

DOI: 10.5846/stxb201404020621

杜滢鑫, 谢宝明, 蔡洪生, 唐璐, 郭长虹. 大庆盐碱地九种植物根际土壤微生物群落结构和功能多样性. 生态学报, 2016, 36(3): - .

Du Y X, Xie B M, Cai H S, Tang Lu, Guo C H. Structural and functional diversity of rhizosphere microbial community of nine plant species in the Daqing Saline-alkali soil region. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(3): - .

大庆盐碱地九种植物根际土壤微生物群落结构和功能多样性

杜滢鑫, 谢宝明, 蔡洪生, 唐璐, 郭长虹*

哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 分子细胞遗传与遗传育种黑龙江省重点实验室, 哈尔滨 150025

摘要:盐碱土是陆地表面生态脆弱区域。它与荒漠化过程相伴而生,不但造成了资源的破坏、农业生产的巨大损失,而且还对生物圈和生态环境构成威胁。研究盐碱地植物根际土壤微生物群落的多样性,对于盐碱土壤的植被恢复和生态重建具有重要意义。本研究运用 PCR-DGGE 技术和 Biolog 微平板法,对大庆盐碱地九种不同植物根际土壤微生物结构和功能的多样性进行了分析。结果表明,不同植物根际土壤微生物组成不同,同一科的植物具有相似的微生物组成。对 11 个克隆进行了序列测定,发现这一地区植物根际优势微生物菌群为变形菌门(Proteobacteria)和酸杆菌门(Acidobacteria)。利用 Biolog 微平板法分析了微生物群落功能多样性。结果表明,不同植物根际土壤细菌群落对底物碳源的代谢特征存在着一定的差异,其中豆科的野大豆根际土壤细菌对底物碳源的代谢能力最强。

关键词:盐碱地; 植物根际; 微生物群落; PCR-DGGE; Biolog 微平板法

Structural and functional diversity of rhizosphere microbial community of nine plant species in the Daqing Saline-alkali soil region

DU Yingxin, XIE Baoming, CAI Hongsheng, TANG Lu, GUO Changhong*

Laboratory of Molecular Cytogenetics and Genetic Breeding of Heilongjiang Province, College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Heilongjiang 150025, China

Abstract: Saline-alkali soils are particularly ecologically fragile. They generally form following desertification, which destroys natural resources and causes heavy losses to agriculture production. Daqing, a city in the northern province of Heilongjiang, is renowned for its vast oil reserves. Exploitation of these reserves has led to soil contamination by petroleum-derived products, and this is becoming serious ecological problem in this city. Saline-alkali soil is another factor that contributes to rendering most of its agricultural land unusable. In recent years, bioremediation, especially microbial remediation, has been a global focus of research. It is more effective, safer, and more environmentally friendly than other remediation strategies, such as chemical or physical methods. The rhizosphere—the layer of soil influenced by plant roots—is much richer in microbial diversity than the surrounding bulk soil. Exploring the diversity of plant rhizosphere microbial communities in Saline-alkali soils can therefore provide a scientific basis for vegetation restoration and ecological reconstruction in this region. This study focused on plant rhizosphere microbial communities in Saline-alkali soils in the Daqing region. Using Biolog EcoPlate methods, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis, and subsequent DNA sequencing, we investigated the structural and functional diversity of rhizosphere microbial communities associated with nine plant species in Daqing Saline-alkali soils. The structure of the rhizosphere microbial community associated with

基金项目:国家自然科学基金(31170479, 31470571); 国家科技支撑计划项目(2011BAD17B04-2-1); 黑龙江省科技攻关计划项目(GC12B304)

收稿日期:2014-04-02; **网络出版日期:**2015- -

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: kaku3008@126.com

each plant species was analyzed by DGGE. Plants in the same family tended to have similar rhizosphere microbial community compositions. Rhizosphere bacteria were dominated by Proteobacteria and Acidobacteria, based on the analysis of 16S rRNA. Pairwise rhizosphere population genetic distances between plant species were calculated using Quantity One software (Bio-Rad Laboratories). In combination with clustering analysis based on the unweighted pair group method with arithmetic mean, it was confirmed that rhizosphere microbial communities reflect relationships among the plant species tested. Biolog EcoPlate was used to investigate the functional diversity of rhizosphere microbial communities. This method is more sensitive to changes in the environment than the other methods such as phospholipid fatty-acid analysis. Changes in functional diversity patterns can be statistically analyzed via principle component analysis of average well color development data. The capacity of rhizobacteria to metabolize carbon sources was higher in communities associated with wild soybean than in other plant species tested. The data also suggest that rhizobacteria from different plant species have distinct carbon metabolism characteristics. While there are limitations in the methods used in this study, they nevertheless provided useful information. Metagenomics—the study of genetic material recovered directly from environmental samples—is becoming increasingly popular as a research tool. It provides a powerful lens for viewing the microbial world that has the potential to revolutionize the understanding of the entire living world. The results of this study offer advanced insights in the field of microbial ecology and provide a theoretical basis for future practical applications.

Key Words: Saline-alkali soil; rhizosphere; microbial community; PCR-DGGE; Biolog-ECO

土地盐碱化是土地退化的主要形式,同时是生态环境的一种恶化现象,严重影响农业的发展。中国现有盐渍土地总面积为 $10000 \times 10^4 \text{ hm}^2$ ^[1]。大庆地区盐碱化总面积 $42.9955 \times 10^4 \text{ hm}^2$,其中大庆盐碱化面积 $14.8687 \times 10^4 \text{ hm}^2$,肇州盐碱化面积 $4.8113 \times 10^4 \text{ hm}^2$,肇源盐碱化面积 $8.769 \times 10^4 \text{ hm}^2$,林甸盐碱化面积 $4.6833 \times 10^4 \text{ hm}^2$,杜蒙盐碱化面积 $9.8592 \times 10^4 \text{ hm}^2$ ^[2]。

盐生植物因为生境恶劣,生物量小,经济效益低,所以没有得到人们的足够重视,盐生植物的开发利用程度不够,严重影响了盐渍土的利用和改良。但是大多数盐生植物则是盐渍土上唯一能够生存的植物,它们对盐渍土的开发与利用,以及维持生态平衡起着至关重要的作用,它们的生态价值是不可以被忽略的。随着人口的增长和经济的发展以及改善生态环境的迫切需要,盐渍土资源和耐盐植物资源将会变得日益重要^[3]。

土壤是许多土壤微生物的生存寄居场所,由于土壤有机质含量酸碱度水分及土质的不同,与此环境相适应的土壤微生物种类也千差万别,在同一地区,不同的植物根际土壤微生物种类和数量也不一样^[4]。盐碱土壤中植物的根际微生物群落研究对于加强对盐生植物资源的开发和利用,以及改良盐碱土壤具有十分重要的意义。

本文从盐碱土壤中植物的根际微生物群落研究入手,以大庆盐碱地区不同植物根际土壤为实验材料,利用 PCR-DGGE 和 Biolog 微平板法分析,评价盐碱地不同植物根际微生物群落结构及功能多样性,为盐碱土壤的植被恢复奠定基础。

1 研究区域

盐碱样地位于黑龙江省大庆市采油三厂第五矿区周围草地,地理为 $46^\circ 41' - 46^\circ 42' \text{ N}$, $124^\circ 59' - 124^\circ 60' \text{ E}$ 。该地属于大陆性半干旱温带草原气候,降水量最大时期为七月份。土壤为盐碱土,pH 值为 8.7—9.3,主要优势植物有鹅观草 (*Roegneria kamoji*)、羊草 (*Leymus chinensis*)、虎尾草 (*Chloris virgata*)、黄芪 (*Astragalus membranaceus*)、野大豆 (*Glycine soja*)、甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*)、菊芋 (*Helianthus tuberosus*)、大籽蒿 (*Artemisia sieversiana*)、碱地肤 (*Kochia scoparia*) 等。

2 样品来源与研究方法

2.1 样品来源

于 2013 年 8 月 1 日对盐碱样地进行土壤样品采集。在盐碱样地内随机选取 3 个样点,按五点采样法采集 0–20 cm 土壤样品,用铁锹将植物从土壤中连根挖出,将植物根际土壤自然抖落,混合均匀,用标本采集袋将植物装好,将土壤样品放在便携式冰盒中带回实验室,用于 Biolog 微平板法分析的土样取根际鲜土立即用于实验,用于 DGGE 分析的土样,放在–20 °C 冰箱保存。

2.2 研究方法

2.2.1 土壤 DNA 的提取

提取方法在 Zhou^[5]的基础上进行了改进,取土壤样品 0.25 g,置 50 mL 离心管中,偏磷酸钠(pH 值 8.5,含 1% PVP)洗涤 3 次,搅拌均匀,10000 rpm/min 离心 5 min,转移沉淀至 1.5 mL 离心管中,贮存于–20 °C 冰箱。取沉淀,重悬于 500 μ L DNA 提取缓冲液,加入溶菌酶(50 mg/mL)至 1 mg/mL,颠倒混匀,37 °C 水浴 1 h,加入蛋白酶 K 至 100 μ g/mL,65 °C 水浴 1 h;中间反复冻融 3 次;加入等体积的氯仿/异戊醇抽提,12000 rpm/min 离心 10 min,取上清加入 0.5 倍体积 PEG 8000,12000 rpm/min 离心 10 min,–20 °C 过夜,沉淀用 70% 乙醇洗涤,8000 rpm/min 离心 5 min,晾干,溶于 100 μ L pH 值 8.0 TE 缓冲液。得到土壤总 DNA。

2.2.2 PCR 扩增

PCR 扩增的引物采用细菌通用性引物,序列是: B968FGC (5' -CGCCGCGCGCGCGGCGGGCGGGCGGGCGGGGCACGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC-3'), B1401R (5'-GCGTGTGTACAAGACCC-3')^[6]。PCR 的反应体系是 50 μ L,PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;最后在 72 °C 延伸 7 min。扩增结果用 2% 的琼脂糖凝胶进行检测。

2.2.3 PCR 产物的 DGGE

在 Muyzer 的方法进行优化^[7]。DGGE 采用 BIO-RAD Dcode Universal Mutation Detection System 进行,丙烯酰胺凝胶强度为 8%,变性剂梯度为 40%–60%,100% 的变性剂含有 7 mol/L 尿素和 40% 的去离子甲酰胺。每孔加入 10 μ L 的 PCR 产物和 6 μ L 的 6 $\times$ Loading buffer,加样完成后,接通电泳电源,在 70 V、60 °C 条件下电泳 13 h。电泳结束后,DGGE 凝胶放在 SYBR Green 中浸泡 30 min,脱水 10 min 后,最后利用 Bio-Rad 凝胶成像系统进行拍照并分析。

2.2.4 DGGE 图谱分析

图谱分析采用 Bio-Rad 公司的凝胶定量软件 Quantity One 4.6.5。对样品条带分析。根据 DGGE 图谱中条带分布用 UPGMA(Unweighted pair group method Using arithmetic averages)进行聚类分析。

2.2.5 条带的切胶、克隆和测序

切胶、克隆和测序主要参照王小芬^[8]等的方法。扩增出来的产物送交到上海生工生物工程股份有限公司测序。将测序结果递交 RDP(Ribosomal Database Project)数据库进行菌种鉴定。

2.2.6 Biolog-ECO 微平板分析

称取 5 g 土壤加入到装有 45 mL 灭菌 NaCl 溶液的三角瓶中(浓度为 0.85%),然后在旋转振荡器上震荡 30 min 摇匀。土壤溶液依次稀释至 10^{-3} ,向 Biolog 微平板(美国 BIOLOG 公司)上每孔加入 150 μ L 土壤稀释液,然后在室温条件下(28 °C),将微孔板放在保湿容器中避光培养,每隔 24 h 用酶标仪读取在 590 nm(颜色+浊度)和 750 nm(浊度)波长的数值。

单孔平均光密度(Average well color development, AWCD)计算按照 Garland 和 Mills 的方法^[9],即 $AWCD(590 - 750\text{ nm}) = \sum (C_{590 - 750})/31$,其中 31 为 Biolog 微平板上供试碳源的种类数。

采用培养 96 h 的数据计算微生物群落的多样性指数^[10]。Shannon 指数 H 用于评估丰富度, $H = - \sum (P_i$

$\times \ln P_i$), 其中 P_i 为第 i 孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率, s 为颜色变化孔的数目; Simpson 指数 D 是用于评估常见种优势度的指数, $D = 1 - \sum (P_i \times P_i)$, 其中 P_i 为第一孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率; McIntosh 指数 U 是基于群落物种多维空间距离的多样性指数, 为一致性的量度, $U = \sqrt{(\sum n_i \times n_i)}$, 其中 n_i 是第 i 孔的相对吸光值。

2.2.7 数据分析

所有数据均用软件 Excel 和 SPSS 19.0 软件用 Duncan 检验方法进行数据分析处理和差异显著性分析 ($P < 0.05$ 差异显著)。同列数据后具有相同字母者, 表示在 0.05 水平上差异不显著。

3 结果与分析

3.1 PCR-DGGE 结果分析

3.1.1 盐碱地植物根际土壤细菌 PCR-DGGE 分析

对大庆盐碱地区九种不同植物根际土壤细菌多样性进行了 DGGE 分析(图 1)。结果表明, DGGE 条带数目、强度、均匀度都存在不同的差异。大庆盐碱地区九种不同植物根际土壤样品之间具有公共的条带, 说明供试土壤根际微生物之间可能存在一些共有的细菌类群, 然而有些公共条带的亮度存在差异, 表明不同植物根际细菌具有数量上的差异。

从图 1 和表 1 可以看出, 1、2、4、8、10、11 是研究样本的共有细菌, 其中 3 仅菊芋、大籽蒿、甘草和黄芪样本中不存在, 其他样本中均存在; 5 仅甘草和羊草样本中不存在, 其他样本中均存在; 6 仅碱地肤中不存在, 其他样本中均存在; 7 仅菊芋、大籽蒿和碱地肤中不存在, 其他样本中都存在。

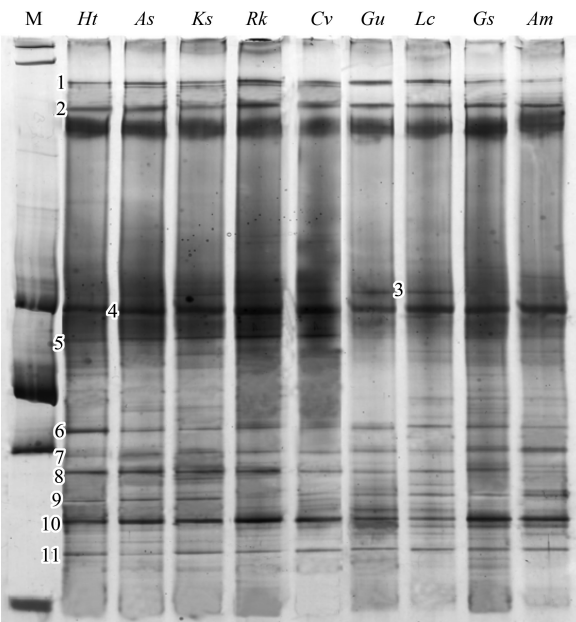


图 1 16S rDNA 扩增片段的 DGGE 图谱
Fig. 1 DGGE profiles of the PCR products
M: Marker, Ht: 菊芋, As: 大籽蒿, Ks: 碱地肤, Rk: 鹅观草, Cv: 虎尾草, Gu: 甘草, Lc: 羊草, Gs: 野大豆, Am: 黄芪

表 1 土壤细菌 PCR-DGGE 电泳图谱条带分析
Table 1 PCR-DGGE analysis of soil bacteria

编号 Number	条带 Band								
	Ht	As	Ks	Rk	Cv	Gu	Lc	Gs	Am
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	-	+	+	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	-	-	+	+
6	+	+	-	+	+	+	+	+	+
7	-	-	-	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Ht: 菊芋, As: 大籽蒿, Ks: 碱地肤, Rk: 鹅观草, Cv: 虎尾草, Gu: 甘草, Lc: 羊草, Gs: 野大豆, Am: 黄芪

3.1.2 DGGE 聚类分析

运用 Bio-Rad 公司 Quantity One 分析软件绘制出不同植物根际微生物之间的遗传簇关系(图 2)和遗传距离与群落差异(表 2)。根据群体间不同的遗传距离,对其进行聚类分析(UPGMA),结果表明,当取值水平在 0.55 以上时,菊芋和大籽蒿,虎尾草与鹅观草,甘草与黄芪根际微生物分别属于同一簇。说明同一科植物根际微生物的类群比较接近。

3.1.3 DGGE 条带测序分析

将测序结果递交 RDP 数据库进行鉴定,结果表明,1、2、4 为酸杆菌门(Acidobacteria),5、8、9、10、11 为变形菌门(Proteobacteria),其他为未知菌种。

3.2 Biolog 微平板结果分析

3.2.1 不同植物根际土壤微生物利用总碳源的动力学特征

表 2 不同植物的遗传距离和细菌群落差异

Table 2 Genetic distance (above diagonal) and differences in bacterial communities (below diagonal) in different plants

种群 PopID	Ht	As	Cv	Rk	Ks	Gu	Am	Gs	Lc
Ht	1.00	0.591	0.517	0.445	0.588	0.485	0.437	0.522	0.537
As	0.591	1.000	0.438	0.491	0.593	0.550	0.533	0.455	0.556
Cv	0.517	0.438	1.000	0.622	0.542	0.470	0.376	0.483	0.586
Rk	0.445	0.491	0.622	1.000	0.601	0.498	0.521	0.462	0.499
Ks	0.588	0.593	0.542	0.601	1.000	0.525	0.584	0.548	0.548
Gu	0.485	0.550	0.470	0.498	0.525	1.000	0.608	0.569	0.674
Am	0.437	0.533	0.376	0.521	0.584	0.608	1.000	0.473	0.573
Gs	0.522	0.455	0.483	0.462	0.548	0.569	0.473	1.000	0.614
Lc	0.537	0.556	0.586	0.499	0.548	0.674	0.573	0.614	1.000

Ht: 菊芋, As: 大籽蒿, Ks: 碱地肤, Rk: 鹅观草, Cv: 虎尾草, Gu: 甘草, Lc: 羊草, Gs: 野大豆, Am: 黄芪

对 9 种植物根际土壤微生物进行了 Biolog 微平板分析(图 3)。AWCD 曲线反映土壤细菌在 Biolog 微平板中的生长情况,通常认为,曲线变化幅度越大的样品碳源利用能力较高,也具有比较高的丰富度。结果表明,9 种植物中根际微生物对碳源利用能力最强的是野大豆,其他植物对碳源的利用能力比较接近。

3.2.2 土壤微生物功能多样性的主成分分析

进一步对不同植物土壤细菌群落底物碳源代谢主成分进行了分析(图 4)。结果表明,野大豆和碱地肤与其他植物没有交集,说明野大豆和碱地肤根际土壤细菌群落对底物碳源的代谢特征与其他植物有显著差异。鹅观草除了与菊芋有交集外,同其他植物没有交集,说明鹅观草根际土壤细菌群落对底物碳源的代谢特征只与菊芋无明显差异,同其他植物都有明显差异。

3.2.3 土壤微生物群落多样性指数分析

对不同植物根际土壤微生物在培养 96 h 的多样性

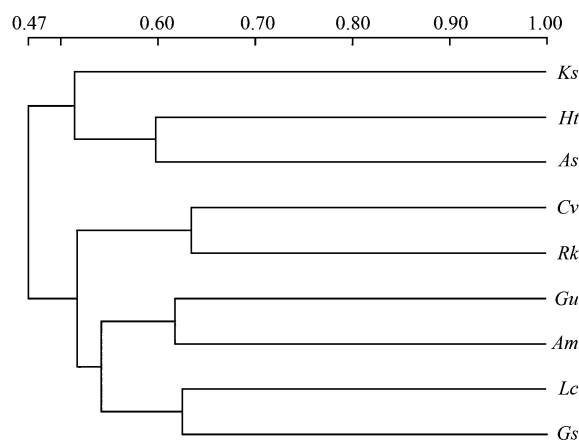


图 2 DGGE 图谱聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of DGGE banding patterns

Ht: 菊芋, As: 大籽蒿, Ks: 碱地肤, Rk: 鹅观草, Cv: 虎尾草, Gu: 甘草, Lc: 羊草, Gs: 野大豆, Am: 黄芪

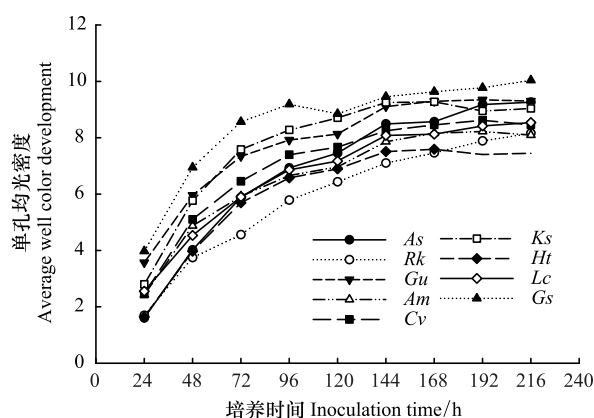


图 3 不同植物根际土壤微生物 AWCD 随时间的变化曲线

Fig. 3 Variation in AWCD of rhizosphere soil microbial communities over time for different plants

Ht: 菊芋, As: 大籽蒿, Ks: 碱地肤, Rk: 鹅观草, Cv: 虎尾草, Gu: 甘草, Lc: 羊草, Gs: 野大豆, Am: 黄芪

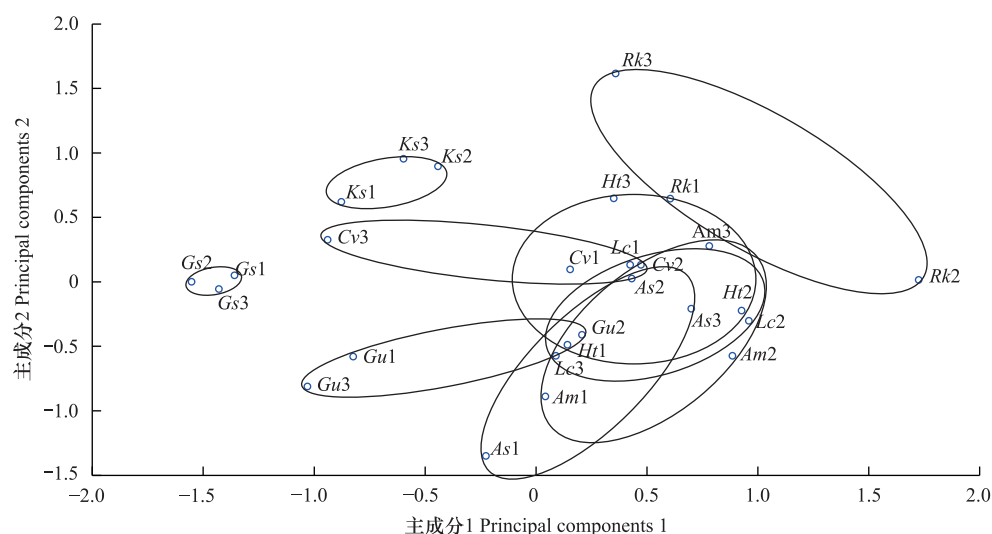


图 4 不同植物根际土壤细菌群落的主成分分析

Fig. 4 Principal component analysis (PCA) of soil bacteria communities in rhizosphere for different plants

*Ht*₁₋₃: 菊芋, *As*₁₋₃: 大籽蒿, *Ks*₁₋₃: 碱地肤, *Rk*₁₋₃: 鹅观草, *Cv*₁₋₃: 虎尾草, *Gu*₁₋₃: 甘草, *Lc*₁₋₃: 羊草, *Gs*₁₋₃: 野大豆, *Am*₁₋₃: 黄芪

指数进行了分析(表三)。Shannon 多样性指数是研究个体数及群落种群数和分布均匀度的综合指标,它是目前应用最广泛的群落多样性指数之一。Simpson 指数较多反映了微生物群落中最常见的物种优势度, MicIntosh 指数则是群落物种均一性的度量。从表 3 可以看出,Shannon 多样性指数与 Simpson 指数均以野大豆土壤样本最高,鹅观草土壤样本最低,不同植物根际土壤样本间存在一定的差异。MicIntosh 指数的变化与 Shannon 多样性指数正相反,鹅观草土壤样本最高,野大豆土壤样本最低。

表 3 不同植物根际土壤微生物群落多样性指数

Table 3 Diversity index of rhizosphere soil microbial communities for different plants

土样	Shannon 指数	Simpson 指数	MicIntosh 指数
Sample	Shannon index	Simpson index	MicIntosh index
Gs	3.3733a	0.9647a	0.1878c
Ks	3.2715ab	0.9607ab	0.1983bc
Gu	3.2609ab	0.9599ab	0.2002bc
Cv	3.2481ab	0.9589ab	0.2028b
Am	3.1697b	0.9557b	0.2103b
Lc	3.1739b	0.9559b	0.2010b
Ht	3.1718b	0.9558b	0.2102b
As	3.1617b	0.9553b	0.2113b
Rk	3.0163c	0.9477c	0.2285a

不同字母表示统计学上的差异性($P < 0.05$) *Ht*: 菊芋, *As*: 大籽蒿, *Ks*: 碱地肤, *Rk*: 鹅观草, *Cv*: 虎尾草, *Gu*: 甘草, *Lc*: 羊草, *Gs*: 野大豆, *Am*: 黄芪

4 讨论

土壤中绝大多数的微生物是不可培养的^[11]。所以,传统的稀释平板涂布方法不能真实和准确的反应出土壤中微生物的结构组成,这就需要我们运用更先进的分子生物学方法来了解土壤中微生物的结构和组成^[12]。

本文通过 DGGE 方法,研究了大庆盐碱地植物根际土壤群落结构多样性,结果表明,不同的植物之间土壤微生物群落结构相似性比较高,但也存在着一些差异。DGGE 指纹图谱的聚类分析显示,同一科的植物,它们

的根际土壤微生物群落结构归为同一簇,表明植物本身对根际土壤微生物群落有一定的调节作用。DGGE 图谱中的优势条带进行测序结果表明,其中共有的 1、2、4 细菌属于酸杆菌门(Acidobacteria),5、8、9、10、11 细菌属于变形菌门(Proteobacteria),具有差异的 3、6、7 细菌均为未知菌种。这与 Fierer 等^[13]和 Deangelis 等^[14]的研究类似,他们推测变形菌门在各种植物根际微生物占优势菌群的原因是它们在各种植物的根际中增长的速度很快。同时,本研究出现了酸杆菌门的菌群与 Kielak 等^[15]和 Yergeau 等^[16]的研究相类似。他们认为酸杆菌门细菌是微生物生态系统中稳定的组成部分,因为它们所需的营养物质很少或者营养物质不变。Duineveld 等^[17]也曾证明这些是由它们贫营养的性质所决定的,这使得它们能慢慢的应对植物根环境的变化,包括那些由根分泌物产生的影响。这与郑贺云等^[18]的研究有所不同,郑贺云等发现 29 个序列属于不可培养的微生物,43 个序列分属粘球菌目(Myxococcales)、假单胞菌目(Pseudomonadales)、根瘤菌目(Rhizobiales)、芽孢杆菌目(Bacillales)、伯克氏菌目(Burkholderiales)、放线菌目(Actinomycetales)、海洋螺菌目(Oceanospirillales)、黄杆菌目(Flavobacteriales)、交替单胞菌目(Alteromonadales),21 个属,因为研究的地域不同,所以出现不同的研究结果。

Biolog 微平板法广泛用于评价土壤微生物群落的功能多样性。微生物功能多样性对同一环境下不同植物根际微生物群落具有重要意义。通过 Biolog 微平板 AWCD 分析,可以看出豆科植物根际土壤微生物群落对碳底物利用的能力明显强于其他科植物,滕应等^[19]在研究复垦红壤中牧草根际微生物群落时,推测植物向根际土壤分泌的碳水化合物越多,根际微生物对碳底物利用的能力越强。本研究的结果表明,豆科植物野大豆向根际土壤分泌的碳水化合物要超过其他植物,同一科的植物根际土壤细菌群落对底物碳源的代谢特征比较相似(如黄芪和甘草,虎尾草和羊草,菊芋和大籽蒿),不同科植物根际土壤细菌群落对底物碳源的代谢特征存在着一定的差异(如碱地肤与其他植物)。Shannon 多样性指数反应物种的丰富度,Simpson 指数反应常见物种的优势度,野大豆无论在物种的丰富度,还是物种的优势度上都处于最高数值。豆科植物黄芪和甘草的 Shannon 和 Simpson 指数也相对较高,这与 Perez-Montan 等^[20]的研究结果相似,他认为豆科植物和根瘤菌共生系统可以很好的完成生物固氮,从而提高根际微生物的数量。

DGGE 技术对根际土壤进行检测时存在一些难题,微生物群落中数量小于 1%的种群不能采用 DGGE 技术进行检测分析^[7]。两个微生物 16S rRNA 的 GC 含量相同,可是序列组成却不同,如果从 DGGE 图谱上看,它们都是同一个条带,这就不能准确的分析微生物群落的多样性,容易产生错误的分析结果^[21]。所以,为了降低由于分析方法产生的误差,我们分析微生物群落多样性时可以将几种不同的分析方法结合使用^[22]。目前许多研究正在利用宏基因组学的方法分析微生物的多样性,它是直接提取全部微生物的 DNA,构建宏基因组文库,利用基因组学研究微生物的群落功能和遗传组成^[23],是一种研究微生物多样性的新理念和新方法,在未来可能会有广泛的应用。

本研究运用 PCR-DGGE 技术和 Biolog 微平板法,分析了大庆盐碱地区九种不同植物根际微生物结构和功能的多样性,为盐碱地土壤的开发利用和生物修复提供了重要参考。

参考文献(References):

- [1] 张宝贤,王光明,谭德云,刘红光,杨云峰,孙丽娟. 蓖麻杂交种耐盐碱能力评价试验初报. 中国农学通报, 2012, 28(33): 88-92.
- [2] 陈建军,张树文,陈静,唐俊梅. 大庆市土地盐碱化遥感监测与动态分析. 干旱区资源与环境, 2003, 17(4): 101-106.
- [3] 刘阳春,何文寿,何进智,沈振荣. 盐碱地改良利用研究进展. 农业科学研究, 2007, 28(2): 68-71.
- [4] 李凤霞,郭永忠,许兴. 盐碱地土壤微生物生态特征研究进展. 安徽农业科学, 2011, 39(23): 14065-14067, 14174-14174.
- [5] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 316-322.
- [6] Heuer H, Smalla K. Evaluation of community-level catabolic profiling using BIOLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. Journal of Microbiological Methods, 1997, 30(1): 49-61.
- [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] 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.
- [9] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(8): 2351-2359.
- [10] 杨永华, 姚健, 华晓梅. 农药污染对土壤微生物群落功能多样性的影响. 微生物学杂志, 2000, 20(2): 23-25.
- [11] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, 59(1): 143-169.
- [12] Pace N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 1997, 276(5313): 734-740.
- [13] Fierer N, Bradford M A, Jackson R B. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 2007, 88(6): 1354-1364.
- [14] Deangelis K M, Brodie E L, Desantis T Z. Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 2009, 3(2): 168-178.
- [15] Kielak A, Pijl A S, Veen J A, Kowalchuk G A. Differences in vegetation composition and plant species identity lead to only minor changes in soil-borne microbial communities in a former arable field. *FFFS Microbiology Ecology*, 2008, 63(3): 372-382.
- [16] Yergeau E, Schoondermark-Stolk S A, Brodie E L, Déjean S, DeSantis T Z, Gonçalves O, Piceno Y M, Andersen G L, Kowalchuk G A. Environmental microarray analyses of Antarctic soil microbial communities. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 2009, 3(3): 340-351.
- [17] Duineveld B M, Rosado A S, van Elsas J D, van Veen J A. Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(12): 4950-4957.
- [18] 郑贺云, 黎志坤, 李超, 张鲜姣, 胡建伟, 朱红惠. 新疆阿克苏地区盐碱地细菌类群多样性及优势菌群分析. 微生物学通报, 2012, 39(7): 1031-1043.
- [19] 滕应, 黄昌勇, 龙健, 姚槐应. 复垦红壤中牧草根际微生物群落功能多样性. 中国环境科学, 2003, 23(3): 295-299.
- [20] Pérez-Montaña F, Alias-Villegas C, Bellogín R A, del Cerro P, Espuny M R, Jiménez-Guerrero I, López-Baena F J, Ollero F J, Cubo T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, 2014, 169(5/6): 325-336.
- [21] 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): 1674-1689.
- [22] 吴永胜, 马万里, 李浩, 卢萍, 吕桂芬. 内蒙古退化荒漠草原土壤细菌群落结构特征. 生态学报, 2010, 30(23): 6355-6362.
- [23] 李慧, 何晶晶, 张颖, 徐慧, 陈冠雄. 宏基因组技术在开发未培养环境微生物基因资源中的应用. 生态学报, 2008, 28(4): 1762-1773.