

16S rDNA-RFLP 方法分析抑菌土中的细菌多样性*

周峻沛, 邹长松, 顾英琦, 莫明和

(云南大学 省部共建生物资源保护与利用重点实验室培育基地, 云南 昆明 650091)

摘要: 采集了从云南省 16 个县烟草主栽区的土壤样品 129 份. 通过测定土壤抑制线虫生防菌 *Pochonia chlamydosporia* 孢子萌发率的大小将土样聚为抑菌率极显著差异的 5 个类群 ($P > 0.01$). 为研究抑菌土中的细菌种群, 构建了强抑菌土样的细菌 16S rRNA 基因文库; 利用限制性片段长度多态性 (RFLP) 对随机克隆进行筛选; 测定代表克隆的 16S rDNA 序列; 对强抑菌土中的细菌种群进行了系统发育分析, 并表明 Proteobacteria 和 Acidobacteria 的细菌是强抑菌土中的主要细菌类群.

关键词: 土壤抑真菌作用; 细菌群落; 生物防治; 16S rRNA

中图分类号: Q 938.15 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2007)04-0424-06

利用真菌研究、开发植物病虫害生防制剂长期以来一直受到重视和亲睐, 但相对较低和不稳定的防治效果大大限制了生物制剂的使用和推广. 在众多的影响因素中, 土壤抑真菌作用 (Soil Fungistasis) 是导致生物制剂防效不稳定的主要原因之一^[1]. 土壤抑真菌作用是指在自然土壤中或与土壤相接触的真菌繁殖体的萌发受到抑制的现象^[2]. 它可使微生物的繁殖体在土壤中保持很长时间的休眠状态, 是土壤微生物生存适应机制的一种表现^[3]. 对于生防菌在土壤中的萌发和定殖而言, 土壤抑真菌作用是一个非常不利的因素. 生防菌要取得良好的防治效果, 其先决条件是能在土壤中正常萌发和生长, 达到一定的种群密度. 然而, 由于受到土壤抑真菌作用的影响, 真菌在土壤中的萌发率很低, 一般在 0~30% 之间, 很少超过 50%, 很难在土壤中建立达到控制靶标对象所需的种群密度, 如果不通过解除处理, 必然导致防效低、且不稳定.

关于土壤抑真菌作用的形成机理, 有 2 种假说: 营养剥夺假说和抑制因子假说^[3,4]. 营养剥夺假说认为由于土壤可供微生物利用的营养物质有限, 特别是有机碳, 施入土壤中的微生物繁殖体与土壤微生物进行营养物质的竞争, 导致繁殖体内源

营养物质流失到土壤, 从而由于营养缺乏而不能萌发; 抑制因子假说认为土壤中存在抑制繁殖体萌发的抑制因子而导致土壤抑菌作用, 土壤抑制性物质的产生被认为与土壤微生物的活动有关. 尽管这 2 种假说侧重点不同, 但都强调了土壤微生物在土壤抑真菌作用中的重要性, 土壤微生物 (特别是细菌) 与土壤抑真菌作用之间的关系成为研究土壤抑真菌作用机理的核心问题^[1].

土壤中的微生物十分丰富, 土壤微生物类群随季节、地理位置、植被、土质等的差异而不同. 本文大量采集土壤样品, 测定各样品的抑菌率, 通过非培养方法分析强抑菌土中的主要细菌区系及各类群的丰度; 对其中的可培养细菌进行分离、鉴定并测定抑菌率, 确定各细菌与土壤抑菌作用间的关系; 对非培养细菌, 通过与弱抑菌土细菌区系比较, 筛选出可能参与土壤抑菌作用的细菌类群, 从而为阐明土壤抑真菌作用机理提供必要的信息.

1 材料和方法

1.1 真菌菌株 线虫生防菌 *Pochonia chlamydosporia* 由本实验室提供.

1.2 土样采集及处理 从云南省 16 个县和地区

* 收稿日期: 2007-02-27

基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目(2007LS700210); 国家自然科学基金资助项目(30460078); 云南省科技厅项目资助(2006YX41, 2004C001Q).

作者简介: 周峻沛(1982-), 男, 云南人, 硕士生, 主要从事微生物分子生态学方面的研究.

通讯作者: 莫明和(1970-), 男, 贵州人, 博士, 教授, 主要从事微生物分子生态学方面的研究, E-mail: minghemo@yahoo.com.cn.

(峨山, 玉溪, 弥勒, 陆良, 宜良, 石林, 文山, 砚山, 腾冲, 宾川, 平远, 祥云, 南华, 禄丰, 曲靖, 永平) 的主要烟草种植区共采集了烟地土样 129 份, 采集的土样充分研碎后过 0.075 mm 筛, 取适量保存于 -70°C , 用于分离提取总 DNA; 剩余土样用于土壤抑菌作用的测定。根据土样对真菌孢子萌发的抑制率数据, 用 SPSS11.0 软件进行聚类分析。

1.3 土壤抑真菌作用测定 取土壤 20 g 均匀填布于直径为 90 mm 的培养皿中, 土面覆盖一层无菌擦镜纸, 均匀滴加 5 mL 无菌水润湿土壤, 将直径为 60 mm, 厚度为 3 mm 的水琼脂块紧贴于纸上, 28°C 下平衡 48 h 后, 在琼脂块上接种 200 μL 孢子悬液(约 10^6 mL^{-1}) 并涂布均匀, 于 28°C 培养 24 h 后镜检孢子的萌发率。以经过 2 次高温湿热灭菌的同一份土壤平板为对照, 每份土样设 3 个重复。

抑制率(%) = 对照萌发率 - 处理萌发率;

萌发率(%) = 萌发的孢子数 / 计数孢子总数 \times 100%。

1.4 土样中细菌区系的分子分析

1.4.1 土壤细菌 16S rRNA 基因文库的构建 用土壤 DNA 提取试剂盒 (Soil DNA Isolation Kit, # 12800-50, Mo Bio, USA) 提取土壤总 DNA, 用引物 27f ($5' - \text{AGAGTTT GATCCTGGCTCAG} - 3'$) 和 1492r ($5' - \text{GGTTACCTGTTACGACTT} - 3'$)^[5] 从土壤总 DNA 中扩增细菌的 16S rDNA 片段 PCR 反应条件为: 98°C 变性 1 min, 然后 98°C 30 s, 50°C 40 s, 72°C 90 s, 循环 25 次; 72°C 延伸 10 min。用 PCR 纯化试剂盒 (DV805A, TaKaRa, Japan) 纯化扩增产物并连接到 pMD18- T 载体上, 转化大肠杆菌 DH-5 α 感受态细胞后, 随机挑取 700 个白斑克隆作为该土样的细菌 16S rDNA 文库, 于 -70°C 保存备用。

1.4.2 细菌种群的 PCR-RFLP 分析

PCR 扩增: 从土样的 16S rDNA 文库中随机挑取 192 个克隆, 在 LB 培养基中过夜培养后, 用载体引物直接扩增活体细胞获得足够的 16S rDNA 片段。

消化: 用限制性内切酶 *Hspa* I, *Msp* I 或 *Hae* III (Bio Basic Inc. Canada) 在 37°C 酶切每个克隆细胞的 16S rDNA 片段 15 h, 之后经 3% 的琼脂糖在 4°C 下在 TBE 缓冲液中进行电泳, 用凝胶成像系统记录谱带图像。比较各克隆间酶切条带的多肽性, 若克隆间的 *Hspa* I 酶切谱带相同时, 比较它们之间的 *Msp* I 酶切图谱, 若再相同时继续比

较它们间的 *Hae* III 的酶切图谱。

谱带图像分析: 用电泳图像分析软件——UVIphoto 进行分析。首先对每一个克隆产生的电泳谱带进行标准化, 使得所有克隆间的谱带具有可比性, 消除因电泳而产生的 DNA 片段运动距离偏差; 其次, 计算并标记出每个克隆谱带中所有不同 DNA 片段的分子量; 最后, 以内切酶 *Hspa* I 产生的片段大小数据为基础聚类分析各克隆谱带间的相似性。通过第 1 次聚类分析而被聚合到同一组的克隆, 用内切酶 *Msp* I 产生的谱带信息进行第 2 次聚类。第 2 次聚类后属于同一组的克隆再用内切酶 *Hae* III 产生的谱带信息进行第 3 次聚类分析当第 3 次聚类后仍属于同一组的克隆被认为具有相同的基因型。

1.4.3 16S rDNA 序列测定和分析 从各种不同的 RFLP 带型克隆中随机挑选 100 个克隆进行测序。测序引物为 T 载体通用测序引物 M13-20 ($5' - \text{CGACG TTGTA AAACG ACGGC CAGT} - 3'$) 和 M13-RV-P ($5' - \text{GGAAA CAGCT ATGAC CATGA TTAC} - 3'$), 由上海生工生物工程技术有限公司 (Sangon) 合成。T 载体的提取用北京百泰克生物技术有限公司 (Biotek) 离心柱型质粒提取试剂盒, 按照说明书中步骤进行提取。测序反应在 9700 型 PCR 扩增仪 (GeneAmp PCR System 9700) 上进行, 反应条件为 96°C 下 10 min, 50°C 下 5 s, 60°C 下 4 min 的 25 个循环, 然后在美国应用生物系统公司 (ABI) 3730 系列高通量基因分析仪上测出序列。

测出的序列人工校对后用 CHECK-CHIMERA 程序进行嵌合序列的鉴定^[6], 并除去嵌合序列。对非嵌合序列进行 BLAST 比对^[7], 相似性 $\geq 97\%$ 的序列视为同一序列型 (sequence type)。将克隆的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中的已知序列进行 BLAST 比较, 确定与实验克隆亲缘关系最近的种属。并从数据库获得相关种属的 16S rDNA 序列, 构建系统发育树。序列的比对排列用软件 Clustal X 进行^[8]。亲缘距离的计算和系统发育树的构建分别采用 MEGA (version 3.1) 软件包中的 Kimura two-parameter 矩阵模型^[9,10] 和 Neighbor-joining 法^[11], 设定步值为 1000 次重复。

本研究得到的非嵌合 16S rDNA 序列已提交到 GenBank 核酸数据库, 序列号为 EF417592-EF417689。

2 结果与分析

2.1 土壤抑真菌作用的测定与分析

测定了 129

份不同来源土样对 *P. chlamyosporia* 分生孢子萌发的影响, 结果表明供试土样都存在不同程度的抑菌作用, 孢子萌发抑制率在 22% ~ 100% 之间, 土壤抑菌作用普遍存在. 其中, 63% 的土样的抑制率在 67. 12% ~ 99. 37%. 根据土样对 ZK7 孢子萌发的抑制率大小, 用 SPSS11. 0 软件在不指定类群数目情况下对土样进行聚类, 得到了抑制率间有极显著差异 ($P > 0. 01$) 的 5 个土样类群(表 1): 强抑制性土包括 42 份土样, 孢子萌发抑制率在 78. 36% ~ 100% 之间; 高抑菌土包括 39 份土样, 孢子萌发抑制率在 67. 24% ~ 78. 36% 之间; 中抑菌土包括 21 份土样, 孢子萌发抑制率在 53. 01% ~ 67. 24% 之间; 低抑菌土包括 12 份土样, 孢子萌发抑制率在 22. 39% ~ 53. 01% 之间; 弱抑菌土包括 15 份土样, 孢子萌发抑制率在 0 ~ 22. 39% 之间.

2.2 强抑菌土中细菌 16S rDNA 文库的 RFLP 分析 在微生物分子生态学中, 通过构建特定样品中特定微生物类群的特定基因文库, 测定文库中部分克隆的特定序列, 再通过与公共数据库中的相关序列比较, 可以初步构建出该样品中微生物的种群构成. 在测定克隆序列之前, 为了避免同一克隆的重复测序, 常用 RFLP 对 rDNA 文库进行筛选, 通过酶切谱带的多态性可以初步发出克隆间的相似性, 同时通过对酶切谱带的分析, 可以获得样品中

微生物多样性的信息.

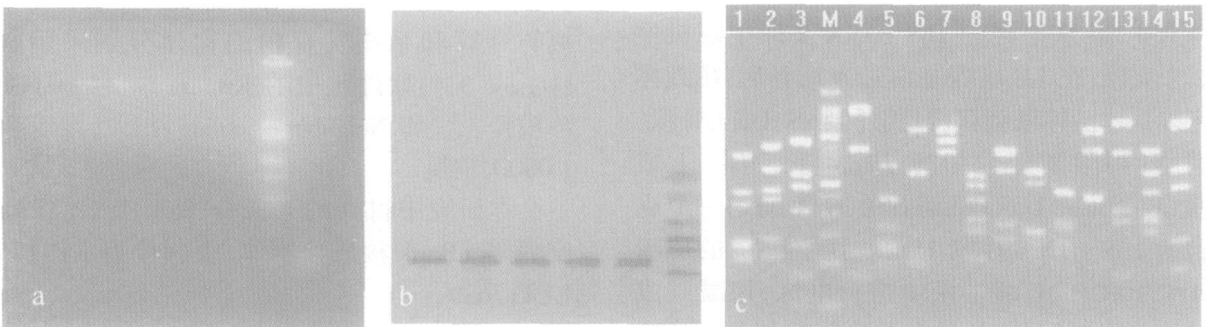
本研究利用土壤 DNA 提取试剂盒有效地完成了土壤 DNA 的提取(图 1a); 并用引物 27f 和 1492r 成功地扩增了 16S rRNA 基因, 片段大小约 1 500 bp(图 1b). 从 1 份强抑菌土样的 16S rDNA 文库中随机挑取 192 个克隆用于 RFLP 分析. 在 3 种限制性内切酶(*Hsp* a I, *Msp* I, *Hae* III) 单酶切或依次酶切下, 1 563 bp 的细菌 16S rDNA 片段能产生丰富的多态性, 便于快速区分克隆间的相似性(图 1c). 在随机分析的 192 个克隆中, 通过对酶切谱带多态性的分析, 得到了 153 种 RFLP 带型.

2.3 抑菌土中细菌区系分析 在所测定的 100 个克隆序列中有 2 条为嵌合序列, 不用于区系分析. 通过序列间的相似性比较, 在剩余的 98 个克隆序列中, 根据相似性 $\geq 97\%$ 被视为同一克隆的原则, 6 个克隆分别被合并为 3 个, 最后共得到 95 条各不相同的序列型. 与公共数据库的 BLAST 比对结果表明这 95 条序列型都属于真细菌. 其中, 77 条序列为各种环境中分布的细菌(图 2), 30 条序列来自土壤细菌. 在测定的序列中, 可培养细菌序列仅为 21 条, 占 22. 1%. 革兰氏阳性菌占 14%. S 系统发育分析将 95 条序列中分类地位明确的 87 条分别聚为 10 大细菌类群(图 2):

表 1 土壤抑菌率极显著差异的抑制率范围及土样数

Tab. 1 Sum of soil sample of different groups showing significant fungistatic rates

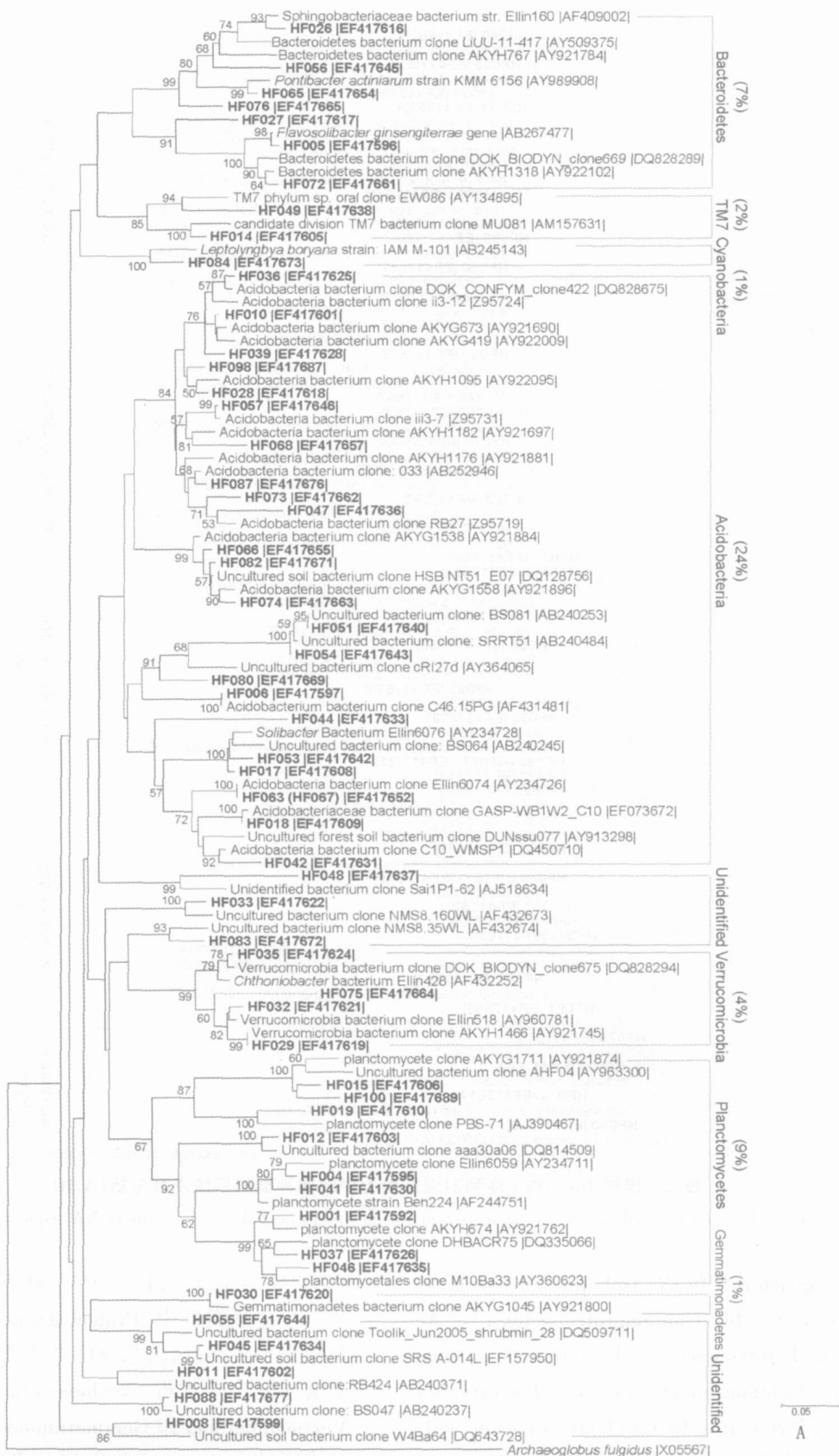
| 土样类群 | 强抑菌土 | 高抑菌土 | 中抑菌土 | 低抑菌土 | 弱抑菌土 |
|-------|-------------|----------------|----------------|----------------|-----------|
| 抑制率/% | 78. 36~ 100 | 67. 24~ 78. 36 | 53. 01~ 67. 24 | 22. 39~ 53. 01 | 0~ 22. 39 |
| 土样数/份 | 42 | 39 | 21 | 12 | 15 |



a: 土壤 DNA 的提取; b: 细菌 16S rDNA 扩增; c: RFLP 分析

图 1 16S rDNA 的文库构建和 RFLP 分析

Fig. 1 The construction of 16S rDNA and RFLP analysis



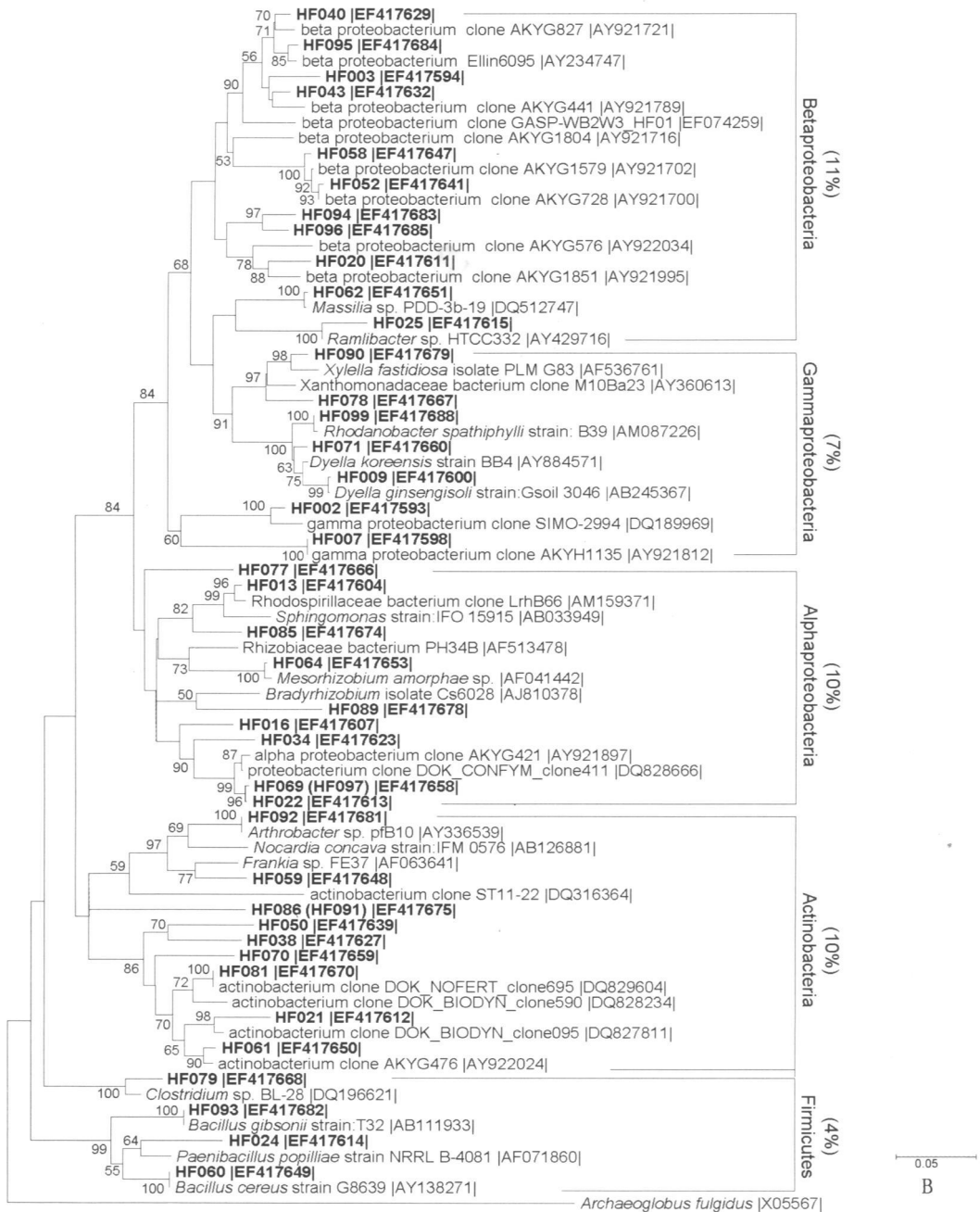


图 2 根据 16s rDNA 序列对强抑菌土中细菌种群的系统发育分析(A, B)

Fig. 2 Phylogenetic analysis on the bacteria from strong fungistat soil based on 16s rDNA sequences(A, B)

Proteobacteria (包括 Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria 和 Gammaproteobacteria), Acidobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Gemmatimonadetes, Cyanobacteria, Actinobacteria, Firmicutes 和 Candidate division TM7. 这些类群包括的克隆百分数分别为 28%, 24%,

9%, 7%, 4%, 1%, 1%, 10%, 4% 和 2%.

在这些类群中, Proteobacteria 和 Acidobacteria 是两大主要类群, 占总克隆数大于 50%, 是强抑菌土壤中的主导类群. Acidobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia 和 Gemmatimonadetes 这 4 类包括的克隆数为 38%, 这些序列几乎全部和环境克隆

序列最相似, 只有其中 2 条(HF017, HF075) 和可培养的细菌序列最相似(相似性 $\geq 97\%$). 到目前为止, Genbank 中属于这 4 个门的可培养细菌非常少. 剩余的 8 条序列在目前的数据库中未找到其类似的序列, 分类地位无法确定, 极可能是一些新的细菌类型, 标记为“U nidentified”(图 2).

3 讨论

土壤抑菌作用是自然界中普遍存在的一种现象, 这也是土壤维持其生态环境稳定的一种机制. 在生防菌引入土壤生态环境时必须考虑这一问题. 从本研究可以看出土壤抑菌作用对生防真菌在土壤中的萌发和定殖影响很大. 有 80% 的烟田土壤对 ZK7 的抑制率均在 50% 以上. 由此可见, 认识土壤抑菌作用的机理、解除土壤的抑菌作用对推动生防菌的应用和产业化有重要意义.

土壤中的微生物类群构成影响土壤抑真菌作用^[12], 但是目前人类认识的微生物还不到理论值的 10%, 使用经典的可培养方法研究抑菌土的微生物组成无疑受到了限制. 基于细菌 16S rRNA 基因的非培养方法为我们研究和揭示非培养微生物提供了强有力的工具. 有关参与土壤抑菌作用的微生物报道不多, Wietse de Boer 等^[13] 利用可培养和非培养研究方法相结合的手段研究了土壤微生物种群组成对土壤抑制真菌(*Chaetomium globosum*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *Trichoderma harzianum*) 孢子萌发的影响, 证实了假单胞菌类是他们研究的土壤中导致土壤抑真菌作用的主要原因. 我们前期的研究报道了土壤细菌通过分泌挥发性化合物(三甲胺、3-甲基-2-戊酮、二甲基二硫醚、甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、苯甲醛、N,N-二甲基辛胺和十九烷)参与土壤抑真菌作用^[14]. 本研究认为 Proteobacteria 和 Acidobacteria 是抑菌土中的主要细菌类群, 对这 2 类细菌产生的抑菌物质及其作用方式的研究正在进行, 结果将另文报道.

参考文献:

[1] 杨怀文. 迈入 21 世纪的中国生物防治[M]. 北京: 中

国农业科学技术出版社, 2005.

- [2] DOBBS C G, HINSON W H. A widespread fungistasis in soil[J]. Nature, 1953, 172: 197-199.
- [3] LOCKWOOD J L. Fungistasis in soils [J]. Biological Review, 1977, 52: 11-43.
- [4] LOCKWOOD J L. Soil fungistasis [J]. Annual Review of Phyto pathology, 1964(2): 351-362.
- [5] STACKEBRANDT E, GOODFELLOW M. Nucleic acid Techniques in Bacterial[M]. New York: Wiley, 1991.
- [6] MAIDAK B L, OLSEN G L, LARSEN N, et al. The RDP ribosomal database project[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 109-110.
- [7] ALTSCHUL S F, GISH W, MILLER W, et al. Basic local alignment search tool[J]. J Mol Biol, 1990, 215: 403-410.
- [8] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, et al. The Clustal X windows interface, flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 24: 4 876-4 882.
- [9] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3, Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis, and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5: 150-163.
- [10] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. J Mol Evol, 1980, 16: 111-120.
- [11] SAITOU N, NEI M, LERMAN L S. The neighbor-joining method, a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol, 1987, 4: 406-425.
- [12] 周薇, 莫明和. 土壤及其微生物对真菌的抑菌作用 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2002, 24(4): 312-315.
- [13] WIETSE DE BOER, VERHEGGEN P, PAULIEN J, et al. Microbial community composition affect soil fungistasis[J]. Applied and Environment Microbiology, 2003, 69(2): 835-844.
- [14] XU C K, MO M H, ZHANG K Q, et al. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36: 1 997-2 004.

参考文献:

- [1] 惠延年. 眼科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [2] 蒋幼芹. 青光眼的药物治疗[J]. 中华眼科杂志, 2006, 42(2): 190-192.
- [3] 蔺晓慧, 艾育德. 青光眼降眼压药物治疗[J]. 内蒙古医学院学报, 2006, 28: 4-7.
- [4] 陈晓明, 刘旭阳. 抗青光眼药物联合治疗的策略[J]. 中华眼科杂志, 2006, 42(11): 1 047-1 049.
- [5] DUBINER H B. Comparison of the diurnal ocular hypotensive efficacy of travoprost and latanoprost over a 44- hour period in patients with elevated intraocular pressure[J]. Clin Ther, 2004, 26: 84-91.
- [6] GARCIA-FEIJOO J. A comparison of the IOP lowering efficacy of travoprost 0. 004% and latanoprost 0. 005% over a 24 hour period[J]. Curr Med Res Opin, 2006, 22: 1 689-1 697.

A clinical observation on travoprost (travatan) reducing intraocular pressure

ZHAO Hong-xia

(Ophthalmic Dementment , Yan' an Hospital, Kunming 650051, China)

Abstract: From December 2005 to November 2006, a total of 42 patients with POAG or ocular hypertension who took the treatment of tracoprost after they carried out the surgery or used other medicines. After 4- and 12- week treatment, the change of intraocular pressure was recorded using a Goldman electronic tonometer, and the safety indicators of travoprost, conjunctival congestion and eyelid skin pigmentation were recorded. Among the patients, 59. 6% (25) showed significant treatment effects, 23. 8% (10) had improvements and 16. 6% (7) were not improved. The average basic intraocular pressure was 24. 40 mmHg, while after 4 weeks tracoprost treatment it reached 17. 30mmHg, and after 12 weeks it was 15. 90mmHg. Mild conjunctival congestions were found with 37 patients (76. 25%), 23. 8% (10) have moderate conjunctival congestions. It shows that the treatment of tracoprost can achieve significant and stable effects on the patients with primary angle closure glaucoma and ocular hypertension.

Key words: travoprost; glaucoma; intraocular pressure; medicine treatment

* * * * *

(上接第 429 页)

Phylogenetic diversity of bacteria in fungistasis soil determined by 16S rDNA-RFLP analysis

ZHOU Jue-pei, ZOU Chang-song, MO Ming-he

(Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: For the objective to study bacterial community related to soil fungistasis, 129 soil samples were collected from tobacco fields in 16 counties of Yunnan Province. After testing the fungistatic capability of inhibit conidialgermination of nematophagous fungus *Pochonia chlamyosporia*, these samples were combined into 5 significant groups ($P > 0. 01$) according to their fungistatic values. The 16S rRNA gene library of strong fungistatic soil was constructed and random clones were screened by RFLP method. Phylogenetic analysis on bacterial community showed that members of Proteobacteria and Acidobacteria were dominant bacteria in fungistatic soil.

Key words: soil fungistasis; bacteria community; bio-control, 16S rRNA