

西北黄土高原柠条种植区土壤微生物多样性分析

张 薇^{1,2,3} 胡跃高³ 黄国和² 高洪文^{1*}

(¹中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 北京 100094)

(²华北电力大学能源与环境研究中心 北京 102206) (³中国农业大学农学与生物技术学院 北京 100094)

摘 要 柠条锦鸡儿 (*Caragana korshinskii*) 是我国黄土高原区重要的饲用豆科灌木植物。为揭示土壤微生物与柠条种植之间的关系,采用未培养技术提取样品宏基因组 DNA,分别构建柠条根表、根际和自然土 16S rDNA 文库,分析各文库微生物群落的变化。结果显示,随距离柠条根部渐远,微生物数量呈现递减趋势。聚类分析发现,变形杆菌纲是根表土壤区系中的优势微生物种群(70.3%),尤其存在大量 α -*Proteobacteria* 类的能诱使植物形成根瘤的根瘤菌和对植物有促生作用的 γ -*Proteobacteria* 类微生物,而在根际和自然土中,酸杆菌属(*Acidobacteria*)和古菌(*Archaea*)数量较多。柠条根际的多样性指数最高,而根表和自然土微生物类群具有较高的优势度,表现出从根表、根际植物相关微生物到自然土单一简单微生物类群的过渡。说明植物根系和土壤环境与微生物类群具有相互选择性。

关键词: 16S rDNA; 微生物多样性; 柠条

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)05-0751-06

黄土高原是我国一个独特的地貌单元。由于自然条件恶劣和人为活动过度,生态环境不断恶化,已成为我国水土流失最严重的地区。植被恢复与重建是进行水土保持、防止土壤退化及加速生态恢复的有效途径之一^[1]。柠条 (*Caragana korshinskii*) 是该地重要的植被之一,由于基本分布于生态环境比较恶劣地区,经过长期演变,大多数种都形成了明显的旱生结构形态,具有较强的适应性和抗逆性。其根部定殖大量根瘤菌,可以固定游离态氮,因而有利改善土壤氮素营养、促进植被恢复和水土保持。柠条还是优良的饲料树种、绿肥灌木、薪炭和食用植物蛋白资源,具有蜜源、入药、木质纤维等资源价值^[2,3]。因其优良的生态—经济效益,已成为西部地区改善生态环境的重要树种,显示了其特殊的作用^[4]。目前柠条种植的研究主要集中于土壤水分、养分变化的关系,有关土壤微生物的多样性及其与柠条种植之间的关系未见报道。

本研究采用未培养手段对黄土高原柠条种植区土壤微生物群落进行研究,通过比较柠条根表、根际和自然土壤微生物多样性的变化揭示微生物与柠条种植之间的关系。为进一步研究植物与微生物的互作以及合理利用微生物资源、促进当地植被恢复、生态改良提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 样点描述和土样采集

土样采于山西省五寨县(39°00'22.9"N, 111°45'39.7"E)柠条种植林。该地属温带大陆性气候,年降雨量 448mm,平均温度 4.1°C ~ 5.5°C,无霜期 100 ~ 120d;土壤为黄土状淡栗褐土,无农作物种植;植被以柠条人工林为主,面积约 3 万 hm²,林分 30 年以上。所有土样在采前均除去地面植被和枯枝落叶,铲除表面 1 ~ 2cm 表土。五点法收集自然土、根际、根表样品^[5],充分混匀后液氮速冻, -70°C 保存。样点划分标准如下: a. 柠条种植区外围土壤: 离开林区 100 m 外土壤,各取样点间隔 50m; "Z"型随机取样; b. 柠条根际土壤: 取柠条根,抖掉大块土,用无菌镊子小心刮下附在根系上的土壤,即为根际土; c. 柠条根表: 将 b 中得到的根带回,即为根表取样。

1.2 主要试剂和仪器

PCR 反应用的各种试剂、各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、载体 pMD18-T、蛋白酶 K、Tris、EDTA、CTAB、SDS 均购自大连 TaKaRa 公司;引物由上海 Shenergy Biocolor 公司合成;DNA 凝胶纯化试剂盒购自 Omega 公司;其它生化试剂均为国产分析纯;PCR 扩增仪(Biometra, Germany);电泳系统 Power Pac1000

基金项目: 国家 863 计划(2002AA241091)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-10-62894560 E-mail: gaohongwen@263.net

作者简介: 张 薇(1979-),女(蒙),北京人,讲师,主要从事环境污染治理及环境与能源微生物研究。E-mail: zhangw@ncepu.edu.cn

收稿日期: 2007-01-16 接受日期: 2007-02-05 修回日期: 2007-06-22

(Bio-Rad, CA USA)。

1.3 样品总 DNA 提取

土壤微生物总 DNA 提取方法根据文献 [6] 略有改动。将 5g 土样溶于 13.5mL DNA 提取缓冲液中 (100mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L sodium EDTA, 100mmol/L sodium phosphate, 1.5mol/L NaCl, 1% CTAB), 加入 100 μ L 蛋白酶 K (10mg/mL), 37 $^{\circ}$ C 中 200r/min 摇培 30min; 加入 1.5mL 20% SDS, 65 $^{\circ}$ C 水浴 2h, 每隔 15~20min 上下颠倒轻轻混匀; 8000r/min 离心 10min 收集上清; 在剩余土样中再加入 4.5mL 提取缓冲液和 0.5mL 20% SDS, 剧烈振荡 10s, 65 $^{\circ}$ C 温浴 10min, 离心收集上清; 加入等体积氯仿: 异戊醇 (24:1) 混匀后 8000r/min 离心 10min, 收集水相; 用 0.6 倍体积的异丙醇 - 20 $^{\circ}$ C 沉淀 DNA 30min; 8000r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 30min; 去上清, 加 1mL 70% 乙醇, 轻混, 8000r/min 离心 5min; 去上清, 无菌风吹干, 加 50 μ L TE buffer 溶解沉淀。总 DNA 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测、DNA 凝胶纯化试剂盒纯化, 以备 PCR 扩增。

1.4 平板计数和细胞裂解效率

采用传统的形态划分标准, 分别检测各样品中可培养微生物的数量。取 2g 土样溶于 8g 灭菌水, 系列稀释后取 200 μ L 涂布于 PDA、LB 和高氏 1 号培养基, 分别置于 25 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C 和 28 $^{\circ}$ C 中培养 5~7d, 依照文献 [7] 所述计测真菌、细菌、放线菌数量。同样方法, 计算裂解后土样的微生物数量, 计算裂解效率。

1.5 16S rDNA 文库构建

采用扩增细菌 16S rDNA 的保守引物 530F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') 与 1494R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3')^[8], 以土壤宏基因组为模板扩增 16S rDNA 约 0.9kb。PCR 扩增反应条件为: 94 $^{\circ}$ C

5min, 94 $^{\circ}$ C 40s, 55 $^{\circ}$ C 40s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 循环数 35, 72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收纯化后, 连接 pMD18-T 转化 *E. coli* DH5 α , 涂于添加 X-Gal 和 IPTG 的氨苄抗性 LB 平板上。具体操作参考文献 [9]。

挑取克隆子用 M13 引物验证片段大小, 阳性克隆双向测序 (上海英骏生物技术有限公司), DNAMAN 软件合并序列, 所得结果提交 GenBank, BLAST 软件对序列进行同源性比较, MEGA 3.1 软件进行遗传距离分析。

1.6 土壤微生物多样性指数测度

借助群落生态学研究方法, 以 Shannon-Weaver 指数 H' ^[10] 计算群落多样性, 以 Simpson 指数 D' ^[11] 计算群落的优势度, 以 Pielou 指数 J' ^[12] 计算群落均匀度: $H' = -\sum P_i \cdot \ln P_i$, $D = 1 / \sum P_i^2$, $J = H' / \ln S$ 以上式中 P_i 为第 i 种微生物占总个体数的比例, 可用 $P_i = n_i/N$ 求出, n_i 是第 i 个属的菌株数, N 为全部属的菌株数之和, S 为生理群数。试验数据用 SPSS11.0 进行统计分析。

2 结果和分析

2.1 微生物计数和细胞裂解率

平板培养法估测土壤中可培养微生物数量。根表区、根际区、自然土区每 g 样品中微生物总数分别为 7.9×10^7 、 3.5×10^6 和 2.0×10^6 cfu, 同时各样品中均为细菌数量多于放线菌, 放线菌多于真菌 (表 1)。微生物数量随距离柠条根部渐远而逐渐减少, 根表中最多, 根际次之, 自然土中最少。

通过平板法检测 DNA 提取前后可培养微生物菌落数, 估测出土样裂解效率约为 90% (表 2), 保证了基于未培养手段分析微生物群落结构的可靠性。

表 1 各土壤中可培养微生物数量 (cfu/g 干土)

Table 1 Direct plate counts of individual samples of three soils (cfu/g dry wt)

Site	Fungi	Bacteria	Actinomycetes	Total
Rhizoplane	$(5.5 \pm 0.9) \times 10^4$ a	$(6.1 \pm 0.4) \times 10^7$ a	$(1.8 \pm 0.6) \times 10^7$ a	$(7.9 \pm 0.9) \times 10^7$ a
Rhizosphere	$(4.0 \pm 0.9) \times 10^4$ a	$(1.2 \pm 0.3) \times 10^6$ b	$(2.3 \pm 0.3) \times 10^6$ b	$(3.5 \pm 0.1) \times 10^6$ b
Bulk soil	$(6.5 \pm 0.7) \times 10^3$ b	$(7.7 \pm 0.7) \times 10^5$ b	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^6$ c	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^6$ c

Mean count \pm standard deviation (n = 5). Significant difference from the log numbers of preextraction and postextraction count at the 5% level.

表 2 各土样裂解效率比较

Table 2 Comparison of lysis efficiency between the three soils

	Rhizoplane	Rhizosphere	Bulk soil
Preextraction cfu/g (dry wt)	$(7.9 \pm 0.9) \times 10^7$ a	$(3.5 \pm 0.1) \times 10^6$ a	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^6$ a
Postextraction cfu/g (dry wt)	$(3.2 \pm 0.3) \times 10^5$ b	$(3.5 \pm 0.5) \times 10^5$ b	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^5$ b
Lysis efficiency/%	99.6	89.9	90.1

The same as notes in Table 1 above.

2.2 16S rDNA 文库构建和遗传分析

从根表、根际和外围 3 个 16S rDNA 文库中挑取克隆子测序, 所得结果经过比对和整理后提交 GenBank, 登录号为 AY942940 ~ AY943043。参照文献 [13] 将所有克隆划分为 10 大生理类群, 包括 1 个未知种群(表 3) 并构建根表、根际和自然土中微生物聚类分析树状图(图 1、2、3)。结果表明, Proteobacteria 是各类土壤区系中的常见类群, 占微生物总量 38.5% 此外 Acidobacteria 和 Crenarchaeota 类微生物也数量较多, 分别达到 19.2% 和 13.5%。

Proteobacteria 是根表土中一类重要的优势种群, 占总克隆子数 70.3%(图 1, 表 3)。其中 γ 类克隆子共 18 个, 占总 Proteobacteria 类群的 69.2%, 包括

表 3 3 样品中微生物类群遗传分类

Phylogenetic group	No. (%) of organisms identified			
	Rhizoplane	Rhizosphere	Bulk soil	Total
Archaea	3 (5.4)	6 (14.0)	6 (25.0)	15 (13.5)
Crenarchaeota	3 (5.4)	6 (14.0)	6 (25.0)	15 (13.5)
Bacteria	33 (89.2)	31 (72.1)	17 (70.8)	81 (77.8)
Green nonsulfur bacteria	0	1 (2.3)	1 (4.2)	2 (1.9)
Low-G + C Gram positive	1 (2.7)	0	0	1 (1.0)
High-G + C Gram positive	3 (5.4)	3 (4.7)	3 (12.5)	9 (6.7)
Cytophaga-Flexibacter-Bacteroids	3 (5.4)	1 (2.3)	0	4 (2.9)
Planctomyces	1 (2.7)	3 (4.7)	1 (4.2)	5 (3.8)
Verrucomicrobium	1 (2.7)	3 (4.7)	1 (4.2)	5 (3.8)
Proteobacteria	26 (70.3)	24 (20.9)	15 (20.8)	65 (38.5)
α	6 (16.2)	4 (9.3)	2 (8.3)	12 (11.5)
β	3 (5.4)	0	0	3 (1.9)
γ	18 (48.6)	4 (9.3)	3 (12.5)	25 (24.0)
δ	0	1 (2.3)	0	1 (1.0)
Acidobacteria	0	14 (32.6)	6 (25.0)	20 (19.2)
Unclassified	3 (5.4)	6 (14.0)	1 (4.2)	10 (8.6)
Total clones sequenced	37	43	24	104 (100)

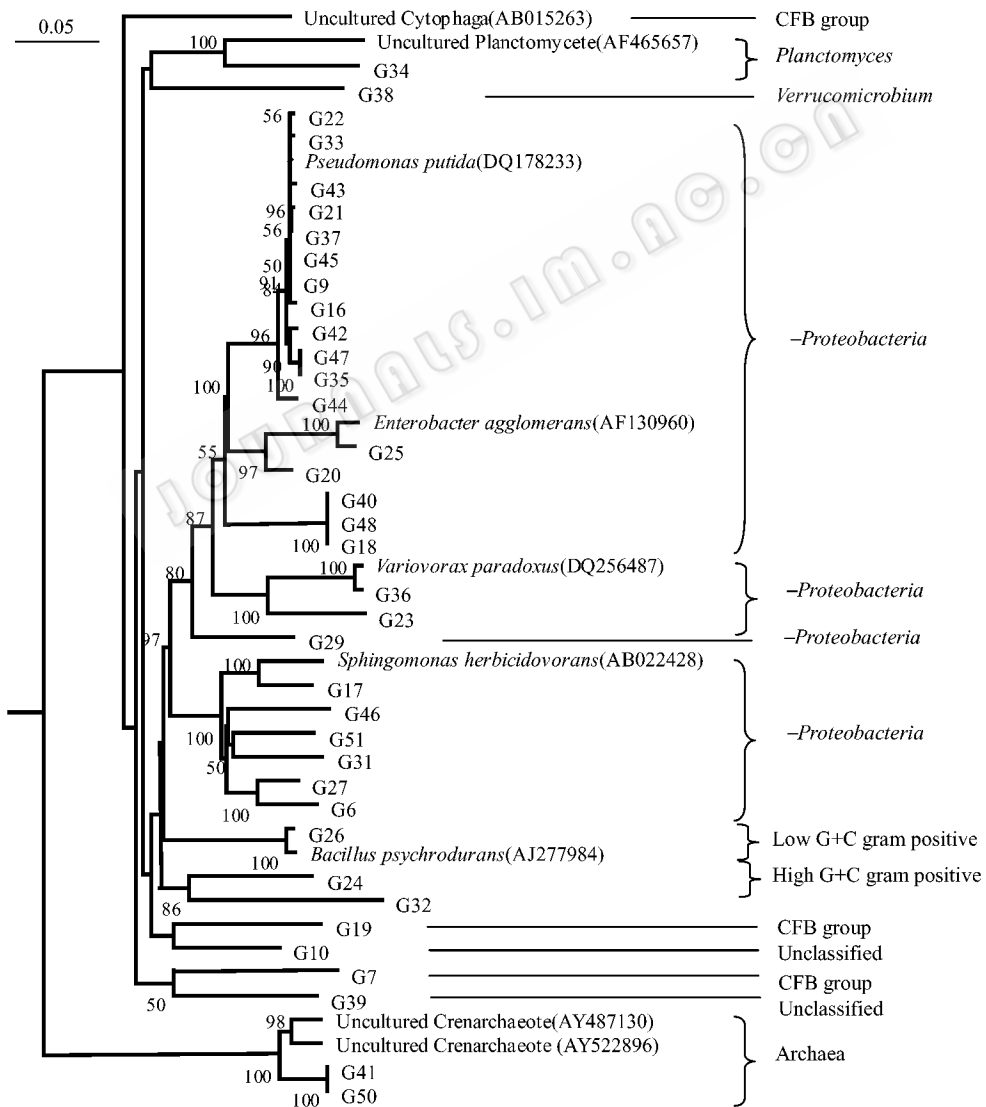


图 1 根表土壤微生物遗传关系聚类分析树状图

Fig. 1 Phylogenetic tree showing the relationship of 16S rDNA gene sequences amplified from rhizoplane of *C. korshinskii* to those of representatives of bacteria, whose sequence accession numbers are shown in parenthesis. The scale bar represents 0.05 substitutions per base position.

Each bootstrap value is expressed as a percentage of 1000 replications.

促进植株健康生长的 *Enterobacter* 和 *Pseudomonas* 属等植物有益促生菌,如 *Pseudomonas* 属微生物,占到克隆子总数 30%; Proteobacteria 中 α 类占总数的 23.1% 和总克隆子数的 16.2%, 其中包含促进植株形成根瘤的 *Rhizobium* sp. 和 *Sinorhizobium* sp. 等属。

从图 2 可以看出 根际土壤中微生物种类丰富, 类群较多。 *Acidobacteria* 为主要类群(32.6%)。在 Proteobacteria 中, 具有一定数量的 α 类和 γ 类细菌(9.3%)。此外还有少量 *Planctomyces*、

此外还发现 5.4% 的古菌类微生物。有趣的是, 此文库中有少量低 GC 含量的革兰氏阳性菌和 β -*Proteobacteria*, 没有 *Acidobacteria* 和 Green nonsulfur bacteria 类微生物, 这与根际区和自然土文库中情况正好相反。

Verrucomicrobium、高(G + C)革兰氏阳性菌和 Archaea, 可见根际环境具有较高的微生物多样性。自然土中微生物类群较少(图 3), Archaea(25.0%)、*Acidobacteria*(25.0%)类微生物具有很高的优势度。

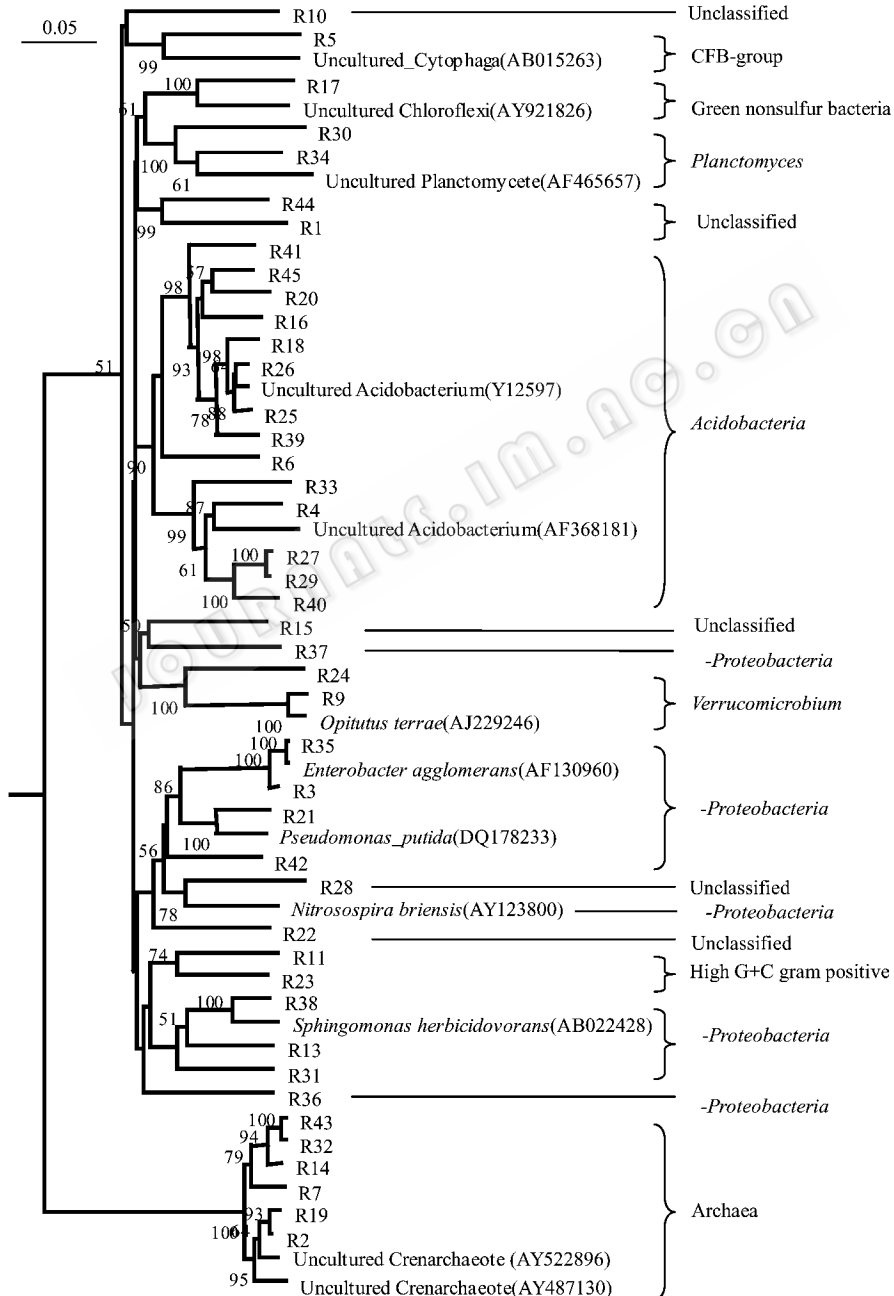


图 2 根际土壤微生物遗传关系聚类分析树状图

Fig.2 Phylogenetic tree showing the relationship of 16S rDNA gene sequences amplified from rhizosphere of *C. korshinskii* to those of representatives of bacteria. The same as that in Fig. 1.

高 GC 含量的革兰氏阳性菌也有一定数量。

2.3 微生物物种多样性分析

对柠条种植区土壤微生物生理群的多样性变化分析结果表明,根际区土壤中微生物种类最多,其多样性指数明显高于自然土,均匀度最高而优势度最小,根表和自然土微生物类群优势度都较高(表4),说明微生物群落的变化与环境条件密切相关。

表4 各土壤微生物多样性指数比较

Table 4 Changes in microbe physiological group diversity indices and community richness

sites	N	S	H'	J	D
Rhizoplane	37	10	2.0313	0.7318	0.8631
Rhizosphere	43	12	2.1670	0.9245	0.7484
Bulk soil	24	9	1.6851	0.8721	0.8506

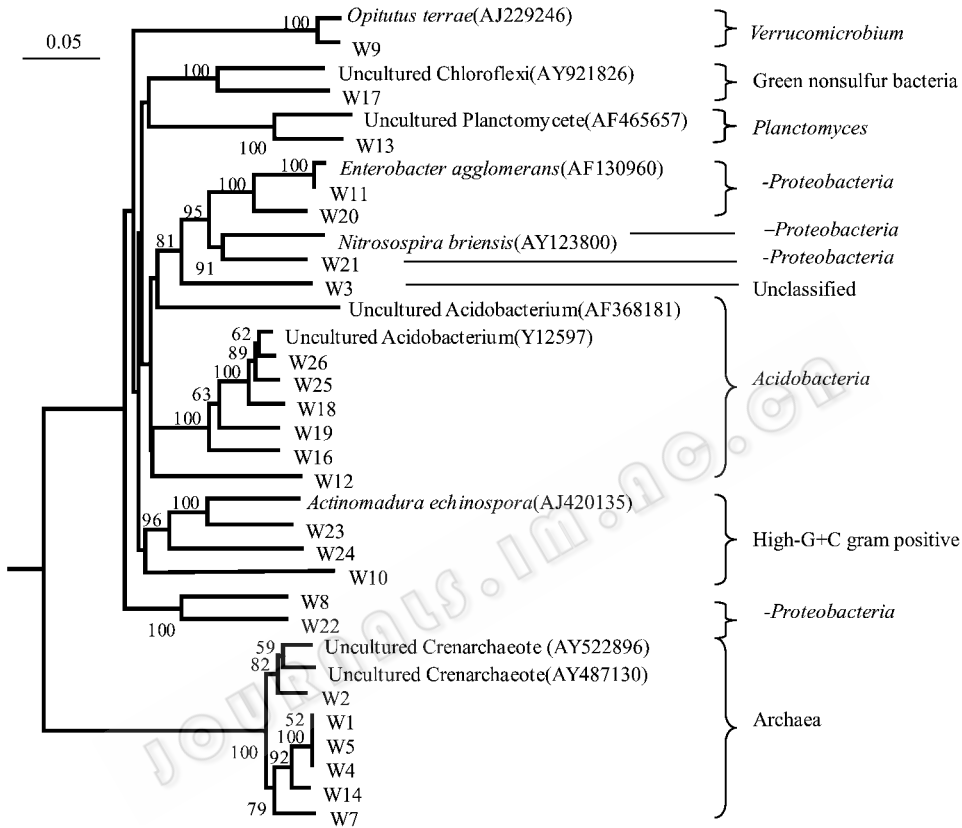


图3 自然土壤微生物遗传关系聚类分析树状图

Fig.3 Phylogenetic tree showing the relationship of 16S rDNA gene sequences amplified from bulk soil of *C. korshinskii* to those of representatives of bacteria. The same as that in Fig.1.

3 讨论

在微生物类群上,按距离柠条植株由近至远的顺序 α -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria 和低(G+C)革兰氏阳性菌的数量逐渐减少,而高(G+C)革兰氏阳性菌和 Archaea 逐渐增多。根表、根际、自然土3个区系中的优势种群各不相同,分别为 Proteobacteria、Acidobacteria 和 Archaea。在根表发现大量的固氮菌,如 *Rhizobium* 属和 *Sinorhizobium* 属,柠条是否具有特殊的根瘤菌类群还有待进一步研究。此外, γ -Proteobacteria 亚纲的 *Pseudomonas* 和 *Enterobacter* 属中有人们熟知的多种植物有益促生菌(PGPR)和内生菌^[14],对植物生长有良好促进作用,也主要分布在根表。许多研究表明,这类微生物产生的次生代谢

物或植物激素,可以有效防治病虫害,促进植物正常生长^[15]。值得注意的是,在根际和自然土中发现有较多的 *Acidobacteria* 分布。目前对该类微生物研究较少,发现其主要分布在洞穴、海底沉积物、活性淤泥等场所^[15]。这类不可培养的微生物自然界中还存在很多,其特定的生态功能有待于进一步研究。

多样性指数是反映群落结构特征的重要指标^[16]。对柠条种植区土壤微生物生理群的多样性变化分析结果表明,多样性指数和均匀度均为根际最高。说明经过多年生长,柠条根际土壤中形成了丰富的微生物类群,各类群在柠条根际区土壤中形成了稳定的生态分布,结构复杂,功能稳定,均匀度和多样性指数最高,群落优势度不明显;相比较而言,外围土壤中的微生物多样性指数最低,这与黄土

高原的特殊地貌直接相关,根表的微生物优势度最高,这主要由于植物根系发达,植物相关微生物数量显著增加。本研究采用克隆文库随机测序的方法研究微生物多样性,可以直接获得微生物的分类地位,但由于测序数量和费用的限制不能完全反映微生物种群和多样性的变化,还需要与 DGGE、RFLP 等分子手段相结合。

参 考 文 献

- [1] 苏永中,赵哈林. 科尔沁沙地不同土地利用和管理方式对土壤质量性状的影响. 应用生态学报, 2003, 14: 1681 - 1686.
- [2] 牛西午. 柠条研究. 北京: 科学出版社, 2003.
- [3] 郑敏燕,魏永生. 藏锦鸡儿原药材中总黄酮含量的初步测定. 青海大学学报(自然科学版), 2001, 19: 10 - 11.
- [4] 张继敏,梁桂英,徐朗然. 陕北柠条的种群分类及其与水土保持和固沙的关系. 陕西林业科技, 1996, 3: 18 - 22.
- [5] Marilley L, Vogt G, Blanc M, et al. Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR restriction analysis of 16S rDNA. *Plant and Soil*, 1998, 198: 219 - 224.
- [6] Lee SY, Bollinger J, Bezdicsek D, et al. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. *App. Environ Microbiol*, 1996, 62: 3787 - 3793.
- [7] Smit E, Leeflang P, Gommans S, et al. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 2284 - 2291.
- [8] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. New York: Wiley, 1991. 115 - 175.
- [9] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [10] Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecology*, 2003, 43: 1 - 11.
- [11] Magurran AE. *Ecological Diversity and Its Measurement*. New Jersey: Princeton University Press, 1988: 86 - 97.
- [12] 马克平,刘玉明. 生物多样性的测度方法 I. α 多样性的测度方法(下). 生物多样性, 1994, 4(4): 231 - 239.
- [13] Olsen GJ, Woese CR, Overbeek R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J Bacteriol*, 1994, 176: 1 - 6.
- [14] 胡江春,薛德林,马成新,等. 植物根际促生菌(PGPR)的研究与应用前景. 应用生态学报, 2004, 15(10): 1963 - 1966.
- [15] Schabereiter-Gurtner C, Saiz-Jimenez C, Piñar G, et al. Altamira Cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 211: 7 - 11.
- [16] Urakawa H, Kita-Tsukamoto K, Ohwada K. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology*, 1999, 145: 3305 - 3315.

Soil microbial diversity of artificial peashrub plantation on North Loess Plateau of China

ZHANG Wei^{1,2,3}, HU Yue-gao³, HUANG Guo-he², GAO Hong-wen^{1*}

(¹ Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

(² Energy and Environmental Research Center, North China Electric Power University, Beijing 102206, China)

(³ College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Peashrub (*Caragana korshinskii* Kom) is a kind of excellent shrub used for dune-fixation in Loess Plateau of China. In order to explore relationship between peashrub and soil microorganisms, microbial communities diversity associated with rhizoplane, rhizosphere and bulk soil of peashrub in Loess Plateau of China were characterized based on a culture-independent approach. Three 16S rDNA gene libraries were constructed, respectively, and each different profile was used to define an operational taxonomic unit (OTU). The numbers of microorganisms decreased as root proximity decreased and a few OTUs became dominant. Phylogenetic analyses indicated that Proteobacteria was the predominant group in rhizoplane, which included many α -Proteobacteria, partially consisted of rhizobia and γ -Proteobacteria beneficial to plant growth. In bulk soil, the most frequent OTUs were closely related to Archaea, while Acidobacteria was the dominant group in rhizosphere of peashrub. The diversity index (H') was higher in rhizosphere than in rhizoplane and bulk soil, whereas microbial populations in rhizoplane and bulk soil had the greater dominance indices (D). It was shown that there was a significant change in microbial species composition along the root gradient, shifting from complex plant-associated bacterial community in the root habitats to a simple bacterial community in the bulk soil. These results showed that plant roots and soil conditions created a selective environment for microbial populations.

Keywords: 16S rDNA; microbial diversity; *Caragana korshinskii*

Foundation item: National Programs for High Technology Research and Development of China (2002AA241091)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-62894560; E-mail: gaohongwen@263.net

Received: 16 January 2007/Accepted: 5 February 2007/Revised: 22 June 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>