

用SRAP标记研究根际土壤微生物的遗传多样性

李春楠^{1,2} 崔海瑞^{1,*} 王伟博¹

1 (浙江大学原子核农业科学研究所, 农业部核农学重点开放实验室, 杭州 310029)

2 (杭州市农业科学研究院园艺研究所, 杭州 310024)

摘要: 将近年来新建立的分子标记技术——相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)应用于土壤微生物遗传多样性研究。采用22对引物组合对20种植物根际土壤微生物进行了分析, 共获得237个扩增位点, 其中多态性位点221个, 占93.2%。平均每对引物组合的多态位点比例(*PPL*)、多态信息含量(*PIC*)、等位基因单体型(*Ah*)和遗传杂合度(*He*)分别为93.78%、0.94、18.05和0.92, 说明SRAP对根际土壤微生物具有较强的鉴别能力, 也反映了本研究中20种不同植物的根际土壤微生物具有丰富的遗传多样性。水稻的2个不同种植地和4个不同发育时期间的根际土壤微生物遗传距离差异极显著, 但2个不同水稻品种间的差异不显著。Shannon多样性指数揭示, 水稻根际土壤微生物的遗传多样性最低, 莴苣的最高。按照非加权类平均法(UPGMA)聚类, 在遗传距离0.454的水平上, 可将20种植物根际土壤微生物分为三类: 第一类是水稻根际土壤微生物, 第二类是种植于大棚温室的芹菜根际土壤微生物, 第三类为其余18种旱作植物根际土壤微生物。本研究结果证明SRAP是分析土壤微生物遗传多样性的有效手段。

关键词: 根际土壤微生物, SRAP, 遗传多样性, 遗传距离, 聚类分析

Genetic diversity in rhizosphere soil microbes detected with SRAP markers

Chunnan Li^{1,2}, Hairui Cui^{1,*}, Weibo Wang¹

1 Institute of Nuclear-Agricultural Sciences/Key Laboratory of Nuclear Agricultural Sciences, Ministry of Agriculture, Zhejiang University, Hangzhou 310029

2 Institute of Horticulture, Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310024

Abstract: We have attempted to use the SRAP (sequence-related amplified polymorphism) markers, a new molecular technology, to study genetic diversity in soil microbes. We sampled rhizosphere soil microbes from 20 plant species and employed 22 SRAP primer combinations. A total of 237 scorable fragments were identified, of which 221 (93.2%) were polymorphic loci. The average percentage of polymorphic loci (*PPL*), polymorphism information content (*PIC*), allele haplotype (*Ah*), and expected heterozygosity (*He*) for each primer combination were 93.78%, 0.94, 18.05 and 0.92, respectively. Our results revealed rich genetic diversity in rhizosphere soil microbes and the high ability of SRAP to resolve samples based on their genetic basis. Differences in genetic distance for rice rhizosphere microbes between two locations, and that among four different developmental stages were both significant at 0.01 level, but the difference was not significant between two varieties. Shannon diversity indices indicated that the genetic diversity of rhizosphere soil microbes was lowest in rice and highest in lettuce. The rhizosphere soil microbes from 20 plant species could be clustered into three groups at the 0.454 (*GD*) level based on UPGMA, in which the first group was from rice, while the second group was from celery planted in plastic green house, and the third group was from 18 other plant species cultivated in dry lands. Our results suggest that SRAP is an efficient method for analyzing the genetic diversity in rhizosphere soil microbes.

Key words: rhizosphere soil microbe, SRAP, genetic diversity, genetic distance, cluster analysis

为克服传统研究技术的局限性, 一系列生物化学和分子生物学技术被引入土壤微生物多样性的

收稿日期: 2010-09-25; 接受日期: 2011-02-19

基金项目: 国家转基因重大专项资助项目(2009ZX08011-014B)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: hrcui@zju.edu.cn

研究中。目前土壤微生物多样性研究主要集中在物种多样性、功能多样性和遗传多样性三个层面(周桔和雷霆, 2007), 其中遗传多样性研究主要通过分子生物学技术来进行(Kirk *et al.*, 2004)。这些技术可分为以下几类: 一是基于分子杂交的技术, 如荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH, 见 Head *et al.*, 1998)和DNA芯片技术(Hubert *et al.*, 1999; Cho & Tiedje, 2001); 二是基于PCR的技术, 如随机扩增多态性DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD, 见Xia *et al.*, 1995)、单链构象多态性(single-strand conformation polymorphism, SSCP, 见Lee *et al.*, 1996)、变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、温度梯度凝胶电泳(temperature gradient gel electrophoresis, TGGE) (Muyzer *et al.*, 1993; Muyzer, 1999)和核糖体基因间区分析(ribosomal intergenic spacer analysis, RISA, 见Borneman & Triplett, 1997); 三是基于PCR与限制性内切酶相结合的技术, 如扩增核糖体DNA限制性分析(amplified rDNA restriction analysis, ARDRA, 见Liu *et al.*, 1997)、末端限制性片段长度多态性(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP, 见Osborn *et al.*, 2000)和扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP, 见Willems *et al.*, 2000; Terefework *et al.*, 2001); 四是基于构建文库的分析技术, 如针对特定基因的克隆文库分析技术(Rheims *et al.*, 1996; Hugenholtz *et al.*, 1998)和针对整个基因组的宏基因组技术(Rondon *et al.*, 2000; Daniel, 2005)。上述研究方法在土壤微生物鉴定、遗传多样性等研究领域发挥了重要作用, 但这些技术也都存在某些难以克服的弊端。因此, 探索新的土壤微生物遗传多样性研究技术仍然十分必要。

相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是近年来发展起来的一种基于PCR的新型分子标记技术, 由美国加州大学Li和Quiros(2001)开发。其基本原理是通过特殊的引物设计对开放阅读框架(open reading frames, ORFs)进行扩增, 正向引物基于外显子里GC含量丰富而设计, 含CCGG序列核心, 对外显子进行特异扩增; 反向引物基于启动子和内含子里AT含量丰富而设计, 含AATT序列核心, 对启动子区域和内含子区域进行特异扩增。不同个体和物种因正反向引物间

的间隔长度不等而产生扩增长度多态性。SRAP技术已广泛应用于植物(柳李旺等, 2004; 赵雪等, 2007)和水产动物(傅洪拓等, 2010)资源遗传多样性分析中, 但目前未见其应用于土壤微生物多样性研究的报道。本研究采用SRAP技术对20种植物根际土壤微生物进行了分析, 以期建立土壤微生物遗传多样性研究的新方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用的植物根际土壤包括两部分。一是20种不同植物的根际土壤(见表1), 取样地点为浙江大学华家池校区农场, 集中分布在A、B、C 3个区域(见图1), 土壤基本理化性质见表2。A区为水田, 种植水稻(OS); B区为旱作区, 种植芹菜(AG)、大蒜(AS)、韭菜(AT)、白菜(BC)、油菜(BN)、茶树(CS)、大豆(GM)、番茄(LE)、莴苣(LS)、豌豆(PS)、萝卜(RS)、茄子(SM)、马铃薯(ST)、小麦(TA)、玉米(ZM), 其中大蒜套种于茶树行间, 芹菜种植于大棚, 其他植物为分开种植; C区也是旱作区, 有甘蓝(BO)、高

表1 20种植物根际土壤取样编号
Table 1 Codes of rhizosphere soils sampled from 20 plant species

编号 Code	植物 Plant species
A 区 Zone A	
OS	水稻 Rice (<i>Oryza sativa</i>)
B 区 Zone B	
AG	芹菜 Celery (<i>Apium graveolens</i>)
AS	大蒜 Garlic (<i>Allium sativum</i>)
AT	韭菜 Chinese chives (<i>Allium tuberosum</i>)
BC	白菜 Chinese cabbage (<i>Brassica campestris</i> ssp. <i>pekinensis</i>)
BN	油菜 Rapeseed (<i>Brassica napus</i>)
CS	茶树 Tea plant (<i>Camellia sinensis</i>)
GM	大豆 Soybean (<i>Glycine max</i>)
LE	番茄 Tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i>)
LS	莴苣 Lettuce (<i>Lactuca sativa</i>)
PS	豌豆 Pea (<i>Pisum sativum</i>)
RS	萝卜 Radish (<i>Raphanus sativus</i>)
SM	茄子 Eggplant (<i>Solanum melongena</i>)
ST	马铃薯 Potato (<i>Solanum tuberosum</i>)
TA	普通小麦 Wheat (<i>Triticum aestivum</i>)
ZM	玉米 Maize (<i>Zea mays</i>)
C 区 Zone C	
BO	甘蓝 Cabbage (<i>Brassica oleracea</i>)
FA	高羊茅 Tall fescue (<i>Festuca arundinacea</i>)
HV	大麦 Barley (<i>Hordeum vulgare</i>)
VF	蚕豆 Broad bean (<i>Vicia faba</i>)

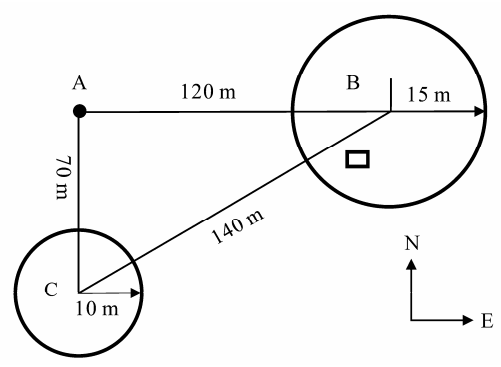


图1 20种植物根际土壤取样分布图(B中□表示种植芹菜的塑料大棚)
Fig. 1 Distribution of rhizosphere soils sampled from 20 plant species (□ in B stands for plastic green house for planting celery)

羊茅(FA)、大麦(HV)、蚕豆(VF)。二是水稻不同品种、不同种植地点和不同发育时期的根际土壤, 所用品种为明恢 63 和嘉早 935, 种植在浙江大学华家池校区农场和建德实验基地。分别在分蘖期、抽穗期、灌浆期和成熟期采集根际土壤。

1.2 土壤微生物总DNA的提取

采用陈旭玉等(2008)报道的方法提取土壤微生物总DNA, 用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的含量与质量。

1.3 SRAP扩增与检测

按照Li和Quiros(2001)提出的原则设计引物(见表3), 参照其SRAP反应体系进行PCR扩增, 并以不同植物根际土壤微生物基因组DNA混合物为模板进行体系优化。在25 μL反应体系中, 模板用量的设置为7.5 ng、15 ng、30 ng、60 ng和120 ng, 引物浓度的设置为0.05 μM、0.1 μM、0.2 μM、0.4 μM和0.8 μM, dNTPs浓度的设置为0.05 mM、0.1 mM、0.2 mM、0.4 mM和0.8 mM, Mg²⁺浓度的设置为0.5 mM、1 mM、2 mM和4 mM, Taq DNA聚合酶用量的设置为0.5 U、1 U、1.5 U和2 U。

在对退火温度进行测试的基础上, 确定了扩增程序: 94℃ 5 min; 94℃ 45 s, 35℃ 1 min, 72℃ 1 min 30 s, 共5个循环; 94℃ 45 s, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min 30 s, 共35个循环; 72℃延伸10 min, 4℃保存。扩增产物经8%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 110 V恒压约130 min, 采用银染检测(任民等, 2008)。所用引物和有关试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.4 数据统计与处理

统计凝胶上清晰、可重复出现的条带, 每个样品条带按有无记录, 有带赋值为1, 无带赋值为0, 从而形成原始数据阵。运用NTSYSpc2.1软件(Rohlf, 2000)统计数据, 计算遗传距离(GD), 按照非加权

表2 3个取样区域土壤的理化性质
Table 2 Physical and chemical properties of soil in the three sampling zones

取样地点 Sites	pH	有机质 Organic matter (g/kg)	全氮 Total N (g/kg)	速效P Available phosphorus (mg/kg)	速效K Available potassium (mg/kg)
A区	6.47	18.59	1.13	18.40	43.80
B区	7.20	16.70	1.44	52.54	61.76
C区	7.15	15.10	1.80	48.52	58.10

取样地点代号同图1 Sample sites see Fig. 1

表3 本研究所用SRAP正反引物序列
Table 3 Sequences of SRAP forward and reverse primers used in the present study

编号 Code	正向引物序列 Forward primer (5'-3')	编号 Code	反向引物序列 Reverse primer (5'-3')
F1	TGAGTCCAAACCGGATA	R1	GACTGCGTACGAATTAAT
F2	TGAGTCCAAACCGGAGC	R2	GACTGCGTACGAATTGTC
F3	TGAGTCCAAACCGGAAT	R3	GACTGCGTACGAATTGAC
F4	TGAGTCCAAACCGGACC	R4	GACTGCGTACGAATTTGA
F5	TGAGTCCAAACCGGAAG	R5	GACTGCGTACGAATTAAC
F6	TGAGTCCAAACCGGTAA	R6	GACTGCGTACGAATTGCA
F7	TGAGTCCAAACCGGTCC	R7	GACTGCGTACGAATTCAA
F8	TGAGTCCAAACCGGTGC	R8	GACTGCGTACGAATTAGC

类平均法(unweighted pair-group method and arithmetic average, UPGMA) (Nei & Li, 1979)聚类分析。有关多样性参数按照以下公式进行计算:

(1)多态信息含量(polymorphism information content, 见Botstein *et al.*, 1980): $PIC = 1 - \sum(P_i)^2$

(2) Shannon多样性指数: $I = -\sum P_i \ln P_i$ 。其中 P_i 为第 i 个等位基因变异出现的频率。

(3) 多态位点比例(percentage of polymorphic loci): $PPL = (k/n) \times 100\%$ 。其中 k 为多态位点的数目, n 为所检测的位点总数。

(4) 遗传杂合度(expected heterozygosity): $He = 1 - \sum(f_i)^2$, f_i 为第 i 个位点出现的频率。

2 结果

2.1 反应体系的建立和引物的筛选

以扩增产物电泳条带清晰、结果稳定为目标,通过对模板、引物、dNTPs和*Taq* DNA聚合酶等用量的测试,建立了可用于植物根际土壤微生物SRAP的适宜反应体系,最终优化体系包含1×PCR缓冲液、2 mM MgCl₂、0.2 mM dNTPs、0.4 μM引

物, 30 ng模板DNA和1 U *Taq* DNA聚合酶,用无菌水补足至25 μL。

对全部64对引物组合进行了筛选,可扩增出清晰条带的有49个,占引物组合的76.6%。

2.2 SRAP标记多态性

用其中扩增条带多、重复性好的22对引物组合对20种不同植物根际土壤微生物DNA进行了SRAP分析,扩增情况和多态性信息见表4。扩增片段大小在50–500 bp之间, 22对引物组合共扩增出237个位点,平均为10.77个,其中, 3/4以上是多态的(221个),占93.2%,有12对引物组合扩增的位点全为多态,平均多态位点比例(*PPL*)为93.78%。等位基因单体型数目(*Ah*)变化于12–20之间,平均可达18.05;多态信息含量(*PIC*)都在0.90以上,平均高达0.94;遗传杂合度(*He*)变化范围为0.837–0.998,平均达到0.92。这些结果表明,尽管不同引物组合的多态性有所差异,但都表现出较高的多态性,一方面说明SRAP技术对根际土壤微生物具有较强的鉴别能力,另一方面反映了本研究中20种不同植物的根际土壤微生物具有丰富的遗传多样性。

表4 22对SRAP引物组合在20种植物根际土壤微生物中的多态性信息
Table 4 Polymorphic information of rhizosphere soil microbes from 20 plant species with 22 SRAP primer combinations

引物组合 Primer combination	扩增片段大小 Fragment size (bp)	位点总数 Total fragments	多态位点比例 <i>PPL</i> (%)	等位基因单体型 <i>Ah</i>	多态信息含量 <i>PIC</i>	遗传杂合度 <i>He</i>
F1/R3*	110–310	14	92.86	20	0.95	0.9127
F1/R6*	180–300	9	88.89	18	0.94	0.8732
F1/R7*	120–290	7	85.71	13	0.90	0.9909
F1/R8	70–280	17	76.47	19	0.95	0.9137
F2/R3*	90–300	13	100.00	20	0.95	0.9921
F2/R4*	50–300	16	87.50	19	0.95	0.9975
F2/R7*	100–300	10	100.00	17	0.94	0.9527
F3/R2	120–280	9	100.00	19	0.95	0.8854
F3/R3*	100–290	11	81.82	16	0.93	0.9770
F3/R8*	110–270	8	75.00	15	0.91	0.9944
F4/R2	90–310	7	100.00	12	0.90	0.8884
F4/R4	130–480	9	100.00	18	0.94	0.9912
F5/R1	140–280	11	100.00	19	0.95	0.9077
F5/R2	130–500	10	100.00	19	0.95	0.8878
F5/R3	60–310	12	91.67	19	0.95	0.8651
F5/R6	130–290	10	100.00	20	0.95	0.8368
F5/R7	80–480	15	93.33	20	0.95	0.8909
F6/R1	130–400	9	100.00	20	0.95	0.8732
F6/R7*	110–450	10	90.00	16	0.93	0.8979
F6/R8	100–470	8	100.00	18	0.94	0.8872
F8/R5*	80–460	12	100.00	20	0.95	0.9222
F8/R7*	120–470	10	100.00	20	0.95	0.8668

*进一步用于不同生育期、不同地点水稻根际土壤微生物SRAP分析的引物 The primer combinations used for analysis of rice rhizosphere soil microbes collected at different locations and developmental stages. *PPL*, Percentage of polymorphic loci; *Ah*, Allele haplotype; *PIC*, Polymorphism information content; *He*, Expected heterozygosity.

表 5 20 种植物根际土壤微生物间遗传距离
Table 5 The genetic distance among rhizosphere soil microbes sampled from 20 plant species

	OS	HV	FA	TA	ZM	VF	PS	GM	BO	BN	RS	BC	SM	LS	AG	ST	LE	AT	AS
HV	0.4945																		
FA	0.5464	0.2774																	
TA	0.4602	0.4459	0.4756																
ZM	0.4797	0.3246	0.3704	0.4332															
VF	0.5377	0.3794	0.3784	0.4329	0.2878														
PS	0.4709	0.4246	0.4657	0.4173	0.3370	0.3278													
GM	0.4831	0.3676	0.3956	0.3699	0.4515	0.3721	0.3982												
BO	0.4645	0.2833	0.3314	0.4553	0.2498	0.3021	0.2812	0.3434											
BN	0.4673	0.3642	0.4371	0.3882	0.3646	0.4799	0.3464	0.3986	0.3494										
RS	0.4337	0.3841	0.4873	0.4351	0.4712	0.4704	0.3636	0.3981	0.3571	0.3636									
BC	0.5193	0.3912	0.4527	0.5194	0.3055	0.3646	0.3273	0.3852	0.3119	0.3240	0.3506								
SM	0.5141	0.4271	0.4169	0.5248	0.4045	0.3904	0.4020	0.3759	0.3349	0.3937	0.4164	0.3582							
LS	0.4669	0.3119	0.3492	0.4484	0.2787	0.3302	0.2934	0.3439	0.2542	0.3135	0.4045	0.2004	0.3060						
AG	0.5280	0.5030	0.5130	0.5368	0.4514	0.5744	0.4676	0.4549	0.4612	0.4514	0.4795	0.4546	0.4323	0.4987					
ST	0.5008	0.3777	0.3723	0.4667	0.3213	0.3213	0.2898	0.3434	0.2663	0.3306	0.3474	0.2768	0.2777	0.2462	0.4379				
LE	0.5355	0.3678	0.4030	0.5115	0.3125	0.3310	0.2995	0.3531	0.2675	0.3783	0.3668	0.2198	0.3348	0.2321	0.4476	0.2344			
AT	0.5872	0.4976	0.4413	0.4874	0.4262	0.4608	0.3905	0.4074	0.3945	0.3715	0.4868	0.3367	0.4287	0.2674	0.5811	0.3634	0.3136		
AS	0.4843	0.3612	0.3875	0.4275	0.3619	0.3344	0.2995	0.3082	0.3109	0.3918	0.3505	0.3044	0.3483	0.2788	0.4214	0.3200	0.2679	0.3886	
CS	0.5350	0.3914	0.3768	0.4163	0.3918	0.4287	0.3825	0.3175	0.2843	0.3817	0.4013	0.3411	0.3483	0.3218	0.4685	0.3761	0.2939	0.3572	0.2590

土壤取样编号同表 1 Codes of soil samples see Table 1

2.3 不同植物根际土壤微生物的遗传多样性

利用NTSYSpc2.1软件计算出的20种植物根际土壤微生物遗传距离见表5。20种植物根际土壤微生物遗传距离变化范围在0.2004–0.5872之间,白菜(BC)和茼蒿(LS)间的根际土壤微生物遗传距离最近,仅0.2004,水稻(OS)与韭菜(AT)间根际微生物的遗传距离最大,为0.5872。不同植物间根际土壤微生物平均遗传距离高达0.3886,表明不同植物根际土壤微生物的遗传基础有很大差异,遗传多样性非常丰富。

20种植物根际土壤微生物DNA的SRAP扩增条带和Shannon多样性指数具有明显的差异(表6),说明不同植物根际土壤微生物的遗传多样性亦不同。20种植物根际土壤微生物共扩增出2,826个位点,每种介于116–166个之间,其中以水稻(OS)最少(116个),茼蒿(LS)最多(166个),多态性位点数和Shannon多样性指数也具有相同的趋势。因此,就本

表6 20种植物根际土壤微生物的SRAP扩增和Shannon多样性指数
Table 6 SRAP amplification and Shannon diversity index of rhizosphere soil microbes from 20 plant species

样品编号 Sample codes	位点总数 Total fragments	多态位点数 No. of polymorphic loci	多态位点比例 PPL (%)	Shannon多样性指数 I
水稻 OS	116	99	85.34	0.2558
芹菜 AG	118	101	85.59	0.2579
大蒜 AS	149	132	88.59	0.3156
韭菜 AT	129	112	86.82	0.2774
白菜 BC	152	135	88.82	0.3205
油菜 BN	144	127	88.19	0.3019
茶树 CS	149	132	88.59	0.3144
大豆 GM	145	128	88.28	0.3086
番茄 LE	157	140	89.17	0.3281
茼蒿 LS	166	149	89.76	0.3457
豌豆 PS	156	139	89.10	0.3258
萝卜 RS	138	121	87.68	0.2945
茄子 SM	132	115	87.12	0.2823
马铃薯 ST	154	137	88.96	0.3240
普通小麦 TA	125	108	86.40	0.2714
玉米 ZM	144	127	88.19	0.3066
甘蓝 BO	154	137	88.96	0.3243
高羊茅 FA	126	109	86.51	0.2728
大麦 HV	141	124	87.94	0.2993
蚕豆 VF	131	114	87.02	0.2817

土壤取样编号同表1 Codes of soil samples see Table 1. PPL, Percentage of polymorphic loci; I, Shannon diversity index.

结果而言,茼蒿根际土壤微生物的遗传多样性最高,水稻较低。

2.4 不同品种、种植地点和发育时期的影响

进一步用22对引物组合中的11对引物组合(见表4)对2个不同水稻品种在2个不同种植地点的4个发育时期的根际土壤微生物DNA进行了分析。根据遗传距离的分析结果:不同种植地点根际土壤微生物的遗传距离差异极显著(表7);2个水稻品种在同一种植点根际微生物的遗传距离无显著差异(表8),但在两个地点遗传距离差异都极显著;而不同发育时期遗传距离的差异显著性则随种植地点的不同而变化,在华家池农场种植点,成熟期与其他3个时期具有显著差异,而在建德实验基地,不同发育时期无显著差异(表9)。这些结果表明土壤和发育时期对根际土壤微生物具有显著的影响,而品种的影响不显著。

2.5 聚类分析

UPGMA聚类分析(图2)显示,在遗传距离0.482的水平上,可将20种植物的根际土壤微生物分为两大类:一类只有水稻(OS),另一大类包含所有参试

表7 华家池和建德两个种植地点水稻根际土壤微生物的遗传距离参数
Table 7 Parameters of genetic distance of rice rhizosphere soil microbes at Huajiachi (HJC) and Jiande (JD)

地点 Location	变化范围 Range	变异系数 CV (%)	标准差 SD	平均 Average
华家池 HJC	0.0907–0.1771	16.66	0.0207	0.1243 ^A
建德 JD	0.0256–0.0821	29.27	0.0160	0.0546 ^B

不同上标字母表示在0.01水平差异显著 Data with different superscripts are significantly different at 0.01 level

表8 嘉早935和明恢63两水稻品种间根际土壤微生物遗传距离参数比较
Table 8 Parameters of genetic distance between Jiazao 935 and Minghui 63 at Huajiachi (HJC) and Jiande (JD)

品种/地点 Variety/location	变化范围 Range	变异系数 CV (%)	标准差 SD	平均 Average
明恢63/华家池 Minghui 63/HJC	0.0958–0.1438	15.45	0.0189	0.1226 ^A
嘉早935/华家池 Jiazao 935/HJC	0.1002–0.1339	11.04	0.0128	0.1157 ^A
明恢63/建德 Minghui 63/JD	0.0256–0.0520	25.24	0.0104	0.0412 ^B
嘉早935/建德 Jiazao 935/JD	0.0334–0.0455	10.82	0.0044	0.0404 ^B

不同上标字母表示在0.01水平差异显著 Data with different superscripts are significantly different at 0.01 level

表9 两个种植地点水稻不同生育期根际土壤微生物的遗传距离参数
Table 9 Parameters of genetic distance of rice rhizosphere soil microbes at different developmental stages in Huajiachi (HJC) and Jiande (JD)

取样时期 Stage		变化范围 Range	变异系数 CV (%)	标准差 SD	平均 Average
华家池 Huajiachi					
成熟期 Maturation		0.1050–0.1771	15.56	0.0215	0.1381 ^A
抽穗期 Heading		0.1002–0.1580	15.01	0.0185	0.1232 ^B
分蘖期 Tillering		0.0907–0.1620	17.20	0.0205	0.1189 ^B
灌浆期 Filling		0.0958–0.1548	14.94	0.0175	0.1171 ^B
建德 Jiande					
成熟期 Maturation		0.0256–0.0821	34.05	0.0195	0.0573 ^C
灌浆期 Filling		0.0404–0.0821	25.12	0.0142	0.0565 ^C
分蘖期 Tillering		0.0333–0.0800	30.99	0.0165	0.0532 ^C
抽穗期 Heading		0.0256–0.0701	28.03	0.0144	0.0515 ^C

不同上标字母表示在0.01水平差异显著 Data with different super-scripts are significantly different at 0.01 level

的19份旱作植物; 在遗传距离0.454的水平上, 可将所有植物的根际土壤微生物分为三类: 第一类是水稻(OS), 第二类是芹菜(AG), 第三类为其余18种旱作植物。

3 讨论

目前, 已有多种技术用于土壤微生物遗传多样性的分析, 但都存在一些缺陷。多数方法只针对微生物DNA中的特定片段进行检测, 但这样扩增出的片段在基因组中毕竟只占很小比例, 不能反映出整

个基因组水平上的遗传多样性; 有的只局限于原核微生物特定片段的检测, 不能揭示出真核生物的遗传多样性, 如ARDRA和RISA; 有的检测的只是特定片段内的单个核苷酸变异, 既不能确定所分析DNA片段中突变的类型和位置, 也不能检测土壤微生物中所占比例极小的劣势种群的多样性, 如SSCP、DGGE、TGGE; 有的需要荧光标记引物, 费用昂贵, 如T-RFLP。尽管AFLP、RAPD可从整个基因组水平上分析土壤微生物的遗传多样性, 但RAPD的稳定性差、多态性水平较低, AFLP则技术复杂, 费用昂贵。还有一些方法有赖于从土壤中提取出高质量的DNA, 如AFLP、T-RFLP, 由于土壤本身结构和成分的复杂性, 从土壤中提取的微生物DNA往往都含有很多阻碍PCR反应的杂质, 如腐植酸, 必须经过多步纯化后方可用作模板, 而纯化的过程中, 如果DNA损失过多, 那么所提取的总DNA将很难反映土壤中全部微生物的遗传信息。SRAP具有多态性高、扩增产率中等、重复性好、操作简单、易对扩增得到的目标片段进行测序、易获取ORFs甚至目的基因的序列信息、正反向引物两组配可提高引物的使用效率、降低成本等特点(李严和张春庆, 2005)。此外, SRAP技术对模板DNA的质量要求不高(陈静等, 2008), 这样就可简化DNA提取过程中的纯化步骤, 在本研究中仅使用未经纯化过的根际微生物DNA便能扩增出清晰的条带。更为重要的是, SRAP基于外显子里GC含量丰富而启动子

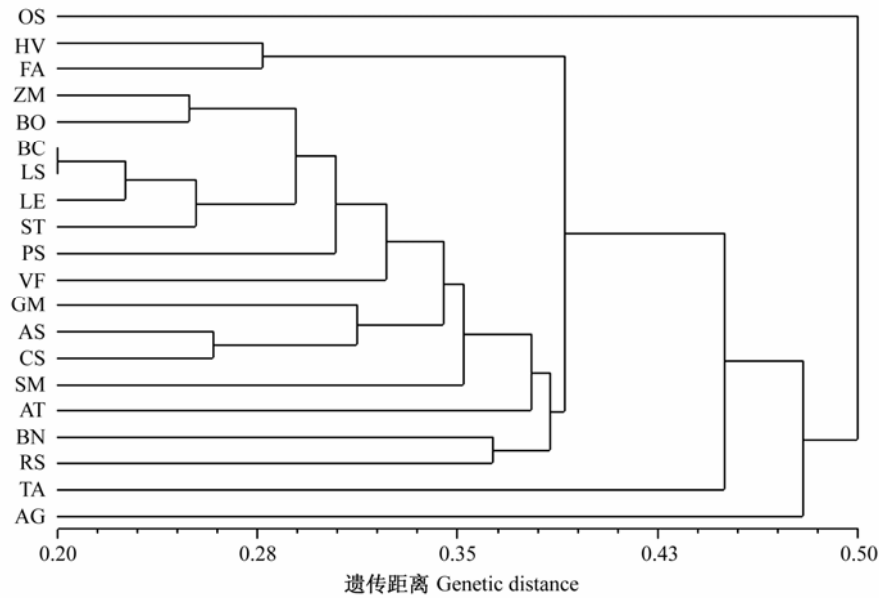


图2 20种植物根际土壤微生物基于SRAP的UPGMA聚类图(土壤取样编号同表1)
Fig. 2 UPGMA dendrogram of rhizosphere soil microbes from 20 plant species generated by SRAP markers. Codes of soil samples see Table 1.

里AT含量丰富的特点来设计特异引物,无需任何序列信息即可直接对可阅读框(ORF)区域进行扩增,因不同物种、不同个体的启动子与间隔区长度不等而产生多态性。由此可见,SRAP引物是可以通用的,对土壤微生物的任何种群都是适用的,而且扩增的目标几乎可以覆盖整个基因组中所有功能序列(表达区域)。因此,利用这种技术所揭示的土壤微生物遗传多样性将更全面。

从大多数研究结果来看,根际土壤微生物多样性受到多种因素的影响(周桔和雷霆, 2007; 毕江涛和贺达汉, 2009), 其中土壤类型是主要因素, 此外还有植物种类、品种(或基因型)、不同发育时期的影响。但也有品种对根际微生物多样性无影响的报道(Carelli *et al.*, 2000)。本研究采用SRAP技术的分析结果显示, 不同植物根际微生物的遗传基础具有明显的差异, 两个不同种植地点的水稻根际土壤微生物遗传距离具有极显著的差异, 不同发育时期的水稻根际微生物的遗传距离也有显著的差别, 但两个水稻品种间根际土壤微生物的遗传多样性无差异, 这与上述研究的结论是一致的。

20种不同植物的根际土壤微生物遗传多样性中, 水稻的最低, 与旱作植物差异较大, 在聚类图中单独聚为一类。造成此结果的一个原因可能是水稻栽培土壤(A区)与其他旱作土壤(B区和C区)的理化性质不同, 也可能是因为稻田土壤处于淹水环境下, 仅适合于某一类微生物(如嫌气细菌)的生长, 故遗传多样性较低, 而其他旱地土壤环境状况(如通气、透光)较好, 因而微生物遗传多样性较高, 这与章家恩等(2002)对不同土地利用方式下土壤微生物多样性指数研究的结果是一致的。芹菜与同在土壤理化性质相同的B区种植的其他14种植物及土壤理化性质不同的C区种植的4种植物的根际微生物遗传距离较大, 也单独聚为一类, 这主要是因为芹菜在大棚栽培, 环境条件与自然田块明显不同, 导致其根际微生物的种群组成不一样。另外, 由聚类图还可以看出, 取自B区和C区的样品没有各自集中聚类的现象, 这也进一步说明了在相似的土壤条件下, 植物的种类对根际土壤微生物遗传多样性具有重要的影响; 另一方面, 大蒜虽为草本植物, 然而其根际微生物却与木本的茶树聚在一起, 而与来自同区的其他草本植物遗传距离则较大, 这主要是因为大蒜套种于茶树行间的缘故, 二者间的土壤和

局部生长环境更为接近, 这既反映出植物种类的显著效应, 又说明土壤和生长环境对根际微生物遗传多样性同样具有的重要影响。

本研究首次将近年来发展起来的SRAP技术用于土壤微生物遗传多样性分析, 用筛选出的22对SRAP引物组合对20种不同植物根际土壤微生物进行分析, 结果显示, 有12对引物组合扩增的位点全是多态性的, 平均每个组合扩增的多态位点比例为93.78%, 多态信息含量(PIC)平均高达0.94, 甚至有近1/3的引物组合(F1/R3、F2/R3、F5/R6、F5/R7、F6/R1、F8/R5、F8/R7)单独使用即可将20种植物根际土壤微生物完全区别开来。这些结果都说明SRAP标记具有较高的多态性, 对不同植物根际土壤微生物具有较强的鉴别能力, 可有效地用于根际土壤微生物遗传多样性的研究。

参考文献

- Bi JT (毕江涛), He DH (贺达汉) (2009) Research advances in effects of plant on soil microbial diversity. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报), **25**, 244–250. (in Chinese with English abstract)
- Borneman J, Triplett EW (1997) Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 2647–2653.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic-linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, **32**, 314–331.
- Carelli M, Gnocchi S, Fancelli S, Mengoni A, Paffetti D, Scotti C, Bazzicalupo M (2000) Genetic diversity and dynamics of *Sinorhizobium meliloti* populations nodulating different alfalfa cultivars in Italian soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 4785–4789.
- Chen J (陈静), Hu XH (胡晓辉), Miao HR (苗华荣), Cui FG (崔凤高), Yu SL (禹山林) (2008) Genome DNA extracted with CTAB method and its use for SSR and SRAP. *Journal of Peanut Science* (花生学报), **37**, 29–31. (in Chinese with English abstract)
- Chen XY (陈旭玉), Zhou YK (周亚奎), Yu XM (余贤美), Zheng FC (郑服丛) (2008) An affection method for DNA extraction from soil microorganisms. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报), **24**, 33–36. (in Chinese with English abstract)
- Cho JC, Tiedje JM (2001) Bacterial species determination from DNA–DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 3677–3682.

- Daniel R (2005) The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 470–478.
- Fu HT (傅洪拓), Qiao H (乔慧), Yao JH (姚建华), Gong YS (龚永生), Wu Y (吴滢), Jiang SF (蒋速飞), Xiong YW (熊贻伟) (2010) Genetic diversity in five *Macrobrachium hainanense* populations using SRAP markers. *Biodiversity Science* (生物多样性), **18**, 145–149. (in Chinese with English abstract)
- Head IM, Saunders JR, Pickup RW (1998) Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, **35**, 1–21.
- Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR (1998) Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, **180**, 4765–4774.
- Hubert C, Shen Y, Voordouw G (1999) Composition of toluene-degrading microbial communities from soil at different concentrations of toluene. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 3064–3070.
- Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglou P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, **58**, 169–188.
- Lee DH, Zo YG, Kim SJ (1996) Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 3112–3120.
- Li G, Quiros CF (2001) Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*, **103**, 455–461.
- Li Y (李严), Zhang CQ (张春庆) (2005) A molecular marker—SRAP technique optimization and application analysis. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报), **21**, 108–112. (in Chinese with English abstract)
- Liu LW (柳李旺), Gong YQ (龚义勤), Huang H (黄浩), Zhu XW (朱献文) (2004) Novel molecular marker systems—SRAP and TRAP and their application. *Hereditas* (遗传), **26**, 777–781. (in Chinese with English abstract)
- Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 4516–4522.
- Muyzer G (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, **2**, 317–322.
- Muyzer G, Dewaal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S ribosomal RNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 695–700.
- Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **76**, 569–573.
- Osborn AM, Moore ERB, Timmis KN (2000) An evaluation of terminal restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, **2**, 39–50.
- Ren M (任民), Jia XH (贾兴华), Jiang CH (蒋彩虹), Yang AG (杨爱国), Wang RJ (王日新) (2008) Comparison study of Bassam and Sanguinetti silver staining in the detecting of SRAP and TRAP. *Biotechnology Bulletin* (生物技术通报), **1**, 113–116. (in Chinese with English abstract)
- Rheims H, Spröer C, Rainey FA, Stackebrandt E (1996) Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the actinomycete line of descent in different environments and geographical locations. *Microbiology*, **142**, 2863–2870.
- Rohlf FJ (2000) NTSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1. Exeter Software. Setauket, New York.
- Rondon MR, August PR, Bettermann AD, Brady SF, Grossman TH, Liles MR, Loiacono KA, Lynch BA, MacNeil IA, Minor C, Tiong CL, Gilman M, Osburne MS, Clardy J, Handelsman J, Goodman RM (2000) Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 2541–2547.
- Terefework Z, Kaijalainen S, Lindström K (2001) AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. *Journal of Biotechnology*, **91**, 169–180.
- Willems A, Doignon-Bourcier F, Coopman R, Hoste B, de Lajudie P, Gillis M (2000) AFLP fingerprint analysis of *Bradyrhizobium* strains isolated from *Faidherbia albida* and *Aeschynomene* species. *Systematic and Applied Microbiology*, **23**, 137–147.
- Xia X, Bollinger J, Ogram A (1995) Molecular genetic analysis of the response of three soil microbial communities to the application of 2,4-D. *Molecular Ecology*, **4**, 17–28.
- Zhang JE (章家恩), Liu WG (刘文高), Hu G (胡刚) (2002) The relationship between quantity index of soil microorganisms and soil fertility of different land use systems. *Soil and Environmental Sciences* (土壤与环境), **11**, 140–143. (in Chinese with English abstract)
- Zhao X (赵雪), Xie H (谢华), Ma RC (马荣才) (2007) New functional molecular markers for plants in the functional genomics era. *China Biotechnology* (中国生物工程杂志), **27**(8), 104–110. (in Chinese with English abstract)
- Zhou J (周桔), Lei T (雷霆) (2007) Review and prospects on methodology and affecting factors of soil microbial diversity. *Biodiversity Science* (生物多样性), **15**, 306–311. (in Chinese with English abstract)