

## 应用 16S rRNA 基因文库技术分析土壤细菌群落的多样性

刘玮琦, 茆振川, 杨宇红, 谢丙炎\*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘要:**【目的】土壤微生物在菜田生态系统中具有重要的生态功能, 通过 16S rRNA 基因克隆文库技术分析典型菜田土壤细菌群落结构的组成情况, 为揭示典型的菜田土壤微生物的多样性以及土地利用变化与生态环境效应之间的关系奠定基础。【方法】采用未培养技术直接从北京和山东两地典型菜田土壤样品中提取微生物总的 DNA, 分别构建基于通用引物 PCR 扩增的土壤细菌 16S rRNA 基因克隆文库, 通过 *Hinf*I 和 *Hae*III 限制性内切酶对两地土壤细菌 16S rRNA 基因文库中的克隆进行 ARDRA(Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)分析, 将所有阳性克隆分为若干个可操作分类单元 (OTU)。【目的】通过构建两地细菌克隆文库的系统发育树, 并分析主要种群的组成表明: 北京和山东菜田土壤细菌克隆文库的优势种群均为  $\gamma$ 、 $\beta$ 、 $\alpha$  变形细菌亚群。两地的细菌种类组成分别包括 124 个 OTUs 和 92 个 OTUs。【结论】北京地区和山东地区典型蔬菜地土壤细菌种群中优势种群均为变形细菌, 但是土壤细菌多样性降低, 这可能与典型菜田的多年连作, 种植蔬菜种类单一直接相关。同时, 也可能是造成菜田土壤病害普遍发生, 土壤退化的一个重要原因。

**关键词:** 土壤细菌群落; 16S rRNA 基因; ARDRA; 系统发育分析

**中图分类号:** Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 10-1344-07

土壤微生物群落结构是土壤生态功能的基础, 它与土壤的化学性质、团聚体的形成以及土壤污染物的降解等密切相关, 在一定程度上土壤微生物群落调节着土壤乃至整个生态系统的功能。土壤中存在大量的微生物, 其中以细菌的种类和数量最多<sup>[1]</sup>, 细菌在土壤营养元素循环、有机物质的形成和分解、肥力的保持和提高、生态环境的改善、植物的生长发育和作物病虫害防治等方面均起着极其重要的作用<sup>[2]</sup>。但是大量微生物的不可培养性是传统微生物生态学在揭示自然界微生物群落结构、生态功能及其相互关系研究中的最大障碍。然而, 随着分子生物学的理论与技术在微生物生态学中的不断渗透, 土壤微生物多样性的研究有了新的突破, 其结果更趋于真实, 大量未被认知的微生物新物种及其新功能得到鉴定和应

用。随后 16S rRNA 序列分析作为微生物分类系统的主要依据也得到了广泛认同, 随着微生物核糖体数据库的日益完善, 该技术成为细菌分类和鉴定的一个有力工具。近年来, 16S rRNA 基因序列分析、核酸指纹图谱分析以及 16S rRNA 基因克隆文库的建立等分子技术也为微生物多样性结构和功能基因组的研究, 提供了崭新的思路。

近年来, 在高投入、高产出的农业体系中, 大量农药化肥的使用, 过于倚重于人为的投入, 土壤自身微生物的重要性往往被忽视, 随之而来的是蔬菜病虫害的严重发生。在发展可持续农业的过程中, 人们逐渐认识到正像地上宏观生态系统一样, 维护土壤生态系统的正常功能和稳定性, 是实现可持续发展思想的前提。此外, 由于多年来土地利用类型和结构的不断

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划课题(2006BAD07B03, 2006BAD08A08, 2006BAD17B08); 农业公益性行业科研专项经费项目(NYHYZX07-050)

\*通讯作者。Tel/Fax: +86-10-68919545; E-mail: xiebingyan2003@yahoo.com.cn

作者简介: 刘玮琦(1981-), 女, 内蒙古赤峰市, 硕士研究生, 主要研究方向为土壤微生物分子生态。E-mail: liuweiqi10124@126.com

收稿日期: 2008-03-04; 修回日期: 2008-07-31

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

变化,尤其是粮食生产面积的减少和菜地面积的增加,必然带来土壤生物学性质的变化,尤其是最为敏感的土壤微生物群落结构将发生相应的变化,这将影响到土壤生态系统的功能发挥和结构的稳定。但目前有关这方面的研究鲜有人涉及,尤其是长期以来缺乏对高强度土地利用条件下的土壤微生物多样性的认识。

因此,为探明高强度土地利用条件下的菜田土壤细菌的多样性和群落结构组成情况,从北京和山东省寿光两地的典型菜田采集土壤样品,采用直接提取的方法提取土壤微生物总 DNA,通过构建 16SrRNA 基因克隆文库,分析了北京和山东寿光地区典型的蔬菜田土壤细菌群落结构的组成情况,以期为全面而深入地理解高强度土地利用条件下菜田土壤中微生物的多样性以及揭示土地利用变化与生态环境效应之间的关系奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 土壤样品:**北京菜田土样于 2007 年 3 月采集自海淀区中国农业科学院蔬菜花卉研究所试验农场菜地。种植蔬菜年限 50 年以上。采样地选择 10 个种植黄瓜的地块(前茬作物为黄瓜)。土壤样品采用五点采样法,用土壤采样器采集菜地中 5 个点的土壤样品,采集深度为 0~15cm,混合后用密封袋带回,土样通过 10 目(2 mm)筛网,存放于-20℃冰箱中。土壤 pH 值 7.47,有机质含量为 4.06 g/kg 干土,全 N 含量为 0.213 g/kg 干土,土壤含水量为 25.63%。

山东菜田土样于 2006 年 11 月采集自寿光蔬菜基地。种植蔬菜年限 30 年以上。采样选择 10 个种植丝瓜的地块(前茬作物为丝瓜),采集方法同上。土壤 pH 值 6.44,有机质含量为 1.76 g/kg 干土,全 N 含量为 0.128 g/kg 干土,土壤含水量为 28.71%。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**PCR 试剂、pGEM-T、限制性核酸内切酶、DNA 纯化试剂盒分别购自 Promage、大连宝生和上海申能公司。PCR 仪型号 PTC-200、离心机型号为 3K15 和紫外分光光度计等仪器。

### 1.2 土壤微生物 DNA 的提取及纯化

采用直接法提取土壤微生物的 DNA,首先将土壤进行预处理<sup>[3]</sup>。将预处理的土样中加入液氮冻融处理 3 次,然后应用土壤微生物总 DNA 提取用蛋白酶 K/SDS 法提取<sup>[4]</sup>,然后采用上海博采公司 DNA 纯化试剂盒对粗提 DNA 进行纯化。

### 1.3 PCR 扩增细菌 16S rRNA 的反应条件

PCR 扩增所用引物:27f:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',1492r:5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 扩增所用反应体系:10×Buffer5 μL, Mg<sup>2+</sup>(25 mmol/L)4 μL, dNTP(5 mmol/L)2 μL,上下游引物(10 pmol/L)各 3 μL,模板(土壤 DNA)10 ng, Taq DNA 聚合酶(5U)1 μL,用无菌 ddH<sub>2</sub>O 补足 50 μL 体系。采用降落 PCR 的方法:94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 65℃ 降到 55℃,每一个循环降低 1℃,72℃ 1.5 min, 20 个循环,94℃ 1 min; 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 10 个循环,72℃ 10 min。

### 1.4 土壤细菌 16SrRNA 基因克隆文库的构建及阳性克隆的筛选

PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,大小约 1500 bp 的 DNA 条带纯化后,连接至 pGEM-T (Promega, USA)上,转化进入 TOP10 大肠杆菌感受态细胞,在有含有 IPTG 和 X-Gal 氨苄青霉素的平板上 37℃过夜培养。利用 T7 和 SP6 进行菌落 PCR 和质粒酶切两种方法进行阳性克隆的筛选,并建立基因克隆文库。T7:5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', SP6:5'-ACGATTTAGGTGACACTATAG-3'。

### 1.5 克隆文库 ARDRA 分型与测序

将鉴定为阳性的 PCR 产物进行扩增性 rDNA 限制性酶切片段分析:ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis),分别用 *Hinf* I, *Hae* III 两种限制性内切酶消化(37℃)。1.2%琼脂糖凝胶成像鉴别各个阳性克隆的酶切图谱类型,最后综合各个阳性克隆双酶切图谱类型,将所有的阳性克隆分成若干个操作分类单元(OTU),统计操作分类单元的种类和各操作分类单元所含阳性克隆的数量<sup>[5]</sup>,将每一个 OTU 类型送 1~3 个进行测序分析(北京诺赛基因公司)。

### 1.6 系统发育树的构建

将测序得到的序列在 NCBI 中利用“BLAST 2 Sequence”工具做最初的排序<sup>[6]</sup>,序列相似性≥97%的认为是一个同样的类型并且用一个单独的序列来代表<sup>[7]</sup>,利用 CHECK-CHIMERA 软件分析检查去除嵌合及怪异序列<sup>[8]</sup>。稀缺性曲线通过网络程序来绘制<sup>[9]</sup>(<http://www.uga.edu/~strata/software/Software.html>)。每一个序列类型在 GenBank 数据库上进行 Blast 和 RDPII 数据库中进行比对,挑选与序列最相似的亲缘关系。选取的序列利用 CLUSTAL-X 1.83 进行自动排序<sup>[10]</sup>。利用 MEGA 3.1 中 Kimura 2 参数矩阵的邻接法构建系统发育树<sup>[11]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 直接提取土壤微生物的 DNA

直接提取土壤微生物 DNA 的方法中采用预处理和未采用预处理的提取方法有明显的区别: 未采用预处理的提取方法得到的 DNA 样品的电泳条带有很明显的弥散现象, 而预处理方法得到的 DNA 样品的条带很整齐。原因是对于土样进行预处理可以很好地去除这些杂质, 减少胞外游离 DNA 污染, 减少可溶性的无机物, 有机物的污染, 特别是减少腐植酸类物质的污染。而预处理的缓冲液中含有 PVPP (聚乙烯吡咯烷酮) 它可以有效去除部分腐植酸类物质。而且 EDTA 可以络合金属离子, 有效抑制核酸酶的活性, 防止在下一步的 DNA 提取过程中造成 DNA 的降解。因此采用预处理的方法较比不用此方法得到的 DNA 粗提液纯净的多, 经纯化以后能够达到很好的效果, 可获得高质量的土壤微生物的总的 DNA。

### 2.2 PCR 扩增细菌的 16S rRNA

利用细菌通用引物进行土壤细菌 16S rRNA 扩增, 结果得到 1500 bp 大小的条带。

### 2.3 北京和山东寿光地区土壤细菌 16S rRNA 基因克隆文库的建立

本研究土壤细菌克隆文库的构建均通过提取 10 份 DNA 样品, 分别进行 PCR 反应, 每次 PCR 反应

设置 3 次重复, 将 3 次重复的 PCR 产物混合后利用 PCR 产物回收试剂盒回收。然后将 10 份 DNA 样品的 PCR 产物充分混合后分别连接在 PGEM-T 载体上用于构建细菌 16S rRNA 基因克隆文库。利用这种方法可以大大增加土壤细菌 16S rRNA 基因克隆文库构建的代表性, 进一步减少 PCR 过程中的可能存在的误差。

北京地区土壤细菌 16S rRNA 基因克隆文库的建立: 用引物 T7 和 SP6 进行阳性克隆菌落 PCR 反应检测和质粒 EcoR1 酶酶切方法对克隆文库进行检测。随机挑选 523 个的克隆, 鉴定得到共有 481 个插入目的片段的克隆。通过 ARDRA 分析, 利用 *Hinf* I 和 *Hae* III 两种限制性内切酶进行酶切图谱分析, 共得到 124 种不同的可操作分类单元, 即 124 个 OTU 类型。其中有 45 个 OTU 类型代表单克隆, 其他的 79 个 OTU 类型代表两个或者多个克隆, 最多的 RFLP 类型包括 26 个克隆。随后进行稀缺性曲线分析表明: 这些克隆代表了文库中大多数细菌的多样性 (图 1)。文库的 coverageC<sup>[12]</sup> 达到 90.6%, coverageC 理论上表示 16S rDNA 克隆文库中所包含的微生物的种类 (OTU) 占样品中全部微生物的种类的比例, 它的计算公式如下: (a)  $C=1-n1/N$ , N 代表 16S rDNA 克隆文库的库容, n1 则代表在 16S rDNA 克隆文库仅出现过一次的 OTU 数量。很显然 CoverageC 如果很高或者达

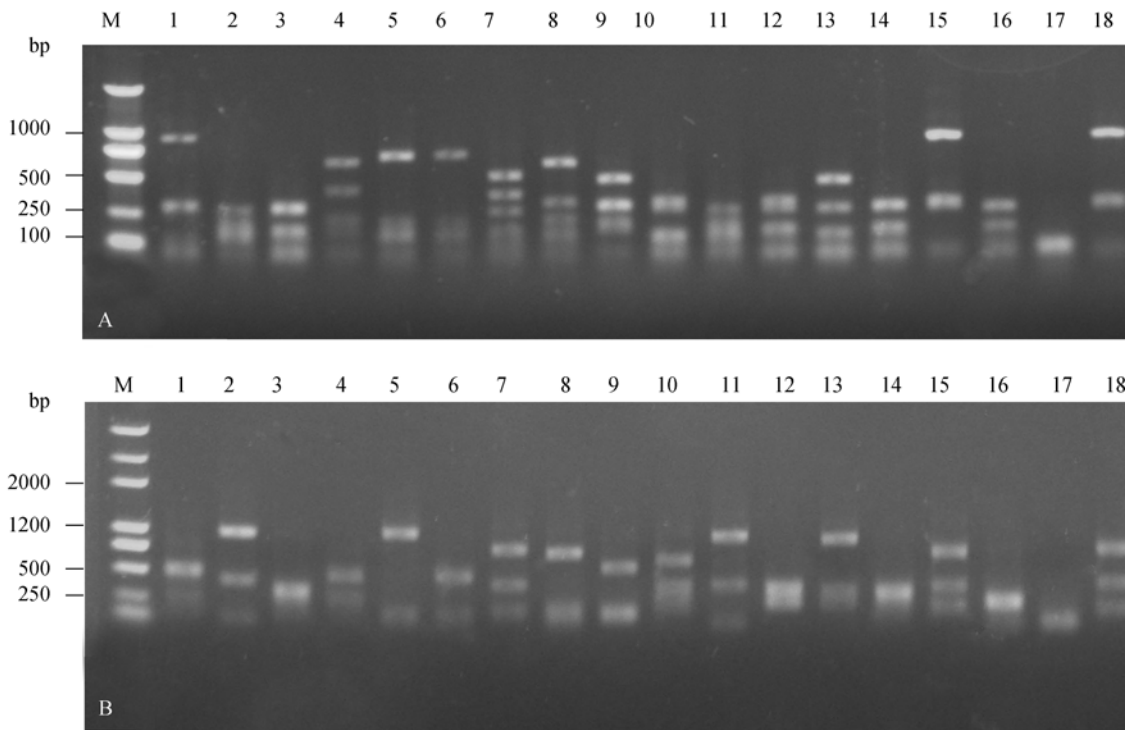


图 1 *Hinf* I (A)和 *Hae* III (B)酶切图谱

到 100%也可以说明库容已经足够。这些克隆的 RFLP 类型选取 1-3 个克隆进行测序分析,在 GenBank 上进行序列比对表明所有的序列都属于细菌种类,与登录的细菌 16S rRNA 序列的相似性在 88%~99.7%之间。

山东寿光地区土壤细菌 16S rRNA 基因克隆文库的建立:随机挑选 486 个克隆,通过鉴定共有 445 个插入目的片断。通过 ARDRA 分析,共得到 92 种不同的可操作分类单元,即 92 个 OTU 类型。其中有 38 个 OTU 类型代表单克隆,其他的 54 个 OTU 类型代表两个或者多个克隆,最多的 OTU 类型包括 18 个克隆。随后进行稀缺性曲线分析表明:这些克隆代表了文库中大多数细菌的多样性(图 2)。文库的 coverageC 得到 91.4%。

另外所获克隆中部分克隆尚难确定其分类地位,可能是代表新属和种的序列,这些序列已向 GenBank/EMBL/DBJ 提交并得到序列号,北京细菌 16S rRNA 基因克隆文库: EU043224-EU043227、EU051335-EU051349 和 EU365180-EU365231 共 71 条序列。山东细菌 16S rRNA 基因克隆文库: EU365175-EU365179。

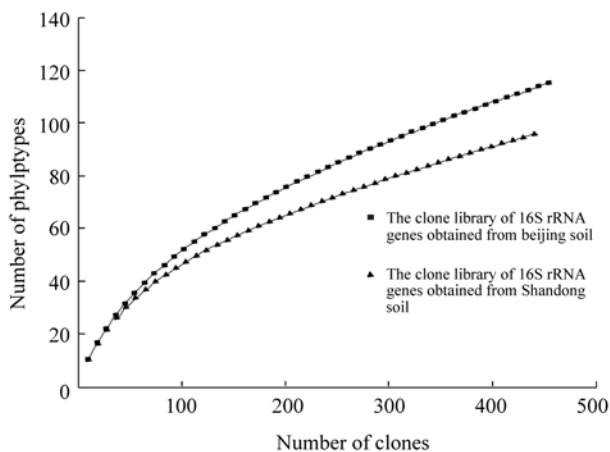


图 2 土壤细菌 16S rRNA 基因克隆文库的稀缺性曲线

Fig. 2 Rarefaction curves generated for 16S rRNA genes in the clone library from samples collected in the mangrove soil. Clones were grouped into phylotypes based on sequence similarity of  $\geq 97\%$ .

#### 2.4 土壤细菌 16S rDNA 基因克隆文库系统发育分析

将北京细菌克隆文库中随机挑选的 200 个克隆的 16S rRNA 序列,去掉测序小于 500 bp 的序列与 GenBank 数据库中的相关已知序列进行比对分析,由 Blastn 去掉同源性比对相同的结果,再用 CLUSTAL-X 完成序列的多重排定剔除不能参与建树的序列,最后选用剩下的 148 条序列。这些序列全部属于细菌种类。

把序列相似性大于 99.5%的归结为同一个细菌的序列,发现 148 个序列可以代表 130 个不同类型的细菌,其中 52%的克隆序列与已报道的未培养或未鉴定菌株的 16SrDNA 序列同源性达到 97%以上,40%的克隆与已鉴定的细菌同源性达到 98%以上,10%的克隆不能和任何报道的细菌 16S rRNA 序列相似大于 85%。

通过构建北京地区细菌 16S rRNA 基因克隆的系统发育树(图 3-A),得到克隆文库中共有 259 个克隆(OTUs)属于变形细菌门(Proteobacteria),所占克隆文库的比例为 53.02%。并且这一类群众几乎所有序列与公共数据库中的序列相似性均能够达到 90-99%,其中大部分相似性达到 97%以上。其中  $\gamma$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria,  $\alpha$ -Proteobacteria 所占比例分别为: 22.42%, 16.7%, 13.9%。另外仅发现克隆 BJ-156 (EU365180)属于  $\delta$ -Proteobacteria,克隆文库中仅有这一个克隆属于这一种类, BJ-156 与克隆 *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 (BX842648)的相似性仅达到 93%。除变形细菌门(Proteobacteria)序列以外还得到包括拟杆菌门(Bacteroidetes)所占比例: 17.6%,放线菌门(Actinobacteria): 6.7%,酸杆菌门(Acidobacteria): 6.7%,芽单胞菌门(Gemmatimonadetes): 2.4%,壁厚菌门(Firmicutes): 2.4%,绿弯菌门(Chloroflexi): 1.0%,浮霉菌门(Planctomycetes): 0.7%等共 10 个种类。

同时构建山东寿光地区细菌 16S rRNA 基因克隆的系统发育树(图 3-B),得到变形细菌门(Proteobacteria)所占比例为 62.7%。其中  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria, 所占比例分别为: 43.4%, 14.1%, 5.2%,拟杆菌门(Bacteroidetes): 12.5%,酸杆菌门(Acidobacteria): 3.7%,壁厚菌门(Firmicutes): 3.8%,浮霉菌门(Planctomycetes): 2.0%。

### 3 讨论

本研究采用 ARDRA 技术分析了北京和山东寿光地区典型蔬菜地土壤细菌的多样性。ARDRA 技术可在 16S rRNA 序列上区分细菌种(species)的差异。每一个特有的 ARDRA 类型代表了一个可操作分类单元 OTU (operational taxonomic unit),用这种方法显示的 OTUs 多样性可以用于估计样品中存在的最低限度的细菌种的数目。这一技术的优点在于可以快速而且准确的对克隆文库微生物种类进行分型,将

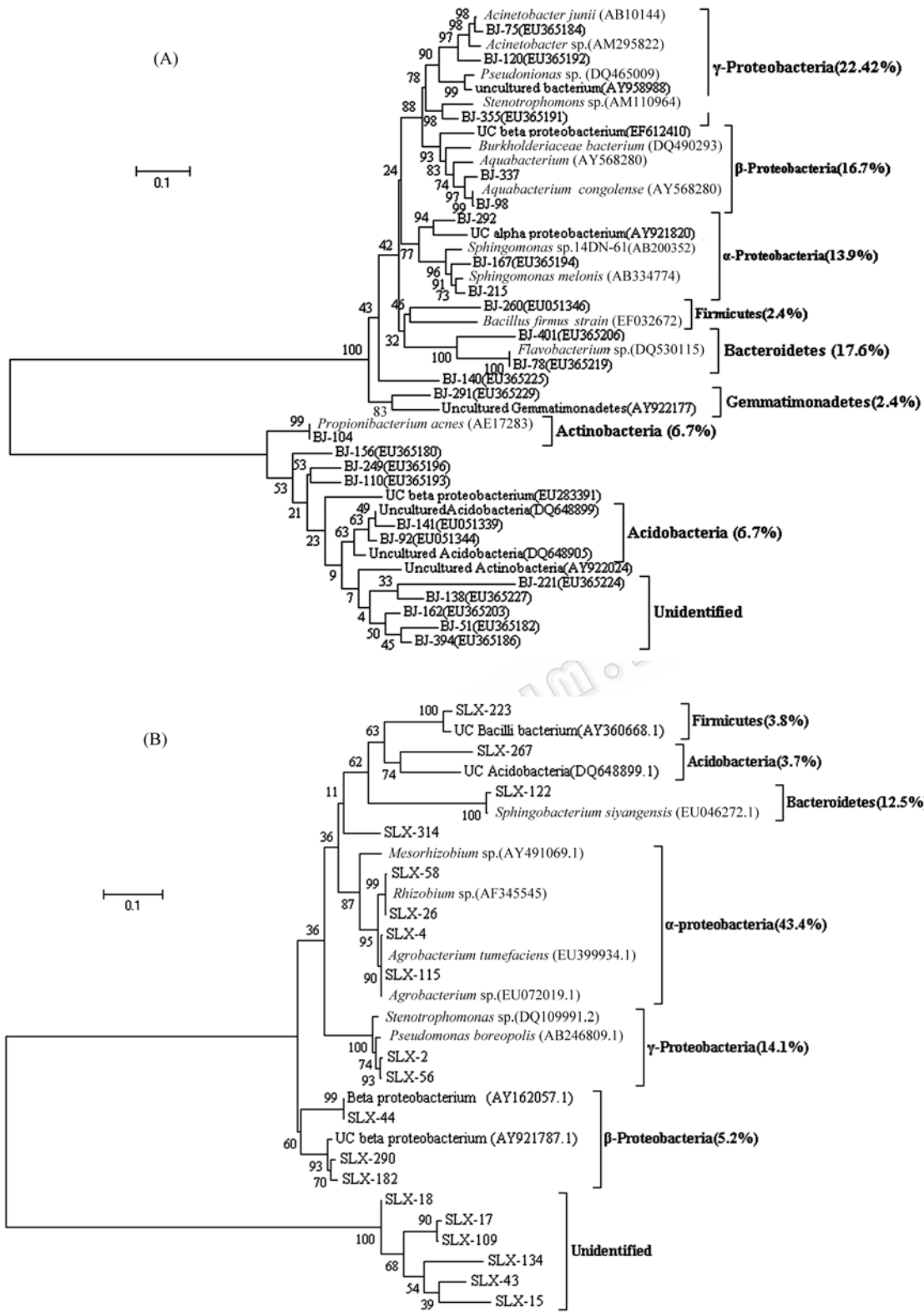


图 3 16S rRNA 基因克隆文库构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequences of the clones obtained from Beijing vegetable soil(A) and from Shandong vegetable soil(B). The tree was constructed via the neighbor-joining method. Bootstrap values above 1000 are shown as percentage. Bar indicates 5% nucleotide changes per 16S rRNA position. "UC" represents uncultured bacterium.

相同酶切图谱的克隆划分为一种类型，这样避免了选择克隆测序的盲目性，同时减少测序数量和经费的使

用。通过酶切图谱分析表明高强度利用条件下菜田土壤细菌的多样性是非常高的，两克隆文库稀缺性曲线

的建立和 coverageC 的计算同样证明北京和山东寿光地区典型蔬菜地土壤细菌 16S rRNA 克隆文库能够比较完整地反映土壤微生物的群落的组成。分析结果表明两地土壤细菌的种类的丰富程度有一定的区别,两地可操作分类单元的数量分别为 124 个 OTUs 和 92 个 OTUs。

同时,分析结果表明北京地区和山东寿光地区典型蔬菜地土壤细菌 16S rRNA 基因克隆文库中细菌的优势种群均主要包括 $\gamma$ 、 $\beta$ 、 $\alpha$ 变形细菌亚群,拟杆菌群,酸杆菌群等。这和近几年来其他研究人员利用 16S rRNA 基因克隆文库的方法对土壤样品进行分析所获得的结果基本一致。Handelsman 等<sup>[13]</sup>人利用 16S rRNA 基因序列的方法来研究农田土壤样品细菌的生态学分类结果得到土壤样品细菌包括七个主要种类 Proteobacteria (48.6%), Acidobacteria (15.3%)等。Borneman 等<sup>[14]</sup>对 Wisconsin 州三叶草牧场土壤中的微生物进行 16S rRNA 克隆及序列测定,结果表明 124 个克隆中,具有代表性的三个分类种群是变形细菌(16.1%),噬纤维菌-屈挠杆菌-拟杆菌群(21.8%)和低 G+C 含量的革兰氏阳性细菌(21.8%)。

通过对北京和山东地区典型菜田土壤细菌克隆文库研究发现,两地典型菜田土壤细菌群落中均包含一种优势类群即变形细菌,所占比例分别为 53.02% 和 62.7%,与其他环境样品相比细菌多样性较低,且这种现象在山东菜田土壤中表现的更加明显。例如 Handelsman 等<sup>[13]</sup>和 Borneman 等<sup>[14]</sup>研究的土壤变形细菌分别为 48.6% 和 16.1%,而其他种类的细菌所占比例较大,且多样性较高。本研究中两地典型菜田土壤出现这种现象的原因推测可能是由于多年连作,种植单一,土壤长期而大量地使用化肥和农药,或者存在连作障碍因子等,限制了土壤某些细菌的生长<sup>[15]</sup>,同时刺激了其他种类细菌的生长而促使其成为优势种类,使得土壤细菌种类较少<sup>[16]</sup>。但对于典型的菜田土壤的这一推测还需要进一步研究证明。土壤的微生物种类不同其功能也很不同,因此微生物多样性的降低,将直接影响到各种微生物不同功能的发挥,以及相互间的互作。从而对土壤各种营养元素的循环、有机物的分解利用,植物对养分的吸收和生长发育产生严重的不良影响,破坏植物正常的生长环境从而使各种植物病害普遍发生,同时也可能是土壤退化的一个重要原因。

本研究应用 16S rRNA 基因克隆文库技术分别构建了北京和山东地区典型菜田土壤细菌 16S rRNA 基

因克隆文库,进一步弄清了菜田土壤环境中土壤细菌群落的组成情况。但由于本研究只对细菌的 16S rRNA 基因克隆文库进行了构建,对土壤中的其他微生物类群(如真菌和古生菌等),还不能全面认识,需要进一步研究。因此为探明高强度利用条件下菜地土壤微生物的多样性和可能发生的变化情况,还需要全面考虑土壤生态环境,土质状况,配合作物种类,施肥情况等,综合分析各种土壤微生物的多样性的构成,从而进一步为菜田土壤的可持续性利用、菜地病虫害的有效防治、蔬菜品质的改良提供基础研究的可靠依据。

## 参 考 文 献

- [1] 陈秀蓉,南志标. 细菌多样性及其在农业生态系统中的作用. 草业科学(*Pratacultural Science*), 2002, 19(9): 34-38.
- [2] Kennedy AC. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 1999, 74: 65-76.
- [3] 赵勇,周志华,李武,等. 土壤微生物分子生态学研究总 DNA 的提取. 农业环境科学学报(*Journal of Agro-environment Science*), 2005, 24(5): 854-860.
- [4] Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(2): 316-322.
- [5] Vaneechoutte MR, Rossau R, Devos P, et al. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *Fems Microbiology Letters*, 1992, 93: 227-234.
- [6] Tatiana AT, Thomas LM. Blast 2 sequences—a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *Fems Microbiology Letters*, 1999, 174: 247-250.
- [7] McCaig AE, Glover LA, Prosser JI. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 1721-1730.
- [8] Cole JR, Chai B, Marsh TL, Farris RJ, et al. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31: 442-443.
- [9] Schloss PD, Handelsman J. 1996. Toward a census of bacteria in soil. *Plos Computational Biology*, 2(7): 786-793.
- [10] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876-4882.
- [11] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5: 150-163.
- [12] Good IL. The population frequencies of species and the estimation of the number of species. *Journal of Animal Ecology*, 1962, 31: 1-10.

- tion of population parameters. *Biometrika*, 1953, 40: 237-264.
- [13] Schloss PD, Handelsman J. Status of the Microbial Census. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(4): 686-691.
- [14] Borneman J, Skroch PW, Palus JA, *et al.* Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 1935-1943.
- [15] Ekundayo EO Effect of common pesticides used in the Niger delta basin of southern Nigeria on soil microbial populations. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2003, 89: 35-41.
- [16] 胡元森, 刘亚峰, 吴坤, 等. 黄瓜连作土壤微生物区系变化研究. *土壤通报*(*Chinese Journal of Soil Science*), 2006, 37: 126-129.

## Analysis of soil bacterial diversity by Using the 16S rRNA gene Library

Weiqi Liu, Zhenchuan Mao, Yuhong Yang, Bingyan Xie\*

(*Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China*)

**Abstract:** [Objective] Soil microorganisms play an important role in the vegetable soil ecosystem. Through 16S rRNA gene cloning library technology to analysis the composition of bacteria community structure in the typical vegetable soil. To revealed the microbial diversity in the typical vegetable soil, and laid the foundation for the relationship between land-use changed and the ecological environment. [Methods] Total microbial DNA was directly extracted from a typical vegetable soil of Beijing and Shandong province. The clone library of 16S ribosomal RNA genes was amplified using PCR with universal bacterial primer sets. The PCR products were then subcloned into pGEM-T vector. Each unique restriction fragment polymorphism pattern, created by using two restriction endonucleases (*Hinf* I and *Hae* III), was designated as an operational taxonomic unit (OTU). Amplified DNA was used for diversity analysis. [Results] Constructed bacterial phylogenetic trees of the samples revealed the  $\gamma$ -proteobacteria,  $\beta$ -proteobacteria and  $\alpha$ -proteobacteria groups were dominant in both clone libraries. Bacterial species composition from Beijing and Shandong province included 124 OTUs and 92 OTUs, respectively. [Conclusion] the dominant species of bacteria populations are proteobacteria in the typical vegetable soil of Beijing and Shandong areas. But bacterial diversity in the two typical vegetable soil samples was reduced. This phenomenon may be directly related to Continuous cultivation for many years and plant a single vegetable species. At the same time, this phenomenon may also be an important reason to cause vegetable soil diseases widespread and soil degradation.

**Keywords:** bacterial diversity; 16S rRNA gene clone library; amplified ribosomal DNA restriction analysis; phylogenetic analysis

Supported by the Subject of National Key Technology Research and Development Program of the Eleventh Five-year Plan (2006BAD07B03, 2006BAD08A08, 2006BAD17B08) and the Fund Scientific Research for Agricultural Public Welfare (NYHYZX07-050)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-68919545; E-mail: xiebingyan2003@yahoo.com.cn

Received: 4 March 2008/ Revised: 31 July 2008

### 《微生物学报》答作者问——关于版权

问: 在与贵刊签订版权协议时, 我只想转让印刷版, 不想转让网络版, 是否可以?

答: 本刊不仅出版印刷版, 同时出版光盘版、网络版。在出版过程中, 一般不大可能将其中的一篇文章撤下来不做网络版, 所以凡是不同意转让光盘版和网络版的作者, 本刊建议您改投其他刊物。请您谅解!