

# 利用小亚基核糖体 RNA 技术分析温室黄瓜近根土壤古菌和真菌多样性

赵志祥<sup>1,2</sup>, 芦晓飞<sup>1</sup>, 陈国华<sup>1</sup>, 茆振川<sup>1</sup>, 杨宇红<sup>1</sup>, 刘二明<sup>2</sup>, 谢丙炎<sup>1</sup>

1 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081

2 湖南农业大学生物安全科技学院, 长沙 410128

**摘要:** 土壤古菌和真菌在温室生态系统是仅次于细菌的微生物, 具有类似于细菌的重要生态功能。通过构建古菌 16S rRNA 和真菌 18S rRNA 基因克隆文库, 分析温室黄瓜近根土壤古菌和真菌群落结构组成, 为开发利用温室这一特殊的生态环境中丰富的微生物资源以及理解微生物与植物间的互作提供参考依据。采用研磨-冻融-溶菌酶-蛋白酶 K-SDS 热处理以及 CTAB 处理等理化方法, 提取和纯化微生物总 DNA, 构建古菌 16S rRNA 和真菌 18S rRNA 基因克隆文库。利用 DOTUR 软件将古菌和真菌序列按照相似性 97% 的标准分成若干个可操作分类单元 (OTUs)。土壤古菌克隆文库主要包括泉古菌门和未分类的古菌两大类, 并有少部分广域古菌类群, 所有泉古菌均属于热变形菌纲, 共 45 个 OTUs; 真菌克隆文库包括真菌门的大多数亚门真菌, 共 24 个 OTUs, 未发现担子菌亚门真菌。古菌多样性比较丰富, 且发现少量的广域古菌 (甲烷菌), 这一情况可能与温室长期高温高湿, 高有机质含量, 土壤处于缺氧环境有关; 土壤真菌的优势种群为子囊菌, 占到土壤真菌的 80% 以上, 这可能与绝大多数植物真菌性病害属于土传病害, 通过菌丝体、菌核或子囊壳在土壤病残体中越冬有一定的关系。

**关键词:** 土壤微生物群落, 古菌 16S rRNA 基因, 真菌 18S rRNA 基因, 系统进化发育分析

## Diversity analysis of archaeal and fungal communities in adjacent cucumber root soil samples in greenhouse by small-subunit rRNA gene cloning

Zhixiang Zhao<sup>1,2</sup>, Xiaofei Lu<sup>1</sup>, Guohua Chen<sup>1</sup>, Zhenchuan Mao<sup>1</sup>, Yuhong Yang<sup>1</sup>, Erming Liu<sup>2</sup>, and Bingyan Xie<sup>1</sup>

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

**Received:** March 2, 2010; **Accepted:** April 30, 2010

**Supported by:** National Basic Research Program of China (No. 2009CB119000), Public Service Sectors (agriculture) Special Funding for Research (No. nyhyzx07-050), Key Projects in the National Science and Technology Pillar Program during the Eleventh Five-Year Plan Period (Nos. 2006BAD07B03, 2006BAD08A08, 2006BAD17B08).

**Corresponding author:** Bingyan Xie. Tel: +86-10-82109545; E-mail: xiebingyan2003@yahoo.com.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2009CB119000), 公益性行业 (农业) 科研专项经费 (No. nyhyzx07-050), 国家“十一五”国家科技支撑计划 (Nos. 2006BAD07B03, 2006BAD08A08, 2006BAD17B08) 资助。

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

**Abstract:** Soil archaea and fungi play important roles in the greenhouse soil ecosystem. To develop and apply rich microbial resources in greenhouse ecological environment, and to understand the interaction between microbes and plants, we constructed archaeal 16S rRNA and fungal 18S rRNA gene libraries to analyze the compositions of archaeal and fungal communities. Total greenhouse soil DNA was directly extracted and purified by skiving-thawing-lysozyme-proteinase K-SDS hot treatment and treatment of cetyltriethylammonium bromide (CTAB). After PCR amplification, retrieving, ligating, transforming, screening of white clones, archaeal 16S rRNA and fungal 18S rRNA gene libraries were constructed. The sequences of archaea and fungi were defined into operational taxonomic units (OTUs) when 97% similarity threshold for OTU assignment was performed by using the software DOTUR. Phylogenetic analysis showed that crenarchaeota and unidentified-archaea were the two major sub-groups and only a few of euryarchaeota existed in the archaeal clone library, total 45 OTUs. All the crenarchaeota belonged to thermoprotei; except for Basidiomycotina, the other four sub-group fungi were discovered in the fungal library, total 24 OTUs. The diversities of archaea were very abundant and a few euryarchaeota (methanobacteria) existed in the archaeal clone library, it might be directly related to the long-term high temperature, high humidity, and high content of organic matter. The limitation of oxygen was the other reason for causing this phenomenon; Ascomycotina (over 80%) was the dominant sub-groups in fungal library. It was because most of the plant fungal diseases belonged to soil-borne diseases which gone through the winter by the ways of sclerotium or perithecium and became the sources of primary infection.

**Keywords:** soil microbial communities, archaeal 16S rRNA gene, fungal 18S rRNA gene, phylogenetic analysis

土壤微生物代表着地球环境中相当大部分的微生物量<sup>[1]</sup>。据估计, 每公顷的表层土壤中包含着 $10^3\sim 10^4$  kg 的微生物生物量<sup>[2]</sup>。它的活动影响着地球环境中的营养循环、有机质的分解、土壤肥力、以及物质与能量的交换<sup>[3]</sup>。尽管具有结构和功能多样性, 长期以来, 人们对其的研究极其有限, 多数情况下, 局限于传统的可纯培养的方法<sup>[4]</sup>。近年来, 随着分子生物学技术在微生物生态学研究中的应用, 小亚基核糖体 RNA (Small subunit rRNA, SSU rRNA) 序列分析作为微生物分类系统的主要依据也得到了广泛认同, 随着微生物核糖体数据库的日益完善, 该技术成为微生物分类和鉴定的一个有力工具。

在土壤微生物群体中, 人们研究得最多的是细菌群体。据估计, 1 g 土壤样品中, 含有 $10^3\sim 10^7$  个细菌种 (Species)<sup>[5-6]</sup>。然而古菌和真菌多样性同样丰富。到目前为止, 仅有美国学者 Fierer 等<sup>[7]</sup>系统地研究过同一环境样品中细菌、古菌、真菌和病毒多样性, 国内尚未见报道。

温室常年种植单一作物, 高温高湿度 (年平均气温 $>28$  °C, 相对湿度 $>80\%$ ), 有机质含量相当丰富。从而造成了该特定环境下微生物种类的特异

性和物种丰度的稳定性, 以及单一微生物物种对该环境的偏好性。因而, 研究温室土壤微生物多样性, 对了解微生物与主栽作物之间的互作关系有十分重要的意义, 对开发利用温室土壤中丰富的微生物资源以及理解土壤温度、湿度、酸碱度等物理化学性质的变化对土壤微生物群落结构多样性的影响提供参考依据。在之前的研究中, 我们结合细菌 16S rRNA 基因克隆文库和宏基因组末端测序技术, 分析了温室黄瓜近根土壤细菌多样性, 初步了解了温室黄瓜近根土壤细菌群落结构组成。但细菌并不是唯一的土壤微生物, 古菌和真菌也占有相当大的比例。

因此, 为全面弄清温室黄瓜近根土壤微生物的多样性和群落结构组成情况, 本试验继续对温室黄瓜近根土壤古菌和真菌多样性进行了研究。从中国农业科学院黄瓜温室采集土壤样品, 直接提取和纯化土壤微生物总 DNA, 构建古菌 16S rRNA 和真菌 18S rRNA 基因克隆文库, 分析了温室黄瓜近根土壤古菌和真菌多样性。对开发利用温室这一特殊的生态环境中丰富的微生物资源以及理解微生物与植物间的互作提供了参考依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 温 室 土 壤 类 型 及 栽 培 管 理

土壤类型为潮土, 前茬作物为黄瓜 (种植年限 10 年以上), 品种为中农 118。种植前, 先将地块深翻, 并且撒上 13.3 kg/hm<sup>2</sup> 的蛭石, 与土壤混匀, 增加土壤疏松度和保湿能力。用平板锄头或者锹挖出 245 mm×175 mm 大小的坑, 播种黄瓜前, 每坑补上 120 g 的干鸡粪, 与周边土壤稍混匀。人工管理, 中途不施加其他化学肥料和农药。从苗子长出到 6 叶期, 少量喷雾浇水的方式, 每日 1 次, 每次 10 min, 6 叶期后, 加大喷水次数, 每日分早、中、晚 3 次, 每次 10 min。每年 3 月份, 温室最后一季黄瓜收完之后, 取近根土壤。其中一份土壤经测量湿重为 200.004 g, 25 °C、100 r/min 的烘箱中, 烘至土壤不再粘结成块为止, 土壤干重为 168.1 g。因此, 估计土壤湿度在 15% 以上。

#### 1.1.2 土 壤 样 品

土样于 2008 年 3 月采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。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 个黄瓜近根 (采集直径 10 cm, 采集深度 0~15 cm) 的土壤样品, 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 °C 冰箱中。土壤性质见表 1。

### 1.2 DNA 的提取与纯化

参考 Bertrand 等的方法并稍作改进<sup>[8]</sup>。用 100 μL TE 溶解, 1% 琼脂糖电泳检测, -20 °C 保存。获得的粗 DNA 用上海申能博彩公司生产的 DNA 柱纯化试剂盒进行纯化。

### 1.3 古菌 16S rRNA 和真菌 18S rRNA 基因的 PCR 扩增

以纯化后的 DNA 为模板, 分别用古菌 16S rRNA 和真菌 18S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增所用反应体系: 10×Buffer 5 μL, Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L) 4 μL, dNTPs (5 mmol/L) 2 μL, 上下游引物 (10 pmol/L) 各 2 μL, 模板 (纯化后的土壤 DNA) 10 ng, Taq DNA 聚合酶 (5 U) 0.7 μL, 用 ddH<sub>2</sub>O 补足 50 μL 体系。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C (或 52 °C, 扩增真菌 18S rRNA 基因) 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 34 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 12 °C 保温 1 h。退火温度和延伸时间见表 2。

### 1.4 基因克隆文库的构建

PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收 900 bp 的古菌和 600 bp 左右的真菌 PCR 扩增产物, 连接至 pGEM-T 上, 大肠杆菌 TOP10 转化, 在含有 IPTG 和 X-Gal 以及氨苄青霉素的 LB 平板上 37 °C 过夜培养。挑白斑, 37 °C、220 r/min 振

表 1 土壤理化性质

Table 1 The soil samples tested in this study

Sample	pH	Organic C (g/kg)	Total N (g/kg)	Available N (mg/kg)	Total P (g/kg)	Available P (mg/kg)	Total K (g/kg)	Available K (mg/kg)
Soil	7.2	27.5	2.0	25.7	2.4	82.6	25.2	273.7

表 2 扩增古菌 16S rRNA 基因和真菌 18S rRNA 基因所用引物

Table 2 Primers for amplifying archaeal 16S rRNA and fungal 18S rRNA genes

Microbes	Primers (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Extension time (min)	References
Archaea	21F (TTCCGGTTGATCCYGCCGGA)	60	1	[9], [18]
	958R (YCCGGCGTTGAMTCCAATT)			
Fungi	fung5 (GTAAAAGTCTGGTTCCCC)	52	1	[7]
	EF4 (GGAAGGGRTGTATTATTAG)			

荡培养 12 h, 每克菌液取 1  $\mu$ L, T7 和 SP6 进行菌液 PCR, 筛选阳性克隆, 构建基因克隆文库。T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', SP6: 5'-ACGATTTAGGTGACACTATAG-3'。

## 1.5 序列测定及序列分析

### 1.5.1 古菌 ARDRA 分型和测序

将鉴定为阳性克隆的古菌菌液 PCR 产物进行 rDNA 扩增片段限制性内切酶分析 (Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA), 用 *Hinf* I 和 *Hae* III 对菌液 PCR 扩增产物 37  $^{\circ}$ C 酶切 2 h, 根据酶切图谱, 将阳性克隆分成若干个可操作分类单元 (OTU), 统计 OTU 的种类和各 OTU 所含阳性克隆的数量<sup>[9]</sup>, 将每一个 OTU 类型送 3~5 个进行测序分析, 测序工作由北京诺赛生物技术公司完成。

### 1.5.2 真菌克隆文库的测序

真菌克隆文库插入片段较小, 小于 580 bp, 不利于 ARDRA 分型后的电泳检测, 酶切条带呈辐射状, 不利于观察, 因此, 我们随机挑取 200 个真菌阳性克隆进行测序, 测序工作同样由北京诺赛生物技术公司完成。

## 1.6 系统进化发育树的构建和物种丰度分析

### 1.6.1 古菌系统进化发育树的构建

序列相似性  $\geq 97\%$  的认为是一个同样的类型并且用一个单独的序列来代表<sup>[10]</sup>, 即用单个的 OUT 来代表, 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<sup>[11]</sup>, 以邻接法构建系统进化树。

### 1.6.2 真菌界系统进化发育树的构建

将真菌克隆文库中已测得的 176 条序列, 在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/Vecscreen.html>) 中在线去除载体序列, 并截取 500 bp 的片段后, 在 GenBank 数据库进行比对分析, 由 Blastn 去掉同源性比对相同的结果, 选取文库中代表单一 OTU 的基因序列, 采用 Mega4.0 软件包<sup>[11]</sup>, 以邻接法构建系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 直接提取和纯化土壤微生物总 DNA

直接法提取的微生物总 DNA 更能代表样品的微生物群落, 能够比较全面地了解、鉴定土壤中微生物的多样性。但是提取 DNA 的同时也提取了其他有机土壤成分, 比如腐质酸和褐菌酸等。本试验采用上海申能博彩公司生产的 DNA 柱纯化试剂盒进行纯化后可获得高质量的土壤微生物总 DNA, 且片段大小  $> 23$  kb (图 1), 适合进行后续反应。



图 1 纯化后的土壤微生物总 DNA

Fig. 1 Extraction and purification of total soil microbial DNA. M: DNA marker  $\lambda$ Hind III; 1-7: DNA template.

### 2.2 PCR 扩增古菌 16S rRNA 和真菌 18S rRNA 基因

经探索, 扩增两种基因时, DNA 浓度稀释倍数在 30~100 倍之间均可以达到较理想的扩增效果。本试验将 7 份 DNA 原液稀释 50 倍作为模板, 扩增古菌 16S rRNA 和真菌 18S rRNA 基因, 每次 PCR 反应设置 3 次重复, 将 21 次重复的 PCR 产物混合后, 利用 PCR 产物回收试剂盒回收。结果分别得到 900 bp 和 580 bp 大小的片段 (图 2A、2B)。将各类回收的 PCR 产物分别连接在 PGEM-T 载体上, 用于构建古菌 16S rRNA 和真菌 18S rRNA 基因克隆文库。

### 2.3 基因克隆文库的构建

#### 2.3.1 古菌 16S rRNA 基因克隆文库的构建

通过连接, 转化, 蓝白斑筛选, 挑白斑, 摇菌, 挑取 672 个古菌克隆, 用引物 T7 和 SP6 进行阳性克隆菌液 PCR 反应检测, 603 个插入目的片段的古菌克隆, 阳性率分别为 90%。通过 ARDRA 分析, 得

到 40 个不同的可操作分类单元 (OTUs), 其中有 15 个 OTU 类型代表单克隆, 最多的 RFLP 类型包括 86 个克隆。反映古菌丰度的稀缺性曲线见图 3A。

通过 ARDRA 获得的 CoverageC<sup>[12]</sup>值相对较高, 为 97.5%。CoverageC 理论上表示克隆文库中包含的微生物种类 (OTU) 占样品中全部微生物种类的比例, 它的计算式如下: (a)  $C=1-n1/N$ , N 代表文库的库容, n1 代表在克隆文库中仅出现一次的 OTU 数量。如果 CoverageC 很高, 甚至达到 100%, 说明库容已经饱和。

然而, ARDRA 分型有其局限性, 且通过对酶切后的电泳胶图的观察, 误差较大。为尽可能地覆盖所有古菌类型, 挑取了 310 个古菌阳性克隆进行测

序, 测序共得到 297 条古菌序列。

用 DOTUR 软件分析, 把序列相似性  $\geq 97\%$  的定义为同一个 OTU<sup>[10]</sup>。这样测得的 297 条古菌序列归属为 45 个 OTU。其中有 19 个 OTU 只有 1 个克隆, 最多的 5 个 OTU 类型分别含有 39、28、24、20 和 18 个克隆。利用 DOTUR 软件生成的数据, 绘制稀缺性曲线 (图 3B), 分析表明, 这些克隆代表了文库中大多数古菌的多样性。

古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 中登录, 并获得核酸序列登录号。已获得的古菌序列登录号有: FJ455763-FJ455766、FJ490632-FJ490675、GU394949-GU394952、GU434679-GU434688。

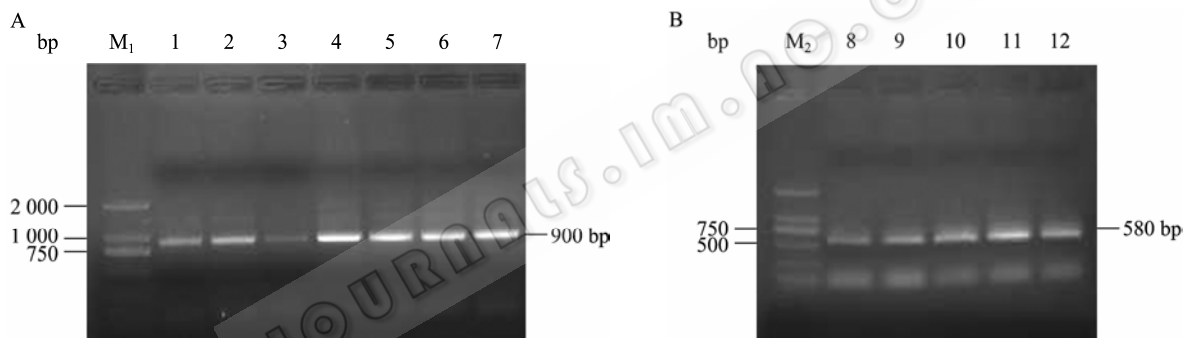


图 2 古菌 16S rRNA 基因 (A) 和真菌 18S rRNA 基因 (B) 的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification results of total DNA with archaeal 16S rRNA universal primers (A) and PCR amplification of total DNA with fungal 18S rRNA universal primers (B). M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>: DNA marker DL2000; 1-7: PCR amplification of archaeal 16S rRNA; 8-12: PCR amplification of fungal 18S rRNA.

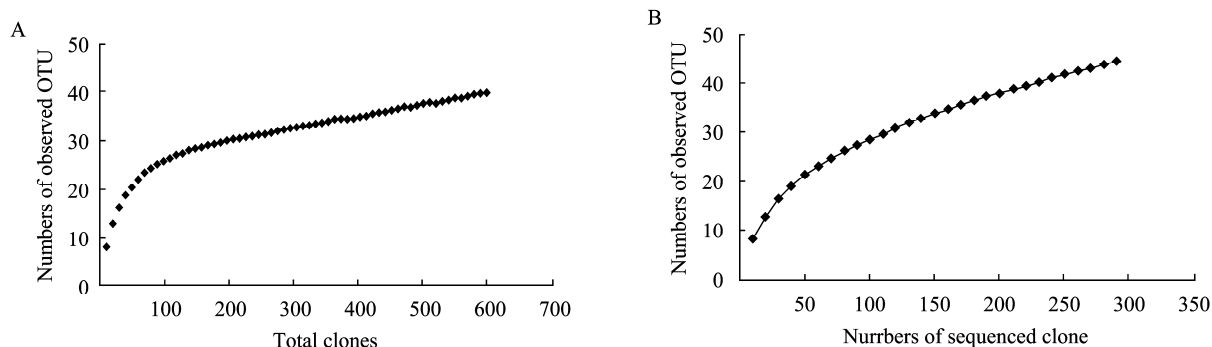


图 3 ARDRA 分析绘制的古菌稀缺性曲线 (A) 和 DOTUR 软件分析绘制的古菌稀缺性曲线 (B) (DNA 水平上有 3% 的序列差异, 则认为不同的 OTU)

Fig. 3 Rarefaction curves generated for 16S rRNA genes in the archeal clone library by analysis of ARDRA (A) and rarefaction curves generated for 16S rRNA genes in the archeal clone library by DOTUR software (B). OTUs were defined as groups of sequences differing by 3% at the DNA level.

### 2.3.2 真菌 18S rRNA 基因克隆文库的构建

随机挑选 400 个克隆, 通过鉴定, 共有 386 个插入目的片段的克隆, 阳性率达到 96.5%。为尽可能地覆盖环境样品中真菌类型, 挑取 196 个阳性克隆进行测序。测序共得到 176 个真菌 18S rRNA 基因序列。

运用 DOTUR 软件进行分析, 176 个真菌 18S rRNA 基因序列归属 25 个 OTUs, 其中 11 个 OTU 只有 1 个克隆, 最多的 3 个 OTU 类型分别含有 71、59 和 10 个克隆。利用 DOTUR 软件绘制真菌 18S rRNA 基因克隆文库稀缺性曲线 (图 4), 分析表明, 文库的 CoverageC 为 94%, 这些克隆代表了大多数真菌的多样性。

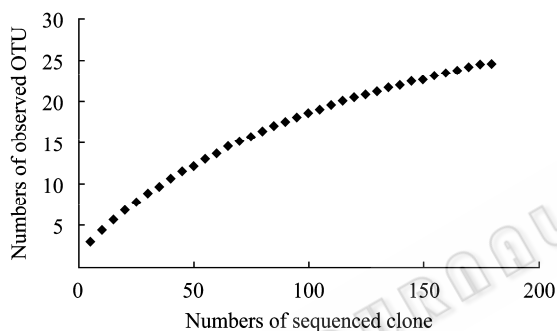


图 4 DOTUR 软件分析绘制的真菌 18S 基因克隆文库稀缺性曲线

Fig. 4 Rarefaction curves generated for 18S rRNA genes in the clone library by DOTUR software. OTUs were defined as groups of sequences differing by 3% at the DNA level.

同样地, 少部分真菌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 中登录, 并获得核酸序列登录号: GU395091-GU395093, GU394948。

## 2.4 系统进化发育分析

### 2.4.1 古菌 16S rRNA 基因系统进化发育分析

利用 Clustalx 对 297 条古菌 16S rRNA 基因序列进行全局比对, 并将产生的 phylip 文件, 输入 phylip 软件中进行排序分析, 产生相应的输出文件 (Outfile), 然后将该输出文件 (Outfile) 变成 DOTUR 软件中的输入文件 (Infile), 序列相似性  $\geq 97\%$  的定义为一个古菌序列, 共得到 45 种不同类型的古菌。

通过对古菌 16S rRNA 基因克隆文库进行系统进化发育树分析 (图 5) 发现, 该文库主要覆盖了嗜泉古菌 (Crenarchaeota)、未分类的古菌 (Unclassified\_Archaea) 和广域古菌 (Euryarchaeota)。其中 232 个克隆属于嗜泉古菌 (Crenarchaeota), 占克隆文库的 78.1%, 56 个克隆属于未分类的古菌 (Unclassified\_Archaea), 占克隆文库的 19.2%, 另外, 还有 9 个克隆属于未纯培养的广域古菌 (Uncultured Euryarchaeota), 占克隆文库的 2.7%, 并且, 这 9 个克隆序列与 NCBI 中广域古菌 (Euryarchaeota) 甲烷菌 (Methanococci) 的序列相似性在 91%~98% 之间, 克隆 HBA287 (FJ490663) 与未培养的广域古菌克隆 (Uncultured euryarchaeote clone CFS-F12) 序列相似性为 96%, 克隆 HBA29 (GU434686) 相似性更低, 仅为 94%。

从系统发育树来看 (图 5), 嗜泉古菌 (Crenarchaeota) 占了 3 大部分, 其中, 有一部分与广域古菌 (Euryarchaeota) 亲缘关系较近, 未鉴定的古菌与嗜泉古菌、广域古菌的亲缘关系较远, 且从 NCBI 上下载的极端环境 (火山口) 未鉴定的古菌序列相似性较高。

另外, 所获得的全部古菌序列在核糖体数据库 (Ribosomal Database Project, RDP) 中进行比对, 除了 9 条序列属于广域古菌 (Euryarchaeota) 外, 其他 288 条古菌序列都属于热变形菌纲 (Thermoprotei), 其中包括 4 个目, 分别是脱硫球菌目 (Desulfurococcales)、硫化叶菌目 (Sulfolobales)、暖球形菌目 (Caldisphaerales) 和热变形菌目 (Thermoproteales), 分别占文库中嗜泉古菌 (Crenarchaeota) 的比例分别为 48.5%、20.5%、17.8% 和 13.2%。

### 2.4.2 真菌 18S rRNA 基因系统进化发育分析

利用 DOTUR 软件分析测序得到的 176 个真菌 18S rRNA 基因序列, 把序列相似性  $\geq 97\%$  的定义为一个真菌序列<sup>[10]</sup>。选取文库中代表不同 OUT 的序列与环境样品中的序列共同构建系统发育树 (图 6)。这些环境样品中的序列来自森林土壤<sup>[13]</sup>、mojave 沙漠土壤<sup>[7]</sup>、草地土壤<sup>[14]</sup>、火炬松山地土壤<sup>[15]</sup>等。

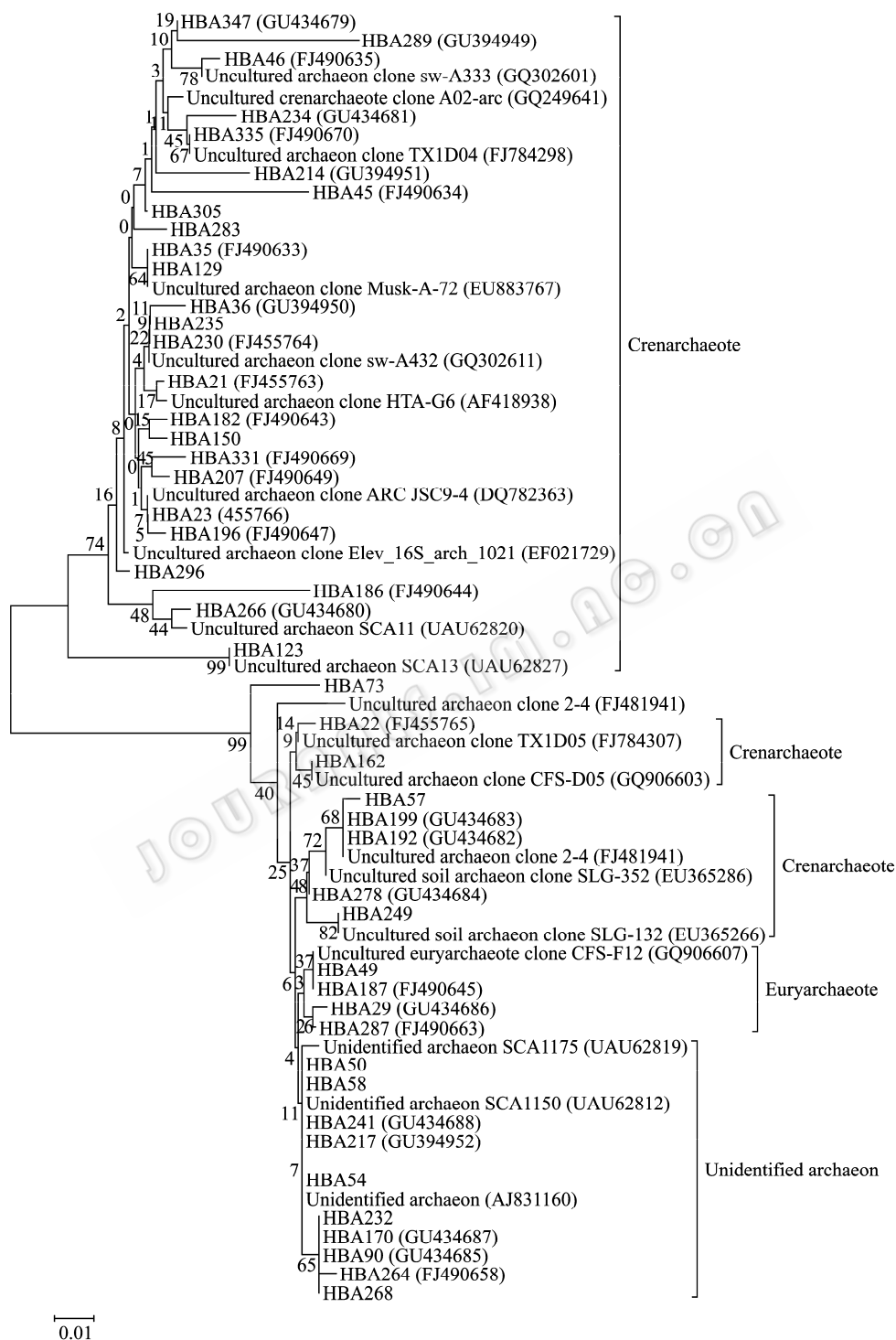


图5 古菌16S rRNA基因克隆文库系统进化发育树 (自举数据集1 000次)

Fig. 5 Phylogenetic tree based on archaeal 16S rRNA sequences of the clones obtained from greenhouse soil samples. The tree was constructed via the neighbor-joining method, bootstrap values above 1 000 are shown as percentage.

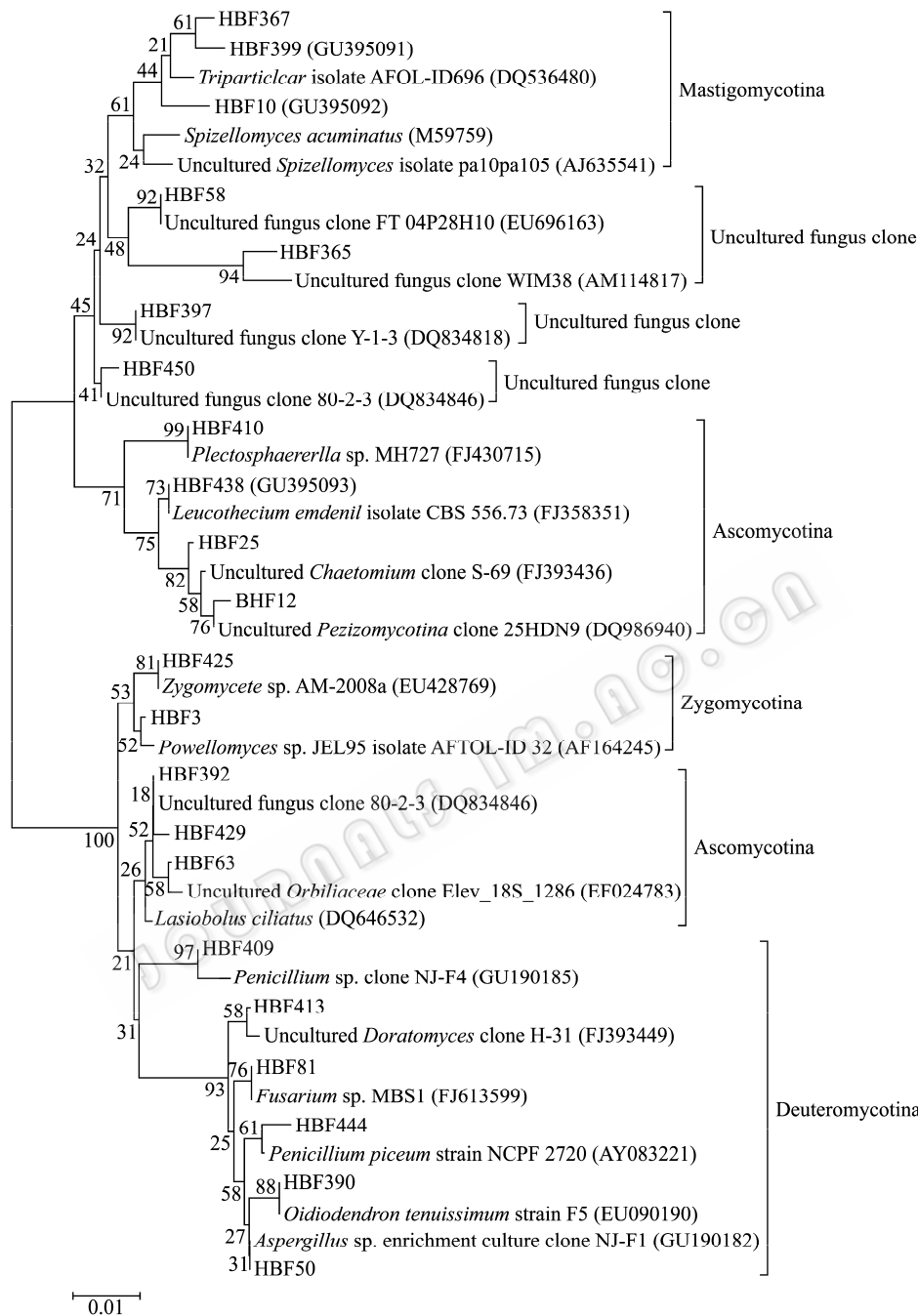


图6 温室土壤真菌18S rRNA基因克隆文库系统进化发育树 (自举数据集1 000次)

Fig. 6 Phylogenetic tree based on fungal 18S rRNA sequences of the clones obtained from Beijing greenhouse soil samples. The tree was constructed via the neighbor-joining method, bootstrap values above 1 000 are shown as percentage.

通过对真菌 18S rRNA 基因克隆文库进行系统进化发育 (图 6) 分析发现, 文库包含了子囊菌亚门 (Ascomycotina)、接合菌亚门 (Zygomycotina)、鞭毛菌亚门 (Mastigomycotina)、半知菌亚门

(Deuteromycotina) 和未分类的不可纯培养真菌 (Uncultured fungi), 未发现担子菌亚门 (Basidiomycotina) 真菌。子囊菌亚门 (Ascomycotina) 是土壤真菌的优势菌群, 在测定的 176 条真菌 18S rRNA 基因



序列中, 有 155 条序列属于该菌群, 占克隆文库的 88.1%, 12 个克隆属于半知菌亚门 (Deuteromycotina), 占克隆文库的 8.5%, 鞭毛菌亚门 (Mastigomycotina)、接合菌亚门 (Zygomycotina) 和不可纯培养真菌 (Uncultured fungi) 克隆分别为 5 个、4 个和 4 个, 分别占克隆文库的 2.8%、2.3% 和 2.3%。

从系统进化发育树 (图 6) 上可以看出, 部分未纯培养的真菌克隆 (Uncultured fungus clone) 的亲缘关系比较接近鞭毛菌亚门 (Mastigomycotina), 部分离子囊菌亚门 (Ascomycotina) 较近。子囊菌亚门 (Ascomycotina) 中, 盘菌 *Pezizomycotina* 和毛壳菌 *Chaetomium* 是其优势菌, 分别占到子囊菌亚门 (Ascomycotina) 的 52.3% 和 33.5%。青霉菌 *Penicillium* 和镰孢菌 *Fusarium* 是半知菌亚门 (Deuteromycotina) 的优势菌, 分别占 54.8% 和 39.7%。

### 3 讨论

本研究结合 ARDRA 分析和基因克隆文库序列测定的方法来研究温室黄瓜近根土壤古菌多样性, 能够快速而准确地对克隆文库中古菌种类进行分型, 将相同酶切图谱的克隆划分为一种类型 (OTU), 然后, 在每类 OTU 中选取有代表性的克隆进行测序, 这样就避免了克隆测序的盲目性, 减少了测序数量以及人力、物力和财力的使用。两者在分析 OTUs 时存在一定的误差, 这可能因为构建的库容较大, 利用 ARDRA 分型后, 观察结果时存在误差, 需要借助计算机才能更快更准确地完成分型工作, 减少误差。

古菌的鉴定, 是我们了解古菌在其小生境中的生态功能重要的一步, 对全面地分析微生物群落结构和功能多样性有十分重要的作用。因此, 古菌多样性的研究越来越受到人们的重视。近年来, 人们从极地海洋<sup>[16]</sup>、淡水湖<sup>[17]</sup>、红树林土壤<sup>[18]</sup>和西藏米拉山口<sup>[9]</sup>等不同的环境样品取样, 研究古菌群落结构多样性, 同时, 鉴定了大量新奇的古菌类型。此外, 通过比较系统进化发育分析, 揭示了古菌群体

典型地系统发育特征。因此, 为评价温室古菌土壤多样性, 本研究直接以纯化后的温室土壤总 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增, 构建古菌 16S rRNA 基因克隆文库。

通过对文库进行分析发现, 嗜泉古菌 (Crenarchaeota) 占 78.1%, 未分类的古菌 (Unclassified\_Archaea) 占 19.2%, 古菌多样性非常丰富, 且有少部分未培养的广域古菌 (甲烷菌)。这一情况的可能与温室长期高温高湿, 有机质含量相对丰富, 整个土壤长期处于高温发酵, 缺氧的状态有关。这一结果与 Leclerc 等<sup>[19]</sup>的报道是相符合的。Sekiguchi 等<sup>[20]</sup>也报道高温发酵缺氧的消化池中的古菌大部分是广域古菌 (甲烷菌)。

在嗜泉古菌 (Crenarchaeota) 中, 脱硫球菌 (Desulfurococales) 和硫化叶菌 (Sulfolobales) 是其优势菌亚群。在环境样品中, 硫化还原型细菌和古菌均能将有机碳矿化成  $\text{CH}_4$  和  $\text{CO}_2$ , 且大多数可培养的硫化还原细菌对醋酸纤维素和  $\text{H}_2$  有高度地亲和力<sup>[21]</sup>。因此, 本研究中脱硫球菌 (Desulfurococales) 和硫化叶菌 (Sulfolobales) 与温室土壤碳和硫的循环有关。至于以何种方式参与碳和硫的循环有待于进一步验证。

子囊菌 (Ascomycotina) 是土壤真菌的优势菌群, 占克隆文库的 88.1%, 其次为半知菌 (Deuteromycotina), 占克隆文库的 8.5%, 鞭毛菌 (Mastigomycotina)、接合菌 (Zygomycotina) 和不可纯培养真菌 (Uncultured fungus) 分别占克隆文库的 2.8%、2.3% 和 2.3%, 未发现担子菌 (Basidiomycotina)。这与近几年来其他研究人员利用 18S rRNA 基因克隆文库的方法对土壤样品进行分析所获得的结果有所区别。Hunt 等<sup>[14]</sup>利用 18S rDNA 途径研究草地土壤真菌多样性, 分析发现该环境样品中土壤真菌包括接合菌 (Zygomycotina)、担子菌 (Basidiomycotina) 和子囊菌 (Ascomycotina), 而无鞭毛菌 (Mastigomycotina) 和半知菌 (Deuteromycotina)。O'Brien 等<sup>[15]</sup>构建了真菌 ITS 和 18S rRNA 基因克隆文库, 分析土壤样品

真菌多样性, 结果发现两种文库中的子囊菌 (Ascomycotina) 和担子菌 (Basidiomycotina) 所占的比例基本相当, 而无其他 3 种类型的真菌。

该环境样品中未发现担子菌亚门真菌 (Basidiomycotina), 可能有以下两方面的原因: 其一, 担子菌亚门真菌 (Basidiomycotina) 在该环境样品中的丰度极低, 200 条测序样品, 甚至增加测序样品到 400 或 1 000 条都难找到一个担子菌亚门真菌 (Basidiomycotina) 序列, 因此, 可以认为担子菌对该基因克隆文库中总的真菌物种丰度不会有影响; 其二, 前茬作物一直为黄瓜, 少数真菌种群在近根选择性富集, 另一部分种群由于不适应此微环境变化而数量逐渐减少。作为该环境中弱势种群的担子菌亚门真菌 (Basidiomycotina), 其丰度逐渐减少, 甚至检测不出来, 很可能与不适应近根微环境的变化有关。随连作茬次增加, 选择性富集于此土壤微环境的真菌类群开始形成优势菌群, 并对其他种群产生抑制作用, 导致真菌多样性水平降低, 并趋于平稳。这与胡元森等<sup>[22]</sup>的报道是一致的。

到目前为止, 虽无文献报道农事操作会影响土壤真菌群落结构, 但是, 土壤真菌群落结构会随季节的变化而变化<sup>[23]</sup>。大多数植物真菌性病害是由子囊菌亚门真菌引起的, 冬季, 这些病原物已经成熟, 以子囊壳和菌核的形式在土壤中越冬, 成为来年的初侵染源。因而, 子囊菌亚门的物种数相对较多, 土壤真菌的群落结构组成会相应地发生变化。这也是该克隆文库中子囊菌是优势菌群的重要原因。

本研究应用 SSU rRNA 基因克隆文库技术分别构建了温室黄瓜近根土壤古菌 16S 和真菌 18S rRNA 基因克隆文库, 弄清了温室黄瓜近根土壤古菌和真菌群落的组成情况。但由于病毒无高度保守的序列结构, 还不能全面认识, 需要进一步研究。同时, 为彻底弄清高强度利用条件下温室土壤微生物的多样性和动态变化情况, 还需考虑土壤理化性质、作物种类、施肥情况以及人事操作对微生物的影响等。

## REFERENCES

- [1] Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(12): 6578–6583.
- [2] Brady NC, Weil RR. *The nature and properties of soils*. Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, NJ, 2002.
- [3] Kennedy AC. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agr Ecosyst Environ*, 1999, 74(1/3): 65–76.
- [4] Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 1997, 276(5313): 734–740.
- [5] Gans J, Wolinsky M, Dunbar J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 2005, 309: 1387–1390.
- [6] Tringe SG, von Mering C, Salamov AA, et al. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 2005, 308(5721): 554–557.
- [7] Fierer N, Breitbart M, Nulton J, et al. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(21): 7059–7066.
- [8] Bertrand H, Poly F, Van VT, et al. High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction. *J Microbiol Meth*, 2005, 62(1): 1–11.
- [9] Meng XW, Mao ZC, Chen GH, et al. Diversity of soil Archaea in Tibetan Mila Mountains. *Acta Microbiol Sin*, 2009, 49(8): 994–1002.  
孟祥伟, 郝振川, 陈国华, 等. 西藏米拉山土壤古菌 16S rRNA 及 amoA 基因多样性分析. *微生物学报*, 2009, 49(8): 994–1002.
- [10] Mccaig AE, Glover LA, Prosser JI. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(4): 1721–1730.
- [11] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [12] Good IJ. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 1953, 40(3/4): 237–264.
- [13] Bailly J, Fraissinet-Tachet L, Verner MC, et al. Soil eukaryotic functional diversity, a metatranscriptomic approach. *Intern Soc Micro Ecol*, 2007, 1(7): 632–642.
- [14] Hunt J, Boddy L, Randerson PF, et al. An evaluation of 18S rDNA approaches for the study of fungal diversity in grassland soils. *Micro Ecol*, 2004, 47(4): 385–395.

- [15] O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, et al. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(9): 5544-5550.
- [16] Vetriani C, Reysenbach AL, Doré J. Recovery and phylogenetic analysis of archaeal rRNA sequences from continental shelf sediments. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 161(1): 83-88.
- [17] Jurgens G, Glöckner F, Amann R, et al. Identification of novel archaea in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridization. *FEMS Microbiol Ecol*, 2000, 34(1): 45-56.
- [18] Yan B, Hong K, Yu ZN. Archaeal communities in mangrove soil characterized by 16S rRNA gene clones. *J Microbiol*, 2006, 44(5): 566-571.
- [19] Leclerc M, Delgènes JP, Godon JJ. Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. *Environ Microbiol*, 2004, 6(8): 809-819.
- [20] Sekiguchi Y, Kamagata Y, Nakamura K, et al. Fluorescence *in situ* hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(3): 1280-1288.
- [21] Lovely DR, Dwyer DF, Klug MJ. Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 43(6): 1373-1379.
- [22] Hu YS, Liu YF, Wu K, et al. Variation of microbial community structure in relation to successive cucumber cropping soil. *Chin J Soil Sci*, 2006, 37(1): 126-129.  
胡元森, 刘亚峰, 吴坤, 等. 黄瓜连作土壤微生物区系变化研究. *土壤通报*, 2006, 37(1): 126-129.
- [23] Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, et al. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, 36(2/3): 203-209.

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 生物工程上游技术实验手册

“十一五”国家重点图书出版规划项目

应用生物技术大系

田长恩 主编

开本: B5 营销分类: 生物科学 装帧: 平装

ISBN 978-7-03-029405-0 ¥ 30.00 2010年11月出版

### 内容简介

本书将分子生物学实验、基因工程实验以及微生物遗传育种实验等多门实验课程有机地统一成一体, 整合出若干个不同层次的实验, 形成了一个较为完整的实验技术体系, 既能节约教学成本, 又能使学生更加系统地掌握实验的基本技术和理解基本原理, 还能使本实验技术更加接近本学科的前沿。内容包括菌种的理化诱变、工程菌的培养和保藏、基因组 DNA 和 RNA 的分离纯化、质粒 DNA 的制备、基因克隆、表达载体构建、遗传转化和转化子的筛选、表达蛋白的检测等。所开设的实验主要为基础性实验, 学生通过实验熟悉实验的基本原理, 掌握实验的基本技术。在此基础上, 再开设综合性实验, 侧重于培养学生的综合能力和创新能力。

本书可以作为大专院校开设生物工程上游技术实验、分子生物学实验或基因工程实验等课程的教材或参考用书, 也可以作为研究生和初级科研工作者分子生物学实验技术的参考用书。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文字 (010-64031535)

网上订购: [www.dangdang.com](http://www.dangdang.com) [www.joy.com](http://www.joy.com) [www.amazon.cn](http://www.amazon.cn) [www.beifabook.com](http://www.beifabook.com)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目