

三江源地区不同植被土壤固氮微生物的群落结构研究

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中国林业科学院森林生态环境与保护研究所 北京 100091)

摘 要 利用 PCR-RFLP 和测序分析法对位于青藏高原腹地三江源自然保护区的高寒草甸、高寒草原和高山森林等不同植被类型的土壤固氮微生物的群落组成进行了探讨。经过 PCR-RFLP 分析固氮基因 *nifH* 在 3 个样品中共得到 233 个克隆和 99 个可操作分类单元(OTUs),NQ-1 样地具有最多的克隆数和 OTUs,多样性为 49.74%。在所有样品中分别具有 1~2 个明显的优势种群(占总克隆数 > 15%),并且具有 4 个共同的 OTUs。选取了 26 个克隆进行基因测序分析,通过 DNAMAN 比较表明这些序列间具有 66%~98% 的相似性,并且在 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 软件构建了系统发育树,结果发现这些序列被分为 4 个不同的簇,部分序列与属于蛋白细菌(*Proteobacteria*)的已知细菌具有近的亲缘关系,但是更多的序列与已知细菌具有较远的亲缘关系,而且 *nifH* 基因序列的分布在样地间没有明显的聚类。

关键词: *nifH* 基因, 植被类型, 群落, PCR-RFLP 分析,

中图分类号: Q938, Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)03-0420-06

生物固氮是氮进入生态系统物质循环的主要途径之一,古细菌、真细菌等多种不同微生物都具有固氮能力^[1]。所有固氮微生物中都含有编码铁蛋白的 *nifH* 基因,Young 等^[1]研究发现, *nifH* 基因的系统发育与 16S rRNA 具有显著的一致性,表明 *nifH* 基因是研究固氮生物群落结构很好的标记。目前对 *nifH* 基因的研究主要依赖于非培养的方法,例如 PCR 克隆、PCR-RFLP、DGGE 和荧光标记末端(FLT)-RFLP 等,通过这些方法有利于对固氮生物群落进行全面的研究^[2]。很多研究者应用了这些方法对不同环境中的 *nifH* 基因进行了分析,研究发现在不同植被和地理条件下都存在多样的 *nifH* 基因,例如森林土壤、草地、海底沉积物、耕地等^[3~6],这些研究中都得到了大量未知固氮生物新的 *nifH* 基因序列,而且某些 *nifH* 基因具有明显的生态特征^[3,7],Shaffer 等^[3]研究认为固氮生物的栖息地与 *nifH* 基因的多样性可能具有相关性。

三江源自然保护区位于青海省南部,属于青藏高原腹地,具有独特的自然地理环境。该地区孕育了独特的动植物区系和生态系统,高寒草甸、高寒草原和高山森林是三江源地区重要的植被类型。迄今

为止,还未见到关于该地区不同植被的固氮微生物群落结构的报道。本研究旨在利用 PCR-RFLP 和测序分析,通过对三江源地区不同植被类型土壤的固氮基因(*nifH*)多样性和系统发育进行研究,探讨该地区固氮微生物群落的组成和结构差异。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集:于 2003 年 8 月,在青海省三江源自然保护区采集了 3 个土壤样品,其植被类型分别为高寒草甸、高寒草原和高山森林,样品的具体采集位置、主要植被种类等基本情况见表 1。样品采集采用正方形 5 点取样法,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。

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 载体试剂盒购自 Promega Corp.(USA);PCR 扩增仪为 Gene Amp PCR9700。

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,博士研究生,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:2004-10-31;修回日期:2005-03-04

表 1 土壤样品的位置和植被情况

Table 1 Sample locations and plant types of the studied soils

No. Sample	Sample location	Altitude	Latitude and longitude	Plant type	Dominant plant species
YS-1	Yushu county	3907m	32°49'875"N, 97°07'795"W	Alp prairie	Form. <i>Kobresia parva</i>
ZD-1	Zhiduo county	4266m	33°49'176"N, 95°56'399"W	Alp grassland	Form. <i>Stipa purpurea</i>
NQ-1	Nangqian county	3990m	31°53'213"N, 96°35'455"W	Mountain forestry	Form. <i>Picea likiangensis</i> var. <i>balfouriana</i>

1.2 样品化学性状的测定^[8]

应用重铬酸钾法测定 C 的含量,碱解扩散法测定 N 的含量, HClO₄-H₂SO₄ 法测定 P 的含量, NaOH 熔融法测定 K 的含量。

1.3 DNA 的提取和纯化

参照 Richard 等的方法^[9], 并进行了适当修改, 具体操作方案参照文献^[10]。将溶解的 DNA 在 40V 电压下 0.8% 琼脂糖电泳 12h, 然后用试剂盒回收。

1.4 固氮基因 (*nifH*) 的 PCR 扩增和克隆

固氮基因的扩增引物参照文献^[11]设计, 其序列为: *nifH*-34F 5'-AAAGG(C/T)GG(A/T)ATCGG(C/T)A(A/G)TCCACCAC-3'; *nifH*-491R 5'-TTGTI(G/C)GG(G/C)GG(A/G)TACAT(G/C)GCCATCA T-3', 该引物可以在不同种属的固氮微生物中扩增到约 460bp 目标片段^[11]。PCR 的反应体系和具体反应条件见文献^[10]。

利用 1.5% 琼脂糖电泳 PCR 扩增产物, 试剂盒回收目标片段。根据厂商提供的说明书, 用 pGEM-T Easy 载体试剂盒对回收的目标片段克隆。

1.5 RFLP 分析

挑选白斑, 用载体 pGEM-T Easy 特异性引物 T₇-TAATACGACTCACTATAGGGAGA 和 SP₆-CATACGATTTAGGTGACACTATAG 对克隆产物进行 PCR 扩增, 经电泳筛选有期望大小片段(有约 620bp 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 3~4h, 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^[12]。最后用 Labwork (3.0.2) 软件对染色结果进行数据统计和分析。

表 2 土壤样品的部分理化性质

Table 2 Physicochemical characteristics of the studied soils

No. sample	N%	C%	C/N	K%	P%	pH	Clones	OTUs (OTUs% in clones)
YS-1	0.474	1.780	3.8	1.975	0.208	7.46	63	24 (38.10%)
ZD-1	0.278	3.065	11.0	3.303	0.165	7.66	75	28 (37.33%)
NQ-1	0.465	8.729	18.8	4.240	0.263	7.13	95	47 (49.47%)

2.2 *nifH* 的克隆和 RFLP 分析

从 3 个样品中共获得 233 个 *nifH* 克隆, 通过

1.6 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, 其中地遗传距离用 Tamura-Nei 公式计算, 枝长代表了分歧程度, 各枝上的数字是 1000 次 bootstrap 重抽样分析的支持百分比。

1.7 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 AY601058 ~ AY601065, AY601067 ~ AY601070, AY601072 ~ AY601074, AY635853 ~ 635863。

2 结果和分析

2.1 土壤的生物地理化学性状

3 个样品的部分理化性质见表 2。从表 1 和 2 可以看出, 样地海拔高度相近, 土壤酸碱度基本一致, 呈中性, 含有较为丰富的有机物质, 其中 N 的含量处于 0.278% ~ 0.474%, C 的含量处于 1.780% ~ 8.729%, C 含量的变化幅度明显大于 N 含量的变化。YS-1 样地虽然 N 的含量最高, 但是 C 的含量却最少, 因而 C/N 比最低, NQ-1 样地因具有的 C 含量最高, C/N 比值也最大, ZD-1 则居中。同时, 土壤 P、K 等元素的含量丰富, 而且 K 的含量存在较明显差异。

Labwork 软件分析酶切结果, 共获得 99 个不同的 *nifH* 可操作分类单元 (OTUs, 见表 2)。在各个样地

中,都具有不同的明显优势种群,在 YS-1 样地中具有 1 个明显的优势种群,该优势种群占总克隆数的 27.0%。在 ZD-1 和 NQ-1 样地中分别有 2 个明显的优势种群,分别占总克隆数的 36.0% (16.0% 和 20.0%) 和 37.9% (15.8% 和 22.1%)。另外,各个样地中还分别有 1~2 个不等的次要的优势种群,分别占总克隆数的 4.1%~7.9%。同时,在各个样地中,很大部分的 OTUs 是由单个克隆产生的,也就是说,大多数的克隆分别都具有独特的 RFLP 谱带类型,在 YS-1、ZD-1 和 NQ-1 样地中,由单个克隆形成的 OTUs 分别占了总 OTUs 的 58.3%、67.9% 和 61.7%,因此,大部分的 OTUs 只占了少量的克隆数,这一结果说明各样品中的 *nifH* 克隆具有高度的多样性。

在所有的 OTUs 中,发现 YS-1-10、YS-1-12、YS-1-15 和 YS-1-19 等 4 个 OTUs 是 3 个样地中所共有的,其中 YS-1-12 在 YS-1 中是明显的优势种群,占总克隆数的 27.0%,YS-1-10 在 NQ-1 中是次要的优势种群,而 YS-1-19 在 YS-1、ZD-1 中都是次要的优势种群,YS-1-15 则是均是由单克隆产生的 OTUs。样地间的两两比较可以发现,更多的克隆是样地间所共有的,具有更多相似的固氮细菌群落。在 YS-1 和 ZD-1 样地间共有克隆数和 OTUs 数分别占总克隆数的 14.96% 和总 OTUs 的 9.61%,在 YS-1 和 NQ-1 样地间共有克隆数和 OTUs 数分别占总克隆数的 10.12% 和总 OTUs 的 7.04%,在 ZD-1 和 NQ-1 样地间共有克隆数和 OTUs 数分别占总克隆数的 14.71% 和总 OTUs 的 8.00%。

2.3 *nifH* 基因的测序结果和系统发育分析

从所有的克隆中挑选出 26 个克隆进行测序分析。通过 DNAMAN 软件对所有序列进行了同源性比较,序列相似性为 66%~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,因此这些序列均是以前没有描述过的固氮基因序列。应用 Clustal W 和 Mega 软件将这些序列构建系统进化树(图 1),从系统发育树可以看出,大部分的序列具有高度的多样性,所有的 *nifH* 测序基因被分为 4 个主要的簇,分属于多个不同的组群,其中大部分都聚集在第一和第三簇中。

从图 1 中可以看出,部分序列与已知的固氮细菌具有近的亲缘关系,这些序列大都聚集在第二簇中。其中来自 ZD-1 样地的克隆 ZD-1-02 与属于蛋白细菌(β -Proteobacteria)的杆菌(*Burkholderia brasiliensis*)的相似性为 86.2%^[13],克隆 ZD-1-07 与属

于 α -Proteobacteria 的根瘤菌(*Rhizobium japonicum*)具有 96.3% 的相似性^[14],克隆 ZD-1-08 与属于 α -Proteobacteria 的甲烷菌(*Methylocella tundrae*)聚类在一起,具有 90.7% 的相似性^[15]。属于 NQ-1 样地的克隆 NQ-1-01 与属于 α -Proteobacteria 的固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)聚类在一起,具有 88.4% 的相似性,克隆 NQ-1-06 与属于 α -Proteobacteria 的根瘤菌(*Rhizobium gallicum*)的相似性为 85.9%^[16],克隆 NQ-1-07 与属于 α -Proteobacteria 的根瘤菌(*Sinorhizobium sp.170*)聚类在一起,具有 89.6% 的相似性^[17]。

同时,很大一部分的序列与已知的固氮细菌具有相对较远的亲缘关系,这些序列主要聚集在第三簇和第四簇中,而且除 ZD-1(ZD-1-05)样地外,其他样地中的明显优势种群都属于这类序列,分别为 YS-1-12 和 NQ-1-03。在第三簇中来自 YS-1 样地的 5 个克隆和属于 NQ-1 样地的 4 个克隆与属于 δ -Proteobacteria 的脱硫弧菌(*Desulfovibrio vulgaris*)和属于 β -Proteobacteria 的粪产碱菌(*A. faecalis*)聚集在一起,但是,其相似性相对较低,仅为 74.1%~77.5% 之间。YS-1-18 是唯一属于第四簇中的克隆,与属于 β -Proteobacteria 的弧菌(*Vibrio cincinnatiensis*)聚集在一起,具有的相似性仅为 70.7%。

另外,在第一簇中,部分序列明显的聚类在一起,但是与已知的固氮细菌不具有明显的亲缘关系。但是这些克隆却与一些未经培养的固氮细菌序列具有较好的同源性,同源性处于 85%~95% 之间,例如克隆 ZD-1-01 与微嗜氮的多年生草(*Molinia coerulea*)的根际非培养固氮生物具有 90.3% 的相似性^[18]。

3 讨论

土壤中仅有 1% 的微生物已经用于培养,还有相当多的微生物因为无法培养而未被人类所认识^[19],以 PCR 为基础的分子生物学方法极大的加快了我们对自然微生物系统的了解^[20-22]。为了减少 PCR 可能产生的人为偏差,我们根据以前的研究结果对 PCR 方法进行了改良^[11]。

不同的生态环境因子都可能影响土壤微生物的活性,特别是固氮微生物^[23,24],Bardgett 等研究认为,植物种类可能容易影响土壤微生物群落的活性^[25]。本研究中的样地来自高寒草甸、高寒草原和高山森林 3 种主要植被,高山森林样地 NQ-1 具有最多的固氮微生物和丰富的多样性,而高寒草甸和高山森林样地的固氮微生物和多样性更为接近。尽管在 3 个

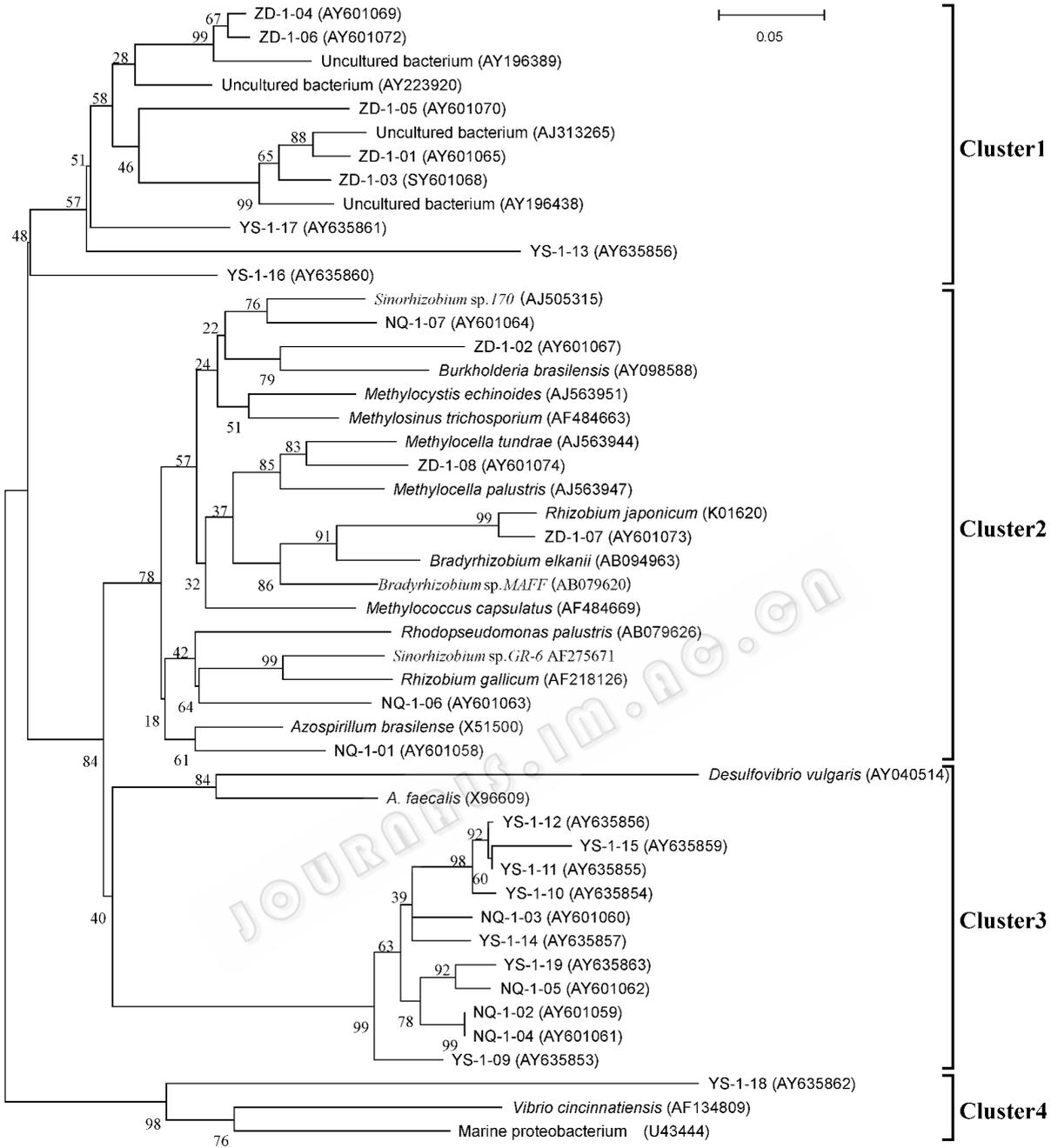


图 1 根据遗传距离建立的 *nifH* 基因系统发育树

Fig.1 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. Bar, 5% sequence divergence.

样地中仅得到了 4 个共有的 OTUs,但是在以前的研究中发现,相同的高寒草甸植被类型间具有更多的共有克隆和 OTUs 数^[10],因此,不同的植被类型下具有不同的固氮微生物群落。Keeling 和 Limmer 等研究表明,土壤的 C/N 比例影响着土壤固氮微生物的活性^[26, 27],同时 Cejudo 等研究表明土壤中的总 N 影响固氮生物的分布^[28],本研究中的样地都具有明显

不同的 C/N 比, NQ-1 具有最高 C/N 比值和克隆数,而氮量相对不足,结果显示有自生固氮菌的存在,其在自然状态下固氮效率比根瘤菌高,符合正常生态规律。

研究中都得到了大量未知固氮生物新的 *nifH* 基因序列,从系统发育树可以看出 (1)大部分的克隆序列与属于 *Proteobacteria* 的已知固氮微生物具有

近的亲缘关系 (2) *nifH* 基因序列的分布在样地间没有明显的差异 (3) 大多数的 *nifH* 克隆与已培养的固氮细菌的亲缘关系较远, 有的甚至不具有明显的亲缘关系, 多数克隆与已知的固氮细菌仅有小于 80% 的相似性, 可能代表了新的固氮细菌序列。如果克隆文库代表了原位的微生物群落结构, 那么这些新的组群是否在样地中具有很高的丰度, 为了证明丰度, 需要应用定量 PCR 等方法对这些基因进行定量分析。为了更好的理解它们的功能, 有必要进行一些分离培养实验。

本研究首次对青藏高原地区的固氮微生物群落结构进行了探讨, 除提供了固氮微生物的多样性和新的 *nifH* 基因序列外, 还就某些影响细菌群落组成的重要生物地理化学性状进行了分析。为了进一步了解固氮细菌群落分布与功能的关系, 有必要对固氮细菌群落和它们的动态变化进行更加深入的研究和探讨。

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] 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.
- [2] 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**(5): 2255 - 2262.
- [3] Shaffer B T, Wildmer F, Porteous L A, et al. Temporal and spatial distribution of the *nifH* gene of N₂-fixing bacteria in forests and clearcuts in western Oregon. *Microb Ecol*, 2000, **39**(1): 12 - 21.
- [4] Ueda T, Suga Y, Yahiro N, et al. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J Bacteriol*, 1995, **177**(5): 1414 - 1417.
- [5] Chelius M K, Lepo J E. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified *nifH* sequences from wetland plant rhizosphere communities. *Environ Technol*, 1999, **2**(2): 883 - 889.
- [6] 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**(4): 2527 - 2532.
- [7] Zehr J P, Capone D G. Problems and promises of assaying the genetic potential for nitrogen fixation in the marine environment. *Microb Ecol*, 1996, **32**(3): 263 - 281.
- [8] 鲍士旦. 土壤农化分析. 北京: 中国农业出版社, 1999, 1 - 126.
- [9] Richard A H, Qiu X, Wu L, et al. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(10): 4495 - 4503.
- [10] 张于光, 王慧敏, 李迪强, 等. 三江源高寒草甸土固氮基因 (*nifH*) 的多样性和系统发育研究. *微生物学报*, 2005, **45**(2): 166 - 171.
- [11] Rosch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(8): 3818 - 3829.
- [12] 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**(1): 118 - 123.
- [13] Marin V A, Teixeira K R, Baldani J I. Characterization of amplified polymerase chain reaction *glnB* and *nifH* gene fragments of nitrogen-fixing Burkholderia species. *Lett Appl Microbiol*, 2003, **36**(2): 77 - 82.
- [14] Fuhrmann M, Hennecke H. Rhizobium japonicum nitrogenase Fe protein gene (*nifH*). *J Bacteriol*, 1984, **158**(3): 1005 - 1011.
- [15] Dedysh S N, Ricke P, Liesack W. NifH and NifD phylogenies: an evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria. *Microbiology*, 2004, **150**(5): 1301 - 1313.
- [16] Laguerre G, Nour SM, Macheret V, et al. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among Phaseolus vulgaris symbionts. *Microbiology*, 2001, **147**(4): 981 - 993.
- [17] Chen W M, Moulin L, Bontemps C, et al. Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol*, 2003, **185**(24): 7266 - 7272.
- [18] Hamelin J, Fromin N, Tamawski S, et al. *nifH* gene diversity in the bacterial community associated with the rhizosphere of Molinia caerulea, an oligonitrophilic perennial grass. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **4**(8): 477 - 481.
- [19] 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.
- [20] Amann R I, Ludwig S K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, **59**(1): 143 - 169.
- [21] Hugenholtz P, Goebel B M, Pace N R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacteria diversity. *J Bacteriol*, 1998, **180**(18): 4765 - 4774.
- [22] Zhou J Z. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Curr Opin Microbiol*, 2003, **6**(1): 288 - 294.
- [23] Atlas R M, Bartha R. Microbial Ecology. Fundamentals and applications. New York: Addison-Wesley Press, 1981, 125.
- [24] Dommergues Y, Mangenot F. Soil Microbial Ecology. Paris: Masson Press, 1970, 56 - 57.
- [25] Bardgett R D, Mawdley J L, Edwards S, et al. Plant species and nitrogen effects on soil biological properties of temperate upland grasslands. *Funct Ecol*, 1999, **13**(3): 650 - 660.

- [26] 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** (2) : 3814 - 3822.
- [27] 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** (3) : 177 - 183.
- [28] Cejudo F J , Paneque A. Short-term nitrate(nitrite) inhibition of nitrogen fixation in *Azotobacter chroococcum* , *J Bacteriol* , 1986 , **165** (1) : 240 - 243.

The community and structure of nitrogen-fixing microorganism in 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. To understand the composition and structure of nitrogen-fixing bacteria communities in the Qingzang plateau , the molecular diversity and phylogenetic of *nifH* genes of Sangjiangyuan natural reserve were examined by using the PCR-RFLP based cloning approach.

The 3 samples were come from different sites and different plant types , and their biogeochemical parameters were diverse. 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)G(C/A/T) ATCG(C/T)AA(A/G) TCCACCAC-3' and *nifH*-491R 5'-TTGT(G/C)G(C/G)G(C/A/G)TACAT(G/C)GCCATCAT-3'. For the *nifH* gene segment , diverse PCR products were characterized by cloning , restriction fragment length polymorphism(RFLP) analysis and sequencing. A total of 233 clones and 99 operational taxonomic units (OTUs) which were digested the clones by the restriction enzymes *MspI* and *RsaI* were obtained from all samples. YS-1 had 63 clones and 24 OTUs , ZD-1 had 75 clones and 28 OTUs , and NQ-1 had 95 clones and 47 OTUs , respectively. They were found 1 ~ 2 significant domain groups of clones and shared 4 OTUs in all samples.

A wide range of sequence divergence was observed in the 26 *nifH* clones that were sequenced from all samples. Sequence comparison showed that the *nifH* clones were 66% to 98% similar. The phylogenetic tree was constructed by the Clustal W and Mega softwares. 26 sequences could be subdivided into 4 clusters in the phylogenetic tree , and some of them had the closely similar to *Proteobacteria* , but The majority of the clones were not closely related to any known cultivated nitrogen-fixing bacteria , Therefore , most of them are unique and may represent novel sequences of nitrogen-fixing bacteria.

Key words : *nifH* gene , Plant type , Community , PCR-RFLP analysis

Foundation item : The 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China(2001BA510B10) ; The State Forestry Administration Key Project (Social , Economical and Ecological Value in Natural Reserve)

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

Received date : 10-31-2004