

呼伦贝尔草原不同退化梯度土壤细菌多样性季节变化

李梓正¹, 朱立博^{1,2}, 林叶春¹, 胡跃高^{1,*}, 曾昭海^{1,*}

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193; 2. 内蒙古自治区呼伦贝尔市草原监理局, 内蒙古 海拉尔 021008)

摘要: 为了研究草地退化程度与土壤微生物多样性的关系, 在呼伦贝尔草地上选取羊草草甸草原和贝加尔针茅草甸草原两个典型放牧点, 按照轻度、中度和重度划分取样点, 分别于 6、8 月份和 10 月份 3 个不同季节采集土壤样品。应用变性梯度凝胶电泳技术 (PCR-DGGE) 研究两个放牧地点不同退化程度、不同季节草地的细菌群落结构变化。结果表明, 呼伦贝尔草地不同退化梯度的草地土壤中细菌种类较为丰富。从丰富度和 Shannon-Winner 指数的变化看, 两个放牧点 8 月份丰富度和 Shannon-Winner 指数最高, 8 月份的丰富度平均为 32.4, 比 6 月和 10 月份分别高 11% 和 7.4%; 8 月份 Shannon-Winner 指数平均为 4.15, 比 6 月和 10 月份分别高 7.7% 和 5.4%。DGGE 图谱聚类分析结果显示, 随着季节变化和草地退化程度由轻至重的变化, 土壤中的细菌优势种群没有受到明显的影响。回收 DGGE 图谱中 10 个条带进行测序分析, 结果显示, 所有序列与 GenBank 数据库中的相似度在 87%—100% 之间。基于 98% 的相似度, 可将其中的 7 个鉴定为 *Proteobacteria* (变形菌门), 将其中的 1 个鉴定为 *Actinobacteria* (放线菌门)。另外 2 个同已知序列相似性较低, 可能是未知的细菌。结果表明, *Proteobacteria* (变形菌门) 为呼伦贝尔草原土壤中的优势细菌类群, 尽管所选取样点草地植被有不同程度的退化, 但土壤微生物优势种群并没有发生变化。

关键词: 呼伦贝尔; 草地; 土壤细菌群落; PCR-DGGE

Seasonal variation of soil bacterial community under different degrees of degradation of Hulunbuir grassland

LI Zizheng¹, ZHU Libo^{1,2}, LIN Yechun¹, HU Yuegao^{1,*}, ZENG Zhaohai^{1,*}

1 College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

2 Bureau of Grassland Supervision and Management in Hulunbuir City, Hailaer 021008, China

Abstract: The goal of this study was to detect the links between grassland degradation and bacterial communities in soil. Grasslands under different degrees of degradation (heavily degraded grassland, HDG; moderately degraded grassland, MDG; and light degraded grassland, LDG) were selected from the *Leymus Chinensis* and *Stipa baicalensis* Meadow Steppe of Hulunbuir. Soil samples of each location were collected in June, August, and October respectively. Bacterial communities were characterized by analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes using the fingerprinting method of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The results showed that the soil of Hulunbuir grasslands were rich with different bacterial species. Based on the PCR-DGGE banding patterns, Shannon Weaver diversity indices and species Richness were calculated. The average calculated species Richness values were 11% and 7.4% greater in August (32.4) than in June and October respectively. Similarly, August samples had the greatest Shannon-Weaver diversity index (4.15); 7.7% and 5.4% greater than in June and October respectively. Cluster analysis of DGGE profiles indicated that different seasons and degradation gradients had no significant impacts on dominant soil bacterial community structure. Ten bands were excised from the DGGE gel and re-amplified for 16S rRNA sequencing. The partial 16S rRNA sequences have 87%—100% similarity compared against those available in the NCBI database. Based on the sequencing results, seven bands can be identified as related to *Proteobacteria* (98%—100%), one close to *Actinobacteria* (99%), the other two are unknown

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671222; 30400310); 国家“十一五”科技支撑计划资助项目 (2007BAD89B01; 2006BAD15B02); 2008 年公益性行业 (农业) 科研专项资助项目 (200803028)

收稿日期: 2009-04-09; **修订日期:** 2010-01-20

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zengzhaohai@cau.edu.cn; huyuegao@cau.edu.cn

bacteria. These results provide evidence that although the grassland vegetation is degrading, the domain bacterial communities in the grassland soil has not changed.

Key Words: Hulunbuir; grassland; soil bacterial community; PCR-DGGE

近年来,人口的不断增长和经济的迅速发展,使草地的载畜量急速上升,再加上掠夺式的放牧利用和低水平管理,以及气候变化等自然因素的干扰,造成了大面积天然草地的退化。草地退化已经成为制约我国草地畜牧业持续发展及生态环境改善的重要因素之一。

呼伦贝尔草原位于内蒙古自治区东北部,北纬 $47^{\circ}05'—53^{\circ}04'$,东经 $115^{\circ}31'—126^{\circ}04'$,土地面积 250557 km^2 ,草地总面积 993 万 hm^2 ,是我国保存较好的半干旱地区草原^[1]。长期以来,由于人为活动等影响,部分典型草原发生大面积沙化,形成连续的流动沙丘带,给当地的畜牧业生产和人民生活造成巨大威胁,严重阻碍了当地社会经济可持续发展^[2]。前人从生态系统角度^[3]、土壤角度^[4]及物质能量循环的角度^[5]对草地退化指标进行了分析。

土壤作为草地生态系统的基础环境,其稳定性是支撑草地生产稳定和恢复的重要因素。草地土壤生物是草地生态系统的重要组成部分,在草地生态系统物质循环和能量流动过程中起主导作用。土壤微生物的生物化学活性影响着土壤肥力,进而影响草地植物生长发育与土壤健康状况^[6]。同时,土壤微生物受土壤环境和生物多样性的影响,并随草地健康状况变化而改变,揭示和指示着草地生态系统现状和发展趋势。

土壤细菌多样性及其在生态系统中的作用的研究越来越受到重视,但传统的平板培养分离方法可分离出的细菌种类只占土壤中细菌种类总数的 $0.1\%—1\%$ ^[7]。PCR-DGGE 技术可以检测到土壤中大量不可培养的细菌,比传统的基于培养的方法在代表性上具有巨大优势,在细菌群落多样性研究中越来越得到广泛应用。国内已有较多针对不同退化程度以及不同季节条件下的草原微生物群落变化的研究,但多应用传统的培养方法,尚少见采用分子生物学手段进行的上述方面研究^[8-10]。本文采用 PCR-DGGE 技术研究呼伦贝尔草原不同退化梯度及不同季节的草地土壤细菌群落结构,并对土壤中的主要细菌种群进行测序分析,旨在从微生物的角度了解退化草地的土壤健康状况,为促进草地的稳定和可持续发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集

呼伦贝尔草地位于内蒙古高原东部,为半湿润气候,年降水量 $350—450 \text{ mm}$, $\geq 0^{\circ}\text{C}$ 年积温 2300°C 。土壤为黑钙土和暗栗钙土,植被以中旱生植物为主体。本项研究地点选在内蒙古自治区呼伦贝尔市海拉尔行政区域内的谢尔塔拉种牛场,该场位于北纬 $49^{\circ}11'—49^{\circ}31'$ 、东经 $119^{\circ}47'—120^{\circ}18'$,试验点分别设在该场的第 6 生产队和第 11 生产队。这两个放牧场均位于居民点到打草场之间的区域,6 队试验样地是典型的羊草草甸草原(AM)、11 队是典型的贝加尔针茅草甸草原(SM)。

放牧牲畜主要是牛,全年自由放牧,草地存在不同程度退化。样地内放牧强度不同,越靠近居民点的地区受到的放牧干扰越大,即随着放牧强度的增大,整个样地形成退化系列。根据李博退化草地分级方法,考虑放牧半径、放牧频率及植被和土壤状况,将退化系列划分为轻度退化区(LDG)、中度退化区(MDG)和重度退化区(HDG) 3 个退化梯度^[3]。

AM 划定:放牧半径在 1.2 km 范围以内的区域为 HDG 区,向外延伸半径在 0.7 km 范围内为 MDG 区,再向外延伸半径在 0.6 km 范围内为 LDG 区。

SM 划定:放牧半径在 1 km 以内为 HDG 区,向外延伸半径在 1.2 km 之内为 MDG 区,再向外延伸半径在 0.8 km 范围内为 LDG 区。

在每个退化梯度内随机选取 3 个样点,用土钻在每个点取 $0—10 \text{ cm}$ 土层的土壤样品约 300 g ,用封口塑料袋密封,并于当天带到实验室放于冰箱中在 4°C 下保存备用。取样时间分别为 2007 年 6 月、8 月和 10 月。

1.2 土壤细菌总 DNA 提取和纯化

土壤总 DNA 提取采用改进的 Zhou 等^[11]的方法,最后用 500 μ L 无菌水溶解 DNA 沉淀,得到 DNA 粗提样品。使用天根公司的普通 DNA 产物纯化试剂盒纯化粗提的 DNA,在 0.8% 的琼脂糖凝胶中对提取的 DNA 进行电泳检测。

1.3 细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增

引物使用细菌 V3 区域通用引物对 V357FGC (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 V517R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')。

PCR 反应体系为 50 μ L:10 \times PCR buffer (含 Mg^{2+}) 5 μ L; dNTP4 μ L (各 2.5 mmol \cdot L⁻¹),上游引物 1 μ L,下游引物 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 5U,模版 1 μ L (10 ng/ μ L),加超纯水至 50 μ L。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 30 次循环:变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 59 $^{\circ}$ C 1 min, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min 10 s,最后 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min。扩增后的 PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 PCR 产物 DGGE 图像处理与分析

DGGE 参照王小芬等^[12]的方法。DGGE 分析应用 Bio-Rad DCode Universal Mutation System DGGE 电泳系统。DGGE 采用变性剂和聚丙烯酰胺双梯度凝胶,变性梯度为 25%—60% (100% 变性相当于 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺),聚丙烯酰胺浓度为 6%—12%。在 61 $^{\circ}$ C, 0.5 \times TAE, 200V 条件下电泳 5 h,电泳胶片用 SYBR GREEN 1 染料(1:10 000 稀释)染色 30 min。用 Alpha Innotech Chemilum 5500 CCD 成像系统拍照,并用图形分析软件(Quantity One 4.2.3, Bio-Rad)对凝胶图像进行分析。使用 Shannon-Winner 指数(H)和丰富度(S)评价土壤细菌群落多样性。其计算公式为:

$$H = - \sum_{i=1}^S (p_i) (\log_2 p_i)$$

式中, S 为某一泳道的条带总数, p_i 为泳道中某一条带的强度同泳道中所有条带强度的比值。

1.5 DGGE 条带切胶测序分析

切胶测序参照王小芬等^[12]的方法,最后将回收的 DNA 片段使用 V357f (无 GC 钳) 和 V517r 引物扩增,扩增产物送交三博远志公司测序。将测序结果在 GenBank 数据库中进行比对分析,找出相似序列,使用 MEGA3.1 软件绘制系统进化树。

2 结果分析

2.1 DGGE 图谱分析

土壤中细菌样品的 16S rDNA 扩增片段通过 DGGE 被分为若干条带(图 1),条带的数量代表土壤中的细菌种群数量,条带的亮暗反映细菌数量的多少。从图中可以看出,土壤中细菌种类十分丰富,各处理有较高的一致性,同时也存在一定的差异。编号为 B4、B11、B5、B6、B8、B10 的条带在不同退化梯度及不同时期处理中始终存在且亮度较高,是土壤中的优势种群。

2.2 土壤细菌群落多样性指数

使用 Bio-Rad 公司 Quantity One 图像分析软件分析 DGGE 电泳图片,检测每个泳道的条带数目,并分析每个条带的强度,计算出每个土样的多样性指数(表 1)。

在所有处理中,Shannon-Winner 指数最高为 2007 年 8 月 11 队轻度退化的 4.30,最低为 2007 年 10 月 6 队中度退化的 3.54。2007 年 7 月各处理 Shannon-

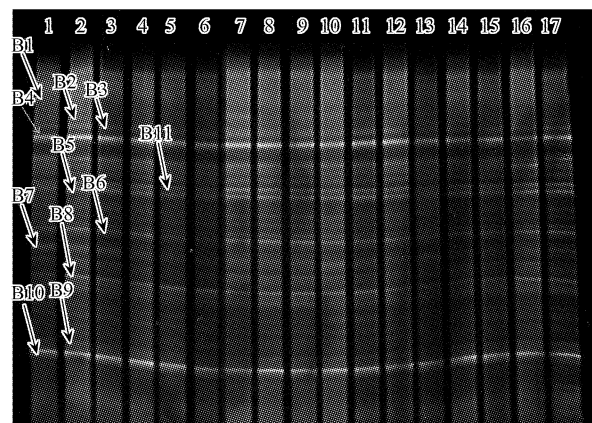


图 1 16S rDNA 扩增片段的 DGGE 图谱

Fig. 1 DGGE profiles of the PCR products

1—3:6 队 2007 年 6 月 轻、中、重度退化;4—6:11 队 2007 年 6 月 轻、中、重度退化;7,8:6 队 2007 年 8 月 轻、重度退化;9—11:11 队 2007 年 8 月 轻、中、重度退化;12—14:6 队 2007 年 10 月 轻、中、重度退化;15—17:11 队 2007 年 10 月 轻、中、重度退化

Winner 指数平均为 3.85, 8 月为 4.15, 10 月为 3.93。与丰富度结果相类似, 8 月平均 Shannon-Winner 指数最高, 分别比 6 月和 10 月高 7.7% 和 5.4%。

2.3 细菌群落相似性分析

使用 Bio-Rad 公司 Quantity One 图像分析软件绘制了不同土壤之间的遗传簇关系(图 2)。该图通过各泳道所代表遗传簇的异同, 表示各样品的基因多样性及亲缘关系。聚类分析(UPGMA)表明, 总体来说, 各处理的相似性较大, 其中 8 与 17, 12 与 7, 13 与 1, 6 与 5, 11 与 3 分别属于同一簇, 说明其相互之间的相似性较高。14 和 16 各自属于一簇, 说明与其它各处理差异较大。但是, 没有发现明显的同一时期或同一取样地点归于一簇, 说明同一时期的样品或同一取样地点的样品之间的差异大于不同时期或不同取样地点的样品之间的差异。表明不同时期或不同退化程度对于土壤细菌群落结构没有明显的影响。

2.4 DGGE 条带的测序分析

将 PCR 产物用 DGGE 分离后, 将优势条带切胶分离并测序, 共分离到 B1—B10(图 1)10 个条带, 测序结果在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对(表 2), 结果显示, 所有序列与 GenBank 数据库中的相似度在 87%—100% 之间。其中 B4、B5 和 B10 分别同 *Acinetobacter* sp. Y3A、*Acinetobacter* HTYC22、*Ochrobactrum* sp. BA-1-3 100% 相似。B9 与 GenBank 中序列最多只有 87% 的相似性。基于 98% 的相似度, 可将 B1、B3、B4、B5、B6、B8、B10 鉴定为 *Proteobacteria* (变形菌门), 将 B7 鉴定为 *Actinobacteria* (放线菌门)。B2 与 B9 同已知序列相似性较低, 可能是未知的细菌。

将 DGGE 切胶分离片段序列与 GenBank 中相似序列进行系统进化分析(图 3), 结果显示, *Proteobacteria* (变形菌门) 为土壤中的优势类群, 占 10 个条带中的 7 个, 其中有 4 个条带属于 γ -*Proteobacteria* (γ -变形菌纲), 2 个条带属于 α -*Proteobacteria* (α -变形菌纲), 1 个条带属于 β -*Proteobacteria* (β -变形菌纲)。其余 3 个条带中, 有一个属于 *Actinobacteria* (放线菌门), 另两个条带同已知序列相似度较低, 无法进行鉴定。

3 讨论

对不同时期的土壤细菌群落多样性指数进行对比, 结果表明, 各个时期的平均丰富度和 Shannon-Winner 指数的排序依次为: 2007 年 8 月 > 2007 年 10 月 > 2007 年 6 月。陈珊等^[9]对东北羊草草原土壤微生物的研究也显示土壤微生物生物量随季节变化明显, 8 月为最高

表 1 土壤细菌群落多样性指数

Table 1 Soil bacterium community diversity index

取样日期及地点 Date and place of sampling	退化程度 Degradation degree	丰富度 Richness	Shannon- Winner 指数 Shannon- Winner index
2007 年 6 月 6 队 Jun 2007 Team 6	轻度退化(LDG)	30	3.8
	中度退化(MDG)	28	4.06
	重度退化(HDG)	31	3.9
2007 年 6 月 11 队 Jun 2007 Team 11	轻度退化(LDG)	29	3.79
	中度退化(MDG)	30	3.84
	重度退化(HDG)	27	3.7
2007 年 8 月 6 队 Aug 2007 Team 6	轻度退化(LDG)	30	4.13
	重度退化(HDG)	32	4.09
2007 年 8 月 11 队 Aug 2007 Team 11	轻度退化(LDG)	35	4.30
	中度退化(MDG)	32	4.23
	重度退化(HDG)	33	3.97
2007 年 10 月 6 队 Oct 2007 Team 6	轻度退化(LDG)	31	4.08
	中度退化(MDG)	28	3.54
	重度退化(HDG)	30	3.83
2007 年 10 月 11 队 Oct 2007 Team 11	轻度退化(LDG)	28	3.72
	中度退化(MDG)	33	4.29
	重度退化(HDG)	31	4.14

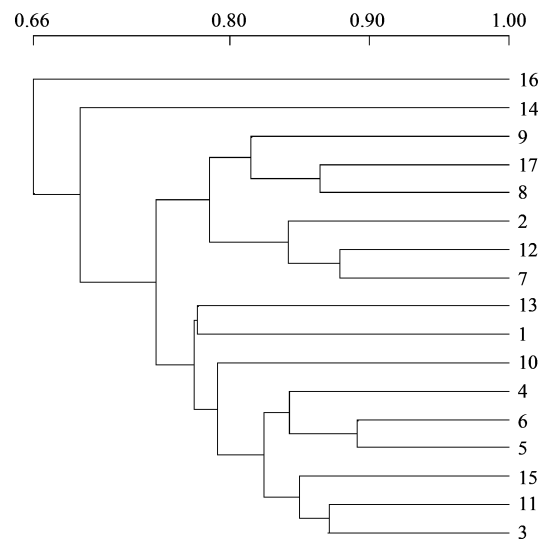


图 2 DGGE 图谱聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of DGGE banding patterns

1—3: 6 队 2007 年 6 月 轻、中、重度退化; 4—6: 11 队 2007 年 6 月 轻、中、重度退化; 7, 8: 6 队 2007 年 8 月 轻、重度退化; 9—11: 11 队 2007 年 8 月 轻、中、重度退化; 12—14: 6 队 2007 年 10 月 轻、中、重度退化; 15—17: 11 队 2007 年 10 月 轻、中、重度退化

峰。说明季节变化对土壤微生物的多样性和生物量都有一定影响。造成此现象的原因一方面是土壤生态环境的温度、水分等因素随着季节变更而变化,另一方面不同季节植物的生长情况和根系分泌物数量与种类也有所变化,这些都是影响土壤微生物的重要因素。

根据 PCR 产物在 DGGE 图谱上的条带数量、迁移距离以及条带亮度可以看出,供试土壤的细菌种类较为丰富,不同时期、不同退化程度以及不同取样地点的草原土壤微生物群落结构相似性较高,但也存在着一定差异。土壤样品的 DGGE 图谱中有几条带亮度较高且一直存在,说明随着时间变化和草地退化程度的变化,土壤中的优势种群没有受到明显的影响。DGGE 指纹图谱的聚类分析显示,同一取样时间或同一退化程度的土壤土样没有明显地归于一簇,表明取样时间或退化程度并不是土壤细菌群落结构最显著的影响因素。对 DGGE 条带切胶回收并测序分析,结合 DGGE 图谱,可以看出土壤中最优势类群为 *Proteobacteria* (变形菌门),这同 McCaig A E^[13] 对英国草原土壤微生物群落结构的研究结果相符,但与周小奇等^[14] 对内蒙

表 2 16SrDNA DGGE 片断测序分析结果

Table 2 Sequencing results of 16S rDNA DGGE fragment

16S rDNA 片断 16S rDNA fragments	最高相似度 The highest identity/%	具有最高相似性的菌株 Bacteria with the highest identity
B1	99	<i>Chelatococcus</i> sp. TKE5A
B2	96	<i>Staphylococcus</i> sp. WS08A_H10
B3	99	<i>Herbaspirillum</i> sp. AV_8R-S-G10
B4	100	<i>Acinetobacter</i> sp. Y3A
B5	100	<i>Acinetobacter</i> HTYC22
B6	98	<i>Acinetobacter</i> sp. 11.5.051CS9
B7	99	<i>Actinobacteria</i> GASP-KC3W3_G11
B8	98	<i>Proteobacteria</i> IMCC1704
B9	87	Uncultured bacterium
B10	100	<i>Ochrobactrum</i> sp. BA-1-3

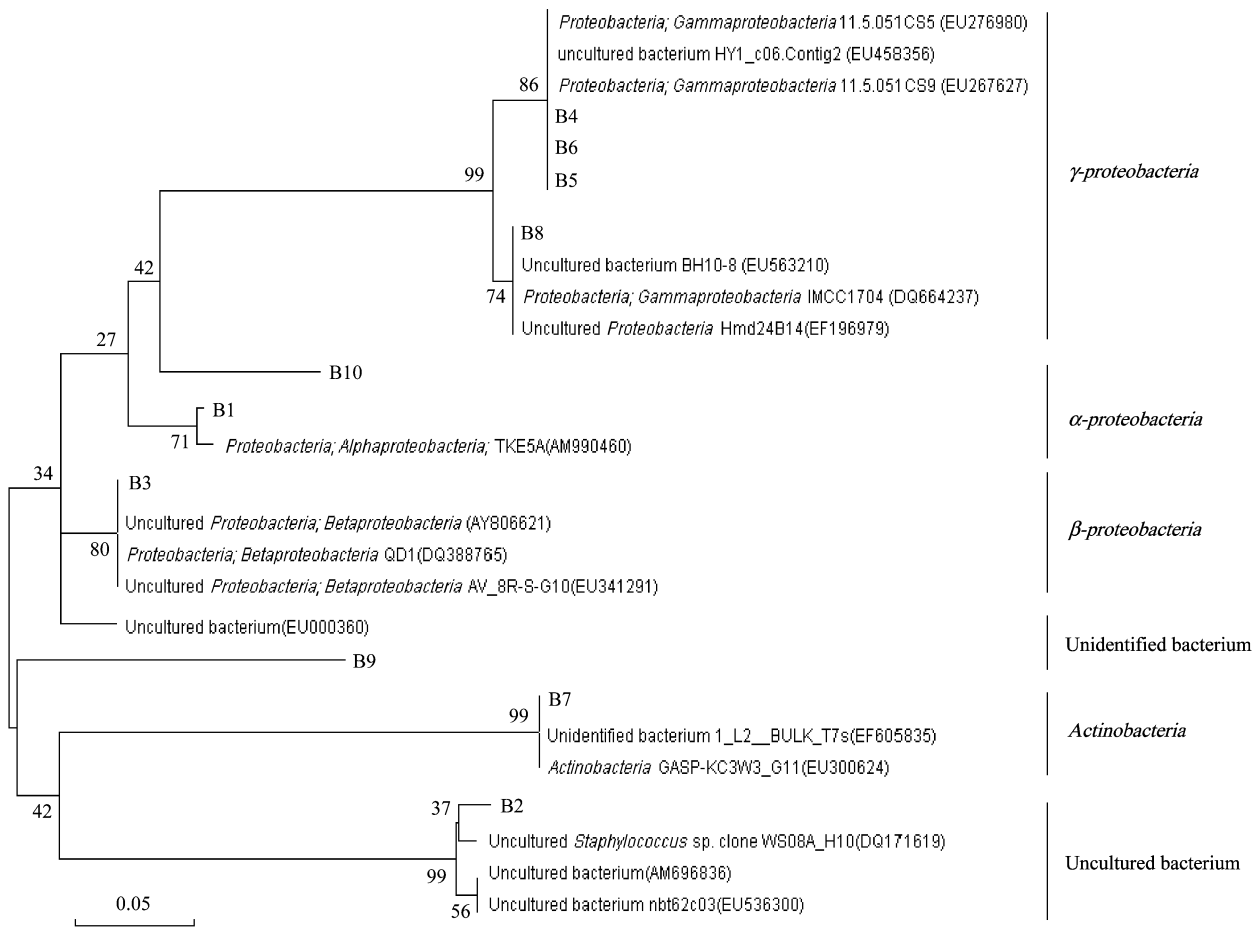


图 3 16S rDNA 序列的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic relationships of 16S rDNA sequences

古草原土壤微生物群落的研究结果并不一致,说明不同土壤中的微生物的组成结构有较大差异。

应用传统方法研究退化草原土壤微生物数量和微生物生物量的结果表明草地不同退化梯度对土壤微生物数量和生物量有显著影响^[8, 10, 15]。地上部分植物的生长情况不同会导致其根系分泌和凋落物也不同,这些因素对土壤中微生物的生长和代谢有重要影响,从而影响土壤微生物数量和生物量。McCaig A E^[16]和 Nunan N^[17]使用 PCR-DGGE 技术对不同改良程度的草原土壤以及不同草原植被的土壤细菌群落结构开展研究,结果显示草原土壤细菌群落没有显著变化,这与本文的研究结果一致。草原土壤微生物受到多方面因素的影响,各因素的影响强度也不同。上述采用传统方法和分子生物学方法的研究表明,草原的退化程度对于微生物群落的影响主要在于微生物量的变化,对于微生物群落结构的影响并不明显,说明草原的退化对土壤微生物量的影响强度高于对土壤微生物群落结构,或本研究中草原的退化程度未达到引起土壤微生物群落结构显著变化的阈值。

土壤中只有 0.1% 的微生物可以被培养,PCR-DGGE 技术可以检测到土壤中的不可培养细菌,相比传统的培养方法,PCR-DGGE 技术具有更好的代表性。但 PCR-DGGE 在研究土壤微生物群落方面还有一定的不足,Muyzer^[7]的研究表明,只有占土壤微生物总量大于 1% 的种群才能被 DGGE 检测到。土壤 DNA 的提取、PCR 扩增以及 DGGE 制胶和电泳过程的偏差都会对最终结果造成一定影响。尽管如此,PCR-DGGE 仍不失为一种快速、有效的检测土壤微生物群落结构的方法。

References:

- [1] Pan X Q. China Hulunbair grassland. Changchun: Jilin Technology Publishing Company, 1992:1-2.
- [2] Han G, Zhang G F. Comprehensive rehabilitational regionalization of sandy desertified lands in Hulunbair steppe. Journal of Desert Research, 2000, 20(1): 25-29.
- [3] Li B. The range land degradation in North China and its prevention strategy. Scientia Agricultura Sinica, 1997, 30(6): 1-9.
- [4] Li S L, Chen Y J, Guan S Y, Kang S A. Relationships between soil degradation and rangeland degradation. Journal of Arid Land Resources and Environment. 2002, 16(1): 92-95.
- [5] Li X Z, Chen Z Z. Influences of stocking rates on C,N,P contents in plant-soil system. Acta Agresita Sinica, 1998, 6(2): 90-97.
- [6] Zhao J, Liao Y N, Zhang G Z, Shao Y Q. Soil microbial ecology on the grassland ecosystem. Grassland of China, 1999, (3): 57-67.
- [7] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59 (3): 695-700.
- [8] Shao Y Q, Zhao J, Yang J. Distribution characteristics of soil microbial numbers in recovered grassland and degenerated grassland. Journal of Desert Research, 2004, 24(2): 223-226.
- [9] Chen S, Zhang C Z. Seasonal variation in the biomass of soil decomposer microbes and its relationship to the soil habitat in the *Leymus chinensis* grasslands in Northeast China. Acta Ecologica Sinica, 1995, 15(1): 91-94.
- [10] Cai X B, Zhou J, Qian C. Variation of soil microbial activities in alpine steppes different in degradation intensity in the North Tibet Plateau. Acta Pedologica Sinica, 2008, 45(6): 1110-1118.
- [11] Zhou J Z, Mary A B, James M T. DNA recovery from soils of diverse composition. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62 (2): 316-322.
- [12] Wang X F, Wang W D, Gao L J, Cui Z J. Protocols of application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in studies of environmental microorganism. Journal of China Agricultural University, 2006, 11(5): 1-7.
- [13] McCaig A E, Glover L A, Prosser J I. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(4): 1721-1730.
- [14] Zhou X Q, Wang Y F, Cai Y, Huang X Z, Hao Y B, Tian J Q, Chai T Y. PCR-DGGE detection bacterial community structure in the Inner Mongolia steppe with two different DNA extraction methods. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(5): 1684-1689.
- [15] Song J F, Han G D, Zhang G, Wu C Y. The effects of grazing intensity on soil microorganisms and soil microbial biomass in meadow steppe. Journal of Inner Mongolia Normal University (Natural Science Edition), 2008, 37(02): 237-240.
- [16] McCaig A E, Glover L A, Prosser J I. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(10): 4554-4559.

- [17] Nunan N, Daniell T J, Singh B K, Papert A, McNicol J W, Daniell T, and Prosser J I. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 6784-6792.

参考文献:

- [1] 潘学清. 中国呼伦贝尔草地. 长春: 吉林科学技术出版社, 1992: 1-2.
- [2] 韩广, 张桂芳. 呼伦贝尔草原沙漠化土地的综合整治区划. *中国沙漠*, 2000, 20(1): 25-29.
- [3] 李博. 中国北方草地退化及其防治对策. *中国农业科学*, 1997, 30(6): 1-9.
- [4] 李绍良, 陈有君, 关世英, 康师安. 土壤退化与草地退化关系的研究. *干旱区资源与环境*, 2002, 16(1): 92-95.
- [5] 李香真, 陈佐忠. 不同放牧率对草原植物与土壤 C、N、P 含量的影响. *草地学报*, 1998, 6(2): 90-97.
- [6] 赵吉, 廖仰南, 张桂枝, 邵玉琴. 草原生态系统的土壤微生物生态. *中国草地*, 1999, (3): 57-67.
- [8] 邵玉琴, 赵吉, 杨劫. 恢复草地和退化草地土壤微生物类群数量的分布特征. *中国沙漠*, 2004, 24(2): 223-226.
- [9] 陈珊, 张常钟. 东北羊草草原土壤微生物生物量的季节变化及其土壤生境的关系. *生态学报*, 1995, 15(1): 91-94.
- [10] 蔡晓布, 周进, 钱成. 不同退化程度高寒草原土壤微生物活性变化特征研究. *土壤学报*, 2008, 45(6): 1110-1118.
- [12] 王小芬, 王伟东, 高丽娟, 崔宗均. 变性梯度凝胶电泳在环境微生物研究中的应用详解. *中国农业大学学报*, 2006, 11(5): 1-7.
- [14] 周小奇, 王艳芬, 蔡莹, 黄祥忠, 郝彦宾, 田建卿, 柴团耀. 内蒙古典型草原细菌群落结构的 PCR-DGGE 检测. *生态学报*, 2007, 27(5): 1684-1689.
- [15] 宋俊峰, 韩国栋, 张功, 武春燕. 放牧强度对草甸草原土壤微生物数量和微生物生物量的影响. *内蒙古师范大学学报(自然科学汉文版)*, 2008, 37(02): 237-240.