

青藏铁路沿线唐古拉山口土壤微生物的 ARDRA 分析

李潞滨¹, 刘振静¹, 杨 凯^{2,*}, 刘 敏³, 周金星¹, 孙 磊³, 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, 河北省生物工程技术研究中心, 保定 071002)

摘要:通过构建 16S rDNA 文库及文库的限制性片段长度多态性分析 (ARDRA), 对青藏铁路沿线唐古拉山口的土壤微生物多样性进行了研究。采用限制性内切酶 *Hae*III 和 *Rsa*I 对克隆文库中的 90 个克隆子进行了酶切分型, 根据 ARDRA 酶切图谱的不同, 可将其分为 23 个 OTUs。16S rDNA 序列分析结果表明, 该克隆文库中主要包括变形菌门 (Proteobacteria) 的 alpha、beta、delta 亚类、厚壁菌门 (Firmicutes)、放线菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、酸杆菌门 (Acidobacteria) 及浮霉菌门 (Planctomycetes) 等 8 类细菌及未培养细菌。Alpha 变形细菌为该文库中的主要菌群, 占克隆总数的 33.3%; 其次为未培养细菌, 占克隆总数的 22.2%, *Bradyrhizobium* 为优势属。研究结果揭示, 青藏铁路唐古拉山口的土壤微生物种群不仅具有丰富的多样性, 还存在丰富的潜在新菌种。

关键词:青藏铁路; 唐古拉山口; 微生物; 多样性; ARDRA

文章编号: 1000-0933(2008)11-5482-06 中图分类号: Q143 文献标识码: A

Soil microbial ARDRA analysis of Tanggula Mountain Pass along the Qinghai-Tibet railway

LI Lu-Bin¹, LIU Zhen-Jing¹, YANG Kai^{2,*}, LIU Min³, ZHOU Jin-Xing¹, SUN Lei³, HAN Ji-Gang³

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 Research Centre of Biological Engineering for Hebei Province, Hebei University, Baoding 071002, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(11): 5482 ~ 5487.

Abstract: The soil microbial diversity of Tanggula Mountain Pass along the Qinghai-Tibet railway was analyzed by 16S rDNA cloning, amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), and sequence homology comparisons. Among 90 positive clones in the 16S rDNA library of microorganisms, 23 OTUs (Operational Taxonomic Units) were identified based on the similarity of the ARDRA banding profiles. Sequence analysis revealed diverse phyla of bacteria in the 16S rDNA library, which consisted of alpha, beta, delta subclasses of the Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria and Planctomycetes. The dominant group was alpha-Proteobacteria (33.3% of the total clones), and the most dominant genus was *Bradyrhizobium*. More than 22.2% of the total clones showed high similarity to uncultured bacteria. The results suggest that the soil microbial diversity is abundant in this area.

基金项目: 铁道部重大科技计划资助项目 (2004G009)

收稿日期: 2008-04-29; 修订日期: 2008-09-26

作者简介: 李潞滨 (1962 ~), 男, 河北保定人, 副研究员, 主要从事植物微生物相互作用研究. E-mail: lilubin@126.com

* 通讯作者 Correspondence author. E-mail: yangkai8978@126.com

Foundation item: The project was financially supported by Major Science and Technology Project of the Ministry of Railways (No. 2004G009)

Received date: 2008-04-29; **Accepted date:** 2008-09-26

Biography: LI Lu-Bin, Associate professor, mainly engaged in plant-microbe interaction. E-mail: lilubin@126.com

Key Words: Qinghai-Tibet railway; Tanggula Mountain Pass; microorganisms; population diversity; ARDRA

青藏铁路格尔木-拉萨段位于青藏高原腹地,北起青海省西部格尔木市,途经南山口、不冻泉、五道梁、沱沱河、雁石坪,翻越唐古拉山进入西藏境内后,经安多、那曲、当雄,最后到达拉萨,全线 1 142 km,最高海拔在唐古拉山越岭地段,是世界上海拔最高、高海拔路段最长的高原铁路。这里的高海拔多年冻土面积居全球首位^[1],其生态类型特殊,多年冻土和生态脆弱是其显著特点。但是高海拔、低气温、长日照和强辐射也赋予了冻土地区独特的土壤微生物资源^[2]。选择唐古拉山口作为研究对象,开展微生物多样性调查,初步揭示其微生物种群多样性特征,不仅对于研究青藏铁路沿线生态环境的变化具有重要意义,也为进一步开发利用这一地区的特有的微生物资源奠定了基础。目前对于青藏铁路沿线冻土地带的微生物多样性研究还处于空白状态。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

2005 年 8 月,在青藏铁路沿线唐古拉山口(32°52'958"N,92°55'111"E)采集土壤样品。采集点海拔 5231 m,生态类型为高寒草甸,主要植被为紫花针茅(*Stipa purea*)和点地梅(*Androsace umbellata*)等。样品采集采用正方形五点取样法,垂直取 1~15 cm 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 -20℃ 保存备用。

1.2 主要试剂与仪器

pMD 18-T Vector、dNTP、Ex Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Hae*III、*Rsa*I 购自大连宝生物公司;PCR 引物 27f(5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'),1541r(5'-AAGGAGGTGAT CCAGCC-3')由上海生工生物工程技术服务有限公司合成;DNA 凝胶回收试剂盒购自 Promega 公司。PCR 仪(Biometra 公司,TGRADIENT),凝胶成像分析仪(Bio-Rad 公司,Gel-Doc2000)。

1.3 土壤细菌群落 16S rDNA 文库的建立及 ARDRA 分析

1.3.1 土壤微生物基因组 DNA 提取及 16S rDNA 扩增

称取充分研磨的 3 g 土样,加入 6 ml DNA 提取液(100 mmol/L Tris,100 mmol/L EDTA,100 mmol/L Na₃PO₄,1.5 mol/L NaCl,1% CTAB,0.01 g/ml PVP,pH 8.0)和 500 μl 溶菌酶(50 mg/ml),加入直径 3 mm 的玻璃珠充分震荡,37℃ 水浴 2 h;加入 20 μl 蛋白酶 K(20 mg/ml)37℃ 水浴 1 h;加入 2 ml 10% SDS,65℃ 水浴过夜;12 000 r/min 离心 10 min;取上清,用等体积苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)和氯仿:异戊醇(24:1)各抽提 1 次,12 000 r/min 离心 10 min;取上清,加入 2~3 倍体积的无水乙醇,-20℃ 放置 20~30 min,12 000 r/min 离心 10 min 收集 DNA 沉淀,适量 TE 溶解。DNA 的纯化参照张于光等的方法^[3]。

以基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 16S rDNA,扩增引物采用细菌通用引物 27F^[4]和 1541R^[5],它们分别位于 16S rDNA 的 8~27 和 1525~1541 位的碱基片段(以 *E. coli* 的 16S rDNA 碱基位置为准)。PCR 反应体系为 50 μl:DNA 模板 2 μl;2.5 mmol/L dNTP 2.5 μl;10× Ex Taq Buffer 5 μl;引物(20 μmol/L)各 1.5 μl;Ex Taq DNA 聚合酶(5U/μl)0.2 μl,ddH₂O 37.3 μl。PCR 反应条件:94℃ 变性 5 min,94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1.5 min,30 个循环,最后 72℃ 下延伸 10 min。扩增的 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳分离,经 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化。

1.3.2 16S rDNA 文库的建立

纯化的 PCR 产物与 pMD 18-T Vector 进行连接。转化感受态大肠杆菌(DH5α)细胞,涂布到含有氨苄青霉素(Ampicillin)/IPTG/X-Gal 的 LB(Luria-Bertani)培养基上,37℃ 培养 16~24 h,随机选取一定数量的白色克隆子,采用菌落 PCR 方法,用 pMD18-T 通用引物 M13F(-47)和 M13R(-48)扩增外源插入片段,电泳检测筛选含有插入片段的阳性克隆子。

1.3.3 ARDRA 分析

以限制性内切酶 *Hae*III、*Rsa*I 消化从各个克隆子扩增出的 16S rDNA 片断,酶切反应体系为:PCR 产物 4

μL , 限制性内切酶 *HaeIII*/*RsaI* 2.5U, $10\times$ 酶切缓冲液 $1\mu\text{L}$, ddH₂O 补充至 $10\mu\text{L}$ 。37℃ 消化 4 h。2% 的琼脂糖凝胶分离酶切片段。用凝胶成像仪照相, 电泳图谱照片用 NTSYS 软件分析。

1.3.4 克隆文库的分析

以 Coverage C 评价所构建的克隆文库的库容。Coverage C 理论上表示 16S rDNA 克隆文库中所包含的微生物种类 (OTU) 占样品中全部微生物种类的比例。 $C = 1 - n1/N$ 。 N 代表 16S rDNA 克隆文库的库容, $n1$ 代表在 16S rDNA 克隆文库仅出现一次的 OTU 的数量。

1.3.5 部分克隆 16S rDNA 测序及系统发育分析

根据 ARDRA 的分型结果, 挑选代表性的克隆进行序列测定。测序反应由北京三博远志有限公司完成。用 BLAST 软件在 GenBank 中搜索相似序列, 确定其分类发育地位。将相关序列用 MEGA 4.1 软件^[6] 分析并构建系统发育树, 用 bootstrap 分析评估树的稳定性。本研究得到的序列已提交 GenBank, 这些序列在 GenBank 中的收录号为 EU223938- EU223944, EU223946- EU223960, EU223962。

2 结果与分析

2.1 16S rRNA 基因克隆文库的 ARDRA 分型结果及文库评估

构建的土壤细菌群落 16S rDNA 文库, 通过菌落 PCR 检测到 90 个阳性克隆。阳性克隆中的插入片段用通用引物进行 PCR 扩增, 扩增产物以 *HaeIII*、*RsaI* 2 种限制性内切酶进行酶切分型。将 2 种酶切图谱完全相同的克隆划分为 1 个分类操作单元 (operational taxonomic unit, OTU), 扫描了青藏铁路唐古拉山口土壤细菌群落的 16S rDNA 文库中的 90 个阳性克隆, 根据酶切图谱的差别, 将其分为 23 个 OTUs。ARDRA 分型结果初步说明了青藏铁路唐古拉山口土壤细菌群落具有丰富的多样性。

所构建的青藏铁路唐古拉山口土壤细菌群落的 16S rDNA 文库的 Coverage C 为 93.3%。Coverage C 较高, 这说明该克隆文库已经能够代表青藏铁路唐古拉山口土壤细菌群落的微生物多样性。

2.2 细菌群落 16S rRNA 基因多样性及系统发育学分析

对 ARDRA 分型得到的 23 个 OTUs 中的代表克隆进行了序列测定。序列系统发育分析表明该克隆文库中主要包括变形菌门 (Proteobacteria) 的 alpha、beta、delta 亚门、厚壁菌门 (Firmicutes)、放线菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、酸杆菌门 (Acidobacteria) 及浮霉菌门 (Planctomycetes) 等 8 类细菌, 除此之外该文库还包含大量的未培养细菌。其中 alpha 亚门的变形细菌最多, 占克隆总数的 33.3%; 其次是未培养细菌, 占克隆总数的 22.2%; 放线菌占克隆总数的 12.22%, 其余各类所占比例较少。各类群的详细描述如表 1, 系统发育树见图 1。

2.2.1 变形细菌

该文库中 10 个 16S rDNA 序列属于变形细菌, 代表 10 个 OTUs, 其中 8 个 OTUs 与 alpha 变形细菌聚为一簇。在这 8 个 OTUs 中, 丰度最高的克隆子 (14 个) 代表了与 *Bradyrhizobium* 相近的 2 个 OTUs, 序列相似性为 94% ~ 98%, 为该文库中的优势菌群。其他 6 个 OTUs 分别与 *Mesorhizobium* sp.、*Sphingosinicella microcystinivorans*、*Sphingomonas* sp.、*Stella humosa* 和 *Rhodoplanes* sp. 相近, 16S rDNA 序列相似性为 91% ~ 97%。在与变形细菌相似的 OTU 中只有 1 个 OTU 与 beta 亚门的 *Ramlibacter tataouinensis* 聚为一群, 序列相似性为 97%。而与 delta 亚门的变形细菌相近的 1 个 OTU 与已知的 *Myxobacterium* AT3-03 的序列相似性为 95%。

2.2.2 放线菌

有 2 个 OTUs 与放线菌门的细菌聚为一群, 包含 11 个克隆子, 它们与 *Conexibacter woesei* 的序列相似性分别为 97% 和 95%, 为文库中的另一个优势菌群。

2.2.3 未培养细菌

测序结果显示, 该文库中有 7 个 OTUs 代表了未培养细菌, 其中 3 个 OTUs 包含了 9 个克隆, 与从土壤样品中克隆的未培养酸杆菌门的不同细菌具有较高的序列相似性, 为未培养细菌中的优势类群; 其余的克隆分别与未培养的 beta 变形细菌、疣微菌及未培养细菌的序列相似性较高。

表 1 青藏铁路沿线唐古拉山口土壤微生物 16S rDNA 克隆的分布情况

Table 1 Distribution of 16S rDNA clones detected from soil microorganisms of Tanggula Mountain Pass

类群 Prokaryotic group	最相似菌株 Closest NCBI match	登录号 GenBank Accession No.	相似性 Identity %	克隆数量 No. of Clones	百分比 Total clones %
Alphaproteobacteria	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (AY904746)	EU223943	98	9	10
	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Shinshu-th2 (AB121773)	EU223948	94	5	5.56
	<i>Mesorhizobium</i> sp. NH-14 (AB196496)	EU223941	97	6	6.67
	<i>Sphingosinicella microcystinivorans</i> (AB219941)	EU223947	94	4	4.44
	<i>Sphingomonas kaistensis</i> (AY769083)	EU223953	94	3	3.33
	<i>Sphingomonas</i> sp. SIA181-1A1 (AF395032)	EU223958	92	1	1.11
	<i>Stella humosa</i> (AJ535710)	EU223956	91	1	1.11
	<i>Rhodoplanes</i> sp. TUT3523 (AB250620)	EU223944	91	1	1.11
Betaproteobacteria	<i>Ramlibacter tataouinensis</i> TTB310 (AF144383)	EU223938	97	5	5.56
Deltaproteobacteria	<i>myxobacterium</i> AT3-03 (AB246770)	EU223957	95	5	5.56
Firmicutes	<i>Sporosarcina</i> sp. F73 (DQ073393)	EU223959	96	3	3.33
Actinobacteria	<i>Conexibacter woesei</i> DSM 14684 (AJ440237)	EU223949	97	8	8.89
	<i>Conexibacter woesei</i> DSM 14684 (AJ440237)	EU223946	95	3	3.33
Bacteroidetes	<i>Segetibacter koreensis</i> (AB267478)	EU223960	95	4	4.44
Acidobacteria	<i>Acidobacteria bacterium</i> Ellin7137 (AY673303)	EU223952	96	6	6.67
Planctomycetes	<i>Isosphaera</i> sp. (X81951)	EU223954	91	6	6.67
Uncultured bacteria	uncultured beta proteobacterium (AY921995)	EU223951	95	1	1.11
	uncultured Burkholderiaceae bacterium (EF018305)	EU223955	95	5	5.56
	uncultivated soil bacterium clone C019 (AF013522)	EU223940	96	4	4.44
	uncultured Acidobacteria bacterium clone lhad28 (DQ648907)	EU223962	98	5	5.56
	uncultured Acidobacteria bacterium clone lhad20 (DQ648919)	EU223942	96	3	3.33
	uncultured Acidobacteria bacterium (Z95720)	EU223939	96	1	1.11
	uncultured bacterium (EU137390)	EU223950	96	1	1.11

2.2.4 其他细菌

2 个 OTUs 分别以 96% 和 95% 的相似水平与从土壤中分离到的厚壁菌门的新菌株 *Sporosarcina* sp. 和拟杆菌门的新菌株 *Segetibacter koreensis* 聚在一起。1 个 OTU 与从土壤中分离的 *Acidobacteria bacterium* Ellin7137 序列相似性为 96%。还有 1 个 OTU 与浮霉菌门的 *Isosphaera* sp. 相近。

3 讨论

唐古拉山口是青藏铁路沿线的重要路段,位于青藏高原腹地,海拔 5231 m,为多年冻土地带。本文首次采用了 16S rDNA 文库构建及 ARDRA 分型的方法研究了唐古拉山口土壤细菌群落的多样性。序列同源性分析表明,该文库中较多的克隆属于变性细菌和放线菌,这与以 16S rDNA 文库构建的方法对北极冻土样品细菌群落多样性的研究结果相似^[7]。该文库中的优势菌属与慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)细菌具有很高的相似性。之所以含有较多的根瘤菌,这可能与低温和贫营养生境中分解作用和氮矿化的低活性有关^[8]。在这样的条件下,具有固氮功能的微生物对氮的固定成为氮素的主要来源^[9]。另外,22.2% 的克隆与未培养的细菌具有高相似性,而与已知细菌的序列相似性则较低,这可能与该地区的高海拔、低气温、强辐射的特殊生境有关,这也可说明该地区土壤中存在大量的未培养细菌。通过构建 16S rDNA 文库及对文库进行 ARDRA 分析,不仅揭示了青藏铁路唐古拉山口土壤细菌群落具有丰富的多样性,而且也对特殊细菌的分离提供了指导。

16S rDNA 克隆文库的构建是微生物分子生态学研究用来调查环境中原核生物组成的常用方法之一^[10]。主要是通过对文库中的克隆进行序列测定,来了解环境样品中的微生物多样性。为了减少测序的数量,往往可采用 ARDRA 对文库进行酶切分型,然后根据分型结果对代表克隆进行测序^[11]。目前该方法已广

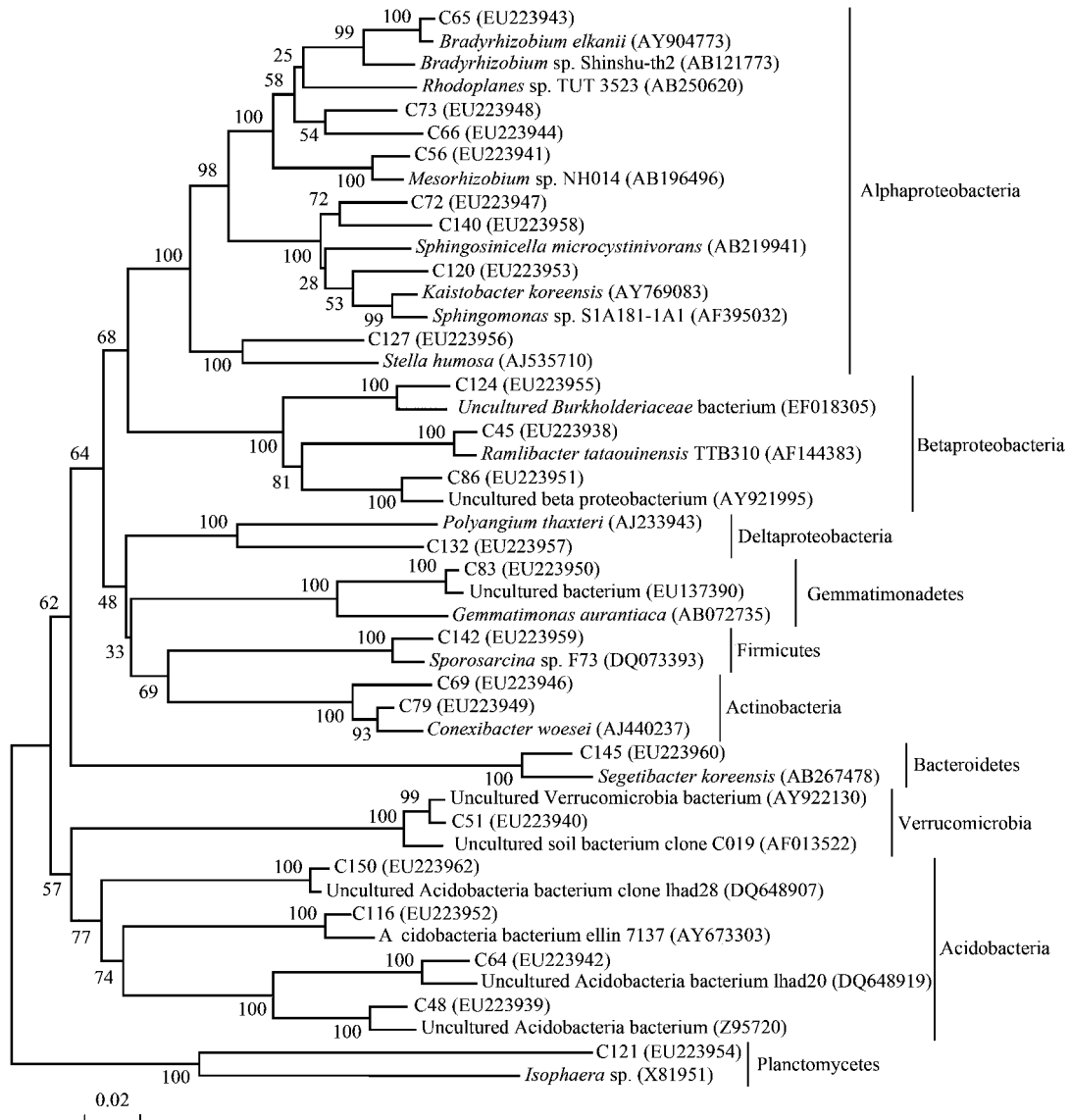


图1 基于16S rDNA序列同源性的青藏铁路沿线唐古拉山口土壤微生物系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of soil microorganisms from Tanggula Mountain Pass 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

泛应用于多种生态系统中微生物多样性的研究^[12]。但值得注意的是,该方法在研究微生物多样性时也存在一定的局限性。主要表现在,提取基因组DNA时细胞的裂解效率不同^[13],DNA提取和纯化时有偏差^[14],PCR扩增过程中的偏差^[15],以及编码16S rRNA的操纵子拷贝数的差异等。另外,该方法也不能提供群落成员的功能信息。因此,将克隆文库的方法与定量的方法如FISH、功能基因的RT-PCR等相结合,同时结合可培养微生物的分离培养,才能更好的分析群落的结构和功能。

References:

- [1] Qiu G Q, Cheng G D. Permafrost in China: past and present. *Quaternary Sciences*, 1995, (1): 13–22.
- [2] Liu G X, Ma X J, Chen T. Progress and significance of studies on microorganisms in permafrost sediments. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2004, 26(2): 188–191.
- [3] Zhang Z G, Wang H M, Li D Q, et al. The community and structure of nitrogen-fixing microorganism in Sanjiangyuan Natural Reserve. *Acta*

- Microbiologica Sinica, 2005, 45(3): 420—425.
- [4] Edwards U, Rogall T, Blacker H, *et al.* Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes; characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17:7843—7853.
- [5] Dong X Z, Sheng D L, Xin Y H. Phylogenetic relationship between the genus *Bifidobacterium* and related bacteria based on 16S rDNA homology. *Chinese Biodiversity*, 2000, 8(2):146—152.
- [6] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24:1596—1599.
- [7] Steven B, Briggs G, McKay C P, *et al.* Characterization of the microbial diversity in a permafrost sample from the Canadian high Arctic using culture-dependent and culture-independent methods, *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 59(2):513—523.
- [8] Jonasson S, Havstrom M, Jensen M, *et al.* *In situ* mineralization of nitrogen and phosphorus of arctic soils after perturbations simulating climate-change. *Oecologia*, 1993, 95:179—186.
- [9] Chapin F S, Jefferies R L, Reynolds J F, *et al.* Arctic plant physiological ecology: a challenge for the future. In: Chapin F S, Jefferies R L, Reynolds J F, *et al.* Eds. *Arctic Ecosystems in a Changing Climate: An Ecophysiological Perspective*, San Diego: Academic Press, 1992. 3—8.
- [10] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, 59:143—169.
- [11] Sun L, Qiu F B, Zhang X X, *et al.* Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology*, 2008, 55:415—424.
- [12] Kemp P F, Aller J Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47:167—177.
- [13] Picard C, Ponsonnet C, Pager E, *et al.* Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58:2712—2722.
- [14] Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, *et al.* DNA extraction from soil: old bias for new microbial diversity analysis method. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 2354—2359.
- [15] Qiu X, Wu L, Huang H, *et al.* Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67:880—887.

参考文献:

- [1] 邱国庆, 程国栋. 中国的多年冻土——过去和现在. *第四纪研究*, 1995, (1): 13~22.
- [2] 刘光琇, 马晓军, 陈拓, 等. 冻土微生物研究进展与意义. *冰川冻土*, 2004, 26(2):188~191.
- [3] 张于光, 王慧敏, 李迪强, 等. 三江源地区不同植被土壤固氮微生物的群落结构研究. *微生物学报*, 2005, 45(3): 420~425.
- [5] 东秀珠, 沈德龙, 辛玉华. 16S rDNA 同源性所揭示的双歧杆菌与有关细菌的亲缘关系. *生物多样性*, 2000, 8(2):146~152.