

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.07.004

石漠化地区生态桑林根际土壤 微生物资源多样性研究^①

段倩倩¹, 杨晓红¹, 黄先智²

1. 南方山地园艺学教育部重点实验室/西南大学 园艺园林学院, 重庆 400716;

2. 西南大学 蚕学与系统生物学研究所, 重庆 400716

摘要: 以石漠化地区生态桑林根际土壤微生物为研究对象, 对微生物群落多样性进行了 16s、ITs 测序分析以及土壤微生物测序热图分析. 结果表明: 石漠化地区原核微生物中优势物种为变形菌门、放线菌门和异常球菌-栖热菌门等细菌; 优势真核微生物为子囊菌门、接合菌门和担子菌门真菌. 热图分析表明, 其中: ① 有益微生物包括变形菌门的硫杆菌属、紫色杆菌属和假单胞菌属细菌, 异常球菌-栖热菌门的特吕珀菌属细菌以及接合菌门的被孢霉属真菌; ② 与植物病变、腐化有关的真菌种类为子囊菌; ③ Setomelanomma 属真菌的功能尚不明确.

关键词: 石漠化; 桑根际土壤; 微生物资源; 微生物分子生态

中图分类号: S154.39

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)07-0025-05

我国西南岩溶地区是世界上最大的一片裸露、半裸露岩溶区, 以分布面积最大、发育最强烈、发育最典型、发育种类最全、生态环境最脆弱著称^[1]. 重庆是我国碳酸盐分布最广、喀斯特发育最强烈的省区之一, 全市碳酸盐裸露面积多达 3 万 km², 占全省总面积的 40.02%, 喀斯特地区居民占全省人口总数的 34.6%^[2]. 碳酸盐抗风蚀能力强, 硅酸盐含量低, 造壤能力差, 成土速率慢; 长期的岩溶作用导致地表保水能力差, 夏季暴雨冲击后岩石裸露, 加之过伐、过垦等不合理的人类活动, 人地矛盾更加突出, 已经形成了连片半裸露的石山, 严重威胁了当地居民的生活^[3-4].

对于土壤微生物多样性的研究方法, 多数基于纯培养、DGGE 和构建克隆文库. 据调查, 土壤中微生物的可培养率仅为 0.1%~1%^[5-6], 为获得更多不能分离培养的土壤微生物信息, 非培养研究为生物多样性的方法应运而生. DGGE 和克隆文库均是以传统分子生物学方法——Sanger 测序方法为基础的, 但由于 DGGE 可用于分析的片段长度太短, 分类信息不够准确, 常导致相近的微生物无法区分; 而克隆文库方法耗时耗力, 花费巨大, 只有在克隆数目足够多的情况下才能完整地反应土壤微生物情况^[7]. 近年来, 第二代测序方法的出现解决了上述方法通量低、信息量少、耗时长的问题, 逐渐成为土壤微生物多样性研究方法的主流^[8]. 原核微生物的 16s rRNA/rDNA 和真核微生物的 18s rRNA/rDNA 或 ITs rDNA 序列都具有一定的保守性, 这些保守序列为全体微生物所共有, 保守序列中由于进化形成的部分可变区域造成了序列差异性, 这些差异性的测定和比对常用于鉴定微生物种类和揭示微生物群落的多样性.

为进一步探索适应石漠化地区特殊生境的微生物种群, 加快推动微生物肥料的研究, 促进桑树及其他生态树种对石漠化生境的恢复功能的发挥, 本研究以石漠化地区长势良好的桑林根际土壤为实验材料, 对生态桑林根际土壤微生物群落多样性进行了 16s 和 ITs 测序分析, 旨在为石漠化地区微生物肥料设计研究提供依据.

① 收稿日期: 2016-04-07

基金项目: 重庆市研究生科研创新项目(CYS2015072); 现代农业产业技术体系专项(CARS-22-ZJ0503).

作者简介: 段倩倩(1991-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事应用微生物学研究.

通信作者: 杨晓红, 教授, 博士研究生导师.

1 材料与方法

1.1 材料

于 2015 年 10 月在重庆市武隆县长坝镇石漠化区域选样地约 700 m², 采用五点取样法, 按梅花形确定 5 个样方, 样方是边长 3 m 的正方形, 分别从 5 个样方内选取 3 株长势良好的 4 年生桑树, 在其根茎部周围半径 0~20 cm 范围内去除枯枝落叶后, 取水平深度为 0~15 cm 的根际土壤各 100 g, 去掉其中的石块、杂草及植物根系等杂质, 将每个样方中的土壤混匀后编号, 用灭过菌的 50 mL 塑料离心管装好, 并分别做好标记, 置于冰盒中运回实验室, 然后贮存于 4 °C 冰箱中, 备用。

采样地点地理坐标为 29.30°N, 107.50°E, 海拔高度 608.0 m, 精度±4.0 m. 气候类型为亚热带湿润季风气候, 年平均气温为 11.1 °C, 夏季最高平均气温为 24.7 °C, 冬季最低平均气温为 -2 °C; 年降水量为 1 411 mm, 年平均降水量为 118 mm, 夏季最高平均降水量为 200 mm, 冬季最低平均降水量为 27 mm, 所采集的土壤类型为黄壤. 采样所在地周围植物种类主要有: 桑树, 栎树, 构树, 柏树, 山麦冬, 鬼针草, 狗尾巴草, 红果子, 绞股兰, 野人参(红), 青蒿, 车前草, 黄荆, 首乌, 翠芸苔, 斑茅和菊花等。

1.2 方法

1.2.1 土壤微生物总 DNA 提取

土壤微生物总 DNA 的提取按照 ZYMO RESEARCH 微量土壤微生物 DNA 提取试剂盒说明书进行。

1.2.2 PCR 分析

将检测后合格的土壤微生物总 DNA 样品送至成都 Rhonin 生物科技有限公司, 使用通用的 16s rRNA 基因引物对 515F/806R, ITS 引物对 ITS4/ITS3-KYO2 进行 PCR 扩增, 进行 16s 和 ITS 序列的扩增、测序。

1.2.3 数据分析

经 Illumina 公司 MiSeq Reagent Kit v3(MS-102-3003)测序得到的序列, 首先用 QIIME 软件进行序列拼接, 同时进行序列过滤, 得到可进行后续分析的高质量目标序列后, 16s rDNA 基因使用 RDP 数据库进行比对, ITS 使用 UNITE 数据库进行比对, 用 Usearch, QIIME 或 Mothur 软件进行生物信息学分析, 后续统计与作图使用 R 软件完成, 使用 Excel 对结果进行进一步的统计与分析。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物总 DNA 提取电泳结果

土壤微生物基因组总 DNA 提取按照按照 ZR 微量土壤微生物 DNA 提取试剂盒说明书进行, 获得的 DNA 用 100 μL DNA 洗脱液洗脱后, 转移至预先准备好的 Zymo-Spin™ IV-HRC 旋转过滤柱中离心, 去掉土壤微生物基因组总 DNA 中残留的腐殖酸, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的 DNA 质量(图 1), 泳带清晰, 杂质较少, 无拖尾现象。

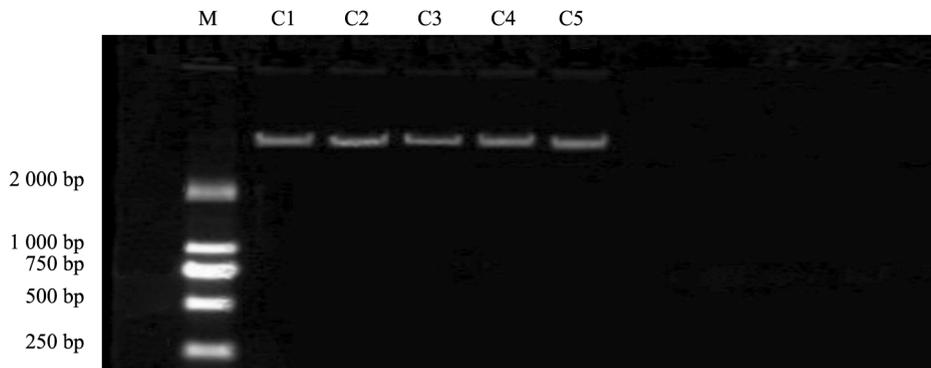


图 1 土壤微生物基因组 DNA 电泳图

2.2 土壤微生物 16s 和 ITS 片段测序热图

2.2.1 土壤微生物测序门水平分析

将所得的 OTUs 用 RDPclassifier 贝叶斯算法或 Uclust 分类法对 97% 相似水平的 OTU 中具有代表性的序列进行分类学分析, 将获得的门分类水平的数据统计桑根际土壤中原核微生物、真核微生物的群落组成。

土壤 16s 测序分析结果反应了土壤细菌和古生菌的群落多样性, 由图 2 可得, 在石漠化地区原核微生物

物中, 排在前 5 位的门依次是: 变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus)、绿弯菌门(Chloroflexi)和奇古菌门(Thaumarchaeota)。图 2. 2. 3 中 ITs 测序分析所反映的土壤真菌群落门水平分析表明, 约 83.1% 的真菌属于子囊菌门(Ascomycota), 其次为接合菌门(Zygomycota), 约 10.5%, 担子菌门(Basidiomycota)仅为 2.5%。

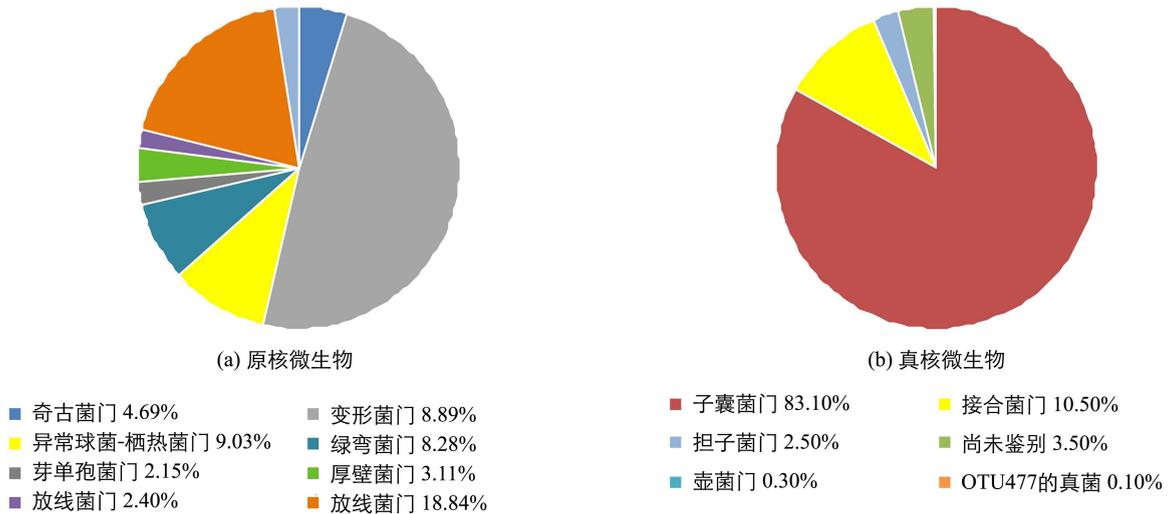


图 2 土壤微生物测序门水平分析

2. 2. 2 土壤微生物测序热图

门以下水平分析热图可用于表示样品在不同分类层次水平上的群落组成和丰度。其中横坐标代表样品名称, 纵坐标是按照属(Genus)的平均丰度排列的, 用颜色深浅表示, 图 3 中显示了 50 个平均丰度最高的 OTU 所对应的属名。

在石漠化地区桑树根际土壤原核微生物群落中, 变形菌门的硫杆菌属(*Thiobacillus*)、紫色杆菌属(*Janthinobacterium*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)以及异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus)的特吕珀菌属(*Truepera*)为优势属; 真核微生物群落中, 子囊菌以及接合菌真菌为优势。

3 讨论

土壤微生物群落在不同环境的生态系统中会有不同的体现, 特别地, 在石漠化生态系统中, 优势菌种的存在是对当前生境长时间的适应与调整所形成的, 甚至若干有害微生物的存在也是石漠化土壤生态系统保持平衡的微观体现。

3. 1 土壤原核微生物在石漠化地区的生态适应性分析

在石漠化生态桑林根际土壤细菌和古生菌群落中占据优势的硫杆菌属细菌具有硫元素氧化功能, 研究证实, 接种硫杆菌属细菌能够降低土壤中可交换钠的含量, 促进土壤中盐分的渗出, 特别是钠盐, 降低植物受土壤盐胁迫的可能性^[9]; 另外被证明能与根内球囊霉(*Glomus intraradices*)——丛枝菌根真菌(Arbuscular mycorrhizal fungi)的一种——协同提高玉米吸收土壤养分的能力^[10], 是能适应石漠化地区极端环境的有益细菌物种之一。而紫色杆菌属(*Janthinobacterium*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)细菌均属于土壤中广泛存在的优势未培养细菌属^[11]。异常球菌-栖热菌门包括一些能抵抗残酷环境的球状细菌; 同时已有实验证明, 在受碳氢化合物污染的土壤中, 异常球菌-栖热菌门细菌数量发生上调^[12], 推测该门下的细菌可能具有高效消化土壤有机物的能力。

3. 2 土壤真核微生物在石漠化生境的生态功能分析

在石漠化生态桑林根际土壤的几种优势真菌中, 只有接合菌门的被孢霉属被确定为土壤有益微生物, 该门下包含了 AM 真菌^[13]。被孢霉属真菌具有溶解土壤中的磷的功能, 实验证明, 被孢霉属真菌与 AM 真菌中的摩西球囊霉(*Glomus mosseae*)双接种能显著降低盐胁迫对土壤的不良影响并显著提高土壤酶活性^[14]。除此之外的几种优势真菌中, 钉孢属真菌常寄生于植物地上部位引起病害^[15]; 类似地, 炭角菌属真菌大多为腐生性, 少数为寄生性, 大多寄生于腐木上, 对木质素降解有一定作用^[16]; 镰孢菌属真菌是土壤真菌的主要类群, 该属真菌是植物萎蔫病和根腐病的主要病原菌^[17]; 而 *Setomelanomma* 属真菌研究极少,

2014 年首次在国内发现,且仅停留在形态学、系统发育学研究水平,其具体生态功能尚不清楚^[18].

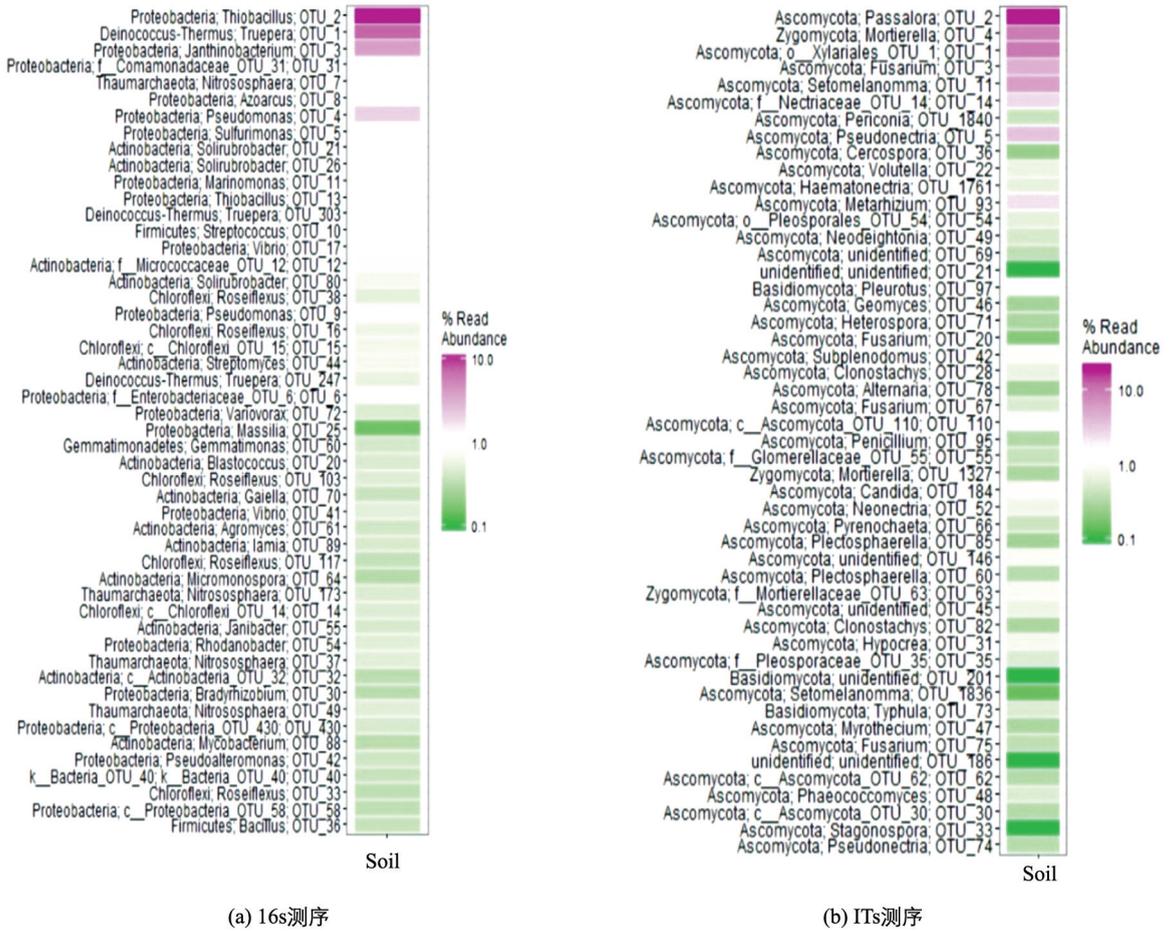


图 3 土壤微生物测序热图

4 结论与展望

本研究利用高通量测序方法对石漠化地区桑树根际土壤进行了土壤细菌、古生菌和真菌进行了群落多样性测序分析,结果表明:在测序分析所得的土壤中优势微生物群落中,① 有益微生物包括变性菌门的硫杆菌属、紫色杆菌属和假单胞菌属细菌,异常球菌-栖热菌门的特吕珀菌属细菌以及接合菌门的被孢霉属真菌等;② 与植物病变、腐化有关的真菌种类为子囊菌门(Ascomycota)的钉孢属(*Passalora*)、炭角菌属(*Xylaria*)真菌;③ *Setomelanomma* 属真菌的功能尚不明确。以上实验结论将为石漠化地区生态桑林及其他生态树种的生物肥料研发提供参考,为进一步实现石漠化地区的生态修复奠定基础,而本实验所得出的优势微生物群落的具体功能及它们之间的协作关系仍有待进一步探究。

参考文献:

- [1] 孙凡,徐胜旺,马生丽,等.典型喀斯特地区季节性石漠化与生态环境建设[J].西南农业大学学报(社会科学版),2011,9(5):1-6.
- [2] 朱章雄,张治伟,蒋勇军.重庆典型岩溶区石漠化现状及综合治理初探[J].人民长江,2006,37(11):90-92,102.
- [3] 施松梅,陈珂,涂波,等.石漠化地区桑根际AM真菌多样性及桑壮苗培育研究[J].西南大学学报(自然科学版),2013,35(10):24-30.
- [4] 苏维词,杨华,李晴,等.我国西南喀斯特山区土地石漠化成因及防治[J].土壤通报,2006,37(3):447-451.
- [5] PACE N R. A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere[J]. Science, 1997, 276(5313): 734-740.
- [6] TORSVIK V, GOKSOYR J, DAAE F L. High Diversity in DNA of Soil Bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(3): 782-787.
- [7] 薛超,黄蔚为,凌宁,等.连作土壤微生物区系分析、调控及高通量研究方法[J].土壤学报,2011,48(3):612-618.

- [8] 楼 骏, 柳 勇, 李 延. 高通量测序技术在土壤微生物多样性研究中的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2014, 30(15): 256–260.
- [9] STAMFORD N P, SILVA A J, FREITAS A D, et al. Effect of Sulphur Inoculated with Thiobacillus on Soil Salinity and Growth of Tropical Tree Legumes [J]. *Bioresource Technology*, 2002, 81(1): 53–59.
- [10] ANSORI A, GHOLAMI A. Improved Nutrient Uptake and Growth of Maize in Response to Inoculation with Thiobacillus and Mycorrhiza on an Alkaline Soil [J]. *Communications In Soil Science and Plant Analysis*, 2015, 46(17): 2111–2126.
- [11] VOGET S, LEGGEWIE C, UESBECK A, et al. Prospecting for Novel Biocatalysts in a Soil Metagenome [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 6235–6242.
- [12] SAUL D J, AISLABIE J M, BROWN C E, et al. Hydrocarbon Contamination Changes the Bacterial Diversity of Soil from Around Scott Base, Antarctica [J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2010, 53(1): 141–155.
- [13] GOTO B T, MAIA L C. Glomerospores: a New Denomination for the Spores of Glomeromycota, a Group Molecularly Distinct from the Zygomycota [J]. *Mycotaxon*, 2006, 96(4): 129–132.
- [14] ZHANG H, WU X, LI G, et al. Interactions Between Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Phosphate-Solubilizing Fungus (*Mortierella* sp.) and Their Effects on *Kosteletzkya Virginica* Growth and Enzyme Activities of Rhizosphere and Bulk Soils at Different Salinities [J]. *Biology and Fertility Of Soils*, 2011, 47(5): 543–554.
- [15] 翟凤艳, 刘英杰, 李 玉. 枝孢属、钉孢属及柱隔孢属真菌内蒙新记录种 [J]. 西北农业学报, 2011, 20(4): 1–6.
- [16] 黄 谷, 刘 娜, 李梦臻. 中国南方炭角菌属的分类研究 [C/OL]. 北京: 中国菌物协会, 中国菌物学会第六届会员代表大会(2014年学术年会)暨贵州省食用菌产业发展高峰论坛会议摘要, 2014: 31 [2016-01-07]. http://xueshu.baidu.com/s?wd=paperuri%3A%282debec01c29fa20480031cf999ba9dc2%29&filter=sc_long_sign&tn=SE_xueshu_source_2kduw22v&sc_vurl=http%3A%2F%2Fcpfd.cnki.com.cn%2FArticle%2FCPFDTOTAL-ZGVL201407001030.htm&ie=utf-8&sc_us=841757835380156037.
- [17] 魏 巍, 许艳丽, 刘金波, 等. 土壤镰孢菌 Real-Time QPCR 定量方法的建立及应用 [J]. 大豆科学, 2010, 29(4): 655–658, 662.
- [18] WU Z Q, FAN X L, YANG T, et al. New Record of *Setomelanomma Holmii* on *Picea Crassifolia* in China Based on Morphological and Molecular Data [J]. *Mycotaxon*, 2014, 128(1): 105–111.

The Diversity of Microbial Resources in Ecological Mulberry Rhizosphere Soil in a Rocky Desertification Area

DUAN Qian-qian¹, YANG Xiao-hong¹, HUANG Xian-zhi²

1. Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education / School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China;
2. Institute of Sericulture and Systems Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: For scientific usage of scarce land resources and improvement of ecological resistance of mulberry, mulberry rhizosphere soil microbes in a rocky desertification area were investigated. Soil microbial community diversity was analysed by ways of 16S rDNA sequence and ITS sequence and soil microbial sequencing heatmap. The results showed that the dominant prokaryotic microbes in this area were bacteria of Proteobacteria, Actinobacteria and Deinococcus-Thermus, and the dominant eukaryotic microorganisms were fungi of Ascomycota, Zygomycota and Basido-mycota. Heatmap analysis showed that beneficial microorganisms included the bacteria genera *Thiobacillus*, *Janthinobacterium* and *Pseudomonas* of Proteobacteria and *Truepera* of Deinococcus-Thermus, and the fungus genus *Mortierella* of Zygomycota. Fungi related to plant diseases and decay were found to belong to Ascomycota. The function of the fungus genus *Setomelanomma* remained undefined. The complex interaction among these microbial communities will be focused on in our next study in order to support microbial fertilizer design in rocky desertification areas.

Key words: rocky desertification; mulberry rhizosphere soil; microbial resource; microbial molecular ecology

