

不同林型土壤微生物有机碳降解基因的多样性

张于光¹, 张小全^{1,*}, 刘学端², 肖 焱², Wu Liyou³

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林生态环境重点实验室, 北京 100091 ;

2. 湖南农业大学生物安全科技学院,长沙 410128 ;3. Environmental Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA 37831)

摘要 :应用寡聚核苷酸基因芯片 ,分析了米亚罗林区冷杉原始林 (M-Y)和 20 世纪 60 年代云杉人工林 (M-60)土壤微生物的功能基因多样性。该功能基因芯片含有与有机碳降解、碳固定、氮、磷、硫循环和金属抗性相关的 1961 个基因探针。在 M-Y 和 M-60 样地中分别检测到 39 和 62 个具有较强杂交信号 (SNR≥2)的功能基因 ,其基因多样性水平指数分别为 3.59 和 4.04 ,杂交信号强度总值分别为 480280 和 630560。M-Y 和 M-60 样地中分别检测到 32 个和 37 个有机碳降解基因 ,占总基因的 82% 和 60% ,这些基因分属于 22 个不同的基因类群 ,分别参与木质素、木聚糖、几丁质等有机碳的降解过程。有机碳降解基因在两个样地中存在较大的多样性和丰度差异。这些结果说明了大多数的土壤微生物直接参与了土壤有机碳的降解 ,同时 ,林型不同显著影响了土壤微生物群落结构和有机碳降解微生物的多样性。

关键词 :土壤有机碳 ;功能基因芯片 ;林型 ;基因多样性

文章编号 :1000-0933 (2007)04-1412-08 中图分类号 :Q143 文献标识码 :A

The soil microbial gene diversity for soil organic carbon degradation in different forest types

ZHANG Yu-Guang¹, ZHANG Xiao-Quan^{1,*}, LIU Xue-Duan², XIAO Ye², WU Li-You³

1 Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Forest Ecology and Environment of State Forestry Administration, Beijing 100091, China

2 College of Biosafety Science and Technology of Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

3 Environmental Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee 37831, USA

Acta Ecologica Sinica 2007 27 (4) 1412 ~ 1419.

Abstract :To increase our understanding of the impact of land use/cover changes on the diversity of soil microbial functional genes in microbial communities ,we analyzed soil samples of fir old growth forest (*Abies faxoniana*) and planted spruce forest (*Picea likiangensis* var. *balfourianan*) in 1960s following the harvest of the old growth forest samples were collected from the Miyaluo forest in a subalpine area of Western Sichuan and were analyzed using a functional gene microarray. This type of functional gene microarray contained 1961 probes complementary to gene orthologs from six functional groups :organic carbon decomposition ,carbon fixation ,metal resistance ,and nitrogen ,sulfur ,and phosphorous cycling. A total of 39 and 62 genes with statistically significant positive signals (SNR≥2) were observed in fir old growth forest and planted spruce forest in 1960s ,respectively. The gene diversity index (*H'*) was 3.59 and 4.04 and the observed sum signal intensity was 480280 and 630560 in fir old growth forest and planted spruce forest in 1960s ,respectively. There

基金项目 :国家自然科学基金资助项目 (No. 40271109)

收稿日期 :2006-03-16 ;修订日期 :2006-06-25

作者简介 :张于光 (1976 ~) ,男 ,湖南湘乡人 ,博士 ,主要从事土壤微生物分子生态学研究。E-mail :yugzhang@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail :xiaoquan@ forestry.ac.cn

Foundation item :The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 40271109)

Received date 2006-03-16 ;Accepted date 2006-06-25

Biography ZHANG Yu-Guang ,Ph. D. ,mainly engaged in soil microbial molecular ecology. E-mail :yugzhang@yahoo.com.cn

were 32 and 37 organic carbon decomposition genes that accounted for 82% and 60% of all observed genes in fir old growth forest and planted spruce forest in 1960s, respectively. These organic carbon decomposition genes belonged to 22 different orthologs that are involved in a variety of organic carbon decomposition process, such as decomposition of lignin, xylan, chitin. However, the individual gene orthologs associated with organic carbon decomposition and their abundance were diverse in these sites. For example, the benzoyl CoA reductase gene related to benzoate decomposition, originally found in *Azoarcus evansii*, was the most abundant in these sites. The putative 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase gene from *Ralstonia solanacearum* was only observed in spruce forest planted in 1960s and had highest abundance among all the detected genes. These results showed that most soil microbes may directly take part in the decomposition of soil organic carbon and differences in forest types can significantly affect the microbial community structure and the molecular diversity of organic carbon decomposition genes. Therefore, land use/cover changes may have a large influence on the soil microbial community structure and the microorganisms involved in organic carbon decomposition. This in turn likely affects the organic carbon cycle dynamics and the increase in atmospheric CO₂ concentration. In addition, the results also indicated that the developed microarray appeared to be useful for analyzing differences in functional microbial community structures.

Key Words : soil organic carbon ; functional microarray ; forest type ; gene diversity

土壤有机碳包括非腐殖质和腐殖质部分有机碳,非腐殖质有机碳包括碳水化合物和含氮化合物,腐殖质有机碳包括胡敏酸、富里酸和胡敏素^[1]。土壤是陆地生态系统中最大的有机碳库,土壤有机碳的动态是当前气候变化研究的热点问题^[2],土地利用/覆盖变化对土壤有机碳动态的影响是其中关键问题^[3]。目前,国内外研究者就土地利用/覆盖变化影响土壤有机碳的输入、输出、贮量、组分和残留等方面进行了大量研究^[1,4~8],但研究结论差异性还较大,而且研究中对效应的研究较多,对机理的研究较少。

土壤微生物是生态系统的重要组成部分,土壤微生物虽然只占总有机碳的1%~3%,但这一部分有机碳却影响着所有进入土壤有机质的转化,是土壤有机碳变化和周转的驱动力^[9]。因此,对土壤微生物的研究是了解土壤有机碳动态变化机理的关键。然而,土壤中仅有1%左右的微生物已人工培养,还有更多的微生物因为无法培养而尚未被人类所认识,所以对土壤微生物群落的定性、定量和种群功能多样性等的研究是微生物学家面临的严峻挑战。

基因芯片(Microarray)因有高密度、高灵敏度、快速检测、高通量、自动化和低背景水平等特点,为揭开土壤微生物这个“黑匣子”提供了可能,引起了微生物生态学家的极大兴趣。近几年来,基因芯片已经被成功应用于污染环境、海底沉积物等不同环境中特定微生物群落的研究^[10~16]。根据探针排列的类型,目前用于环境微生物研究的基因芯片主要分为3类:功能基因芯片(Functional Gene Arrays,FGAs)、系统发育寡核苷酸芯片(Phylogenetic Oligonucleotide Arrays,POAs)、群落基因组芯片(Community Genome Arrays,CGAs)^[17~19]。所谓功能基因芯片就是在芯片上含有编码各种与生态学和生物功能过程(如碳和氮的固定、硝化和反硝化作用等)或生物降解作用有关酶的基因^[18,19]。本研究试图应用含有有机碳降解基因等相关的微生物功能基因芯片,探讨土地利用/覆盖变化对土壤微生物群落结构和有机碳降解微生物多样性的影响,为揭示土地利用/覆盖变化对土壤有机碳的影响机理提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 研究地概况和样品采集

研究区位于四川省理县米亚罗林区(31°24'~31°55'N,102°35'~103°40'E),属于青藏高原东缘褶皱带最外缘部分。地形以石质山地为主,坡度多在35°以上,海拔高差悬殊,处于2200~5500m之间。气候受高原地形的决定性影响,属高山气候。年均温6~12℃,极端高温32℃,极端低温-16℃。≥10℃年积温为1200~1400℃,年蒸发量为1000~1900mm,常年无霜期200d,年降水量为600~1100mm,具有降水次数多,强度小的特点^[20]。20世纪50年代以来,该地区进行了大量的采伐和人工更新,形成了原始林、次生林、人工林和由原

始林开垦而来的农地等多样的土地利用类型。

本研究选择原始冷杉林 (*Abies faxoniana*) 和 20 世纪 60 年代原始林采伐后人工更新的云杉 (*Picea likiangensis var balfouriana*) 人工林土壤为研究对象。于 2005 年 8 月,在每种森林类型选择 5 ~ 10 个样点,分别垂直取 1 ~ 20 cm 深度的土壤,每个点取样量大体一致,去除石砾、根系和土壤动物等,均匀混合后取少量装入灭菌的封口聚乙烯袋,带回实验室 - 70℃ 保存备用。样地具体情况见表 1。

1.2 土壤 DNA 的提取和纯化

参照 Richard 等^[21]和张于光等^[22]的方法提取土壤微生物总 DNA。将粗提的 DNA 在 40 V 电压下 0.8% 琼脂糖电泳 12h,然后用试剂盒 (ABI, Canada)回收进行纯化。

1.3 寡聚核苷酸探针的设计

基因芯片上的探针包括与有机碳降解、碳的固定、氮、硫、磷循环和金属抗性有关的各类基因。用相关代谢的关键词从 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中搜索相关基因,下载搜索到的相关功能基因序列。应用引物设计软件 PRIMEGENS 的修订版本设计 50bp 寡核苷酸引物探针,具体设计方法参照 Rhee 等^[21]。

1.4 基因芯片的构建和处理

所设计的寡核苷酸探针由生物公司 (MWG Biotech, Inc., US) 合成,置于 96 孔样品盘内。芯片打印前,用 50% 二甲基亚砜将探针稀释至终浓度为 50 pmol·μl⁻¹,并转入 384 孔样品盘内。用 PixSystems 5500 自动芯片点样仪在相对湿度为 55% ~ 58% 的条件下,打印在 25mm × 75mm 的硅化玻片表面,样点间距离为 210 μm,每一玻片上打印 2 个探针阵列重复。将打印好的芯片用紫外交联仪进行紫外交联固定,然后用荧光标记对芯片质量进行检测。

1.5 目标 DNA 的 Cy3-dUTP 荧光标记

3 ~ 5 μg 的纯化 DNA 与 1.5 μg·μl⁻¹ 六聚体碱基随机引物混合 (25 μl),在 95℃ 下变性 2 min,迅速在冰上冷却。变性的 DNA 溶液与 15 μl 标记反应液混合,标记反应液的成分如下: 5 mmol·L⁻¹ dATP (dTTP 和 dGTP)、2.5 mmol·L⁻¹ dCTP、1.0 mmol·L⁻¹ Cy3-dUTP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N. J.), 80U Klenow 大片断 DNA 聚合酶 I (Invitrogen, C. A.)。反应混合物 (40 μl) 在 37℃ 下恒温反应 3 ~ 6 h,然后在 95℃ 变性 5min,迅速置于冰上冷却。随后将标记的 DNA 用 QIA quick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen, US) 进行纯化,纯化液于 43℃ 下在旋转加速真空中浓缩干燥。

1.6 基因芯片杂交和洗涤

所有基因芯片杂交均设 3 个重复。用适量的杂交液将标记的 DNA 重新溶解,30 μl 杂交液的成分如下: 50% 甲酰胺,3 × SSC,1 μg 未标记的青鱼精子 DNA 和 0.31% SDS。杂交液在 95℃ 下变性 5min,冷却并保持在 50℃,此前将待杂交的芯片和盖玻片预热到 50℃。先将杂交液加到盖玻片,然后以 DNA 阵列面朝下放到盖玻片上,将芯片翻转后置于防水的杂交盒内。为了保持杂交系统的湿度,在杂交盒两端的小孔中各加入 30 μl 3 × SSC。将杂交盒加盖密封后放入 50℃ 水浴箱杂交 12 h 以上。

从水浴箱中取出芯片后,尽快加入洗涤液中并使盖玻片尽快脱离芯片。洗涤过程如下: 洗涤液 1,1 × SSC 和 0.2% SDS,于 50℃ 下洗涤 5 min,洗涤液 2,0.1 × SSC 和 0.2% SDS,于室温下洗涤 10 min,洗涤液 3,0.1 × SSC,于室温下洗涤 1 min。最后通过离心去除洗涤液并干燥。

1.7 图像处理和数据分析

应用 GenePix 4100A (Axon Instruments Inc., C. A.) 芯片分析系统,在分辨率为 10 μm 下对芯片进行扫描。将扫描获得的图像存为 16 位 TIFF 文件,然后用芯片分析软件 GenePix Pro 5.0 (Axon Instruments Inc., C. A.) 对每一个杂交点的光素密度 (或强度) 进行分析。将每一荧光点所获得的平均荧光强度作为信号强度值,局部背景信号被自动地从每一个单独的荧光杂交信号中减去。根据下列公式计算信号干扰率 (Signal-to-Noise Ratio, SNR): $SNR = (\text{信号强度值} - \text{背景信号值}) / \text{背景标准偏差}$,将 $SNR \geq 2$ 定为信号强度可接受最小

阈值^[12, 14],并将小于最小阈值的杂交点从数据中去掉。

2 结果与分析

2.1 土壤有机碳和全氮的含量

样地土壤有机碳和全氮的含量分布情况见表 1。从表中可以看出,两类土地覆盖类型均含有丰富的有机质,但是,原始冷杉林的有机碳和全氮含量明显高于 20 世纪 60 年代云杉人工林。表明土地利用变化显著的影响了土壤有机碳和全氮的含量。

表 1 样地位置和土壤碳氮含量
Table 1 Soil locations and the contents of organic carbon and total nitrogen

土地类型 Land types	样品编号 No. sample	经纬度 Latitude , longitude	海拔 Altitude (m)	有机碳 Organic carbon (g/kg)	全氮 Total nitrogen (g/kg)	碳氮比 C/N ratio
原始冷杉林 Fir forest	M-Y	31°47'46" N , 102°41'53" E	3162	141.74	7.37	19.23
20 世纪 60 年代云杉人工林 Spruce forest planted in 1960s	M-60	31°47'46" N , 102°42'03" E	3233	58.05	4.96	11.70

2.2 探针设计

从所获得的 123 类功能基因序列共设计得到 1961 个 50 个碱基长度的寡聚核苷酸探针 (表 2)。

表 2 功能基因芯片上的探针情况
Table 2 Summary of gene probes designed in this functional gene microarray

功能基因群 Functional gene group	有机碳降解 Organic carbon degradation	碳的固定 Carbon fixation	磷循环 Phosphorous cycle	氮循环 Nitrogen cycle	硫循环 Sulfur cycle	抗金属 Metal resistance	总数 Totals
基因种类数 ^a No. genes ^a	99	4	4	13	2	1	123
探针数 ^b No. probes ^b	1145	131	81	319	204	81	1961

a 同一类基因只算一次,例如,不管 *nifH* 基因有多少个序列被用来设计探针,都只算一个基因 Orthologs of the same gene are only counted once. For example , the *nifH* gene is only listed as one gene regardless of how many times it 's represented by probes to different sequences b 每个探针是对一类基因中的一个序列互补 Each probe is complementary to one ortholog of a given gene sequence

2.3 基因多样性和基因分布

为了评价研究样地中的基因多样性水平,应用 Shannon-Weiner 指数计算了基因多样性。M-Y 和 M-60 的多样性指数分别为 3.59 和 4.04,表明两个样地均具有较高的多样性水平,但是 M-60 高于 M-Y。

在 M-Y 和 M-60 样地中分别得到 39 个和 62 个较强的探针杂交信号 ($SNR \geq 2$) (图 1),杂交信号强度的总值分别是 480280 和 630560。这些杂交信号在功能基因群中的分布见表 3。从表 3 可以看出,两个样地中所检测到的功能基因数明显不同,例如,检测到的有机碳降解基因在 M-Y 样地 (32 个)少于 M-60 样地 (37 个)。

2.4 有机碳降解基因的多样性

为了评价土地利用变化对有机碳降解功能微生物的影响,对检测到的有机碳降解基因种类和得到的信号强度进行了分析。在 M-Y 样地所获得的 39 个基因中,有机碳降解基因占了总基因的 82%,而 M-60 样地中的有机碳降解基因占总基因的比例为 60%,表明相当多的土壤微生物直接参与了土壤有机碳的降解。

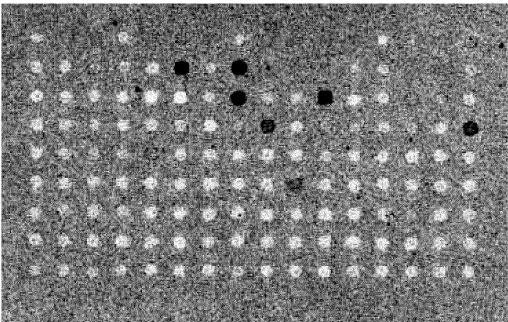


图 1 M-Y 样地与基因芯片的部分杂交结果
Fig.1 The partly hybridization results of site M-Y

表 3 检测到的功能基因数

Table 3 The detected gene number at each functional gene group						
样地 No. sample	有机碳降解 Organiccarbon degradation	功能基因数 Functional gene number				金属抗性 Metal resistance
		碳的固定 Carbon fixation	氮循环 Nitrogen cycling	硫循环 Sulfur cycling	磷循环 Phosphorous cycling	
M-Y	32	1	2	1	1	2
M-60	37	3	10	8	0	4

在两个样地中共检测到的 69 个有机碳降解基因分属于 22 个不同的基因类群 ,参与了有机碳降解的不同过程 ,包括木质素降解、木聚糖降解、几丁质降解等 (表 4)。其中有 14 个基因是两个样地均有的 ,在样地间信号强度都较高 ,例如苯甲酰辅酶 A 还原酶 (benzoyl CoA reductase)基因是两个样地所共有的 ,其信号强度比分别为 8.1% 和 6.8%。2 ,3-二氢-4 ,6-二烯脱氢酶 (2 β -dihydroxy-4 β -diene dehydrogenase)基因 ,儿茶酚双加氧酶 (catechol 1 ,2-dioxygenase)基因 ,木质素专一甲基化酶 (lignin specific demethylase)基因 ,几丁质酶 (chitinase)基因 (登陆号 AAL65191)等均在两个样地中具有较高丰度。而大多数基因仅在某一样地中检测到 ,且杂交信号强度也存在较大的差异 (表 4)。例如 ,几丁质酶 (chitinase)基因 (登陆号 BAA09629 , BAA88834) ,烷烃羟化酶 (alkane hydroxylase)基因等仅在 M-Y 样地中检测到。

表 4 检测到的功能基因情况和杂交信号强度比

Table 4 The detected functional genes and signal intensity ratios in tested soil samples				
登陆号 No. of accession	基因功能 Gene functional description	微生物来源 Original microorganism	信号强度比 ^a Signal Intensity ratio ^a	
			M-Y	M-60
CAA86927	homology to hydrolases	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	–	2.2%
BAA12807	large subunit of terminal dioxygenase	<i>Pseudomonas putida</i>	4.5%	4.1%
AAD03838	benzaldehyde dehydrogenase	<i>Sphingomonas chungbukensis</i>	2.9%	–
AAF63451	cis-diol dehydrogenase	<i>Pseudomonas putida</i>	–	2.0%
AAK00600	benzoyl-CoA oxygenase	<i>Azoarcus evansii</i>	1.9%	–
AAK58903	benzoate dioxygenase large subunit	<i>Rhodococcus</i> sp. 19070	–	1.1%
CAD21631	benzoyl CoA reductase subunit	<i>Azoarcus evansii</i>	8.1%	6.8%
BAA06873	2 β -dihydroxy-4 β -diene dehydrogenase	<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	4.0%	4.2%
BAA25606	biphenyl degradation hydroxylase	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	6.3%	4.0%
BAA25610	ferredoxin reductase	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	–	2.2%
BAA25617	biphenyl degradation hydroxylase	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	2.9%	2.4%
BAA98133	2 β -dihydroxybiphenyl 1 ,2-dioxygenase	<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	2.8%	2.3%
BAA98134	2 β -dihydroxybiphenyl 1 ,2-dioxygenase	<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	–	2.1%
CAA67941	catechol 1 ,2-dioxygenase	<i>Rhodococcus opacus</i>	4.6%	5.3%
AAC38243	protocatechuate dioxygenase beta subunit	<i>Rhodococcus opacus</i>	–	2.2%
AAC36352	lactone-specific esterase	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	–	2.2%
AAD05270	protocatechuate 3 ,4-dioxygenase alpha subunit	<i>Streptomyces</i> sp. 2065	2.7%	2.8%
AAD22035	beta-ketoadipyl-CoA thiolase	<i>Streptomyces</i> sp. 2065	3.0%	1.9%
AAD40813	3-oxoadipate CoA transferase beta subunit	<i>Streptomyces</i> sp. 2065	2.8%	–
BAB18934	2-hydroxy- 6-semialdehyde dehydrogenase	<i>Pseudomonas</i> sp.	–	2.5%
AAG42031	catechol 1 ,2 - dioxygenase	<i>Ralstonia eutropha</i>	3.1%	–
AAG42032	catechol 1 ,4 - dioxygenase	<i>Ralstonia eutropha</i>	3.0%	2.6%
AB075235	2-hydroxymuconic-semialdehyde dehydrogenase	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	–	2.1%
BAA09629	chitinase	<i>Aeromonas</i> sp. 10S-24	2.9%	–
BAA88834	chitinase	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	2.6%	–
AAL65191	chitinase	<i>uncultured bacterium</i>	2.6%	2.1%
CAA06974	cis-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase	<i>Ralstonia</i> sp.	–	1.7%
AAF16406	4-chlorobenzoyl CoA ligase	<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	2.8%	–

续表	登陆号 No. of accession	基因功能 Gene functional description	微生物来源 Original microorganism	信号强度比 ^a	
				Signal Intensity ratio ^a	
				M-Y	M-60
	BAB21466	cis-diol dehydrogenase	<i>Burkholderia</i> sp. NK8	–	2.1%
	BAC06603	beta subunit of dibenzofuran dioxygenase	<i>Terrabacter</i> sp. YK3	–	3.5%
	CAA11188	extradiol dioxygenase	<i>Sphingomonas</i> sp.	3.5%	–
	AAC37035	endo-14-beta-D-glucanase	<i>Clostridium longisporum</i>	–	2.0%
	AAC69757	endo-1 β -1 β -4-beta-D-glucanase	<i>Andropogoneae zea mays</i>	2.1%	–
	AAD01959	endoglucanase	<i>Pseudomonas</i> sp. YD-15	2.1%	–
	AAD47606	endoglucanase	<i>Methanococcus maripaludis</i>	–	1.9%
	CAB87569	Fluorene degradation hydroxylase	<i>Sphingomonas</i> sp. LB126	3.0%	2.8%
	CAA05039	4-Hydroxybenzoyl-CoA reductase beta-subunit	<i>Thauera aromatica</i>	2.6%	–
	AAB81312	3- (3-hydroxyphenyl) propionate hydroxylase	<i>Rhodococcus globerulus</i>	2.1%	–
	CAA72287	a-subunit oxygenase	<i>Pseudomonas</i> sp.	–	2.3%
	BAA36168	lignin specific demethylase	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2.8%	1.9%
	CAB93956	a-subunit oxygenase	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2.4%	–
	BAA84756	methane monooxygenase reductase component	<i>Methylomonas</i> sp. KSPIII	2.6%	–
	BAA23265	2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase	<i>Nocardioides</i> sp.	–	3.6%
	AAD12616	hydroxybenzylidenepyruvate hydratase-aldolase	<i>Ralstonia</i> sp. U2	2.7%	–
	NP049213	large subunit aromatic oxygenase	<i>Novosphingobium aromaticivoran</i>	–	1.6%
	NP518394	2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase	<i>Ralstonia solanacearum</i>	–	7.4%
	BAA87874	ferredoxin-like protein	<i>Comamonas testosteroni</i>	–	1.9%
	AAC71714	putative C-P lyase subunit HtxG	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2.9%	2.6%
	AAA25897	salicylate hydroxylase	<i>Pseudomonas putida</i>	2.3%	–
	AAK07408	toluene ortho-monooxygenase	<i>Burkholderia cepacia</i>	–	1.6%
	AJ293306	alkane hydroxylase	<i>Burkholderia cepacia</i>	2.3%	–
	CAA88762	endo-beta-14-xylanase	<i>Cellvibrio mixtus</i>	3.0%	–
	AAB87372	xylan-degrading enzymes	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	–	1.9%
	AAD32594	family 10 xylanase XynC	<i>Thermotoga</i> sp. strain FjSS3-B.1	–	2.2%
	AAG02558	glycosyl hydrolase CelJ	<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85	–	1.7%

a 指单个基因检测到的信号强度与该样地总信号强度的比值 The detected signal intensity of per gene divided the sum signal intensity of each site
– 没有检测到较强的杂交信号 (SNR < 2) Means no detected the positive signal intensity (SNR < 2)

3 讨论

基因芯片技术的一个主要优点是高通量平行分析 ,通过一次杂交即可同时监测一个群落中大量微生物种群的结构与动态^[7]。因此 ,基因芯片技术极大地方便了同时分析多个基因组 ,并为高通量实时分析微生物群落组成和功能提供了极大的便利。其次 ,在环境样品中许多功能基因具有高度的多样性 ,它们很难甚至不可能找到保守区段来设计 PCR 引物 ,因此 ,应用以 PCR 为基础的分子方法同时检测诸如有机碳降解的多个特异性微生物种群具有极大的困难 ,而以基因芯片为基础的方法则不需要这样的保守序列 ,因为许多来自不同种群的多样性基因可以放在一张芯片上作为探针监测相应的种群^[11]。

本研究中 ,应用含有有机碳降解、碳固定、氮、磷、硫循环等相关功能基因的芯片 ,分析了不同林型土壤中的微生物功能基因多样性。由于探针的设计是根据目前公共基因数据库中所有已知的序列信息而进行的 ,因此该芯片能很好的代表目前已知的有机碳降解基因的多样性。本研究结果表明 ,两个样地具有不同的微生物基因多样性 ,M-Y 样地低于 M-60 样地 ,M-Y 样地的杂交信号强度也明显低于 M-60 样地。已有的基因芯片研究表明 ,杂交信号强度与微生物群落基因组 DNA 和细胞总量均有良好的线性正相关性^[11 ,23] ,因此 ,M-60 样地中可能存在比 M-Y 样地中多样性和丰度更高的微生物群落结构。

同时发现 ,大多数地土壤微生物都直接参与了土壤有机碳的降解 ,包括腐殖质、胺类、木质素、葡聚糖、木聚糖、几丁质等有机碳的降解。结果检测到了 *Azoarcus evansii* 的苯甲酰辅酶 A 还原酶 (benzoyl CoA reductase)

基因在两个样地中都具有相对最高的丰度 ,表明苯甲酰辅酶 A 还原酶参与的胺类和腐殖质等的降解是土壤中的一个重要代谢活动 ,*Azoarcus evansii* 类微生物可能是土壤中有有机碳降解的重要活动者。同时 ,*Pseudomonas putida* 的大亚基末端双加氧酶 (large subunit of terminal dioxygenase)基因 ,*Rhodococcus* sp. RHA1 的 2 β -二氢-4 ,6 - 二烯脱氢酶 (2 β -dihydroxy-4 β -diene dehydrogenase)基因 ,*Rhodococcus erythropolis* 的联苯降解羟化酶 (biphenyl degradation hydroxylase)基因 ,*Sphingomonas paucimobilis* 的木质素专性甲基化酶 (lignin specific demethylase) ,*Sphingomonas* sp. LB126 的芴降解羟化酶 (fluorene degradation hydroxylase)基因等都在两个样地中具有较高的丰度 ,说明这些微生物类群在两类林地中可能都是有机碳降解的积极参与者。

样地之间的有机碳降解基因还具有明显不同的多样性和丰度。例如在 M-60 样地中检测到的木聚糖降解基因有 *Fibrobacter succinogenes* S85 的糖基水解酶 CelJ (glycosyl hydrolase CelJ)基因、*Thermotoga* sp. strain FjSS3-B.1 的木聚糖酶 XynC (family 10 xylanase XynC)基因和 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 的木聚糖降解酶 (xylan-degrading enzymes)基因 ,而 M-Y 样地中仅存在 *Cellvibrio mixtus* 的呋喃- β -1 ,4-木聚糖酶 (endo- β -1 ,4-xylanase)基因。表明 *Fibrobacter succinogenes*、*Thermotoga* sp. 和 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 三类微生物在 M-60 样地中可能积极的参与了土壤木聚糖的降解 ,而在 M-Y 样地中仅有 *Cellvibrio mixtus* 参与了木聚糖的降解。相反 ,在 M-Y 样地检测到了 3 个几丁质酶基因 ,而 M-60 样地中却只得到 1 个基因 ,且丰度也较低。这些结果表明 ,不同的样地参与有机碳降解的功能微生物种类和丰度均存在明显的差别。

土地覆盖变化直接改变了土壤植被的类型和生物量等因素 ,因而改变了进入土壤的生物的成分和数量等 ,进而可能引起土壤微生物群落结构的变化。本研究结果表明了不同土地覆盖具有不同的土壤微生物群落结构 ,还具有不同的土壤有机碳降解微生物的多样性和丰度。同时 ,土壤微生物群落结构的变化也可能是土地覆盖变化影响土壤有机碳动态的直接原因。

References :

[1] Wu J G , Xu D Y. The effect of land use changes on soil organic carbon. Beijing : China Forestry Press ,2004. 27 - 28.

[2] Watson R T , Noble I R , Trumbore S. Land use , land use change , and forestry : a special report of the IPCC. Cambridge : Cambridge University Press ,2000. 189 - 217.

[3] Houghton J T , Ding Y , Griggs D J , *et al.* Climate change 2001 : the scientific basis. Inter government panel on climate change. Cambridge : Cambridge University Press. 2001. 185 - 237.

[4] Jackson R B , Banner J L , Jobbagy E G , *et al.* Ecosystem carbon loss with woody plant invasion of grasslands. Nature ,2002 , 418 : 623 - 626.

[5] Six J , Contant R T , Paul E A , *et al.* Stabilization mechanisms of soil organic matter : implications for C-saturation of soils. Plant and Soil ,2002 , 241 : 155 - 176.

[6] Michelsen A , Andersson M , Jensen M , *et al.* Carbon stocks , soil respiration and microbial biomass in fire-prone tropical grassland , woodland and forest ecosystems. Soil Biololgy and Biochemistry ,2004 , 36 : 1707 - 1717.

[7] Wu T , Schoenau J J , Li F , *et al.* Influence of cultivation and fertilization on total organic carbon and carbon fractions in soils from the Loess Plateau of China. Soil & Tillage Research ,2004 , 77 : 59 - 68.

[8] Templer P H , Groffman P M , Flecker A S , *et al.* Land use change and soil nutrient transformations in the Los Haitises region of the Dominican Republic. Soil Biology and Biochemistry ,2005 , 37 : 215 - 225.

[9] Lavrie A T , Marry A A , Ruth D Y , *et al.* Forest floor microbial biomass across a northern hardwood successional sequence. Soil Biology and Biochemistry ,1998 , 31 : 431 - 439.

[10] Gaspar T O , Erin M G , Chris A F , *et al.* Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. Applied and Environmental Microbiology ,2003 , 69 (2) : 1159 - 1171.

[11] Rhee S K , Liu X D , Wu L Y , *et al.* Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays. Applied and Environmental Microbiology ,2004 , 70 (7) : 4303 - 4317.

[12] Loy A , Kirsten K , Lehner A , *et al.* Microarray and functional gene analyses of sulfate-reducing prokaryotes in low-sulfate , acidic fens reveal cooccurrence of recognized genera and novel lineages. Applied and Environmental Microbiology ,2004 , 70 (2) : 6998 - 7009.

[13] Tiquia S M , Wu L , Chong S C , *et al.* Evaluation of 50-mer oligonucleotide arrays for detecting microbial populations in environmental samples. Biology Techniques ,2004 , 36 : 664 - 675.

[14] Ingrid H F , Susanne H K , Heribert I. Design and application of an oligonucleotide microarray for the investigation of compost microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* ,2005 ,62 :37 – 56.

[15] Saleema S L , Michelle M , Rachel G C , *et al.* Microbial gene expression in soil :methods ,applications and challenges. *Journal of Microbiological Methods* ,2005 ,63 :1 – 19.

[16] Josh D N , William W M , Victor L. Composition of microbial communities in hexachlorocyclohexane (HCH) contaminated soils from Spain revealed with a habitat-specific microarray. *Environmental Microbiology* ,2006 ,8 (1) :126 – 140.

[17] Zhou J. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Current Opinion Microbiology* ,2003 ,6 :288 – 294.

[18] Zhou J Z , Thompson D K. Challenges in applying microarrays to environmental studies. *Current Opinion Microbiology* ,2002 ,13 :202 – 204.

[19] Zhang Y G , Li D Q , Xiao Q M , *et al.* Microarrays and their application to environmental microorganisms , *Acta Microbiologica Sinica* ,2004 ,44 (3) :406 – 410.

[20] Liu Q , Yun H J , Wu Y. A study on the structure of Picea Asperata community of Miyaluo subalpine in western Sichuan , China. *Journal of Mountain Science* ,2003 ,21 (6) 695 – 701.

[21] Richard A H , Qiu X , Wu L , *et al.* Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* ,2001 ,67 :4495 – 4503.

[22] Zhang Y G , Li D Q , Wang H M , *et al.* Extraction method of soil microbial DNA for molecular ecology study. *Chinese Journal of Applied Ecology* ,2005 ,16 (5) :956 – 960.

[23] Wu L Y , Thompson D K , Li G , *et al.* Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* ,2001 ,67 :5780 – 5790.

参考文献：

[1] 吴建国,徐德应. 土地利用变化对土壤有机碳的影响. 北京:中国林业出版社,2004. 27~28.

[19] 张于光,李迪强,肖启明,刘学端. 基因芯片及其在环境微生物研究中的应用. *微生物学报*,2004,44 (3):406~410.

[20] 刘庆,尹华军,吴彦. 川西米亚罗高山地区云杉林群落结构分析. *山地学报*,2003,21 (6):695~701.

[22] 张于光,李迪强,王慧敏,肖启明. 用于分子生态学研究的土壤微生物 DNA 提取方法. *应用生态学报*,2005,16 (5):956~960.