

三江源高寒草甸土固氮基因(*nifH*)的多样性和系统发育研究

张于光^{1,2} 王慧敏^{1,2} 李迪强^{2*} 肖启明¹ 刘学端¹

(¹湖南农业大学生物安全科技学院 长沙 410128)

(²中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所 北京 100091)

摘 要 首次利用 PCR-RFLP 和测序分析对位于青藏高原腹地的青海三江源保护区高寒草甸土壤微生物固氮基因(*nifH*)的多样性和系统发育进行了探讨。在 2 个样地中,共得到 143 个阳性克隆,用限制性内切酶 *Msp* I 和 *Rsa* I 进行 RFLP 分析后得到 35 个不同的 RFLP 谱带型,多样性为 24.5%,其中 ZD 样品中获得 82 个阳性克隆和 21 个不同的 RFLP 谱带型,多样性为 25.6%,而 YS 样品中获得 61 个阳性克隆和 19 个不同的 RFLP 谱带型,多样性为 31.1%,2 个样地中有 5 个相同的 RFLP 谱带型。在各样地都发现一个明显的优势种群,ZD 样地的明显优势种群占克隆数的 29.3%,YS 的优势种群占克隆数的 32.8%。对 21 个克隆进行了部分序列的测定,序列的相似性在 71%~98% 之间,在 GenBank 数据库中没有发现完全匹配的序列,因此这些序列可能代表着新的固氮生物株系。最后利用 Clustal W 与 Mega 软件和已有序列构建了系统发育树,结果发现,21 个序列分为 4 个不同的簇,大部分的克隆与 *Proteobacteria* 的 3 个系统发育亚簇(α 、 β 和 γ)具有较高的相似性,其中主要的序列都落在第一和第二簇内。YS 样地中的优势种群与 α -*Proteobacteria* 中的 *Rhodobacter sphaeroides* 具有较高的相似性,而 ZD 样地中的优势种群则与 β -*Proteobacteria* 中的 *Delftia tsuruhatensis* 具有较高的相似性。

关键词 高寒草甸, 固氮基因, 多样性, 系统发育

中图分类号 Q939,Q78 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2005)02-0166-06

目前,土壤中仅有 1% 的微生物已培养^[1],还有相当多的微生物因为无法培养而未被人类所认识,而它们所包含的大量的遗传信息是一笔无法估计的财富。通过直接从土壤中提取微生物总 DNA,并进行分子生态学分析的实验技术,可以有效地避免在传统富集、培养、分离等过程中造成的微生物多样性的丢失,能够更直接更可靠的反映土壤微生物的原始组成情况^[1]。

生物固氮由古细菌到真细菌等^[2]多种不同的微生物完成,与共生固氮和联合固氮体系相比,自生固氮微生物对氮的固定被认为是次要的有效生物氮源^[3,4],然而,很多研究发现具有自生固氮能力的微生物广泛存在于土壤中,这些生物分属于不同的微生物系统发育分支,例如蛋白细菌(*Proteobacteria*)、蓝细菌(*Cyanobacteria*)和硬壁细菌(*Firmicutes*)等^[5,6]。所有固氮生物的固氮酶中都含有编码铁蛋白的 *nifH* 基因,目前,已经有不少关于研究不同植被和地理条件下 *nifH* 基因多样性的报道,例如森林土壤、草地、海底沉积物、耕地等^[7~10],但是还没有见

到关于高寒草甸土壤固氮微生物的报道。

三江源自然保护区位于世界上最年轻的高原——青藏高原的主体部分,因其独特的自然地理环境,具有重要的研究价值和意义。高寒草甸是三江源地区分布面积最大的优势植被类型,是青藏高原植被的主要组成部分,也是我国独特的植被类型。本研究旨在利用 PCR-RFLP 和克隆测序,对三江源高寒草甸土壤中固氮基因(*nifH*)的多样性和系统发育进行研究,探讨青藏高原的固氮微生物群落类型和分布。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 样品采于 2003 年 8 月,在青海省三江源自然保护区采集 2 个高寒草甸土样样品。采用正方形 5 点取样法采集土壤,垂直取 1~15cm 深度的土壤,每个点取样量大体一致,均匀混合后取少量装入灭菌的封口聚乙烯袋,带回实验室低温保存备用。

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2001BA510B10);林业局重点项目“自然保护区社会经济生态价值研究”

* 通讯作者。Tel/Fax 86-10-62889551;E-mail:reserve@forestry.ac.cn

作者简介:张于光(1976-),男,湖南湘乡人,博士,主要从事环境微生物分子生态学研究。E-mail:yugzhang@yahoo.com.cn

收稿日期:2004-08-30,修回日期:2004-12-20

1.1.2 主要试剂和仪器 异硫青酸胍, 2-巯基乙醇, Tris-HCl, EDTA, SDS 等试剂购自上海生工生物工程公司; DNA 回收试剂盒, *Taq* DNA 聚合酶购自 Bio Basic Inc. Canada 限制性内切酶 *Msp*I 和 *Rsa*I, pGEM-T Easy 载体试剂盒等购自 Promega 公司; PCR 扩增仪为 Gene Amp PCR9700。

1.2 DNA 的提取和纯化

参照 Richard 等^[11]的方法, 并进行适当修改。取 2 g 土样和等量的灭菌石英砂在研钵中混合, 加入 1 mL 变性液 [4 mol/L 异硫青酸胍, 10 mmol/L Tris·HCl (pH 7.0), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 0.5% 2-巯基乙醇]; 液氮冷冻, 研磨至溶解, 重复 3 次; 转入 50 mL 离心管中, 加入 9 mL 提取缓冲液 [100 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.0), 100 mmol/L Tris·HCl (pH 7.0), 100 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1.5 mol/L NaCl, 1% CTAB, 2% SDS]; 65℃ 水浴 1 h, 每 10 min 轻轻混匀 1 次; 5000 r/min 离心 10 min, 取上清; 在原管中加入 5 mL 提取缓冲液, 混合后, 65℃ 水浴 10 min, 离心, 取上清合入上述上清液, 重复一次; 加入等体积的氯仿混合, 5000 r/min 离心 20 min, 取上清; 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 室温沉淀 1 h; 20 ~ 25℃, 12000 r/min 离心 20 min, TE 溶解沉淀。

将溶解的 DNA 在 40 V 电压下 0.8% 琼脂糖电泳 12 h, 然后用试剂盒回收。

1.3 固氮基因的 PCR 扩增

固氮基因的扩增引物参照文献^[12]设计, 该引物可以在不同种属的固氮微生物中扩增到目标片段, 其序列为: *nifH*-34F 5'-AAAGG (C/T) GG (A/T) ATCGG (C/T) AA (A/G) TCCACCAC-3' 和 *nifH*-491R 5'-TTGTT (G/C) GC (G/C) GC (A/G) TACAT (G/C) GCCAT-CA T-3', 可以扩增出约 460 bp 的片段^[12]。PCR 反应体系 (25 μ L) 含有: 1 $\times$ PCR Buffer, 200 μ mol/L 的 dNTPs, 2.0 mmol/L 的 Mg^{2+} , 1 μ mol/L 的引物, 4 μ g 的 BSA 和 2.0 U 的 *Taq* DNA 聚合酶。采用“降落”PCR 扩增, 具体条件为: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 40 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 2 个循环; 95℃ 40 s, 54℃ 30 s, 72℃ 1 min, 2 个循环; 95℃ 40 s, 53℃ 30 s, 72℃ 1 min, 2 个循环; 95℃ 40 s, 52℃ 30 s, 72℃ 1 min, 2 个循环; 95℃ 40 s, 51℃ 30 s, 72℃ 1 min, 2 个循环; 95℃ 40 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 6 min。

1.4 扩增产物的克隆和 RFLP 分析

1.5% 琼脂糖电泳 PCR 扩增产物, 试剂盒回收目标片断。根据厂商提供的说明书, 用 pGEM-T

Easy 载体试剂盒对回收的 PCR 产物进行克隆。挑选白斑, 用载体 pGEM-T Easy 特异性引物 T₇-TAAT ACGACTCACTATAGGGAGA 和 SP₆-CATACGATTAG-GTGACACTATAG 对克隆产物进行 PCR 扩增, 筛选有期望大小片段 (有约 620 bp 大小的产物) 的克隆。

将 T₇ 和 SP₆ 引物扩增所获得的产物用限制性内切酶 *Msp*I 和 *Rsa*I 在 37℃ 酶切过夜, 酶切后用 8% 非变性聚丙烯酰胺电泳检测, 用银染法检测电泳结果^[13]。Labwork (版本 3.0.2) 软件对染色结果进行数据统计和分析。

1.5 基因测序和系统发育分析

为了进一步弄清 *nifH* 基因系统发育的多样性, 选择部分 RFLP 谱带出现 2 次以上的克隆及部分单一克隆进行基因测序, 测序由上海生工生物工程公司完成。

利用 DNAMAN (版本 4.0) 软件对测序结果进行同源性比较, 利用 BLAST 软件, 将测定得到的基因序列与 GenBank 数据库进行序列比对分析, 获取相近典型菌株的 *nifH* 基因序列。然后利用 Clustal W (版本 1.8) 和 Mega (版本 3.0) 中的邻接法 (Neighbor-Joining) 建立 *nifH* 基因的系统发育树, 其中的遗传距离用 Tamura-Nei 公式计算, 分支长度代表了分歧程度, 各支上的数字是 1000 次 bootstrap 重抽样分析的支持百分比。

1.6 核苷酸序列登录号

将测序得到的序列提交 GenBank 数据库, 数据库登录号为 AY601037 ~ AY601057。

2 结果

2.1 土壤情况

样地均位于青海省三江源自然保护区内, 处于长江上游的高寒草甸地区。受寒冷干旱气候的影响, 该地区植被类型极其简单, 植物生长期短, 生物生产量低, 嵩草草甸是主要的植被。该地区是青海的主要天然牧场之一, 受人为影响比较严重。

样品为高山草甸土, 样品采集地年平均气温在 -5℃ 以下, 表 1 为采样具体位置和土壤部分性质。从表 1 可以看出, 样地土壤均为中性, 含有较为丰富的有机物质, 其中 ZD 样地的有机质高于 YS 样地, 但是氮的含量低于后者, 因此 ZD 样地的 C/N 比明显高于 YS 样地。同时, 土壤 K、P 和 Ca 的含量均较高, 其中 ZD 样地中 K 和 Ca 的含量显著高于 YS 样地。

表 1 土壤样品的位置和部分土壤性质

Table 1 Sample locations and properties of soils used in DNA extraction										
No. Sample	Sample location	Latitude and longitude	Altitude/m	N/%	C/%	C/N	K/%	P/%	Ca/%	pH
ZD	Zhiduo county	34°06'69"N,94°07'62"W	4817	0.259	3.83	14.8	3.611	0.204	4.831	7.72
YS	Yushu county	33°21'14"N,96°14'78"W	4824	0.304	2.71	8.9	1.819	0.170	1.407	7.50

2.2 *nifH* 克隆和 RFLP 分析

将扩增回收后的 *nifH* 扩增片段进行连接转化和培养。从 2 个样品中共获得 143 个 *nifH* 克隆,对所有的 *nifH* 克隆用 *Msp*I 和 *Rsa*I 限制性内切酶进行 RFLP 分析,通过 Labwork 软件分析酶切结果,共获得 35 个 *nifH* 的不同的 RFLP 谱带类型,多样性为 24.5%,在两个样品中发现了 5 个共同的 RFLP 谱带类型(图 1)。其中 ZD 样品中获得 82 个阳性克隆,具有 21 个不同的 RFLP 谱带类型,多样性为 25.6%,而 YS 样品中获得 61 个阳性克隆,有 19 个不同的 RFLP 谱带类型,多样性为 31.1%。

从图 1 中可以看出,在 ZD 样地中有一个明显的优势种群 1,占总克隆数的 29.3%,同时还有 3 个次要的优势种群,在 YS 中也存在 1 个明显的优势种群 9,占总克隆数的 32.8%,同时也有 2 个次要的优势种群。两个样品中具有 3 个或 3 个以上克隆数的 RFLP 谱带类型分别占据了总克隆数的 81.7% 和 75.4%,而只有 2 个克隆或单个克隆产生的 RFLP 谱带类型分别占了总 RFLP 谱带类型的 51.7% 和 63.2%,所以大部分的 RFLP 谱带类型是由少量的克隆数产生的。从图 1 中我们还可以看到,在 2 个样地中具有部分相同的优势种群,ZD 中的明显优势种群在 YS 中是次要的优势种群,而 YS 中的明显优势种群在 ZD 中是次要的优势种群。

2.3 *nifH* 基因的测序结果和系统发育分析

从 RFLP 分析后得到的不同 RFLP 谱带型中挑取了 21 个克隆进行测序分析。通过 DNAMAN 软件对 21 个序列结果进行了同源性比较,*nifH* 基因序列的相似性为 71% ~ 98%。通过 GenBank 中的 BLAST 软件,将所有的序列与 GenBank 数据库中的序列进行比对,在数据库中没有找到完全相似的序列,根据它们与已知种属的 *nifH* 基因序列相似性的比较,这些序列均可能是以前没有研究过的新的基因序列。

在 GenBank 中选取了 20 个与测定序列相似性较高的固氮基因序列,通过 Clustal W 软件和 Mega 软件将 41 个序列构建系统进化树(图 2),进行系统发育分析。从系统发育树可以看出,21 个 *nifH* 克隆基因分属于 4 个主要的簇,除第一簇中的克隆 ZD-*nifH*-3 和第 4 簇外,其它大部分的克隆与 *Proteobacteria* 的 3 个系统发育亚簇(α 、 β 和 γ) 具有较高的相似性。而且分别代表 YS 样地和 ZD 样地中优势种群的克隆都处于系统发育树中的第一簇和第二簇。

从系统发育树可以看出,很大一部分的 *nifH* 序列具有高度的多样性,且与已知的固氮微生物具有明显的亲缘关系。在第一簇中,ZD-*nifH*-4, ZD-*nifH*-7, YS-*nifH*-03 和 YS-*nifH*-14 与属于 α -*Proteobacteria* 的可培养菌株 *Azospirillum brasilense* 具有较高的相似性^[14],相似性为 84% ~ 90%,而 YS-*nifH*-08 和 YS-*nifH*-05 是这一簇中唯一属于 β -*Proteobacteria* 的

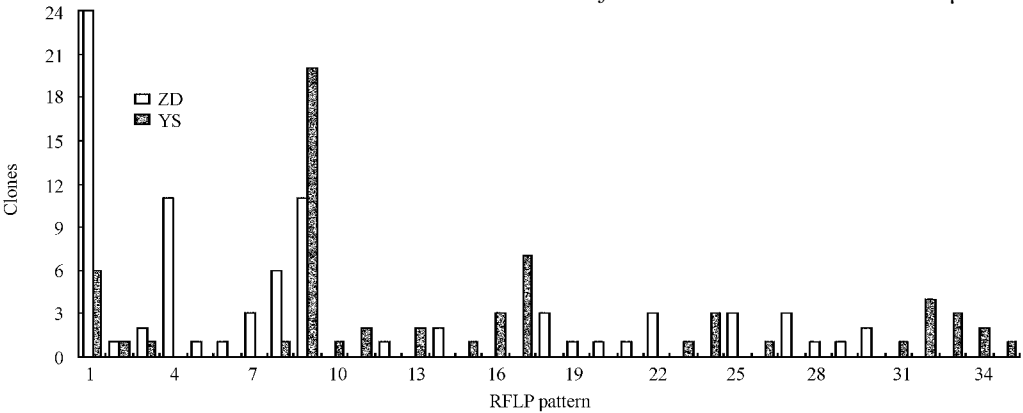


图 1 ZD 和 YS 样品克隆的 RFLP 分析结果

Fig.1 The analysis results by RFLP of sample ZD and YS

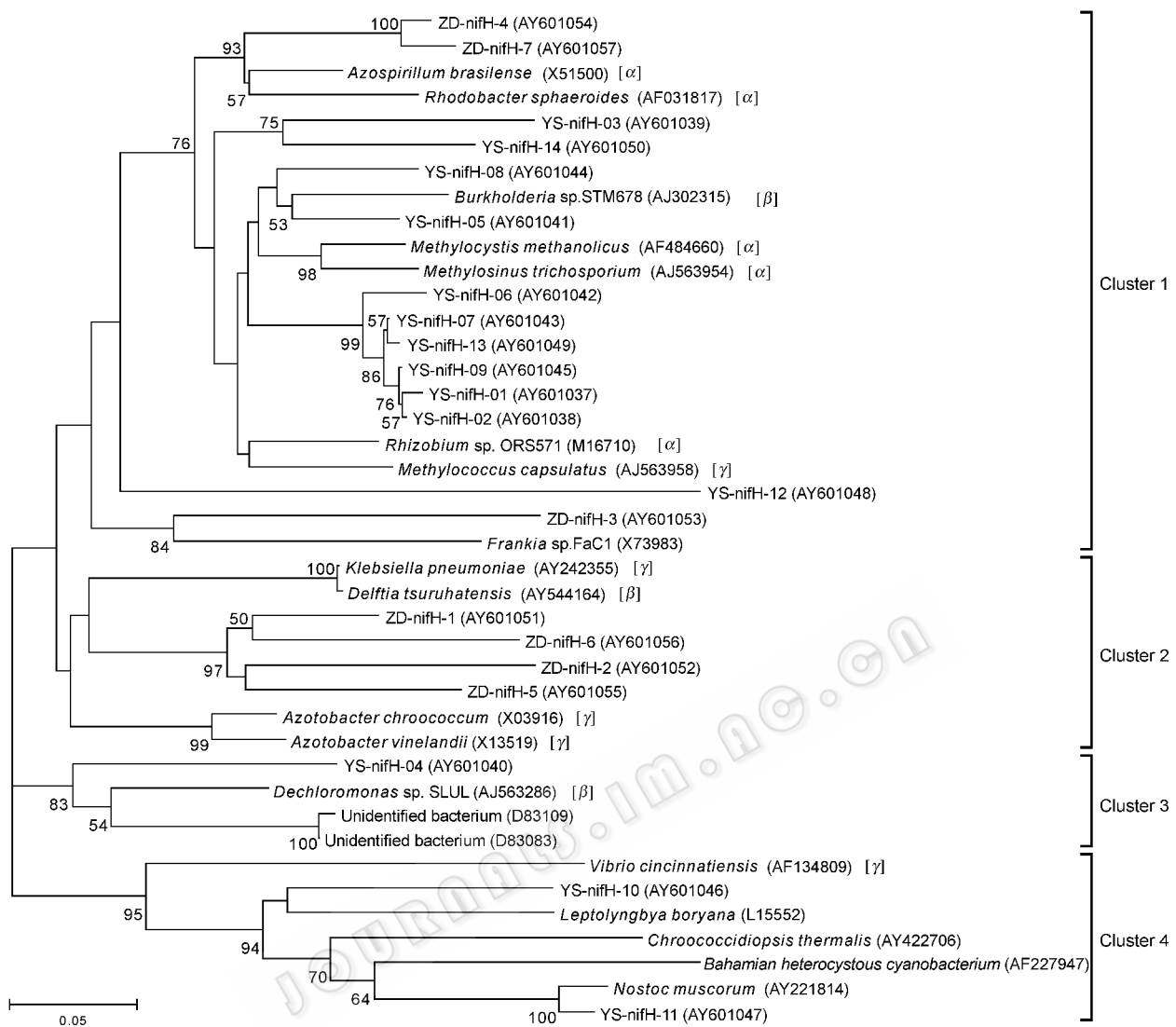


图 2 根据遗传距离建立的 *nifH* 基因系统发育树

Fig.2 Phylogenetic and molecular evolutionary analyses of *nifH* were conducted by genetic distance. The tree was constructed by Neighbor-Joining procedure in the software of Mega (3.0). Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The length and bootstrap confidence values of each branch are indicated above or below the branch, respectively. Numbers in square brackets indicate the phylogenetic positions of pure cultures based on 16S ribosomal DNA genes by α , β and γ subclasses of the *Proteobacteria*, respectively. Bar, 5% sequence divergence.

克隆,与 *Burkholderia* sp. STM678 分别具有 88% 和 90% 的相似性^[15]。属于 α -*Proteobacteria* 的 *Methylocystis methanolicus* 与 YS-*nifH*-01, YS-*nifH*-02, YS-*nifH*-06, YS-*nifH*-07, YS-*nifH*-09, YS-*nifH*-13 都具有 86% 以上的相似性, ZD-*nifH*-3 是所有序列中唯一与弗兰克氏 (*Frankia* sp. *FaC1*) 有较高相似性的克隆。属于第三簇的 YS-*nifH*-04 与属于 γ -*Proteobacteria* 的可培养的好气性自生固氮菌 *Azotobacter vinelandii* 具有 83% 的相似性^[16]。第四簇中的 YS-*nifH*-10 与培养菌株 *Leptolyngbya boryana* 具有 83% 的相似性^[17]; 而 YS-*nifH*-11 则是唯一与 *Cyanobacteria* 具有高相似性

的克隆,与其中的可培养菌株 *Nostoc muscorum* 具有 97% 的相似性^[18], 该序列也是 YS 样地中由唯一克隆产生的 RFLP 谱带型。同时,从图 2 中发现,部分的 *nifH* 序列虽然具有较高的多样性,但是与已知的固氮微生物具有较远的亲缘关系。例如第一簇中的 YS-*nifH*-12 则与已知的固氮微生物具有相对较低的相似性。属于第二簇的 4 个克隆都来自 ZD 样地,与属于 β -*Proteobacteria* 的可培养菌株 *Delftia tsuruhatensis* 具有较低的相似性。这些结果说明,本研究中的高寒草甸土中可能栖息着新的固氮微生物。

3 讨论

从微生物群落基因组的角度研究土壤微生物的多样性及其功能是一种可行的方法,近年来已经成为国内外研究的热点。对土壤固氮生物 *nifH* 基因的研究大都是应用不依赖于纯培养的方法,与纯培养相比,PCR 克隆、RFLP 分析等方法常被用于研究不同环境下 *nifH* 基因的组成和多样性,这些方法更有利于对固氮生物进行完整的探索,这些研究发现, *nifH* 基因存在于不同的生态环境^[7~10]。但是在已有的研究报道中,没有见到关于高寒草甸土壤固氮微生物的研究报道。

在本研究中,对高寒草甸土壤微生物 *nifH* 基因的 PCR 克隆产物进行了 RFLP 分析和测序,研究发现 2 个样地的 *nifH* 都具有高度的多样性,而且分别存在不同的明显优势种群。有研究表明, *NifH* 亚基是固氮酶中最保守的^[19],本研究中除了 *YS-nifH-11* 与 *Nostoc muscorum* 具有 97% 的相似性外,其他的序列与已知序列的相似性在 76% ~ 90% 之间,因此,表明这些序列具有高度的多样性,而且这些新发现的序列与已有的微生物都具有一定的亲缘关系。Mehta 等对深海中的 *nifH* 基因进行研究时,也发现所得到的序列与已知的微生物具有一定的亲缘关系^[20]。测序得到的 *nifH* 基因序列均是在 GenBank 数据库没有登记过,因此,这些序列可能代表着以前没有研究过的固氮微生物,甚至是该地区特有的。而且除了 *ZD-nifH-3*, *YS-nifH-11* 和 *YS-nifH-12* 外,所有序列都与 *Proteobacteria* 具有相对较高的相似性,因此样地中的大部分的固氮生物可能都属于 *Proteobacteria*。

生物地理化学性状影响着固氮微生物群落的组成和分布。本研究中的两个样地具有不同的生物地理化学性状, *ZD* 样地具有相对较高的 C、K、P 和 Ca 等含量,从 PCR-RFLP 分析看出, *ZD* 样地具有更多的克隆数和 RFLP 谱带分布型,且两个样地之间的谱带型大部分相差较大,因此,两个样地含有明显不同的固氮微生物群落。

不同的生态环境因子可能影响土壤微生物的活性,特别是固氮微生物^[21,22]。Keeling 和 Limmer 等^[23,24] 研究表明,土壤的 C/N 比例影响着土壤固氮微生物的活性,在本研究采用的 2 个样地中, *ZD* 样地的 C/N 比明显高于 *YS* 样地,从 RFLP 分析的结果可以看出,尽管 *YS* 样地的 *nifH* 基因多样性 31.1% 要高于 *ZD* 样地 25.6%,但是 *ZD* 样地中得到的克隆

数要多于 *YS* 样地,因此固氮微生物活性可能高于要高于 *YS* 样地,所以, C/N 比例高的土壤中,固氮微生物的活性可能要高。

本研究首次对高寒草甸土壤微生物固氮生物 *nifH* 基因的多样性和系统发育进行了探讨。样品取自青藏高原三江源自然保护区,由于常年气候严寒,在地下形成了永久冰川冻土,因此,这些样地中的土壤微生物活动可能相对要少,而且主要发生在上层土壤。有研究表明,绝大部分的固氮微生物都位于土壤的最表层,并且可能占上层微生物总数的 5%^[25],同时本研究的样品采自微生物较为活跃的季节,因此,本研究得到的固氮微生物 *nifH* 基因能够很大程度的反映该地区固氮微生物的多样性。

致谢 本研究在数据分析中得到了美国 Oak Ridge 国家重点实验室 Jizhong Zhou 教授的指导和帮助,并在本文的撰写过程中提出了许多宝贵意见,谨在此表示感谢!

参 考 文 献

- [1] 陈 灏,唐小树,林 洁,等.不经培养的农田土壤微生物种群构成及系统分类的初步研究.微生物学报,2002,42 (4) 478-483.
- [2] Young J P W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In Stacey G, Burris R H, Evans H J. ed. Biological Nitrogen Fixation. New York: Chapman and Hall, 1992, 43-86.
- [3] Kennedy I R, Islam N. The current and potential contribution of asymbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms: a review. Aust J Exp Agric, 2001, 41 447-457.
- [4] Peoples M B, Craswell E T. Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual contributions to agriculture. Plant soil, 1992, 141 13-39.
- [5] Lovell C R, Piceno J M, Quattro J M. Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*. Appl Environ Microbiol, 2000, 66 3814-3822.
- [6] Poly F L, Ranjard S, Nazaret F, et al. Comparison of *NifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. Appl Environ Microbiol, 2001, 67 2255-2262.
- [7] Shaffer B T, Wildmer F, Porteous L A, et al. Temporal and spatial distribution of the *nifH* gene of N_2 -fixing bacteria in forests and clearcuts in western Oregon. Microb Ecol, 2000, 39 12-21.
- [8] Ueda T, Suga Y, Yahiro N, et al. Remarkable N_2 -fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. J Bacteriol, 1995, 177 1414-1417.
- [9] Chelius M K, Lepo J E. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified *nifH* sequences from wetland plant rhizosphere communities. Environ Technol, 1999, 20 883-889.
- [10] Zehr J P, Mellon M, Braun S, et al. Diversity of heterotrophic nitrogen fixation genes in a marine cyanobacterial mat. Appl Environ Microbiol, 1995, 61 2527-2532.
- [11] Richard A H, Qiu X, Wu L, et al. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. Appl Environ Microbiol, 2001, 67 4405-4503.

- [12] Rosch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 3818 – 3829.
- [13] 张于光, 李迪强, 饶力群, 等. 东北虎微卫星 DNA 遗传标记的筛选及在亲子鉴定中的应用. *动物学报*, 2003, **49**: 118 – 123.
- [14] Zamaroczy M, Delorme F, Elmerich C. Regulation of transcription and promoter mapping of the structural genes for nitrogenase (*nif-HDK*) of *Azospirillum brasilense* Sp 7. *Mol Gen Genet*, 1989, **22**: 38 – 94.
- [15] Moulin L, Munive A, Dreyfus B, *et al.* Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of proteobacteria. *Nature*, 2001, **411**: 948 – 950.
- [16] Raina R, Reddy M A, Ghosal D, *et al.* Characterization of the gene for the Fe-protein of the vanadium dependent alternative nitrogenase of *Azotobacter vinelandii* and construction of a Tn5 mutant. *Mol Gen Genet*, 1988, **21**: 121 – 127.
- [17] Ben-Porath J, Zehr J P. Detection and characterization of cyanobacterial *nifH* genes. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 880 – 887.
- [18] Steward G F, Jenkins B D, Ward B B, *et al.* Development and testing of a DNA macroarray to assess nitrogenase (*nifH*) gene diversity. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 1455 – 1465.
- [19] Zani S, Mellon M T, Collier J L, *et al.* Expression of *nifH* genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, Detected by reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 3119 – 3124.
- [20] Mehta M P, Butterfield D A, Baross J A. Phylogenetic diversity of nitrogenase (*nifH*) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca Ridge. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 960 – 970.
- [21] Atlas R M, Bartha R. Microbial ecology, Fundamentals and applications. New York: Addison-Wesley Press, 1981, 125.
- [22] Dommergues Y, Mangenot F. Soil microbial ecology. Paris: Masson Press, 1970, 56 – 57.
- [23] Keeling A A, Cook J A, Wilcox A. Effects of carbohydrate application on diazotroph populations and nitrogen availability in grass swards established in garden waste compost. *Biores Technol*, 1998, **66**: 3814 – 3822.
- [24] Limmer C, Drake H L. Non-symbiotic N₂-fixation in acidic and pH-neutral forest soil: aerobic and anaerobic differentials. *Soil Biol Biochem*, 1996, **28**: 177 – 183.
- [25] Mergel A, Schmitz O, Mallmann T, *et al.* Relative abundance of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in layers of a forest soil. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, **36**: 33 – 42.

Molecular diversity and phylogenetic analysis of nitrogen-fixing (*nifH*) genes in alp prairie soil of Sanjiangyuan natural reserve

ZHANG Yu-guang^{1,2} WANG Hui-min^{1,2} LI Di-qiang^{2*} XIAO Qi-ming¹ LIU Xue-duan¹

⁽¹⁾ College of Biosafety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

⁽²⁾ Institute of Forestry Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China

Abstract: Research on the diversity of microorganism community in natural environment has been concerned hot spot using the newly molecular biotechnology in the world now. This was the first description of the molecular diversity and phylogenetic analysis of nitrogen-fixing (*nifH*) genes in alp prairie soil of Sanjiangyuan natural reserve. DNA was directly extracted from the soil microorganism and amplified the *nifH* gene fragment using PCR by the primers of *nifH*-34F 5'-AAAGG(C/T)GG(A/T)ATCGG(C/T)AA(A/G)TCCACCAC-3' and *nifH*-491R 5'-TTGTT(G/C)GC(G/C)GC(A/G)TACAT(G/C)GCCATCAT-3'. For the gene fragment, diverse PCR products were characterized by cloning, restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and sequencing. 143 clones and 35 different RFLP patterns were received in two samples by the restriction enzymes *Msp*I and *Rsa*I digested. ZD sample had 82 clones and 21 different RFLP patterns, and YS sample had 61 clones and 19 different RFLP patterns. There were shared 5 RFLP patterns in two samples. The analysis result found a significant dominant group of clones occurring in both samples which account for 29.3% and 32.8%, respectively, and several minor groups were also detected.

21 clones were sequenced, and their levels of nucleotide identity were from 71% to 98%. None of the sequenced *nifH* gene was completely identical to any deposited in the data banks, and therefore each of them belong to a noncharacterized bacterium. Finally, the phylogenetic tree was constructed by the Clustal W and Mega softwares. 21 sequences can be subdivided into 4 clusters in the phylogenetic tree, and most of them had the closely similar to α -, β -, and γ -*Proteobacteria*. The significant dominant group in YS sample and ZD sample had the closely related with *Rhodobacter sphaeroides* and *Delftia tsuruhatensis*, respectively. The YS-*nifH*-11 was the only sequence which had highly similar to *Cyanobacteria*.

Key words: Alp prairie, Nitrogen-fixing gene, Diversity, Phylogeny

Foundation item: The 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2001BA510B10)

* Corresponding author. Tel: 86-10-62889551; Fax: 86-10-62889551; E-mail: reserve@forestry.ac.cn, yugzhang@sina.com.cn

Received date: 2008-30-2004