

DB21

辽 宁 省 地 方 标 准

DB 21/T XXXX—2024

辽西北退化草地土壤微生物多样性恢复技术规程

Technical regulation of soil microbial diversity restoration in degraded grassland in
northwest Liaoning Province

(工作组讨论稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX- XX - XX 实施

辽宁省市场监督管理局 发 布

目 次

前 言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 土壤样本收集 1

5 微生物多样性测定 1

6 测序数据的处理 2

7 评价方法 2

8 恢复标准 2

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规则起草。

本文件由辽宁省林业和草原局提出并归口管理。

本文件起草单位：沈阳农业大学。

本文件主要起草人：任百慧、白龙、李佳欢、刘英、杨季云。

本文件发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口管理部门通讯地址：辽宁省林业和草原局（辽宁省沈阳市和平区太原北街2号），联系电话：024-23448927。

文件起草单位通讯地址：沈阳农业大学（辽宁省沈阳市沈河区东陵路120号），联系电话：024-88487143。

辽西北退化草地土壤微生物多样性恢复技术规程

1 范围

本文规定了辽西北退化草地土壤样本收集、微生物多样性测定、测序数据的处理和恢复标准。本文适用于辽西北地区的退化草地。

2 规范性引用文件

本文没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

DNA

脱氧核糖核酸（英文 DeoxyriboNucleic Acid，缩写为 DNA）是生物细胞内含有的四种生物大分子之一核酸的一种。

3.2

PCR

聚合酶链式反应（PCR）是一种用于放大扩增特定的 DNA 片段的分子生物学技术。

3.3

高通量测序

高通量测序技术（High-throughput sequencing）又称“下一代”测序技术（Next-generation sequencing technology），或大规模平行测序（Massively parallel sequencing, MPS）。区别于传统 Sanger（双脱氧法）测序，能够一次并行对大量核酸分子进行平行序列测定的技术，通常一次测序反应能产生不低于 100Mb 的测序数据。

4 土壤样本收集

在辽西北地区选取不同草地类型样地，记录样地信息并观测草地退化程度，采用五点取样法采集0~20 cm土层的土壤，置于-80 °C冷冻保存。

5 微生物多样性测定

5.1 DNA 提取

选用Powersoil DNA Isolation Kit (MoBio, USA) 提取样本的基因组DNA, 之后利用琼脂糖凝胶电泳和Nanodrop对DNA的纯度和浓度进行检测。

5.2 PCR 扩增

以稀释后的基因组DNA为模板, 根据测序区域的选择, 使用带Barcode的特异引物和高效高保真的酶进行PCR, 细菌扩增引物为515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')/909R(5'-CCCGYCAATTCMTTTRAGT-3'), 真菌扩增引物为ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')/gITS7F(5'-GTGARTCATCGA RTCTTTG-3')。

5.3 高通量测序

使用TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit建库试剂盒进行文库构建, 构建好的文库经过Qubit和qPCR定量, 文库合格后, 使用v2测序试剂盒(2x250 bp)和Miseq测序仪进行上机测序。

6 测序数据的处理

使用Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME v.1.9.1) 控制程序获取初始序列, 并提取高质量的清洁标签 (<https://docs.qiime2.org/2019.4/tutorials/>), 并使用基于UCHIME算法的USEARCH工具, 根据97%的配对身份将序列聚类为操作性分类单元(OTU)。

7 评价方法

7.1 Venn 图

使用R语言中的“VennDiagram”包计算并绘制不同草地类型中细菌和真菌OTU的Venn图。

7.2 可视化

使用R语言中的“ggplot2”包绘制箱线图, 同时使每个样本的组成分布在门和属的分类水平上可视化, 以确定不同草地土壤类型中的细菌、真菌群落组成和Alpha多样性的差异。

7.3 主坐标分析

使用R中的“ape”包, 利用基于Bray-Curtis异质性矩阵的主坐标分析, 对不同草地类型中的细菌、真菌群落的结构组成进行了可视化。

7.4 相似性分析

相似性分析(Anosim)被用来研究不同草地类型对细菌、真菌的Beta多样性的影响。

7.5 共生网络

SparCC算法与“ggraph”和“igraph”软件包一起使用, 绘制共生网络图和构建网络拓扑指数表, 以观察不同草地类型细菌、真菌群落的差异。

8 恢复标准

8.1 网络复杂程度

土壤微生物共生网络越复杂，草地微生物相互作用越强，网络中的连接越多，其稳定性越高，抑制病原体入侵的能力越强，具有较高的恢复水平。

8.2 微生物群落结构差异

利用不同草地土壤类型的微生物群落结构的差异来判断草原土壤的退化程度。