

用 PCR-DGGE 研究长期施用无机肥对种稻红壤微生物群落多样性的影响

钟文辉^{1, 2}, 蔡祖聪^{1, *}, 尹力初³, 张 鹤²

(1. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室 中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008 ;
2. 南京师范大学化学与环境科学学院, 南京 210097 ; 3. 湖南农业大学资源环境学院, 长沙 410128)

摘要 以中国科学院红壤生态试验站的发育于第四纪红粘土的种稻红壤为研究对象, 采用 PCR-DGGE 方法研究了长期施用无机肥对土壤微生物群落多样性的影响。在种植双季稻、连续 13a 施用不同无机肥后, 土壤中细菌、古菌、放线菌和真菌的群落结构发生了较大的变化。未种植水稻的土壤与种稻土壤间四类微生物 SSU rDNA DGGE 带谱相似性只有 33% ~ 66%。施磷肥的处理 NP、PK、NPK 之间微生物群落结构相似性较高, 4 类微生物的 SSU rDNA DGGE 带谱相似性高达 75% ~ 81%。施氮钾肥 (NK)、不施肥 (K) 处理与施磷肥处理间土壤微生物群落结构的差异较大, 其四类微生物的 SSU rDNA DGGE 带谱相似性分别为 69% ~ 77%、55% ~ 77%。研究的目的是深入地了解土壤中微生物群落的多样性, 为科学施肥、合理利用土壤、保护微生物多样性和实现农业生态系统的可持续发展提供科学依据。

关键词 种稻红壤 微生物多样性 细菌 放线菌 真菌 古菌 PCR-DGGE

文章编号 1000-0933 (2007) 10-4011-08 **中图分类号** Q142, Q938, S154.36 **文献标识码** A

The effects of the long-term application of inorganic fertilizers on microbial community diversity in rice-planting red soil as studied by PCR-DGGE

ZHONG Wen-Hui^{1, 2}, CAI Zu-Cong^{1, *}, YIN Li-Chu³, ZHANG He²

1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 21000, China

2 College of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China

3 College of Resources and Environmental Science, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Acta Ecologica Sinica, 2007, 27 (10) 4011 ~ 4018.

Abstract : The effects of the long-term application of inorganic fertilizers on microbial community diversity were investigated in a rice-planting soil derived from quaternary red clay in the Ecological Experimental Station of Red Soil, Chinese Academy of Sciences. After 13 years application of different inorganic fertilizers for flooded double rice crops, the community structure of bacteria, archaea, actinomycetes, and fungi in the soil changed greatly. The similarity of the SSU rDNA DGGE patterns of these four kinds of microorganisms between the soil without rice-planting and the soil with rice-planting reached

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (40471065) 中国科学院知识创新工程重要方向资助项目 (KZCX2-YW-408) 土壤与农业可持续发展国家重点实验室基金资助项目 (55122)

收稿日期 2006-08-15 ; **修订日期** 2007-03-28

作者简介 钟文辉 (1965 ~), 男, 江西瑞金人, 博士, 教授, 主要从事环境微生物及环境生物技术研究. E-mail : zhongwenhui@njnu.edu.cn

* **通讯作者** Corresponding author E-mail : zccai@issas.ac.cn

Foundation item : The project was financially supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 40471065), the Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Sciences (No. KZCX2-YW-408) and the open fund of the State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (No. 055122)

Received date 2006-08-15 ; **Accepted date** 2007-03-28

Biography : ZHONG Wen-Hui, Ph. D., Professor, mainly engaged in environmental microbiology and biotechnology. E-mail : zhongwenhui@njnu.edu.cn

only 33% and 66% , respectively. The microbial community structure among treatments with NP, PK, and NPK types of P fertilizer were much similar ;the similarity of the SSU rDNA DGGE patterns of the four kinds of microorganisms in these treatments reached a high range of 75%—81% . The microbial community structures between the treatment with N and K fertilizers (NK) and the treatment without inorganic fertilization (CK) with the treatments with P fertilizer differed greatly, with the similarity of the SSU rDNA DGGE patterns of the four kinds of microorganisms in these treatments reaching 69%—77% and 55%—77% , respectively. The results of this study provide a scientific basis for fertilizing and utilizing soil, protecting microbial diversity, and accomplishing the sustainable development of agroecology.

Key Words :rice-planting red soil ;microbial diversity ;bacteria ;actinomycetes ;fungi ;archaea ;PCR-DGGE

红壤广泛分布于中国南部和中部的热带和亚热带地区,分布区面积 113 万 km²、占国土面积的 11.8%。栽培水稻是红壤的主要利用方式之一。红壤是高度风化和淋溶的土壤,pH 低、营养缺乏,特别是磷和氮比较缺乏^[1],作物通常受酸度和营养供给不足的限制。

土壤微生物种类极其丰富,在土壤生态系统中有着至关重要的作用。在生态学和环境科学中,土壤微生物的多样性及其作用的研究越来越受到重视。土壤微生物多样性的研究方法很多,从目前国内外采用的方法来看,大致上包括传统的微生物平板纯培养方法、群落水平生理代谢谱分析法(如 Biolog 微平板法)、微生物生物标记物分析法(如 PLFA 分析、麦角甾醇分析)、分子生物学方法和其它方法(如氯仿熏蒸方法、底物诱导呼吸法、酶活性分析方法、微生物能量代谢的分析方法等等)。传统的平板培养方法研究土壤微生物多样性有很多的缺陷,不能很好地反映土壤微生物多样性^[1]。如可分离的微生物种类只占总数的 1%~10%,许多‘存活但不能培养’的微生物不能被分离和鉴定,这就使得采用新的技术和方法显得尤为必要。当前,群落水平生理代谢谱分析法、微生物生物标记物分析法和分子生物学方法是应用最广泛的方法^[1]。

分子生物学方法如 PCR-DGGE 使得研究者能够在分子水平上对土壤微生物多样性进行研究^[4-6]。尽管不能提供有关微生物活性的信息,但自 1993 年被引入微生物生态学研究以来,在许多微生物实验室被用作分子工具来比较土壤微生物种群的多样性和对种群动态监测。PCR-DGGE 的基本思路及及操作方法如下^[1,7]:从土壤样品中提取土壤微生物基因组 DNA,选择特异性引物 PCR 扩增核糖体小亚基 rRNA 基因(16S rDNA,即 16S rDNA 或 18S rDNA),再用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术对 PCR 产物进行分离,根据 DGGE 电泳条带的多寡和条带的位置结合序列测定可了解土壤样品中微生物的多样性。

本研究采用 PCR-DGGE 技术、以中国科学院红壤生态试验站的长期无机肥定位试验土壤样品中土壤微生物的基因组 DNA 为研究对象,通过比较土壤中几类原核微生物的 16S rRNA 和真核微生物的 18S rRNA 来研究土壤利用方式变化和长期施无机肥条件下微生物群落多样性的变化。本研究的目的在于研究 PCR-DGGE 技术在红壤微生物多样性研究中的应用、深入地了解土壤中微生物群落的多样性和资源库,为科学施肥、合理利用土壤、保护微生物多样性和实现农业生态系统的可持续发展提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 长期试验描述和采样

长期定位试验始于 1990 年,设置于中国科学院鹰潭红壤生态试验站(28°15'30"N,116°55'30"E)。该地区是典型的亚热带季风气候,年降雨量 1795 mm,年蒸发量 1318 mm,年平均气温 17.6℃。土壤为发育于第四纪红粘土母质的红壤,作物为早稻和晚稻双季稻,冬季休闲。5 个处理分别为不施肥对照(CK)、NK、NP、PK 和 NPK,每个处理 4 个重复。N、P 和 K 肥分别为尿素、过磷酸钙和氯化钾,年施用量分别为:尿素 333 kg/hm²,过磷酸钙 273 kg/hm²,氯化钾 124 kg/hm²。P 和 K 作为基肥施用,氮肥分别作基肥和追肥施用(比例 250:83)。水稻籽粒和秸秆均收获。

于 2003 年 3 月(此时土壤休耕)从试验区采取耕作层(0~20 cm)土壤,同时从邻近的未开垦荒地采取表层土壤(CK')作对照,剔除根系后过 2 mm 筛,4℃保存,所有分析在两个月内完成。

1.2 土壤 DNA 的提取和 rDNA 的 PCR 扩增

采用 FastDNA® SPIN Kit for Soil 试剂盒和 Fast Prep™ FP120 核酸提取仪提取土壤 DNA。PCR 引物按照文献报道合成,PCR 条件列于表 1。为提高灵敏度和有利于 DGGE 分析,使用了嵌套式 PCR 扩增技术(nested PCR technique)在第一轮扩增中使用各类微生物的特征引物及其相对应的 PCR 程序。在第二轮扩增中使用通用引物或特征引物对第一轮扩增产物进行再次扩增。由于放线菌属于细菌域(domain of the Bacteria),故在第二轮扩增中使用了细菌通用引物 P338f 和 P518r。PCR 反应体系的组成如下:上、下游引物各 0.2 μmol/L,dNTP 200 μmol/L ,MgCl₂1.5 mmol/L,1 × Taq DNA 聚合酶缓冲液(不含 Mg²⁺),每 50μl 反应体系用 Taq DNA 聚合酶 1.25U。在第一轮 PCR 中每 25μl PCR 反应体系中加入 DNA 提取物 1μl,在第二轮 PCR 中每 50μl PCR 反应体系中加入第一轮扩增产物 1μl。PCR 结束后用 1.5% 琼脂糖凝胶检验扩增片段。PCR 样品在 4℃ (几小时内)或是 -20℃ 下保存。

表 1 本研究中使用的 PCR 条件
Table 1 PCR condition used in this study

靶 Target	引物 Primers	PCR 条件 PCR condition							参考文献 References
		循环次数 Number of cycles	变性 Denaturation		退火 Annealing		链延伸 Elongation		
			℃	min	℃	min	℃	min	
细菌 Bacteria									[8]
第一轮 PCR First PCR round	P63f, R1378r	30	95	1	53	1	72	2	
第二轮 PCR Second PCR round	P338fGC, P518r	30	95	1	53	1	72	2	
古菌 Archaea									[8]
第一轮 PCR First PCR round	PRA46f, PRA1100r	30	92	1	55	1	72	1	
第二轮 PCR Second PCR round	PARCH340fGC, PARCH519r	30	92	1	55	1	72	1	
放线菌 Actinomycetes									
第一轮 PCR First PCR round	F243, R1378r	35	95	1	63	1	72	2	[9;10]
第二轮 PCR Second PCR round	P338fGC, P518r	30	95	1	53	1	72	2	[8]
真菌 Fungi									[1]
第一轮 PCR First PCR round	NS1, NS2 + 10	30	95	1	55	1	72	1	
第二轮 PCR Second PCR round	NS26, 518rGC	30	95	1	55	1	72	1	

1.3 DGGE 及凝胶成像分析

DGGE 采用 Muyzer 等的方法 [1],使用的电泳设备是 Bio-Rad D Gene 系统 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)。将第二轮 PCR 产物上样到 8g/100ml 聚丙烯酰胺凝胶上,60℃、200 V 下电泳 5h。聚丙烯酰胺凝胶变性梯度范围为 35% 至 65%,电泳缓冲液为 0.5 × TAE (40 mmol/L Tris, 10 mmol/L 冰醋酸,0.5 mmol/L EDTA pH7.4)。电泳结束后用 1:10000 SYBR Gold (Bio Probe Products, Rockland, ME, USA) 染色 30min,立即用凝胶成像系统 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 成像和拍照。

1.4 DGGE 图谱分析

DGGE 图谱中 DNA 条带由凝胶成像系统分析软件 Imaging and Analysis Software (Windows/Macintosh, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 识别和统计,DGGE 带谱聚类分析 (clustering analysis) 也使用该软件。主成分分析使用 SPSS10.0。

2 结果与分析

2.1 细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE

采用嵌套式 PCR 扩增技术对细菌 16S rDNA 进行扩增,获得预期大小的 DNA 片段。第一轮和第二轮扩增分别得到 1339bp 和 237bp 的 16S rDNA 片段 (图 1),第二轮扩增产物的 DGGE 图谱见图 2,CK'、CK、NK、NP、PK、NPK 分别有 30、23、23、25、25 和 22 条 DNA 带。聚类分析表明 (图 3A),施 P 处理 (NP、NPK 和 PK) 的 DGGE 带谱相似性达到 74% ;CK' 与其它处理的差异最大,DGGE 带谱相似性为 57%。DGGE 带谱主成分分析显示,第一、二、三主成分的方差贡献率分别为 47.23 %、19.49% 和 16.90%,前三主成分的方差贡献率达 83.62%。三维因子载荷图 (图 2) 显示,CK' 分布在第 1 因子的正端,对该因子的得分最高,其它处理分布在第 1 因子的负端。施 P 的处理在三维因子载荷图中分布接近。

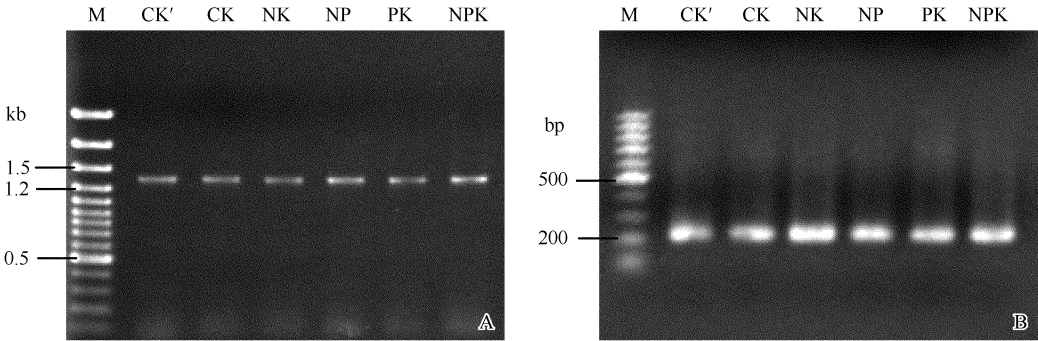


图 1 土壤样品中细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增产物

Fig. 1 Bacterial 16S rDNA PCR amplification products of soil samples

M :DNA Marker (100bp ladder) ; A、B 分别为第一、二轮 PCR 扩增产物 A and B are first and second round PCR amplification products

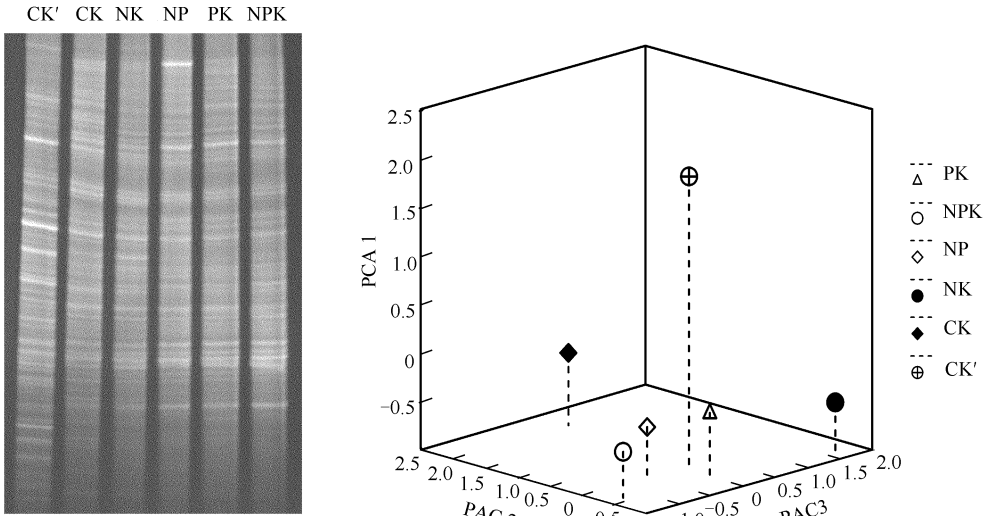


图 2 土壤样品中细菌 16S rDNA 的 DGGE 图谱及其主成分分析结果

Fig. 2 DGGE pattern and its PCA analysis result of bacterial 16S rDNA PCR amplification products of soil samples

3.2 古菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE

古菌第一轮和第二轮扩增分别得到 1072bp 和 237bp 的 16S rDNA 片段。第二轮扩增产物的 DGGE 图谱见图 4,CK'、CK、NK、NP、PK、NPK 分别有 17、19、20、17、19 和 17 条 DNA 带。聚类分析表明 (图 3B),NP 和 NPK 的相似性最高,达到 86% ,3 个施 P 处理 (NP、NPK 和 PK) 的 DGGE 带谱相似性达到 75% ;CK' 与其它处理的差异最大,DGGE 带谱相似性只有 33%。DGGE 带谱主成分分析显示,第一、二、三主成分的方差贡献率

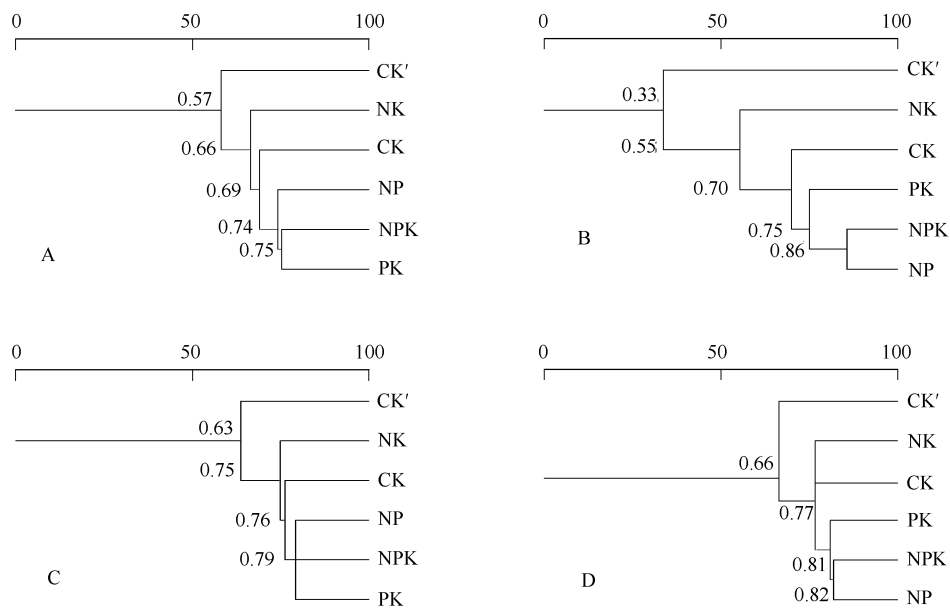


图 3 土壤样品 DGGE 带谱的聚类分析结果

Fig. 3 Clustering analysis results of the DGGE patterns of the soil samples
A :细菌 Bacteria ;B :古菌 Archaea ;C :放线菌 Actinomycetes ;D :真菌 Fungi

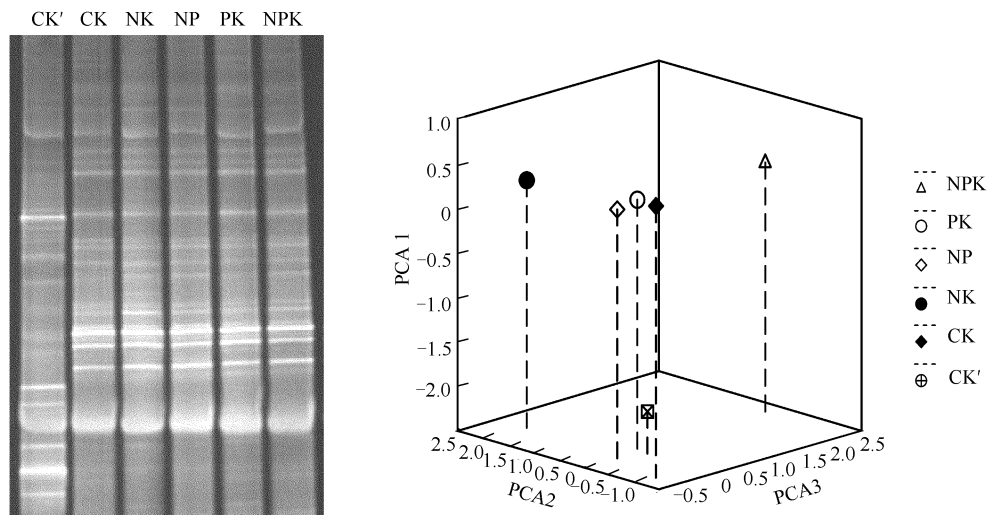


图 4 土壤样品中古菌 16S rDNA 的 DGGE 图谱及其主成分分析结果

Fig. 4 DGGE pattern and its PCA analysis result of archaeal 16S rDNA PCR amplification products of soil samples

分别为 58.92 %、14.59% 和 12.44% ,前三主成分的方差贡献率达 85.95%。三维因子载荷图 (图 4) 显示, CK ' 分布在第 1 因子的负端,得分最低,其它处理分布在第 1 因子的正端且得分接近。另一方面,NK 分布在第 2 因子的正端,其它分布在第 2 因子的负端。

3.3 放线菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE

放线菌第一轮和第二轮扩增分别得到 1158bp 和 237bp 的 16S rDNA 片段。第二轮扩增产物的 DGGE 图谱见图 5,CK '、CK、NK、NP、PK、NPK 分别有 23、25、23、25、22 条和 25 条 DNA 带。聚类分析表明 (图 3C) ,3 个施 P 的处理 (NP、NPK 和 PK) 的 DGGE 带谱相似性最高,达到 79% ;CK '与其它处理的差异最大,DGGE 带谱相似性为 63%。DGGE 带谱主成分分析显示,第一、二、三主成分的方差贡献率分别为 43.27%、25.75% 和

17.71%,前三主成分的方差贡献率达 86.73%。三维因子载荷图 图 5) 显示,CK '分布在第 1 因子的正端,得分最高,其它处理分布在第 1 因子的负端且得分接近。

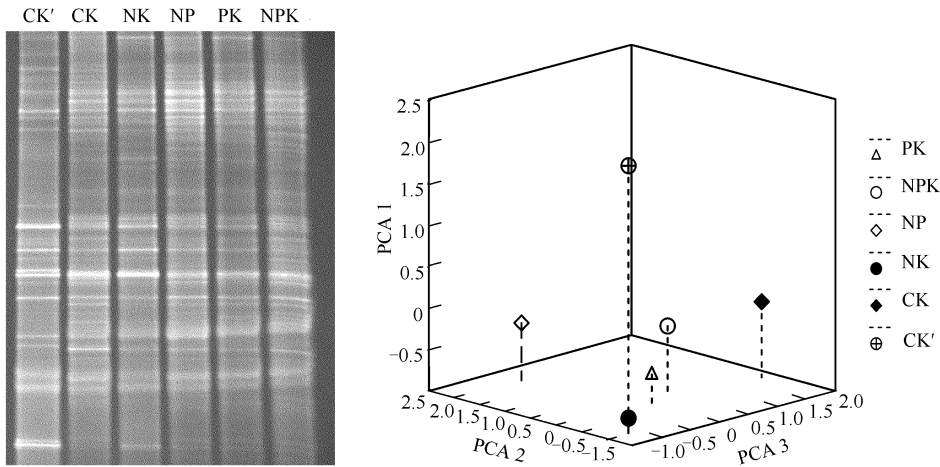


图 5 土壤样品中放线菌 16S rDNA 的 DGGE 图谱及其主成分分析结果

Fig. 5 DGGE pattern and its PCA analysis result of actinomycetes 16S rDNA PCR amplification products of soil samples

3.4 真菌 18S r DNA 的 PCR-DGGE

真菌 18S rDNA 第一轮和第二轮扩增分别得到 567bp 和 317bp 的 18S rDNA 片段。第二轮扩增产物的 DGGE 图谱见图 6,CK '、CK、NK、NP、PK、NPK 分别有 13、11、12、11、11 条和 11 条 DNA 带。聚类分析表明 图 3D),3 个施 P 的处理 (NP、NPK 和 PK) 的 DGGE 带谱相似性最高,达到 81% ;CK '与其它处理的差异最大, DGGE 带谱相似性为 66%。DGGE 带谱主成分分析显示,第一、二、三主成分的方差贡献率分别为 49.92%、20.62% 和 11.23%,前三主成分的方差贡献率达 81.77%。三维因子载荷图 图 6) 显示,CK '分布在第 1 因子的正端,得分最高,其它处理分布在第 1 因子的负端且得分接近。另一方面,3 个未施 P 的处理 (CK '、CK 和 NK) 分布在第 2 因子的负端,3 个施 P 的处理 (NP、NPK 和 PK) 分布在第 2 因子的正端。

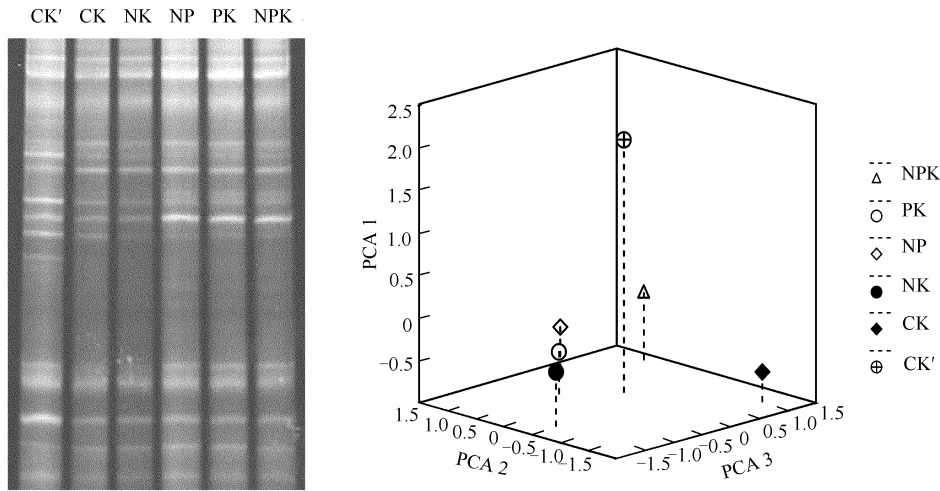


图 6 长期施用不同无机肥的红壤中真菌 18S rDNA 的 DGGE 图谱及其主成分分析

Fig. 6 DGGE pattern and its PCA analysis of fungal 18S rDNA PCR amplification products of soil samples

4 讨论

4.1 PCR-DGGE 方法与土壤微生物多样性

在 DGGE 图谱中,处于不同位置的每条 DNA 带及其相对浓度 (亮度) 很可能代表微生物群落中某一特定

微生物种及其在群落中的相对丰度^[1]。在 PCR-DGGE 方法中,由于 PCR 模板为土壤总 DNA,其中既含可培养微生物的 DNA,也含不可培养微生物的 DNA,反映的微生物种类要比可培养微生物种类多。另一方面,PCR-DGGE 方法只能反映土壤中数量达到一定程度的那一部分微生物,若微生物数量过低,其 DNA 含量即低,经 PCR 扩增后的 SSU rDNA 产量亦低,可能在 DGGE 图谱中不能被分辨出来。Muyzer 等报道^[1],当某一模板 DNA 在总 DNA 中的量小于 1% 时,在 DGGE 图谱中还能分辨出该 DNA 带,因此推测 DGGE 法可反映微生物群落中数量上大于 1% 的优势种群。本研究中,DGGE 图谱中显示出分别有 27 ~ 30、17 ~ 20、26 ~ 37、13 ~ 15 条细菌、古菌、放线菌、真菌 SSU rDNA 带,可能分别反映出与 DNA 条带数相当各类微生物种群,该数量均比以往资料报道的红壤中可分离培养的各类微生物种类多^[1]。

在使用 PCR-DGGE 进行微生物多样性研究中,关键在于对样品中所有微生物群落 16S/18S rDNA 基因进行有效地扩增,所以在 PCR 过程中选择合适的引物显得尤为重要。一方面,选择的引物必须能够对样品中的绝大多数微生物种类进行有效扩增,这样就能保证研究结果的全面性;另一方面,选择的引物在设计上必须要求所有在 PCR 过程中扩增出的微生物的 16S rDNA 片断,在后续的 DGGE 分析中能够被完全分离,这样就有利于对单个微生物类群的 16S/18S rDNA 片断的回收和测序,从而对之进行分类单元上的定性。本研究所采用的引物是目前国际上常用引物。在 PCR 扩增技术上,也有不用嵌套技术的^[1],本研究发现采用嵌套技术扩增效果比较好,以用 FastDNA® SPIN Kit for Soil 试剂盒提取的 DNA 为模板,直接用 P338FfGC-P518r 扩增不仅产量较低,而且容易出现‘拖尾’现象。

16S rDNA DGGE 指纹 (fingerprinting) 技术目前已经广泛低用于监测细菌生长和分析细菌群落,然而,用 18S rDNA DGGE 指纹技术对真菌群落的分析方法却没有很好地建立起来^[1]。对于不同的研究对象,可能需要采用不同的引物。Smit 等用 EF4-EF3/funga5 (第一轮扩增)和 EF4-NS3GC (第二轮扩增)成功地研究了小麦根际真菌多样性^[2]。采用 EF4-EF3/funga5 成功地从所研究的红壤中扩增了 18S rDNA,但用 EF4-NS3GC 进行第二轮扩增时,发现扩增产物中除目的 DNA 带外,还有若干条非特异性 DNA 带,不管如何优化 PCR 条件,这些非特异性带都不能消除。显然,用该引物体系并不适用于所研究的红壤。采用 NS1-NS2 + 10 以及 NS26-518rGC 引物体系^[1]可成功地从所研究的红壤中扩增 18S rDNA (图 6)。

理论上,只要选择的电泳条件如变性剂梯度、电泳时间、电压等足够精细,DGGE 技术对于 DNA 片段的分辨率可以达到一个碱基差异水平,这无疑对序列信息的系统发育分析都有一定的影响。但本研究表明,不同的 DGGE 实验条件很可能导致不同的带型谱图。待测样品的预处理过程是影响 DGGE 效能的关键步骤,这一步骤也是实验误差的主要来源。很多因素都会影响样品 DNA 的提取过程,譬如,待测细胞是否充分裂解,一些抑制 DNA 降解的物质是否完全去除等。此外,在 PCR 扩增过程中,如何避免优先扩增,使所有模板以均等的几率被扩增,基因组的大小、引物的设计以及扩增程序的选择均对扩增后 DNA 片段的质量和数量有很大的影响。这些都将间接影响 DGGE 的分析结果。本研究表明,在 DGGE 电泳技术上,用 130 V、11h 与用 200 V、5h 电泳的效果相当。

4.2 荒地红壤改种水稻微生物多样性的变化和长期施用无机肥对土壤微生物多样性的影响

荒地红壤 (CK') 的肥力水平很低,土壤有机碳含量极低 (1.64 g kg⁻¹),土壤微生物量碳和氮、可培养微生物的数量、微生物群落功能多样性,均比改种水稻和施用 N、P、K 肥料低^①。但是,本研究结果表明,荒地红壤改种水稻后,细菌、放线菌、古菌和真菌的 SSU rDNA 的总数量未发生明显的变化,但带谱发生了明显的改变,荒地红壤与种水稻、施肥处理土壤细菌、古菌、放线菌和真菌 SSU rDNA DGGE 带谱相似性分别为 57%、33%、63%、66%,说明土壤微生物群落结构发生了显著的变化。根据 DGGE 带谱的聚类分析和主成分分析结果,CK' 与 CK 及不同施肥处理 (NK、NP、PK 和 NPK) 的差异比不同施肥处理之间的差异大,不管对所研究的哪个类群的微生物,CK' 的 DGGE 带谱与其它处理的 DGGE 带谱的差异都是最大的,表明荒地红壤改种水稻后土

① 待发表

壤微生物群落结构变化程度比长期施用不同无机肥使土壤微生物群落结构发生变化的程度大。

在长期施用无机肥对土壤微生物多样性的影响上,根据 DGGE 图谱以及 DGGE 带谱的聚类分析和主成分分析结果,不管对所研究的哪个类群的微生物,施 P 处理 NP、NPK 和 PK 的 DGGE 带谱相似性都是最高的,四类微生物 DGGE 带谱相似性高达到 74% ~ 81% (图 3),表明施用磷肥处理的土壤微生物群落结构最为接近。而不施无机肥的对照 CK 与施磷肥处理间细菌、古生菌、放线菌和真菌的 SSU rDNA DGGE 带谱相似性分别为 69%、70%、76%、77% (图 3),提示 CK 与施磷肥处理间土壤微生物群落结构的差异较大。NK 处理与施用磷肥处理间微生物群落结构的差异也较大,细菌、古生菌、放线菌和真菌的 SSU rDNA DGGE 带谱相似性分别为 66%、55%、75%、77% (图 3)。可见,长期施用不同无机肥使种稻红壤微生物群落结构发生了一定的变化,引起这些变化的原因还有待进一步研究。

References :

[1] Hao W Y and Cao Z B. Microbes in red soils in China. In :Proceeding of international symposium on red soil. Edited by Institute of Soil Science, Academia Sinica. Beijing :Science Press, 1986. 274 — 285.

[2] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and insitu detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. , 1995, 59 (1) :143 — 169.

[3] Zhong W H, Cai Z C. Methods for studying soil microbial diversity. Chinese J. Appl. Ecol. , 2004, 15 (6) : 899 — 904.

[4] Maarit N R, Ilse H, Kaisa W, *et al.* Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. J. Microbiol. Methods, 2001, 45 (1) :155 — 165.

[5] Muyzer G, de Waal E D, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. , 1993, 59 :695 — 700.

[6] Gong M L, Ren N Q, Xing D F. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis in microbial molecular ecology. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44 (6) :845 — 848.

[7] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie. Van. Leeuwenhoek, 1998, 73 :127 — 141.

[8] Øvreas L, Forney L, Daae F L, *et al.* Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. , 1997, 63, 3367 — 3373.

[9] Boon N, de Windt W, Verstraete W, Top E M. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gelelectrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. FEMS Microbiol. Ecol. , 2001, 39, 101 — 112.

[10] Heuer H, Krsek M, Baker P, *et al.* Analysis of actinomycete communities by specific of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. Appl. Environ. Microbiol. , 1997, 63, 3233 — 3241.

[11] Schabereiter-Gurtner C, Pinar G, Lubitz W, *et al.* Analysis of fungal communities on historical church window glass by denaturing gradient gel electrophoresis and phylogenetic 18S rDNA sequence analysis. J. Microbiol. Methods, 2001, 47 :345 — 354.

[12] Smit E, Leeftang P, Glandorf B, *et al.* Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. , 1999, 65, 2614 — 2621.

参考文献 :

[3] 钟文辉, 蔡祖聪. 土壤微生物多样性研究方法, 应用生态学报, 2004, 15 (6) :899 ~ 904.

[6] 宫曼丽, 任南琪, 邢德峰. DGGE/TGGE 技术及其在微生物分子生态学中的应用, 微生物学报, 2004, 44 (6) :845 ~ 848.