

结合宏基因组末端随机测序和 16S rDNA 技术分析 温室黄瓜根围土壤细菌多样性

赵志祥^{1,2}, 罗 坤¹, 陈国华², 杨宇红², 茆振川², 刘二明^{1,*}, 谢丙炎^{2,*}

(1. 湖南农业大学生物安全科技学院, 长沙 410128; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 土壤细菌在温室土壤环境中具有十分重要的生态功能, 与温室作物以及微生物内部存在互作关系。研究土壤细菌的群落结构组成, 有助于了解土地利用变化与生态环境效应之间的关系。结合 16S rRNA 基因克隆文库和宏基因组末端测序对温室黄瓜根围土壤细菌的多样性进行了分析。在 16S 文库中, 根据 97% 的序列相似性水平划分 OTU, 共有 35 个 OTU, 其中优势菌群是 γ -Proteobacteria, 其次为 Firmicutes, *Bacillus* 为优势细菌。在纲分类水平上, 16S 文库和宏基因组末端测序结果均包含 γ -Proteobacteria、 α -Proteobacteria、 δ -Proteobacteria、 β -Proteobacteria、Actinomycetales 和 Firmicutes, 各纲比例有差别; 在优势种群属水平上, 末端测序的结果包含的属多于 16S 文库 (40 > 35); 在优势细菌种类上, 两者反映的结果一致, 均为 *Bacillus*。但是, 宏基因组末端测序包含了大多数的弱势种群, 更能反映细菌多样性的真实水平。与露地土壤细菌 16S 文库相比较, 土壤细菌多样性降低, 这可能与温室多年连作, 种植蔬菜种类单一直接相关。

关键词: 土壤细菌多样性; 末端测序; 16S rRNA 基因克隆文库; 宏基因组文库

Analysis of bacterial diversity in rhizosphere of cucumber in greenhouse by the methods of metagenomic end-random sequencing and 16S rDNA technology

ZHAO Zhixiang^{1,2}, LUO Kun¹, CHEN Guohua², YANG Yuhong², MAO Zhenchuan², LIU Erming^{1,*}, XIE Bingyan^{2,*}

1 College of Biosafety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, 410128, China

2 Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing, 100081, China

Abstract: Soil bacteria play an important ecological role in the ecosystem of soil in greenhouse and in the exchange of energy and substance, and have a significant inter- or intra interaction between bacterial community and greenhouse crops. Understanding of the composition of soil bacterial communities is benefit to reveal the relationship between the change of land use and the effects of environment. In this study, total microbial genomic DNA from soil was extracted and purified by density gradient centrifugation, and 16S rRNA gene was amplified using universal primer, 27F and 1492R, and the product of PCR was recycled, ligated, transformed and screened using blue-white selection, and then was constructed 16S rRNA gene clone library. Partial total DNA from soil was treated with end repairing, ligated to Fosmid vector, PCC2FOS, packed using lambda packaging extracts, transfected with *E. coli* EPI300, and then was constructed metagenomic Fosmid library. The result showed that the 16S rRNA gene clone library was dominated by bacteria belonged to γ -Proteobacteria, which followed by Firmicutes, especially *Bacillus*, which constituted 32.2% of 16S rRNA gene clone library. The groups including α -Proteobacteria, δ -Proteobacteria and Actinomycetales were minority in the 16S rRNA gene clone library. In addition, 35 OTUs were obtained from the 16S rRNA gene clone library according to sequences similarity of 97%. From the result of end sequencing from metagenomic library, γ -Proteobacteria and Firmicutes were also dominant groups, which

基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目 (2009CB119000); 公益性行业 (农业) 科研专项经费资助项目 (3-25, nyhyzx07-050); 国家“十一五”科技支撑计划资助项目 (2006BAD07B03, 2006BAD08A08, 2006BAD17B08)

收稿日期: 2010-01-29; 修订日期: 2010-04-14

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xiebingyan2003@yahoo.com.cn

constituted 26.1% and 19.8%, respectively. At the level of class, the results from 16S rRNA gene clone library and metagenomic library were also included γ -Proteobacteria, α -Proteobacteria, δ -Proteobacteria, β -Proteobacteria, Actinomycetales and Firmicutes, but the proportions of each class were various, especially Actinomycetales, which contained 2 clones from 16S rRNA gene clone library and constituted 0.7%, but contained 26 clones from metagenomic library and constituted 8.7%. In terms of predominant genus, the numbers of genus from end sequencing were higher than that of 16S rRNA gene clone library (40 > 35). In term of dominant bacteria, the two methods both showed that *Bacillus* was predominant group. However, the result from end sequencing of clone from metagenome contained some minority of bacterial groups, which were not revealed by 16S rRNA gene clone library, such as Gemmatimonadetes, Chloroflexi, CFB group bacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia and Cyanobacteria. This discrepancy maybe reflected the substantial difference in two methods and probably results from the defects of 16S rRNA gene method, including PCR bias, chimeric gene, heteroduplex and mutation and so on. Comparing of bacterial community of the exposed soil, the bacterial diversity of soil in greenhouse was relatively low. This phenomenon was possibly directly caused by continuous cropping and single cropping.

Key Words: soil bacterial diversity; end-random sequencing; 16S rRNA gene library; metagenomic library

土壤是地球上最大的细菌遗传资源库,它的理化性质、团聚体的形成以及土壤中污染物的降解等与细菌群体结构,群体之间的相互作用,活动和稳定性密切相关^[1]。土壤细菌对土壤中的营养循环,有机质的分解和土壤肥力起着很重要的作用^[2],是整个地球生态系统的重要组成部分^[3]。研究土壤中的微生物群体有助于我们了解环境可变性对细菌多样性,组成和丰度的影响。

近年来,伴随着人们对反季节蔬菜需求的不断扩大,温室种植面积逐年增加,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。同时,多年来土地利用类型和结构不断变化,尤其是粮食生产面积的减少和温室种植面积的增加,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。

自然环境中,99% 以上的微生物不可用实验室纯培养的方法获得^[4],成为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。随着分子生物学技术在微生物生态学研究中的应用,微生物多样性的研究有了新的突破。进入 20 世纪 90 年代末,随着宏基因组技术的发展,基于宏基因组文库的分析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^[5]。

因此,本试验采用 16S rRNA 基因克隆文库和宏基因组 Fosmid 文库末端随机测序两种方法,比较了两者在反应温室黄瓜根围土壤细菌多样性和丰度之间的差异,分析了温室黄瓜根围土壤细菌群落结构组成情况,旨在了解温室黄瓜根围土壤细菌的多样性以及为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 材料与方法

1.1 材料

土样于 2008 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黄瓜种植地。种植黄瓜年限 10 a 以上。采样地选择 10 个种植黄瓜的地块。采用五点采样法,用土壤采样器采集 5 个黄瓜根围土壤样品(采集直径 10 cm,采集深度 0—15 cm),混合后用密封袋带回,土样用 10 mesh(2 mm)筛网过筛,去除小颗粒的石头和残存的植物根系,存放于 -20℃ 冰箱中。土壤性质见表 1。

1.2 土壤 DNA 的提取

参考 Bertrand 等有所改进^[6]。改进部分:沉淀用 10 mL 0.8% NaCl 重悬后,补上 10 mL 的 PVPP,涡旋混匀,10 000 r/min,4℃ 离心 10 min 后弃上清,重复 3—5 次,至上清呈淡褐色,沉淀用 10 mL 0.8% NaCl 重悬。将 10 mL Nycodenz(Axis-Shield, Oslo, Norway; 8 g Nycodenz 溶于 10 mL 灭菌水)加入悬液底部,11 000 r/min,

4℃ 离心 30 min。小心收集在 Nycodenz-土壤混合颗粒和上层水层分界面上的白色细胞层,重悬后在 10 000 r/min 4℃ 离心 20 min 去除 Nycodenz 溶液。紧接着用蛋白酶 K-溶菌酶-SDS 法提取土壤 DNA,用 100μL TE 溶解,1% 琼脂糖电泳检测,−20℃ 保存。

表 1 温室土壤理化性质
Table 1 The soil sample tested in this study

样品 Sample	pH 值 pH	有机碳 Organic C / (g/kg)	总 N Total N / (g/kg)	有效 N Available N / (mg/kg)	总 P Total P / (g/kg)	有效 P Available P / (mg/kg)	总 K Total K / (g/kg)	有效 K Available K / (mg/kg)
土壤 Soil	7.2	27.5	2.0	25.7	2.4	82.6	25.2	273.7

1.3 细菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增及基因克隆文库构建

以 DNA 为模板,细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) 和 1492R (5′-TACTTGTACGACTT-3′) 进行 PCR 扩增。PCR 扩增所用反应体系及反应条件参考文献^[14]报道的方法。

扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,回收 1500 bp 的片段,连接至 pGEM-T

(Promega, USA) 上,*E. coli* TOP10 转化,涂 LB 板(含 Amp +、IPTG 和 X-Gal),37℃ 过夜培养。挑白斑,37℃,220 rpm,摇动培养 12 h,每克隆菌液取 1μL,用 T7 和 SP6 进行菌液 PCR,筛选阳性克隆,构建基因克隆文库。菌液 PCR 引物,T7: 5′-TAATACGACTCACTATAGGG-3′,SP6:5′-ACGATTTAGGTGACACTATAG-3′。挑取 300 个阳性克隆送诺赛基因测序。

1.4 16S 文库多样性分析

用 Chimera Check 程序将所得 16S rRNA 序列在核糖体数据库(Ribosomal database project,RDP)进行嵌合体检验,去除嵌合体序列。以 97% 为划定阈值,用 DOTUR 软件包划分操作分类单元(OTU)^[7],并构建稀缺性曲线。Shannon-Wiener 指数依据下列公式进行计算^[8]:

$$H = \sum (pi) (\log_2 p - i)$$

式中, pi 代表每个物种样本数量占总样本数量的比例。

$$\text{均匀度}(E) = H/H_{\max}, H_{\max} = \log_2 S$$

丰富度 S 是样本中物种的数量,这里等同 OTU 的数量

$$\text{Good 覆盖度} = [1 - (n/N)] \times 100$$

式中, n 代表单克隆 OTU 的数量, N 代表文库中克隆总数量^[9]。

1.5 构建系统进化树

将每个 OTU 代表序列在 NCBI 进行序列比对,并下载一致性最高的序列作为参比序列构建系统进化树。采用 Mega4.0 软件包^[10],以邻接法构建系统进化树。

1.6 宏基因组 Fosmid 文库构建及特征分析

按照 Epicenter 公司 CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit 的使用说明,构建土壤微生物宏基因组 Fosmid 文库。

通过对宏基因组文库进行插入片段大小、克隆稳定性和插入片段随机性检测,发现构建的文库质量高,适合多样性分析和功能基因筛选等方面的研究工作。

1.7 Fosmid 文库末端测序分析土壤细菌多样性

随机挑取 296 个 Fosmid 克隆,37℃,250 r/min,初摇 12 h,加入 Epicenter 公司生产 Fosmid Inducer,37℃,诱导培养 24 h,使其产生高拷贝后,按照 FosmidMAX™ DNA Purification Kit 使用说明提取质粒 DNA,用 pCC2FOS™ Sequencing Primers 进行单末端测序,正向测序引物为 pCC2FOS™:5′-GTACAACGACACCTAGAC-3′。

将所有的 contigs 在 NCBI 原核数据库进行比对。设定阈值为^[5]: HSP 长度 >150nt,期望值 < e^{-15} ,序列

一致性 > 90%, 将符合阈值的序列进一步分析。将 NCBI 返回的相似度最高值的序列所属种类做为 contig 的分类归属, 并在 NCBI 数据库分类浏览器 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/batchentrez.cgi?db=Taxonomy>) 进行分类地位划分。

1.8 核酸序列登录号

细菌文库中部分克隆尚难确定其分类地位, 可能代表新的属和种。这些序列已在 GenBank 里边登录, 并获得核酸序列登录号。已获得的细菌序列登录号有: GU395088-GU395090, GU394939-GU394947。

2 结果与分析

2.1 16S rRNA 基因克隆文库分析土壤细菌多样性

利用 DOTUR 软件分析, 把序列相似性 $\geq 97\%$ 的定义为同一个 OTU^[11]。这样 292 个细菌序列归属为 35 个 OTU。其中有 22 个 OTU 只有 1 个克隆, 其他的 13 个 OTU 类型有两个或者多个克隆, 其中最多的 5 个 OTU 类型分别含有 56、50、46、42 个克隆和 22 个克隆。同时, 利用 DOTUR 软件生成的数据绘制稀缺性曲线, 稀缺性曲线上升幅度逐渐平缓, 表明文库取样数量趋近饱和 (图 1)。Good 覆盖度为 92.5 (表 2), 能够反应细菌多样性 (表 2)。将每个 OTU 的代表序列在 NCBI 进行 BLAST 分析, 文库克隆代表的细菌大多数属于 γ -Proteobacteria (41.1%)、 α -Proteobacteria (7.5%)、 δ -Proteobacteria (5.8%)、 β -Proteobacteria (4.5%) 和 Firmicutes (39.7%), 其中 γ -Proteobacteria 为优势菌群, 其次为 Firmicutes (图 2), 未发现酸杆菌门 (Acidobacteria), 芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes), 绿弯菌门 (Chloroflexi), 浮霉菌门 (Planctomycetes) 等 4 个菌门的克隆。

在种水平上, 各纲包含细菌种类数量见图 3。 γ -Proteobacteria 包含 12 种细菌: *Enterobacter* sp.、*Klebsiella* sp.、*Citrobacter amalonaticus*、*Aeromonas* sp.、*Pseudomonas* sp.、*Shewanella* sp.、*Aeromonas enteropelogenes*、*Thermoleovorans*、*Staphylococcus* sp.、*Citrobacter koseri*、*Citrobacter amalonaticus* 和 Uncultured bacterium, 其中优势菌为 *Enterobacter* sp. (66 个克隆)。Firmicutes 包含 7 种细菌: *Bacillus cereus*、*Bacillus* sp.、*Planomicrobium* sp.、*Bacillus pumilus*、*Streptococcus sanguinis*、*Geobacillus* sp. 和 Uncultured bacterium clone, 其中优势菌为 *Bacillus* sp. (94 个克隆)。 α -Proteobacteria 包含 6 种细菌: *Rhizobium* sp.、*Rhodopseudomonas palustris*、*Caulobacter crescentus*、*Methylobacterium radiotolerans*、*Agrobacterium* 和 Uncultured bacterium clone, 其中优势菌为 *Agrobacterium* (9 个克隆)。 β -Proteobacteria 包含 2 种细菌: *Burkholderia* sp. 和 *Acidovorax* sp., 其中优势菌为 *Burkholderia* sp. (5 个克隆)。 δ -Proteobacteria 包含 3 种细菌: *Desulfovibrio*、*Geobacter* sp. 和 *Planococcus maritimus*, 其中优势菌为 *Planococcus maritimus* (10 个克隆)。Bacteroidetes 仅包含 1 种细菌: *Flavobacterium* sp. (2 个克隆), Actinomycetales 中 2 个克隆均属于 *Streptomyces* sp.。

另外, 系统进化发育树 (图 3) 上部分参考序列来源于本实验室已经登录的北京露地菜田土壤细菌 16S

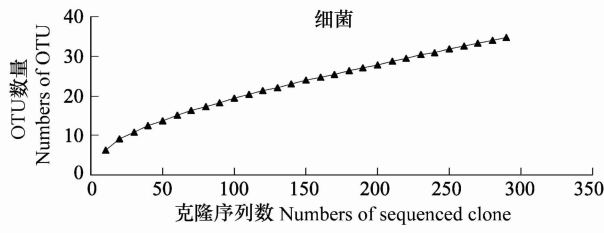


图 1 16S 文库稀缺性曲线

Fig. 1 Rarefaction curves of 16S library

表 2 16S 文库细菌多样性指数

Table 2 Diversity index of 16S rRNA gene library

丰富度 <i>S</i>	物种样本数占总 样本数比例和 <i>H</i>	均匀度 <i>E</i>	Good 覆盖度 Good's Coverage
35	4.748	0.931	92.5

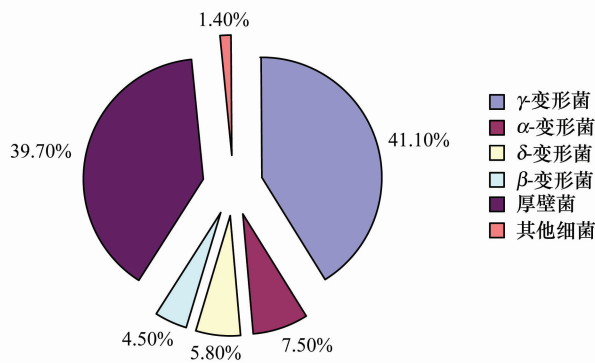


图 2 16S 文库中各纲细菌比例

Fig. 2 Proportions of each class in 16S library

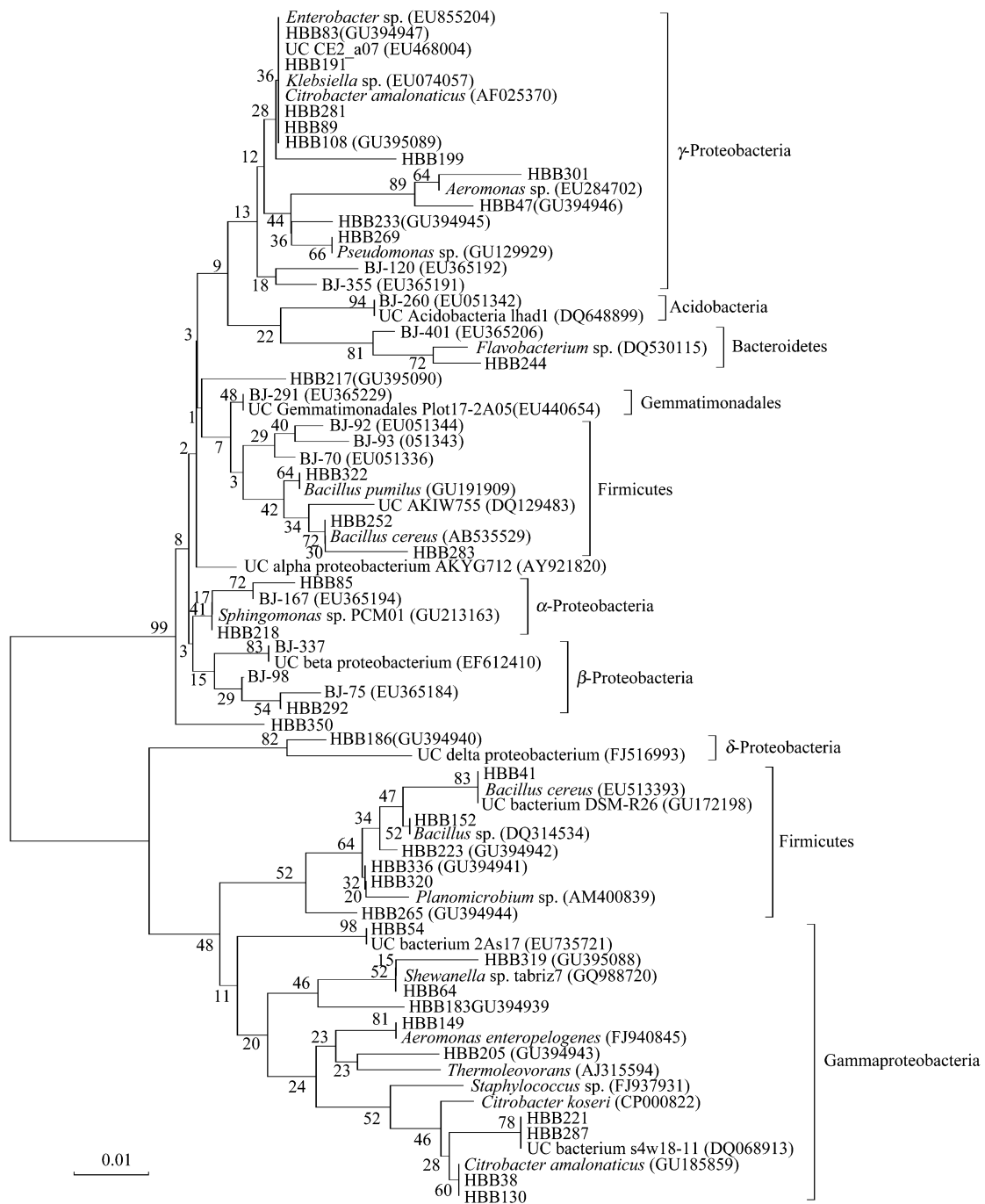


图3 温室土壤细菌 16S rRNA 基因克隆文库系统进化发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on bacterial 16S rRNA sequences of the clones obtained from greenhouse soil samples; UC stand for uncultured clones

UC 代表未培养的细菌克隆,进化树采用 MEGA4.0 软件中的邻近距离法构建,自举数据集 1000 次

rRNA 基因序列,从图中可以看出,属于同一个亚门的两个不同的环境样品细菌物种位于十分靠近的同分支上,说明进化发育关系较近。但是,与露地菜田土壤细菌克隆文库相比较,该文库中 γ -Proteobacteria 和厚壁菌 (Firmicutes) 占绝对优势,且都出现了两个较大的分支,说明同为一个菌门细菌,其亲缘关系并不一定十分靠近,可能是根据其表观特征命名,而忽略了遗传特性。同时,未发现类似于露地菜田土壤克隆文库的芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) 和酸杆菌门 (Acidobacteria) 克隆。

2.2 Fosmid 文库末端随机测序分析土壤细菌多样性

将所有拼接的 contigs 在 NCBI 原核数据库进行 BLAST 比对分析, 296 条序列中有 207 条序列符合设定的阈值, 依照返回比对结果的最高相似种类作为序列的分类归属, 并划分分类地位。所有序列中 γ -Proteobacteria 占 26.1%, α -Proteobacteria 占 15.9%, δ -Proteobacteria 占 4.3%, β -Proteobacteria 占 8.2%, Actinomycetales 占 8.7% 和 Firmicutes 占 19.8% (图 4), 少部分序列属于 Gemmatimonadetes、Chloroflexi、CFB group bacteria、planctomycetes、verrucomicrobia 和 cyanobacteria, 此外, 还有少部分真菌 (ascomycetes)、古菌 (euryarchaeotes 和 crenarchaeotes)、线虫 (nematodes)、病毒 (viruses) 和毛滴虫 (trichomonads) 序列。

在属水平上, 末端测序包含的细菌属于 40 个属 (表 3), Actinomycetales 包含 10 个属, *Streptomyces* 为优势菌属 (5 条序列)。 β -Proteobacteria 包含 7 个属, *Burkholderia* 为优势菌属 (7 条序列)。 γ -Proteobacteria 包含 6 个属, *Pseudomonas* 为优势菌属 (25 条序列)。 δ -Proteobacteria 包含 4 个属, *Desulfovibrio* 为优势菌属 (4 条序列)。 α -Proteobacteria 包含 10 个属, *Nitrobacter* 为优势菌属 (12 条序列)。Firmicutes 包含 3 个属, *Bacillus* 为优势菌属 (39 条序列), 仅有两条序列分别属于 *Geobacillus* sp. 和 *Streptococcus*。

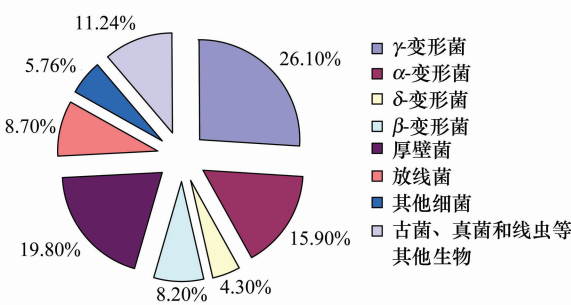


图 4 末端序列分析各纲细菌比例
Fig.4 Proportions of each class in the results of end random sequencing

表 3 各纲中细菌属分布
Table 3 Distribution of genus in each class

纲 Class	属 Genus	OTU 数 No. of OTU	序列数 No. of sequences	纲 Class	属 Genus	OTU 数 No. of OTU	序列数 No. of sequences
Actinomycetales	<i>Streptosporangium</i>	1	2	δ -Proteobacteria	<i>Aeromonas</i>	1	7
	<i>Mycobacterium</i>	1	1		<i>Thioalkalivibrio</i> sp.	1	5
	<i>Saccharopolyspora</i>	1	2		<i>Desulfovibrio</i>	1	4
	<i>Brachybacterium</i>	1	2		<i>Geobacter</i> sp.	1	2
	<i>Streptomyces</i>	1	5		<i>Anaeromyxobacter</i> sp.	1	2
	<i>Rhodococcus</i>	1	1		<i>Haliangium</i>	1	1
Actinomycetales	<i>Corynebacterium</i>	1	1	α -Proteobacteria	<i>Rhodopseudomonas</i>	1	3
	<i>Frankia</i> sp.	1	2		<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1	4
	<i>Rubrobacter</i>	1	1		<i>Caulobacter</i>	1	3
	<i>Acidimicrobium</i>	1	1		<i>Nitrobacter</i>	1	12
	<i>Burkholderia</i>	1	7		<i>Agrobacterium</i>	1	3
β -Proteobacteria	<i>Acidovorax</i> sp.	1	2	Firmicutes	<i>Beijerinckia</i>	1	1
	<i>Bordetella</i>	1	1		<i>Rhodospirillum</i>	1	2
	<i>Chromobacterium</i>	1	1		<i>Methylobacterium</i> sp.	1	1
	<i>Leptothrix</i>	1	2		<i>Xanthobacter</i>	1	3
	<i>Ralstonia</i>	1	3		<i>Paracoccus</i>	1	1
	<i>Variovorax</i>	1	1		<i>Geobacillus</i> sp.	1	1
	<i>Pseudomonas</i>	1	25		<i>Streptococcus</i>	1	1
γ -Proteobacteria	<i>Xanthomonas</i>	1	8		<i>Bacillus</i>	2	39
	<i>Stenotrophomonas</i>	1	5				

2.3 两种方法反映细菌多样性差异

在纲分类水平上, 16S 文库和宏基因组末端测序结果中得到的细菌均包含 γ -Proteobacteria、 α -Proteobacteria、 δ -Proteobacteria、 β -Proteobacteria、Actinomycetales 和 Firmicutes, 但各纲比例有差别 (图 2 和图 4)。16S 文库中, 2 个克隆属 Actinomycetales, 仅占克隆文库的 0.7%, 而在末端测序结果中占 8.7%, 同为

Proteobacteria, 16S 文库中 γ -Proteobacteria 占绝对优势, 而其他 Proteobacteria 所占的比例较少, 在末端测序结果中各 Proteobacteria 亚门所占的比例差异较小, 在 16S 文库中, δ -Proteobacteria 所占的比例大于 β -Proteobacteria ($5.8\% > 4.5\%$), 而在末端测序结果中, δ -Proteobacteria 所占的比例远小于 β -Proteobacteria ($4.3\% < 8.2\%$)。此外, 在 16S 文库中, 未发现酸杆菌门 (Acidobacteria)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、浮霉菌门 (Planctomycetes)、CFB 细菌种群 (CFB group bacteria)、疣微菌纲 (verrucomicrobia)、绿硫细菌 (green sulfur bacteria) 和蓝藻细菌 (cyanobacteria) 等少量细菌种群, 而在末端测序结果中均有发现, 且有 4 个末端序列属于芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes), 2 个属于绿弯菌门 (Chloroflexi)。在纲的水平上, 末端测序的结果反映细菌多样性远大于 16S 文库。

在优势种群属水平上, 末端测序的结果包含的属多于 16S 文库 ($40 > 35$), 并且, 每个纲中属的数目有所差别 (表 4)。在 γ -Proteobacteria 和 Firmicutes 中, 末端测序结果包含的属数目少于 16S 文库。在 α -Proteobacteria、 β -Proteobacteria、 δ -Proteobacteria 和 Actinomycetales 中, 末端测序的结果包含的属数目多于 16S 文库。在 Actinomycetales、 β -Proteobacteria 和 Firmicutes 中, 两种方法得到的优势菌属相同, 分别为 *Streptomyces*、*Burkholderia* 和 *Bacillus* sp., 而在 γ -Proteobacteria 中, 16S 文库优势菌属为 *Enterobacter* sp., 末端测序的结果优势菌属为 *Pseudomonas*; 在 α -Proteobacteria 中, 16S 文库优势菌属为 *Agrobacterium*, 末端测序的结果优势菌属为 *Nitrobacter*; 在 δ -Proteobacteria 中, 16S 文库优势菌属为 *Planococcus maritimus*, 末端测序的结果优势菌属为 *Desulfovibrio*。16S 文库中有个别拟杆菌门 (Bacteroidetes) 细菌 *Flavobacterium* sp., 而末端测序的结果中未发现该类细菌。

表 4 各纲中优势细菌属和各属数目
Table 4 Dominant genus and numbers of genus in each class

纲 Class	优势菌属 Dominant genus		各属数目 Number of genus	
	16S 文库 16S library	末端随机测序 End-random sequencing	16S 文库 16S library	末端随机测序 End-random sequencing
γ -Proteobacteria	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Pseudomonas</i>	12	6
Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	7	3
α -Proteobacteria	<i>Agrobacterium</i>	<i>Nitrobacter</i>	6	10
β -Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	2	7
δ -Proteobacteria	<i>Planococcus maritimus</i>	<i>Desulfovibrio</i>	3	4
Actinomycetales	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	1	—
Bacteroidetes	<i>Flavobacterium</i> sp.	—	1	10

3 讨论

16S 文库和末端测序的结果均表明温室黄瓜根围土壤细菌多样性较高。16S rRNA 文库包含 35 个 OTU, 35 个属, 宏基因组末端序列代表的细菌属有 40 个, 基本上能够涵盖不同类型的该环境样品细菌。在纲分类水平上, 两种方法获得的细菌差异不大, 均属于 γ -Proteobacteria、Firmicutes、 α -Proteobacteria、 β -Proteobacteria 和 δ -Proteobacteria, γ -Proteobacteria 为优势菌群。这和近几年来其他研究人员利用 16SrRNA 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^[12-15], 但在种群丰度上有一定的差异。本研究通过两种不同的方法, 同时对温室黄瓜根围土壤微生物多样性进行了分析, 均发现 Firmicutes 是仅次于 γ -Proteobacteria 的优势均群。这可能与温室长年高温高湿, 高有机质含量, 酸碱度极端 (偏酸或偏碱), 种植单一作物, 作物与环境微生物之间相互作用而形成的微防御体系有关。长期以来, 厚壁菌门芽孢杆菌被作为生防模式菌株得到人们的广泛研究^[16]。但是, 可纯培养的芽孢杆菌极其有限。本研究构建的宏基因组文库, 包含的微生物基因资源丰富, 特别是含有大量的芽孢杆菌, 既有利于从生态学的角度上分析温室黄瓜根围土壤微生物多样性, 又有利于筛选和改造芽孢生防菌株。

研究根围微生物多样性也还有其他分子生物学方法。如分子标记技术和分子检测技术, 分子标记技术包

括限制性片断长度多态 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP)^[17]、随机扩增 DNA 多态性 (Random amplified polymorphism DNA, RAPD)^[18]、扩增核糖体 DNA 限制性分析 (Amplified rDNA restriction analysis, ARDRA)^[14]等;分子检测技术包括变性梯度 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)^[19]、单链构象多态性 (Single strand conformation polymorphism, SSCP)^[20]、温度梯度凝胶电泳 (Temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)^[21]等。但是,所有这些研究方法都是基于 DNA 片段大小的琼脂糖凝胶电泳或者聚丙烯酰胺凝胶电泳分析的,对酶切条带的观察未免会产生一定误差。因此,微生物的多样性水平必然会失真。本研究采用的两种方法都是基于序列分析的基础上的,根据序列相似性水平来进行研究,能够更好地了解细菌群落结构和不同物种间的丰度。

16S 方法存在偏嗜性及扩增异常,出现嵌合基因、异源双链和突变,会影响结果的准确性和真实性。另外,该方法会造成含 16S rRNA 基因拷贝数多的细菌数量偏高,且使得那些由于难以裂解细胞壁而释放 DNA 少的细菌数量偏低,在反映物种丰度上必然会存在一定的误差,尤其是稀有物种的存在与否。但是,16S 文库是根据 97% 的序列相似性水平来划分种属,低于 97%,则可认为是一个新的物种^[14]。因此,在对细菌进行分类鉴定时,利用 16S 方法有助于找到新的物种。在宏基因组文库中,末端测序只能对测得的序列进行门、纲和属的划分,没有固定的划分物种的标准,不能找到新的物种。同时,宏基因组文库中,Fosmid 克隆插入片段较大(≥ 35 kb),如不诱导其产生高拷贝,则很难提取 Fosmid DNA,或者 DNA 的浓度过低,这将直接影响到测序结果的准确性,甚至无结果。虽然其操作繁琐(构库—文库检测—初摇菌—诱导摇菌—提取高浓度的 Fosmid DNA—测序),由于其不经过 PCR 扩增,直接对根围微生物基因组 DNA 进行序列测定,然后,以序列片段的高阈值 BLAST 比对结果来分析其多样性,这样就克服了 16S 方法中 PCR 偏嗜性的缺点,能够较真实地反映根围细菌的多样性水平。

因此,本研究有效地结合 2 种分子方法对温室黄瓜根围土壤细菌多样性进行评价。首先,运用 16S 方法进行系统进化发育和物种丰度分析,找到新的物种;然后,利用宏基因组末端测序,加大测序量,将不能通过 PCR 扩增出来的稀有物种也包含在多样性之中。经分析,末端测序结果中有 26 条链霉菌属 (*Streptomyces*) 序列,属于丰度较高的细菌,但 16S 文库仅发现 2 条 16S 序列属于该属,这可能是该属细菌 16S rRNA 区域对 27F 和 1492R 引物特异性较低造成的。较之于 16S 文库,宏基因组末端测序反映的结果更客观。但是,16S 方法也有一定的优势:操作简便可行,且能寻找新的物种。因而,在对细菌进行分类鉴定时,宏基因组末端测序和 16S 文库互有优势,互有缺点。在其多样性评价方面,只有两者有机结合起来才能更好地反应环境样品细菌多样性和丰度的真实水平。

与露地菜田土壤细菌 16S rRNA 基因克隆文库^[14]相比较,两种方法获得的细菌多样性明显降低,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^[22],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^[23]。

References:

- [1] Coleman D C, Whitman W B. Linking species richness, biodiversity and ecosystem function in soil systems. *Pedobiologia*, 2005, 49 (6): 479-497.
- [2] Ehrlich H L. How microbes influence mineral growth and dissolution. *Chemical Geology*, 1996, 132 (4): 5-9.
- [3] Doran J W, Zeiss M R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, 2000, 15 (1): 3-11.
- [4] Kamagata Y, Tamaki H. Cultivation of uncultured fastidious microbes. *Microbes Environments*, 2005, 20 (2): 85-91.
- [5] Manichanh C, Chapple C E, Frangeul L, Gloux K, Guigo R, Dore J. A comparison of random sequence reads versus 16S rDNA sequences for estimating the biodiversity of a metagenomic library. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36 (16): 5180-5188.
- [6] Bertrand H, Poly F, Van V T, Lombard N, Nalin R, Vogel T M, Simonet P. High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 62 (1): 1-11.
- [7] Schloss P D, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (3): 1501.

- [8] Rani A, Porwal S, Sharma R. Assessing microbial diversity by culture-dependent and independent approaches for efficient functioning of effluent treatment plants. *Bioresource Technology*, 2008, 99: 7098-7107.
- [9] Good I J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 1953, 40 (3): 237-264.
- [10] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4:molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24 (8): 1596.
- [11] Stackebrandt E, Goebel B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1994, 44 (4): 846-849.
- [12] Schloss P D, Handelsman J. Status of the microbial census. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68 (4): 686-691.
- [13] Borneman J, Skroch P W, Palus J A, O'Sullivan K M, Rumjanek N G, Jansen J L, Nienhuis J, Triplett E W. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 1935-1943.
- [14] Liu W Q, Mao Z C, Yang Y H, Xie B Y. Analysis of soil bacterial diversity by the 16S rRNA gene Library. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 8 (10): 1344-1350.
- [15] Lin Y T, Huang Y J, Tang S L, Whitman W B, Coleman D C, Chiu C Y. Bacterial community diversity in undisturbed perhumid montane forest Soils in Taiwan. *Soil Microbiology*, 2009, 42 (4): 378-388.
- [16] Chen Z Y, Li D Q, Liu Y F, Liu Y Z, Wei W. Screening of high-efficiency biocontrol bacterium B-916 of *Bacillus subtilis* by ion implantation. *Jiangsu Journal of Agricultural Science*, 2004, 20 (4): 240-243.
- [17] Marsh T L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2 (3): 323-327.
- [18] Xia X, Bollinger J, Ogram A. Molecular genetic analysis of response of three soil microbial communities to the application of 2,4-D. *Molecular Ecology*, 1995, 4: 17-28.
- [19] Muyzer G, Walle D E, Uitterlinden A. Profiling of complex microbial populations by DGGE of PCR-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 695-700.
- [20] Stach J E M, Bathe S, Clapp J P, Burns R G. PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 2006, 36 (2): 139-151.
- [21] 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 (1): 127-141.
- [22] Ekundayo E O. 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.
- [23] Hu Y S, Liu Y F, Wu K, Dou H J, Jia X C. Variation of microbial community structure in relation to successive cucumber cropping soil. *Chinese Journal of Soil Science*, 2006, 37: 126-129.

参考文献:

- [14] 刘玮琦, 茆振川, 杨宇红, 谢丙炎. 应用 16S rRNA 基因文库技术分析土壤细菌群落的多样性. *微生物学报*, 2008, 8 (10): 1344-1350.
- [16] 陈志谊, 李德全, 刘永锋, 刘卮洲, 魏巍. 离子注入选育枯草芽孢杆菌生防菌 B-916 高效菌种. *江苏农业学报*, 2004, 20 (4): 240-243.
- [23] 胡元森, 刘亚峰, 吴坤, 窦会娟, 贾新成. 黄瓜连作土壤微生物区系变化研究. *土壤通报*, 2006, 37: 126-129.