

毛竹根际可培养微生物种群多样性分析

李潞滨^{1*}, 刘敏^{1,3}, 杨淑贞⁴, 刘亮⁴, 缪崑¹, 杨凯^{2*}, 韩继刚³

(¹ 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091)

(² 北京农学院农业应用新技术北京市重点实验室, 北京 102206)

(³ 河北大学生命科学学院, 保定 071002)

(⁴ 浙江天目山国家级自然保护区管理局, 临安 311311)

摘要:【目的】为了了解天然毛竹林根际可培养微生物种群的多样性信息,【方法】采用稀释平板法,对浙江天目山和重庆缙云山天然毛竹林根际细菌和放线菌进行了分离,并对其 16S rDNA 序列进行了分析。【结果】分别从天目山和缙云山天然毛竹林根际分离得到 51 株和 31 株菌落形态差异的细菌和放线菌。16S rDNA 序列分析表明,天目山和缙云山毛竹根际细菌主要包括厚壁菌门 (Firmicutes, 分别为 40%和 58%)、放线菌门 (Actinobacteria, 分别为 36.7%和 10.52%)、变形菌门 α 亚群 (Alphaproteobacteria, 分别为 10%和 5.26%)和变形菌门 γ 亚群 (Gammaproteobacteria, 分别为 10%和 26.32%),其中芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 为共同的优势菌属 (分别为 34.38%和 42.11%)。分离的菌株中, B188、B171 和 B152 等 6 株与 GenBank 中已报道 16S rRNA 基因序列的相似性从 90%到 96%不等,可能代表着新属或种。【结论】这表明,天然毛竹林根际具有较为丰富的可培养微生物种群多样性,并存在一些潜在的新的微生物菌种资源。

关键词: 毛竹; 根际; 可培养微生物; 种群多样性

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 06-0772-08

植物根际是土壤-植物生态系统物质交换的活跃界面。作为最活跃生物因子的土壤微生物具有数量大、代谢强、繁殖快等特点,既是土壤微生物区系的重要组成部分,也是土壤物质流和能量流的主要推动者^[1]。近年来,将土壤微生物种群、数量以及分布作为评价土壤生态环境质量的重要指标,越来越受到重视^[2~3],有关玉米、茶树、棉花、哈密瓜、烟草等根际微生物的研究已有较多报道^[4~7]。毛竹 (*Phyllostachys pubescens*) 又名楠竹,是集生态与经济效益于一体的植物,目前对毛竹天然林根际土壤微生物种群多样性的研究尚处于空白状态。

本文以浙江省天目山和重庆缙云山两个地区天然毛竹林为研究对象,调查了竹林根际微生物的数

量,并依据 16S rDNA 序列特征对分离的 82 个菌株进行了鉴定和系统发育多样性分析,初步获得了天然毛竹林根际可培养微生物种群的多样性信息,为竹林根际微生物的理论和应用研究提供了基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土样采集: 2006 年 5 月 6 日和 10 日,分别于浙江省临安天目山和重庆缙云山国家级自然保护区天然毛竹林采取土壤样品。天目山自然保护区 (E119°25', N30°20') 年平均气温 15.9℃, 年降水量 1535.6 mm。采样点海拔 100 m 左右,土壤为酸性 (pH 4.5~5.5) 红壤^[8]。缙云山自然保护区 (E106°22', N29°45')

基金项目: 林业科技支撑计划(2006BAD01A1804)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-10-80791569, E-mail: yangkai8978@126.com

作者简介: 李潞滨(1962-), 男, 河北保定人, 副研究员, 博士。主要从事植物微生物相互关系等方面的研究。Tel/Fax: +86-10-62889684; E-mail: lilubin@126.com

收稿日期: 2007-11-19; 修回日期: 2008-01-02

年平均气温 13.6℃, 年均降水量 1611.8 mm, 采样点海拔 800 m 左右, 土壤为酸性 (pH 4.0~4.5) 黄壤^[9]。在中坡位置沿等高线分别设置 5 个样地 (5 m×10 m), 在各样地随机选竹 10 株。根据 Courchesne 等^[10]根际区土壤取样方法, 沿着毛竹基部挖取健康根系, 轻轻抖动 1 min, 取附着根系 2 mm 左右的土壤为根际土。试验样品为各样点采集的混合土壤样品。样品采集后放入无菌封口聚乙烯袋中, 4℃ 保存, 一周内分离。

1.1.2 培养基:牛肉膏蛋白胨培养基 (NA)^[11]。

1.1.3 主要试剂和仪器: Ex Taq DNA Polymerase 等扩增用试剂均购自 TaKaRa 公司; PCR Purification Kit 购自北京金螺旋生物科技公司; 引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。PCR 仪 (Biometra T-Gradient); 凝胶成像分析仪 (Bio-Rad Gel-Doc2000)。

1.2 根际微生物分离和计数

样品经系列稀释后涂布在 NA 培养基上, 30℃ 倒置恒温培养, 3 d 后统计数量。挑取菌落表型差异的单菌落, 纯化后的菌种转至 NA 斜面, 4℃ 保存。

1.3 16S rDNA 扩增

1.3.1 DNA 提取:参考 Kim 等和 Rainey 等的方法小量提取总 DNA^[12,13]。室温干燥后溶于适量 TE Buffer, 1% 琼脂糖电泳检测 DNA 质量。

1.3.2 引物:选用细菌通用引物^[12]。正向: 27 F, 5'-AG-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向: 1495 R, 5'-CT-ACGGCTACCTTGTACGA-3'。分别对应于 *Escherichia coli* 16S rDNA 的 8~27 和 1495~1514 位的碱基片段。

1.3.3 16S rDNA PCR 扩增:采用 50 μL 反应体系, 反应条件: 94℃ 3min; 94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 3min, 30 个循环; 72℃ 5min。

1.4 16S rDNA 序列分析

PCR 扩增产物经纯化后, 送北京三博远志生物技术有限责任公司测序。测序结果登录 GenBank (EU240367~EU240448)。利用 BLAST 软件, 将测定得到的基因序列与 GenBank 数据库中的序列进行比对分析, 并从数据库获得最相近的典型菌株的 16S rDNA 序列, 用 Clustal X 按照最大同源性的原则进行排序, 采用 Kimura 2^[14] 计算核苷酸差异值, 并用 Neighbor-join^[15] 法构建系统进化树, 自展数 (Bootstrap) 为 1000。

1.5 种群多样性分析

定义 16S rDNA 序列同源性大于 97% 作为同一分

类单元^[16], 采用 Shannon-Wiener 指数 (H), 均匀度指数 (E), 计算多样性^[17]。

$$H = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i \dots\dots\dots (1)$$

$$E = H / \ln S \dots\dots\dots (2)$$

式中 S 为分类单元, P_i 第 i 种的多度比例, 可以用 $P_i = n_i/N$ 求出。 n_i 是第 i 个分类单元的菌株数, $N = \sum n_i$, N 是所有菌株数总和。

2 结果

2.1 毛竹根际微生物的分离和计数

利用牛肉膏蛋白胨培养基 (NA) 对两个地区的毛竹根际土壤样品进行分离, 获得 82 株菌落表型差异的微生物。其中天目山和缙云山毛竹林根际细菌的数量分别为 7.1×10^5 cfu/g dw 和 4.0×10^5 cfu/g dw, 放线菌的数量分别为 3.0×10^5 cfu/g dw 和 3.3×10^3 cfu/g dw。

2.2 毛竹天然林根际微生物的多样性

对两地 82 株分离培养物的 16S rDNA 进行序列测定, 将获得的序列通过 BLAST 程序与 GenBank 数据库中已报道的 16S rDNA 序列进行相似性比对分析。其中 64 株与 GenBank 中已报道菌株具有较高的相似性 (97%), 18 株相似性只有 83%~96%。

定义 16S rDNA 相似性低于 97% 时作为不同的分类单元进行多样性计算, 结果表明: 分离自天目山的毛竹根际 51 个菌株, 可以划分为 32 个不同分类单元, Shannon 多样性指数为 4.7389, 均匀度指数为 0.9478。分离自缙云山的毛竹根际 31 个菌株, 可以划分为 19 个不同的分类单元。Shannon 多样性指数为 3.9064, 均匀度指数为 0.9196。以天目山毛竹根际微生物多样性指数和均匀度高。

2.3 天目山毛竹根际微生物的系统发育学分析

16S rDNA 序列分析表明, 51 株天目山毛竹根际微生物主要分属于 4 大类群 (表 1, 图 1)。其中, 30 株属于厚壁菌门 (Firmicutes, 40%), 11 株属于放线菌门 (Actinobacteria, 36.7%), 5 株属于变形菌门 α 亚群 (Alphaproteobacteria, 10%), 3 株属于变形菌门 γ 亚群 (Gammaproteobacteria, 10%), 1 株属于异常球菌-栖热菌门 (Deinococcus-Thermus)。

类群 Firmicutes 在天目山毛竹根际微生物中比例最高。其中 27 株 (34.38%) 在系统发育上与芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 关系密切, 16S rDNA 序列相似

表 1 分离自天目山的毛竹根际细菌和放线菌
Table 1 List of isolates from Tianmu mountain *Phyllostachys pubescens* rhizosphere

Phylogenetic group (genus)	Representative isolate (accession No.)	No. of strains in OTU*	Nearest type strain (accession No.)	Sequence identity /%
<i>Bacillus</i>	B99(EU240369)	3	<i>Bacillus samanii</i> (EF036537.1)	99
	B75(EU240370)	3	<i>Bacillus thuringiensis</i> (AF390545)	99
	B97(EU240378)	1	<i>Bacillus cereus</i> (AB247137)	96
	B89(EU240375)	5	<i>Bacillus cereus</i> (AB244464)	98
	B81(EU240382)	3	<i>Bacillus simplex</i> (DQ275178)	99
	B83(EU240381)	1	<i>Bacillus simplex</i> (DQ275178)	94
	B85(EU240383)	2	<i>Bacillus sphaericus</i> (DQ870695)	98
	B93(EU240393)	1	<i>Bacillus drentensis</i> (AJ542506)	98
	B90(EU240389)	3	<i>Bacillus megaterium</i> (AB244444)	98
	B100(EU240392)	1	<i>Bacillus megaterium</i> (AB244298)	91
	B96(EU240385)	4	<i>Bacillus mycoides</i> (AB116121)	98
<i>Paenibacillus</i>	B113(EU240394)	1	<i>Paenibacillus phyllosphaerae</i> (AY598818)	92
	B87(EU240395)	1	<i>Paenibacillus elgii</i> (AY090110)	93
	B121(EU240396)	1	<i>Paenibacillus graminis</i> (AJ223987)	97
<i>Deinococcus</i>	B80(EU240400)	1	<i>Deinococcus hohokamensis</i> (AY743258)	95
<i>Sphingomonas</i>	B107(EU240401)	1	<i>Sphingomonas xenophaga</i> (AY611716)	98
<i>Acinetobacter</i>	B120(EU240404)	1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (AF417872)	98
	B135(EU240405)	1	<i>Acinetobacter</i> sp. (AF500278)	83
<i>Massilia</i>	B108(EU240397)	3	<i>Massilia timonae</i> (AY157761)	98
<i>Brevundimonas</i>	B123(EU240402)	1	<i>Brevundimonas terrae</i> (DQ335215.1)	92
	B117(EU240403)	1	<i>Brevundimonas diminuta</i> (AB167225)	93
<i>Micrococcus</i>	B88(EU240406)	1	<i>Micrococcus luteus</i> (AJ409096)	98
<i>Dactylosporangium</i>	B138(EU240416)	1	<i>Dactylosporangium matsuzakiense</i> (D86940)	97
<i>Streptomyces</i>	B122(EU240412)	1	<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i> (DQ462662)	94
	B125(EU240413)	1	<i>Streptomyces sporoclivatus</i> (AJ781369)	98
	B126(EU240414)	1	<i>Streptomyces longwoodensis</i> (AJ781356)	97
	B131(EU240415)	1	<i>Streptomyces libani</i> (AJ781351)	98
	B128(EU240407)	2	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> (AY094370)	98
	B136(EU240409)	1	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> (AY094370)	96
	B115(EU240410)	1	<i>Streptomyces mirabilis</i> (AF112180)	96
	B116(EU240411)	1	<i>Streptomyces galbus</i> (X79325)	99
	B143(EU240417)	1	<i>Streptomyces pulveraceus</i> (AJ781377)	99

*OTUs generated using a 16S rRNA percent identity value of 97%.

性为 91%~99%，成为分离获得的最优势菌属。其余 3 株（9.38%）与类芽孢杆菌（*Paenibacillus* sp.）系统关系密切。12 株（34.38%）Actinobacteria 类群的菌株，包括了孢囊菌属（*Dactylosporangium* sp.）、链霉菌属（*Streptomyces* sp.）和微球菌属（*Micrococcus* sp.）。其中 10 株（28.13%）在系统发

育上与链霉菌属关系密切，是分离获得的第二优势菌属。

在全部菌株中，B97、B83 和 B100 等 12 株（23.5%，表 1）与 GenBank 中已报道菌株的序列相似性低于 97%，从 83%到 96%不等。这些菌株是可能的属或种，其分类地位有待于进一步的鉴定。

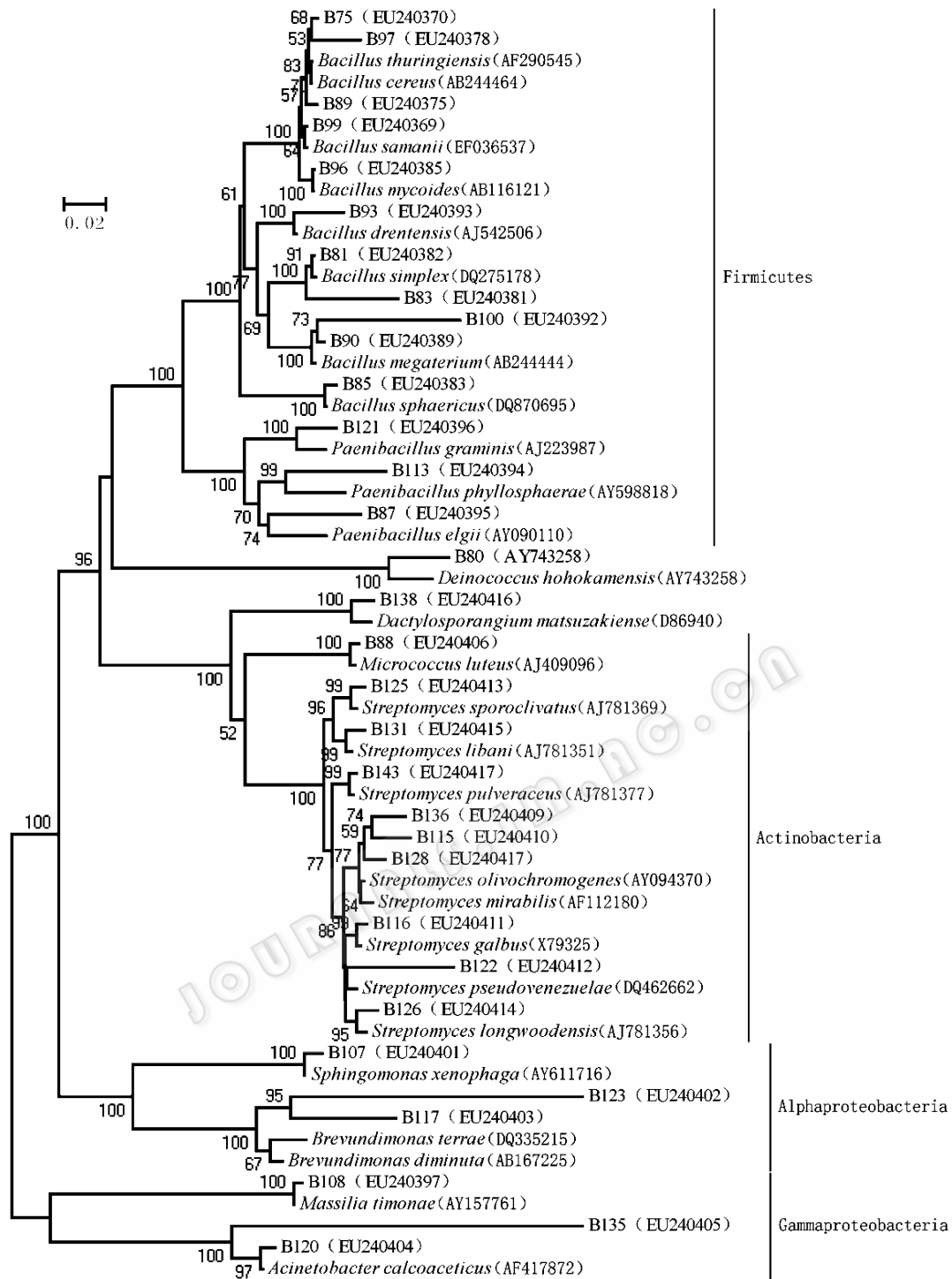


图1 基于16S rDNA序列同源性的天目山毛竹根际细菌系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the strains isolated from Tianmu Mountain *Phyllostachys pubescens* rhizosphere based on 16S rDNA sequences. Data in parentheses are the GenBank accession numbers and the number of isolates represented by this strain.

Bar indicates 2% sequence divergence. Bootstrap supporting values are shown at branch nodes.

2.4 缙云山毛竹根际微生物的系统发育学分析

16S rDNA 序列分析结果 (表 2, 图 2) 表明, 分离的 31 个菌株主要分属于 4 大类群。其中, 21 株属于厚壁菌门 (Firmicutes, 58%), 6 株属于变形菌门γ

亚群 (Gammaproteobacteria, 26.32%), 3 株属于放线菌门 (Actinobacteria, 10.52%), 1 株属于变形菌门α 亚群 (Alphaproteobacteria, 5.26%)。

类群 Firmicutes 在缙云山毛竹根际微生物中所占

表 2 分离自天目山的毛竹根际细菌和放线菌
Table 2 List of isolates from Jinyun mountain *Phyllostachys pubescens* rhizosphere

Phylogenetic group (genus)	Representative isolate (accession No.)	No.of strains in OTU*	Nearest type strain (accession No.)	Sequence identity /%
<i>Bacillus</i>	B159(EU240440)	7	<i>Bacillus cereus</i> (AF290554)	98
	B158(EU240439)	2	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (DQ345791)	98
	B188(EU240442)	1	<i>Bacillus cereus</i> (AJ577288)	96
	B170(EU240420)	3	<i>Bacillus cereus</i> (AJ577288)	98
	B154(EU240424)	2	<i>Bacillus simplex</i> (DQ275178)	97
	B169(EU240419)	1	<i>Bacillus psychrodurans</i> (EF101552)	98
	B174(EU240423)	1	<i>Bacillus luciferensis</i> (DQ870692)	97
	B150(EU240434)	1	<i>Bacillus sphaericus</i> (DQ523503)	98
<i>Paenibacillus</i>	B179(EU240430)	1	<i>Paenibacillus chondroitinus</i> (AB073206)	98
	B171(EU240421)	1	<i>Paenibacillus agarexedens</i> (AJ345020)	96
	B152(EU240436)	1	<i>Paenibacillus terrigena</i> (AB248087)	91
<i>Sphingomonas</i>	B166(EU240418)	1	<i>Sphingomonas yanoikuyae</i> (AF331661)	98
<i>Microbacterium</i>	B153(EU240437)	1	<i>Microbacterium trichotecenolyticum</i> (AY741722)	97
<i>Acinetobacter</i>	B190(EU240445)	1	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (DQ328322)	98
	B178(EU240429)	2	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (AF188300)	98
	B162(EU240441)	1	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (AF188300)	95
	B167(EU240446)	1	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (AF188300)	90
<i>Streptomyces</i>	B173(EU240447)	1	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (AF188300)	95
	B180(EU240422)	2	<i>Streptomyces</i> sp. (AY754722)	98

*OTUs generated using a 16S rRNA percent identity value of 97%.

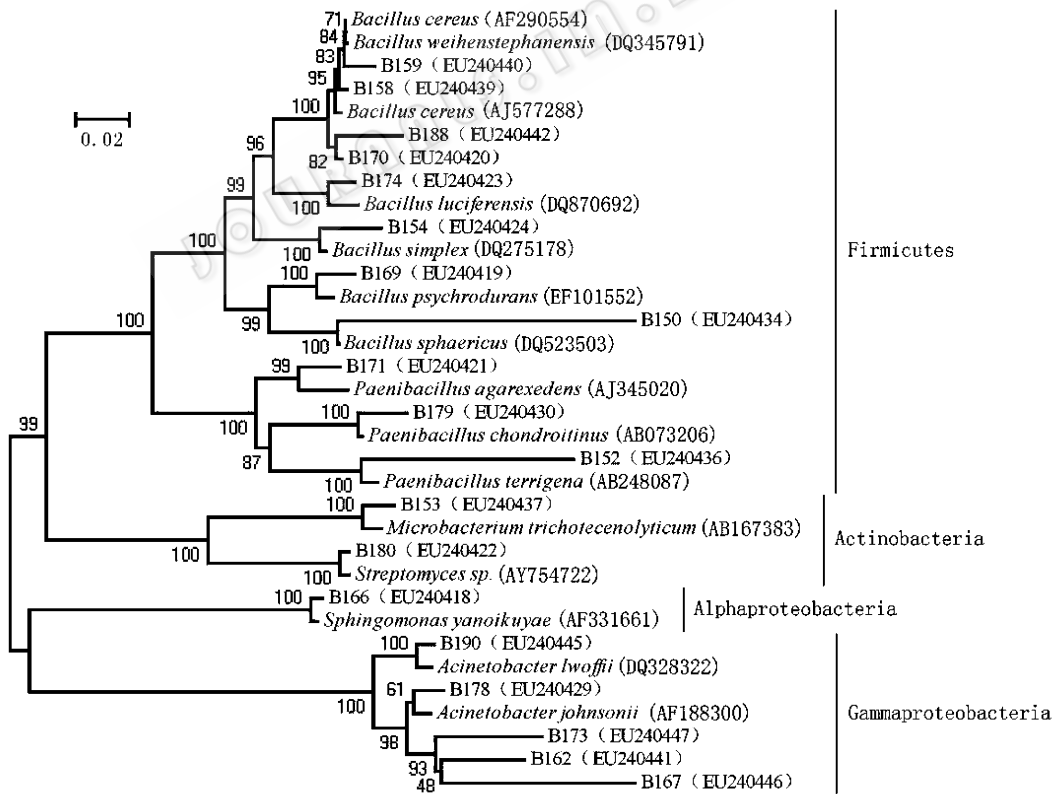


图2 基于16S rDNA序列同源性的缙云山毛竹根际细菌系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the strains isolated from Jinyun Mountain *Phyllostachys pubescens* rhizosphere based on 16S rDNA sequences. Data in parentheses are the GenBank accession numbers and the number of isolates represented by this strain. Bar indicates 2% sequence divergence. Bootstrap supporting values are shown at branch nodes.

的比例最高。其中,18株(42.11%)在亲缘关系上与芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)关系密切,16S rDNA序列相似性为96%~98%,是这一地区毛竹根际微生物种群的最优势菌属。6株(26.32%) Gammaproteobacteria类群的菌株在系统学上与不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)关系密切,为毛竹根际次优势类群。

分离的菌株中,B188、B171和B152等6株(19.4%,见表2)与GenBank中已报道序列的相似性低于97%,从90%到96%不等。这些菌株为可能的新属或种。

3 讨论

3.1 毛竹根际微生物的数量

根际是指土壤中围绕着植物根的一个狭窄的区域。由于植物根系分泌的代谢产物及根脱落物中含有大量有机质(约50~100 mg/g根),它们主要包括糖类、氨基酸、有机酸、脂肪酸、甾醇、核苷酸、维生素、黄酮、生长素和酶等,这些分泌物为根际微生物提供了丰富的营养来源,为其增殖创造了条件。因此,根际与散土相比有着数量更大,生物活性更强的微生物区系,主要包括细菌、真菌和藻类等,它们在根际的密度可达 $1 \times 10^9/\text{cm}^3$,比散土中高出10~100倍^[18]。本研究中,缙云山毛竹林根际细菌的数量为 4.0×10^5 cfu/g dw,放线菌的数量为 3.3×10^3 cfu/g dw。天目山毛竹林根际细菌的数量为 7.1×10^5 cfu/g dw,放线菌的数量为 3.0×10^5 cfu/g dw,与徐秋芳等^[8,19]的研究结果相接近。但这一数值均显著低于一般植物根际微生物的数量。推测这一结果与竹类植物根部特殊的生理结构和生理活动有关,而有待于进一步的研究。

3.2 毛竹根际微生物种群的多样性

根际环境中,细菌对各种根分泌物的利用率和敏感性远远超过放线菌、真菌、藻类和原生动物等,它们在根际微生物中最为活跃并占主导地位,能与植物根系联合生存并定殖和保持在根部。由于根系分泌物的选择作用,通常根际微生物的种类较少,并且大多以简单的有机物为养料^[20~21]。但在本研究中,两地毛竹林的微生物种群多样性指数分别为4.7389(天目山)和3.9064(缙云山),均显示出较为丰富的微生物种群多样性。比较两地天然毛竹林分离的根际微生物,发现芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)类芽孢杆菌属(*Paenibacillus* sp.)、鞘氨醇菌属(*Sphingomonas* sp.)不动杆菌属(*Acinetobacter*

sp.)和链霉菌属(*Streptomyces* sp.)在两地竹林根际都有分布。而异常球菌属(*Deinococcus* sp.)、Massilia sp.、短波菌属(*Brevundimonas* sp.)、指孢囊菌属(*Dactylosporangium* sp.)和微球菌属(*Micrococcus* sp.)只分布在天目山毛竹林根际,微杆菌属(*Microbacterium* sp.)只分布于缙云山毛竹林根际。其中芽孢杆菌属在天目山和缙云山两地毛竹林根际微生物中都占优势地位,分别占分离微生物种类的34.38%和42.11%。而两个地区毛竹根际微生物种群的次优势菌属则不相同,天目山地区为链霉菌属(28.13%),缙云山地区为不动杆菌属(26.32%)。

考察天目山和缙云山地区的地理气候特征发现,两地的土壤特征虽然较为相似,都是酸性土壤(天目山红壤pH4.5~5.5,缙云山黄壤pH4.0~4.5),但年平均气温天目山地区高于缙云山地区(分别为15.9和13.6),年降水量天目山地区却低于缙云山地区(分别为1535.6 mm和1611.8 mm)^[8,9]。一般认为红壤形成于亚热带生物气候条件下,气候温暖,雨量充沛;而黄壤形成于湿润的生物气候下,热量较同纬度红壤略低,雾日比红壤区多一半以上,日照少30%~40%^[22]。因此有理由认为天目山的地理气候特征更有利于毛竹根际微生物的生长繁殖,这与本研究中天目山毛竹根际微生物数量和种群多样性都高于缙云山毛竹根际的实验结果相一致。由于目前关于竹子根际微生物种群的研究尚处于空白状态,虽然芽孢杆菌属在两地都是优势菌属,本文的研究也还不能说明毛竹根际对芽孢杆菌属菌株具有选择性。有关根际微生物及其与竹类植物关系的研究还有待于进一步深入。

3.3 毛竹根际微生物种群中潜在的新的菌种资源

中国是世界上竹类植物资源最丰富的国家,竹类植物广泛分布于我国南方地区,具有独特的地理、气候特征。值得关注的是,在两地毛竹林根际都发现了很多16S rDNA序列与GenBank中已报道序列相似性较低(<97%)的菌株,这些菌株分别占到分离菌株总数的23.5%(天目山)和19.4%(缙云山),显示出竹林根际微生物种群中有很多潜在的新的菌种资源。

本文首次对我国两个地区天然毛竹林根际微生物进行了分离培养,对可培养微生物的16S rDNA进行了序列分析,结果表明,天然毛竹林根际具有较为丰富的可培养微生物种群多样性,并存在一些潜在的新的微生物菌种资源。但是应该看到,尽管用稀释涂布平板分离环境中微生物的是一种常用的方法,但所

获得的可培养微生物种类和数量与所采用的培养基有密切的联系。本研究仅采用牛肉膏蛋白胨一种培养基分离毛竹根际微生物,虽然初步揭示了毛竹根际特有生境中微生物种群的分布特征,但还存在一定的局限性。采用多种培养基对样品进行分离培养,将有利于了解毛竹根际可培养微生物种群的完整信息。此外,由于自然界中只有 0.1%~1% 的微生物通过常规方法能被培养,仅占自然界中微生物种类的极小部分,应用传统的微生物分离培养方法研究土壤微生物种群构成导致了严重的微生物多样性丢失^[23]。因此非常有必要应用不依赖纯培养的分子生物学的方法来研究毛竹根际未培养或不能培养的微生物,以更全面的获取毛竹林根际微生物多样性信息。

参 考 文 献

- [1] 鲁如坤. 土壤-植物营养学. 第一版. 北京:化学工业出版社, 1998.
- [2] 范君华, 刘明, 黄伟. 南疆温室和菜地土壤微生物学特性比较. 土壤肥料(*Soil and Fertilizers*), 2003, 1:31-33.
- [3] 章家恩, 刘文高, 胡刚. 不同土地利用方式下土壤微生物数量与土壤肥力的关系. 土壤与环境(*Soil and Environmental Sciences*), 2002, 11(2): 140-143.
- [4] Lemanceau P, Corberand T, Gardan L, et al. Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) on the diversity of soilborne populations of *Fluorescent pseudomonads*. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 3: 1004-1012.
- [5] 孙海新, 刘训理. 茶树根际微生物研究. 生态学报(*Acta Ecologica Sinica*), 2004, 24(7): 1353-1357.
- [6] 徐长伦, 杨新平, 王志方, 等. 哈密瓜根系与根际微生态分析研究. 中国微生态学杂志(*Chinese Journal of Microecology*), 1997, 9(1): 45-47.
- [7] 刘训理, 王超, 吴凡, 等. 烟草根际微生物研究. 生态学报(*Acta Ecologica Sinica*), 2006, 26(2): 552-557.
- [8] 徐秋芳, 姜培坤. 毛竹竹根区土壤微生物数量与酶活性研究. 林业科学研究 (*Forest Research*), 2001, 14(6):648-652.
- [9] 刘玉成, 钟章成. 缙云山自然保护区植被概况. 见: 钟章成. 常绿阔叶林生态学研究. 第一版. 重庆:西南师范大学出版, 1988, pp315-326.
- [10] Courchesne F, Gobran GR. Mineralogical variations of bulk and rhizosphere soils from a Norway spruce stand. *Soil Sci Soc Am J*, 1997, 61: 1245-1249.
- [11] 范秀荣, 李广武, 沈萍. 微生物学实验. 第三版. 北京:高等教育出版社, 1999.
- [12] Kim SB, Yoon JH, Kim H, et al. A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomonospora* conducted with 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45(2): 351-356.
- [13] Rainey FA, Ward-Rainey N, Kroppenstedt RM, et al. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46: 28-96.
- [14] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16: 111-120.
- [15] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4: 406-425.
- [16] McCaig AE, Glover LA, Prosser J I. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 1721-1730.
- [17] 陈梦. 对生态系统及生物多样性等理论问题的探讨. 南京林业大学学报(自然科学版)(*Journal of Nanjing Forestry University* (Natural Science Edition)), 2003, 27(5): 30-34.
- [18] Weller DM, Thomashow LS. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. In: O'Gara F, Dowling DN, Boesten B, Molecular ecology of rhizosphere microorganisms. Weinheim, Germany: VCH; 1994.
- [19] 徐秋芳, 姜培坤. 有机肥对毛竹林间及根区土壤生物化学性质的影响. 浙江林学院学报(*Journal of Zhejiang Forestry College*), 2000, 17(4): 64-68.
- [20] 胡正嘉. 根际微生物和植物营养. 见:中国土壤学会. 中国土壤科学的现状与展望. 第一版. 南京:江苏科学技术出版社出版, 1991.
- [21] Kloepper JW, Lifschitz R, Schroth MN. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. In: Insititute for Scientific Information. ISI Atlas of Science. Philadelphia, 1988.
- [22] 赵其国, 龚子同, 徐琪, 等. 中国土壤资源. 南京:南京大学出版社, 1991.
- [23] 王岳坤, 洪葵. 红树林土壤细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2005, 45: 201-204.

Cultivable microbial diversity at the rhizosphere of *Phyllostachys pubescens*

Lubin Li^{1*}, Min Liu^{1,3}, Shuzhen Yang⁴, Liang Liu⁴, Kun Miao¹, Kai Yang^{2*}, Jigang Han³

(¹ Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

(² Beijing Key Laboratory of New Technology in Agricultural Application, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

(³ College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China)

(⁴ Tianmu Mountain National Nature Reserve Management Bureau, Lin'an 311311, China)

Abstract: [Objective] To obtain the information of the cultivable microbial population diversity at the rhizosphere of *Phyllostachys pubescens*. **[Methods]** We isolated strains from Tianmu Mountain and Jinyun Mountain by diluting plate counting method and analyzed the 16S rDNA sequence of the isolates. **[Results]** We obtained 51 and 31 strains with different morphological character of colonies from Tianmu Mountain and Jinyun Mountain separately. The 16S rDNA sequence analysis showed that they had similar microbial population diversity. There were 40% and 58% firmicutes, 36.7% and 10.52% actinobacteria, 10% and 5.26% alphaproteobacteria, 10% and 26.32% gammaproteobacteria at the rhizosphere of *Phyllostachys pubescens* from Tianmu Mountain and Jinyun Mountain separately. The dominant bacteria were the genera *Bacillus* in both two areas. **[Conclusion]** The result showed that the cultivable microbial population diversity was abundant and there were some potential novel strains at the rhizosphere of *Phyllostachys pubescens*. Our research made it is possible to further investigate the function of the rhizosphere microbes and there interaction with the bamboo plant.

Keywords: *Phyllostachys pubescens*; rhizosphere; culturable microbe; population diversity

Supported by the Project of Forest Scientific and Technical Supporting Programs(2006BAD01A1804)

*Corresponding author. Lubin Li, Tel/Fax: +86-10-62889684; E-mail: lilubin@126.com; Kai Yang, Tel/Fax: +86-10-80791569, E-mail: yangkai8978@126.com

Received: 19 November 2007/ Revised: 2 January 2008

答 作 者 问

问: 我想发表一篇关于生物降解的文章, 菌株是自己筛选的, 现在只做了 16S rDNA 的鉴定(自己实验室), 请问必须要到相关部门(如北微所)做生理生化鉴定并具备有效国家证明才能在贵刊发表该菌株的相关文章?

答: 对于您提出的问题, 编辑部分 3 点回答您, 请您作参考。

- (1) 关于菌种鉴定的文章必须两个要点, 要么是新种, 要么是有新的应用价值的已知菌。
- (2) 如果您实验室筛选到了一株菌, 并发表文章, 不必到权威部门再做测试, 只是你们实验室的结果就行, 但是如果是新种必须满足以下两条: 一是作一下 16S rDNA 的鉴定, 二是要在两个国家以上的菌种保藏中心进行保藏。
- (3) 2004 年 11 月, 本刊主编建议: 为了使我国的研究成果得到国际公认, 建议作者将发现新种的研究报告尽快投到国外期刊“IJSEM”, 以取得国际上的认可。待发表后, 再告知本刊, 由《微生物学报》将此消息公布。

问: 如何构建系统发育树?

答: 构建系统树是为了鉴定菌株的分类学地位, 应使用正确的方法重新构树, 制作方法如下:

- (1) 将鉴定菌的 16S rRNA 序列递交 GenBank, 用 Blast 软件搜索相似的 16S rRNA, 然后一起构树。
 - (2) 构建树时采用能反应分支长度的软件(如 NJ 法), 并用 Bootstrap 值分析分支聚类的稳定性。
 - (3) 系统发育分析应该用国际上较为通用的一些建树方法, 如 Neighbour-Joining 等, 这样结果就更为可靠, 更直观。
 - (4) 请严格按照下列具体要求写作[参见: 微生物学报, 2004, 44(2): 143.]
 - ①系统树中: 菌名应列出全称, 且属和种名应斜体; 名称后再加括号, 其内含序列号。
 - ②图注(本刊的图注全部采用英文写作): 应表明“树”上所有的内容, 包括: 括号中的序号、分支点上的数字涵义、0.01代表的意义。
- ③作图要求: 文件格式为*.Tif; 分辨率为 600 线; 字体为“Times New Roman”, 字号为 7 磅。