

林贵兵, 万德光, 严铸云, 等. 基于 PCR-DGGE 的中江丹参轮作期间土壤细菌遗传多样性变化特征[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 48-51.

基于 PCR-DGGE 的中江丹参轮作期间土壤细菌遗传多样性变化特征

林贵兵^{1,2}, 万德光², 严铸云², 杨新杰³, 刘 涛⁴

(1. 江西中医药大学药学院, 江西南昌 330004; 2. 成都中医药大学中药材标准化教育部重点实验室, 四川成都 610075;

3. 陕西中医学院, 陕西咸阳 712046; 4. 成都大学, 四川成都 610106)

摘要: 为了解四川中江丹参轮作期间土壤细菌遗传多样性变化特征, 分离提取土壤微生物 DNA, 以细菌通用引物 PCR 扩增, DGGE 分离, 切割条带、回收并测序, 在 GenBank 中查得菌种。结果表明, 中江丹参轮作期间, 土壤细菌主要群落包括: *Alpha proteobacterium*, *Sphingomonas* sp., Uncultured bacterium isolate LH2-12, Uncultured bacterium isolate DGGE gel band h, Uncultured *Arthrobacter* sp., Uncultured bacterium isolate DGGE gel band a1-11, Uncultured *Sphingomonas* sp.。休种 1 年与当年种植丹参土壤细菌多样性相似, 而与休种 3 年土壤细菌种群结构有明显差异; 休种第 2 年属于过渡。说明中江丹参轮作期休种为其土壤细菌群落遗传多样性逐渐恢复平衡过程; 且休地第 2 年是关键时期, 与笔者前期采用培养法及土壤真菌群落结构相关的研究结果一致。

关键词: 丹参土壤细菌; PCR-DGGE; 遗传多样性; 变化特征

中图分类号: S567.5⁺30.1; S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0048-04

丹参为唇形科植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 的干燥根及根茎, 具有祛瘀止痛、活血调经、养心除烦的功效。在中药材生产质量管理规范(GAP)实施过程中, 中药材种植快速发展; 但也出现了一些严重的问题, 如连作障碍。丹参忌连

收稿日期: 2013-08-20

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81173493); 国家科技支撑计划(编号: 2006BAI09B03-4)。

作者简介: 林贵兵(1981—), 男, 四川自贡人, 博士, 讲师, 研究方向为中药资源可持续利用与药材质量标准化。Tel: (0791) 87118997; E-mail: linguibing897@gmail.com。

通信作者: 严铸云, 博士。E-mail: cdtemyan@126.com。

适的作用浓度, 以建立更加快捷的蓖麻花药愈伤增殖培养方法。

参考文献:

- [1] 郑 鹭, 祁建民, 陈绍军, 等. 蓖麻遗传育种进展及其在生物能源与医药综合利用潜力[J]. 中国农学通报, 2006, 22(9): 109-113.
- [2] 陈永胜, 王永佳, 王 莹, 等. 蓖麻毒蛋白 A 链基因 RNAi 转化研究[J]. 西北植物学报, 2013, 33(1): 39-42.
- [3] 王文跃, 李国瑞, 黄凤兰, 等. 蓖麻茎秆 cDNA-AFLP 反应体系的建立[J]. 华北农学报, 2013, 28(2): 86-90.
- [4] 代建丽, 宋婵婵, 徐 晨, 等. 库拉索芦荟组织培养褐化现象的抑制研究[J]. 安徽农学通报, 2013, 19(6): 23-24.
- [5] 郑 颖, 秦红玫, 黎云祥. 台湾椴木组织培养中污染和褐化的防止[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(2): 64-65, 117.
- [6] 徐耀华, 杨春华, 刘晓波, 等. 扁穗牛鞭草组织培养中褐化控制技术初探[J]. 草业科学, 2013, 30(2): 212-217.
- [7] 杨亚萍, 郑新强. 茶树组织培养中的褐化控制研究[J]. 茶叶, 2013, 39(1): 3-7.
- [8] 黄凤兰, 萨日娜, 孟凡娟, 等. 蓖麻花药愈伤组织诱导的研究[J].

作, 连作导致病虫害严重, 其质量和产量明显下降^[1]。土壤生物环境恶化是引起作物连作障碍形成的主要机制之一^[2]。研究表明, 土壤微生物群落结构多样性与土传病害、连作障碍有着密切的关系^[3]; 对地黄^[4]、麦冬^[5]和苍术^[6]研究认为, 土壤微生物群落失衡是引起连作障碍的主要因素之一。在前期的研究中, 通过纯培养法试验发现, 种植丹参的土壤中各类微生物数量与群落结构发生变化, 重新建立土壤生态系统平衡; 栽培丹参后土壤微生物群落自然恢复间隔至少为 2 年^[7]。前期的研究方法主要是通过培养法研究土壤微生物群落, 但此法只能对土壤中的可培养优势微生物进行分析, 而土壤中有绝大部分是不可培养微生物, 因此培养法不能全面

作物杂志, 2009(6): 59-63, 后插 1.

- [9] 邵志敏, 陈永胜, 黄凤兰, 等. 低温预处理与光照条件对蓖麻花药愈伤组织诱导的影响[J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2012, 27(2): 189-193.
- [10] 李国瑞, 黄凤兰, 王文跃, 等. 蓖麻花药愈伤组织诱导条件优化[J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2012, 27(6): 670-673.
- [11] 刘 强, 张春庆, 巩东营. 玉米花药培养中影响褐变的几个因素的初步研究[J]. 玉米科学, 2005, 13(1): 39-40, 43.
- [12] 钱春艳, 曹有龙, 段安安, 等. 枸杞花药培养若干影响因素的研究[J]. 江苏农业科学, 2010(6): 76-78.
- [13] Gland A, Lichter R, Schweiger H G. Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica napus* L. [J]. Journal of Plant Physiology, 1988, 132(5): 613-617.
- [14] Johansson L B, Calleberg E, Gedin A. Correlations between activated charcoal, Fe-EDTA and other organic media ingredients in cultured anthers of *Anemone canadensis* [J]. Physiologia Plantarum, 1990, 80(2): 243-247.

反映其微生物群落。本试验以 PCR-DGGE 技术研究中江丹参栽培轮作休地期间其土壤细菌群落遗传多样性变化特征,以揭示细菌群落结构在土壤微生物群落平衡自然恢复的变化特征,为丹参栽培地轮作期间土壤退化的修复以及缓解连作障碍提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试土壤基本情况

试验区设在四川中江石泉镇范围内,104°35'26"E,30°57'04"N,属中亚热带湿润气候区;年平均气温 16.5℃,年均降雨量 1 200~1 400 mm;地形为台地,地势较平坦,面积 1 km²,土壤属红黄壤,海拔 750 m。

2008 年 3 月在试验区范围内,选取丹参休种(现为油菜)1~4 年的样地,长宽在 20 m×10 m 以上;每一休种年选 5 块样地,丹参休种期间,为油菜-小麦的轮作体系;采用双“S”法采样与四分法取 1.0 kg 土壤,用牛皮纸袋装好,带回实验室,在 4℃ 下保存备用,1 月内进行土壤微生物分析。

1.2 土壤微生物的解离

取土壤样品 2.0 g,加入 20 g/L 的偏磷酸钠(pH 值 8.5,含 10 g/L 的聚乙烯吡咯烷酮 K30),涡旋振荡,离心,去上清液。

1.3 土壤微生物 DNA 提取方法

参照文献[8-11],略作改良,具体如下:(1)取沉淀于 SDS 裂解液中涡旋;(2)68℃ 温浴 1 h,同时轻轻摇动,12 000 r/min 离心,取上清液体;(3)加入 0.125 倍体积的 5 mol/L 的醋酸钾和 0.42 倍的 40% 的 PEG-8000;在 -20℃ 下沉淀约 15 min,12 000 r/min 离心 15 min,去上清液;(4)加入 CTAB 提取液中溶解沉淀,68℃ 温浴 15 min,加入等体积的氯仿/异戊醇,轻柔混匀,12 000 r/min 离心 10 min;(5)在 DNA 上清液中加入 0.6~1.0 倍体积的异丙醇,-20℃ 放置 3 h 以上,13 000 r/min 离心 20 min;(6)用 70% 乙醇洗 DNA 2~3 次,自然晾干,加无菌水溶解备用。

1.4 DNA 检测

用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

1.5 PCR 过程

参照文献[12-13]的方法,从土壤中提取的 DNA 扩增 16S rDNA 基因 V-3 区扩增引物:F341:5'-CCTACGGGAG-GCAGCAG-3';R518:5'-ATT ACCGCGGCTGCTGG-3';Gc.-F338:5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGCGGGG-

GCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'。

PCR 反应 50 μL 体系:10×缓冲液 5 μL,dNTP(25 mmol/L)4 μL,Mg²⁺(25 mmol/L)5 μL,引物 NS1/GC.-Fungi 各 1 μL,DNA 模板 1~5 μL,Taq DNA 聚合酶 2.5 U(预变性后加入)(大连宝生物工程有限公司),补充 ddH₂O 至总体积 50 μL。PCR 反应程序为:94℃ 变性 5 min;94℃ 1 min,65℃ 1 min,72℃ 1 min,20 个循环;72℃ 延伸 5 min。

1.6 DGGE 电泳

采用 30%~70% 的变性梯度(100% 的变性剂含 40% 的去离子甲酰胺和 7 mol/L 的尿素),10% 的聚丙烯酰胺凝胶,凝胶体系中过硫酸铵浓度为 0.03%,TEMED 浓度为 0.15%。胶完全凝固后,在每加样孔加含有 10% 加样缓冲液的 PCR 样品 20 μL。在电压 120 V、60℃ 下电泳 320 min。电泳完成后对胶片进行银染。

1.7 回收 DNA 片断

参照文献[14-15],略作改良,在凝胶尚未完全干燥时用手术刀片切取回收的 DNA 条带,放到 Eppendorf 管内,超纯水洗涤,去超纯水。将凝胶碾碎,加超纯水,浸泡 5 h 以上,短暂离心后取上清液 1 μL 作为第二次 PCR 扩增的模板。

第 2 轮 PCR 体系:10×缓冲液 5 μL,dNTP(25 mmol/L)4 μL,Mg²⁺(25 mmol/L)5 μL,引物 F341/R518 各 1 μL,补充 ddH₂O 模板总体积 50 μL,DNA 1~5 μL,Taq DNA 聚合酶 2.5 U(预变性后加入)(大连宝生物工程有限公司)。PCR 反应程序为:94℃ 变性 5 min;94℃ 1 min,65℃ 1 min,72℃ 1 min,20 个循环;72℃ 延伸 5 min。

1.8 PCR 产物纯化

用广州东盛生物科技有限公司生产的 PCR 产物纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化。

1.9 数据处理

采用统计分析软件 NASYS-pc 2.10 进行遗传距离计算和聚类分析,DNA 测序采用 CLUSTAL X 1.81 软件,进化树分析采用 MEGA 4.0 软件。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物 DNA 提取检测结果

土壤微生物 DNA 提取的琼脂糖凝胶电泳结果见图 1,DNA 片断大小约为 20 kb。条带的亮度强弱不一,可能是此方法提取不同田块土壤微生物的 DNA 的量不同,或者土壤本身的微生物数量有较大的差异。

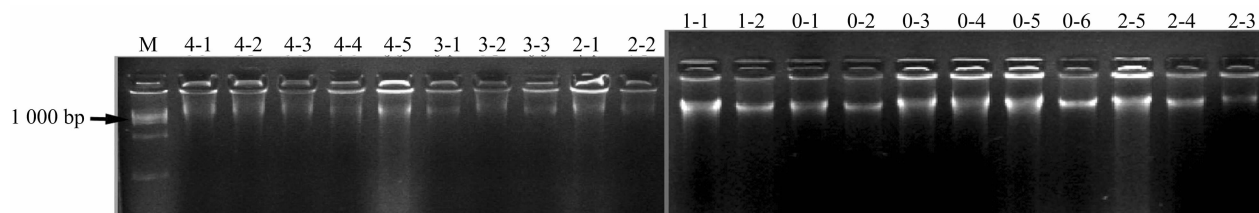
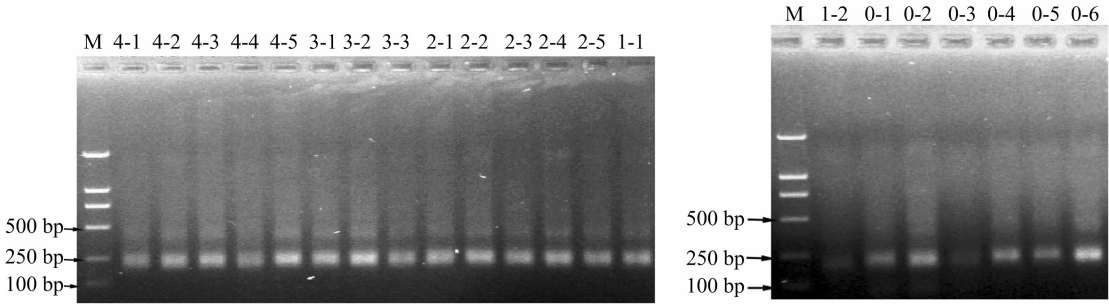


图1 土壤微生物提取DNA琼脂糖电泳图

2.2 PCR 产物检测结果

图 2 显示供试样品 DNA 扩增产物在 230 bp 左右,阴性

对照则没有明显的亮带。说明提取的 DNA 方法适合 PCR 扩增。在扩增片断琼脂糖凝胶检测的电泳图片中,条带亮度有



4-1、4-2、4-3、4-4、4-5 分别表示丹参休种 4 年的 1、2、3、4、5 号样地；3-1、3-2、3-3 分别表示丹参休种 3 年的 1、2、3 号样地；2-1、2-2、2-3、2-4、2-5 分别表示丹参休种 2 年的 1、2、3、4、5 号样地；1-1、1-2 分别表示丹参休种 1 年的 1、2 号样地；0-1、0-2、0-3、0-4、0-5、0-6 分别表示当年种植丹参的 1、2、3、4、5、6 号样地。

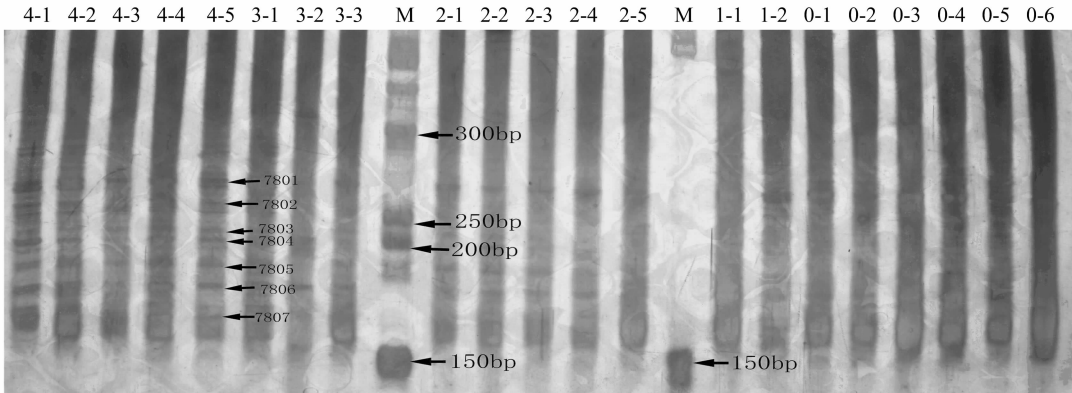
图2 土壤微生物DNA PCR扩增产物

差异,可能由于 DNA 提取时存在少量杂质或降解的 DNA 片断导致 PCR 效果较差。

2.3 DGGE 电泳结果

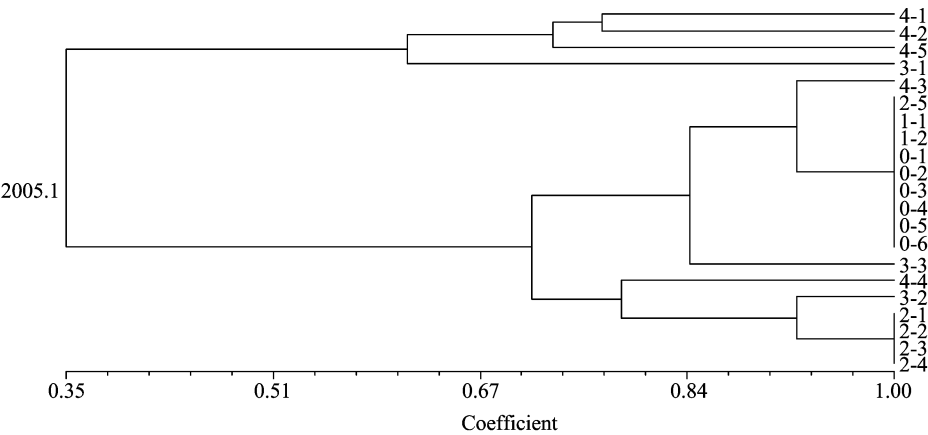
图 3 显示,条带在 300 bp 至 150 bp 大小区间选取清晰条带,其中丹参休种 4 年的样地,其细菌多样性条带较多且清晰,而当年种植丹参的土壤,其细菌多样性条带模糊,可以初步推断栽培丹参对土壤细菌群落有影响,随着丹参休种年限

的延长,细菌多样性在逐渐恢复平衡。通过聚类分析,图 4 所示,丹参休种 4 年的土壤细菌群落聚为一支,丹参休种 1 年和当年种植丹参的土壤细菌群落聚为一支,丹参休种 3 年的土壤细菌群落聚为一支,丹参休种 2 年的土壤细菌群落却是分散的,可以看出,丹参休种的第 3 年是土壤细菌群落自然恢复的关键时期,是人工干预恢复土壤细菌群落结构的最佳时期。



4-1、4-2、4-3、4-4、4-5 分别表示丹参休种 4 年的 1、2、3、4、5 号样地；3-1、3-2、3-3 分别表示丹参休种 3 年的 1、2、3 号样地；2-1、2-2、2-3、2-4、2-5 分别表示丹参休种 2 年的 1、2、3、4、5 号样地；1-1、1-2 分别表示丹参休种 1 年的 1、2 号样地；0-1、0-2、0-3、0-4、0-5、0-6 分别表示当年种植丹参的 1、2、3、4、5、6 号样地。

图3 中江丹参产地丹参休种期间土壤细菌群落遗传多样性DGGE图谱



4-1、4-2、4-3、4-4、4-5 分别表示丹参休种 4 年的 1、2、3、4、5 号样地；3-1、3-2、3-3 分别表示丹参休种 3 年的 1、2、3 号样地；2-1、2-2、2-3、2-4、2-5 分别表示丹参休种 2 年的 1、2、3、4、5 号样地；1-1、1-2 分别表示丹参休种 1 年的 1、2 号样地；0-1、0-2、0-3、0-4、0-5、0-6 分别表示当年种植丹参的 1、2、3、4、5、6 号样地。

图4 中江丹参产地丹参休种期间土壤细菌群落遗传多样性聚类分析

对 DGGE 条带进行 DNA 测序(由大连宝生物工程有限公司完成),并将 DNA 序列在 NCBI 的 GenBank 上进行核酸序列的 Blast 对比,结果见表 1。通过扩增序列查得的菌种有:*Alpha proteobacterium*,*Sphingomonas* sp.,Uncultured bacteri-

um isolate LH2 - 12,Uncultured bacterium isolate DGGE gel band h,Uncultured *Arthrobacter* sp.,Uncultured bacterium isolate DGGE gel band a1 - 11,Uncultured *Sphingomonas* sp.,对细菌菌种作系统进化树分析结果如图 5。

表 1 中江丹参产地土壤细菌种类

编号	登录号	最相似菌	一致性(%)
7801	GQ350707.1	Uncultured <i>Alpha proteobacterium</i> clone SHBH1021 16S ribosomal RNA gene	95
7802	EF554984.1	Uncultured <i>Sphingomonas</i> sp. isolate DGGE gel band AtRSS1 16S ribosomal RNA gene	97
7803	EU440442.1	Uncultured bacterium isolate LH2 - 12 16S ribosomal RNA gene	100
7804	EF590131.1	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band h 16S ribosomal RNA gene	96
7805	GQ289414.1	Uncultured <i>Arthrobacter</i> sp. isolate DGGE gel band L2B5 16S ribosomal RNA gene	94
7806	GU227556.1	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band a1 - 11 16S ribosomal RNA gene	91
7807	GQ289421.1	Uncultured <i>Sphingomonas</i> sp. isolate DGGE gel band L5B4 16S ribosomal RNA gene	95

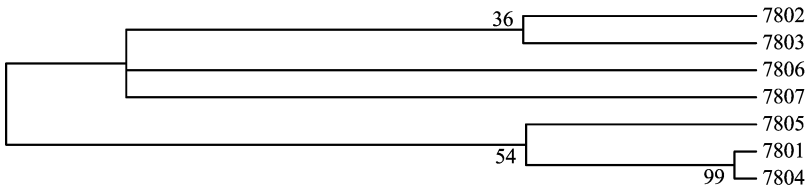


图5 中江丹参产地土壤细菌系统进化树

3 讨论

本试验采用 PCR - DGGE 技术研究土壤细菌群落结构变化特征,结果表明,四川中江丹参种植和休种期间,其土壤细菌群落遗传多样性发生了变化,导致土壤微生物结构发生改变,且在不同的丹参休种年限之间差异明显,特别是在栽培丹参后休种第 2 年属于过渡阶段,是土壤细菌群落失衡恢复的重要时期。这对采用改良土壤微生态环境以缓解丹参连作障碍有重要的实用指导价值,有利于揭示丹参连作障碍形成关键因素。

PCR - DGGE 法研究土壤微生物群落结构具有快速、可重复性等优点,在近几年来研究土壤微生物生态等领域研究上得到广泛应用,克服了传统培养法培养微生物种群局限性的缺点,能对土壤中不可培养的微生物菌群进行研究^[16]。但是,本技术依赖于对土壤微生物 DNA 提取技术和 PCR 技术,因此 DNA 提取的土壤微生物菌群的全面性和 PCR 扩增的引物、扩增条件优化等因素对 DGGE 分离菌群丰富度具有至关重要的影响。

参考文献:

[1]张辰露,孙 群,叶 青. 连作对丹参生长的障碍效应[J]. 西北植物学报,2005,25(5):1029 - 1034.
[2]张子龙,王文全. 植物连作障碍的形成机制及其调控技术研究进展[J]. 生物学杂志,2010,27(5):69 - 72.
[3]郑良永,胡剑非,林昌华,等. 作物连作障碍的产生及防治[J]. 热带农业科学,2005,25(2):58 - 62.
[4]陈 慧,郝慧荣,熊 君,等. 地黄连作对根际微生物区系及土壤酶活性的影响[J]. 应用生态学报,2007,18(12):2755 - 2759.

[5]李芳琼. 不同连作年限麦冬根际土壤微生物区系动态研究[J]. 土壤通报,2006,37(3):563 - 566.
[6]郭兰萍,黄璐琦,蒋有绪,等. 栽培苍术根际土壤微生物变化[J]. 中国中药杂志,2007,32(12):1131 - 1133.
[7]林贵兵,万德光,杨新杰,等. 四川中江丹参栽培地轮作期间土壤微生物的变化特点[J]. 中国中药杂志,2009,34(24):3184 - 3187.
[8]陈旭玉,周亚奎,余贤美,等. 一种直接用于 PCR 的土壤微生物 DNA 提取方法[J]. 中国农学通报,2008,24(4):33 - 36.
[9]张瑞福,曹 慧,崔中利,等. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化[J]. 微生物学报,2003,43(2):276 - 282.
[10]Yeates C, Gillings M R, Davison A D, et al. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification[J]. Biological Procedures Online,1998,1(1):40 - 46.
[11]徐晓宇,闵 航,刘 和,等. 土壤微生物总 DNA 提取方法的比较[J]. 农业生物技术学报,2005,13(3):377 - 381.
[12]Carter M R. Soil quality for sustainable land management: organic matter and aggregation interactions that maintain soil functions[J]. Agronomy Journal,2002,94:38 - 47.
[13]Doran J W, Sarrantonio M, Liebig M A. Soil health and sustainability[J]. Advances in Agriculture,1996,56:1 - 54.
[14]胡元森,吴 坤,李翠香,等. 黄瓜连作对土壤微生物区系影响 II. 基于 DGGE 方法对微生物群落遗传的变化分析[J]. 中国农业科学,2007,40(10):2267 - 2273.
[15]李卫东,孟祥文,李 伟,等. 一种从银染后聚丙烯酰胺凝胶中回收、克隆 DNA 的方法[J]. 中华医学遗传学杂志,1997,14(6):58 - 59.
[16]胡宇容,叶小梅,常志州,等. 沼气池微生物生态群落 PCR - DGGE 分析方法研究[J]. 江苏农业科学,2012,40(3):39 - 42.