

DOI: 10.5846/stxb201503030405

张永敢, 赵娟, 张玉洁, 吴婷, 吴孝兵, 郑艳. 药用植物凤丹 (*Paeonia suffruticosa*) 根际土壤细菌群落 16S rRNA 基因的 ARDRA 分析. 生态学报, 2016, 36(17): - .

Zhang Y G, Zhao J, Zhang Y J, Wu T, Wu X B, Zheng Y. Bacterial diversity in rhizosphere soil of the medicinal tree peony (*Paeonia suffruticosa*) revealed by amplified ribosomal DNA restriction analysis. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(17): - .

## 药用植物凤丹 (*Paeonia suffruticosa*) 根际土壤细菌群落 16S rRNA 基因的 ARDRA 分析

张永敢<sup>1</sup>, 赵娟<sup>1</sup>, 张玉洁<sup>1</sup>, 吴婷<sup>1</sup>, 吴孝兵<sup>2</sup>, 郑艳<sup>2,\*</sup>

1 安徽师范大学环境科学与工程学院, 芜湖 241000

2 安徽师范大学生命科学学院, 芜湖 241000

**摘要:** 凤丹 (*Paeonia suffruticosa* Andr.) 为芍药科多年生植物, 是一种重要的传统中药资源。在其生长发育的周期中与土壤微生物尤其是根际土壤微生物有密切的关系。本文通过构建 16S rRNA 基因克隆文库及文库的限制性片段长度多态性分析 (ARDRA), 对中国药用植物凤丹 5 大主要分布区域的根际土壤细菌群落多样性进行了研究。采用限制性内切酶 *Hin*Ⅰ 和 *Csp*Ⅵ 对克隆文库中随机挑选的 1000 个白色克隆子进行了酶切分型, 根据酶切图谱的不同, 将其分为 324 个 OTUs, 并对 38 个优势 OTUs 进行了测序和系统发育分析。16S rRNA 基因序列分析结果表明, 凤丹根际土壤细菌种群主要包括: 变形菌门 (包括 alpha、beta、gamma、delta 亚门)、酸杆菌门、放线菌门、拟杆菌门及厚壁菌门等 11 类细菌, 此外还包含了 3 个未归类的细菌。变形菌门和酸杆菌门为文库中的主要菌群, 分别占克隆总数的 47.34% 和 14.36%, 其中 *Pseudomonas* sp.、*Burkholderia* sp. 和 *Arthrobacter* sp. 为优势菌属。研究表明, 我国药用植物凤丹 5 大主要分布区域的根际土壤细菌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:** 凤丹; 根际土壤; 细菌; 多样性; ARDRA

## Bacterial diversity in rhizosphere soil of the medicinal tree peony (*Paeonia suffruticosa*) revealed by amplified ribosomal DNA restriction analysis

ZHANG Yonggan<sup>1</sup>, ZHAO Juan<sup>1</sup>, ZHANG Yujie<sup>1</sup>, WU Ting<sup>1</sup>, WU Xiaobing<sup>2</sup>, ZHENG Yan<sup>2,\*</sup>

1 School of Environmental Science and Engineering, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China

2 School of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China

**Abstract:** The medicinal tree peony (*Paeonia suffruticosa*) is an important resource in traditional Chinese medicine. Soil bacteria, especially rhizosphere bacteria, have strong effects on plant health and growth. In this study, the bacterial community structure and diversity in *P. suffruticosa* rhizosphere soil in five major distribution areas in China were investigated by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). The ARDRA patterns of the amplified 16S rRNA gene produced an average of 2—6 bands that ranged in size from 100 to 1302 bp, which indicated that the fragments of the 16S rRNA gene were efficiently double-digested with the restriction endonucleases *Hin*Ⅰ and *Csp*Ⅵ. ARDRA-based cluster analysis showed that 702 positive clones were clustered into 74, 69, 76, 73, and 72 operational taxonomic units (OTUs) in the FH, YS, BZ, HZ, and LY libraries, respectively. Most of the OTUs contained 1—3 clones, which implied high diversity in the peony rhizosphere soil; twenty-six OTUs contained 4—6 clones; and five OTUs contained 7—12 clones.

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81173491); 安徽省自然科学基金 (1308085MC42)

**收稿日期:** 2015-03-03; **修订日期:** 2016-03-21

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhengyan67@126.com

Rarefaction analysis showed that the positive clones in each library covered the diversity of bacterial taxa, which was further confirmed by clone library coverage (range: 71.32%—81.40%). Diversity analysis indicated high bacterial diversity in the soils (Shannon diversity index 3.949—4.184; Chao1 index range 89.52—107.25). Sequence analysis revealed diverse bacterial phyla in the 16S rRNA gene library, consisting of  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$  subclasses of Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Verrucomicrobia, TM7, Gemmatimonadetes, and three unclassified bacteria. The dominant phyla were Proteobacteria and Acidobacteria (47.34% and 14.36% of the total clones, respectively), and the dominant genera in the clone libraries were *Pseudomonas*, *Burkholderia*, and *Arthrobacter*. In addition, a portion of the clones was only distantly related to sequences in the GenBank database, suggesting that bacteria in rhizosphere soil of the medicinal tree peony were unique and diverse. Furthermore, the relative abundance of Firmicutes (mainly *Bacillus* spp.) was positively correlated with soil Cu content. The rhizosphere bacteria belonged the same dominant phyla (Proteobacteria, Acidobacteria, and Actinobacteria) and showed high diversity between geo-authentic and non-authentic areas, implying that *P. suffruticosa* tended to form a similar microenvironment and select similar bacterial communities in the rhizosphere soil.

**Key Words:** tree peony (*Paeonia suffruticosa*); rhizosphere soils; bacteria; diversity; ARDRA

凤丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.) 又称铜陵牡丹, 为芍药科多年生药用植物, 是世界上著名的花卉之一, 素有“国色天香”之美誉, 在中国已有上千年的栽种历史。其根皮可供药用, 俗称丹皮, 是一种贵重的中药材。我国药用植物凤丹主要分布在河南洛阳, 山东菏泽, 安徽的亳州、铜陵和南陵, 但地道药材凤丹则主产于安徽铜陵和南陵一带。丹皮虽然年产量较高, 但是地道药材丹皮所占的比重却较少, 近年来市场上对高质量丹皮的需求不断增加<sup>[1]</sup>, 而影响丹皮质量的因素却非常之多。目前, 对凤丹的研究主要集中在品种<sup>[2]</sup>、化学成分与药理药效<sup>[3-4]</sup>、生理生化<sup>[5-6]</sup>、病虫害防治<sup>[7]</sup>及丹皮的储存加工<sup>[8]</sup>等方面, 而对凤丹根际土壤微生物的群落结构和丰富度的研究相对缺乏, 如康业斌等<sup>[9]</sup>利用 HPLC 法和涂布平板法研究了凤丹和洛阳红根际微生物及其与根皮中丹皮酚含量的关系, 结果发现, 洛阳红根际土壤中微生物数量明显高于凤丹, 但其根皮中丹皮酚含量却低于凤丹; Han 等<sup>[10]</sup>利用传统纯培养的方法研究了牡丹(*Paeonia ostii*) 根部土壤微生物的多样性, 结果发现, 不同牡丹品系(蓝芙蓉、凤丹)的根部细菌群落结构有明显的差异性; Xue & Huang<sup>[11]</sup>利用了聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳法(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)研究了牡丹根部土壤微生物群落结构及其与牡丹品系和种植年限的变化关系, 结果发现, 牡丹品系和种植年限均会影响土壤微生物群落结构并且后者高于前者。

土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分, 其在物质循环、能量流动及有机质分解等方面发挥着至关重要的作用<sup>[12]</sup>。土壤中存在大量的根际促生菌(PGPR)和部分有害细菌(DRB)及植物病原菌。PGPR 定殖于植物根际土壤中, 通过产生植物激素<sup>[13]</sup>、提高营养成分<sup>[14]</sup>、抑制 DRB 和植物病原菌<sup>[15-16]</sup>等来促进植物的生长发育; 与之相反, 土壤中的 DRB 和植物病原菌通过侵染植物维管组织、产生微生物毒素及与其他微生物间相互作用<sup>[17]</sup>, 影响植物的健康生长。所以, 研究根际土壤微生物的群落多样性及其群落结构在植物的生长和健康等方面是至关重要的<sup>[18]</sup>。

扩增核糖体 DNA 限制性内切酶分析法(amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA)是基于特异限制性内切酶对一定长度的 DNA 片段进行酶切, 酶切产物通过琼脂糖凝胶电泳进行分离和检测, 从而分析环境微生物的多样性。由于该技术不受菌株能否纯培养的限制, 不受宿主的干扰, 具有特异性强、效率高、试验结果稳定、可重复性好等优点<sup>[19]</sup>, 已被广泛地用于环境微生物多样性和系统发育关系的研究。本研究采用 PCR 技术, 从凤丹(*P. suffruticosa*) 根际土壤微生物的总 DNA 中选择性地扩增细菌群落的 16S rRNA 基因片段, 在此基础上构建细菌的 16S rRNA 基因克隆文库, 然后利用 ARDRA 法对其进行分析, 从而建立凤丹栽培土壤微生物种群遗传多样性 ARDRA 研究体系, 揭示其根际细菌群落结构及多样性特征, 为研究药材的地道性与土壤微生物之间的关系奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤样品的采集和理化分析

于 2012 年 4 月在安徽铜陵(FH)、芜湖(YS)、亳州(BZ)、山东菏泽(HZ)和河南洛阳(LY)采集 3 年生凤丹的根际土壤样品(图 1 和表 1)。在株龄为三年的凤丹栽植区内随机选取 3 株凤丹,除去表层土壤,挖掘出带根整体植株,把附着在根系上的土壤抖落下来,作为根际土,每株凤丹根际土壤取样量大体一致,将采集的土壤装入灭菌的封口聚乙烯袋中,带回实验室于 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备用。使用全球定位系统(GPS)测定了采样点的经纬度;利用 pH 计测量土壤样品的 pH 值(土壤:水=1:2.5);土壤总磷(TP)和总钾(TK)经过酸消解[ $\text{HNO}_3$ (65%):HF(40%)=9:4, v/v]后,使用 ICP-OES (optic emission spectroscopy with inductively coupled plasma) 进行测定<sup>[20]</sup>;土壤总铜(TCu)和总锌(TZn)经过酸消解( $\text{HNO}_3$ : $\text{HClO}_4$ =4:1, v/v)后,使用原子吸收分光光度法测定<sup>[21]</sup>;其他参数为土壤总有机碳(TOC)(重铬酸钾氧化法)<sup>[22]</sup>和土壤总氮(TN)(凯氏定氮法)<sup>[23]</sup>。

### 1.2 土壤微生物基因组 DNA 的提取及 16S rRNA 基因扩增

将每个采样点的 3 份平行土壤样品均匀混合后,采用试剂盒 FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil(MP Biomedicals, CA, USA),根据生产商提供的方法提取土壤微生物基因组 DNA,提取的结果用经 EB(etidium bromide)染色的 1%(w/v)的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

使用基因扩增仪 PTC-200(MJ Research Inc, Watertown, MA, USA),以细菌引物 F27 [5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' *E. coli* bases 8-27] 和 R1487 [5'-ACGGTTACCTTGTACGACTT-3' *E. coli* bases 1,487-1,507]<sup>[24]</sup> 扩增土壤细菌 16S rRNA 基因。PCR 的反应体系为 30 $\mu\text{l}$ ,包括 10mM 的 Tris-HCl (pH 8.3),50mM KCl,1.5mM  $\text{MgCl}_2$ ,0.25mM dNTP,1U Taq 酶 (TaKaRa Biotechnology),1 $\mu\text{g}$  BSA (bovine serum albumin),50ng DNA 模版和引物各 10 $\mu\text{M}$ 。PCR 的反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 10min,94 $^{\circ}\text{C}$  变性 45s,50 $^{\circ}\text{C}$  退火 1s,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1min,30 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10min。PCR 产物用含有 EB 的 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.3 16S rRNA 基因文库构建

采用 DNA 凝胶纯化试剂盒[AxyPrep<sup>™</sup> PCR Cleanup Kit (AXYGEN Biotechnology (Hangzhou) Limited, Hangzhou, China)]纯化扩增后的产物,之后将纯化产物通过连接试剂盒(TaKaRa, Dalian, China)连接到载体上,再将连接产物转化到大肠杆菌(DH5 $\alpha$ )的感受态细胞中,均匀涂布到含有氨苄青霉素(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside) (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 和 IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) (24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 LB (Luria-Bertani) 培养基上。每个土壤样品随机挑选了 200 个白色克隆子,并使用 pMD18-T easy vector 通用引物 M13 (-47) [5'-AGGGTTTCCAGTCACG-3'] 和 M13 (-48) [5'-GAGCGGATAACAATTCACAC-3'] 扩增外源插入片断,将插入片断的克隆子进行 ARDRA 分析。

### 1.4 ARDRA 分析

以限制性内切酶 *Hin*I 和 *Csp*6I (Fermentas, AM) 酶切上述从各个克隆子扩增出来的 16S rRNA 基因片断。双酶切的反应体系为:2 $\mu\text{l}$  1 $\times$ Tango<sup>™</sup> 酶切反应缓冲液,限制性内切酶 *Hin*I 和 *Csp*6I 各 1 $\mu\text{l}$  (10U),10 $\mu\text{l}$  (约 0.

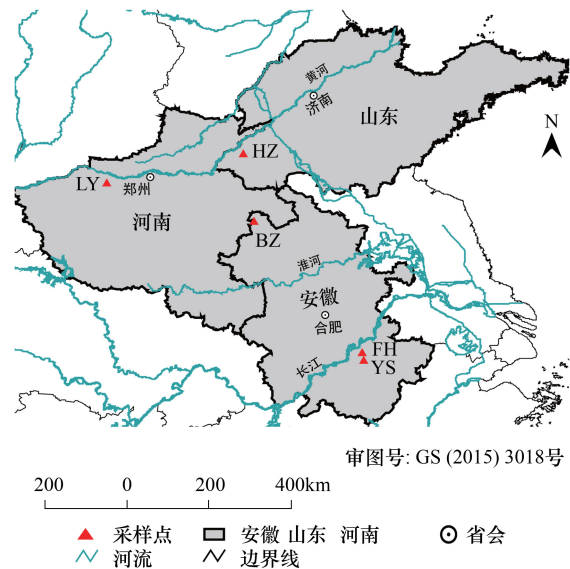


图 1 药用植物凤丹 (*Paeonia suffruticosa*) 根际土壤样品采集点地图

Fig. 1 The map of sampling sites of rhizosphere soil from medicinal tree peony (*Paeonia suffruticosa*) of variety (Fengdan) 采样点 HZ、LY、BZ、FH、YS, 分别表示采自于菏泽、洛阳、亳州、铜陵、芜湖牡丹园内 3 年生凤丹种植区

5  $\mu\text{g}$  DNA) PCR 产物,最后加灭菌水至 30  $\mu\text{l}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  过夜消化,最后经 65 $^{\circ}\text{C}$  水浴 20min, 终止酶切反应。酶切产物用经 EB 染色的 2% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳检测,得到的酶切谱型图,利用软件 GelComparv. 3.0 (Applied Math, Kortrijk, Belgium) 进行分析,小于 100bp 的片段比较模糊,在本研究中不计数。

### 1.5 部分克隆子的 16S rRNA 基因测序

根据 ARDRA 谱型分析,将克隆文库中的优势酶切谱型 (>3 个克隆子) 挑选一个克隆子送交上海生工生物技术有限公司进行测序。

### 1.6 数据分析

以稀疏曲线 (<http://www.uga.edu/strata/software/anRareReadme.html>) 和 Coverage C<sup>[25]</sup> 评价所构建的克隆文库的库容;采用 Shannon-Wiener 多样性指数 ( $H'$ ) 和均匀度指数 ( $E_H$ )<sup>[11]</sup> 及 Chao1 指数<sup>[26]</sup> 进行多样性分析;16S rRNA 基因序列经软件 ContigExpress (version, June 20, 2000) 拼接,用 Mallard<sup>[27]</sup> 进行嵌合体检查,剩下的序列利用 RDP II (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifie>) 和 NCBI BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 分析后,用软件 Clustal X (1.81) 和 MEGA 5.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA) 构建系统发育树 (Neighbor-joining tree)。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤理化性质

5 个采样点凤丹根际土壤的理化性质见表 1。所测的土壤 pH 值范围为 6.04—6.62, 趋于中性。TOC 和 TN 在 YS 最高,其次是 HZ、LY、BZ, FH 最低, TP 在 BZ 最高 (0.978g/kg), FH 最低 (0.536g/kg), TK、TZn 和 TCu 的浓度范围分别为: 17.499—19.669g/kg、0.077—0.139g/kg 和 0.015—0.029g/kg。

表 1 采样点地理位置、经纬度和样品理化性质

Table 1 Sampling locations, latitude, attitude and soil physicochemical properties

样品编号 Sample No.	采样地点 Sampling location	经纬度 Latitude & altitude	pH	有机质 Organic C/ (g/kg)	总氮 Total N/ (g/kg)	总磷 Total P/ (g/kg)	总钾 Total K/ (g/kg)	总锌 Total Zn/ (g/kg)	总铜 Total Cu/ (g/kg)
FH	安徽省铜陵市铜陵县钟鸣镇	118°03'28"E 30°58'47"N	6.04 <sup>d</sup>	19.107 <sup>c</sup>	0.777 <sup>c</sup>	0.536 <sup>c</sup>	18.731 <sup>c</sup>	0.139 <sup>a</sup>	0.022 <sup>b</sup>
YS	安徽省芜湖市南陵县河湾镇	118°05'04"E 30°48'53"N	6.62 <sup>a</sup>	29.861 <sup>a</sup>	1.221 <sup>a</sup>	0.778 <sup>c</sup>	19.041 <sup>b</sup>	0.107 <sup>b</sup>	0.029 <sup>a</sup>
BZ	安徽省亳州市谯城区十八里镇	115°39'58"E 33°52'11"N	6.09 <sup>cd</sup>	17.051 <sup>d</sup>	0.693 <sup>d</sup>	0.978 <sup>a</sup>	19.669 <sup>a</sup>	0.085 <sup>d</sup>	0.018 <sup>c</sup>
HZ	山东省菏泽市牡丹区小留镇	115°26'04"E 35°21'15"N	6.43 <sup>b</sup>	10.125 <sup>e</sup>	0.408 <sup>e</sup>	0.794 <sup>b</sup>	19.661 <sup>a</sup>	0.077 <sup>e</sup>	0.015 <sup>d</sup>
LY	河南省洛阳市老城区邙山镇	112°23'30"E 34°42'30"N	6.20 <sup>c</sup>	19.562 <sup>b</sup>	0.798 <sup>b</sup>	0.633 <sup>d</sup>	17.499 <sup>d</sup>	0.100 <sup>c</sup>	0.029 <sup>a</sup>

$P < 0.05$  水平下 LSD 检验, 相同的字母代表差异不显著的同组

### 2.2 ARDRA 分析

对从 5 个样品中随机挑选的 1000 个白色克隆子进行 PCR 扩增获得其外源插入片段, 然后进行双酶切。酶切结果显示, 库中的 ARDRA 谱型包含 2—6 个条带, 条带大小范围在 100—1302bp (图 2)。用 NTSYSpc 2.10e 进行聚类分析, 将具有相同 ARDRA 谱型的克隆子归为同一种可操作分类单元 (OTU)<sup>[28]</sup>。聚类分析结果显示 702 个含有外源插入片段的克隆子被聚为 324 个 OTUs, FH、YS、BZ、HZ、LY 分别包含 74、69、76、73、72 个 OTUs, 其中含有 1、2、3 个克隆子的 OTU 分别占有被分析 16S rRNA 基因克隆子的 26%、23% 和 18%, 优势 ARDRA 谱型 (>3 个克隆子) 有 38 个, 占有被分析 16S rRNA 基因克隆子的 33% (图 3)。

### 2.3 16S rRNA 基因克隆文库的评估和细菌多样性分析

所构建的 5 个凤丹根际土壤细菌群落的 16S rRNA 基因文库的 Coverage C 为 71.32—81.40, 均大于 70%

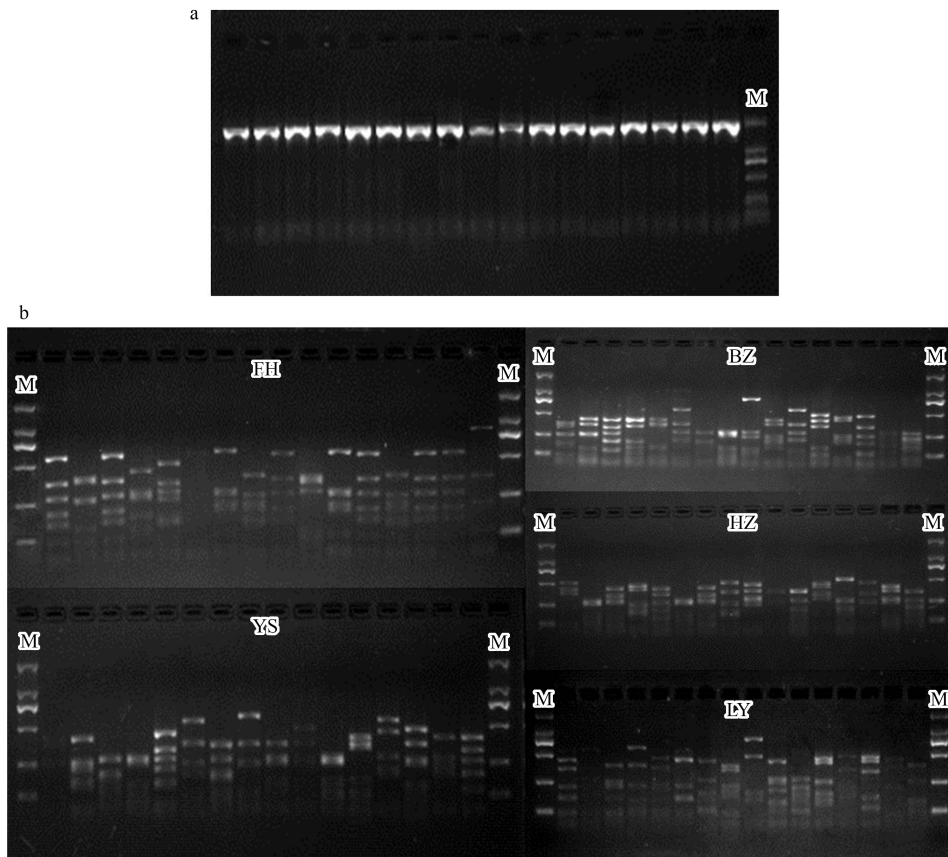


图 2 凤丹根际土壤 16S rRNA 基因文库中部分克隆的酶切图谱 (a.从克隆子中扩增出的 16S rRNA 基因插入片段,b.经 *HinI* 和 *Csp6I* 消化产生的片段多态性)

Fig.2 16S rRNA gene enzyme digestion process ( a. Inserted 16S rRNA gene from clones, b. RFLP profiles of some clones digested by *HinI* and *Csp6I*)

且 YS(81.40%)明显高于其他 4 个(表 2)。稀疏曲线分析结果见图 4。克隆文库的多样性指数分析显示, FH、YS、BZ、HZ、LY 克隆文库的 Shannon-Wiener 多样性指数( $H'$ )依次分别为 4.141、3.949、4.173、4.184 和 4.120。均匀度指数( $E_H$ )范围为 0.933—0.975 且 YS(0.933)明显小于其他 4 个。Chao1 指数 YS 最高(107.25), HZ 最低(89.52)。

2.4 序列及系统发育学分析

为了更详细了解凤丹根际土壤的优势细菌种类组成,从库中占优势的 ARDRA 谱型中挑选了 38 个代表克隆子,对其插入的 16S rRNA 基因片段进行测序,并建立系统发育树(图 5)。优势 OTU 所代表的细菌类群详细描述如表 3,主要包括变形菌门(Proteobacteria)的 alpha、beta、gamma、delta 亚门,酸杆菌门(Acidobacteria),放线菌门(Actinobacteria),拟杆菌门(Bacteroidetes)及厚壁菌门(Firmicutes)等 11 类细菌,此外,还包含了 3 个未归类的细菌。克隆文库中 16S rRNA 基因序列相似性为 95%—99%,其最相似细菌主要来自花生、向日葵、草原、森林等不同类型的土壤。

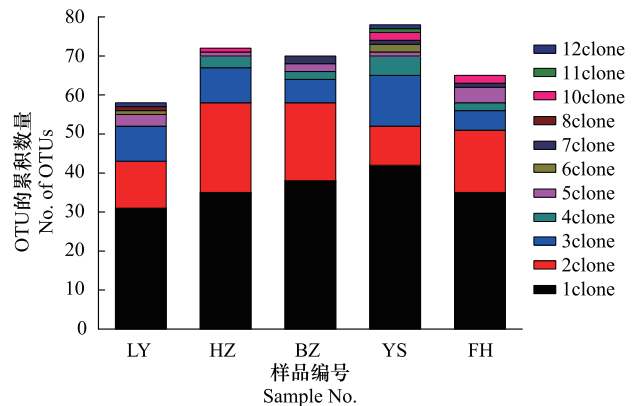


图 3 五个克隆文库中细菌群落 16S rRNA 基因克隆的 ARDRA 型分布

Fig.3 ARDRA distribution in five 16S rRNA gene clone libraries from bacteria community

表 2 细菌群落 16S rRNA 基因克隆文库多样性指数

Table 2 Diversity indices for the rhizosphere bacterial communities as represented by the 16S rRNA gene libraries

样品名称 Soil sample	克隆数 NO. of clones	覆盖度 Coverage/%	香农指数 Shannon diversity index ( $H'$ )	丰度 Richness (NO. of OTUs)	均匀度 Evenness ( $E_H$ )	Chao1 指数 Chao1 index ( $S_{Chao1}$ )
FH	132	73.72	4.141	74	0.962	95.75
YS	172	81.40	3.949	69	0.933	107.25
BZ	138	72.46	4.173	76	0.964	103.07
HZ	126	73.81	4.184	73	0.975	89.52
LY	129	71.32	4.120	72	0.963	99.78

样品 FH、YS、BZ、HZ、LY, 分别表示采自于铜陵、芜湖、亳州、菏泽、洛阳牡丹园内 3 年生 4 月份风丹根际土壤

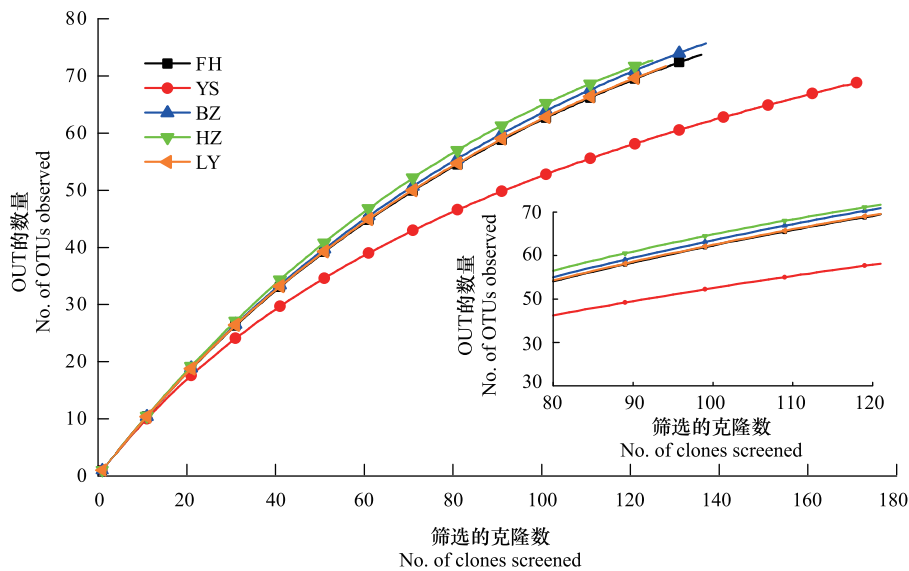


图 4 风丹根际土壤细菌群落 16S rRNA 基因克隆文库的稀疏曲线分析

Fig.4 Rarefaction curves generated for 16S rRNA genes in clones libraries from soil samples collected in YS, FH, BZ, HZ and LY, indicating the observed number of operational taxonomic units (OTUs) at a genetic distance of 3%

样品 FH、YS、BZ、HZ、LY, 分别表示采自于铜陵、芜湖、亳州、菏泽、洛阳牡丹园内 3 年生 4 月份风丹根际土壤

#### 2.4.1 变形菌门(Proteobacteria)

在测序的优势代表克隆子中,有 15 个属于变形细菌,代表了 15 个 OTUs,其中  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -Proteobacteria 分别为 1、8、5、1 个。在  $\gamma$ -Proteobacteria 的 5 个 OTUs 中,丰度最高的克隆子(13 个)代表了与 *Pseudomonas* sp. 相近的 3 个 OTUs,序列相似性为 96%—99%,为文库优势菌属。在  $\beta$ -Proteobacteria 的 8 个 OTUs 中,有 2 个 OTUs(含有 10 个克隆子)与 *Burkholderia* sp. 相近,16S rRNA 基因序列相似性为 99%,为文库优势菌属。此外,有 2 个 OTUs 分别与 *Polaromonas* sp. 和 *Cupriavidus* sp. 相近,序列相似性为 98%。在与变形细菌相似的 OTU 中,仅有 1 个 OTU 与  $\alpha$ -Proteobacteria 的 *Sphingomonas* sp. 聚为一群,序列相似性为 98%。而与  $\delta$ -Proteobacteria 相近的 1 个 OTU 与已知的 *Sorangium cellulosum* strain KYC3466 的序列相似性为 95%。

#### 2.4.2 酸杆菌门(Acidobacteria)

有 5 个 OTUs 与酸杆菌门的细菌聚为一群(图 5),共包含了 28 个克隆子,均为不可培养的细菌,16S rRNA 基因序列相似性为 97%—99%。

#### 2.4.3 放线菌(Actinobacteria)

在放线菌的 5 个 OTUs 中,丰度最高的克隆子(14 个)代表了与 *Arthrobacter* sp. 相近的 3 个 OTUs,序列相似性为 98%—99%,为文库优势菌属。其余 2 个 OTUs 分别于 *Solirubrobacter* sp. 和 *Streptomyces* sp. 相近,16S rRNA 基因序列相似性为 96%—99%。

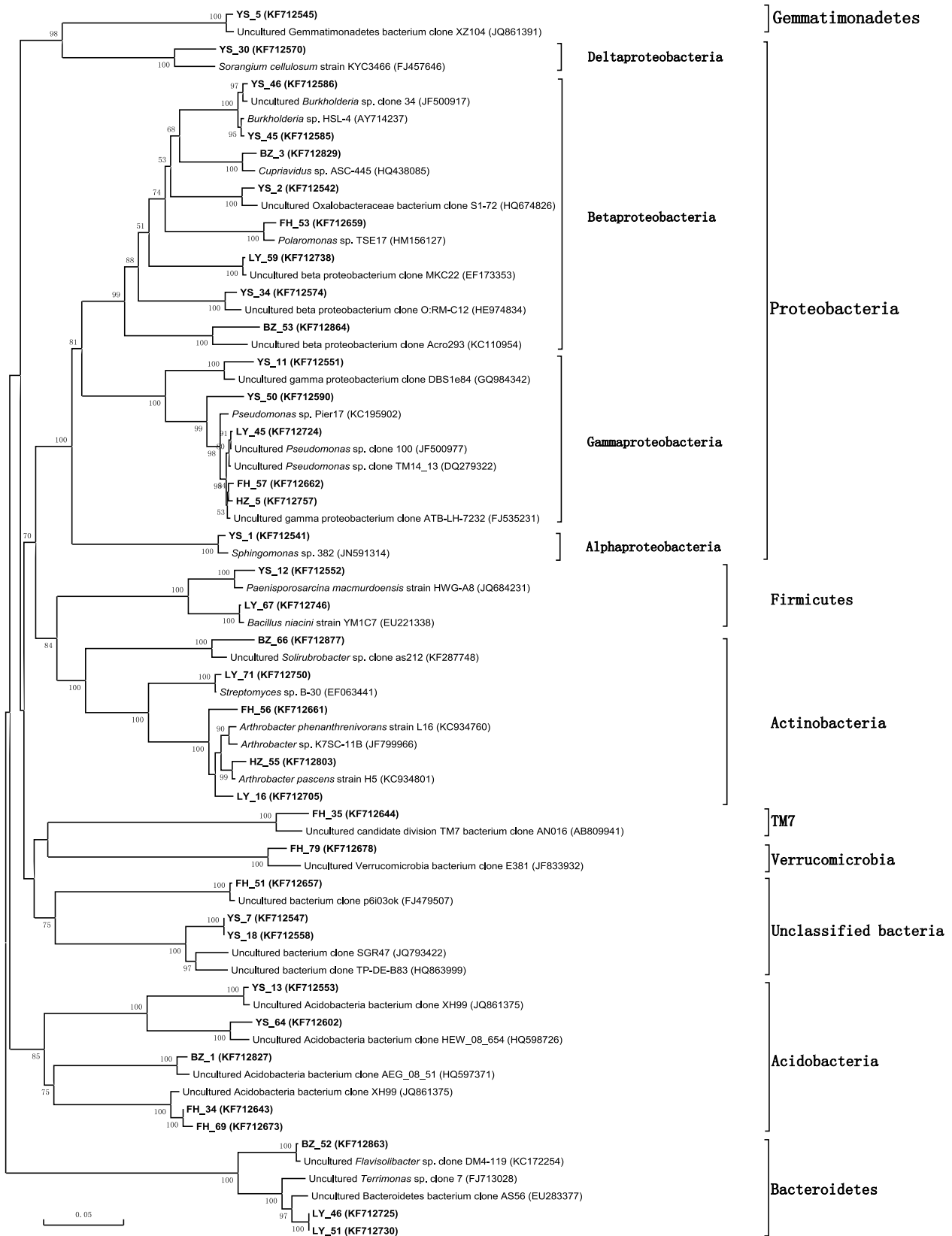


图 5 基于 16S rRNA 基因序列同源性的 38 个优势 OTUs 系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree showing the relationship of 16S rRNA gene sequences of 38 dominant OTUs compared with the most similar GenBank sequences. The tree was constructed by the use of neighbor-joining analysis based on rRNA gene sequences. Only bootstrap values (n=1000 replicates) above 50% were displayed and the par represents a 0.05 of nucleotide divergence. All the sequences highlighted in bold were retrieved from this study

表 3 与测序克隆 16s rRNA 基因序列最相似的 NCBI 基因库中的微生物种类  
 Table 3 Species of bacteria with 16S rRNA gene sequences in the NCBI GenBank database most similar to the clones of soil samples

克隆编号 Clone no.	代表克隆数 Clones represented	与 NCBI 中最相似序列(登录号) Closest NCBI match(Accession no.)	生境 Habitat-Ecological niche	相似性 %Identity	分类 Taxon
FH_34	5	Uncultured Acidobacteria bacterium clone XH99(JQ861375)	peanut rhizosphere soil	98	Acidobacteria
FH_69	5	Uncultured Acidobacteria bacterium clone XH99(JQ861375)	peanut rhizosphere soil	97	Acidobacteria
YS_13	7	Uncultured Acidobacteriaceae bacterium clone CS6(JQ771962)	sunflower rhizosphere; creosote polluted soil	98	Acidobacteria
YS_64	4	Uncultured Acidobacteria bacterium clone HEW_08_654(HQ598726)	woodland soil	97	Acidobacteria
BZ_1	7	Uncultured Acidobacteria bacterium clone AEG_08_51(HQ597371)	grassland soil	99	Acidobacteria
FH_56	4	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> strain L16(KC934760)	purple siltstone	98	Actinobacteria
BZ_66	4	Uncultured <i>Solirubrobacter</i> sp. clone as212(KF287748)	water from a copper mine	96	Actinobacteria
HZ_55	5	<i>Arthrobacter pascens</i> strain H5(KC934801)	purple siltstone	99	Actinobacteria
LY_16	5	<i>Arthrobacter</i> sp. K7SC-11B(JF799966)	soil	98	Actinobacteria
LY_71	5	<i>Streptomyces</i> sp. B-30(EF063441)	unreported	99	Actinobacteria
YS_1	6	<i>Sphingomonas</i> sp. 382(JN591314)	prealpine freshwater lake	98	Alphaproteobacteria
BZ_52	5	Uncultured <i>Flavisolibacter</i> sp. clone DM4-119(KC172254)	ginger continuous cropping soil	99	Bacteroidetes
LY_46	5	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone ASS6(EU283377)	activated sludge from membrane bioreactor	98	Bacteroidetes
LY_51	4	Uncultured <i>Terrimonas</i> sp. clone 7(FJ13028)	groundwater contaminated with MTBE	97	Bacteroidetes
FH_53	4	<i>Polaromonas</i> sp. TSE17(HM156127)	soil from glacier forefield	98	Betaproteobacteria
YS_2	11	Uncultured Oxalobacteraceae bacterium clone S1-72(HQ674826)	variably weathered outcrop	98	Betaproteobacteria
YS_34	5	Uncultured beta proteobacterium clone O;RM-C12(HE974834)	Ajka red mud contaminated soils	98	Betaproteobacteria
YS_45	4	<i>Burkholderia</i> sp. HSL-4(AY714237)	soil	99	Betaproteobacteria
YS_46	6	Uncultured <i>Burkholderia</i> sp. clone 34(JF500917)	rye-grass rhizosphere	99	Betaproteobacteria
BZ_3	4	<i>Cupriavidus</i> sp. ASC-445(HQ438085)	agricultural rhizosphere soil	98	Betaproteobacteria
BZ_53	5	Uncultured beta proteobacterium clone Acro293(KC110954)	<i>Acroboloides maximus</i> in soil microcosm	95	Betaproteobacteria
LY_59	4	Uncultured beta proteobacterium clone MKC22(EF173353)	hydrocarbon-contaminated soil	99	Betaproteobacteria
YS_30	4	<i>Sorangium cellulosum</i> strain KYC3466(FJ457646)	unreported	95	Deltaproteobacteria
YS_12	4	<i>Paenisporsarcina macmurdoensis</i> strain HWG-A8(JQ684231)	permafrost soil samples	98	Firmicutes
LY_67	5	<i>Bacillus niacini</i> strain YMIC7(EU221338)	wheat rhizosphere	99	Firmicutes
FH_57	4	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone TM14_13(DQ279322)	Tuber magnatum	99	Gammaproteobacteria
YS_11	6	Uncultured gamma proteobacterium clone DBS1-e84(GQ984342)	surface water in the Northern Bering Sea	98	Gammaproteobacteria
YS_50	4	<i>Pseudomonas</i> sp. Pier17(KC195902)	heavy metal contaminated soil	96	Gammaproteobacteria
HZ_5	4	Uncultured gamma proteobacterium clone ATB-LH-7232(FJ535231)	washing water of carrot washing plant	99	Gammaproteobacteria
LY_45	5	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone 100(JF500977)	rye-grass rhizosphere	99	Gammaproteobacteria
YS_5	10	Uncultured Gemmatimonadetes bacterium clone XZ104(JQ861391)	peanut rhizosphere soil	99	Gemmatimonadetes
FH_35	6	Uncultured candidate division TM7 bacterium clone ANO16(AB809941)	acidophilic nitrifying activated sludge	97	TM7
FH_51	4	Uncultured bacterium clone p6i03ok(FJ479507)	undisturbed tall grass prairie, top 5 cm	99	Unclassified bacteria
YS_7	8	Uncultured bacterium clone SGR47(JQ793422)	rhizosphere of <i>Arachis hypogaea</i>	95	Unclassified bacteria
YS_18	4	Uncultured bacterium clone TP-DE-B83(HQ863999)	alpine meadow in the upper area of Shule River	95	Unclassified bacteria
FH_79	5	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone E381(JF833932)	potassium mine soil	97	Verrucomicrobia



#### 2.4.4 其他细菌

有 3 个 OTUs 与拟杆菌门的细菌聚在一起(图 5),序列相似性为 97%—99%。2 个 OTUs 分别以 98% 和 99% 的相似水平与从土壤中分离到的厚壁菌门菌株 *Paenisporosarcina macmurdoensis* 和 *Bacillus niacini* 聚在一起。分别有 1 个 OUT 与芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)、TM7 菌和疣微菌门(*Verrucomicrobia*)聚在一起。

### 3 讨论

16S rRNA 基因克隆文库的构建是微生物分子生态学中用来研究环境中微生物多样性的主要方法之一<sup>[29]</sup>。通过对文库中的克隆进行测序,了解环境样品中的微生物组成。但是要获得一个较全面、详细的微生物群落组成分析结果,就需要建一个足够大的文库,而对文库中每个克隆进行测序,就需要高昂的费用<sup>[30]</sup>。ARDRA 不但可以快速、稳定地分析微生物群落组成,而且可以减少测序费用<sup>[31]</sup>。为了验证 ARDRA 的分析结果,随机挑选了 5 种谱型,每种谱型送 2—3 个克隆子进行序列测定,结果表明来自同一种谱型不同克隆子的序列是一样的。通过 ARDRA 分析,702 个阳性克隆子被聚为 324 个 OTUs,这样测序量就大大降低。通过对谱型图的观察分析发现,不同类型的细菌具有不同的谱型,这表明所使用的限制性内切酶 *Hinf*I 和 *Csp*6I 可以很好地区分所研究的细菌种群。此外,大部分的谱型只包含了 1—3 个克隆,说明凤丹根际土壤具有丰富的细菌多样性。

为了对凤丹根际土壤细菌群落做一个较全面的分析,本研究中使用了稀疏曲线和 Coverage C<sup>[25]</sup> 来评价所构建的克隆文库大小。Coverage C 越高,表明所构建的文库越能代表环境中的细菌群落多样性。结果显示,所构建的 5 个凤丹根际土壤细菌群落的 16S rRNA 基因文库的 Coverage C 均大于 70%(表 2),说明所构建的克隆文库基本可以反映所采集土壤细菌群落的多样性,这一结果与稀疏曲线分析一致(图 4)。此外,YS 的 Coverage C 明显高于其他四个,表明 YS 未被检测到的微生物最少,最能反应其土壤细菌群落的多样性。

细菌多样性分析结果显示,虽然 YS 的 Chao1 指数最高(107.25),但是其均匀度( $E_H$ )和 Shannon-Wiener 多样性指数( $H'$ )却最低(0.933 和 3.949)(表 2)。这可能因为 Chao1 指数用于反映物种丰富度的非参数估计<sup>[26]</sup>,而 Shannon-Wiener 多样性指数不仅反映了物种的丰富度,而且反映了其均匀度<sup>[32]</sup>。与前人相似的研究比较发现,使用分子方法研究微生物多样性<sup>[11]</sup>比使用传统纯培养方法<sup>[10]</sup>获得的细菌多样性指数要高。凤丹地道产区(FH 和 YS)与非地道产区(BZ、HZ 和 LY)的细菌群落都具有较高的多样性(表 2),这可能与药用植物凤丹在生长发育的周期中形成的特殊根际土壤微环境有关<sup>[11]</sup>。

由于优势细菌种类可能对碳、氮循环和其他地球生物化学循环产生较大的影响,因此,了解所研究环境的优势细菌种群是至关重要的。此外,对于特定的细菌主导着微生物群落一直是生态学研究的基本问题<sup>[33]</sup>。本研究中挑选了优势细菌种群进行测序,并对其进行系统发育分析,结果表明,凤丹根际土壤的优势细菌种群主要包括变形菌门的 alpha、beta、gamma、delta 亚门,酸杆菌门,放线菌门,拟杆菌门及厚壁菌门等 11 类细菌,此外,还包含了 3 个未归类的细菌。其中 *Pseudomonas* sp.、*Burkholderia* sp. 和 *Arthrobacter* sp. 为优势菌属。*Pseudomonas* 是土壤中最常见的细菌,也是根际土壤细菌群落的主要成员之一,具有抑制植物病原菌、促进植物生长的作用<sup>[34]</sup>。可能因为研究方法不同, Han 等<sup>[10]</sup>利用传统纯培养的方法研究了牡丹(*P. ostii*)根部土壤微生物的多样性,却没有发现 *Pseudomonas*。*Burkholderia* 是  $\beta$ -Proteobacteria 中最丰富的一个属,在矿石风化和氮固定方面具有重要作用<sup>[35]</sup>。*Arthrobacter* 是放线菌中最主要的一个属,广泛的存在于土壤中。该属的许多种类在不同植物的土壤微生物区系中占优势地位<sup>[36]</sup>,并参与有毒金属(包括铜、锰、镍和铅)的生物吸附<sup>[37]</sup>。值得注意的是:(1)克隆文库中存在大量未归类的细菌种类,这可能与凤丹根际土壤形成的特殊微环境有关<sup>[11]</sup>;(2)仅在 TCu 含量最高 YS 和 LY 发现了厚壁菌门的细菌优势菌属,这一结果与前人研究结论相一致<sup>[38]</sup>;(3)凤丹地道产区(FH 和 YS)与非地道产区(BZ、HZ 和 LY)根际土壤细菌优势菌群均为变形菌门(包括 alpha、beta、gamma、delta 亚门)、酸杆菌门、放线菌门,这可能是因为这些优势菌群普遍存在于种植凤丹的根际土壤中。为了更深入地研究凤丹地道产区与非地道产区根际细菌群落间的差异,后续将所有剩下的

OTUs 进行测序和系统发育分析。

#### 4 结论

目前,16S rRNA 基因克隆文库和 ARDRA 方法已广泛应用于生物群落结构和多样性研究中。该方法体系可以反映群落基因组的遗传信息和单个菌株的系统发育信息,但是,要获得较全面的群落结构信息,就需要进行大量样品分析,以确保所构建的克隆文库库容达到要求。

我国药用植物凤丹(*P. suffruticosa*)主要分布区域的根际土壤细菌种群有 11 类和 3 个未归类细菌,其中变形菌门和酸杆菌门为文库中的主要菌群,*Pseudomonas* sp.、*Burkholderia* sp. 和 *Arthrobacter* sp. 为优势菌属。表明我国药用植物凤丹(*P. suffruticosa*)主要分布区域的根际土壤细菌种群不仅具有丰富的多样性,还存在丰富的潜在新种类。

#### 参考文献 (References):

- [ 1 ] He L X, Suo Z L, Zhang C H, Jin X B, Zhao D X, Zhao X Q, Hou B X, Deng C F. Classification of Chinese medicinal tree peony cultivars based on chloroplast DNA sequences. *AASRI Procedia*, 2012, 1: 344-352.
- [ 2 ] Guo D L, Hou X G, Zhang J. Sequence-related amplified polymorphism analysis of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andrews) cultivars with different flower colours. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 2009, 84: 131-136.
- [ 3 ] Han X Y, Wang L S, Shu Q Y, Liu Z A, Xu S X, Tetsumura T. Molecular characterization of tree peony germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Biochemical Genetics*, 2008, 46(3/4): 162-179.
- [ 4 ] Wu M J, Gu Z Y. Screening of bioactive compounds from Moutan Cortex and their anti-inflammatory activities in Rat *Synoviocytes*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2009, 6(1): 57-63.
- [ 5 ] 覃逸明, 聂刘旺, 黄雨清, 王千, 刘欣, 周科. 凤丹(*Paeonia ostii* T.) 自毒物质的检测及其作用机制. *生态学报*, 2009, 29(3): 1153-1160.
- [ 6 ] Liu Y L, Xia Y, Guo P, Wang G P, Shen Z G, Xu Y C, Chen Y H. Copper and bacterial diversity in soil enhance paeonol accumulation in Cortex Moutan of *Paeonia suffruticosa* 'Fengdan'. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 2013, 54(4): 331-337.
- [ 7 ] 康业斌, 商鸿生, 成玉梅. 牡丹病害及其固有的化学抗病物质研究进展. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2005, 33(8): 247-249.
- [ 8 ] 易建利. 储存时间对牡丹皮药材和饮片中丹皮酚含量的影响. *湖南中医药大学学报*, 2008, 28(3): 42-43.
- [ 9 ] 康业斌, 商鸿生, 董苗菊. 凤丹与洛阳红根际微生物及其与根皮中丹皮酚含量的关系. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2006, 34(12): 159-162.
- [ 10 ] Han J G, Song Y, Liu Z G, Hu Y H. Culturable bacterial community analysis in the root domains of two varieties of tree peony (*Paeonia ostii*). *Fems Microbiology Letters*, 2011, 322(1): 15-24.
- [ 11 ] Xue D, Huang X D. Changes in soil microbial community structure with planting years and cultivars of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30(2): 389-397.
- [ 12 ] Bastida F, Kandler E, Moreno J L, Ros M, García C, Hernández T. Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Applied Soil Ecology*, 2008, 40(2): 318-329.
- [ 13 ] Davies P J. The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions // *Plant Hormones—Biosynthesis, Signal Transduction, Action*, 3rd ed. The Netherlands: Springer, 2010: 1-15.
- [ 14 ] Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(1): 11-18.
- [ 15 ] Zhou H Y, Wei H L, Liu X L, Wang Y, Zhang L Q, Tang W H. Improving biocontrol activity of *Pseudomonas fluorescens* through chromosomal integration of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis genes. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50(8): 775-781.
- [ 16 ] Franke-Whittle I H, Knapp B A, Fuchs J, Kaufmann R, Insam H. Application of COMPOCHIP microarray to investigate the bacterial communities of different composts. *Microbial Ecology*, 2009, 57(3): 510-521.
- [ 17 ] Benizri E, Piutti S, Verger S, Pagès L, Vercambre G, Poessel J L, Michelot P. Replant diseases: Bacterial community structure and diversity in peach rhizosphere as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37(9): 1738-1746.
- [ 18 ] Milling A, Smalla K, Maida F X, Schlöter M, Munch J C. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. *Plant and Soil*, 2005, 266(1/2): 23-39.
- [ 19 ] Kirk J L, Beaudette L A, Hart M, Moutoglou P, Klironomos J N, Lee H, Trevors J T. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 58(2): 169-188.

- [20] Sardans J, Peñuelas J, Prieto P, Estiarte M. Drought and warming induced changes in P and K concentration and accumulation in plant biomass and soil in a Mediterranean shrubland. *Plant and Soil*, 2008, 306(1/2): 261-271.
- [21] Lee C S, Li X D, Shi W Z, Cheung S C, Thornton I. Metal contamination in urban, suburban, and country park soils of Hong Kong: A study based on GIS and multivariate statistics. *Science of the Total Environment*, 2006, 356(1/3): 45-61.
- [22] Nelson D W, Sommers L E. Total carbon, organic carbon, and organic matter // Sparks D L, Page A L, Helmke P A, Loeppert R H, Soltanpour P N, Tabatabai M A, Johnson C T, Sumner M E, eds. *Methods of Soil Analysis. Part 3—Chemical Methods*. Madison: Soil Science Society of America Inc., 1996: 961-1010.
- [23] Keeney D, Nelson D. Nitrogen-inorganic forms // Page A L, Miller R H, Keeney D R, eds. *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy, 1982: 643-698.
- [24] Zhao J, Wu X B, Nie C P, Wu T, Dai W H, Liu H, Yang R Y. Analysis of unculturable bacterial communities in tea orchard soils based on nested PCR-DGGE. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(5): 1967-1979.
- [25] Good I J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 1953, 40(3/4): 237-264.
- [26] Chao A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics*, 1987, 43(4): 783-791.
- [27] Ashelford K E, Chuzhanova N A, Fry J C, Jones A J, Weightman A J. New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(9): 5734-5741.
- [28] Moyer C L, Dobbs F C, Karl D M. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(3): 871-879.
- [29] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1995, 59(1): 143-169.
- [30] Sogin M L, Morrison H G, Huber J A, Mark W D, Huse S M, Neal P R, Arrieta J M, Herndl G J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(32): 12115-12120.
- [31] Sun L, Qiu F B, Zhang X X, Dai X, Dong X Z, Song W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology*, 2008, 55(3): 415-424.
- [32] Shannon C E, Weaver W. *The Mathematical Theory of Communication*. Urbana IL: University of Illinois Press, 1949: 3-18.
- [33] Cottrell M T, Kirchman D L. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12): 5116-5122.
- [34] Jorquera M A, Crowley D E, Marschner P, Greiner R, Teresa Fernández M, Romero D, Menezes-Blackburn D, de la Luz Mora M. Identification of beta-propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. *Fems Microbiology Ecology*, 2011, 75(1): 163-172.
- [35] Leveau J H J, Uroz S, de Boer W. The bacterial genus *Collimonas*: mycophagy, weathering and other adaptive solutions to life in oligotrophic soil environments. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(2): 281-292.
- [36] Xu C W, Yang M Z, Chen Y J, Chen L M, Zhang D Z, Mei L, Shi Y T, Zhang H B. Changes in non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria inhabiting rhizosphere soils of an invasive plant *Ageratina adenophora*. *Applied Soil Ecology*, 2012, 54: 32-38.
- [37] Veglió F, Beolchini F, Gasbarro A. Biosorption of toxic metals: an equilibrium study using free cells of *Arthrobacter* sp. *Process Biochemistry*, 1997, 32(2): 99-105.
- [38] Wakelin S A, Chu G X, Lardner R, Liang Y C, McLaughlin M. A single application of Cu to field soil has long-term effects on bacterial community structure, diversity, and soil processes. *Pedobiologia*, 2010, 53(2): 149-158.