

DGGE 法与常规培养法对稻田蓝细菌多态性分析结果比较*

宋铁英 林智敏 郑伟文 Lotta Martensson Ulla Rasmussen

(福建省农业科学院生物技术中心 福州 350003) (瑞典斯德哥尔摩大学植物系 斯德哥尔摩)

摘要 研究运用蓝细菌和硅藻 16S rDNA 特异引物,将晚季水稻生长后期稻田土壤中提取的总 DNA 进行 PCR 扩增后,以 DGGE 技术对 PCR 产物进行分析结果表明,14 条 DGGE 带经克隆测序,经 NCBI 基因库比对得晚季水稻生长后期存在 10 种蓝细菌,包括 4 种 *Leptolyngbya*、1 种 *Chamaesiphon*、1 种 *Nostoc*、1 种 *Oscillatoria*、2 种 *Synechococcus* 和 1 种 *Chroococcidiopsis*。同层不同位置土壤中蓝细菌种群亦有所不同,但每个取样点都有一些特有的蓝细菌种类。用常规方法对同一稻田土壤样品进行分离培养,根据蓝细菌鉴定图谱观察到类似 *Lyngbya*、*Oscillatoria*、*Chroococcidiopsis* 及 *Nostoc* 的蓝细菌,但显微镜下无法准确分类。比较结果表明采用 DGGE 法比常规培养法能更准确进行蓝细菌多态性鉴定。

关键词 稻田 蓝细菌 DGGE 技术

Analysis on the species diversity of cyanobacteria in paddy field by comparison between normal culture and DGGE method. SONG Tie-Ying, LIN Zhi-Min, ZHENG Wei-Wen (Biotechnology Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China), LOTTA Martensson, ULLA Rasmussen (Department of Botany, Stockholm University, Sweden), *CJEA*, 2005, 13(3): 140~143

Abstract Segments of 16S rDNA genes from cyanobacteria were retrieved from paddy field samples by DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR), and subsequently analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The cyanobacterial community was analyzed in the rice paddy field by nested PCR using universal 16S rDNA primers and subsequently primers targeting cyanobacterial specific regions in the 16S rDNA genes. The amplified products were analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). 14 dominating bands were excised from the gels and further sequenced and determined by BLAST search against the GenBank database. 10 bands were identified as cyanobacteria, representing 6 different cyanobacterial genera. 4 of the bands were identified as belonging to the genus *Leptolyngbya*, 1 to the genus *Nostoc*, 2 to the genus *Synechococcus*, and 1 to each of the genera *Oscillatoria*, *Chroococcidiopsis* and *Chamaesiphon*, respectively. The cyanobacterial diversity varied both in the upper and the deeper soil fractions and different sampling points. *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Chroococcidiopsis* and *Nostoc* were identified under microscope by normal culture method, but can not be identified exactly, indicated that DGGE method can reflect the complex and dynamic of cyanobacteria in the community.

Key words Paddy field, Cyanobacteria, DGGE technology

(Received Nov. 12, 2004; revised Dec. 1, 2004)

采用传统分析方法诸研究已证实稻田中栖息着多处蓝细菌群落^[1~3,5],近年来变性梯度凝胶电泳技术 (DGGE) 已更多地应用于蓝细菌遗传多态性方面研究。Rasmussen U. 等^[6]对从根乃拉草中分离培养的 10 株蓝细菌进行 DGGE 检测结果表明,培养后的 10 株蓝细菌具有高度分子多态性。Nübel U.^[7]应用 DGGE 技术对不同盐浓度下蓝细菌及硅藻培养物的测定结果证明,不同盐浓度培养的蓝细菌及硅藻种类不同。Eller G. 等^[8]将水田土壤风干、粉碎过筛后,在人工光照、水肥和湿度条件下种植水稻,并应用 DGGE 技术分析研究水稻生长周期甲烷氧化菌的动态变化和种群结构。但有关应用 DGGE 法对稻田蓝细菌多态性的分析研究目前尚未见报道。本研究通过提取稻田土壤总 DNA,并用蓝细菌特异的 16S rDNA 引物进行扩增后,应用 DGGE 法对扩增产物进行 DNA 遗传多态性分析,较准确地表达了稻田蓝细菌各时期的遗传多态性。

* 瑞典 SIDA 项目“蓝细菌固氮在持续水稻产量中的意义”资助

收稿日期:2004-11-12 改回日期:2004-12-01

1 试验材料与方法

试验在福建省农业科学院稻麦研究所稻田进行, 试验地面积 22.5m × 25m, 2001 年晚季水稻生长后期 (10 月 10 日) 按米字型在稻田四角和中间各取约 400g 土样, 充分混匀置牛皮纸上凉干后于福建省农业科学院土壤肥料研究所化实验室检测土壤 pH、有机质、全 N、全 P、全 K、碱解氮、有效磷、速效钾及重金属元素 Cd、Pb、As 和 Hg 含量。稻田蓝细菌常规调查在同一地块四角和中心 5 个取样点取样。土壤样品分别取自各点 0~5cm 土层, 取 0.5g 土样溶于 4.5mL HB111 (含 N 40mg/kg) 培养液中, 混匀后进行 4 级 10 倍对数稀释, 稀释液直接在试管中光照培养, 蓝细菌菌落长出后用同样培养基挑取单菌落纯化, 并在显微镜下观察蓝细菌种类。DGGE 法对稻田蓝细菌多态性分析取样地点与常规稻田蓝细菌调查样品取样点相同, 分别取各点 0~5cm 土层及 10~15cm 土层土壤样品各 5g, 冷藏带回实验室进行样品的 DNA 提取。样品总 DNA 提取按 Zhou J. 等^[9]方法, DNA 纯化按 Stach J. E. M. 等^[10]方法进行。纯化样品按宋铁英等^[4]方法进行套式 PCR 扩增和 DGGE 分析。

2 结果与分析

经检测试验田晚季水稻收割后稻田土壤呈偏酸性, pH5.93, 有机质含量 49.08g/kg, 全 N 3.38g/kg, 全 P 0.27g/kg, 全 K 23.68g/kg, 碱解氮 251.09mg/kg, 速效磷 50.8mg/kg, 速效钾 119.65mg/kg。参考土壤农化分析手册中我国主要土壤类型养分含量变幅表数值, 试验田有机质及 N、P、K 含量均属正常值范围。稻田土壤重金属含量 Hg 为 0.274mg/kg, Cd 为 1.718mg/kg, Pb 为 78.61mg/kg, As 为 2.18mg/kg, 根据我国颁布的土壤环境质量标准 (GB15618-1995), 自然土壤中重金属含量应 Hg ≤ 0.15mg/kg, Cd ≤ 0.20 mg/kg, Pb ≤ 35mg/kg, As ≤ 15mg/kg, 试验稻田 Cd 已超标 7.59 倍, Pb 超标 1.25 倍, Hg 超标 0.83 倍, 表明试验稻田已受 Cd、Pb 和 Hg 污染。用常规方法将同一稻田土壤样品的蓝细菌进行分离培养后, 显微镜下观察并对照蓝细菌图谱, 观察到类似 *Lyngbya*、*Oscillatoria*、*Chroococcidiopsis* 及 *Nostoc* 的蓝细菌及硅藻, 但无法在显微镜下准确分类。该结果表明用常规法分离鉴定蓝细菌需深厚的蓝细菌分类学实验经验, 且与分离培养条件密切相关。

将稻田土样用 DGGE 法分析得到 DGGE 图谱见图 1。DGGE 图谱中不同带型表示表土和底层土中分别存在不同种类的蓝细菌, 每 1 条带分别显示 1 种蓝细菌种类。因本实验所用 16S rDNA 引物 CyA359F、CyA781R(a) 和 CyA781R(b)^[11] 特异于蓝细菌且能扩增出硅藻及植物质粒, 将上述图谱中的条带分别切下并克隆后, 通过基因序列比对, 得知试验稻田中生长的蓝细菌有 4 种 *Leptolyngbya*、1 种 *Chamaesiphon*、1 种 *Nostoc*、1 种 *Oscillatoria*、2 种 *Synechococcus* 和 1 种 *Chroococcidiopsis*, 条带 a 与硅藻 *Haslea wawrikae* 的基因最相似, 而条带 A、B、C 则为质粒 DNA (见表 1)。由图 1 可知一些蓝细菌种群生长在稻田不同位置和深度, 如 1 号条带代表的 *Leptolyngbya* 和 2 号条带代表的 *Chamaesiphon* 蓝细菌为优势种类, 表层土壤优势菌群如

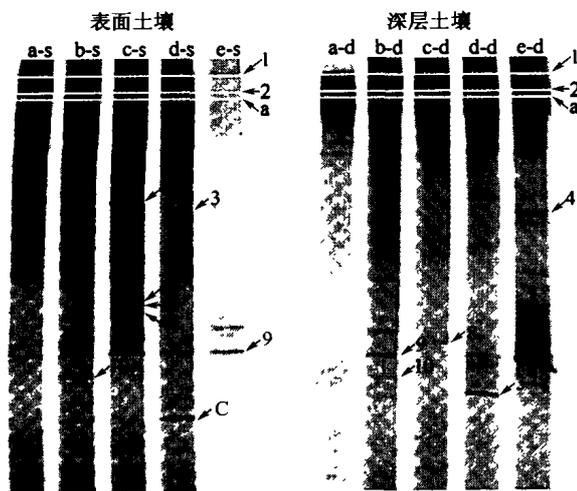


图 1 稻田蓝细菌多态性的 DGGE 图谱 *

Fig.1 DGGE band patterns after DNA amplification from paddy field
* 图中 a-s, b-s, c-s, d-s 和 e-s 分别为 5 个取样点的表面土壤样品, a-d, b-d, c-d, d-d 和 e-d 分别为 5 个取样点的深层土壤样品。

表 1 16S rDNA 扩增片段经 DGGE 分离后各条带的基因相似性比较

Tab.1 Sequence similarities of 16S rDNA fragments excised by DGGE

条带号 Bands	Ncbi 搜索最近似细菌种类 Close match	所属菌种类别 Belong to strains	Ncbi 基因库号 Genebank accession number	序列相似度/% Sequence similarity
1	<i>Leptolyngbya</i>	蓝细菌	AF355398	93
2	<i>Chamaesiphon</i> (管胞藻属)	蓝细菌	AY170472	90
3	<i>Oscillatoria</i> (颤藻属)	蓝细菌	AF317508	90
4	<i>Nostoc</i> (念珠藻属)	蓝细菌	AF506238	100
5	<i>Synechococcus</i> (聚胞藻属)	蓝细菌	AF448074	93
6	<i>Synechococcus</i> (聚胞藻属)	蓝细菌	AF448074	91
7	<i>Chroococcidiopsis</i> (聚球藻属)	蓝细菌	AJ344557	91
8	<i>Leptolyngbya</i>	蓝细菌	AF317507	92
9	<i>Leptolyngbya</i>	蓝细菌	AF317507	92
10	<i>Leptolyngbya</i>	蓝细菌	AF355398	95
a	<i>Haslea wawrikae</i> (硅藻属)	硅藻	AF514855	97
A	<i>Solanum chloroplast</i>	质粒	CPY18934	95
B	<i>Solanum chloroplast</i>	质粒	CPY18934	99
C	<i>Physcomitrella chloroplast</i>	质粒	AF005672	100

9 号条带代表另 1 种 *Leptolyngbya*, 但深层土壤较少出现, 且同一土层不同位置土壤蓝细菌种群亦有所不同, 如 a-s, b-s, c-s, d-s 和 e-s 均为稻田不同位置表面土壤, 但每一取样点均有一些特有的蓝细菌种类, 如 b-s 点的条带 10(*Leptolyngbya*), c-s 点的条带 5(*Synechococcus*)、条带 6(*Synechococcus*)和条带 7(*Chroococcidiopsis*), d-s 点的条带 3(*Oscillatoria*), 深层土壤中 c-d 点的条带 8(*Leptolyngbya*), e-d 点的条带 4(*Nostoc*)等。将 DGGE 法与常规分离法对稻田蓝细菌种类调查及相关结果^[1,5,12~14]综合比较见表 2。用常规法分析稻田蓝细菌多态性的 5 篇相关文章中, 蓝细菌分离贯穿整个水稻生长季节, 且取样为整个地区稻田, 试验亦显示不同时期蓝细菌的优势菌群有所变化。有些研究检测到 *Nostoc*(念珠藻属)、*Oscillatoria*(颤藻属)、*Phormidium*(席藻属)、*Anabaena*(鱼腥藻属)、*Cylindrospermum*(筒胞藻属)和 *Lyngbya*(鞘颤藻属)在稻田生长。本研究用常规法和 DGGE 分析法亦检测到 *Nostoc*(念珠藻属)、*Oscillatoria*(颤藻属)和 *Lyngbya*(鞘颤藻属), 但通过 DGGE 法检测到的 *Leptolyngbya*、*Synechococcus*(聚胞藻属)、*Chamaesiphon*(管胞藻属)和 *Chroococcidiopsis*(聚球藻属)则常规检测未出现。与其他研究结果相比常规检测中出现频率很高的 *Anabaena*、*Phormidium*、*Cylindrospermum* 及 *Tolypothrix*、*Pseudanabaena*、*Gloeocapsa*、*Aphanocapsa*、*Gloeotheca*、*Scytonema* 和 *Nodularia* 未见于本实验常规检测和 DGGE 检测结果中。其原因一是常规分析法需深厚的蓝细菌分类学实验经验, 有些蓝细菌如 *Leptolyngbya* 和 *Lyngbya*, *Nostoc* 和 *Anabaena* 在外形上十分相似, 用形态学方法容易混淆; 二是常规分析法需依靠对稻田蓝细菌分离纯化培养后鉴定, 样品采集、分离和培养条件决定蓝细菌分离种类, 但前人研究表明样品中仅 < 1% 的微生物可经实验室培养成功^[6]; 三是蓝细菌的多态性受环境因素影响而有所变化, 各试验田气候环境、取样时间及稻田土壤化学成分不同, 蓝细菌多态性亦有所不同。且本试验田位于车行道旁边, 人为活动如采矿、金属冶炼、施用污泥、污水灌溉及汽车尾气污染等导致试验稻田重金属 Cd、Pb 和 Hg 含量超标, 该因素也可能是导致本试验田蓝细菌种类明显不同于其他田块的原因。

表 2 DGGE 法与常规分离法对稻田蓝细菌种类调查结果比较 *

Tab. 2 Comparison of cyanobacteria types in paddy field with DGGE method and normal method

蓝细菌种类 Cyanobacteria types	DGGE 法 DGGE method	常规法 Normal method	Khan ^[12] 孟加拉 Khan Bengal	Pilar ^[13] 乌拉圭 Pilar Uruguay	Quesada ^[5] 西班牙 Quesada Spain	董俊德 ^[1] 中国 Dong Junde China	Tiwari ^[14] 印度 Tiwari India
<i>Nostoc</i> (念珠藻属)	√*	√	√	√	√	√	√
<i>Oscillatoria</i> (颤藻属)	√	√	√	√			√
<i>Chroococcidiopsis</i> (聚球藻属)	√	√					
<i>Synechococcus</i> (聚胞藻属)	√						
<i>Chamaesiphon</i> (管胞藻属)	√						
<i>Leptolyngbya</i>	√						
<i>Phormidium</i> (席藻属)					√	√	√
<i>Anabaena</i> (鱼腥藻属)				√	√	√	√
<i>Cylindrospermum</i> (筒胞藻属)			√	√		√	
<i>Lyngbya</i> (鞘颤藻属)		√	√	√			√
<i>Tolypothrix</i> (单歧藻)				√		√	
<i>Microcoleus</i> (微鞘藻属)			√				√
<i>Gloeocapsa</i> (胶球藻属)			√				√
<i>Aphanocapsa</i> (隐球藻属)			√				√
<i>Pseudanabaena</i> (假鱼腥藻属)			√		√		
<i>Gloeotheca</i> (粘杆藻属)				√	√		
<i>Scytonema</i> (双歧藻属)				√	√		
<i>Nodularia</i> (节球藻属)				√	√		
<i>Calothrix</i> (眉藻属)				√	√		
<i>Fisherella</i> (飞氏藻属)						√	
<i>Plectonema</i> (织线藻属)							√
<i>Porphyrosiphon</i>							√
<i>Limnothrix</i>							√
<i>Synechosystis</i> (集胞藻属)			√				
<i>Microcystis</i> (微囊藻)			√				
<i>Chroococcus</i> (色球藻属)			√				
<i>Myxosarcina</i> (粘八叠蓝细菌属)			√				
<i>Schizothrix</i> (裂须藻属)			√				

* 表中√表示该种蓝细菌在调查中出现。

3 小 结

通过 DGGE 法检测稻田蓝细菌的多态性不需分离、培养, 且将分离的 DNA 条带直接通过基因比对鉴定蓝细菌种类, 可避免因纯化、培养以及人为经验判断等因素造成的误差, 能更准确地判定蓝细菌的多态性。

参 考 文 献

- 1 董俊德,商树田,苏宝林.北京地区稻田固氮蓝藻研究: I. 固氮蓝藻种类与群落演替.北京农业大学学报,1994,20(1):15~20
- 2 黄维淦.热带水田中与氮素循环有关的微生物区系. Soil Science and Plant Nutrition,1979,25(3):297~308
- 3 莫文英,贾小明,钱泽澍.有机肥对水稻根际固氮活性的影响.浙江农业大学学报,1985,11(3):331~335
- 4 宋铁英,包晓东,郑伟文等. DGGE法检测稻田蓝细菌及硅藻的遗传多态性.厦门大学学报,2002,41(5):669~673
- 5 Quesada A., Fernandez-Valiente E. Relationship between abundance of N₂-fixing cyanobacteria and environmental features of spanish rice fields. Microbiol. Ecol.,1996,32:59~71
- 6 Rasmussen U., Sevenning M. M. Characterization by genotypic methods of symbiotic Nostoc strains isolated from five species of Gunnera. Arch. Microbiol.,2001,176(3):204~210
- 7 Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. Appl. Environ. Microbiol.,1997,63(8):3327~3332
- 8 Eller G., Frenzel P. Changes in activity and community structure of Methane-Oxidizing Bacteria over the growth period of rice. Appl. Environ. Microbiol.,2001,67(6):2395~2403
- 9 Zhou J., Bruns M. A., Tiemdje J. M. DNA recovery from soils of diverse composition. Appl. Environ. Microbiol.,1996,62(2):316~322
- 10 Stach J. E. M., Bathe S., Clapp J. P., et al. PCR-SSCP comparison of 16S rRNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. FEMS Microbiol. Ecol.,2001,36:139~151
- 11 Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. Appl. Environ. Microbiol.,1997,63(8):3327~3332
- 12 Khan Z. U. M., Tahmida Begum Z. M., Mandal M., et al. Cyanobacteria in rice soils. World J. Microbiol. Biotech.,1994,10:296~298
- 13 Irisarri P., Gonnet S., Monza J. Cyanobacteria in Uruguayan rice field: diversity, nitrogen fixing ability and tolerance to herbicides and combined nitrogen. Journal of Biotechnology,2001,91:95~103
- 14 Tiwari O. N., Dhar D. W., Prasanna R., et al. Growth and nitrogen fixation by non-heterocystous filament cyanobacteria of rice fields of Uttar Pradesh, India. Philippine J. Science,2000,129:101~107

欢迎订阅 2005 年《中国农业资源环境文摘》

《中国农业资源环境文摘》(原名《中国农业文摘——土壤肥料》)于1985年创刊,收录了全国200余种农业科技期刊中关于土壤学、肥科学、植物营养学和生态环境科学方面的文献,是本学科专业核心期刊评价的指标刊物,也是我国本学科唯一文献检索刊物。2003年始《中国农业文摘——土壤肥料》更名为《中国农业资源环境文摘》,原办刊宗旨与发行范围不变。报道内容包含原《中国农业文摘——土壤肥料》报道范围,侧重于报道生态农业、环境科学、资源可持续利用以及学科之间交叉领域的新理论、新技术和新方法,为广大土壤科学、资源与环境科学科技工作者服务,促进学术交流,推动学科发展。本刊为双月刊,16开本,刊号:CN 11-4920/S,ISSN 1002-543X。邮发代号:18-124,每期定价:10.00元/册,全年60.00元,国内外公开发行,全国各地邮局均可订阅,漏订者可直接向编辑部补订。地址:(100081)北京市中关村南大街12号中国农业科学院科技文献信息中心《中国农业资源环境文摘》编辑部,电话:(010)68919886转2313。