壤有机质总 N 含量最高^[22],这可能与阔叶林土壤中含有较多的 α -变形杆菌有关,通过地下土壤微生物的固氮作用为地上植物提供更多的营养。其次,阔叶林中还发现有 2.5% 的柄杆菌目细菌(Caulobacterales)。除 α -变形杆菌外,含量最多的是 γ -变形杆菌(Gammaproteobacteria),分别在针叶林、混交林和阔叶林中占 4.9%,3.3% 和 5%,均包含有黄单胞菌目细菌(Xanthomonadales),且在阔叶林中占 5%,含量最高。黄单胞菌目中存在植物致病菌,较为常见的是黄单胞菌属,土壤中黄单胞菌的含量可能会影响地上部分植物的生长状况。

本研究采用 Mothur 软件对序列进行多样性分析及细菌群落结构差异性检验,结果显示(表 1),细菌物种丰富度:阔叶林 > 混交林 > 针叶林;细菌多样性:阔叶林 > 针叶林 > 混交林,阔叶林土壤细菌的物种丰富度及多样性均最高。土壤微生物丰富度及多样性随生态系统的演替而变化,这可能有益于群落更好的适应新的生态环境。混交林 Simpson 优势度指数(0.0371)最高,这与 Acidobacteria 在混交林中占到最高比例,优势最为明显相对应。

3 种土壤样品细菌群落间 Jaccard 相似性系数为 0.308–0.460,为中等不相似水平。Shared OTUs 和 Jaccard similarity 表明 3 种土壤细菌群落具有一定的相似性且 Shannon 指数相近,但 Shannon 指数所反映的是系统的多样性,不能直接反映群落组成的差异;另外,Parsimony 检验和 Unifrac unweighted 检验的 *P* 值均小于 0.05,证实了 3 种森林土壤具有不同的细菌群落结构。从 3 种土壤样品共有 OTU 的数目来看,针叶林与阔叶林最多(16 个),分别占两者 OTU 总数的 22.9% 和 22.2%,三类森林土壤相同的细菌种类不超过 25%,表明各森林土壤细菌群落在种类水平上存在较大的差异。土壤微生物在生态系统中与植物紧密相关^[25],由于大多数土壤微生物以植物凋落物或根系分泌物为营养,植物群落多样性和群落结构的改变必然引起土壤有机质组成的变化,进而引起土壤微生物群落结构的改变^[26]。本研究结果表明,鼎湖山不同演替阶段森林土壤细菌的群落结构差异显著,这可能是由于在鼎湖山森

林演替过程中植被类型的改变所造成的^[1],而土壤微生物组成的变化也会反作用于地上植被,影响某种植物在该类土壤中的生长繁殖^[25]。本研究初步揭示了鼎湖山 3 种演替阶段森林土壤细菌的群落组成,为以后研究土壤微生物与森林植被的相互作用提供了依据。

参考文献

- [1] 彭少麟,王伯荪. 鼎湖山森林群落演替之研究. 华南植物学报(*Botanical Journal of South China*), 1993, 试刊(01):34-42.
- [2] 李刚,赵建宁,杨殿林. 抗草甘膦转基因大豆对根际土壤细菌多样性的影响. 中国农学通报(*Chinese Agricultural Science Bulletin*), 2011, 27(01):100-104.
- [3] Romaniuk R, Giuffr  L, Costantini A, Nannipieri P. Assessment of soil microbial diversity measurements as indicators of soil functioning in organic and conventional horticulture systems. *Ecological Indicators*, 2011, 11(5):1345-1353.
- [4] Alexander M. Introduction to soil microbiology. *Soil Science*, 1978, 125(5):331.
- [5] Kennedy AC. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 1999, 74(1-3):65-76.
- [6] Stefanowicz AM, Niklinska M, Kapusta P, Szarek-Lukaszewska G. Pine forest and grassland differently influence the response of soil microbial communities to metal contamination. *Science of the Total Environment*, 2010, 408(24):6134-6141.
- [7] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Review*, 1995, 59(1):143-169.
- [8] 赵志祥. 结合宏基因组末端随机测序和 16S rDNA 技术分析室温黄瓜根围土壤细菌多样性. 生态学报(*Acta Ecologica Sinica*), 2010, 30(14):3849-3857.
- [9] 王霞,陈哲,袁红朝,吴敏娜,魏文学,吴金水,秦红灵. 应用 16S rDNA 克隆文库技术研究长期稻草还田对水稻土细菌多样性的影响. 生态学报(*Acta Ecologica Sinica*), 2010, 30(13):3865-3874.
- [10] 刘菊秀,余清发,褚国伟,周国逸,温达志. 鼎湖山主要森林类型土壤 pH 值动态变化. 土壤与环境(*Soil*

- and *Environmental Sciences*), 2001, 10 (01) :39-41.
- [11] 黄展帆, 范征广. 鼎湖山的气候. //中国科学院鼎湖山森林生态系统定位研究站. 热带亚热带森林生态系统研究. 广州: 科学普及出版社广州分社, 1982.
- [12] Mo J, Zhang WEI, Zhu W, Gundersen PER, Fang Y, Li D, Wang HUI. Nitrogen addition reduces soil respiration in a mature tropical forest in southern China. *Global Change Biology*, 2007, 14 (2) :403-412.
- [13] Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 (2) :316-322.
- [14] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ et al. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (23) :7537-7541.
- [15] Kemp PF, Aller JY. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47 (2) :161-177.
- [16] Tait E, Carman M, Sievert SM. Phylogenetic diversity of bacteria associated with ascidians in Eel Pond (Woods Hole, Massachusetts, USA). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 342 (1) :138-146.
- [17] Axelrood PE, Chow ML, Radomski CC, McDermott JM, Davies J. Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, 48 (7) :655-674.
- [18] Fierer N, Jackson RB. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103 (3) :626.
- [19] Schabereiter-Gurtner C, Saiz-Jimenez C, Piñar G, Lubitz W, Rölleke S. Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 211 (1) :7-11.
- [20] Coates JD, Ellis DJ, Gaw CV, Lovley DR. Geothrix fermentans gen. nov., sp. nov., a novel Fe (III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 1999, 49 (4) :1615-1622.
- [21] Koch IH, Gich F, Dunfield PF, Overmann J. Edaphobacter modestus gen. nov., sp. nov., and Edaphobacter aggregans sp. nov., acidobacteria isolated from alpine and forest soils. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2008, 58 (5) :1114-1122.
- [22] Hou Y-P, Peng S-L, Chen B-M, Ni G-Y. Inhibition of an invasive plant (Mikania micrantha H. B. K.) by soils of three different forests in lower subtropical China. *Biological Invasions*, 2010, 13 (2) :381-391.
- [23] Gilbert JA, Schloss PD, Gevers D, Westcott SL. Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. *PLoS ONE*, 2011, 6 (12) :e27310.
- [24] Huse SM, Welch DM, Morrison HG, Sogin ML. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environmental Microbiology*, 2010, 12 (7) :1889-1898.
- [25] Wardle DA. Ecological Linkages Between Aboveground and Belowground Biota. *Science*, 2004, 304 (5677) :1629-1633.
- [26] Hooper DU, Bignell DE, Brown VK, Brussard L, MARK Dangerfield J, Wall DH, Wardle DA, Coleman DC, Giller KE, Lavelle P. Interactions between aboveground and belowground biodiversity in terrestrial ecosystems: patterns, mechanisms, and feedbacks. *BioScience*, 2000, 50 (12) :1049-1061.

Bacterial diversity of different successional stage forest soils in Dinghushan

Chunlin Liu, Weiying Zuo, Zengyang Zhao, Lihong Qiu*

State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: [Objective] The aim of the present study was to investigate the soil bacterial diversity of pine forest (PF), pine-broadleaf mixed forest (MF) and monsoon evergreen broadleaf forest (MEBF), the typical forest types that represent early, middle and late successional stage forests in Dinghushan, respectively. The results obtained will also provide information for further examination of the relationship between the soil bacterial diversity and ecological function of the forests. [Method] Three total DNA samples were extracted directly from soil samples collected from PF, MF and MEBF, and then the 16S rDNA sequences were PCR amplified and the libraries were constructed, respectively. For each of the three libraries constructed, 150 positive clones were picked randomly and the inserted 16S rDNA were sequenced. The soil bacterial diversity of the forests was analyzed by Mothur based on the sequences obtained. [Result] A total of 122, 118 and 120 valid 16S rDNA sequences were obtained from PF, MF and MEBF, which represented 70, 64 and 72 operational taxonomic units (OTUs, definition at a level of 97% similarity), respectively. Bacteria belonging to 8 phyla were identified. Among them, Acidobacteria accounted for 53.3%, 67.8% and 60%, while Proteobacteria took up 29.5%, 20.3% and 32.5% in PF, MF and MEBF, respectively. The other bacterial phyla identified each accounted for less than 10%. The bacterial community structure differed significantly at species level among three soil samples ($P < 0.05$) with the percentages of the shared OTUs between any two soil samples lower than 25%. MEBF had the highest Chao index (414.2), Shannon index (3.90) and the lowest Simpson dominance index (0.0249). [Conclusion] The soil bacterial community structure differed significantly at species level among PF, MF and MEBF in Dinghushan, while they have a similar structure at phyla or class levels with Acidobacteria predominated followed by Proteobacteria.

Keywords: bacterial diversity, 16S rDNA, Dinghushan, different successional stage forest

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31030015) and by the Grant for Major Projects and Emerging Interdisciplinary Studies from Sun Yat-sen University (2010330003165003)

* Corresponding author. Tel: +86-20-84113009; E-mail: qiuilh@mail.sysu.edu.cn

Received: 15 June 2012 / Revised: 29 July 2012

《微生物学报》审稿程序

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,3-6个月之内发表。

(1) 收到来稿后,首先要由编辑初审,通过后再送外审。将请2位专家进行审阅,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。

(2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。