

# 福建省稻田土壤细菌群落的 16S rDNA-PCR-DGGE 分析

李友发<sup>1,2</sup> 宋兵<sup>1,2</sup> 宋亚娜<sup>1</sup> 郑斯平<sup>1</sup> 翟焕趁<sup>1,2</sup> 郑伟文<sup>1\*</sup>

(1. 福建省农业科学院生物技术研究所 福州 350003)

(2. 福建农林大学生命科学院 福州 350002)

**摘要:** 用不依赖细菌培养的 16S rDNA-PCR-DGGE 方法对福建省 6 个不同地区 12 个取样点的稻田土壤进行细菌群落结构分析。对 12 份样品直接提取其总 DNA, 用 F341GC/R534 引物扩增 16S rDNA 基因的 V3 可变区, 结合 DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis)技术分析样品细菌群落组成。结果表明, 福建省不同地区的稻田土壤之间细菌群落结构存在较大差异, 大体上可分为闽东、闽南、闽北、闽西 4 个大类。同一地区的根际土和表土样品之间也存在差异, 但差异相对较低, 其中龙岩根际土和表土细菌群落结构相似性最大, 永泰差异性最大。回收了 DGGE 图谱中 11 个条带, 测序结果经过 Blast 比对表明其中 10 个条带代表的细菌是不可培养的, 显示了 DGGE 技术的优越性。

**关键词:** 稻田土壤, 细菌群落, 16S rDNA-PCR-DGGE

## Analysis of the Bacterial Communities in Paddy Soils in Fujian Province Using 16S rDNA -PCR- DGGE

LI You-Fa<sup>1,2</sup> SONG Bing<sup>1,2</sup> SONG Ya-Na<sup>1</sup> ZHENG Si-Ping<sup>1</sup>  
ZHAI Huan-Chen<sup>1,2</sup> ZHENG Wei-Wen<sup>1\*</sup>

(1. Biotech Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003)

(2. College of Life Science, Fujian Agriculture and Forest University, Fuzhou 350002)

**Abstract:** 16S rDNA-PCR-DGGE, a cultivation-independent approach, was used to analyze the bacterial communities in paddy soils in Fujian Province. The bulk soils and rhizospheric soils were sampled from six different ecological soil regions. Total DNA was directly extracted and amplified with the F341GC and R534 primers targeting the 16S rDNA V3. The amplified fragments were analyzed by perpendicular DGGE. Cluster analysis revealed that there was a high diversity of bacterial community compositions among different soil samples tested. Basically they could be grouped to Mindong (East), Minnan (South), Minbei (North) and Minxi (West) ecological regions. 16S rDNA-PCR-DGGE profiles from bulk and rhizospheric soil in the same region showed less bacterial diversity but more similarity. The bacterial community from bulk soil and rhizospheric soil in Longyan shared the most similar DGGE banding patterns, and the banding patterns in

Yongtai exhibited the highest diversity. Eleven DGGE bands recovered were re-amplified, sequenced and aligned with Blast. The results indicated that ten of the fragments belong to uncultivated bacteria implying DGGE technique having priority in analyzing uncultivated bacteria in the paddy soils.

**Keywords:** Paddy soils, Bacterial communities, 16S rDNA-PCR-DGGE

长期的水稻种植形成了独特的稻田土壤细菌群落。这些细菌参与土壤物质转化过程,在土壤形成、肥力演变、植物养分有效化和土壤结构的形成与改良等方面起重要作用<sup>[1]</sup>。稻田土壤微生物的群落结构与数量可以作为衡量土壤肥力高低的重要指标。段红平等通过平板分离计数发现,丰富的水稻根际微生物类群数量是水稻高产的原因之一<sup>[2]</sup>。宋铁英、郑伟文等应用PCR-DGGE技术在水稻不同生长期对福建省稻田蓝细菌群落结构进行了研究,发现蓝细菌是稻田土壤微生物群落的重要组成部分,对稻田土壤肥力有重要影响<sup>[3]</sup>。不同于传统培养方法,分子生物学方法不依赖室内培养,能更全面、真实地反映微生物群落结构,其中PCR-DGGE技术可靠、重复性好、快速,已被广泛应用于微生物群落结构的研究<sup>[4]</sup>。本文旨在利用PCR-DGGE方法揭示福建省不同生态区域稻田细菌群落结构,以期从一个侧面

为认识福建稻田细菌的遗传多样性及其与土壤肥力的关系等提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

稻田土壤取自福建省6个不同地区,取2 cm的表土及10 cm~15 cm深处的根际土,土壤理化性质见表1。取样地内设5个取样点,分别位于取样地四角和中心,混匀,置于液氮。

### 1.2 方法

**1.2.1 样品总DNA的提取和纯化:** DNA的提取参照Zhou等的SDS-based DNA extraction法<sup>[5]</sup>,唯一改动之处是,在氯仿、异戊醇抽提前多加了一步等体积的酚、氯仿和异戊醇抽提。DNA的纯化按Moreira的方法<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 PCR扩增:** 采用嵌套PCR,引物见表2。第

表1 样品理化性质  
Table 1 The physicochemical properties of the soils used in this study

样品 Sample	pH	土温(°C) Temperature	总氮(%) N	总磷(%) P	总钾(%) K	有机质(%) Organic matter
永泰	5.1	31	0.196	0.0573	1.659	2.835
宁德	5.4	29	0.136	0.158	2.714	2.136
武夷山	4.8	27.5	0.211	0.0486	2.700	2.970
永安	6.3	28	0.282	0.0952	0.935	4.027
龙岩	5.5	29	0.160	0.121	1.114	2.413
龙海	4.8	30	0.210	0.0703	1.934	3.078

表2 用于16S rDNA扩增的引物  
Table 2 Primers for 16S rDNA amplification

引物 Primer	靶位点 <sup>a</sup> 16S rDNA target <sup>a</sup>	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	参考文献 References
For	9-27	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G	[7]
Dev	1541-1525	AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC	[7]
F341-GC <sup>b</sup>	341-359	GC 夹-CC TAC GGG AGG CAG CAG	[8]
R534	534-518	ATT ACC GCG GCT GCT GG	[8]

注:靶位点<sup>a</sup>: 编号针对大肠杆菌; GC<sup>b</sup>: 在PCR-DGGE分析中,在5'端加入了一个富含GC序列的GC夹:CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G

Note: target<sup>a</sup>: The region amplified corresponds to the position in the 16S rDNA of *E. coli*; GC<sup>b</sup>: In this study primer F341-GC incorporate a 40-bp GC clamp(CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G) at its 5' end at position 341

一套PCR扩增: 用细菌的通用引物For/Dev扩增差不多全长的 16S rDNA<sup>[7]</sup>。反应体系(25  $\mu$ L): 其中 2.5 mmol/L dNTPs 2.8  $\mu$ L, 3.5  $\mu$ L 10 $\times$ Buffer, 1 U Taq酶, 引物各 3 pmol。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 60 s, 65 $^{\circ}$ C (前 20 个循环每个循环降 0.5 $^{\circ}$ C 降至 55 $^{\circ}$ C) 45 s, 72 $^{\circ}$ C 120 s(后 10 个循环每个循环增加 1 s), 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。

第二套PCR: 用F341GC/R534 引物扩增细菌 16S rDNA V3 区<sup>[8]</sup>。反应体系(25  $\mu$ L)其中含有稀释 100 倍的一套扩增物 1  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2.8  $\mu$ L, 2.5  $\mu$ L 10 $\times$ Buffer, 1U Taq酶, 引物各 5 pmol。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 60 s, 65 $^{\circ}$ C (前 20 个循环每个循环降 0.5 $^{\circ}$ C 直至降到 55 $^{\circ}$ C)45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。

对第二套 PCR 产物进行 reconditioning PCR, 体系除模板量占体系的 1/10(2.5  $\mu$ L)外与第二套 PCR 的体系完全相同。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 60 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 循环 3 次; 72 $^{\circ}$ C 5 min。

**1.2.3 DGGE 分析:** 采用 Bio-Rad 电泳系统。变性剂梯度为 45%~60%的 8%聚丙烯酰胺凝胶, 60 $^{\circ}$ C、70 V 条件下电泳 16 h。胶用 sybr green 染色 30 min, DGGE 条带用 Quantity One 软件分析。

## 2 结果

### 2.1 DNA 提取

用 Zhou 的方法从 12 种不同土壤中都提取出了 DNA, 用该方法提出的总 DNA, 其片段均比较大, 少有断裂片段(图 1)。

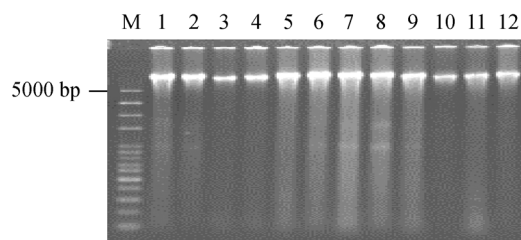


图 1 土壤总 DNA 提取电泳图

Fig. 1 Profile of total DNA extracted from soil

M: Marker; 1: 永泰根际土; 2: 永泰表土; 3: 宁德根际土; 4: 宁德表土; 5: 武夷山根际土; 6: 武夷山表土; 7: 永安根际土; 8: 永安表土; 9: 龙岩根际土; 10: 龙岩表土; 11: 龙海根际土; 12: 龙海表土。编号下同

M: Marker; 1: Rhizospheric soil of Yongtai; 2: Bulk soil of Yongtai; 3: Rhizospheric soil of Ningde; 4: Bulk soil of Ningde; 5: Rhizospheric soil of Wuyishan; 6: Bulk soil of Wuyishan; 7: Rhizospheric soil of Yong'an; 8: Bulk soil of Yong'an; 9: Rhizospheric soil of Longyan; 10: Bulk soil of Longyan; 11: Rhizospheric soil of Longhai; 12: Bulk soil of Longhai. The same below

### 2.2 DNA 纯化

用 Moreira 的方法去除腐殖质等 PCR 抑制剂成分, 除样品 7 外, DNA 纯化回收率较高(图 2)。

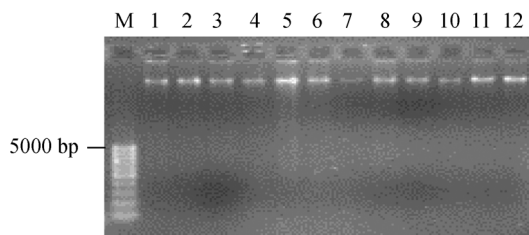


图 2 土壤总 DNA 纯化电泳图

Fig. 2 Profile of the purified DNA extracted from soil

### 2.3 PCR 扩增

嵌套 PCR 扩增: 第一套 PCR, For/Dev 引物扩增得到大约 1533 bp 的目的片段(图 3)。第二套扩增, 用 F341GC/R534 引物扩增得到目的片段大小约为 234 bp, 用 reconditioning PCR 去除了二套 PCR 产物中的异二聚体<sup>[9]</sup>(如图 4A 中泳道 1 中的条带实际不是单一的条带, 其中 b 为目的片段, 大于目的片段 b 的 a 带为异二聚体, reconditioning PCR 去除了异二聚体, 只留下目的条带, 见图 4B)。

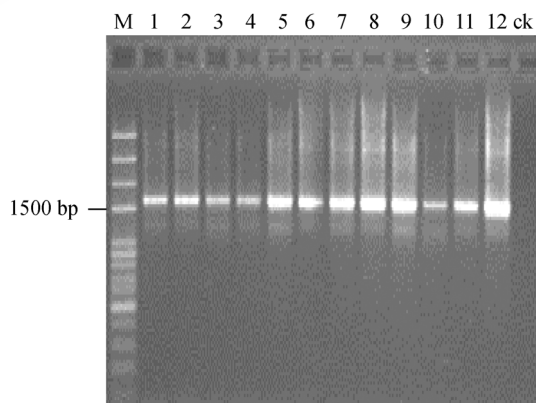


图 3 一套 PCR 产物电泳图

Fig. 3 Profile of the first round PCR products with primers For/Dev

### 2.4 变性梯度凝胶电泳

DGGE 图谱(图 5)显示, 从 12 份稻田土壤总 DNA 中, 共检测到 62 条不同的 16S rDNA V3 区条带, 回收其中 11 个条带测序(表 3), 除条带 C 外的其它 10 个条带代表的细菌是不可培养的。每份土壤样品都检测到很多不同的条带, 从 13 个条带(永安根际土)到 36 个条带(永泰表土)不等, 它们之间的带型也各不相同, 相对来讲, 武夷山地区细菌多样性最低,

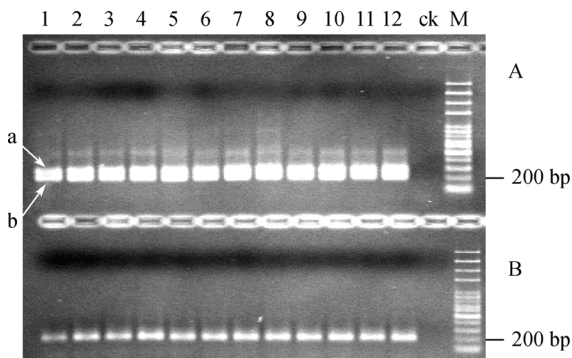


图4 (A)二套 PCR 产物电泳图; (B) reconditioning PCR 产物电泳图

Fig. 4 Profile of the second round PCR products (A) and the reconditioning PCR of the second round PCR products (B)

注: a: 异二聚体; b: 目的产物

Note: a: Heteroduplex; b: Product

永安也较低, 其它 4 个地区多样性较高。用 Quantity One 软件聚类分析(图 6)表明, 不同地区的稻田土壤之间细菌群落结构存在较大差异, 大体上可分为闽东、闽南、闽北、闽西 4 个大类。同一地区的根际土和表土样品之间也存在差异, 但差异相对较小, 一般都聚在一类内, 其中龙岩根际土和表土细菌群落结构相似性最大。但永泰地区是个例外, 永泰地

区根际土和表土细菌群落结构存在较大差异, 被聚类到不同大类。DGGE 图谱特征还表明, 有些细菌例如测序的条带 J, 在 12 个取样地点中均有分布。

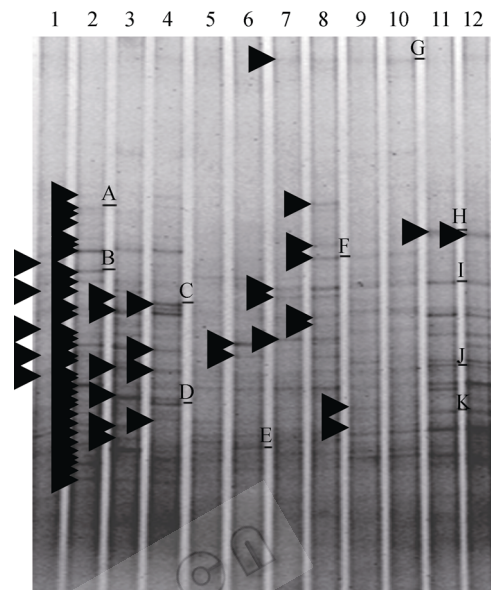


图5 PCR 产物的 DGGE 电泳图谱

Fig. 5 DGGE profiles of the PCR products

注: ▶: 检测到的不同条带; A 等英文字母代表测序

Note: ▶: The bands that detected different to each other; The bands denoted by the letters were sequenced

表3 测序比对结果  
Table 3 Sequence alignment with blast

条带 Band	比对结果 Most similar sequence	序列号 Accession no.	相似度(%) Similarity
A	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 4 16S ribosomal RNA gene	EF636475.1	93
B	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone IRR-DS4-26	AJ621959.1	98
C	Agricultural soil bacterium clone SC-I-18	AJ252621.1	95
D	Uncultured gamma proteobacterium clone GASP-WA2W3_D07	EF073006.1	94
E	Uncultured delta proteobacterium clone GASP-MA4W3_H10	EF664444.1	98
F	Uncultured cyanobacterium clone H1w-31	EF633013.1	100
G	Uncultured Acidobacteria bacterium clone REF-062	EU122904.1	100
H	Uncultured Rhodocyclales bacterium clone 7025P4B72	EF562098.1	97
I	Uncultured beta proteobacterium clone ADK-MOh02-40	EF520478.1	97
J	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone SZB3	AM176854.1	97
K	Uncultured bacterium clone FCPT756	EF516751.1	100

### 3 讨论

从福建稻田土壤细菌群落的 DGGE 结果看, 永泰地区检测到的 DGGE 条带最多, 其次是龙海地区。永泰稻田是本课题组研究基地, 尽管土壤氮磷钾和有机质水平在供试土壤中不是最高, 但施肥、耕作管理好, 有利微生物的栖息。龙海处于福建九

龙江下游平原, 土壤肥沃, 有机质相对高于其他地区(表 1)。一个例外是, 永安的稻田土壤的总氮量和有机质是本研究供试土壤中最高, 但 DGGE 条带并不是最多, 其原因是否与取样误差有关, 有待进一步研究。从聚类结果看, 不同地区之间 DGGE 图谱差异大, 大体上可分为闽东、闽南、闽北、闽西 4 大类。这个结果与福建省土壤分类基本相符<sup>[10]</sup>。同

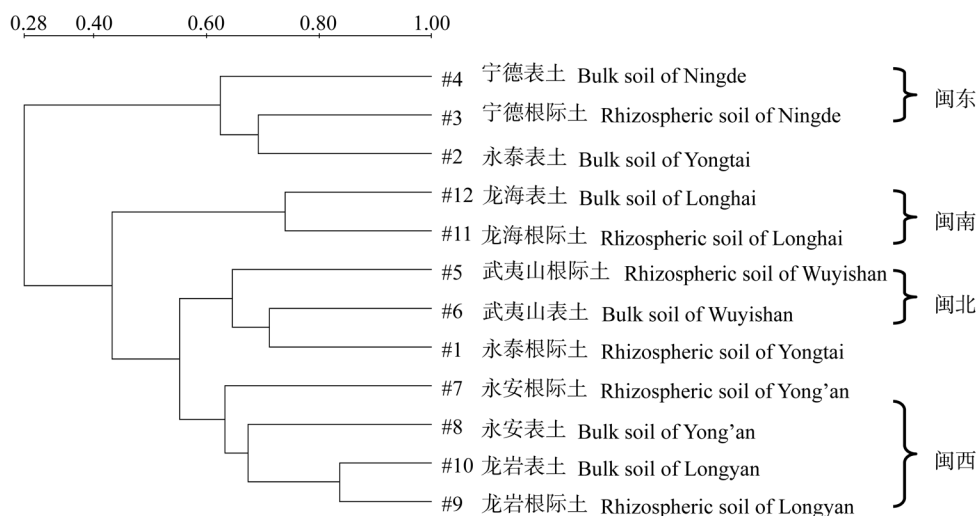


图 6 对 DGGE 图谱聚类分析

Fig. 6 Dendrogram showing the relatedness of the DGGE banding patterns

一地区的根际土与表土之间的细菌群落结构的差异。总的来看,表土的细菌 DGGE 条带比根际土多,这可能与不同土层的营养水平和通气状况不同有关。但与地域差异相比,不同土层对细菌群落构成影响较小(永泰地区是个例外)。龙岩稻田表土与根际土的细菌菌落被聚在一类,表明两者有较多的相似性。本研究得到的细菌群落 DGGE 图谱与罗青等<sup>[11]</sup>的研究结果有较大出入。本次采样是八月份,采集的是早稻土,而罗青的样品是取自冬闲土。这似乎说明细菌群落结构受季节影响较大。本研究结果我们可以得出这样的结论:细菌群落结构地区差异大,细菌群落组成受当地土壤类型、肥力水平、季节变化和生态气候条件等因素影响。

分子生物学方法可以克服传统培养方法的缺陷,可以有效避免在传统培养、分离等过程中造成的微生物遗传多样性信息的丢失,使得分析结果更全面、真实地反映微生物群落结构。在具体操作时,从总 DNA 提取、PCR 扩增、到 DGGE 检测有一系列的技术问题需要解决并加以优化。

首先要取得高质量的土壤总 DNA。不同 DNA 提取方法对应的 DNA 得率不同,影响 DGGE 结果。很多研究者试图通过超声、研磨、珠子振荡等剧烈的物理处理来增加 DNA 得率,这些处理确实能够提高 DNA 得率,PCR-DGGE 检测也获得了相对较多的条带<sup>[12]</sup>,但这也使细菌基因组片段化。这些小片段 DNA 容易与 PCR 产物形成虚假条带,人为夸大

待测细菌多样性<sup>[9]</sup>。本研究采用了条件较为温和的 Zhou 等的方法,这种方法 DNA 得率高、所得总 DNA 片段大、适用于不同的土壤类型并且相对简单、快速<sup>[5]</sup>。

从土壤提取的总 DNA 往往混杂有腐殖质和色素成分,这些 PCR 抑制物都会影响后续的 PCR 反应,对土壤 DNA 的纯化是至关重要的。针对土壤 DNA 粗提样品的纯化方法报道较多,常见的除了本研究采用的 Moreira 的方法外还有氯化铯梯度离心、色谱法、电泳法等方法,用氯化铯梯度离心纯化时耗时耗力并且会损失大量样品;电泳法纯化效果相对较差,得不到高纯度的 DNA 样品;色谱法能够得到高纯度的 DNA 样品,但比较费时费力<sup>[13]</sup>。本研究采用了 Moreira 的方法,这种方法简单易行,纯化效果好,完全去除了 PCR 抑制物,利用纯化的样品扩增 16S rDNA 效果好。

PCR 引物的选择也会影响 DGGE 结果。对胃肠道微生物 DGGE 分析表明用扩增 V3 区的 F341 和 R534 引物对得到的 DGGE 条带最多<sup>[14]</sup>,事实上对 V3 区 PCR-DGGE 的文献报道也是最多的。另外,对微生物群落提取的 DNA 进行 PCR 过程中会产生异源双链,尤其是在 PCR 后期随着引物的大量消耗,导致在 PCR 产物中异源双链占扩增产物的一大部分,异源双链会在 DGGE 胶中产生虚假条带,从而人为夸大细菌群落的多态性。本研究应用 reconditioning PCR 消除了扩增产物中的异源双链<sup>[15,16]</sup>,真实地反映了

稻田土壤中细菌群落结构。

表 2 中回收的 11 个条带中测序结果有 10 个为不可培养的细菌。由此看来稻田土壤中多数细菌是不可培养的, 这一结果是传统培养方法无法实现的, 体现了 PCR-DGGE 技术的优越性。但这种方法也有不足之处, 据报道某些细菌 16S rDNA 片段在 DGGE 图谱上可能不只显示一条带<sup>[17]</sup>, 而不同种类细菌的 16S rDNA 片段也可能因为具有相同的解链行为而不能分开<sup>[18]</sup>。

本研究从 DGGE 技术路线诸如 DNA 提取、引物选择、PCR 嵌套扩增、PCR 产物中异源双链去除等各个方面优化条件, 尽量做到减小试验误差, 力求为福建稻田土壤细菌群落结构提供更加全面、真实的信息。

## 参 考 文 献

- [1] 顾华杰, 李玉祥, 赵明文, 等. 几种水稻田土壤微生物总 DNA 提取方法的比较. *江苏大学学报(医学版)*, 2005, **15**(4): 300.
- [2] 段红平, 张乃明, 李进学, 等. 超高产水稻根际微生物类群数量初探. *土壤肥料科学*, 2007, **23**(2): 285-289.
- [3] Tieying Song, Lotta Martensson, Torsten Eriksson, *et al.* Biodiversity and seasonal variation of the cyanobacterial assemblage in a rice paddy field in Fujian, China. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, **54**: 131-140.
- [4] 罗海峰, 齐鸿雁, 薛 凯, 等. PCR-DGGE 技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用. *生态学报*, 2003, **23**(8): 1571.
- [5] Zhou J, Bruns MA, Tiemdje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(2): 316-322.
- [6] Moreira D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**: 3309-3310.
- [7] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 1991, **173**: 697-703.
- [8] Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 695-700.
- [9] Liesack W, Weyland H, Stakebrandt E. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed culture of strict barophilic bacteria. *Microb Ecol*, 1991, **21**: 192-198.
- [10] <http://www.fjsq.gov.cn/ShowText.asp?Tobook=12&index=81&Query=1&>.
- [11] 罗青, 宋亚娜, 郑伟文. PCR-DGGE 法研究福建省稻田土壤微生物地区多态性. *中国农业生态学报*, 2008, **16**(3): 669-674.
- [12] Niemi RM, Heiskanen I, Wallenius K, *et al.* Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, **45**: 155-165.
- [13] 张秀敏, 徐金娥, 王海祥. 从土壤样品中提取和纯化微生物 DNA 方法研究进展. *保定专科学院学报*, 2005, **18**(2): 34-38.
- [14] Zhongtang Yu, Mark Morrison. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 4800.
- [15] Speksnijder AG, Kowalchuk GA, Jong SD, *et al.* Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 469-472.
- [16] Thompson JD, Marcelino LA, Polz MF. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic Acids Research*, 2002, **30**: 2083-2088.
- [17] Nubel U, Engelen, Felske A, *et al.* Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol*, 1996, **178**: 5636-5643.
- [18] Vallaeyts T, Topp E, Muyzer G, *et al.* Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiol Ecol*, 1997, **24**: 279-285.