

绰墩山遗址古水稻土细菌与古菌群落的 PCR-DGGE 分析

申卫收^{1,2,3}, 尹 睿^{1,2}, 林先贵^{1,2,*}, 褚海燕^{1,2}, 胡正义¹, 曹志洪^{1,2}

(1. 中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210008;

2. 中国科学院南京土壤研究所-香港浸会大学土壤与环境联合开放实验室, 南京 210008; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:在江苏苏州绰墩山遗址考古发掘中,发现了在剖面不同深度埋藏的距今约 6280 a 的新石器时期灌溉古水稻田土层和距今约 3320 a 的商周时期的古水稻田土层。为了解古代水稻种植活动对土壤中细菌、古菌及产甲烷古菌群落多样性的影响,以土壤剖面 P-01 (包含 100 ~ 116 cm 新石器时期水稻土, 42 ~ 57 cm 商周时期水稻土, 0 ~ 15 cm 现代水稻土和 174 ~ 200 cm 土壤母质)为对象,利用细菌、古菌及产甲烷古菌群落 16S rDNA 的高可变区 V3 区的 PCR-DGGE 分析技术,研究了不同土层细菌、古菌及产甲烷古菌群落多样性。结果表明:利用 PCR-DGGE 技术成功获得了古水稻土细菌、古菌及产甲烷古菌群落的分子指纹图谱。现代水稻土、商周时期古水稻土和新石器时期古水稻土中细菌、古菌及产甲烷古菌群落的 DGGE 条带类型各不相同,并且 DGGE 条带类型都较母质层丰富多样。UPGAMA 聚类分析可以将不同时期水稻土及母质层的细菌、古菌及产甲烷古菌群落区分开来。埋藏古水稻土中仍有较多的细菌、古菌与产甲烷古菌存活。与母质层相比,不同时期水稻种植活动均增加了细菌、古菌与产甲烷古菌群落多样性。不同时期水稻种植活动可以引起特异性的细菌、古菌与产甲烷古菌群落发育,而且不同的栽培措施可能导致不同的优势种群。

关键词:古水稻土;新石器时代;DGGE;古菌;产甲烷古菌

文章编号:1000-0933(2008)06-2916-09 中图分类号:Q3496, Q938, S154.36 文献标识码:A

PCR-DGGE analyses of bacterial and archaeal community diversities in ancient paddy soils discovered in Chuodunshan Site, Suzhou, China

SHEN Wei-Shou^{1,2,3}, YIN Rui^{1,2}, LIN Xian-Gui^{1,2,*}, CHU Hai-Yan^{1,2}, HU Zheng-Yi^{1,2}, CAO Zhi-Hong^{1,2}

1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

2 Joint Open Laboratory of Soil and the Environment, Institute of Soil Science and Hong Kong Baptist University, Nanjing 210008, China

3 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(6): 2916 ~ 2924.

Abstract: Ancient irrigated paddy soils from the Neolithic age of 6280 a BP and Shang-Zhou Period of 3320 a were excavated at Chuodunshan in the Yangtze River Delta, close to Suzhou, Jiangsu Province of China. The objective of this study was to carry out a survey of the bacterial, archaeal and methanogenic archaeal community diversities in these soils under different rice farming practices. PCR-DGGE analyses of V3 regions of 16S rDNA gene fragments were employed to profile community diversities in different soil layers. These included Neolithic, Shangzhou and present day paddy soils collected between 100 – 116, 42 – 57, 0 – 15 cm's respectively from the soil surface. In addition parent material (174 –

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(40335047)

收稿日期:2007-03-23; 修订日期:2007-12-12

作者简介:申卫收(1979 ~),男,陕西杨凌人,博士生,主要从事环境与土壤微生物学研究。

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xglin@mail.issas.ac.cn

Foundation item: The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 40335047)

Received date: 2007-03-23; **Accepted date:** 2007-12-12

Biography: SHEN Wei-Shou, Ph. D. candidate, mainly engaged in environmental and soil microbiology.

200 cm) was also sampled. The results show that clear molecular finger-printings in ancient irrigated paddy soils were gained using PCR-DGGE. The DGGE band patterns differed between paddy soil types, and exhibited more diverse DGGE band patterns compared with the parent material. UPGAMA analyses concurred with the DGGE results and showed that bacterial, archaeal and methanogenic archaeal communities were separated from present paddy soil, Shang-Zhou paddy soil, Neolithic paddy soil, and parent material. Based on our findings we concluded that the buried ancient irrigated paddy soils still have a large number of bacteria, archaea and methanogenic archaea surviving. The rice farming practices increased diversity in present day, Shang-Zhou and Neolithic paddy soils compared with the parent material. The different rice farming practices might induce specific community development, and different rice farming practices probably led different predominant species in the irrigated paddy soils.

Key Words: ancient paddy soils; Neolithic age; DGGE; archaea; methanogenic archaea

水稻土属人为土。水稻栽培已经有非常悠久的历史,但关于古代水稻栽培技术及其与水稻土形成、发育和可持续利用的关系尚无研究。近年来在浙江、江苏、湖南等地相继发现了多处 7000 ~ 8000 年 BP 史前古代稻作遗址^[1,2],因此水稻栽培在我国至少可追溯到 7000 年 BP。2003 年底,对江苏苏州的埤墩山遗址进行考古发掘,在其马家浜文化层(地下 100 cm 左右)土层再次发现了十几块大小不等的田块,经过对从中出土的陶片、淘洗得到的炭化稻粒、土壤中植硅体含量、土壤有机碳¹⁴C 定年以及稻田灌溉系统,如水沟、出水口、蓄水池塘和水井、在田间和水沟中出土的灌溉用的陶罐和陶盆等的研究和考证,确定是距今约 6280 a 的古灌溉稻田^[3~5],是迄今发现的最早的灌溉稻田。史前古灌溉稻田土壤有机碳含量与该地区的现代水稻土有机碳含量相当,但比母质层土壤有机碳含量高 5 倍左右^[3]。史前古灌溉稻田土壤总磷及有效磷含量也高于现代水稻土^[4]。

美洲亚马逊河盆地 Terra Preta (葡萄牙文“黑沃土”之意)也属人为土,由史前古人类“刀耕火种(slash and char)”所形成^[6,7]。这种土壤养分丰富,有较厚的深色有机质层,土壤有机质含量较高^[8]。由于 Terra Preta 能够累积形态稳定的有机质而备受关注,从而为提高热带地区土壤肥力及增加碳的存储提供了可能途径^[9,10]。同时,土壤微生物在 Terra Preta 的形成以及促进植物生长中的作用也日益受到重视^[11]。Kim 等首次利用分子生物学方法研究了 Terra Preta 中细菌群落组成及结构,发现 Terra Preta 中细菌物种多样性比附近的原始森林土高 25%,其中的优势菌为 Acidobacteria^[12]。

土壤微生物在维持土壤功能方面至关重要,因为微生物参与了土壤中发生的重要过程,如土壤结构的形成、有机质的转化、有毒物质的降解以及 C、N、P、S 的循环。不仅如此,水稻田中温室气体 CH₄ 的产生主要与产甲烷古菌有关。然而,到目前为止大多数细菌、古菌与产甲烷古菌仍然无法进行分离和纯培养。利用分子生物学技术研究自然界微生物生态系统,发现了许多前所未有的种群,这些种群对整个生物圈具有不可忽视的影响^[13]。PCR-DGGE 是强大的分子生物学工具之一,Muyzer 等首先将 PCR-DGGE 用于研究土壤细菌群落结构^[14],目前该技术已经广泛用于土壤微生物生态学研究领域。

本研究利用 PCR-DGGE 技术,探讨水稻种植活动与埋藏古水稻土中存活的细菌、古菌与产甲烷古菌群落多样性的关系,一方面可以了解古代水稻种植活动对土壤微生物多样性的影响,另一方面也可以为水稻土的形成、发育和可持续利用提供微生物学依据。

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集与处理

采样地点在江苏苏州埤墩山遗址(北纬 31°24'07",东经 120°50'41"),采样时间为 2003 年 12 月。根据土壤质地和颜色判断,剖面 P-01 从表层到母质层可分为 12 个土层,其中含有 3 个时期的水稻土:0 ~ 15 cm 为现代水稻土表层,42 ~ 57 cm 为 3320 a 前的商周时期的古水稻土表层,100 ~ 116 cm 为 6280 a 前的新石器时代古水稻土表层,174 ~ 200 cm 为母质层。采集时使用无菌竹刀,将暴露于空气的表面土壤铲掉后,迅速采集土

壤并保存于无菌聚乙烯袋,一部分于 4℃ 下保存,另一部分在 -80℃ 下保存至分析。部分土层有机碳含量与 pH 值见表 1。

1.2 土壤样品总 DNA 的提取与纯化

采用 FastDNA® SPIN Kit for Soil 试剂盒和 FastPrep™ FP120 核酸提取仪(Bio 101, Carlsbad, CA, USA)提取和纯化土壤样品总 DNA,具体方法参见生产商使用说明。主要过程为称取 500 mg 新鲜土壤样品到含有陶瓷和硅土微粒的裂解管中,并加入 978 μl 磷酸钠缓冲液和 122 μl MT 缓冲液,将管子放入 FastPrep™ FP120 核酸提取仪,设置速度为 5.5 并运行 30 s,最后用硅胶柱过滤并洗脱总 DNA 进行纯化,提取的总 DNA 置于 -20℃ 保存。

表 1 古水稻土剖面 P-01 土壤有机碳含量与 pH 值

Table 1 Organic C contents and pH values in ancient paddy soils from the P-01

土层深度 Soil depth (cm)	0 ~ 15	15 ~ 22	22 ~ 38	38 ~ 42	42 ~ 57	57 ~ 75
有机碳含量 Organic C (g kg^{-1})	20.52	10.12	9.89	9.89	9.75	7.72
pH 值 pH value (H_2O)	5.77	6.51	6.50	6.50	6.07	5.89
土层深度 Soil depth (cm)	75 ~ 100	100 ~ 116	130 ~ 150	150 ~ 160	160 ~ 174	174 ~ 200
有机碳含量 Organic C (g kg^{-1})	13.40	22.31	19.68	17.20	10.70	4.00
pH 值 pH value (H_2O)	6.12	6.17	6.30	6.33	6.55	6.12

1.3 细菌全 16S rDNA PCR 扩增及其 V3 区嵌套式 PCR 扩增

首先使用正向引物 27f 与反向引物 1405r 扩增细菌全 16S rDNA 片段^[15]。然后以第一轮 PCR 产物为模板,利用正向引物 338fGC 和反向引物 534r 进行嵌套式 PCR 扩增^[14,16]。PCR 扩增使用 MyCycler™ Thermal Cycler 热循环仪(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)。使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.4 古菌 16S rDNA PCR 扩增及其嵌套式 PCR 扩增

先使用上游引物 Ar3f 与下游引物 Ar9r 进行扩增^[17~19]。再以其 PCR 产物为模板,使用上游引物 Saf 与下游引物 PARCH519r 进行嵌套式 PCR 扩增^[16,19]。在 50 μl PCR 反应体系中,加入 1.25 U TaKaRa Taq DNA 聚合酶, dNTP 0.2 mmol L^{-1} , 上游引物与下游引物 0.4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, MgCl_2 1.5 mmol L^{-1} , 5 μl 10 $\times$ PCR 缓冲液, 1、2、3 与 4 样品加入 0.3 μl 模板, 5、6、7、8、9、10、11 与 12 样品加入 1.2 μl 模板。反应参数在 Nicol 等^[19]基础上略有改动: 95℃ 5 min; 94℃ 30 s, 53.5℃ 30 s, 72℃ 1 min, 5 循环; 92℃ 30 s, 53.5℃ 30 s, 退火温度每循环降低 0.1℃, 72℃ 1 min, 30 循环; 72℃ 10 min。使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.5 产甲烷古菌 16S rDNA PCR 扩增及其嵌套式 PCR 扩增

首先使用正向引物 1Af 和反向引物 1100Ar 扩增产甲烷古菌 16S rDNA 片段^[20,21]。然后以第一轮 PCR 产物为模板,利用正向引物 Saf 和反向引物 PARCH519r 进行嵌套式 PCR 扩增^[16,19],反应体系及反应参数与古菌嵌套式 PCR 相同。使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.6 变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)

利用 DCode™ Universal Mutation Detection System 系统(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)进行变性梯度凝胶电泳。细菌 16S rDNA 嵌套式 PCR 产物 DGGE 条件:制备变性剂浓度 30% ~ 60% 线性梯度的 8% 聚丙烯酰胺凝胶(100% 的变性剂溶液包含体积分数为 40% 的甲酰胺与 7 mol L^{-1} 的尿素)^[22],在 60℃, 200 V 电压下持续电泳 5 h^[23],然后用 SYBR Gold(Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)染色 30 min^[24]。古菌 16S rDNA 嵌套式 PCR 产物 DGGE 条件:聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,变性剂梯度为 40% ~ 65%,在 60℃, 130 V 电压下持续电泳 10 ~ 11 h,然后用 EB 染色 30 min。产甲烷古菌 16S rDNA 嵌套式 PCR 产物 DGGE 条件:聚

丙烯酰胺凝胶浓度为 8%, 变性剂梯度为 35% ~ 60%^[19], 在 60℃, 130 V 电压下持续电泳 11 h, 然后用 SYBR Gold 染色 30 min。使用 Universal Hood II 凝胶成像系统 (Bio-Rad Laboratories, Segrate, Italy) 观察 DGGE 图谱, Quantity One® 1-D Analysis Software 软件 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 记录与分析。聚类分析采用未加权算术平均组对法 (Unweighted pair group with mathematical averages, UPGAMA)。

2 结果与分析

2.1 细菌全 16S rDNA PCR 及其 V3 区嵌套式 PCR 扩增产物的 DGGE

使用细菌通用引物 27f/1405r 扩增出古水稻土细菌全 16S rDNA 序列, 目标条带约 1.4 kb。然后使用细菌 V3 区引物 338fGC/534r 进行嵌套式 PCR, 扩增出古水稻土 16S rDNA V3 区序列, 目标条带为 237 bp, 条带特异性较好。细菌特异性 PCR-DGGE 图谱及其相似性树状图分别见图 1 和图 2。应用 Quantity One 软件共检测到 19 个条带类型。从图 1 可以看出, 现代水稻土 (1 泳道)、商周时期古水稻土 (4 泳道) 及新石器时代古水稻土 (7 泳道) 既有与其它土层共有的条带类型 (条带 d 和 q), 也有其它土层所没有的特异条带。现代水稻土具有 7 条特异性条带 (条带 a、g、i、k、o、p 和 r), 商周时期古水稻土具有 2 条特异性条带 (条带 c 和 s), 而史前古水稻土也具有 3 条特异性条带 (条带 b、e 和 j), 并且不同时期水稻土条带类型都比母质层 (11 泳道) 丰富, 分布也比较均匀。如果每种条带类型可以假定代表一个实用分类单位 (OTU), 即简单种^[25], 这些结果表明, 水稻种植可以引起特异性的细菌群落发育, 而且不同的栽培措施可能导致不同的优势种群。从图 2 可以看出, 如果根据相似性距离远近将图谱分为 4 簇, 则母质层 (9、10、11 泳道) 聚为一簇, 现代水稻土 (1 泳道) 单独成为一簇, 古水稻土过渡层 (8、3 泳道) 聚为一簇, 商周时期、新石器时代古水稻土及其过渡层 (5、4、2、7、6 泳道) 聚为一簇。

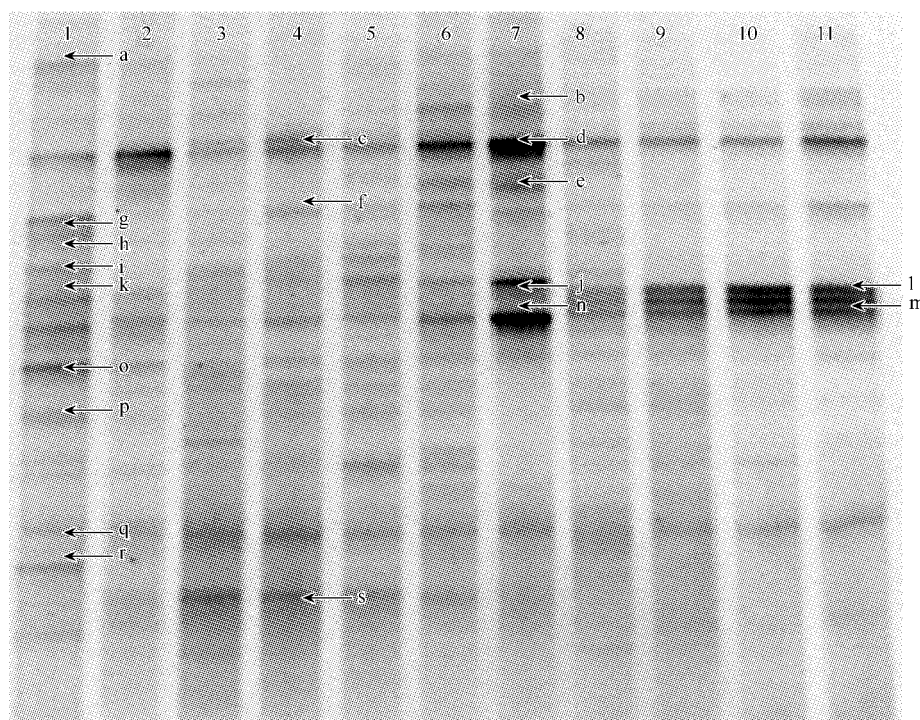


图 1 P-01 剖面古水稻土细菌 16S rDNA 的 V3 区片段 PCR-DGGE 图谱

Fig. 1 PCR-DGGE patterns of bacterial V3 region of 16S rDNA fragments retrieved from the ancient paddy soils of profile P-01

1 泳道, 0 ~ 15 cm 土; 2 泳道, 15 ~ 22 cm 土; 3 泳道, 22 ~ 38 cm 土; 4 泳道, 42 ~ 57 cm 土; 5 泳道, 57 ~ 75 cm 土; 6 泳道, 75 ~ 100 cm 土; 7 泳道, 100 ~ 116 cm 土; 8 泳道, 130 ~ 150 cm 土; 9 泳道, 150 ~ 160 cm 土; 10 泳道, 160 ~ 174 cm 土; 11 泳道, 174 ~ 200 cm 土 Lane 1, 0 - 15 cm soil; Lane 2, 15 - 22 cm soil; Lane 3, 22 - 38 cm soil; Lane 4, 42 - 57 cm soil; Lane 5, 57 - 75 cm soil; Lane 6, 75 - 100 cm soil; Lane 7, 100 - 116 cm soil; Lane 8, 130 - 150 cm soil; Lane 9, 150 - 160 cm soil; Lane 10, 160 - 174 cm soil; Lane 11, 174 - 200 cm soil

2.2 古菌 16S rDNA PCR 扩增及其嵌套式 PCR 扩增产物的 DGGE

使用古菌特异性引物 Ar3f/Ar9r 扩增出古水稻土古菌 16S rDNA 序列,目标条带约 900 bp。再使用引物 SAf/PARCH519r 进行嵌套式 PCR,扩增出古水稻土古菌 16S rDNA 片断,目标条带为 157 bp,条带特异性较好。古菌特异性 PCR-DGGE 图谱及其相似性树状图分别见图 3 和图 4。应用 Quantity One 软件共检测到 38 个条带类型。从图 3 可以看出,现代水稻土(1 泳道)、商周时期古水稻土(5 泳道)及新石器时代古水稻土(8 泳道)既有与其它土层共有的条带类型(条带 d、e、i、k 和 q),也有其它土层所没有的特异条带。现代水稻土具有 3 条特异性条带(条带 c、l 和 m),商周时期古水稻土具有 3 条特异性条带(条带 f、j 和 n),而史前古水稻土具有 6 条特异性条带(条带 a、b、g、h、o 和 p),并且不同时期水稻土条带类型都比母质层(12 泳道)丰富,分布也比较均匀。如果每种条带类型可以假定代表一个实用分类单位(OTU)或简单种,这些结果表明,水稻种植可以引起特异性的古菌群落发育,而且不同的栽培措施可能导致不同的优势种群。从图 4 可以看出,如果根据相似性距离远近将图谱分为 4 簇,则现代水稻土(1 泳道)单独成为一簇,现代水稻土与商周时期古水稻土的过渡层(2 泳道)也单独成为一簇,商周时期古水稻土及其过渡层(3、4、5、6 泳道)聚为一簇,史前古水稻土与母质层等(12、7、11、8、9 与 10 泳道)聚为一簇。尽管史

前古水稻土与母质层等聚为一簇,如果作进一步比较,可以发现史前古水稻土(8 泳道)与其下面的两个土层(9、10 泳道)相似性距离明显大于与母质层的相似性距离(12 泳道)。

2.3 产甲烷古菌 16S rDNA PCR 扩增及其嵌套式 PCR 扩增产物的 DGGE

使用产甲烷古菌特异性引物 1Af/1100Ar 扩增出古水稻土产甲烷古菌 16S rDNA 序列,目标条带约 1.1 kb。再使用引物 SAf/PARCH519r 进行嵌套式 PCR,扩增出古水稻土产甲烷古菌 16S rDNA 片断,目标条带为 157 bp,条带特异性较好。产甲烷古菌特异性 PCR-DGGE 图谱及其相似性树状图分别见图 5 和图 6。应用 Quantity One 软件共检测到 17 个条带类型。从图 3 可以看出,现代水稻土(1 泳道)、商周时期古水稻土(5 泳道)及新石器时代古水稻土(8 泳道)既有与其它土层共有的条带类型(条带 f 和 g),也有其它土层所没有的特异条带。现代水稻土具有 3 条特异性条带(条带 e、h 和 i),商周时期古水稻土具有 2 条特异性条带(条带 b 和 d),而史前古水稻土具有 2 条特异性条带(条带 a 和 c),并且不同时期水稻土条带类型都比母质层(12 泳道)丰富。如果每种条带类型可以假定代表一个实用分类单位(OTU)或简单种,这些结果表明,水稻种植可以引起特异性的产甲烷古菌群落发育,而且不同的栽培措施可能导致不同的优势种群。从图 6 可以看出,如果根据相似性距离远近将图谱分为 4 簇,则母质层(12 泳道)单独成为一簇,史前古水稻土及其过渡层(10、8、11 与 9 泳道)聚为一簇,商周时期古水稻土(5 泳道)也单独成为一簇,现代水稻土及其过渡层(7、3、2、1、6 及 4 泳道)等聚为一簇。

3 讨论

中国具有悠久的水稻种植历史,探讨水稻种植活动与埋藏古水稻土中存活的细菌、古菌与产甲烷古菌群

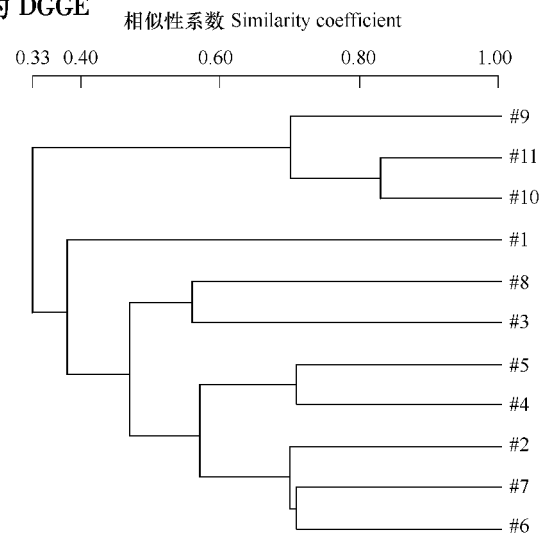


图 2 P-01 剖面古水稻土细菌特异性 PCR-DGGE 相似性树状图

Fig. 2 Dendrogram representing the similarity of bacterial specific PCR-DGGE profiles generated with soil DNA from the ancient paddy soils of profile P-01

#1, 0 ~ 15 cm 土; #2, 15 ~ 22 cm 土; #3, 22 ~ 38 cm 土; #4, 42 ~ 57 cm 土; #5, 57 ~ 75 cm 土; #6, 75 ~ 100 cm 土; #7, 100 ~ 116 cm 土; #8, 130 ~ 150 cm 土; #9, 150 ~ 160 cm 土; #10, 160 ~ 174 cm 土; #11, 174 ~ 200 cm 土 #1, 0—15 cm soil; #2, 15—22 cm soil; #3, 22—38 cm soil; #4, 42—57 cm soil; #5, 57—75 cm soil; #6, 75—100 cm soil; #7, 100—116 cm soil; #8, 130—150 cm soil; #9, 150—160 cm soil; #10, 160—174 cm soil; #11, 174—200 cm soil

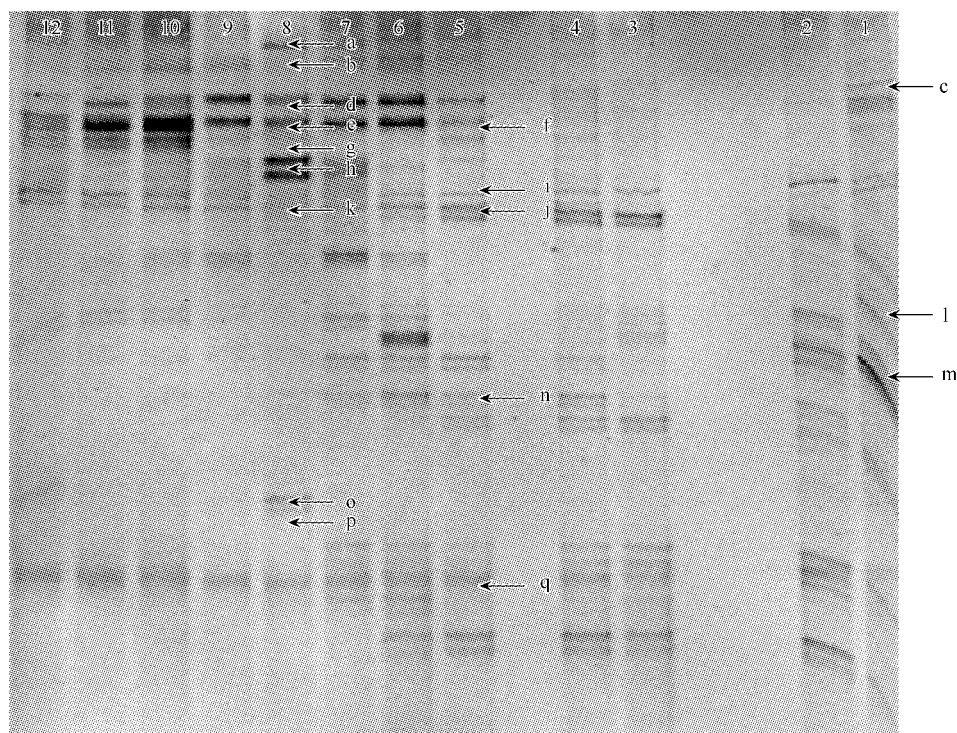


图3 P-01 剖面古水稻土古菌 16S rDNA 片段的 PCR-DGGE 图谱

Fig. 3 PCR-DGGE patterns of archaeal 16S rDNA fragments retrieved from the ancient paddy soils of profile P-01

图注见表 1 和图 1 See Table 1 and Fig. 1

落多样性的关系,一方面可以了解古代水稻种植活动对土壤微生物多样性的影响,另一方面也可以为水稻土的形成、发育和可持续利用提供微生物学依据。PCR-DGGE 是强大的分子生物学工具之一,目前该技术已经广泛用于土壤微生物生态学研究领域。但是由于在 PCR 扩增过程中会产生偏差和异源 DNA 双链,加之 DGGE 本身分辨率有限,因此应该谨慎地解释利用 PCR-DGGE 获得的结果^[26~29]。

以前的研究发现,新石器时期水稻土中仍有较多厌氧微生物存活,可达 7.0×10^5 CFU g^{-1} 干土,并且微生物代谢活性与功能多样性也高于母质层和同时期的土壤^[30]。另外,新石器时期水稻土产甲烷潜势也比商周水稻土和同时期的土壤高,但是明显低于现代水稻土^[30]。产甲烷古菌特异性 PCR-DGGE 结果显示,水稻土层都有区别于非水稻土层的产甲烷古菌群落,新石器时期、商周时期、现代水稻土也各有不同的优势产甲烷古菌群落^[30]。本研究则提供了进一步的证据:埋藏古水稻土中仍有较多的细菌、古菌与产甲烷古菌存活。与母质层相比,新石器时期、商周时期、现代水稻土都存在着丰富多样的独特的细菌、古菌与产甲烷古菌群落。不同时期水稻种植活动可以引起特异性的细菌、古菌与产甲烷古菌群落发育,而且不同的栽培措施导致了不同的优势种群。

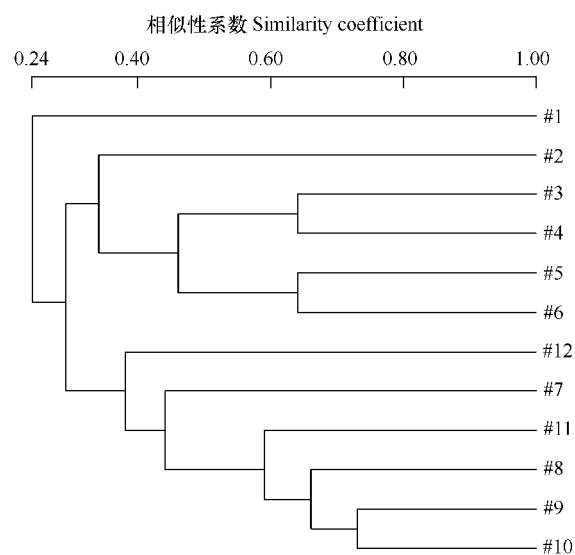


图4 P-01 剖面古水稻土古菌特异性 PCR-DGGE 相似性树状图

Fig. 4 Dendrogram representing the similarity of archaeal specific PCR-DGGE profiles generated with soil DNA from the ancient paddy soils of profile P-01

图注见表 1 和图 2 See Table 1 and Fig. 2

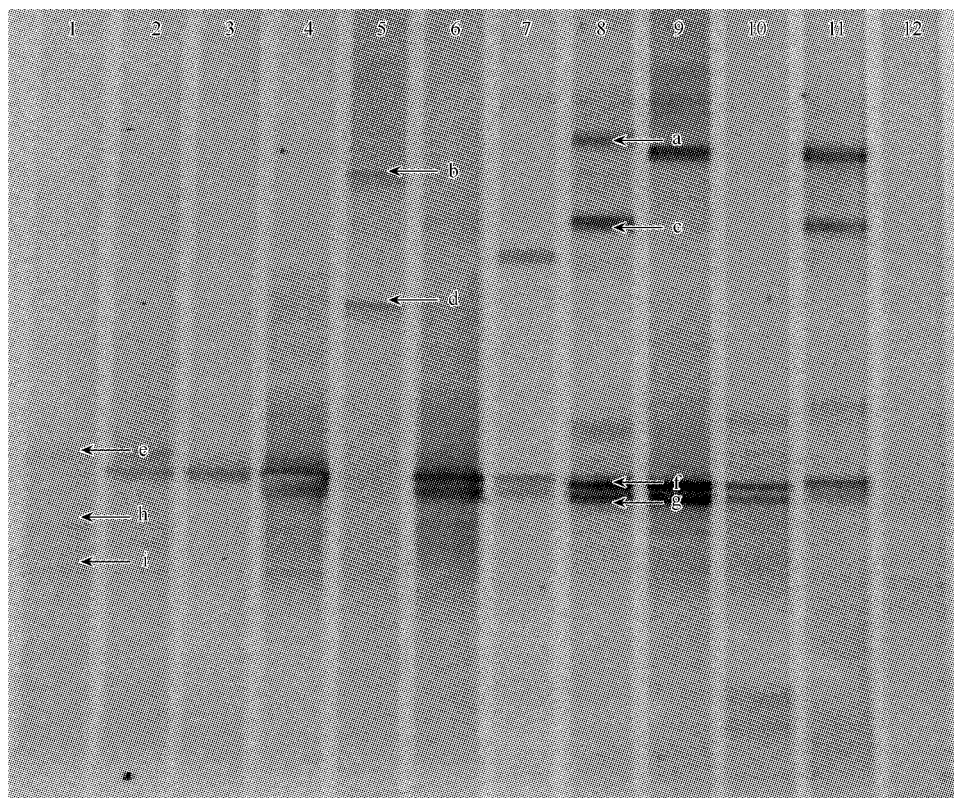


图5 P-01剖面古水稻土产甲烷古菌16S rDNA片段的PCR-DGGE图谱

Fig. 5 PCR-DGGE patterns of methanogenic archaeal 16S rDNA fragments retrieved from the ancient paddy soils of profile P-01

图注见表1和图1 See Table 1 and Fig. 1

随着耕作工具和栽培技术的发展和进步,以及逐步发明了沟渠池塘水井等灌溉技术,史前古人类便可以长期在同一地块种植水稻^[3]。淹水植稻和季节性的落于对稻田土壤加入了人为影响,以及大量秸秆焚烧和根系的残留,使得耕作层积累有大量有机物和养分^[3,4],创造了有利于微生物活动和多样性的土壤条件。史前古代人类的水稻种植活动增加了稻田土壤耕作层的有机质含量和养分的同时,也为微生物提供了良好的生境。我国长江三角洲新石器时期水稻土由史前古人类以“火耕水耨”方法种植水稻而形成^[3],美洲亚马逊河盆地古土壤 Terra Preta 也是由史前古人类“刀耕火种”所形成^[7]。这两类史前古土壤均含有较高的有机质,同时保持着较高水平的微生物多样性,其中 Terra Preta 中的优势菌为 *Acidobacteria*^[12]。由于商周水稻土埋藏较浅,受到现代人为活动的影响比较强烈,可能很难客观地反映商周时期水稻种植活动对土壤微生物多样性的影响。后续的研究需要对我国长江三角洲地区不同位置的古水稻土进行研究,并对土壤中的优势菌进行测序分析,从而获得更多的关于水稻种植活动对土壤微生物多样性的影响以及微生物在水稻土起源、形成和演化

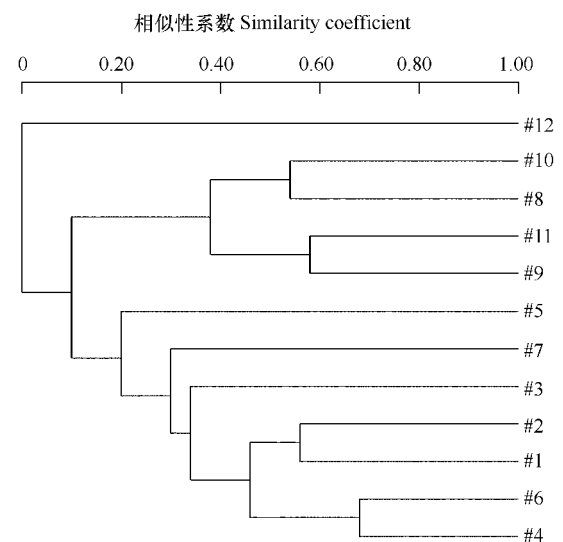


图6 P-01剖面古水稻土产甲烷古菌特异性PCR-DGGE相似性树状图

Fig. 6 Dendrogram representing the similarity of methanogenic archaeal specific PCR-DGGE profiles generated with soil DNA from the ancient paddy soils of profile P-01

图注见表1和图2 See Table 1 and Fig. 2

中的作用等信息。

References:

- [1] You X L. History of Rice Cultivation in China. Beijing: China Agricultural Press, 1995. 43 — 57, 209 — 215.
- [2] Ding J L. The neolithic rice field in the low region of Changjiang River and the origin of rice agriculture. Southeast Culture, 2004, 178(2): 19 — 23.
- [3] Cao Z H, J L Ding, Hu Z Y, *et al.* Ancient paddy soils from the Neolithic age in China's Yangtze River Delta. Naturwissenschaften, 2006, 93: 232 — 236.
- [4] Lu J, Hu Z Y, Cao Z H, *et al.* Characteristics of soil fertility of buried ancient paddy at Chuodun Site in Yangtze River Delta, China. Agricultural Sciences in China, 2006, 5(6): 441 — 450.
- [5] Li C H, Zhang G Y, Yang L Z, *et al.* Pollen evidence for ancient paddy fields at Chuodun Site. Acta Pedologica Sinica, 2006, 43(3): 452 — 460.
- [6] Mann C C. The real dirt on rain forest fertility. Science, 2002, 297: 920 — 923.
- [7] Glaser B. Prehistorically modified soils of central Amazonia: a model for sustainable agriculture in the twenty-first century. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2007, 362: 187 — 196.
- [8] Lima H N, Schaefer C E R, Mello J W V, *et al.* Pedogenesis and pre-Columbian land use of "Terra Preta Anthrosols" ("Indian black earth") of Western Amazonia. Geoderma, 2002, 110: 1 — 17.
- [9] Sombroek W G. Amazon Soils: A Reconnaissance of the Soils of the Brazilian Amazon Region. Centre for Agriculture Publications and Documentation, Wageningen, the Netherlands, 1966. 300.
- [10] Lehmann J, Kern D, Glaser B, *et al.* Amazonian Dark Earths: Origin, Properties, Management. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, 2003. 523.
- [11] Thies J, Suzuki K. Amazonian dark earths: biological measurements. In: Lehmann, J., D. C. Kern, B. Glaser, and W. Woods, eds. Amazonian Dark Earth; Origin, Properties, Management. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, 2003. 232 — 287.
- [12] Kim J S, Sparovek G, Longo R M, *et al.* Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. Soil Biology Biochemistry, 2007, 39: 684 — 690.
- [13] Pace N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science, 1997, 267: 734 — 740.
- [14] Muyzer G, Dewaal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695 — 700.
- [15] Heuer H, Krsek M, Baker P, *et al.* Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(8): 3233 — 3241.
- [16] vre s L, Forney L, Daae F L, *et al.* Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(9): 3367 — 3373.
- [17] Giovannoni S J, DeLong E F, Olsen G J, *et al.* Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial-cells. Journal of Bacteriology, 1988, 170: 720 — 726.
- [18] Jurgens G, Lindstrom K, Munster U. Novel group within the kingdom *Crenarchaeota* from boreal forest soil. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63: 803 — 805.
- [19] Nicol G W, Glover L A, Prosser J I. The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. Environmental Microbiology, 2003, 5(3): 152 — 162.
- [20] Embley T M, Finlay B J, Thomas R H, *et al.* The use of rRNA sequences and fluorescent probes to investigate the phylogenetic positions of the anaerobic ciliate *Metopus palaeformis* and its archaeobacterial endosymbiont. Journal of General Microbiology, 1992, 138: 1479 — 1487.
- [21] Nicol G W, Glover L A, Prosser J I. Molecular analysis of methanogenic archaeal communities in managed and natural upland pasture soils. Global Change Biology, 2003, 9: 1451 — 1457.
- [22] Watanabe K, Kodama Y, Harayama S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community

fingerprinting. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 44: 253 — 262.

- [23] Sigler W V, Miniaci C, Zeyer J. Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 57: 17 — 22.
- [24] Tuma R S, Beaudet M P, Jin X, *et al.* Characterization of SYBR Gold nucleic acid gel stain: A dye optimized for use with 300-nm ultraviolet transilluminators. *Analytical Biochemistry*, 1999, 268: 278 — 288.
- [25] Hughes J B, Hellmann J J, Ricketts T H, *et al.* Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(10): 4399 — 4406.
- [26] Reysenbach A L, Giver L J, Wickham G S, *et al.* Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58: 3417 — 3418.
- [27] Suzuki M T, Giovannoni S J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 625 — 630.
- [28] Gejman P V, Cao Q H, Guedj F, *et al.* The sensitivity of denaturing gradient gel electrophoresis: a blinded analysis. *Mutation Research Genomics*, 1998, 382: 109 — 114.
- [29] Kisand V, Wikner J. Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 54: 83 — 191.
- [30] Shen W S, Yin R, Lin X G, *et al.* Microbiological properties of an ancient paddy soil discovered in Chuodunshan Relics of Kunshan, China. *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(5): 814 — 820.

参考文献:

- [1] 游修龄. 中国稻作史. 北京: 中国农业出版社, 1995. 43 ~ 57, 209 ~ 215.
- [2] 丁金龙. 长江下游新石器时代水稻田与稻作农业的起源. *东南文化*, 2004, 178(2): 19 ~ 23.
- [5] 李春海, 章钢娅, 杨林章, 等. 绰墩遗址古水稻土孢粉学特征初步研究. *土壤学报*, 2006, 43(3): 452 ~ 460.
- [30] 申卫收, 尹睿, 林先贵, 等. 绰墩山遗址古水稻土的一些微生物学特性研究. *土壤学报*, 2006, 43(5): 814 ~ 820.