

## 西藏米拉山土壤古菌 16S rRNA 及 *amoA* 基因多样性分析

孟祥伟, 茆振川, 陈国华, 杨宇红, 谢丙炎\*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘要** 【目的】本研究旨在了解西藏米拉山高寒草甸土壤中古菌及氨氧化古菌群落结构组成情况。【方法】采用未培养技术直接从土壤中提取微生物总 DNA, 分别利用通用引物构建古菌 16S rRNA 基因和氨氧化古菌 *amoA* 基因克隆文库。利用 DOTUR 软件将古菌和氨氧化古菌序列按照相似性 97% 的标准分成若干个可操作分类单元(OTUs)。【结果】通过构建系统发育树, 表明古菌 16S rRNA 基因克隆文库包括泉古菌门和未分类的古菌两大类, 并且所有泉古菌均属于热变形菌纲。氨氧化古菌 *amoA* 基因克隆文库中序列均为泉古菌。古菌 16S rRNA 基因和古菌 *amoA* 基因克隆文库分别包括 64 个 OTUs 和 75 个 OTUs。【结论】西藏米拉山高寒草甸土壤中古菌多样性比较丰富, 表明古菌在高寒草甸土壤的氮循环中可能具有重要的作用。

**关键词:** 古菌; 16S rRNA 基因; *amoA* 基因; 系统发育分析

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)08-0994-09

古菌作为三域之一的生物<sup>[1]</sup>, 具有其独特的性质, 也是目前生物地球化学研究的热点之一。古菌多生活在地球的极端生境, 如热泉、盐碱湖、极地等<sup>[2-5]</sup>。近年来, 人们利用分子生物学方法, 发现古菌还广泛分布于土壤、淡水、海洋等自然环境中<sup>[6-13]</sup>, 甚至作为优势菌群存在, 古菌在全球的生物地球化学过程中的作用不可忽视。

氨氧化是全球氮循环的一个关键过程, 主要通过硝化作用完成, 硝化作用指的是微生物将氨转换成硝酸盐的过程, 其中氨氮氧化成亚硝酸盐是硝化作用的限制性步骤, 在此过程中直接起作用的酶即氨单加氧酶(ammonium monooxygenase, AMO), *amoA* 基因是编码氨单加氧酶活性位点多肽的基因<sup>[14-16]</sup>。近年来, 国内外学者已经利用 *amoA* 基因作为分子标记研究环境样品中氨氧化细菌的种群特征和系统发育状况。

长久以来, 科学家们普遍认为进行专门硝化作

用的细菌是土壤中在需氧条件下氧化氨的主要微生物<sup>[17]</sup>。Schleper 与合作者对 3 个气候带 12 种土壤类型中 *amoA* 的丰度进行了调查研究, 表明泉古菌才是土壤中居主导地位的氨氧化微生物<sup>[18]</sup>。随着越来越多的证据显示在自然界原核生物组成中占重要比例的泉古菌具有氨氧化能力, 这群独特的微生物迅速吸引了人们的目光, 成为一个新的研究热点。

西藏米拉山位于青藏高原, 是经漫长的地质历史变迁下形成的, 属于高原草甸土壤类型, 是青藏高原的典型土壤类型。在全球气候变暖的大背景下, 青藏高原的气温正呈现较大幅度的变暖趋势, 是全球气候变暖的敏感区, 青藏高原对全球气候变化的先兆性具有特殊的研究意义。因此, 通过研究西藏米拉山高寒草甸土壤中古菌及氨氧化古菌的多样性, 对了解氨氧化古菌在高寒草甸土壤氮循环中作用具有重要意义, 对开发利用高寒草甸土壤中丰富的微生物资源以及理解全球气候变化对古菌和氨氧

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2009CB119000); 公益性行业(农业)科研专项经费项目(NYHYZX07-050)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-82109545; E-mail: xiebingyan2003@yahoo.com.cn

作者简介: 孟祥伟(1981-), 女, 籍贯, 硕士研究生, 研究方向为土壤微生物分子生态。E-mail: xiaowei031@163.com

收稿日期: 2009-03-23; 修回日期: 2009-04-27

化古菌的多样性的影响提供参考依据,并为进一步研究我国高寒地区微生物生态系统提供了参考信息。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 土壤样品** 2007年5月采集于西藏米拉山3个不同海拔的土壤,采用正方形5点取样法,垂直取10 cm深度的土壤,每个点取样量大体一致,均匀混合后用装入灭菌的封口聚乙烯袋,土样通过10 mesh (2 mm)筛网,再充分拌匀,存放于-20℃冰箱。土壤 pH 5.2,有效 N 85.7 mg/kg,有效 P 10.9 mg/kg,有效 K 93.7 mg/kg,有机质 119.1 g/kg,全 P 1.2 g/kg,全 N 5.5 g/kg,全 K 25.6 g/kg。

**1.1.2 主要试剂和仪器** PCR 仪系 BIO-RAD 公司 PTC-200 型,离心机系 SIGMA 公司 3K15 型,紫外分光光度计系 BIO-RAD 公司仪器。

### 1.2 环境总 DNA 的提取及纯化

采用直接法提取土壤微生物的总 DNA。首先将土壤进行预处理<sup>[19]</sup>,将预处理的土样中加入液氮冻融处理3次,然后用土壤微生物总 DNA 提取用蛋白酶 K/SDS 法提取<sup>[20]</sup>,最后采用上海申能博采公司 DNA 纯化试剂盒对粗提 DNA 进行纯化。

### 1.3 PCR 扩增目的基因片段的反应条件

**1.3.1 PCR 扩增古菌 16S rRNA 基因的反应条件**:利用引物对 21 F:5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3' 和 958 R:5'-YCCGGCGTTGAMTCCAAT-3' 进行古菌 16S rRNA 基因的扩增<sup>[10]</sup>。PCR 扩增条件:95℃ 5 min;95℃ 45 s,60℃ 45 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 10 min。

**1.3.2 PCR 扩增氨氧化古菌 *amoA* 的反应条件**:利用引物对 Arch-*amoA*F:5'-STAATGGTCTGGCTTAGA-CG-3' 和 Arch-*amoA*R:5'-GCCGCCATCCATCTGTAT-GT-3' 进行氨氧化古菌 *amoA* 基因的扩增<sup>[21]</sup>。PCR 扩增条件:95℃ 5 min;95℃ 45 s;53℃ 45 s;72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 10 min。

**1.3.3 PCR 产物的纯化**:使用 DNA 纯化试剂盒进行 PCR 产物的纯化。

### 1.4 克隆文库的构建及阳性克隆的筛选

纯化后 PCR 产物通过连接试剂盒连接到 T4 载体,将连接好的载体转化入 TOP10 大肠杆菌感受态细胞。在涂有 X-gal 和 IPTG 的氨苄霉素的 LB 平板上进行蓝白斑筛选。随机挑取克隆,采用特异引物

T7 和 SP6 的 PCR 扩增进行插入片段的筛选。

### 1.5 克隆的测序

**1.5.1 古菌的 ARDRA 分型和测序**:将鉴定为阳性的古菌 PCR 产物进行核糖体 DNA 扩增片段限制性内切酶分析(Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA 分析),分别用 2 种限制性内切酶 *Hinf* I 和 *Hae* III 对 PCR 产物进行 37℃ 酶切 2 h,综合双酶切图谱,将阳性克隆分成若干个操作分类单元(OTU)统计 OTU 的种类和各 OTU 所含阳性克隆的数量<sup>[22]</sup>,将每一个 OTU 类型送 1~3 个进行测序分析,测序工作由北京诺赛生物技术公司完成。

**1.5.2 氨氧化古菌克隆文库的测序**:随机挑取 400 个氨氧化古菌阳性克隆进行测序,测序工作由北京诺赛生物技术公司完成。

### 1.6 系统发育树的构建

**1.6.1 古菌系统发育树的构建**:运用 CHECK\_CHIMERA 程序在 RDP(Ribosomal Database Project)在线数据库进行嵌合体检验,去除嵌合及怪异序列<sup>[23]</sup>。稀缺性曲线通过网络程序绘制<sup>[24]</sup>(<http://www.uga.edu/~strata/software/Software.html>)。运用 Blast 程序将获得的序列在 GenBank 数据库中进行相似性搜索。根据搜索结果并参照有关文献,选取参考序列。运用 PHYLIP 软件构建系统发育树。

**1.6.2 氨氧化酶基因系统发育树的构建**:将氨氧化古菌克隆文库中已测得的 400 条序列在 GenBank 数据库进行比对分析,由 Blastn 去掉同源性比对相同的结果,选取文库中 *amoA* 基因序列和已知环境样品进行分析,共同构建系统发育树。运用 PHYLIP 软件构建系统发育树。

## 2 结果和分析

### 2.1 环境总 DNA 的提取

直接法提取的 DNA 更能代表样品的微生物群落,能够比较全面地了解、鉴定土壤中微生物的多样性。但是提取 DNA 的同时也提取了其它有机土壤成分,比如腐质酸和褐菌酸等。本试验在直接法的基础上进行了预处理,预处理的缓冲液中含有 PVPP(聚乙烯吡咯烷酮)去除部分腐植酸类物质;还有 EDTA 以络合金属离子,有效抑制核酸酶的活性。采用预处理的方法得到的 DNA 粗提液比较纯净,经纯化以后可获得高质量的土壤微生物总的 DNA。通过直接法提取的 DNA 大小主要集中在 23 kb(图 1),适合进行后续反应。

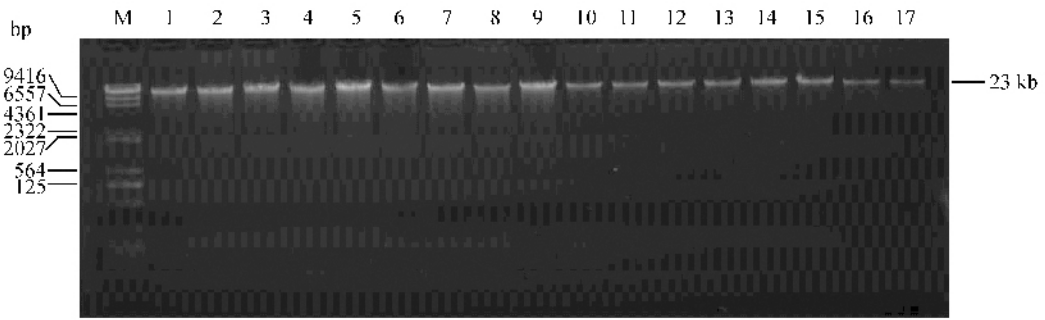


图 1 土壤微生物 DNA 的提取

Fig. 1 DNA extracted results from soil M :DNA Marker  $\lambda$  Hind III ; 1-17 : DNA extraction through pretreatment .

## 2.2 PCR 扩增古菌 16S rRNA 和 *amoA* 基因

采用 DNA 原液稀释的方法进行 DNA 样品的 PCR 扩增,浓度稀释倍数在 10 ~ 100 倍之间可以达到较理想的扩增效果。本试验将 DNA 原液稀释 50 倍以 10 份 DNA 样品为模板,扩增土壤古菌 16S rRNA 基因和氨氧化古菌 *amoA* 基因,每次 PCR 反应设置 3 次重复,将 30 次重复的 PCR 产物混合后利用 PCR 产物回收试剂盒回收。结果分别得到 900 bp 和 630 bp 大小的条带(图 2)。将 10 份 DNA 样品的 PCR 产物充分混合后分别连接在 pGEM-T 载体上用于构建古菌 16S rRNA 基因克隆文库和氨氧化古菌 *amoA* 基因克隆文库。

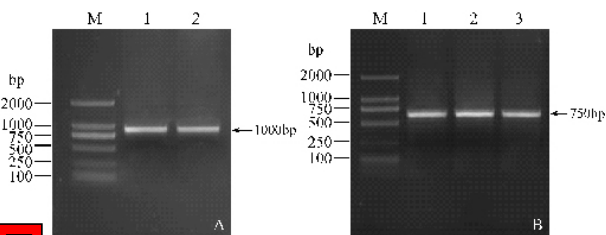


图 2 古菌基因的 PCR 扩增产物 A :16S rRNA ; B :古菌 *amoA*

Fig. 2 PCR amplification of total DNA with archaeal 16S rRNA universal primers (A) and PCR amplification of total DNA with archaeal *amoA* universal primers (B). M : DNA Marker DL2000 ; 1-2 of (A) : PCR amplification of archaeal 16S rRNA ; 1-3 of (B) : PCR amplification of archaeal *amoA* .

## 2.3 克隆文库的构建

### 2.3.1 古菌 16S rRNA 基因克隆文库的建立

随机挑选 792 个克隆,通过鉴定共有 760 个插入目的片段的克隆,阳性克隆率达到 95% 以上。通过 ARDNA 分析,共得到 81 个不同的 OTU 类型,通过 OTU 数目绘制稀缺性曲线(图 3),曲线最终趋于水平直线,表明挑取的克隆代表了文库中大多数古菌的类型。文库的 coverage $C^{[25]}$ 得到 94.8%。coverage C 理论上表示 16S rRNA 克隆文库中包含的微生物种类

(OTU)占样品中全部微生物种类的比例,它的计算公式如下(a)  $C = 1 - n1/N$ , N 代表 16S rRNA 克隆文库的库容, n1 代表在 16S rRNA 克隆文库中仅出现过一次的 OUT 数量。如果 coverage C 很高或者达到 100% ,即说明库容已经足够。

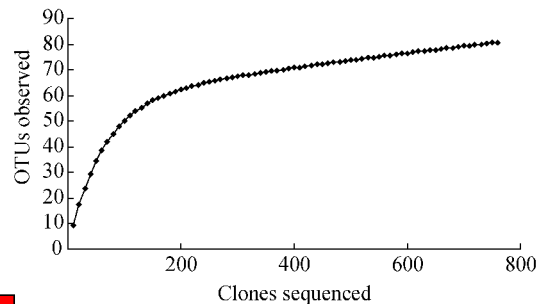


图 3 通过 ARDNA 分析,绘制的土壤古菌 16S rRNA 基因克隆文库的稀缺性曲线

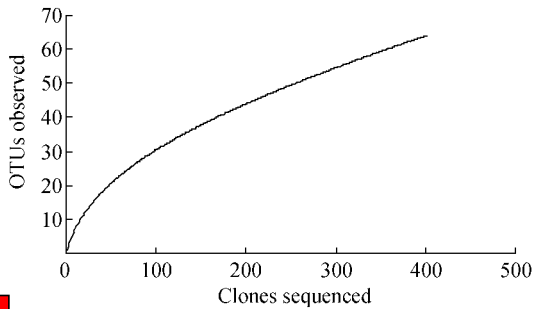
Fig. 3 Rarefaction curves generated for 16S rRNA genes in the clone library from samples collected in the Mila Mountains soil. Clones were grouped into phylotypes based on sequence similarity of  $\geq 97\%$  .

同时考虑到内切酶本身的局限性,增加了优势图谱类型的测序数量。为了尽可能的覆盖所有古菌类型,挑取了 410 个阳性克隆进行测序。运用 CHECK\_CHIMERA 程序在 RDP 在线数据库中对得到的序列进行嵌合体验证,并无明显的嵌合体情况出现。测序共得到 403 个古菌 16S rRNA 基因序列。

通过 DOTUR 软件分析,把序列相似性大于 97% 的定义为同一个 OTU $^{[26]}$ 。这样测定的 403 个古菌序列归属为 64 个 OTUs。其中有 36 个 OTU 只有 1 个克隆,其他的 28 个 OTU 类型有 2 个或者多个克隆,其中最多的 5 个 OTU 类型分别含有 68、64、43、39、13 个克隆子。利用 DOTUR 软件生成的数据再次绘制稀缺性曲线,分析表明这些克隆代表了文库中大多数古菌的多样性(图 5)。文库的 coverage $C^{[25]}$ 得到 91.1%。

古菌文库中部分克隆尚难确定其分类地位,可

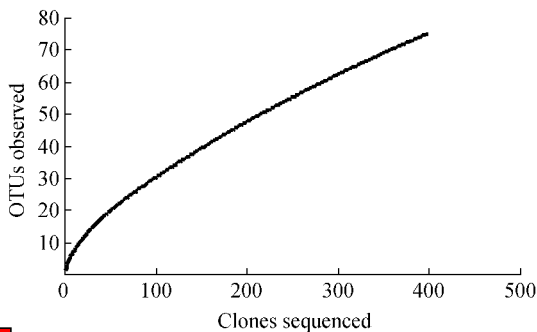
能代表新的属和种,这些序列已向 GenBank/EMBL/DDBJ 提交并得到序列号为 EU570077-EU570096, FJ753331-FJ753347。



4 通过 DOTER 软件分析生成的数据绘制的古菌 16S rRNA 基因克隆文库稀缺性曲线

Fig.4 Rarefaction curves generated for 16S rRNA genes in the clone library from samples collected in the Mila Mountains soil. OTUs were defined as groups of sequences differing by 3% at the DNA level.

2.3.2 古菌 *amoA* 基因克隆文库的建立:随机挑选 792 个克隆,通过鉴定共有 768 个插入目的片段的克隆,阳性克隆率达到 95% 以上。为了尽可能的覆盖所有氨氧化古菌类型,挑取了 410 个阳性克隆进行测序。运用 CHECK\_CHIMERA 程序在 RDP 在线数据库中对得到的序列进行嵌合体检验,并无明显的嵌合体情况出现。测序共得到 399 个古菌 *amoA* 基因序列。



5 通过 DOTER 软件分析生成的数据绘制古菌 *amoA* 基因克隆文库的稀缺性曲线

Fig.5 Rarefaction curves generated for *amoA* genes in the clone library from samples collected in the Mila Mountains soil. OTUs were defined as groups of sequences differing by 3% at the DNA level.

通过 DOTUR 软件分析,把序列相似性大于 97% 的定义为同一个 OTU<sup>[26]</sup>。这样测定的 399 个古菌 *amoA* 基因序列归属为 75 个 OTUs。其中有 48 个 OTU 只有 1 个克隆,其他的 27 个 OTU 有两个或者多个克隆,其中最多的 5 个 OTU 类型分别含有 70、58、48、32、22 个克隆子。利用 DOTUR 软件生成的数据再次绘制稀缺性曲线,分析表明:这些克隆代

表了文库中大多数古菌的多样性(图 5)。文库的 coverage<sup>[25]</sup>得到 88.0%。

氨氧化古菌文库中部分克隆尚难确定其分类地位,可能是代表新属和种的序列,这些序列已向 GenBank/EMBL/DDBJ 提交并得到序列号, FJ753348-FJ753370。

## 2.4 系统发育分析

2.4.1 古菌 16S rRNA 基因克隆文库系统发育分析:利用 DOUTR 软件分析测序得到的 403 个古菌 16S rRNA 基因序列,把序列相似性大于 97% 的定义为一个古菌序列<sup>[26]</sup>,得到 403 个序列可以代表 64 种不同类型的古菌。

通过构建西藏米拉山古菌 16S rRNA 基因系统发育树(图 6),古菌克隆文库包括 Crenarchaeota(嗜泉古菌界)和 unclassified\_Archaea(未分类的古菌),没有发现 Euryarchaeota(广域古菌界)。文库中 289 个克隆属于 Crenarchaeota(嗜泉古菌界),所占文库的比例为 71.7%。114 个克隆属于 unclassified\_Archaea(未分类的古菌)所占文库的比例为 28.3%。

从系统发育树来看,Cluster A、Cluster B、Cluster C、Cluster D 和 Cluster E 5 部分属于 Crenarchaeota(嗜泉古菌界),Cluster H 属于 unclassified\_Archaea 未分类的古菌。Cluster F 和 Cluster G 两部分的参考序列来自 NCBI 中已登录的从地中海和里海中获得的古菌序列。从系统发育树上看,地中海和里海序列聚集在同一个分支上,与西藏米拉山古菌序列位置相对较远。西藏米拉山所获得的大部分古菌序列与土壤环境中的古菌序列更为相似。

另外,所获得全部古菌序列在 RDP 在线数据库中进行比对,所有古菌序列都属于热变形菌纲(Thermoprotei),其中包括 4 个目,分别是除硫球菌目(Desulfurococcales)、硫化叶菌目(Sulfolobales)、暖球形菌目(Caldisphaerales)和热变形菌目(Thermoproteales),所占比例分别为 62.5%、16.5%、13.3% 和 7.7%。

2.4.2 古菌 *amoA* 基因克隆文库系统发育分析:利用 DOUTR 软件分析测序得到的 399 个古菌 *amoA* 基因序列,把序列相似性大于 97% 的定义为一个古菌序列<sup>[26]</sup>,得到 399 个序列可以代表 75 种不同类型的氨氧化古菌。选取文库中的代表序列与环境样品中的序列共同构建系统发育树(图 7)。这些环境样品中的序列来自陆地土壤、设施土壤、长期施肥处理的土壤、淡水、海洋、海底沉积物、湖泊、热泉以及黑海等。

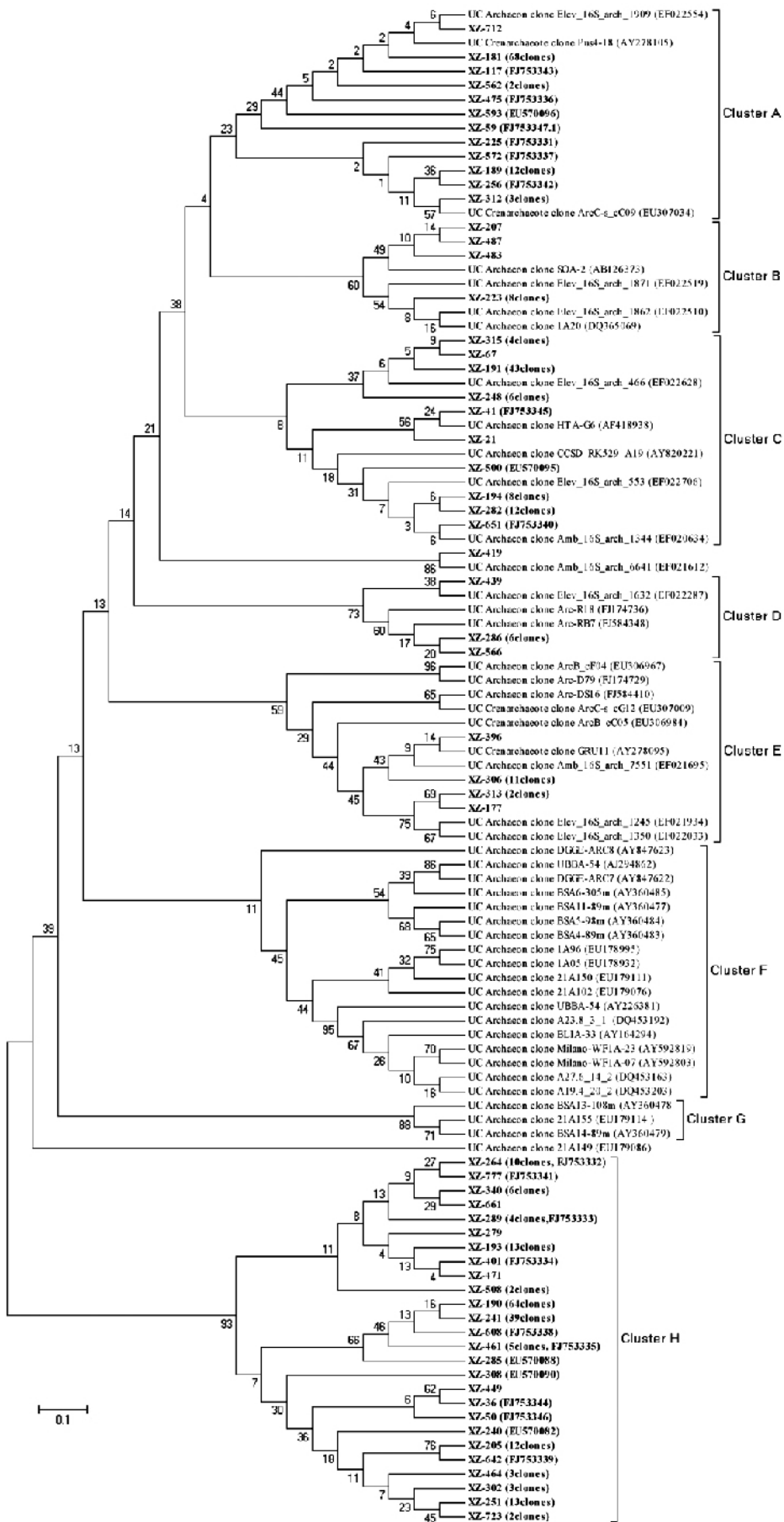


图 6 基于古菌 16S rRNA 基因片段序列构建的系统发育树



6 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequences of the clones obtained from Mila Mountains soil. The tree was constructed via the neighbor-joining method. Bootstrap values above 1000 are shown as percentage. Bar indicates 5% nucleotide changes per 16S rRNA position. "UC" represents uncultured. The sequences obtained from Mila Mountains soil are shown in bold.

从系统发育树来看,Cluster A 中,本试验获得的西藏米拉山古菌 *amoA* 基因序列与来自土壤、淡水、海底沉积物及设施土壤的古菌 *amoA* 基因序列聚集在一起。Cluster B 中,XA-343 与来自热泉的 BSB44-21 聚集在一起。XA-132 与来自红壤的 AOA-R1 距离较近。Cluster C 中,获得的序列与来自土壤中的序列聚集在同一分枝上。Cluster D 和 Cluster E 中,与来自土壤、海底沉积物中序列聚集在一起。Cluster F 中,这一分支处没有西藏米拉山古菌 *amoA* 基因序列,来自黑海中的序列聚集在一起。Cluster G 中,来自黑海的古菌 *amoA* 基因序列 100e2F6 与西藏米拉山古菌 *amoA* 基因序列聚集在一起。本试验获得的氨氧化古菌 *amoA* 基因序列与环境样品中土壤及海底沉积物中获得的序列同源性更高。

### 3 讨论

本研究采用 ARDRA 技术分析了西藏米拉山古菌 16S rRNA 基因多样性。通过 ARDRA 分型,得到 810 OTUs。进行测序后,利用 DOTUR 软件分析测序获得的古菌 16S rRNA 基因序列,把相似性大于 97% 的序列定义为一个 OTU,得到 64 个 OTU 类型。利用这两种方法得到的 OTU 数目不同,但利用这两种方法绘制稀缺性曲线分析,结果都表明这些克隆代表了文库中大多数古菌的类型,所构建的古菌 16S rRNA 基因克隆文库能够比较完整地反映土壤微生物的群落组成。利用这两种分析方法得到不同数量的 OTU 类型可能有两点原因:一方面,因为构建的库容较大,利用 ARDRA 分型后,观察酶切分型结果时存在误差,需要借助计算机才能更快更准确地完成 ARDRA 分型的工作,减少误差;另一方面,利用 DOTUR 软件分析序列时所规定的相似性(把相似性大于 97% 序列的归结为一个 OTU)标准也是影响这一结果的原因。

分析结果表明所获得的西藏米拉山古菌中 77.7% 属于 Crenarchaeota(泉古菌门),其余 28.3% 的序列属于 unclassified Archaea(未分类的古菌),说明泉古菌是西藏米拉山土壤古菌的优势菌群。所获得的氨氧化古菌都属于泉古菌门,这与 Leininger 等发表在 Nature 杂志上的结果所一致。Leininger 等对 3 种不同气候带的 12 种土壤类型的氨氧化古菌的

*amoA* 基因丰度进行了调查研究,发现这些来源广泛的土壤样品中,来自泉古菌的 *amoA* 基因拷贝数比来自细菌的高出达 3000 倍,土壤中高的泉古菌特异性脂质也佐证了土壤中源自泉古菌的 *amoA* 基因的高丰度,反转录定量 PCR 研究和互补 DNA 分析也说明了土壤中古菌的活性。此外,2006 年,Wuchter 等在美国科学院院刊上报道了他们在北海及北大西洋的研究结果,显示在这些海域中,古菌 *amoA* 基因的拷贝数是细菌的 10~1000 倍,且与泉古菌的细胞数量呈明显的正相关<sup>[27]</sup>。这些研究结果都提示着古菌在土壤中氮的生物地球化学循环中的具有重要作用,在西藏米拉山高原草甸土壤中的氮循环中同样具有重要作用。

微生物支撑着整个地球上的物质循环和生命的持续,其多样性被用于监视和预测环境变化,也是新基因资源的重要来源。本文获得的古菌中有一部分属于尚未分类的古菌,可能潜藏着新类型的古菌资源。

土壤样品来自西藏米拉山高寒草甸土壤,是青藏高原上典型的土壤类型。青藏高原有“世界屋脊”和“第三极”之称,是从 5000 年前的古地中海历经漫长的地质历史变迁下形成的。而古地中海,形成了现在的地中海、黑海和里海,因此本文选取了 NCBI 中已登录的来自地中海、黑海和里海的古菌 16S rRNA 基因序列和古菌 *amoA* 基因序列,分别与获得的西藏米拉山古菌 16S rRNA 基因序列和古菌 *amoA* 基因序列共同构建系统发育树,进行了对比分析。发现基于古菌 16S rRNA 基因的系统发育树中,地中海和黑海的古菌 16S rRNA 基因序列聚集在一起,而古菌主要和来自设施土壤中的一些序列聚集在一起,具有更高的相似性。古菌 *amoA* 基因的系统发育树中,仅有一个来自黑海的序列 100e2F6 与所获得序列聚集在一起。大部分所获得的古菌 *amoA* 基因序列与已知环境中的陆地土壤、温室土壤、长期施肥的土壤、海水、淡水、海洋沉积物中获得的一些序列具有很高同源性,其中,本试验获得的序列与来自陆地和海洋沉积物中的序列相似性更高。这提示着我们西藏米拉山的微生物生态系统是非常复杂的,可能与青藏高原的地质历史变迁形成过程有关,其古菌及氨氧化古菌来自不同环境的可能性比较大,







7 Phylogenetic tree of the archaeal *amoA* clones obtained from Mila Mountains soil. The tree was constructed via the neighbor-joining method. Bootstrap values above 1000 are shown as percentage. "UC" represents uncultured Crenarchaeote. The sequences obtained from Mila Mountains soil are shown in bold.

当然只根据所得到的序列不足以说明情况,还需要更多证据加以说明。古菌及氨氧化古菌与来自设施土壤中的古菌和氨氧化古菌具有很高的相似性,可能与西藏米拉山高寒草甸土壤的退化有一定的关系。

## 参考文献

- [ 1 ] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(12): 4576 - 4579.
- [ 2 ] Pearson, A, Huang, Z, Ingalls, AE, et al. Nonmarine crenarchaeol in Nevada hot springs. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(9): 5229 - 5237.
- [ 3 ] Bano, N, Ruffin, S, Ransom, B, et al. Phylogenetic composition of Arctic Ocean archaeal assemblages and comparison with Antarctic assemblages. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(2): 781 - 789.
- [ 4 ] Horikoshi, K, Grant, WD. Extremophiles: microbial life in extreme environments. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1998. 93 - 109.
- [ 5 ] Brown, MV, Bowman, JP. A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities (SIMCO). *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 35(3): 267 - 275.
- [ 6 ] Beja, O, Koonin, EV, Aravind, L, et al. Comparative genomic analysis of archaeal genotypic variants in a single population and in two different oceanic provinces. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(1): 335 - 345.
- [ 7 ] Stein, LY, Jones, G, Alexander, B, et al. Intriguing microbial diversity associated with metal-rich particles from a freshwater reservoir. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 42(3): 431 - 440.
- [ 8 ] Stein, LY, La Duc, MT, Grundl, TJ, et al. Bacterial and archaeal populations associated with freshwater ferromanganous micronodules and sediments. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(1): 10 - 18.
- [ 9 ] MacGregor, BJ, Moser, DP, Alm, EW, et al. Crenarchaeota in Lake Michigan sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(3): 1178 - 1181.
- [ 10 ] DeLong, EF. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(12): 5685 - 5689.
- [ 11 ] Ochsenreiter, T, Selezi, D, Quaiser, A, et al. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(9): 787 - 797.
- [ 12 ] Bintrim, SB, Donohue, TJ, Handelsman, J, et al. Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(1): 277 - 282.
- [ 13 ] Jurgens, G, Saano, A. Diversity of soil Archaea in boreal forest before, and after clear-cutting and prescribed burning 1. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29(2): 205 - 213.
- [ 14 ] Kowalchuk, GA, Stephen, JR. AMMONIA-OXIDIZING BACTERIA: A Model for Molecular Microbial Ecology. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55(1): 485 - 529.
- [ 15 ] McTavish, H, Fuchs, JA, Hooper, AB. Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(8): 2436 - 2444.
- [ 16 ] Klotz, MG, Alzerreca, J, Norton, JM. A gene encoding a membrane protein exists upstream of the *amoA/amoB* genes in ammonia oxidizing bacteria: a third member of the *amo* operon?. *FEMS microbiology letters*, 1997, 150(1): 65 - 73.
- [ 17 ] Prosser, JI, Martin Embley, T. Cultivation-based and molecular approaches to characterisation of terrestrial and aquatic nitrifiers. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, 81(1): 165 - 179.
- [ 18 ] Leininger, S, Urich, T, Schloter, M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, 442: 806 - 809.
- [ 19 ] 赵勇, 周志华, 李武, 等. 土壤微生物分子生态学研究 中总 DNA 的提取. 农业环境科学学报( *Journal of Agro-environment Science* ), 2005, 24(5): 854 - 860.
- [ 20 ] Zhou, J, Bruns, MA, Tiedje, JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 316 - 322.



- [ 21 ] Francis , CA , Roberts , KJ , Beman , JM , 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 ) : 14683 – 14688 .
- [ 22 ] Vaneechoutte , M , Rossau , R , Vos , P , et al. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis ( ARDRA ). *FEMS Microbiology Letters* , 1992 , 93( 3 ) : 227 – 233 .
- [ 23 ] Cole , JR , Chai , B , Marsh , TL , et al. The Ribosomal Database Project ( RDP- II ) : previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research* , 2003 , 31( 1 ) : 442 – 443 .
- [ 24 ] Schloss , PD , Handelsman , J. Toward a census of bacteria in soil. *Plos Computational Biology* , 2006 , 2( 7 ) : 786 – 793 .
- [ 25 ] Pielou , EC. Shannon 's formula as a measure of specific diversity : its use and misuse. *The American Naturalist* , 1966 : 463 – 465 .
- [ 26 ] Stackebrandt , E , Goebel , BM. Taxonomic note : a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 1994 , 44( 4 ) : 846 – 849 .
- [ 27 ] Wuchter , C , Abbas , B , Coolen , MJL , et al. Archaeal nitrification in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2006 , 103( 33 ) : 12317 – 12322 .

## Diversity of soil Archaea in Tibetan Mila Mountains

Xiangwei Meng , Zhenchuan Mao , Guohua Chen , Yuhong Yang , Bingyan Xie \*

( Institute of Vegetables and Flowers , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Beijing 100081 , China )

**Abstract [ Objective ]** In order to study the diversity of archaea and ammonia-oxidizing archaea ( AOA ) of the alp prairie soil in Mila Mountain of Tibet. **[ Methods ]** Total microbial DNA was directly extracted from the alp prairie of Mila Mountain. The clone library of 16S rRNA genes and amoA genes were amplified by PCR with universal primer sets. The sequences of archaea and AOA were defined into operational taxonomic units ( OTUs ) according to the 97% similarity threshold for OTU assignment was performed using the software program DOTUR. **[ Results ]** Phylogenetic analysis revealed archaea in the soil of Mila Mountain including the Crenarchaeota ( 71.7% ) and unclassified-Archaea ( 28.3% ) phyla. All the Crenarchaeota belong to the Thermoprotei. Phylogenetic analysis revealed AOA in the alp prairie soil of Mila Mountain belonged to the kingdom Crenarchaeota. Archaea and AOA species composition from Mila Mountain included 64 OTUs and 75 OTUs. **[ Conclusion ]** These findings show prolific archaeal diversity in the alp prairie soil of Mila Mountain , where they may be actively involved in nitrification.

**Keywords :** Archaea ; 16S rRNA gene ; amoA gene ; phylogenetic analysis

( 本文责编 : 张晓丽 , 谷志静 )