

一个红壤剖面微生物群落的焦磷酸测序法研究*

袁超磊^{1,2} 贺纪正¹ 沈菊培¹ 戴宇^{1,2} 张丽梅^{1†}

(1 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

(2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 利用定量 PCR 和 454 焦磷酸测序法, 研究了湖南湘阴县一典型红壤剖面微生物相关基因的多度及微生物(古菌、细菌、真菌)群落结构。结果显示, 随剖面深度增加, 土壤黏粒含量增多, 有机质和全氮含量、碳氮比则下降。每克干土微生物基因拷贝数也趋于下降, 其值为: $10^{7.09} \sim 10^{9.30}$ (古菌 16S rDNA), $10^{8.10} \sim 10^{9.70}$ (细菌 16S rDNA), $10^{6.54} \sim 10^{7.95}$ (真菌 18S rDNA), $10^{7.24} \sim 10^{8.61}$ (古菌 *amoA* 基因), $10^{4.76} \sim 10^{6.25}$ (细菌 *amoA* 基因), $10^{5.94} \sim 10^{7.88}$ (*nirK* 基因), $10^{6.81} \sim 10^{9.21}$ (*nirS* 基因), $10^{7.03} \sim 10^{9.46}$ (*nosZ* 基因)。焦磷酸测序得到了 6459 条古菌 16S rRNA 基因序列, 平均长度为 496 bp; 28626 条细菌 16S rRNA 基因序列, 平均长度为 448 bp; 4683 条真菌 18S rRNA 基因序列, 平均长度为 534 bp。OTU(97% 相似度)分析表明, 微生物群落 α -多样性与所测土壤理化性质均无显著相关。Jaccard 差异度分析表明同一剖面各土壤层次间微生物群落结构更为相似, 而不同位点的三个表层土之间的差异较大; Mantel 检验发现, 与微生物群落变化相关的主要土壤因子是黏粒含量。在所有土样中, 古菌以泉古菌门中的热变形菌纲(89%)为主, 其分布与土壤黏粒含量相关。细菌的主要类群为酸杆菌门(33%)、变形菌门(17%)、绿弯菌门(12%)、门未定(11%)、厚壁菌门(10%)和放线菌门(7%)。其中, 酸杆菌门和变形菌门的相对多度在表层土中高于非表层土; 而绿弯菌门和厚壁菌门的相对多度则在非表层土中更高, 与土壤深度呈显著正相关。所有真菌序列分属于三个门, 即子囊菌门(87%)、担子菌门(9%)和球囊菌门(4%), 在纲一级的分类水平上, 各样品间群落结构无明显差异。

关键词 红壤; 焦磷酸测序; 生物多样性; 古菌; 细菌; 真菌

中图分类号 Q938.1+3 **文献标识码** A

红壤是我国铁铝土纲中分布最广的土类, 总面积达 5690 万 hm^2 , 约占全国土壤面积的 6.5%^[1], 其分布区是我国热带亚热带地区经济和粮食作物的重要产区。由于自然和人为因素的影响, 多数地区红壤面临严重的土壤肥力退化、酸化和水土流失等问题^[2-3]。微生物是土壤生态系统的重要组成部分, 广泛参与土壤有机和无机物质的循环转化, 其多样性及活性可以作为衡量土壤肥力的一个重要指标。红壤中微生物多样性及其在农田生态系统中的作用因此也受到广泛的关注。

近年来, 国内学者通过变性梯度凝胶电泳(DGGE)、末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)和克隆测序等免培养的分子生物学技术以及 BIOLOG 等方法对红壤微生物多样性开展了研究, 积累了丰富的信息^[4-7]。例如, 曾翠平等^[4]利用 PCR-DGGE 分析了红壤中半导体矿物光催化作用对微生物群

落结构的影响; He 等^[6]通过定量 PCR 和克隆测序研究发现红壤中存在较高数量的氢氧化古菌, 且其群落组成对长期不同施肥处理及其导致的土壤理化性质变化变化响应灵敏; 秦红灵等^[8]、袁红朝等^[9]也通过 T-RFLP 技术研究发现红壤不同坡地利用方式或不同水稻施肥管理措施对土壤细菌群落结构产生显著影响。但这些研究所使用的方法存在信息量小、耗时长、操作繁琐等不足之处, 使研究多限于关注某一类微生物, 难以对包括细菌、古菌和真菌在内的土壤微生物群落有全面的了解。新一代高通量测序的出现则为我们提供了更为有力的研究手段。例如 Roche 454 平台先通过微磁珠和 emPCR(emulsion PCR)制备样品, 然后用焦磷酸法测序, 相比传统的 Sanger 测序法, 大大提高了测序速度并降低了单位成本。该技术因其高通量、快捷和读长长等优点满足了对环境样品大规模测序的

* 国家自然科学基金项目(41090281 和 41025004)资助

† 通讯作者, E-mail: zhanglm@rcees.ac.cn

作者简介: 袁超磊(1989—), 男, 硕士研究生, 从事土壤分子生态学研究。E-mail: yuanchefeng@163.com

收稿日期: 2012-01-04; 收到修改稿日期: 2012-04-12

需求,越来越多地被应用于微生物生态学研究^[10]。

本研究运用焦磷酸测序对湖南湘阴县一典型红壤表层和剖面上细菌、古菌、真菌核糖体小亚基 rRNA (SSU rRNA) 基因进行了深度测序,旨在探讨 454 焦磷酸测序技术在揭示土壤微生物多样性方面的可行性和优势,为该技术的推广应用和数据分析提供方法参考和经验借鉴。此外,本研究还利用定量 PCR 技术考察了以上三个基因以及五个氮循环相关功能基因(细菌和古菌氨单加氧酶(*amoA*)基因,亚硝酸盐还原酶(*nirS*、*nirK*)基因,一氧化二氮还原酶(*nosZ*)基因)的多度变化。在此基础上,探讨了微生物多样性及相关基因多度与土壤因子之间的关系,以期为认识红壤地区微生物的多样性分布特征及其影响因素、为评价这些微生物在农田生态系统养分循环中的作用提供基础信息和参考。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

土壤样品于 2010 年 7 月采自湖南省湘阴县一典型丘陵坡地,土壤类型为红壤(筒育湿润富铁土),包括三个样点:XY1A(N28°38'32",E112°55'10";海拔 37 m)、XY2A(N28°38'33",E112°55'11";海拔 43 m)和 XY3A(N28°38'33",E112°55'11";海拔 42 m)。三个样点分别位于下坡、上坡和中坡,土地利用类型分别为:花生地、牧草地和开垦未耕农用地。每个样点在约 50 m² 的范围内打五个土钻(直径 5 cm,深度 20 cm)混匀作为一个表层土样品。并对 XY3A 样点中的一个位点进行剖面取样,非表层土样分别标记为 XY3B(20~35 cm),XY3C(35~55 cm)和 XY3D(55~70 cm)。共计 6 个样品。土壤采集后用 4℃ 冰盒运至实验室,过 2 mm 筛后分装,保存于 4℃ 和 -80℃ 冰箱,分别用于理化指标测定和 DNA 提取。

1.2 土壤理化性质测定

土壤有机碳测定采用低温外加热重铬酸钾氧化-比色法,全氮含量利用元素分析仪(Vario EL,Elementar,Germany)测定,土壤碳氮比以土壤有机碳含量和全氮含量的比值表示。土壤 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 以 1 mol L⁻¹ KCl 浸提后,用连续流动分析仪(SAN++,Skalar,Holand)测定。土壤粒径分析参考 Kettler 等^[11]的方法。

1.3 土壤 DNA 提取

称取 0.5 g 土壤用 Fast DNA[®] SPIN 试剂盒(Qbiogene Inc.,USA)提取总 DNA,操作按说明书进行,略有改动,即在 FastPrep[®] 细胞破碎仪(Qbiogene Inc.,USA)上进行细胞破碎处理时强度设为 4.0,时间设为 30 s,并室温静置 15 min 后再进行后续步骤。所得 DNA 均稀释 10 倍后再进行下游实验。

1.4 定量 PCR

细菌 16S rDNA (BAC) 定量 PCR 采用 TaqMan 探针法,探针 Probe TM1389F 的 5' 端用 FAM 标记,3' 端用 TAMRA 标记^[12]。古菌 16S rDNA (ARC),真菌 18S rDNA (FUNGI) 以及五个氮循环相关基因(细菌 *amoA* 基因(AOB),古菌 *amoA* 基因(AOA),*nirS*、*nirK*、*nosZ* 基因)的定量 PCR 分析采用 SYBR Green 染色法。细菌 16S rDNA 定量 PCR 反应体系为:25 μl 体系含 Premix Ex Taq[™] (TaKaRa) 12.5 μl,引物(10 μmol L⁻¹)各 0.25 μl, Taqman 探针 (TaKaRa, 3 μmol L⁻¹) 0.5 μl,模板 1 μl。其余基因的反应体系均按 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (TaKaRa) 说明书操作,其中模板加入量为 2 μl。各基因定量 PCR 所用的引物、反应程序和参考文献如表 1 所示。反应在 iCycler iQ5 (Bio-Rad, USA) 定量 PCR 仪上进行。各基因定量 PCR 标准曲线参考沈菊培等^[13]的方法准备。

1.5 454 焦磷酸测序及数据分析

用于焦磷酸测序的古菌 16S rDNA、细菌 16S rDNA 以及真菌 18S rDNA 的 PCR 扩增引物和反应条件见表 1。其中 Primer A-Key (5'-CGTATCGCCTC-CCTCGCGCCATCAG-3')、Primer B-Key (5'-CTAT-GCGCCTTGCCAGCCCCGCTCAG-3') 为 Roche 公司提供的加在 MID 和特异引物(用于扩增目标片段)之前的接头^[14]。MID 为一段十碱基的寡核苷酸序列,各样品含不同的 MID 以用于区分。古菌 16S rDNA 和真菌 18S rDNA PCR 反应体系为:50 μl 体系含 Premix Ex Taq[™] (TaKaRa) 25 μl,引物(10 μmol L⁻¹)各 1 μl,牛血清蛋白(BSA;25 mg mL⁻¹) 0.5 μl,模板 3 μl。细菌 16S rDNA PCR 反应体系为:50 μl 体系含 10 × buffer (含 Mg²⁺; TaKaRa) 5 μl, dNTP (各 2.5 mmol L⁻¹; TaKaRa) 4 μl, Ex Taq[™] (TaKaRa) 0.5 μl,引物(10 μmol L⁻¹)各 1 μl,模板 4 μl。

所得 PCR 产物经切胶纯化后用 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) 测定浓度,等摩尔混合后送到韩国 Macrogen 公司用罗氏 454 测序仪测序。所得序列用 mothur^[15] (v. 1.21.1) 处理。

表 1 定量 PCR 及普通 PCR 中所用的引物和反应条件

Table 1 Primers and reaction conditions used in PCR

目标基因 Target gene	引物 Primer set	序列 (5' - 3') Sequence (5' - 3')	反应程序 Thermal profile	参考文献 Reference
Archaeal 16S rRNA (ARC)	A364aF A934b	CGGGGCGCASCAGGCGCGAA GTGCTCCCGCGCAATTCCT	94°C for 60 s (1 cycle); 94°C for 20 s, 59°C for 30 s, 72°C for 30 s, and plate read at 83°C for 15 s (40 cycles)	[19]
Bacterial 16S rRNA (BAC)	BACT1369F PROK1492R Probe TM1389F	CGGTGAATACGTTTCYCGG GCWTAACCTTGTACGACTT CTTGTACACACGGCCCGCTC	95°C for 10 s (1 cycle); 95°C for 15 s, and 56°C for 60 s (plate read) (35 cycles)	[12]
Fungal 18S rRNA (FUNG1)	NSI Fung	GTAGTCATATGCTTGCTC ATTCCCCCTTACCCGTTG	95°C for 3 min (1 cycle); 95°C for 10 s, 55°C for 30 s, 72°C for 60 s, and plate read at 83°C for 10 s (35 cycles)	[20] [21]
Bacterial <i>amoA</i> (AOB)	<i>amoA</i> -1F <i>amoA</i> -2R	GGGGTTTCTACTGCTGGT CCCTCKGSAAAGGCTTCTTC	95°C for 60 s (1 cycle); 95°C for 10 s, 55°C for 30 s, 72°C for 60 s, and plate read at 85°C for 10 s (35 cycles)	[22]
Archaeal <i>amoA</i> (AOA)	Arch-amoAF Arch-amoAR	STAATGCTCTGGCTTAGACG CGGGCCATCCATCTATGT	95°C for 3 min (1 cycle); 95°C for 10 s, 55°C for 30 s, 72°C for 60 s, and plate read at 83°C for 10 s (35 cycles)	[23]
<i>nirS</i>	cd3aF R3cd	GTSAAAGTSAAGGARACSGG GASTTCGGRTGSGTCTTGA	94°C for 2 min (1 cycle); 94°C for 30 s, 57°C for 30 s (-1°C/cy- cle), 72°C for 45 s (6 cycles); 94°C for 30 s, 52°C for 30 s, 72°C for 45 s, plate read at 83°C for 10 s (30 cycles)	[24]
<i>nirK</i>	F1aCu R3Cu	ATCATGCTSCTGCGCGCG GCCTCGATCAGRITTGCTGT	95°C for 3 min (1 cycle); 95°C for 30 s, 63°C for 30 s (-1°C/cy- cle), 72°C for 30 s (6 cycles); 95°C for 30 s, 58°C for 30 s, 72°C for 30 s, plate read at 83°C for 10 s (32 cycles)	[25]
<i>nosZ</i>	nosZ-F nosZ1662R	CGYTGTTCMTGACAGCCAG CGSACCTTSTTCCGCTYCGG	94°C for 2 min (1 cycle); 94°C for 30 s, 57°C for 30 s (-1°C/cy- cle), 72°C for 45 s (6 cycles); 94°C for 30 s, 52°C for 30 s, 72°C for 45 s, plate read at 83°C for 10 s (30 cycles)	[26] [24]
Archaeal 16S rRNA ^a	Primer A - key + MID + A364aF Primer B - key + A934bR	CGGGGCGCASCAGGCGCGAA GTGCTCCCGCGCAATTCCT	94°C for 2 min (1 cycle); 94°C for 20 s, 59°C for 30 s, and 72°C for 30 s (35 cycles); and 72°C for 5 min (1 cycle)	[19]
Bacterial 16S rRNA ^a	Primer A - key + MID + 27F Primer B - key + 519R	AGAGTTGATCCTCGCTCAG GWATTACCGCGGCKGCTG	95°C for 5 min (1 cycle); 94°C for 30 s, 55°C for 60 s, and 72°C for 1.5 min (35 cycles); and 72°C for 10 min (1 cycle)	[27]
Fungal 18S rRNA ^a	Primer B - key + EF4 Primer A - key + MID + Fung5	GGAAGGGRCTATTATTATTAG GTAAAAGTCTCTGCTTCCCC	94°C for 15 min (1 cycle); 94°C for 60 s, 48°C for 60 s, and 72°C for 3 min (40 cycles); and 72°C for 10 min (1 cycle)	[28]

注: a 用于 454 焦磷酸测序, 给出的为特异引物的序列; 无 a 标记的为定量 PCR 扩增引物。Note: a For 454 pyrosequencing; only sequences of specific primers are presented. Primers without a mark are used for real-time PCR.

大致流程如下:1)序列处理:使用 mothur 提供的 silva 参考序列^[16] (http://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files) 进行序列比对 (align. seqs) 后, 去除短片段 (小于 150 bp) 及嵌合体 (质量控制), 并通过预聚类 (preclustering) 降低序列中的噪音^[17] (pre. cluster 命令), 然后将所得到的高质量序列进行分类 (classify. seqs 命令; 古菌、细菌使用 mothur 提供的 RDP 参考序列和分类系统^[18], 真菌使用 mothur 提供的 silva 参考序列^[16] 和对应的 NCBI 分类系统 (http://www.mothur.org/wiki/Taxonomy_outline)。2)序列分析:采用基于序列相似度的方法将序列分为不同的可操作分类单元 (OTU); 利用 mothur 的 dist. seqs 和 cluster 命令, 本研究在 97% 的相似度水平上进行了 OTU 分析。3)生态学分析:利用 mothur 中的命令, 生成了各样品的稀释曲线 (rarefaction. single), 在重取样 (sub. sample) 以保证各样品序列数相同的基础上, 分析了 OTU 的多样性 (summary. single)、群落间差异 (tree. shared、metastats) 及其与环境因子的关系等。此外还根据分类

结果描述了各微生物类群在不同样品中的分布。

1.6 统计分析

相关分析 (除特殊说明外, 均为 Pearson 相关)、t-检验等通过 SPSS 19 (IBM, USA) 实现。Mantel 检验用 mothur 中的 mantel 命令计算。 $p < 0.05$ 为显著。

2 结果与讨论

2.1 土壤理化性质

土壤理化性质如表 2 所示, 土壤为酸性土, pH 在 4.42 和 5.73 之间。有机质和全氮含量随着土壤深度增加而降低, 表现出显著的负相关关系。土壤黏粒含量则沿剖面深度增加, 二者呈显著正相关。土壤碳氮比也随剖面深度增加而下降, 表明土壤有机质减少的速度比全氮更快。此外, 在 XY3 样点的剖面上, 土壤硝态氮含量随土壤深度增加而增加, 表明 NO_3^- 经长期淋溶后在深层土壤中有累积的趋势。铵态氮含量在剖面上则无明显变化规律。

表 2 土壤理化性质¹⁾

Table 2 Soil properties¹⁾

土样编号 Soil ID	pH	有机质含量 Organic matter (g kg ⁻¹)	全氮 Total N (g kg ⁻¹)	碳氮比 C:N	黏粒含量 Clay content (g kg ⁻¹)	硝态氮含量 NO ₃ ⁻ -N content (mg kg ⁻¹ dry soil)	铵态氮含量 NH ₄ ⁺ -N content (mg kg ⁻¹ dry soil)
XY1A	5.11	16.49	1.21	7.97	165.0	10.05	8.50
XY2A	5.73	17.43	1.09	9.19	220.9	2.37	8.87
XY3A	4.93	13.96	0.97	8.10	257.0	4.15	8.31
XY3B	4.64	6.79	0.65	6.56	306.6	2.81	7.26
XY3C	4.67	4.58	0.55	4.43	357.0	11.41	10.88
XY3D	4.42	3.65	0.52	4.23	359.2	29.51	8.20

注:1) 除黏粒含量为 2 个测量重复的平均值外, 其余数值均为 3 个测量重复的平均数。Note:1) Values are means of the measurements of three replicates except that the values for clay content are means of only 2 replicates.

2.2 定量 PCR

古菌、细菌和真菌 SSU rRNA 基因 (ARC、BAC、FUNGI) 以及五个功能基因 (AOA、AOB、*nirS*、*nirK*、*nosZ*) 的拷贝数如图 1 所示。土壤中 SSU rRNA 基因多度由大到小依次为: BAC ($10^{8.10} \sim 10^{9.70}$) > ARC ($10^{7.09} \sim 10^{9.3}$) > FUNGI ($10^{6.54} \sim 10^{7.95}$), 成对样品的 t-检验表明它们差异显著。细菌和古菌的数量与一些在红壤^[6]或其他土壤类型^[13]上取得的研究结果一致, Cao 等^[29]运用同样的定量分析方法也发现我国北方褐土、碱性潮土和酸性红壤中细菌 16S rD-

NA 的每克干土拷贝数为 $10^{8.68} \sim 10^{9.70}$, 古菌为 $10^{6.70} \sim 10^{8.11}$ 。目前未见有关红壤中真菌 18S rDNA 拷贝数的报道, 但 Prévost-Bouré 等^[30]对 24 个欧洲土壤进行的调查显示每克干土中真菌 18S rDNA 拷贝数的约为 $10^{6.84} \sim 10^{9.32}$, Grantina 等^[31]对不同土地利用类型下真菌的定量研究也表明耕地土壤中真菌 ITS 拷贝数在 $10^{6.35} \sim 10^{7.51}$ 之间, 与本研究中的范围相当。氮循环相关基因中, 古菌 *amoA* 基因 ($10^{7.24} \sim 10^{8.61}$) 多度显著多于细菌 *amoA* 基因 ($10^{4.76} \sim 10^{6.25}$), 这之前对酸性红壤的研究结

果^[6, 32]一致,进一步为酸性土壤中氨氧化古菌可能在氨氧化过程中起主要作用提供了支持。反硝化相关基因中,由少到多依次为:*nirK*($10^{5.94} \sim 10^{7.88}$)、*nirS*($10^{6.81} \sim 10^{9.21}$)、*nosZ*($10^{7.03} \sim 10^{9.46}$)。

总体来说,以上各基因的拷贝数在表层土(XY1A、XY2A、XY3A)中高于非表层土(XY3B、XY3C、XY3D),在土壤剖面上随深度的增加而降低(图1),二者呈显著的负相关关系。土壤理化性质与基因拷贝数之间的相关分析表明,以上各基因的多度均与有机质含量、全氮、碳氮比呈显著正相关,而与土壤黏粒含量呈显著负相关。沈菊培等^[13]对几种农田土壤的调查也发现细菌和古菌多度沿土壤剖面降低,且与土壤有机质含量呈显著正相关,王会利等^[33]对红壤中微生物量与理化性质关系的考察也揭示出类似的规律。这可能是由于随深度的增加,土壤中营养物质减少;而黏粒的增加也改变了土壤的孔隙结构,影响到水分和氧气状况,进而影响微生物的生长。各基因拷贝数之间呈显著正相关,暗示环境因子对它们的影响一致。另外,细菌和真菌的多度与pH呈显著正相关,反映出这两类微生物对酸性土壤低pH的胁迫敏感。硝态氮、铵态氮含量与各基因拷贝数相关均不显著。

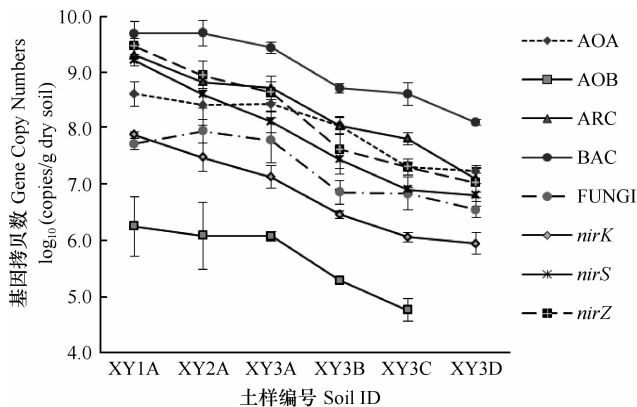


图1 定量PCR结果(XY3D中AOB低于检测限)。AOA,古菌*amoA*基因;AOB,细菌*amoA*基因;ARC,古菌16S rRNA基因;BAC,细菌16S rRNA基因;FUNGI,真菌18S rRNA基因。

Fig. 1 Results of qPCR (AOB in XY3D was not detected). AOA and AOB stand for archaeal and bacterial *amoA* gene, respectively; ARC, BAC and FUNGI indicate archaeal 16S rRNA gene, bacterial 16S rRNA gene, and fungal 18S rRNA gene, respectively.

2.3 454 测序

除了样品XY3B未获得古菌16S rRNA基因扩增产物外,其余样品均获得了古菌、细菌和真菌的

SSU rDNA片段,即对17个样品进行了焦磷酸测序。共获得古菌16S rRNA基因序列6459条,平均长度496 bp,细菌16S rRNA基因序列28626条,平均长度448 bp,真菌18S rRNA基因序列4683条,平均长度534 bp。经过质量控制后,用于分析的序列数为古菌6416条、细菌26505条、真菌4059条。

2.3.1 α -多样性 用mothur的calculators计算了17个微生物群落的 α -多样性(表3)。结果显示,在0.03的差异度水平下,各基因稀释曲线均未达到明显的平台阶段(数据未列出),但Good's coverage大于0.80的样品还是有七个。由于OTU数和Chao1指数受到取样(序列数)的影响^[34],为考察群落 α -多样性与环境因子之间的关系,本研究参照文献^[35]进行了重取样,使各样品的序列数量一致。即从每个样品中随机挑出了90条古菌16S rDNA序列,1022条细菌16S rDNA序列,140条真菌18S rDNA序列(XY2A序列太少,未进行计算),用于计算各样品的 α -多样性。从表3可以看出,虽然古菌的序列条数最少,但其样本覆盖率最高,细菌的情况则相反,真菌介于二者之间;表明该红壤中OTU多样性顺序为细菌>真菌>古菌。相关分析表明,真菌的Chao1丰富度指数与细菌的OTU数(sobs)、Chao1、npshannon指数均显著正相关,而古菌的多样性指数与细菌或真菌的无显著相关。即细菌和真菌间 α -多样性联系较为紧密。除细菌的invsimpson指数与铵态氮含量显著正相关以外,表3中各 α -多样性指标与土壤深度及pH、有机质、全氮和碳氮比等理化指标均无显著相关。虽然有研究显示随土壤深度增加微生物多样性有所下降^[34, 36],但目前未见类似的对该红壤的具体调查,这是否由所得序列的覆盖度不同还是土壤样品的特异性造成这一差异还需进一步研究。

2.3.2 群落间比较 在重取样的基础上,本研究对各样品微生物群落进行了比较。OTU分析发现,对古菌16S rDNA而言,3个表层土XY1A、XY2A和XY3A中共有的OTU为2个,同一剖面上的XY3A、XY3C和XY3D共有的OTU为10个;对细菌16S rDNA而言,表层土(XY1A、XY2A、XY3A)和剖面(XY3A、XY3B、XY3C、XY3D)样品中重叠的OTU分别为14个和79个;真菌的这一数值分别为6(XY1A、XY3A)和14(XY3A、XY3B、XY3C、XY3D)。表明本研究考察的6个土样中,同一位点不同剖面深度土壤中古菌、细菌和真菌群落的相似性大于三

表 3 微生物群落 α -多样性指标Table 3 α -diversity indices of microbial communities

微生物群落 Microbial Community ^a	重取样前 Before subsampling			重取样后 After subsampling					
	nseqs ^b	coverage	sobs	nseqs	coverage	sobs	chao	invsimpson	npshannon
XY1A—ARC	469	0.91	73	90	0.82	27	47	5.00	2.75
XY2A—ARC	90	0.83	29	90	0.83	29	47	11.38	3.11
XY3A—ARC	109	0.86	30	90	0.92	20	23	3.70	2.29
XY3C—ARC	5161	0.98	163	90	0.78	31	69	5.32	2.96
XY3D—ARC	587	0.96	58	90	0.82	30	60	9.38	3.10
XY1A—BAC	2418	0.62	1179	1022	0.69	505	949	164.22	6.20
XY2A—BAC	1496	0.60	775	1022	0.76	462	721	199.21	6.12
XY3A—BAC	1139	0.59	611	1022	0.81	406	578	134.12	5.88
XY3B—BAC	1022	0.57	569	1022	0.57	569	2055	150.35	6.34
XY3C—BAC	19110	0.76	6124	1022	0.54	602	2219	267.42	6.53
XY3D—BAC	1320	0.58	716	1022	0.78	419	655	157.62	5.91
XY1A—FUNGI	234	0.76	85	140	0.81	50	77	22.79	3.75
XY2A—FUNGI	28	0.29	24	NA ^c	NA	NA	NA	NA	NA
XY3A—FUNGI	276	0.72	103	140	0.82	47	70	10.92	3.46
XY3B—FUNGI	140	0.70	64	140	0.70	64	136	17.56	4.06
XY3C—FUNGI	2341	0.89	374	140	0.71	54	184	7.82	3.55
XY3D—FUNGI	1040	0.92	147	140	0.83	43	78	11.25	3.35

注: a: ARC, 古菌; BAC, 细菌; FUNGI, 真菌。 b: nseqs, 序列数; coverage, 指 Good's coverage; sobs, 观察到的 OTU 数; chao, Chao1 丰富度指数; invsimpson, Simpson 多样性指数的倒数; npshannon, 基于 OTU 的 Shannon 多样性指数的非参数估计。各指数计算公式参见: http://www.mothur.org/wiki/Calculators#Community_richness。 c: 数据缺失, 因样品 XY2A 获得的真菌 18S rDNA 序列太少, 未进行重取样。 Note: a: ARC, Archaea; BAC, Bacteria; FUNGI, Fungi。 b: nseqs, number of sequences; coverage, Good's coverage; sobs, number of observed OTUs; chao, Chao1 richness estimate; invsimpson, inverse of the Simpson diversity index; npshannon, non-parametric estimate of the Shannon diversity index. For detail, see http://www.mothur.org/wiki/Calculators#Community_richness。 c: NA stands for not available (due to that the sequences of fungal 18S rRNA gene obtained in XY2A were too few for subsampling).

个不同位点的表层土样。图 2 中的树状图表示了各群落之间的 Jaccard 差异度, 同样可以看出同一剖面土壤微生物群落间差异度较小, 与 OTU 分析结果一致。类似地, Cao 等^[29]对取自不同区域的多个剖面表层土壤进行的分析也发现古菌的多样性组成在表层土壤中差异较大, 而在同一剖面不同深度的样品之间差异较小。通过 Mantel 检验分析群落间 Jaccard 差异度矩阵和土壤因子欧几里德距离矩阵之间的相关性, 本研究考察了影响微生物群落组成的环境因子。结果显示, 对古菌而言, 相关显著的因子有土壤黏粒含量 ($p = 0.017$)、碳氮比 ($p = 0.036$), p 值小于 0.1 的因子还有有机质 ($p = 0.068$)。对细菌而言, 相关显著的因子有 pH ($p = 0.042$)、有机质 ($p = 0.035$)、全氮 ($p = 0.043$)、土壤黏粒含量 ($p = 0.009$)。而对真菌而言, 所有环境因

子距离矩阵与群落距离矩阵均无显著相关, 最小的 p 值属于土壤黏粒含量, 为 0.162。有机质、全氮对

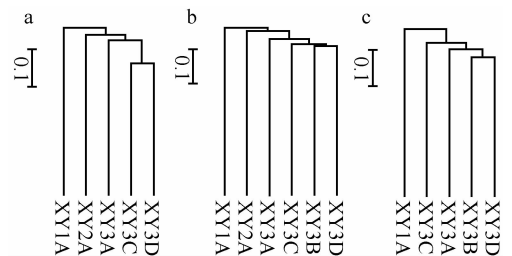


图 2 群落 Jaccard 差异度树状图 (a, 古菌群落; b, 细菌群落; c, 真菌群落。XY1A、XY2A、XY3A、XY3B、XY3C、XY3D 为土样编号)

Fig. 2 Dendrogram for Jaccard dissimilarity among communities (a, archaeal communities; b, bacterial communities; c, fungal communities. XY1A, XY2A, XY3A, XY3B, XY3C and XY3D are soil IDs)

古菌和细菌群落组成的影响在之前也有报道^[29, 34]。另外,有研究表明 pH 是驱动土壤细菌分布最主要的因素^[37],但对真菌群落组成的影响较小^[35],这在本文中也有所体现。

2.3.3 微生物类群分布 由抽样理论可知,达到一定限度后,取样量并不影响物种相对多度。在分析主要微生物类群在各样品中的分布时,与其他报道^[34, 38]类似,本研究对各样品得到的所有有效序列进行分析,没有进行重取样。

1) 古菌分布

对古菌数据而言,RDP 分类结果显示全部 6416 条序列均属于古菌界。能确定到门的序列有 6415 条,其中 89% 属于泉古菌门(Crenarchaeota)中的热变形菌纲(Thermoprotei),11% 属于广古菌门(Euryarchaeota)(其中 43% 为甲烷微菌纲(Methanomicrobia)、30% 为热原体纲(Thermoplasmata)、26% 为未分类)。可见泉古菌门为该土壤中的优势古菌,与之前的研究^[39]一致。除表层土 XY1A 中甲烷微菌纲的比例(56%)高于热变形菌纲(33%)外,其余土样的优势古菌类群都为热变形菌纲(占 69%~95%),而几乎不含甲烷微菌纲的序列。另外,热变形菌纲的相对多度与土壤黏粒含量呈显著正相关。

2) 细菌分布

细菌 RDP 分类结果显示除一条序列外,其余 26504 条序列均属于细菌,主要类群为酸杆菌门(Acidobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、门未定(Bacteria incertae sedis)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria),所占比例分别为 33%、17%、12%、11%、10% 和 7%,这些类群在所有样品中均有分布,其比例如图 3 所示。酸杆菌门是所有土样的优势细

菌类群(占 28%~56%),与之前的研究结果一致^[34]。其相对多度在表层土中高于非表层土,并与土壤深度和黏粒含量呈显著负相关,与有机质含量、全氮含量以及碳氮比呈显著正相关,与 pH 相关不显著($r = 0.706, p = 0.117$)。在所有序列中,共检测到了 26 个酸杆菌亚类(subgroup)^[40]中的 18 个,其中以亚类 1、2、3、7、6 为主,其占全部序列的比例分别为 21%、4%、3%、2%、1%。与此类似,Jones 等^[41]发现土壤中优势的酸杆菌亚类为亚类 1、2、3、4 和 6。比较表层土和非表层土发现,除亚类 2 外,其他主要亚类均是在表层土中相对多度较高。许多研究^[35, 37, 41]显示酸杆菌门或其某些亚类的分布受 pH 影响,但在本研究中主要亚类仅发现亚类 6 与 pH 有显著正相关,这可能与供试土壤间 pH 差异不大有关。不同亚类分布不同表现出其在生态位上的分化。

另外,变形菌门也是该红壤中的优势菌群,且以 α -变形菌纲为主。 α -变形菌纲同样在表层土壤中表现出更高的相对多度,这与 Hansel 等^[42]报道的 α -变形菌纲在表层土壤出现的比例较深层土壤高、在碳含量相对丰富的土壤中比低碳土壤高的结果一致,表明这类变形菌的分布可能受有机质影响。与酸杆菌门和变形菌门相反,绿弯菌门和厚壁菌门则在非表层土中更占优势,其比例与土壤深度呈显著正相关。其他研究也发现绿弯菌门和厚壁菌门在剖面深层土壤中的相对多度明显高于表层土壤^[42-43],与本研究结果一致。许多绿弯菌门为兼性厌氧菌,有些类群则为专性厌氧菌^[44],有研究发现一些绿弯菌在低温缺氧的环境表现出很高的相对多度和多样性^[45],表明绿弯菌门的分布可能与氧含量有关。

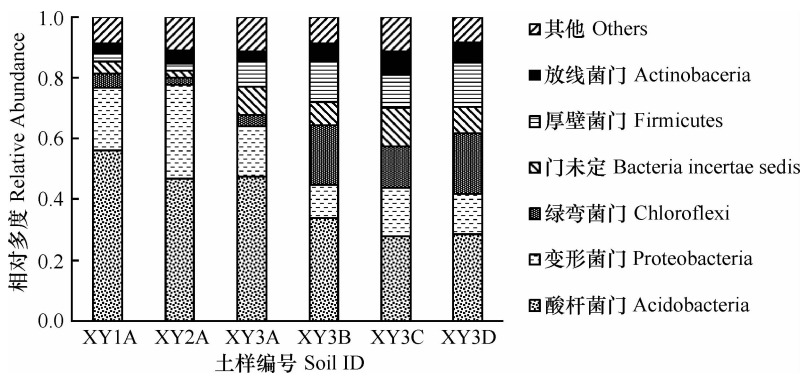


图 3 细菌类群分布

Fig. 3 Distribution of bacterial phyla

3) 真菌分布

采用 silva 参考序列和 NCBI 命名系统对得到的真菌序列进行分类,结果显示除两条序列不属于真菌外,其余 4057 条序列分别属于真菌的三个门:子囊菌门(Ascomycota)(87%)、担子菌门(Basidiomycota)(9%)和球囊菌门(Glomeromycota)(4%)。除 XY2A 群落结构有所不同(这三个门的比例依次为 46%、54%、0%)外,其余样品中真菌类群的比例与总体类似。而 Buée 等^[38]通过焦磷酸测序发现法国森林土壤中最丰富的真菌类群为担子菌门,其次是子囊菌门。表明农业土壤和森林土壤中真菌的优势类群明显不同,这可能与生境中凋落物的状况有关。

在属于子囊菌门的序列中,盘菌亚门(Pezizomycotina)

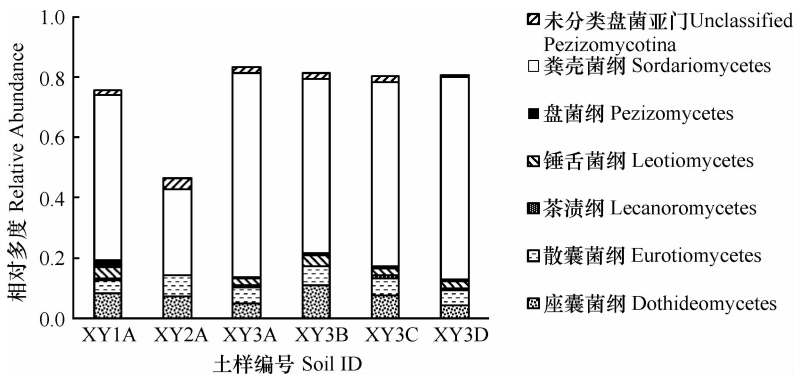


图 4 盘菌亚门以下各纲的相对多度

Fig. 4 Relative abundances of classes in Pezizomycotina

3 结论与展望

本研究通过定量 PCR 和焦磷酸测序对湖南湘阴县一红壤中氮转化相关微生物的基因多度及古菌、细菌和真菌的群落结构进行了调查,得到以下主要结果:

定量 PCR 揭示出该红壤中存在数量巨大的古菌、细菌、真菌和氮循环相关功能微生物,土壤中 SSU rRNA 基因拷贝数的多度顺序为细菌 > 古菌 > 真菌。各微生物类群的数量随土壤剖面深度增加而降低,与有机质含量、全氮、碳氮比呈显著正相关,而与土壤黏粒含量呈显著负相关。

焦磷酸测序结果表明该红壤中 OTU 多样性顺序为细菌 > 真菌 > 古菌,这 3 大类微生物的 α -多样性与土壤因子之间无显著相关性。Jaccard 差异度分析显示微生物群落结构在不同位点三个表层土样间的差异大于同一位点不同剖面深度土壤中的

mycotina) 占 93%,其中又以粪壳菌纲(Sordariomycetes)为主。在纲一级的分类水平上,各个样品之间群落结构无显著差异(图 4)。但进一步的 Metastats^[46]分析显示,有 24 个属于盘菌亚门的 OTU 在表层土和非表层土中的分布差异显著。尤其是 OTU1、OTU18、OTU20、OTU22、OTU29、OTU75、OTU189 和 OTU202,它们共包含 1359 条序列,占总数的三分之一,虽然它们都是未分类的 *Geosmithia putterillii* sensu Pitt,但除了 OTU18,OTU22 外,其余 OTU 的相对多度都是在表层土中显著低于非表层土。这表明在更细的分类水平上,底层土壤和表层土壤中真菌的组成明显不同,但由于这些 OTU 都属于未分类的 *Geosmithia putterillii* sensu Pitt,有关这些类群的生理生态特征还不明确。

差异;驱动这种差异的土壤因子主要是黏粒、有机质和全氮含量。在所有土样中,古菌以泉古菌门中的热变形菌纲为主,其分布主要与土壤黏粒含量相关。各土样中细菌的主要类群包括酸杆菌门、变形菌门、绿弯菌门、门未定、厚壁菌门和放线菌门。酸杆菌门和变形菌门是所有土样的优势菌群,其相对多度在表层土壤中高于非表层土,并与有机质含量相关;而绿弯菌门和厚壁菌门的相对多度则在非表层土中更高,且与土壤深度呈显著正相关关系。真菌的组成以子囊菌门为主,在纲一级的分类水平上,各样品之间无明显差异;但在更细的分类水平上,表层土壤和剖面土壤之间有显著不同。

研究方法上,样品和操作不一致可能导致提取的土壤 DNA 以及 PCR 产物有差异,加之焦磷酸测序技术本身的缺陷(等量混合的样品不能产生等量的序列),本研究中群落取样不均匀,有些样品取样也不够充分;但相对常规的分子生态学研究方法(如克隆文库),454 焦磷酸测序在分析通量和信息

量上还是表现出明显的优势,如本研究中鉴定出的土壤细菌 OTU 数平均在 500 个以上,这是通过克隆测序的方法难以达到的。鉴于焦磷酸测序在数据量上的优势,加之土样采集时已是多点混匀,与目前国际上运用该技术的多数研究^[34-35, 37, 41, 47]类似,本研究中未对同一样品设置重复;若实验条件允许,后续研究可在此方面有所改进。此外,本研究的表层土样取自同一坡地的不同位置,意在探讨利用高通量 454 测序技术进行较大尺度上土壤微生物多样性调查时,以 3 个位点作为这一区域的 3 个取样重复的样本变异性和代表性如何。虽然各样点的气候条件和土壤母质一致,但所处坡面位置及耕作管理等导致的微环境不同,可能是造成不同位点的表层土样中微生物群落差异大于同一位点的不同剖面深度样品的主要原因,在进行大规模取样调查土壤微生物多样性时,应充分考虑土壤样点的空间异质性。考察群落 α -多样性和差异度时,本研究通过重取样使各样品的序列数均一,以尽量减小样本量的影响。然而,这也并不是没有缺陷的,在计算 α -多样性和差异度时,依据的信息是群落的物种数及每个物种包含的个体数;一定的序列条数可能已经穷尽多样性小的群落,却不能涵盖多样性高的群落中的全部物种,致使计算出现偏差。理想的取样应该考虑群落的多样性,但这在操作上是很难实现的。序列条数对优势种的影响相对较小,因为和稀有种不同,优势种一般都能在样本中反映出来,这也是本研究在分析主要微生物类群分布时,并没有采用相同数量序列的原因。另外,在对 454 序列进行分类分析方面,本研究利用 RDP 数据库对古菌序列进行分析,显示古菌的优势类群为热变形菌纲,但其中绝大多数未能进一步分类,表明 RDP 数据库在古菌分类方面存在局限性,后续研究可以考虑尝试其他数据库(如 Greengenes^[48])或自建数据库^[38]。

本文利用焦磷酸测序技术高通量的优势,结合定量 PCR,深入地调查了湘阴一红壤剖面上细菌、真菌和古菌的群落组成及氮循环相关功能微生物的数量分布特征,探讨了影响微生物群落结构的环境因子。为利用高通量测序技术研究土壤微生物多样性提供了重要的方法借鉴和经验,也为认识我国典型红壤中的微生物多样性特征,并进一步阐释微生物在土壤重要元素生物地球化学循环中的作用提供了背景资料和参考信息。

致谢 感谢中国科学院亚热带研究所魏文学研究员和朱亦君女士等在样品采集中给予的大力帮助,感谢上海人类基因组研究中心郑华军研究员在焦磷酸测序技术和数据处理方面给予的帮助。

参考文献

- [1] 张凤荣. 土壤地理学. 北京:中国农业出版社, 2002:126—127. Zhang F R. Soil geography (In Chinese). Beijing: China Agriculture Press, 2002:126—127
- [2] 赵其国. 我国红壤的退化问题. 土壤, 1995, (06):281—285. Zhao Q G. Degradation of China's red soil (In Chinese). Soils, 1995(6):281—285
- [3] Li X H, Zhang Z Y, Yang J, et al. Effects of bahia grass cover and mulch on runoff and sediment yield of sloping red soil in southern China. *Pedosphere*, 2011, 21(2):238—243
- [4] 曾翠平, 鲁安怀, 李艳, 等. 红壤中微生物群落对半导体矿物日光催化作用的响应. 高校地质学报, 2011, (01):101—106. Zeng C P, Lu A H, Li Y, et al. Response of microbial community to sunlight catalysis of semiconductor minerals in red soil (In Chinese). *Geological Journal of China Universities*, 2011, 17(1):101—106
- [5] 张慧, 袁红朝, 朱亦君, 等. 不同利用方式对红壤坡地微生物多样性和硝化势的影响. 生态学杂志, 2011, (06):169—176. Zhang H, Yuan H Z, Zhu Y J, et al. Microbial diversity and nitrification potential of sloping land red soil under different land use patterns (In Chinese). *Chinese Journal of Ecology*, 2011, 30(6):169—176
- [6] He J Z, Shen J P, Zhang L M, et al. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(9):2364—2374.
- [7] 李云, 孙波, 李忠佩, 等. 不同气候条件对旱地红壤微生物群落代谢特征的长期影响. 土壤, 2011, (01):60—66. Li Y, Sun B, Li Z P, et al. Long-term effects of different climatic conditions on microbial metabolic properties in red soil (In Chinese). *Soils*, 2011, 43(1):60—66
- [8] 秦红灵, 袁红朝, 张慧, 等. 红壤坡地利用方式对土壤细菌群落结构的影响. 土壤学报, 2011, 48(3):594—602. Qin H L, Yuan H Z, Zhang H, et al. Soil bacteria community structure in upland red soil in relation to land use pattern (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48(3):594—602
- [9] 袁红朝, 秦红灵, 刘守龙, 等. 长期施肥对红壤性水稻土细菌群落结构和数量的影响. 中国农业科学, 2011, (22):4610—4617. Yuan H Z, Qin H L, Liu S L, et al. Response of abundance and composition of the bacterial community to long-term fertilization in paddy soils(In Chinese). *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(22):4610—4617
- [10] 贺纪正, 袁超磊, 沈菊培, 等. 土壤宏基因组学研究方法与进展. 土壤学报, 2012, 49(1):155—164. He J Z, Yuan C L, Shen J P, et al. Methods for and progress in research on soil metagenomics (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2012,

- 49(1):165—174
- [11] Kettler T A, Doran J W, Gilbert T L. Simplified method for soil particle-size determination to accompany soil-quality analyses. *Soil Science Society of America Journal*, 2001, 65 (3): 849—852
- [12] Suzuki M T, Taylor L T, DeLong E F. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(11):4 605—4 614
- [13] 沈菊培, 张丽梅, 贺纪正. 几种农田土壤中古菌、泉古菌和细菌的数量分布特征. *应用生态学报*, 2011, 22(11):2 996—3 002. Shen J P, Zhang L M, He J Z. Abundance of archaea, crenarchaea and bacteria in selected agricultural soils of China (In Chinese). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(11):2 996—3 002
- [14] 454 Sequencing Technical Bulletin No. 013—2009. [2011-11-17] http://www.igsb.org/uploads/pdf/TCB-09013_Amplicon-FusionPrimerDesignGuidelines.pdf
- [15] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (23): 7 537—7 541
- [16] Pruesse E, Quast C, Knittel K, et al. SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(21):7 188—7 196
- [17] Sogin M L, Huse S M, Welch D M, et al. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(7):1 889—1 898
- [18] Cole J R, Wang Q, Cardenas E, et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37: D141—D145
- [19] Kemnitz D, Kolb S, Conrad R. Phenotypic characterization of Rice Cluster III archaea without prior isolation by applying quantitative polymerase chain reaction to an enrichment culture. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(4):553—565
- [20] White T, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. eds. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990:315—322
- [21] May L A, Smiley B, Schmidt M G. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Canadian Journal of Microbiology*, 2001, 47(9):829—841
- [22] Rotthauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12):4 704—4 712
- [23] Francis C A, Roberts K J, Beman J M, et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (41): 14 683—14 688
- [24] Throbäck I N, Enwall K, Jarvis Å, et al. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 49(3):401—417
- [25] Hallin S, Lindgren P-E. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(4):1 652—1 657
- [26] Kloos K, Mergel A, Rosch C, et al. Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria. *Australian Journal of Plant Physiology*, 2001, 28(9):991—998
- [27] Lane D. 16S/23S rRNA sequencing // Stackebrandt E, Goodfellow M. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: Wiley, 1991:133
- [28] Smit E, Leeflang P, Glandorf B, et al. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(6):2 614—2 621
- [29] Cao P, Zhang L-M, Shen J-P, et al. Distribution and diversity of archaeal communities in selected Chinese soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 80(1):146—158
- [30] Chemidlin Prévost-Bouré N, Christen R, Dequiedt S, et al. Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PLoS ONE*, 2011, 6(9):e24166
- [31] Grantina L, Seile E, Kenigvalde K, et al. The influence of the land use on abundance and diversity of soil fungi: Comparison of conventional and molecular methods of analysis. *Environmental and Experimental Biology*, 2011, 9:9—21
- [32] Zhang L M, Hu H W, Shen J P, et al. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. *ISME Journal*, 2011. doi:10.1038/ismej.2011.168
- [33] 王会利, 毕利东, 张斌. 退化红壤马尾松恢复林地土壤微生物生物量变化及其控制因素研究. *土壤学报*, 2008, 45(2): 313—320. Wang H L, Bi L D, Zhang B. Change in microbial biomass and its controlling factors in degraded soil after reforestation of *pinus massoniana* (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2008, 45(2):313—320
- [34] Will C, Thurmer A, Wollherr A, et al. Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(20):6 751—6 759
- [35] Rousk J, Baath E, Brookes P C, et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME Journal*, 2010, 4(10):1 340—1 351
- [36] LaMontagne M G, Schimel J P, Holden P A. Comparison of subsurface and surface soil bacterial communities in California grassland as assessed by terminal restriction fragment length polymorphisms of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Microbial Ecology*,

- 2003, 46(2):216—227
- [37] Lauber C L, Hamady M, Knight R, et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(15):5 111—5 120
- [38] Buée M, Reich M, Murat C, et al. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*, 2009, 184(2):449—456
- [39] Timonen S, Bomberg M. Archaea in dry soil environments. *Phytochemistry Reviews*, 2009, 8(3):505—518
- [40] Barns S M, Cain E C, Sommerville L, et al. Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(9):3 113—3 116
- [41] Jones R T, Robeson M S, Lauber C L, et al. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *ISME Journal*, 2009, 3(4):442—453
- [42] Hansel C M, Fendorf S, Jardine P M, et al. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(5):1 620—1 633
- [43] Douerelo I, Goulder R, Lillie M. Soil microbial community response to land-management and depth, related to the degradation of organic matter in English wetlands; Implications for the in situ preservation of archaeological remains. *Applied Soil Ecology*, 2010, 44(3):219—227
- [44] Gregoire P, Fardeau M L, Joseph M, et al. Isolation and characterization of *Thermanaerotherix daxensis* gen. nov., sp nov., a thermophilic anaerobic bacterium pertaining to the phylum “*Chloroflexi*”, isolated from a deep hot aquifer in the Aquitaine Basin. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34(7):494—497
- [45] Costello E K, Schmidt S K. Microbial diversity in alpine tundra wet meadow soil; novel Chloroflexi from a cold, water-saturated environment. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(8):1 471—1 486
- [46] White J R, Nagarajan N, Pop M. Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples. *PLoS Computational Biology*, 2009, 5(4):e1000352
- [47] Bates S T, Berg-Lyons D, Caporaso J G, et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME Journal*, 2011, 5(5):908—917
- [48] DeSantis T Z, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7):5 069—5 072

PYROSEQUENCING APPROACH TO STUDY MICROBIAL COMPOSITION IN A RED SOIL PROFILE

Yuan Chaolei^{1,2} He Jizheng¹ Shen Jupei¹ Dai Yu^{1,2} Zhang Limei^{1†}

(1 Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

(2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Abundances and community structure of archaea, bacteria and fungi in a red soil profile located at Xiangyin County, Hunan province, was investigated with the quantitative real-time PCR (qPCR) and 454 pyrosequencing approaches. Results showed that with increasing soil depth, soil clay increased in content, while organic matter, total nitrogen, and carbon to nitrogen ratio declined. Correspondingly, the numbers of gene copies per gram of dry soil also decreased within the range of $10^{7.09} \sim 10^{9.3}$ for archaeal 16S rDNA, $10^{8.10} \sim 10^{9.70}$ for bacterial 16S rDNA, $10^{6.54} \sim 10^{7.95}$ for fungal 18S rDNA, $10^{7.24} \sim 10^{8.61}$ for archaeal *amoA* gene, $10^{4.76} \sim 10^{6.25}$ for bacterial *amoA* gene, $10^{5.94} \sim 10^{7.88}$ for *nirK* gene, $10^{6.81} \sim 10^{9.21}$ for *nirS* gene, and $10^{7.03} \sim 10^{9.46}$ for *nosZ* gene. Pyrosequencing generated 6459 archaeal 16S rDNA sequences with an average length of 496 bp, 28626 bacterial 16S rDNA sequences with an average length of 448 bp, and 4683 fungal 18S rDNA sequences with an average size of 534 bp. OTU (97% similarity) analysis revealed that the α -diversity was in the order bacteria > fungi > archaea, but there was no significant correlation between microbial α -diversity and soil properties determined. Analysis of the Jaccard dissimilarity indicated that microbial communities in different layers of the same soil profile were closer, compared with the dissimilarity between three surface replicates. Mantel test showed that clay content was the main soil factor explaining the variation of microbial communities. In all the soil samples, archaea was dominated (89%) with Thermoprotei (belonging to Crenarchaeota), of which the distribution was significantly related to soil clay content. The bacterial community consisted mainly of Acidobacteria (33%), Proteobacteria (17%), Chloroflexi (12%), Bacteria incertae sedis (11%), Firmicutes (10%) and Actinobacteria (7%). Acidobac-

teria and Proteobacteria were found to be more abundant in the surface soils than in other soil layers, while the situations of Chloroflexi and Firmicutes were opposite. All fungal sequences belonged to three phyla, i. e., Ascomycota (87%), Basidiomycota (9%) and Glomeromycota (4%). This work demonstrated the great potential of pyrosequencing technique in revealing microbial diversity and presented background information of microbial communities in the red soil.

Key words Red soil; Pyrosequencing; Microbial diversity; Archaea; Bacteria; Fungi

(责任编辑:过 园)