

周虹,杨占武. 青藏高原高寒沙区小叶锦鸡凋落物下土壤细菌菌群的 DGGE 分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):353-356.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.110

青藏高原高寒沙区小叶锦鸡凋落物下土壤细菌菌群的 DGGE 分析

周虹¹,杨占武²

(1. 青海大学,青海西宁 810016;2. 青海大学农林科学院,青海西宁 810016)

摘要:为了解青藏高原高寒沙区小叶锦鸡凋落物下土壤细菌菌群多样性,用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术对青海省沙珠玉荒漠人工植被恢复区小叶锦鸡儿凋落物下土壤细菌群落的 16S rDNA 片段进行电泳分离,用 Quantity One 软件和 Image J 软件进行图谱分析和灰度值分析,并对主要条带进行回收测序。结果表明,不同年代植被恢复区、凋落物下土壤微生物多样性差别不大,而小叶锦鸡儿丛下和丛间凋落物种群结构相似,但丛下微生物含量普遍比丛间高。特异条带的回收测序结果表明,研究区土壤中优势微生物大部分是非培养的,另外还有鞘氨醇单胞菌、泛菌属、黄色杆菌属。

关键词:青藏高原;沙区;小叶锦鸡;凋落物;土壤菌群;DGGE

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0353-04

土壤微生物是衡量土壤是否健康的重要指标,也是土壤退化与否的指标之一。在凋落物分解过程中,一般认为生物因素是主导因子,分解前期土壤动物贡献较大,分解后期主要是微生物的作用^[1]。由于能够通过传统实验室培养的菌种只占自然界菌种的很少一部分,这对微生物多样性研究造成了很大困难^[2]。变性梯度凝胶电泳(DGGE)是近几年被广泛用于微生物多态性分析的分子生物学技术,它克服了传统培养方法的缺陷,能够直接从土壤中提取总 DNA,分析其中 16S rDNA 序列的多态性,快速有效地分析环境中的微生物群落结构,是研究土壤微生物群落的有效手段之一^[3]。作为世界上独一无二的地理单元,由于自然因素和人类活动增加,青藏高原荒漠化日益严重。本研究通过模拟荒漠中主要有机物来源凋落物的分解过程,研究凋落物下土壤微生物的动态变化,以期对青藏高原荒漠生态系统的研究和管理提供参考。

1 材料与与方法

1.1 研究区域概况

研究区选在青海省海南州共和县沙珠玉乡的荒漠人工植被恢复区。该地区海拔 2 871 ~ 3 870 m,年平均气温 2.4 °C,降水主要集中在 7—9 月份,属于典型的高寒沙区。沙漠化在该区以风蚀、风沙流、沙丘前移等方式对自然资源、生态、人民生活造成严重危害^[4-5]。选取沙珠玉乡的 1964、1977、1994、2003、2011 年人工植被恢复区作为研究样区。

1.2 土样采集

2014 年 9 月在各样区小叶锦鸡儿的丛下和丛间安置分别装有叶和果荚 2 种凋落物的尼龙网袋,模拟凋落物的自然降解,每个处理 3 次重复。2015 年 3 月采集凋落物袋下的土壤样品作为试验材料。每次采样时垂直取不同恢复区丛下和丛间不同位置以及装有不同凋落物的尼龙网袋下 5 ~ 20 cm 表层土。另外,基于研究区环境特征,特别是对生物土壤结皮特征的分析,选取研究区附近无小叶锦鸡儿生长的自然结皮下土壤以及流动沙地土壤作为对照,采用“四分法”均匀混合后装入无菌封口聚乙烯袋,带回实验室后, -20 °C 保存。

1.3 DNA 的提取

采用 FastDNA™ SPIN Kit For Soil 试剂盒提取样品基因组 DNA。

1.4 细菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增

以样品基因组 DNA 为模板,采用细菌通用引物 GC-338 F、518 R(表 1)扩增样品 16S rDNA 高变区序列。

表 1 引物信息

引物	序列(5'→3')
338F	CCTACGGGAGGCAGCAG
518R	ATTACCGGGCTGCTGG
GC338F	CGCCCGGGCGCCCGGGCGGGCGGGGGC - CGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG

PCR 扩增体系: 10 × PCR buffer 5 μL; 2.5 mmol/L dNTP 3.2 μL; 5 U/μL *rTaq* 0.4 μL; 20 μmol/L GC-338F 1 μL; 20 μmol/L 518R 1 μL; 模板 DNA 50 ng; 补 ddH₂O 至 50 μL。

PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

PCR 产物采用 OMEGA 公司 DNA Gel Extraction Kit 纯化回收。

PCR 仪为 Biometra 公司生产,型号为 T-gradient;凝胶成

收稿日期:2015-05-29

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAD16B0105)。

作者简介:周虹(1991—),女,青海西宁人,硕士研究生,研究方向为荒漠化防治。E-mail:569221737@qq.com。

通信作者:杨占武,男,青海西宁人,副研究员,研究方向为荒漠化防治。E-mail:yangzhanw90@126.com。

像仪为 Bio-Rad 公司生产,采用 Gel-Doc2000 凝胶成像系统。

1.5 PCR 产物的 DGGE 分析

取 10 μ L PCR 产物进行 DGGE 分析。采用变性梯度 35%~55%、浓度 7% 的聚丙烯酰胺凝胶在 1 \times TAE 缓冲液中 150 V 60 $^{\circ}$ C 下电泳 5 h。DGGE 完毕后,采用银染法染色,步骤如下:(1)固定液(乙醇 50 mL、冰乙酸 2.5 mL,定容至 500 mL)固定 15 min;(2)Milli-Q 纯水清洗,20 s、2 min 各 1 次;(3)银染液(硝酸银 1 g、37% 甲醛 0.75 mL,定容至 500 mL)染色 15 min;(4)Milli-Q 纯水清洗,20 s、2 min 各 1 次;(5)显色液(氢氧化钠 7.5 g、37% 甲醛 2.5 mL,定容至 500 mL)显色 5~7 min;(6)用终止液(乙醇 50 mL、冰乙酸 2.5 mL,定容至 500 mL)终止反应。

1.6 DGGE 图谱中优势条带的回收

用灭菌的手术刀切下待回收 DGGE 条带,采用 OMEGA 公司生产的 Poly-Gel DNA Extraction Kit 回收纯化试剂盒回

收目的条带。采用 Quantity One 和 Image J 软件分析 DGGE 图谱。

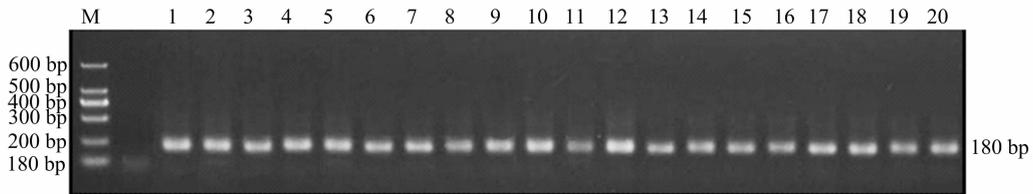
1.7 测序分析及比对

对割胶回收的 DNA 片段进行扩增。反应体系与“2.3”节中一致。扩增片段送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行分析。将测得的基因序列与 NCBI 数据库比对,选择序列匹配程度最高的作为测序结果。

2 结果与分析

2.1 细菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增结果

以土壤总 DNA 为模板,用细菌通用引物 GC-338 F 和 518 R 对样品的 16S rDNA 高变区序列进行扩增,图 1 是扩增后经过 1% 琼脂糖凝胶电泳以后的成像情况。由图 1 可见,得到的扩增片段长度均在 180 bp 左右,所得的目标片段特异型好,没有产生杂带,能够满足 DGGE 要求。

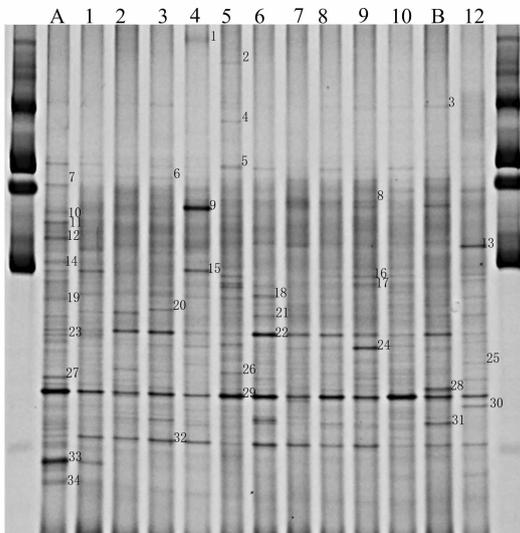


1~5分别为1964、1977、1994、2003、2011年恢复区丛下凋落叶下土样;6~10分别为1964、1977、1994、2003、2011年恢复区丛间凋落叶下土样;11~14分别为1964、1977、1994、2003年恢复区丛下凋落果荚下土样;15~18分别为1964、1977、1994、2003年恢复区丛间凋落果荚下土样;19—沙地;20—自然结皮下土壤

图1 PCR产物电泳情况

2.2 DGGE 图谱多样性分析

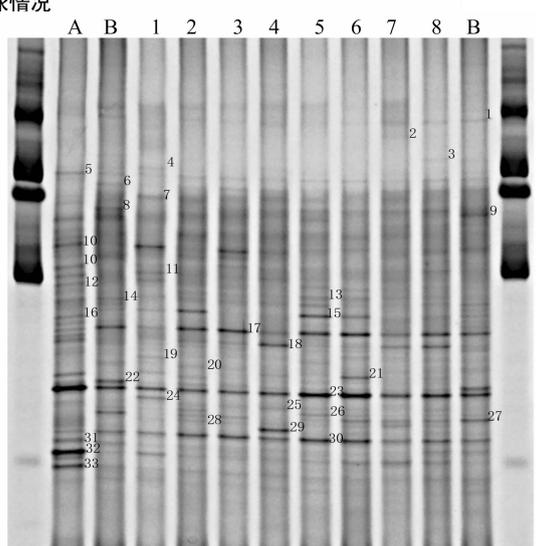
以细菌的通用引物 GC-338F 和 518R 扩增样品 16S rDNA 高变区序列,分 2 板进行变形梯度凝胶电泳,得到板 1 和板 2 的图谱分别如图 2、图 3 所示。



A为沙地;B为自然结皮下土壤;1~5分别为1964、1977、1994、2003、2011年恢复区丛下凋落叶下土样;6~10分别为1964、1977、1994、2003、2011年恢复区丛间凋落叶下土样;12为1964年丛下凋落果荚下土壤;M为DNA标准DL2000

图2 不同年代叶凋落物下土壤菌群的 DGGE 图谱

DGGE 图谱中不同泳道分别表示不同植被恢复年代、凋落物、位置下的土壤细菌丰富度。如图 2、图 3 所示,图谱中



A为沙地;B为自然结皮下土壤;1~4分别为1964、1977、1994、2003年恢复区丛下凋落果荚下土样;5~8分别为1964、1977、1994、2003年恢复区丛间凋落果荚下土样;M为DNA标准DL2000

图3 不同年代果荚凋落物下土壤菌群的 DGGE 图谱

电泳条带数量、强度有差异,这可以充分反映土壤中细菌的多样性差异。不同样品之间含有共同条带,则说明它们之间可能含有共有的菌种,但由于条带深浅不一,表示含该菌种的量会有一定差异。结合图 2、图 3,能够看到板 1-5、板 1-13(板 2 的 10)、板 1-22(板 2-17)、板 1-29(板 2-23)、板 1-32(板 2-30)、板 1-33(板 2-32)是整个研究区的共有

菌群,其中板1-22、板1-29、板1-32是优势菌群。

比较不同植被恢复年代下凋落物相同的土壤样品条带发现,菌种种类并无太大差异,主要区别在于个别菌种含量不同,表现为恢复年代长的样品中,共有菌群的条带普遍较恢复年代短的样品深。这是由于凋落物分解是一个长期过程,采用尼龙网袋模拟自然降解,回收时间较短,并不能完全反映不同年代小叶锦鸡下凋落物的分解状况;而恢复年代较长的小叶锦鸡下,因为凋落物的长年积累,使其固有土壤菌群的数量也有一定积累。对丛下和丛间相同凋落物下的土壤样品条带比较发现,丛下细菌的丰富度和个别菌种含量均高于丛间,这可能是由于丛下和丛间微环境的不同而导致,丛下受到小叶锦鸡树丛的遮盖,使水分不易被蒸发,阳光不能直射,为微生物的生长创造了更有利的条件。对不同凋落物样品进行比较,菌种种类差别不大,板1-1、板1-2只出现在2003、2011年丛下的叶凋落物土壤样品中。板2-2、板2-3只出现在1994、2003年丛间果夹凋落物土壤样品中,成为其特异类群。

A泳道沙地样品的微生物丰富度很高,是由于高原气候条件特殊,在没有植被的沙地,有许多嗜极菌的存在,而在有植被覆盖的土壤中,丰富度降低,表明植被调节微环境条件,使其下土壤微生物的种群结构发生变化。B泳道自然结皮下的土壤样品丰富度低于A泳道,高于有凋落物覆盖的土壤样品。

2.3 样品的相似性分析

为研究不同土壤样品间微生物群落的相似性,利用Quantity One软件(Bio-Rad)进行DGGE图谱分析,并绘制系统树(图4),结合相似性矩阵(图5)进行分析。

结合相似性分析和聚类分析可知,板1中各泳道的相似度大多为60%左右,其中8、9、10泳道的相似度较高,表明凋落叶在不同恢复年代的小叶锦鸡丛间环境中分解,其土壤细菌种群结构更为稳定。板2中7、8、9、10泳道的相似度较高,表明凋落果荚在不同恢复年代的小叶锦鸡丛间环境中分解,菌群结构变化相对不明显。

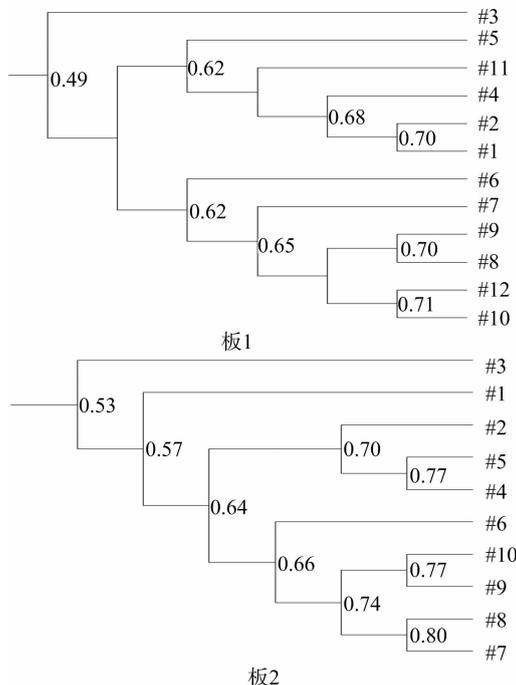


图4 DGGE 图谱聚类分析

泳道	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	100.0											
2	70.2	100.0										
3	47.5	51.2	100.0									
4	68.2	67.0	46.6	100.0								
5	59.0	59.4	59.0	65.9	100.0							
6	54.6	61.1	57.5	56.1	58.9	100.0						
7	64.0	63.3	47.8	64.2	56.0	64.7	100.0					
8	62.5	60.8	50.2	60.1	61.1	60.3	70.0	100.0				
9	55.5	52.4	44.1	56.6	52.0	60.4	59.6	70.4	100.0			
10	70.4	62.0	46.5	62.9	59.6	62.5	65.3	70.2	69.2	100.0		
11	64.0	68.3	47.6	66.0	62.0	63.6	65.1	61.0	58.5	64.3	100.0	
12	61.4	56.0	45.7	61.6	50.5	62.4	64.4	64.8	69.5	70.7	61.1	100.0

泳道	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	100.0									
2	54.9	100.0								
3	50.3	55.0	100.0							
4	64.7	71.2	53.1	100.0						
5	56.6	68.4	51.5	77.1	100.0					
6	50.9	57.6	53.9	63.2	63.3	100.0				
7	58.1	58.0	52.3	72.8	72.8	69.6	100.0			
8	60.8	56.2	49.2	68.5	64.3	58.8	79.6	100.0		
9	53.5	63.3	54.1	65.8	65.5	66.2	72.3	74.6	100.0	
10	54.9	57.2	54.4	65.3	62.9	70.4	76.1	74.0	77.4	100.0

图5 DGGE 图谱的相似性分析

2.4 克隆子序列的 Blast 对比分析

挑取图谱中条带颜色较深、差异性较大的条带(条带命

名来自 DGGE 图谱中数字标记),进行测序,将得到的碱基序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对,结果如表 2 所示。

表2 测序比对结果

条带	比对结果	相似度(%)	登录号
板1-3	<i>Uncultured Pedobacter</i> sp.	99	HM561504
板1-5	Uncultured bacterium	98	KM192311
板1-9	Uncultured bacterium	100	JQ369024
板1-22	<i>Sphingomonas</i> sp.	100	KC404011
板1-29	Uncultured bacterium	99	GQ425987
板1-32	Uncultured bacterium	99	KM154029
板2-10	Uncultured bacterium	99	GU552206
板2-15	Uncultured bacterium	100	JQ379008
板2-27	<i>Pseudolabrys</i> sp.	99	JX458452
板2-32	<i>Pantoea ananatis</i>	100	CP001875

序列同源性达97%以上,可确定为同一种;序列同源性达到95%以上,可把这些菌归为同一属^[6]。由表2可知,本

表3 灰度值结果

泳道	板1条带						板2条带			
	3	5	9	22	29	32	10	15	27	32
1	16 497.45	22 726.69	14 059.10	18 407.28	24 707.98	23 374.69	30 066.83	30 810.49	29 621.13	35 120.78
2	—	18 016.28	17 561.98	21 259.35	17 597.81	22 293.69	—	28 318.01	—	—
3	17 838.10	20 398.86	19 639.69	20 863.98	17 117.98	20 860.93	26 738.88	18 306.35	16 047.4	14 419.76
4	14 102.69	21 088.64	17 818.86	22 103.45	19 420.74	24 388.57	—	26 411.59	26 666.02	18 374.71
5	—	—	30 144.52	14 457.64	13 798.69	19 090.57	29 224.88	—	24 826.01	17 065.35
6	14 949.03	21 656.86	16 086.50	15 688.03	22 861.86	19 190.28	27 634.05	24 584.47	—	19 059.76
7	11 695.69	16 143.74	14 197.15	21 906.28	20 808.91	22 046.45	23 377.59	27 808.05	24 538.93	16 481.18
8	—	—	21 002.45	19 289.86	17 904.40	20 587.45	21 704.35	24 687.47	25 835.76	18 412.47
9	11 078.28	17 238.45	16 307.86	16 090.45	19 414.15	16 658.86	—	—	21 582.47	18 310.64
10	13 704.69	19 702.69	19 661.40	19 657.40	19 126.45	21 791.40	24 658.30	24 882.30	24 648.88	21 201.47
11	10 392.05	16 855.52	14 598.10	15 223.40	24 877.52	19 038.57	—	—	—	—
12	19 009.10	23 032.81	21 954.69	23 463.23	26 450.98	24 077.05	—	—	—	—

注:“—”表示未能扫出灰度值。

3 结论与讨论

目前,对于我国典型荒漠系统凋落物的分解机制和微生物的动态变化尚不十分清楚,尤其是对青藏高原高寒环境下的荒漠区凋落物研究十分欠缺^[8]。而青藏高原的独特环境决定了其重要性,对青藏高原生态环境的研究具有深远意义。本研究表明,土壤中可以培养的微生物非常有限,大部分土壤微生物因为无法培养而不被了解,DGGE分子学方法克服了这一缺陷,直接从土壤中提取出DNA,能够满足本研究需要。本研究选取了5个年代植被恢复区,同时放置尼龙网袋,模拟凋落物的自然降解,研究表明不同植被恢复年代对微生物多样性并无太大差异,菌种种类基本相似。本研究还对2种凋落物以及丛下和丛间2种放置位置下的微生物进行比较,发现菌种种类上的差异均不明显,但结合DGGE图谱和灰度值分析,发现丛下土壤微生物普遍比丛间土壤微生物含量高。该结果可能是因为凋落物分解是个漫长过程,它对土壤微生物的影响是长期积累的结果,虽然本研究选取了不同植被恢复年代进行对比,但由于是统一放置尼龙袋,凋落物在多样地的分解时间均为半年,所以各植被恢复年代的微生物多样性差别不大。而导致丛下和丛间微生物含量的差异,可能是由于丛下和丛间微环境的不同,造成温度和湿度等条件差异,给微生物生存提供了不同的生存条件所致。

研究样地的优势菌种多为非培养微生物,还包括鞘氨醇单胞菌、泛菌属和黄色杆菌属,从DGGE图谱看出样品土壤

研究的10个DGGE条带序列中,有7个与数据库中的非培养微生物16S rDNA相似,且相似度均在98%以上,其中板1-9、板2-15分别与收录序列JQ369024、JQ379008相似度达100%。板1-22是鞘氨醇单胞菌,板2-32是泛菌属,板2-27与收录序列为JX458452的黄色杆菌属相似度达99%。

2.5 灰度值分析

灰度值与DNA含量呈正比^[7]。为了进一步确定已挑取条带的DNA含量,用Image J软件对挑取条带进行灰度值扫描。从表3可以看出,绝大部分泳道中都存在挑取的条带,且灰度值的大小在DGGE图谱中得到了很好印证,即灰度值较大,条带就越深。说明挑取的条带具有共有菌种,但含量有所差异,能够反映土壤样品的多样性。

微生物多样性较高,但数量偏少,群落结构稳定,这为下一步研究奠定了基础。微生物作为凋落物的重要分解者,一直被研究者重视。但对于环境极端恶劣的高寒沙区,微生物生存机理还有待进一步探究。采用尼龙网袋法研究凋落物分解,大大减弱了某些土壤微生物的分解作用,因此有必要对研究方法进行改进,以期为准确探究凋落物分解提供依据。

参考文献:

- [1]李志安,邹碧,丁永祯,等.森林凋落物分解重要影响因子及其研究进展[J].生态学杂志,2004,23(6):77-83.
- [2]王岳坤,洪葵.红树林土壤细菌群落16S rDNA V3片段PCR产物的DGGE分析[J].微生物学报,2005,45(2):201-204.
- [3]张亚平,曹小妮,路盼盼,等.新疆泥火山群土壤真菌群落的DGGE分析[J].东北农业大学学报,2014,45(4):66-70.
- [4]张登山.青海共和盆地土地沙漠化影响因子的定量分析[J].中国沙漠,2000,20(1):60-63.
- [5]封建民,李晓华,张军利.基于马尔柯夫模型的青海共和盆地土地沙漠化预测[J].中国农学通报,2010,26(10):309-313.
- [6]侯军,林晓民,江芸,等.基于ITS序列分析对疑似白羊肚菌的分子鉴定[J].食品科学,2009,30(5):141-144.
- [7]涂宗财,马达,王辉,等.PCR-DGGE技术分析不同包装条件下鱼肉表面优势菌的菌群变化[J].食品科学,2014,35(20):143-147.
- [8]王相娥,薛立,谢腾芳.凋落物分解研究综述[J].土壤通报,2009,40(6):1473-1478.