



## 普洱地区茶叶内生细菌与根际土壤细菌群落结构分析

王桥美<sup>1,2,3</sup>, 严亮<sup>2,3</sup>, 杨瑞娟<sup>2,3</sup>, 彭文书<sup>2,3</sup>, 季爱兵<sup>2,3</sup>, 刘丽<sup>2,3</sup>, 张文杰<sup>2,3</sup>, 胡先奇<sup>1\*</sup>

1 云南农业大学植物保护学院, 云南 昆明 650201

2 滇西应用技术大学普洱茶学院, 云南 普洱 665000

3 普洱茶研究院微生物实验室, 云南 普洱 665000

王桥美, 严亮, 杨瑞娟, 彭文书, 季爱兵, 刘丽, 张文杰, 胡先奇. 普洱地区茶叶内生细菌与根际土壤细菌群落结构分析. 微生物学报, 2022, 62(2): 703–714.

Wang Qiaomei, Yan Liang, Yang Ruijuan, Peng Wenshu, Ji Aibing, Liu Li, Zhang Wenjie, Hu Xianqi. Analysis on the community structure of bacteria in tea leaves and rhizosphere soil in Pu'er. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 703–714.

**摘要:**【目的】茶叶内生细菌、根际土壤细菌在普洱茶的发酵中起着重要的作用, 还可以促进茶树生长, 诱导茶树抗病性。研究其群落结构组成及相互关系可为微生物资源开发利用提供理论依据。【方法】本研究以普洱地区茶树叶片和根际土壤为材料, 采用高通量测序技术, 对茶叶及根际土壤细菌的 16S 核糖体 RNA 基因(16S rRNA)进行测序, 比较分析茶叶与根际土壤细菌的群落结构组成。【结果】结果表明, 茶叶内生细菌主要由 76 个属组成, 归属于 9 个门。相对丰度较高的门是厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)。相对丰度较高的属为乳杆菌属(*Lactobacillus*)、布劳特氏菌属(*Blautia*)、粪杆菌属(*Faecalibacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)和普雷沃氏菌属(*Prevotella*)。根际土壤细菌主要由 198 个属组成, 归属于 10 个门, 相对丰度较高的门是变形菌门(*Proteobacteria*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)和放线菌门(*Actinobacteria*)。相对丰度较高的属与茶叶中的高丰度属相似, 但在两者中的相对丰度有所差异。茶叶内生细菌物种丰度和多样性显著低于根际土壤细菌, 但超过 50% 的茶叶内生细菌同时存在根际土壤中。【结论】通过对普洱地区茶叶内生细菌及根际土壤细菌的群落结构

**基金项目:** 云南省重点项目云南绿色食品国际合作研究中心资助项目(2019ZG00909-02)

Supported by the Yunnan Provincial Key Programs of Yunnan Eco-Friendly Food International Cooperation Research Center Project under Grant (2019ZG00909-02)

\*Corresponding author. E-mail: xqhoo@126.com

Received: 29 May 2021; Revised: 22 June 2021; Published online: 16 July 2021

组成分析, 明确了茶叶内生细菌与根际土壤细菌的共性与差异, 为普洱茶品质改良和生物菌肥开发研究奠定了基础。

**关键词:** 茶树; 茶叶内生细菌; 根际土壤细菌; 16S rRNA 测序

## Analysis on the community structure of bacteria in tea leaves and rhizosphere soil in Pu'er

WANG Qiaomei<sup>1,2,3</sup>, YAN Liang<sup>2,3</sup>, YANG Ruijuan<sup>2,3</sup>, PENG Wenshu<sup>2,3</sup>, JI Aibing<sup>2,3</sup>, LIU Li<sup>2,3</sup>, ZHANG Wenjie<sup>2,3</sup>, HU Xianqi<sup>1\*</sup>

1 College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China

2 College of Pu'er Tea, West Yunnan University of Applied Sciences, Pu'er 665000, Yunnan, China

3 Microbiology Laboratory, Pu'er Tea Research Institute, Pu'er 665000, Yunnan, China

**Abstract:** [Objective] Endophyte and rhizosphere microorganisms of tea plant not only play an important role in the fermentation of Pu-erh tea, but also promote the growth of tea plants and induce disease resistance of tea plants. Studying the community structure and their relationship can provide a theoretical basis for the development and utilization of microbial resources. [Methods] In this study, we sequenced the 16S ribosomal RNA (16S rRNA) gene of bacteria in tea leaves and rhizosphere soil by high-throughput sequencing technology, analysed the community structure of bacteria in tea leaves and rhizosphere soil. [Results] The results showed that endophytic bacteria in tea leaves were mainly composed of 76 genera, belonging to 9 phyla. Among them, the phyla with higher relative abundance were *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Actinobacteria*. At the genus level, the genera with high relative abundance were *Lactobacillus*, *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacteroides*, and *Prevotella*. Rhizosphere soil bacteria were mainly composed of 198 genera, belonging to 10 phyla. The phyla with higher relative abundance were *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria*, and *Acidobacteria*. At the genus level, the high abundance genera of bacteria in rhizosphere soil were the same as those in tea leaves, but the relative abundance of the same genus was different in the two. The abundance and diversity of endophytic bacteria in tea leaves were significantly lower than those in rhizosphere soil, but more than 50% of the endophytic bacteria were also identified in the rhizosphere soil. [Conclusion] Our findings would provide a basis for the bacterium-based strategies in bacterial manure and Pu-erh tea quality.

**Keywords:** tea plant; endophytic bacteria in tea leaves; rhizosphere soil bacteria; 16S rRNA sequencing

普洱(N22°02'24.50", E99°09'102.19")位于中国西南边陲, 地处北回归线附近, 海拔在376–3 306 m之间。由于受地形、海拔以及亚热带季风气候的影响, 垂直气候特点明显, 年均气温 15.0–20.3 °C, 大部分地区常年无霜, 冬无

严寒, 夏无酷暑, 为茶树的生长提供了得天独厚的条件。普洱曾是“茶马古道”上的重要驿站, 也是中国最大的茶叶产区之一, 以普洱茶盛名, 茶园面积达 2 120 km<sup>2</sup>, 有成片的现代茶园, 也拥有古老的野生古茶树资源, 因此被授予“世界

茶源”的称号。

植物内生细菌是植物微生态系统的重要组成部分, 在长期的协同进化过程中, 与植物形成互利共生的关系<sup>[1]</sup>。大量研究表明, 植物内生细菌种类丰富、功能多样, 可促进植物生长<sup>[2]</sup>, 诱导寄主抗病、抗逆, 抑制植物病害<sup>[3-4]</sup>。茶树(*Camellia sinensis*)为多年生木本植物, 生长周期较长, 经过长期与环境协同作用, 形成了独特的内生细菌菌群, 内生细菌的存在对茶树的生长, 茶叶特异风味的形成具有重要作用<sup>[5]</sup>。路伟尧<sup>[6]</sup>对普洱茶生长和加工环境中微生物的研究表明, 普洱茶特殊风味的形成与茶叶内生菌参与发酵直接相关。王志伟等<sup>[2]</sup>的研究也表明, 内生芽孢杆菌作为普洱茶渥堆发酵过程中的嗜热菌, 该菌可产生多种蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶, 并可利用茶叶中的营养物质产生有机酸, 对普洱茶特殊风味的形成起着重要的作用。

茶树内生细菌种类繁多, 资源丰富, 主要来源于根部土壤环境<sup>[7-8]</sup>, 也有部分来源于空气环境和邻近的植物。明确内生细菌的来源将有助于探索其特定的生物学功能, 由于土壤微生物的可测性, 以及其作为茶树根内细菌主要来源的前期研究结果<sup>[9-10]</sup>, 因此, 开展茶叶内生细菌极其根际细菌菌群多样性关系的研究意义重大。此外, 根际土壤细菌对茶树的生长也发挥着重要的作用, 现有研究表明<sup>[11]</sup>, 多种土壤细菌都具有释钾、固氮、解磷及分解有机物的作用, 能够有效调节茶园环境, 促进茶叶萌发、代谢、合成芳香物质、减少虫害等重要作用。黄芳芳等<sup>[12]</sup>的研究表明, 茶树根际富集有利于茶树生长及品质特征形成的特定微生物群落。因此, 了解茶树根际细菌群落的多样性组成, 对特定功能菌群的开发研究具有重要的作用。

目前, 对茶树内生菌的研究已有很多, 主

要集中在可培养细菌的分离鉴定及拮抗菌的筛选上<sup>[13-17]</sup>, 针对内生菌种群多样性分析和功能微生物筛选领域仍存在不足, 采用传统分离鉴定方法不能检测难培养和无法纯培养的微生物, 研究结果不具有全面性和科学性。为促进茶叶内生细菌的研究发展, 发掘新的微生物资源, 本文采用细菌 16S 核糖体 RNA 基因(16S rRNA)扩增子测序技术对普洱地区茶叶片内生细菌及根际土壤细菌的菌群结构进行比较分析, 推测茶叶内生细菌的可能来源。这为进一步研究茶叶内生菌、茶叶品质和抗病性之间的关系奠定理论基础; 也为促进茶树生长、提升茶叶品质、防御茶叶病虫害提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

茶树叶片和根际土壤样本于 2019 年 8 月采自云南省普洱市整碗村(22°75'41.2"N, 100°87'78.7"E)祖祥高山有机茶园基地。基地平均海拔 1 304.9 m, 季节性温差较小, 年平均气温 17.80 °C, 年降水量 1 330.00 mm。基地占地面积 130 hm<sup>2</sup>。6 组茶叶样本和对应的 6 组根际土壤样本采自 6 个不同地理位置, 每个位置采样面积为 500 m<sup>2</sup>, 茶树品种均为云南大叶种云抗 10 号。采用 5 点取样法, 每个样本由 5 个子样本混合而成, 每个地理位置包括 3 个生物学重复。土壤样本带回实验室, -80 °C 保存备用, 叶片样本带回实验室做表面消毒处理。

### 1.2 仪器和耗材

PowerLyzer™ 24 Bench Top Bead-Based Homogenizer 珠磨研磨设备(深圳市安必胜科技有限公司), Vortex-Genie® 2 涡旋仪(MO BIO 货号 13111-V-220), 微型离心机(TIANGEN 型号 1795), 振荡器(SI 型号 G560E), 96well PCR 仪(AB 型号 9002), 24 孔离心机(EPPENDORF 型

号 5424EQ766751)。PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kit 试剂盒(深圳市安必胜科技有限公司, 12855-50), AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN 公司), KOD FX Neo (TOYOBO)。

### 1.3 叶片表面消毒及基因组 DNA 提取

茶叶用 75%酒精浸泡 1 min, 无菌水冲洗 3 次, 再用 5% (有效氯)次氯酸钠表面消毒 5 min, 无菌水冲洗 3 次备用<sup>[18]</sup>。消毒处理后的茶叶采用 PowerLyzer<sup>™</sup> 24 Bench Top Bead-Based Homogenizer 珠磨研磨设备进行研磨, 用 PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kit 试剂盒按生产商提供的步骤分别快速提取茶叶及根际土壤细菌基因组 DNA, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量。

### 1.4 16S rRNA 基因序列扩增及测序

将提取的总 DNA 作为模板, 用下列引物扩增目的基因片段(表 1)。PCR 扩增体系为 (50  $\mu$ L)<sup>[19]</sup>: 模板 DNA (茶叶及其内生细菌总 DNA 50 ng, 根际土壤 DNA 10 ng), 上游引物 (10  $\mu$ mol/L) 1.5  $\mu$ L, 下游引物(10  $\mu$ mol/L) 1.5  $\mu$ L, KOD FX Neo (TOYOBO) 1  $\mu$ L, KOD FX Neo Buf (2 $\times$ ) 25  $\mu$ L, 2 mmol/L dNTPs 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补至总体积 50  $\mu$ L。PCR 反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 1 min, 50  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 7 min。反应产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 扩增及测序工作由上海百趣生物医学科技有限公司完成, 测序平台为 HiSeq 2500 平台。

表 1 PCR 引物

Table 1 PCR primers

Items	Primer names	Sequences (5'→3')	Target genes
Endophytic bacteria in tea leaves	799F	5'-AACMGGATTAGATACCCCKG-3'	16S rRNA (V7-V9)
	1193R	5'-ACGTTCATCCCCACCTTCC-3'	
Rhizosphere bacteria of soil	F27	5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3'	16S rRNA (V3-V4)
	R1492	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'	

### 1.5 数据分析

用 FLASH v1.2.7 软件进行双端测序序列拼接, 用 Trimmomatic v0.33 软件过滤 Raw Tags, 用 UCHIME v4.2 软件去除嵌合体。用 Usearch 软件对相似度在 97%水平下的 Tags 进行聚类、获得 OTU (operational taxonomic units), 并以 SILVA 为参考数据库对特征序列进行分类学注释。利用 QIIME 软件生成不同分类水平的物种丰度表, 利用 R 语言工具绘制成样品各分类水平下的群落结构。用 Mothur (version v.1.30) 进行 alpha 多样性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 茶叶与根际土壤细菌测序序列及 alpha 多样性分析

茶叶样本测序共获得 420 621 条有效序列, 平均长度 407 bp; 根际土壤样本测序共获得 393 136 条有效序列, 平均长度 413 bp。将相似度  $\geq$  97% 的有效序列进行可操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 聚类, 茶叶样本共获得 1 018 个 OTU, 根际获得 5 898 个 OTU (表 2)。

茶叶与根际土壤细菌的 alpha 多样性指数经 *t* 检验后的组间差异如图 1 所示。由图可知, 茶叶的 ACE、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数均极显著低于根际土壤细菌。Chao1 和 ACE 指数用于衡量物种的丰度, 数值越高说明细菌的丰度越大; Shannon 和 Simpson 指数用于衡量

表 2 茶叶和根际土壤细菌序列丰度

Table 2 Sequence abundance of bacteria in tea leaves and rhizosphere soil

Sample ID	Effective reads	AvgLen/bp	OTUs
Leaf			
Leaf1	72 258	407	176
Leaf2	72 263	407	163
Leaf3	59 551	408	155
Leaf4	72 188	407	169
Leaf5	71 850	407	175
Leaf6	72 511	407 </td <td>180</td>	180
Total	420 621	407	1 018
Soil			
Soil1	65 341	413	1 003
Soil2	66 457	413	999
Soil3	66 209	414	1 010
Soil4	65 426	413	976
Soil5	64 754	414	956
Soil6	64 949	413	954
Total	393 136	413	5 898

物种多样性, 其数值越大说明细菌的多样性越高。因此, 以上结果说明茶叶内生细菌菌群的相对丰度和多样性均显著低于茶树根际土壤的细菌群落。

## 2.2 茶叶内生细菌与根际土壤细菌门水平菌群结构的组成

在门分类水平上, 高通量测序得到的茶叶内生细菌归类到 9 个门(图 2A), 其中相对丰度大于 1% 的门有 6 个, 分别为厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、蓝细菌门(*Cyanobacteria*)和 *Epsilonbacteraeota*。分别占叶内生细菌总序列的 62.54%、14.34%、11.93%、5.89%、2.48%和 2.37% (图 2B)。根际土壤细菌归类到 10 个门(图 2C), 其中相对丰度大于 1% 的门为变形菌门(*Proteobacteria*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)、浮霉菌门(*Planctomycetes*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和 *Candidatus Eremiobacterota* (WPS-2)。分别占根际土壤细菌总序列的 27.68%、24.69%、23.35%、9.53%、3.23%、2.82%、2.20%、1.86%、1.29%和

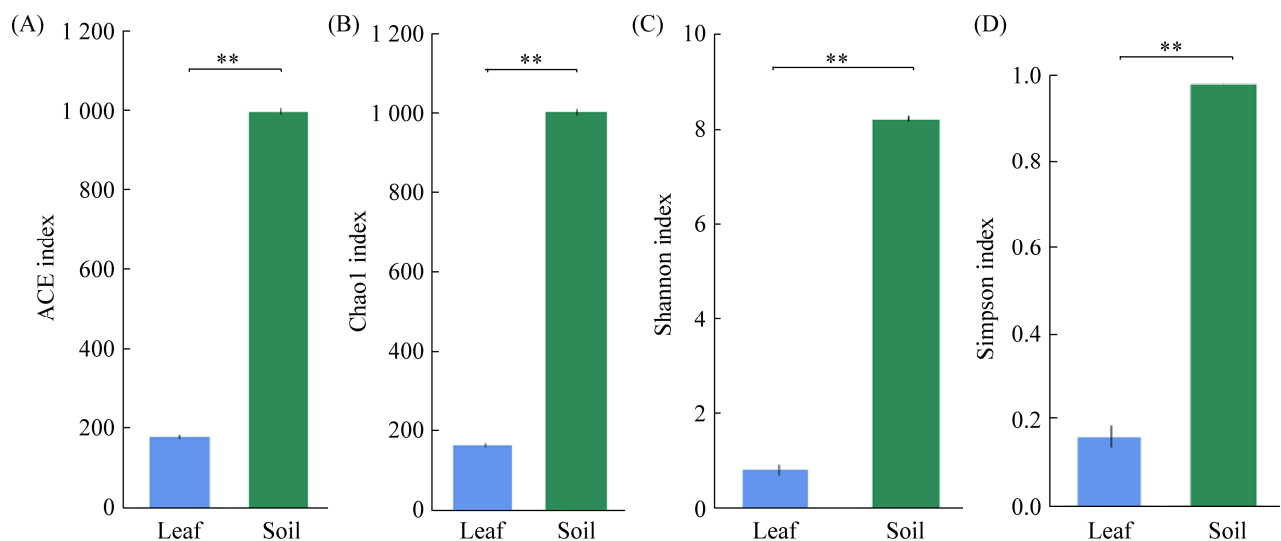
图 1 茶叶与根际土壤细菌  $\alpha$  多样性指数

Figure 1 Alpha diversity index of bacteria in tea leaves and rhizosphere soil. A, B, C, D represent ACE, Chao1, Shannon and Simpson analysis, respectively. \*\* represents  $P < 0.001$ .

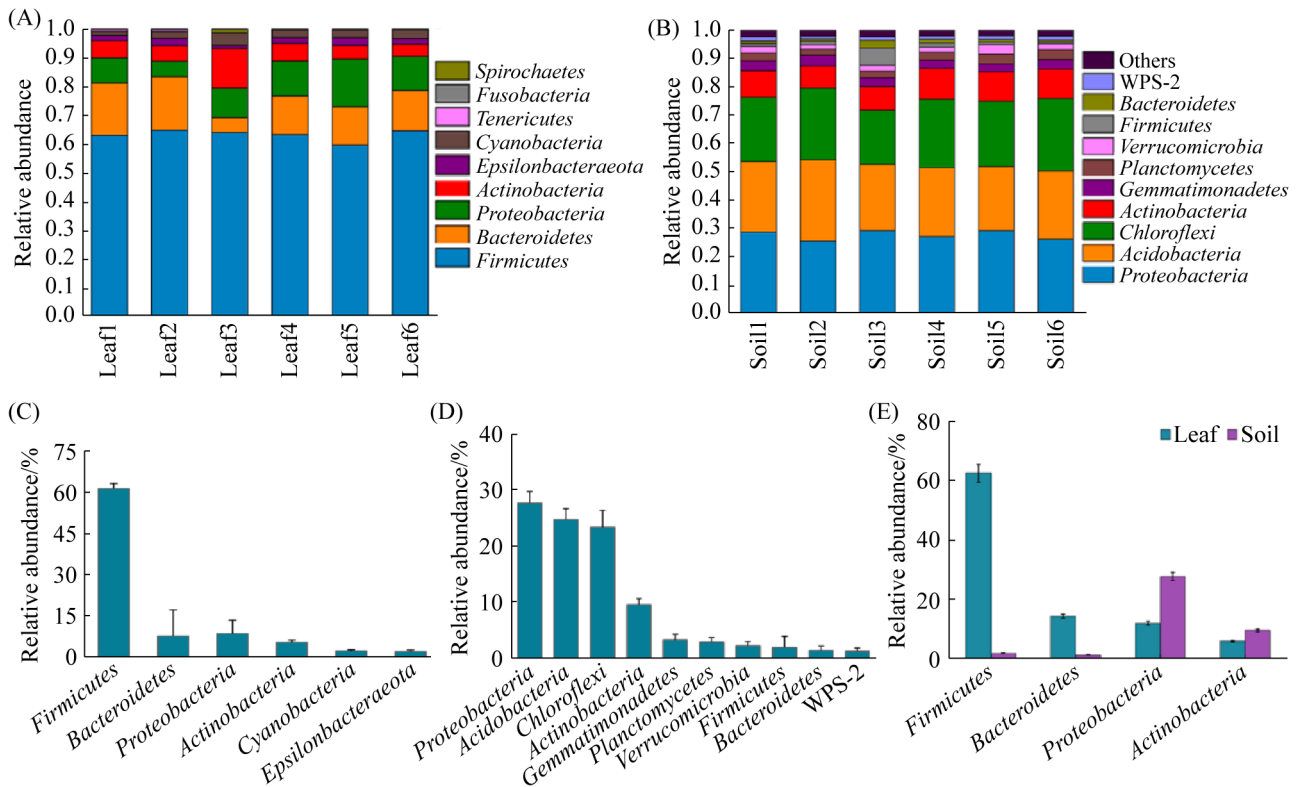


图 2 茶叶内生细菌与根际土壤细菌门水平物种比较图

Figure 2 Comparison of bacterial species between tea leaves and rhizosphere soil at phylum level. A: species distribution histogram of endophytic bacteria in tea leaves. B: the dominant phylum with relative abundance over 1% in tea leaves. C: species distribution histogram of rhizosphere soil. D: the dominant phylum with relative abundance over 1% in rhizosphere soil. E: common bacteria in tea leaves and rhizosphere soil. The bars of C, D, E show average  $\pm$ SD of six replicates ( $n=6$ ).

1.21% (图 2D)。以上结果显示, 茶叶内生细菌与根际土壤细菌的优势门不同, 茶叶内生细菌的优势门为厚壁菌门(*Firmicutes*), 而根际土壤中的优势门为变形菌门(*Proteobacteria*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)和绿弯菌门(*Chloroflexi*)。其中两者共有的门是厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和酸杆菌门(*Acidobacteria*), 但它们在两者中的相对丰度各不相同(图 2E)。

### 2.3 茶叶内生细菌与根际土壤细菌属水平菌群结构组成

在属分类水平上, 6 组茶叶样本中检测到

的内生细菌归类为 85 个属, 注释到属分类水平的有 76 个属, 其中, 相对丰度大于 1% 的有 25 个属(图 3A), 丰度较高的是乳杆菌属(*Lactobacillus*) (20.14%)、布劳特氏菌属(*Blautia*) (5.29%)、粪杆菌属(*Faecalibacterium*) (4.67%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*) (4.34%)、红球菌属(*Rhodococcus*) (3.7%)、拟杆菌属(*Bacteroides*) (3.15%)和普雷沃氏菌属(*Prevotella*) (3.00%), 它们的相对丰度均超过 3%, 为茶叶中较为优势的属(图 3A)。根际土壤中检测到的细菌归类为 340 个属, 注释到属分类水平的有 198 个属, 相对丰度大于 1% 的有 10 个属(图 3B), 丰度较

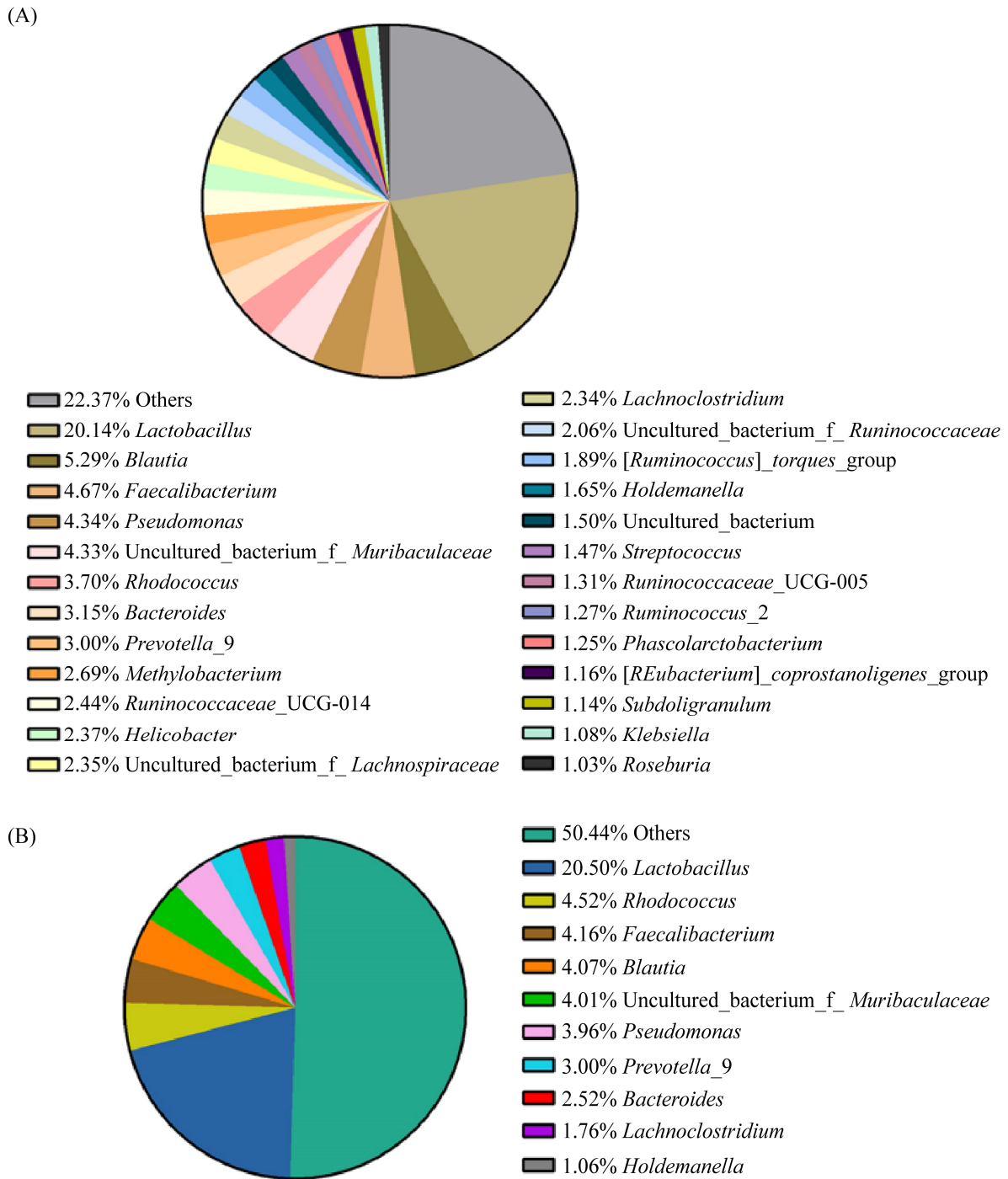


图 3 茶叶内生细菌与根际土壤细菌属水平物种比较

Figure 3 Comparison of bacterial species between tea leaves and rhizosphere soil at genus level. A: common bacteria in six groups of tea leaves. B: common bacteria in six groups of rhizosphere soil. This figure shows the genus whose relative abundance were over 1%, different colors represent the relative abundance ratio of the corresponding genera.

高的属是乳杆菌属(*Lactobacillus*) (20.5%)、红球菌属(*Rhodococcus*) (4.52%)、粪杆菌属(*Faecalibacterium*) (4.16%)、布劳特氏菌属(*Blautia*) (4.07%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*) (3.96%)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*) (3.00%)和拟杆菌属(*Bacteroides*) (2.52%) (图 3B)。以上结果显示, 在属分类水平上, 除了未明确分类地位的属以外, 茶叶内生细菌与根际土壤细菌的优势菌属组成非常相似, 但是每个属在茶叶和根际内的相对丰度有所差异。

#### 2.4 茶叶与根际土壤中共有的细菌类群

对不同区域 6 组茶叶及根际土壤细菌菌群检测分析, 在 OTU 水平上, 茶叶与根际土壤细菌共有的 OTUs 如图 4 所示。每组茶叶与根际土壤细菌共有的 OTUs 分别为 158、145、141、137、112、119, 分别占茶叶内生细菌的 89.77%、88.96%、90.97%、81.07%、64.00%、66.11%。结果显示, 平均约 80% 的茶叶内生细菌都存在根际土壤中, 由于茶树与其生长的土壤环境关系密切, 因此推测茶叶中的这部分细菌可能来源于土壤。

在属分类水平上, 通过高通量测序、注释得到分类明确的茶叶内生细菌和根际土壤细菌菌群多样性如图 5 所示。由图可知, 根际土壤细菌属级别的多样性较丰富, 共注释到 198 个属, 而茶叶内生细菌的属级别的多样性相对较低, 共注释到 76 个属。其中, 茶叶特有内生细菌 34 个属, 根际土壤特有细菌 156 个属, 两者共有细菌 42 个属, 共有属约占茶叶内生细菌总数的 55%, 比两者共有的 OTUs 占比少, 原因是部分 OTU 未注释到属分类水平。以上结果进一步说明茶叶内生细菌超过 50% 的属存在根际土壤中。

茶叶与根际土壤中相对丰度均大于 1% 的共有细菌有 9 个属(图 6)。分别是乳杆菌属(*Lactobacillus*)、布劳特氏菌属(*Blautia*)、粪杆菌属(*Faecalibacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、*Lachnoclostridium* 和霍尔曼氏菌(*Holdemanella*)。它们在茶叶与根际土壤中的相对丰度差异不显著, 其中, 乳杆菌属在两者中的相对丰度均较高。

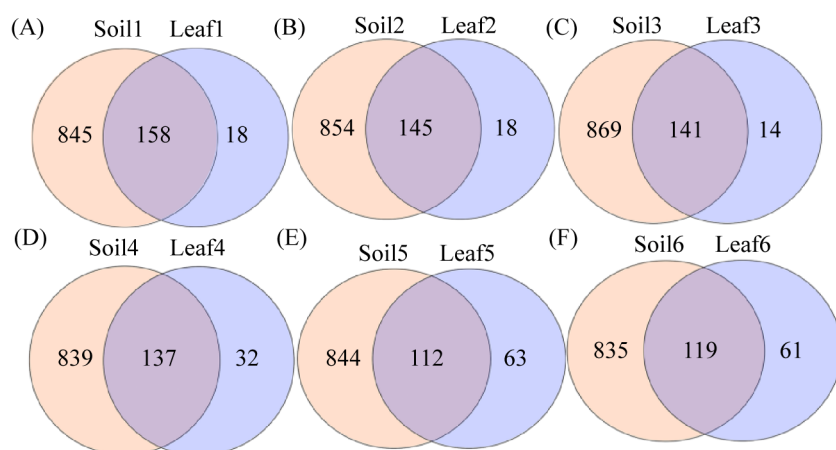


图 4 茶叶和根际土壤细菌共有 OTUs 维恩图

Figure 4 Venn diagrams of bacterial OTUs of tea leaves and rhizosphere soil. A–F represent the common OTUs of tea leaves and rhizosphere soil in six different regions, respectively. Orange represent tea rhizosphere soil, purple represent tea leaves and the number represent OTUs of samples.



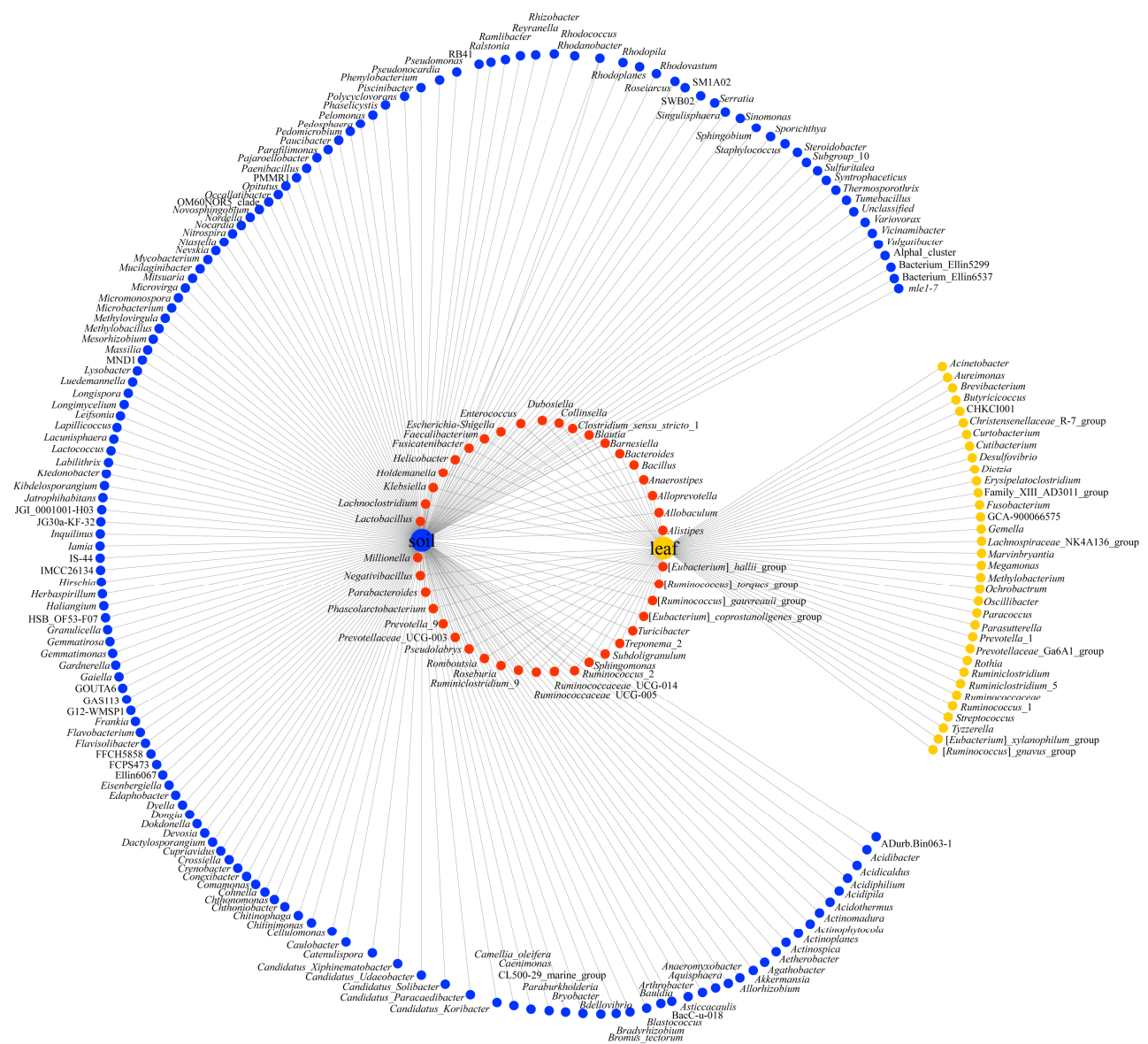


图 5 茶叶和根际土壤细菌属水平多样性网络关系图

Figure 5 Network of bacteria generic diversity in tea leaves and rhizosphere soil. Blue represents rhizosphere soil bacteria, yellow represents endophytic bacteria of tea leaves and red represents the bacteria shared by both.

### 3 讨论

普洱地区以普洱茶盛名，是云南大叶种茶树的主要产区，由于特殊的地理位置和独特的气候条件，造就了普洱地区茶叶具有独特的风味特征，同时，湿润的气候环境也为病原菌的

滋生制造了条件。这与茶叶和根际土壤中特定功能的微生物密切相关。因此，开展普洱地区茶叶和根际土壤细菌群落多样性分析的研究意义重大，可为本地区的发酵普洱茶品质改良和病害控制提供参考依据。本文首次利用高通量测序技术对普洱地区大叶种茶叶内生细菌的

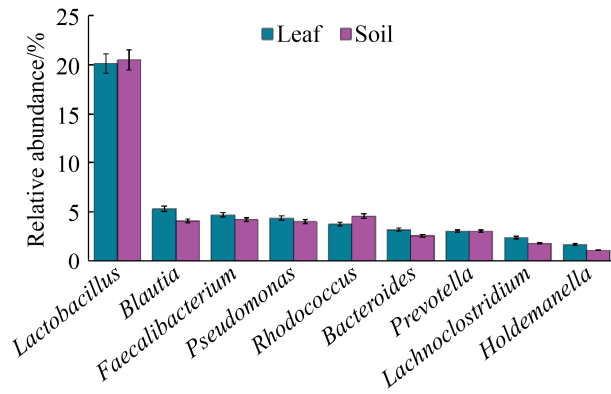


图 6 茶叶和根际土壤中相对丰度大于 1% 的共有细菌

Figure 6 Common bacteria of tea leaves and rhizosphere soil on genus level. This figure shows the genus whose relative abundance was over 1%. The bars show average $\pm$ SD of six replicates ( $n=6$ ).

16S rRNA 基因序列进行分析,为云南大叶种茶叶内生细菌群落结构多样性的研究开拓了新的思路,也为特定功能微生物资源的开发利用提供了借鉴。

通过检测分析,在门分类水平上,茶叶内生细菌主要由厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门和放线菌门组成。此结果与前人的研究结果一致,说明茶叶内生细菌与目前已测的大部分植物一样,门水平的组成相对稳定<sup>[20]</sup>。在属水平上,相对丰度较高的属有乳杆菌属、布劳特氏菌属、粪杆菌属、假单胞菌属、红球菌属、拟杆菌属和普雷沃氏菌属。此结果与陈丽莹等<sup>[19]</sup>的研究结果有一定差异,分析原因可能有两方面,一方面是茶树的品种不同所致,汪立群等<sup>[13-14,21-22]</sup>的研究表明,不同品种茶树内生细菌种类及数量都存在显著差异;第二方面的原因可能是茶树生长的气候及土壤环境条件不同所致。路伟尧等<sup>[23]</sup>对不同茶山空气微生物种类的研究表明,不同茶山的空气微生物差异较大,且对茶叶内生菌的影响也较大;马同锁等<sup>[24]</sup>的研究表明,植物的生长土壤环境对植物内生菌

的种类及数量都有很大影响。以上研究结果表明,普洱地区茶叶内生细菌的种类与当地的特殊环境气候息息相关。本研究从茶树根际土壤中检测到细菌优势属与茶叶中的优势属非常相似,且茶叶中超过 50% 的内生细菌存在根际土壤中。此结果进一步说明,茶树生长的土壤环境细菌种群直接影响着茶叶内生细菌的组成,茶叶可能从根际中选择性富集一些土壤细菌,并成为叶片内的优势类群。刘迎雪等<sup>[8]</sup>也表示土壤是内生细菌最重要的接种源,是地下和地上植物微生物群落的库。Compant 等<sup>[7]</sup>用绿色荧光蛋白标记菌株研究其在植物内部的定殖,结果显示,菌株从根表面开始进入到根内部组织,最后在节间和叶片中定殖,此结果支持了细菌通过根定殖于植物内部的结论,进一步说明茶叶内生细菌与茶树根际细菌的种类密切相关,也为茶叶内生细菌来源于土壤提供了依据。

综上,不同环境影响茶叶内生细菌的组成种类,茶叶内生菌的组成与普洱茶品质关系密切。现有的研究表明<sup>[6]</sup>,茶叶内生细菌是普洱茶发酵微生物的重要来源,与普洱茶特殊风味的形成直接相关。张欣等<sup>[25]</sup>的研究也表明,茶叶内生优势菌乳杆菌和假单胞菌是参与普洱茶发酵的重要菌群。高晓余等<sup>[26]</sup>的研究表明,假单胞菌属在普洱茶发酵过程中可分解茶叶中的蛋白质,与普洱茶滋味物质的形成密切相关。此外,也有多项研究表明<sup>[14-16,21,27]</sup>,茶叶内生菌和根际细菌是生防菌的重要来源。因此,基于此研究,可进一步开展茶叶内生菌与发酵普洱茶特殊风味物质的关系研究,也可对潜在生防作用的细菌进行研究及开发利用。

## 4 结论

本研究通过对普洱地区茶叶内生细菌及根际土壤细菌菌群结构组成的比较分析,弄清了

普洱地区茶叶及根际土壤细菌的群落结构, 明确了茶叶内生细菌与根际土壤细菌之间的联系, 为改善普洱茶品质及防御茶树病虫害的研究提供了理论依据。

## 参考文献

- [1] 季爱兵. 普洱茶叶片中内生菌的鉴定. 吉林大学硕士学位论文, 2013.
- [2] 王志伟, 陈永敢, 王庆臻, 纪燕玲. 中国植物内生微生物研究的发展和展望. 微生物学通报, 2014, 41(3): 482–496.  
Wang ZW, Chen YG, Wang QC, Ji YL. Progresses and perspectives of studies on plant endophytic microbes in China. *Microbiology China*, 2014, 41(3): 482–496. (in Chinese)
- [3] Ito M, Sato I, Ishizaka M, Yoshida SI, Koitabashi M, Yoshida S, Tsushima S. Bacterial cytochrome P450 system catabolizing the *Fusarium* toxin deoxynivalenol. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(5): 1619–1628.
- [4] 王志伟, 纪燕玲, 陈永敢. 禾本科植物内生真菌及其在农业上的应用潜力. 南京农业大学学报, 2011, 34(5): 144–154.  
Wang ZW, Ji YL, Chen YG. Grass endophytes and their potential applications in agriculture. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2011, 34(5): 144–154. (in Chinese)
- [5] 宫安东, 韩萌真, 孔宪巍, 魏彦博, 王磊, 程琳. 茶树内生菌的应用性研究进展. 信阳师范学院学报: 自然科学版, 2017, 30(1): 168–172.  
Gong AD, Han MZ, Kong XW, Wei YB, Wang L, Cheng L. Application analysis of endophytic microbes in *Camellia sinensis*. *Journal of Xinyang Normal University: Natural Science Edition*, 2017, 30(1): 168–172. (in Chinese)
- [6] 路伟尧. 普洱茶发酵微生物的溯源分析. 北京化工大学硕士学位论文, 2013.
- [7] Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Ait Barka E. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4): 1685–1693.
- [8] 刘迎雪, 赵滢, 张宝香, 杨义明, 范书田, 李昌禹, 王月, 许培磊, 秦红艳, 路文鹏. 植物内生细菌来源及生物学功能研究进展. 特产研究, 2020, 42(4): 60–67.
- [9] Liu YX, Zhao Y, Zhang BX, Yang YM, Fan ST, Li CY, Wang Y, Xu PL, Qin HY, Lu WP. Research progress on the source and biological function of plant endophytic bacteria. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*, 2020, 42(4): 60–67. (in Chinese)
- [9] Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, VerLoren van Themaat E, Schulze-Lefert P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64: 807–838.
- [10] Edwards J, Johnson C, Santos-Medellin C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S, Eisen JA, Sundaresan V. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(8): E911–E920.
- [11] 卢开阳, 张云峰, 贾鵬, 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.  
Lu KY, Zhang YF, Jia M, Gao LR, Tian F, Tang SK. Bacteria distribution diversity in tea rhizospheric soil from different habitats at Nannuo mountain based on 16S rRNA sequence analysis. *Journal of Kunming University of Science and Technology: Natural Science Edition*, 2016, 41(2): 89–95. (in Chinese)
- [12] 黄芳芳, 李勤, 黄建安. 茶树根际微生物研究进展. 茶叶科学, 2020, 40(6): 715–723.  
Huang FF, Li Q, Huang JA. Research progress of tea rhizosphere microorganisms. *Journal of Tea Science*, 2020, 40(6): 715–723. (in Chinese)
- [13] 朱育菁, 陈璐, 蓝江林, 苏明星, 刘波. 茶叶内生菌的分离鉴定及其生防功能初探. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2009, 38(2): 129–134.  
Zhu YJ, Chen L, Lan JL, Su MX, Liu B. Isolation, identification and the biocontrol potential of endophyte in *theasiensis* (*Camellia sinensis*). *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2009, 38(2): 129–134. (in Chinese)
- [14] 陈百文, 刘伟, 赵恬欢, 叶乃兴, 杨江帆, 魏日凤. 对茶树炭疽病菌拮抗作用的茶树内生细菌的筛选. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2010, 39(4): 341–346.  
Chen BW, Liu W, Zhao TH, Ye NX, Yang JF, Wei RF. Screening of endophytic strains to control *Gloeosporium theae sinensis* Miyake. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition*, 2010, 39(4): 341–346. (in Chinese)

- [15] 蔡丽, 欧燕清, 侯小楨, 王金良, 傅力. 凤凰单丛茶内生拮抗细菌的筛选与鉴定. *食品工业科技*, 2016, 37(10): 246–250.  
Cai L, Ou YQ, Hou XZ, Wang JL, Fu L. Isolation and identification of endophytic bacteria from Fenghuang Dancong tea. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(10): 246–250. (in Chinese)
- [16] 蔡丽, 欧燕清, 陈巧儿, 王金良, 傅力. 岭头单丛茶树内生细菌的分离与拮抗细菌鉴定. *食品科技*, 2016, 41(4): 24–28, 34.  
Cai L, Ou YQ, Chen QE, Wang JL, Fu L. Isolation of endophytic bacteria from Lingtou Dancong tea tree and identification of antagonistic bacteria. *Food Science and Technology*, 2016, 41(4): 24–28, 34. (in Chinese)
- [17] 赵希俊, 宋萍, 封磊, 洪伟, 吴承祯, 余蓉, 陈秀珠. 一株具有耐铝促生作用的茶树内生细菌的分离鉴定. *江西农业大学学报*, 2014, 36(2): 407–412.  
Zhao XJ, Song P, Feng L, Hong W, Wu CZ, Yu R, Chen XZ. Isolation and identification of a growth-promoting and aluminum-resistant endophytic bacterium from tea tree. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2014, 36(2): 407–412. (in Chinese)
- [18] 戴清良. 茶树内生真菌的相互作用、内生性及抗菌活性研究. 福建师范大学学位论文, 2008.
- [19] 陈丽莹, 张玉满, 陈晓英, 方荣祥, 张莉莉. 茶树叶际选择性富集的内生细菌的鉴定. *微生物学报*, 2018, 58(10): 1776–1785.  
Chen LY, Zhang YM, Chen XY, Fang RX, Zhang LL. Identification of endophytic bacteria selectively enriched in *Camellia sinensis* leaf. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(10): 1776–1785. (in Chinese)
- [20] Müller DB, Vogel C, Bai Y, Vorholt JA. The plant microbiota: systems-level insights and perspectives. *Annual Review of Genetics*, 2016, 50(1): 211–234.
- [21] 洪永聪. 茶树内生枯草芽孢杆菌的研究. 福建农林大学学位论文, 2006.
- [22] 汪立群, 颜小梅, 郭小双, 张冉, 梅玉, 韦朝领. 紫娟、云抗 10 号两个茶树品种内生菌多样性研究. *安徽农业大学学报*, 2016, 43(1): 1–5.  
Wang LQ, Yan XM, Guo XS, Zhang R, Mei Y, Wei CL. Diversity of endophytic microorganisms Zijuan and Yunkang 10 of *Camellia sinensis*. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2016, 43(1): 1–5. (in Chinese)
- [23] 路伟尧, 吕杰, 严亮, 李灏, 季爱兵, 杨瑞娟, 盛军. 普洱茶区空气微生物的群落结构及生态分布. *北京化工大学学报: 自然科学版*, 2013, 40(4): 103–108.  
Lu WY, Lü J, Yan L, Li H, Ji AB, Yang RJ, Sheng J. Community structure and ecological distribution of airborne microorganisms in the Pu'er tea growing environment. *Journal of Beijing University of Chemical Technology: Natural Science Edition*, 2013, 40(4): 103–108. (in Chinese)
- [24] 马同锁, 田苗珍, 袁红楼, 赵士豪, 薛胜平. 不同生长环境对 2 种蔬菜内生菌分布的影响. *安徽农业科学*, 2009, 37(17): 7812–7813, 7815.  
Ma TS, Tian MZ, Yuan HL, Zhao SH, Xue SP. Effect of the different growth environmental conditions on the distribution of endophytes in two species of vegetables. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(17): 7812–7813, 7815. (in Chinese)
- [25] 张欣, 姚粟, 白飞荣, 田海霞, 赵婷, 马跃, 刘海新, 李颂, 郝彬秀, 王春玲. 基于高通量测序和可培养方法的勐海发酵普洱茶细菌多样性分析. *食品与发酵工业*, 2018, 44(9): 15–21.  
Zhang X, Yao S, Bai FR, Tian HX, Zhao T, Ma Y, Liu HX, Li S, Hao BX, Wang CL. Analysis on bacterial diversity in Menhai fermented Pu-erh tea by high throughput sequencing and culture method. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(9): 15–21. (in Chinese)
- [26] 高晓余, 严亮, 赵艳, 相宏宇, 谢秋宏. 微生物多样性与普洱茶品质关系研究进展. *广东农业科学*, 2014, 41(22): 13–17.  
Gao XY, Yan L, Zhao Y, Xiang HY, Xie QH. Advance in relationship between microbial diversity and Pu'er tea quality. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(22): 13–17. (in Chinese)
- [27] Mishra AK, Morang P, Deka M, Nishanth KS, Dileep KB. Plant growth-promoting rhizobacterial strain-mediated induced systemic resistance in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) through defense-related enzymes against brown root rot and charcoal stump rot. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 174(2): 506–521.

(本文责编 张晓丽)