

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (12) :1397 – 1405; 4 December 2014
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.12.002

我国 8 个典型水稻土中产甲烷古菌群落组成的空间分异特征

俎千惠^{1,2}, 王保战¹, 郑燕^{1,2}, 贾仲君¹, 林先贵^{1*}, 冯有智^{1*}

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, 江苏 南京 210008

²中国科学院大学研究生院, 北京 100049

摘要: 【目的】产甲烷古菌主导稻田甲烷生成, 是稻田生态系统的模式微生物类群之一, 具有重要的生态学意义。然而, 水稻土产甲烷古菌群落组成的空间分异却鲜有报告。【方法】本研究沿 20.55° N 至 47.43° N 梯度, 采集了我国不同纬度上 8 个典型水稻土, 利用 PCR-DGGE 指纹图谱和系统发育树分析揭示不同地点水稻土中产甲烷古菌群落的组成; 结合多个环境因子, 利用生物信息学, 典范对应分析 (Canonical Correspondence Analysis, CCA) 和维恩图 (Venn diagram) 明确产甲烷古菌的空间分异规律。【结果】研究发现 pH 值是驱动水稻土中产甲烷古菌群落组成分异的主要因子; 此外, 沿纬度梯度, 8 个地区的产甲烷古菌群落组成也呈现出规律性变化。【结论】本研究首次阐明了稻田中产甲烷古菌群落分布情况, 并揭示其主要驱动因子。该认知不仅有助于我们更好地了解产甲烷古菌的生物地理学分布, 还有助于从微生物学机制上阐明我国温度梯度带上有机质转化空间的差异。

关键词: 水稻土, 产甲烷古菌, 群落组成空间分异, PCR-DGGE 指纹图谱, 典范对应分析

中图分类号: Q938 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 12-1397-09

水稻是世界上主要的粮食作物。全球水稻的耕种面积有 150 万 km², 其中 75% 处于淹水状态^[1]。稻田每年大约排放 25 – 54 Tg 的甲烷^[2], 占全球每年甲烷排放的 4% – 9%^[3]。产甲烷古菌是一类严格厌氧的微生物, 主导着稻田甲烷的生成, 是稻田生态系统的模式微生物类群之一, 具有重要的生态学意义。稻田淹水后大分子有机物在土壤中通过一系列的厌氧降解和转化, 变成 H₂/CO₂ 以及小分子有机酸如乙酸、甲酸等。其中, 部分物质会成为产甲烷古菌的底物, 进一步转化为 CH₄ 排放到大气中, 从而完成稻田碳素循环。此外, 产甲烷古菌还能敏感地响应全球气候变化。例如大气 CO₂ 浓度升高可

刺激水稻土中产甲烷古菌生长, 增加稻田甲烷排放^[4-5]; 全球增温也会通过提高土壤温度而增加稻田甲烷的排放^[6]。本课题组前期的工作发现, 近地层臭氧浓度升高可负面影响水稻土产甲烷古菌并抑制稻田甲烷的排放^[7]。

虽然水稻土中产甲烷古菌群落的生态学以及生态生理研究是当前科学热点, 但是其空间分异却鲜有报导。我国地域辽阔, 从南到北呈现明显的温度梯度带, 且土壤类型众多, 决定了我国土壤碳含量及其转化功能存在巨大的时空变异。例如, 我国东北土壤有机碳含量变幅较大, 而南部亚热带和热带土壤有机碳含量变幅较小^[8]; 相同施肥条件下, 土壤

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (41430859); 国家自然科学基金 (41271256); 土壤与农业可持续发展国家重点实验室优秀青年人才项目 (212000009)

* 通信作者。E-mail: yzfeng@issas.ac.cn, xglin@issas.ac.cn

作者简介: 俎千惠 (1989 –), 女, 河南洛阳人, 硕士研究生, 主要研究土壤微生物生态与功能。E-mail: qhzu@issas.ac.cn

收稿日期: 2014-04-09; **修回日期:** 2014-06-11

有机碳含量和碳储量^[9]、轻组有机碳含量等^[10]与气候因素密切相关,呈现沿纬度南低、北高的趋势。土壤有机质降解和转化由土壤微生物参与和驱动,因此在我国温度梯度带上,参与土壤有机质降解和转化的微生物群落结构和功能也必将存在分异。产甲烷古菌处于稻田生态系统碳循环的末端,任何影响碳循环过程的外界因素都会对产甲烷古菌的群落产生影响,因此我们推测水稻土产甲烷古菌群落组成会沿我国温度梯度带呈现空间分异。实际上,国内外已有不少研究间接表明水稻土中产甲烷古菌群落组成随环境因子变化呈现演替规律。例如, *Methanocellaceae* (Rice cluster I) 是水稻根际土中主要的活性产甲烷古菌^[11]。Conrad 等^[12]在海南岛(年平均温度 26°C)的水稻土中发现 *Methanocellaceae* (Rice cluster I) 在产甲烷古菌中的比例为 32.0%;我们前期研究利用高通量基因测序研究发现该类群在扬州(年平均温度 15°C)水稻土产甲烷古菌的比例为 13.0%^[7];而其在日本福冈(年平均温度 12°C)水稻土中的比例仅为 7.0%^[13]。湿地产甲烷古菌群落组成的空间分异规律^[14-16]暗示稻田产甲烷古菌的群落结构沿经纬度可能也存在空间变异。此外,以甲烷为唯一碳源的甲烷氧化菌呈现出来的地理学分布规律也暗示水稻土产甲烷古菌群落存在空间分异^[17]。

基于以上认知和前期工作的结果,本研究沿我国纬度梯度,采集了 8 种典型(广东雷州、江西鹰潭、湖南桃源、湖南古市、浙江嘉兴、江苏常熟、江苏扬州和黑龙江海伦)水稻土,利用 PCR-DGGE 指纹图谱和系统发育分析揭示不同地点水稻土中产甲烷古菌群落组成,结合环境因子,利用生物信息学,典范对应分析(Canonical Correspondence Analysis, CCA)和维恩图(Venn diagram)明确产甲烷古菌群落组成的空间分异规律。该认知不仅有助于我们更好地了解产甲烷古菌的生物地理学分布,还有助于从微生物学机制上阐明我国温度梯度带上有机质转化空间的差异。

1 材料和方法

1.1 供试土壤信息

选择我国不同经纬度的雷州、鹰潭、桃源、古市、嘉兴、常熟、扬州和海伦地区 8 个典型水稻土,如表 1 所示。每个地区水稻种植年限都超过 50 年。于

2011 年在各个地区水稻成熟期采集土壤样品,每个地区采样 3 处,每个采样点相隔 20 m。各个采样点随机取 6 个点 0-5 cm 的水稻土,去除其中的植物残体、根系和石头后充分混匀。用于分子实验的土壤样品于 -40°C 保藏,用于土壤理化性质测定的土壤样品经自然风干后过 20 目(0.90 mm 孔径)分样筛备用。

表 1. 八个地区水稻土地理信息

Table 1. The geographic information of each sample location

site	latitude	longitude	T/°C*
雷州(Leizhou)	20.55° N	110.07° E	23
鹰潭(Yingtán)	28.38° N	116.82° E	18
桃源(Taoyuan)	28.91° N	111.45° E	17
古市(Gushi)	28.95° N	111.85° E	17
嘉兴(Jiāxing)	30.63° N	120.77° E	16
常熟(Changshu)	31.93° N	120.71° E	17
扬州(Yangzhou)	32.58° N	119.70° E	15
海伦(Hailun)	47.43° N	126.63° E	4

* Annual mean atmosphere temperature.

1.2 土壤理化性质的测定

利用酸度计测定土壤的 pH 值(水土比 2.5:1);土壤的铵态氮、硝态氮、总氮含量分别利用靛酚蓝比色法、镀铜镉还原-重氮化偶合比色法和凯氏定氮法测定;土壤有机质含量采用 H₂SO₄-K₂Cr₂O₇ 氧化-容量法进行测定^[18];各样点年平均温度参考各地方气象台信息。

1.3 土壤总 DNA 提取

土壤总 DNA 采用 FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) 试剂盒和 Fast Prep™ FP120 核酸提取仪提取。步骤简述如下,称取 0.5 g 土壤样品,按照试剂盒说明书提取 DNA,将提取到的 DNA 溶解于 75 μL 的 ddH₂O,保存于 -20°C。

1.4 PCR-DGGE 指纹图谱分析

1.4.1 PCR 扩增:产甲烷古菌 16S rRNA 基因片段采用特异性引物 1106F-GC/1378R 进行扩增,引物序列为 1106F-GC (5'-CGCCCCCGCGCGGGCCGGCGGGCGGGGGCACGGGGGTTWAGTCAGGCAACGAGC-3'), 1378R (5'-TGTGCAAGGAGCAGGAC-3')^[19]。PCR 反应用试剂盒 Premix Taq® Version 2.0 Kit (TaKaRa), 50 μL 的 PCR 体系添加 50 ng 的 DNA 模板量。PCR 反应条件:94°C 3 min;94°C 45 s, 56°C 45 s, 72°C 90 s, 30 个循环;72°C 10 min。PCR 扩增产物在 1.2% (W/V) Tris-acetate-EDTA (TAE) 琼脂糖凝胶中电泳验证。PCR 产物保存于

4℃。

1.4.2 变性梯度凝胶电泳 (DGGE): 采用 BIO-RAD Dcode 系统 (Bio-Rad, CA, USA) 对产甲烷古菌 16S rRNA 基因片段 PCR 产物进行 DGGE 指纹图谱电泳。使用 8% 聚丙烯酰胺凝胶, 电泳缓冲液为 1 × TAE, 变性梯度 45% - 75%; PCR 产物上样量为 200 ng DNA; 电压 80 V, 60℃, 电泳 13 h; 用 SYBR Green I (Invitrogen) (1: 10000, V/V) 染色 30 min, 后用 Gel Doc™ EQ imager (Bio-Rad) 成像拍照^[19]。

将 DGGE 特征条带割胶, 放入含有 40 μL 去离子水的 1.5 mL 的离心管中, 置于 4℃ 冰箱过夜。以此溶液为模板, 再次使用产甲烷古菌引物 1106F-GC/1378R 对其进行扩增。PCR 扩增体系和反应条件如上。将扩增后的 PCR 产物进行 DGGE 验证, 以确定各个产甲烷古菌基因型的位置和纯度。如不符, 继续切带、扩增和验证。

1.5 克隆测序和构建系统发育树

将验证后产甲烷古菌 16S rRNA 基因片段 PCR 扩增产物连接到 pMD 18-T vector (TaKaRa), 并转化到 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞中, 在含有 X-gal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB 培养基上培养过夜。挑取具有氨苄青霉素抗性的白色转化子, 采用 T 载体通用引物 M13 进行菌落 PCR, 扩增产物经 1.2% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测是否为阳性克隆。将含有正确克隆子的细胞扩大液交由上海 Invitrogen 公司进行测序。将测序得到的序列在 National

Center for Biotechnology Information (NCBI) 网站上 BLAST 比对, 进行同源性检索。利用 Cluster W 软件对本实验获得的产甲烷古菌基因序列以及 NCBI 中亲缘性最高的基因序列进行多重序列比对, 根据 N-J (Neighbor-Joining) 法, 利用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树。

1.6 统计分析

运用 SPSS 13.0 进行统计分析, 并使用 Tukey 检验进行多重比较 ($P < 0.05$)。用 Quantity One 4.4.0 (Bio-Rad) 对产甲烷古菌 DGGE 指纹图谱进行数字化分析; 利用软件 Canoco for Windows (version 4.5) 进行产甲烷古菌群落组成成分和各个环境因子变化相关性的典范对应分析 (Canonical Correspondence Analysis, CCA); 依据 DGGE 各个泳道的条带数, 利用 R 软件包 (Version 2.12.1) 绘制不同地区水稻土中产甲烷古菌群落组成的维恩图。

2 实验结果

2.1 八个地区水稻土理化性质分析

8 个地区土壤样品的理化性质如表 2 所示: 扬州的 pH 最高, 而桃源地区的 pH 最低; 硝态氮和铵态氮的分布情况相同, 含量最高的地区是桃源和嘉兴, 而鹰潭的含量最低; 全氮和有机质的分布相似, 古市最高, 而最低值出现在海伦; 而在碳氮比方面, 海伦地区的比值最高, 嘉兴的碳氮比最低。

表 2. 八个地区水稻土化学特性

Table 2. The chemical information of each sample location

site	pH	NO ₃ ⁻ -N (μg/g d. w. s)	NH ₄ ⁺ -N (μg/g d. w. s)	total N (%)	c/(SOC) %	C/N
Leizhou (雷州)	6.53 ± 0.09b	2.88 ± 0.04f	17.02 ± 0.26f	0.12 ± 0.00f	2.31 ± 0.01g	18.86 ± 0.23b
Yingtian (鹰潭)	5.41 ± 0.01f	1.42 ± 0.20g	38.10 ± 3.96g	0.13 ± 0.00d	2.35 ± 0.01f	18.33 ± 0.18c
Taoyuan (桃源)	5.18 ± 0.11g	21.89 ± 0.14a	97.76 ± 0.40a	0.23 ± 0.00b	4.31 ± 0.04b	18.99 ± 0.30b
Gushi (古市)	5.63 ± 0.04e	7.77 ± 0.04e	114.88 ± 0.41e	0.26 ± 0.00a	4.80 ± 0.04a	18.33 ± 0.26c
Jiaying (嘉兴)	6.16 ± 0.10c	21.98 ± 0.35a	65.89 ± 0.83a	0.19 ± 0.00c	3.25 ± 0.02d	17.46 ± 0.12d
Changshu (常熟)	5.29 ± 0.02g	13.98 ± 0.14c	2.88 ± 0.14c	0.15 ± 0.00d	2.84 ± 0.01e	18.83 ± 0.09b
Yangzhou (扬州)	6.80 ± 0.04a	14.39 ± 0.19b	9.18 ± 0.42b	0.19 ± 0.00c	3.54 ± 0.02c	18.52 ± 0.36bc
Hailun (海伦)	5.97 ± 0.06d	11.42 ± 0.21d	4.17 ± 0.30d	0.11 ± 0.00g	2.19 ± 0.01h	20.66 ± 0.35a

Data presented as average ± standard deviation from three replicates. The appearance of the different letter means that there has significant difference in one column. ($P < 0.05$).

2.2 八个地区水稻土中产甲烷古菌群落组成的 DGGE 指纹图谱

PCR-DGGE 指纹图谱用于分析 8 个地区水稻土中产甲烷古菌群落组成的差异 (图 1)。通过比较各

个地区的条带数量和光密度值可以看出各地区的条带数量差异明显。其中, 嘉兴和扬州土壤中产甲烷古菌条带数量最丰富, 常熟次之, 海伦的条带数量最少。此外各个条带在不同地区的分布情况也不尽相

同,例如条带4被各个地区水稻土所共有;而很多条带只出现在一个地区或部分地区,比如条带13和22是雷州水稻土所特有,条带21是古市、嘉兴、常熟、扬州和海伦地区所共有。此外,部分条带还呈现

温度(纬度)规律性变化,例如条带16出现在中纬度的桃源、古市和常熟等地区;条带18出现在纬度较高的海伦、扬州和常熟等地区。

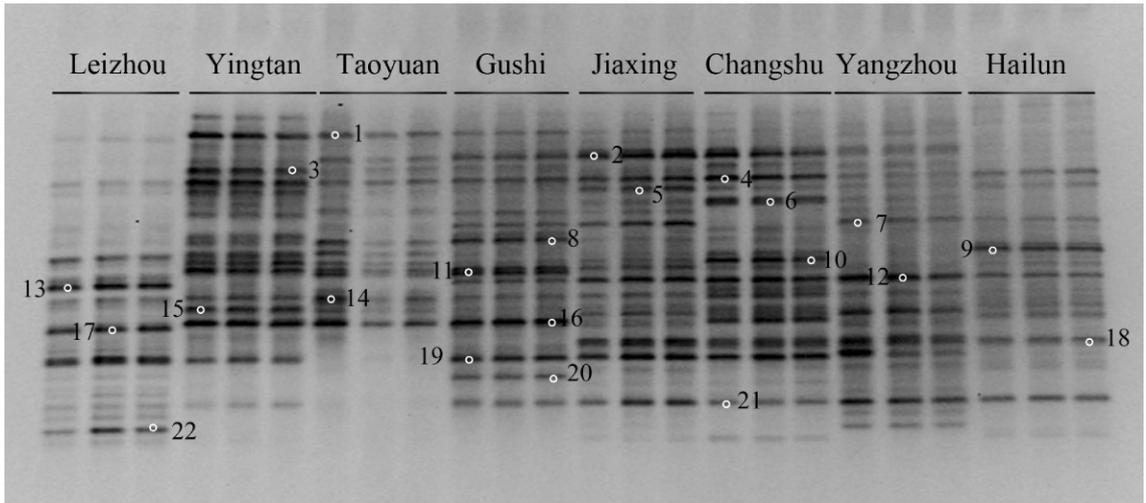


图 1. 产甲烷古菌 16S rRNA 基因片段的 DGGE 指纹图谱

Figure 1. DGGE fingerprinting profiles of methanogenic archaeal 16S rRNA gene fragments.

2.3 八个地区水稻土中产甲烷古菌群落多样性指数分析

根据 DGGE 指纹图谱,我们分别对 8 个地区水稻土中产甲烷古菌群落进行 Shannon 和 Richness 的多样性分析(图 2)。从图中可以看出,8 个样品的

Shannon 多样性指数存在差异,其中扬州和嘉兴地区的 Shannon 多样性最高,海伦地区最低;而各地区的 Richness 指数也呈现出相同的规律,即扬州和嘉兴地区的 Richness 值最高,海伦地区最低。Shannon 和 Richness 多样性指数和所有环境因子均无相关性。

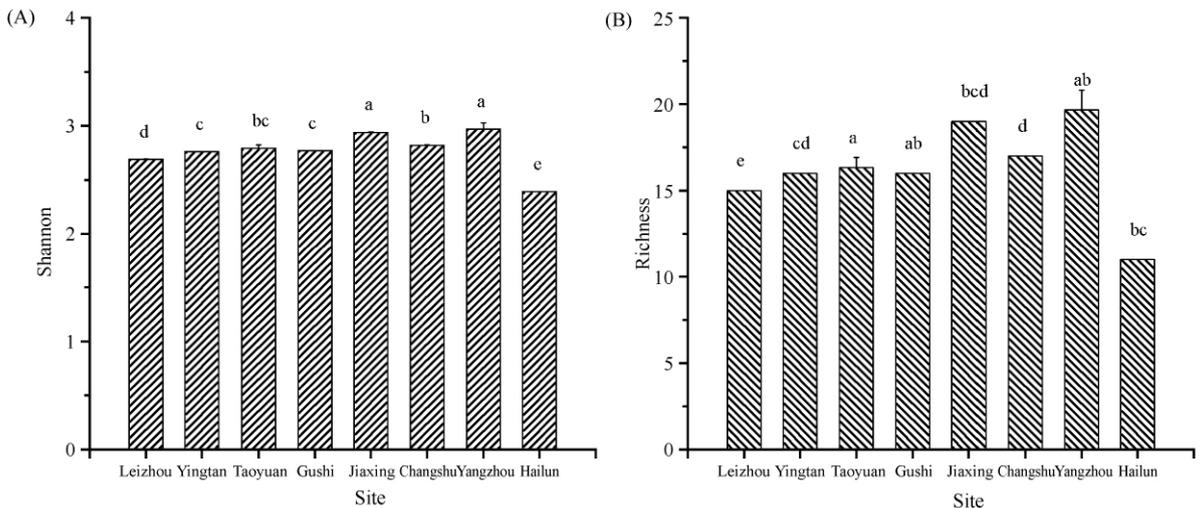


图 2. 产甲烷古菌 Shannon (A) 和 Richness (B) 多样性指数分析

Figure 2. Methanogenic archaeal Shannon (A) and Richness (B) diversity indices.

2.4 产甲烷古菌系统发育分析

系统发育分析(图 3)显示 8 个地区水稻土中产甲烷古菌主要隶属于乙酸营养型的

Methanosarcinaceae 和 Methanosaetaceae 2 个科中,以及 H_2/CO_2 利用型的 Methanoregulaceae, Methanocellaceae 和 Methanobacteriaceae 3 个科中。

其中, DGGE 图谱中 8 个地区所共有的条带 4 与 Methanocellaceae 的亲缘性最高, 而古市、嘉兴、常熟、扬州和海伦地区所共有的条带 21 隶属于 Methanoregulaceae。此外, 雷州地区所特有的条带

13 和 22 则分别属于 Methanoregulaceae 和 Methanosaetaceae。而 DGGE 指纹图谱中出现在低纬度地区的条带 10 隶属于 Methanosaetaceae, 出现在中纬度地区的条带 16 隶属于 Methanocellaceae。

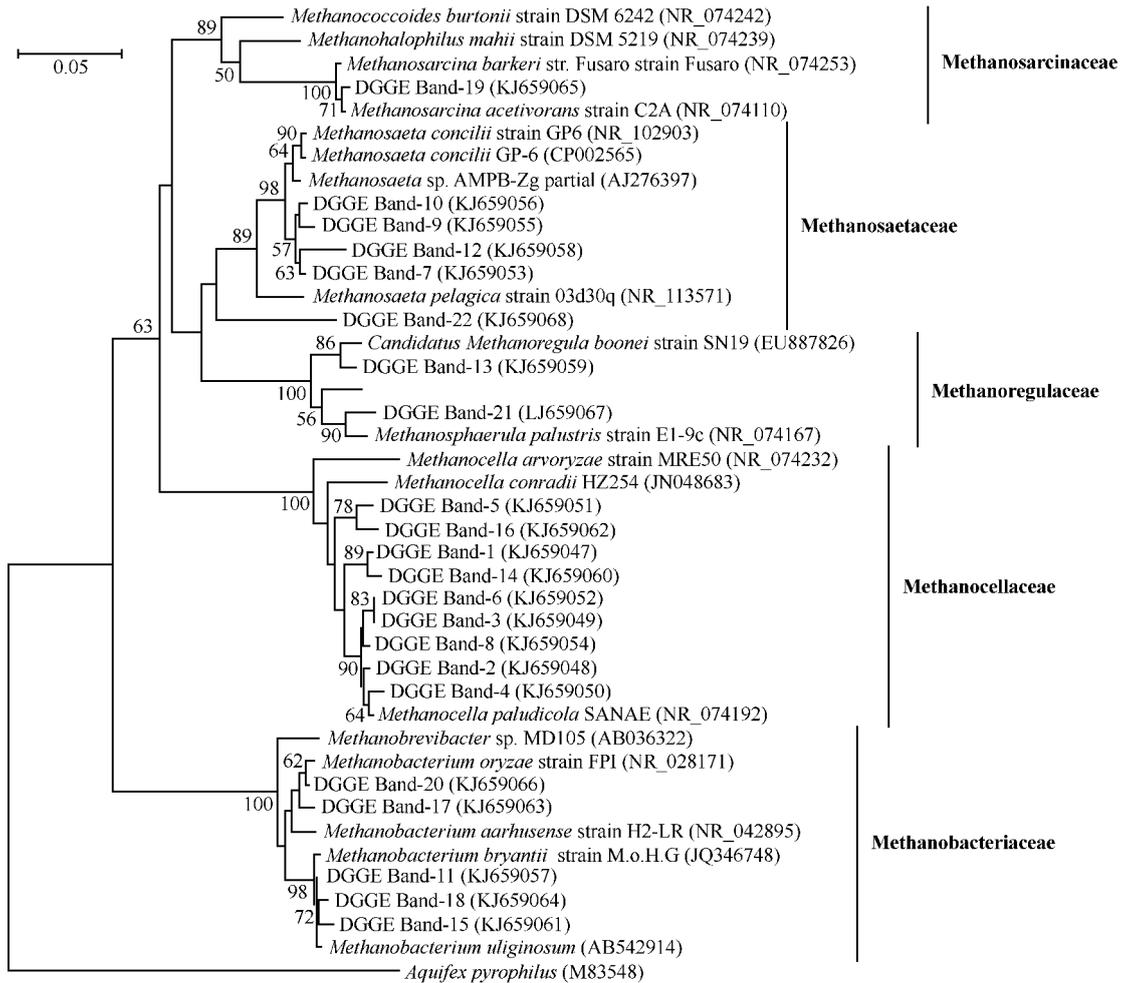


图 3. 八个地区水稻土中优势产甲烷古菌 16S rRNA 基因片段的系统发育树

Figure 3. Phylogenetic analysis showing the relationships of dominant methanogenic archaeal 16S rRNA genes in DGGE fingerprinting profiles to the closest relatives in GenBank.

The numbers at the nodes indicate the percentages of occurrence in 1000 bootstrapped trees. The GenBank accession number of each strain is indicated in parentheses and the scale bar represents 5% sequences difference.

2.5 八个地区水稻土中产甲烷古菌群落结构的 CCA 分析

利用 8 个地区产甲烷古菌群落组成的 DGGE 图谱条带和 7 个环境因子做 CCA 分析 (图 4)。从图中可以看出, 在横轴上, pH 是主要的影响因素, 贡献率为 30.2%; 铵态氮、SOC 和全氮 3 个环境因素对 8 个地区水稻土中产甲烷古菌群落的影响同方向, 与 pH 呈现相反的作用。在纵轴上, 纬度和硝态氮对不同地区水稻土中产甲烷古菌群落的影响趋势一致, 而与温度的影响方向相反。根据产甲烷古菌群落组成的相

似性, 不同地区水稻土呈现不同的分布规律。从主要相关性因素 pH 上看, 土壤 pH 值大于 6.0 的雷州和扬州在 CCA 图中的右侧, 而土壤 pH 值低于 6.0 的古市、桃源、鹰潭和常熟在 CCA 图中的左侧。从纵向的纬度上看, 相对低纬度、高气温的古市、桃源、鹰潭和雷州地区水稻土聚在一起; 与之相反, 相对高纬度、低气温的常熟、嘉兴、扬州和海伦聚在一起。

2.6 八个地区水稻土中产甲烷古菌群落结构的韦恩图分析

为了更好地展示不同地区水稻土中产甲烷古菌

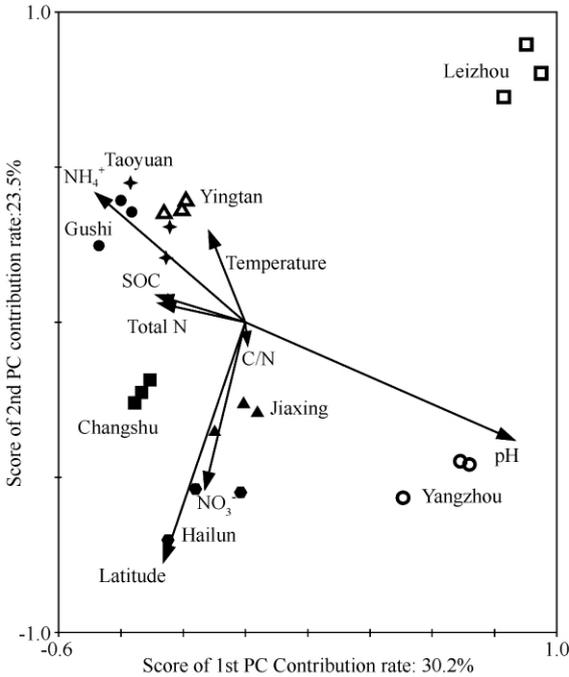


图 4. 八个地区水稻土中产甲烷古菌群落组成的典范对应分析

Figure 4. Canonical correspondence analysis relating DGGE fingerprinting patterns with environmental variables.

群落组成的差异,依据 CCA 分析中 2 个主要环境驱动因子, pH 和温度,我们分别选取具有代表性的 4 个地区水稻土中的产甲烷古菌群落组成绘制了维恩图。结果与 CCA 分析相一致,沿土壤 pH 梯度,雷州、嘉兴、扬州、桃源一共有 28 个条带,其中,雷州特有条带占 13.3% (2 个条带),嘉兴特有条带占 5.0% (1 个条带),扬州无特有条带,桃源特有条带占 18.8% (3 个条带)(图 5-A)。在温度方面,雷州、扬州、海伦和桃源一共有 27 个条带,其中,雷州特有条带占 13.3% (2 个条带),扬州特有条带占 5.6% (1 个条带),海伦特有条带占 9.1% (1 个条带),桃源特有条带占 20.0% (3 个条带)(图 5-B)。

3 讨论

水稻土产甲烷古菌是一类关键的功能微生物,它们对于全球气候变化和陆地生态系统碳库收支都有着重要的作用。目前,湿地生态系统中产甲烷古菌群落空间分异的研究已经展开^[14-16],然后稻田生态系统中却鲜有报道。鉴于稻田生态系统中产甲烷古菌的重要性,本文开展了相关研究。通过 PCR-DGGE 指纹图谱,首先揭示我国 8

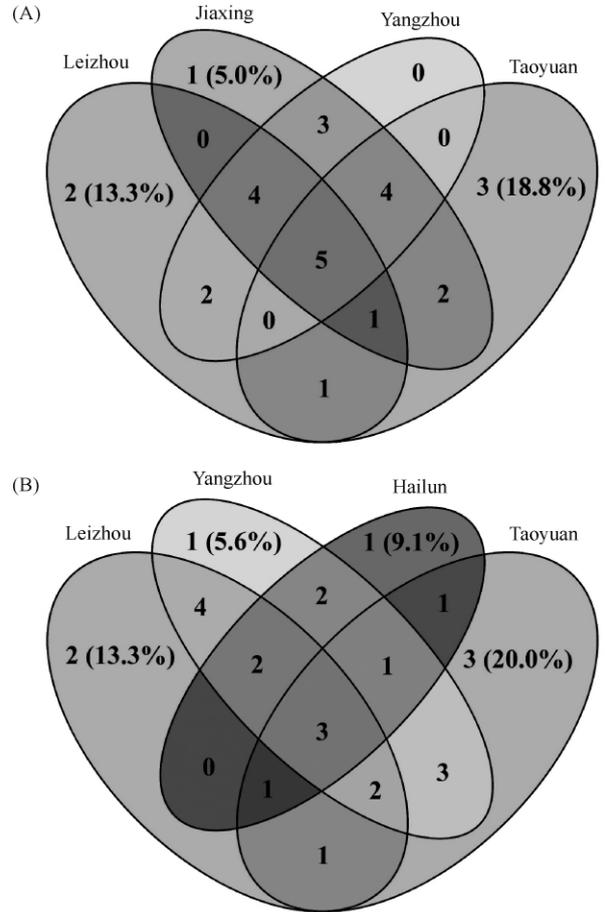


图 5. 沿土壤 pH 梯度 (A) 和纬度梯度 (B) 的各 4 个典型地区产甲烷古菌群落结构的维恩图分析

Figure 5. Venn diagrams comparing DGGE band memberships among different soil samples along soil pH value (A) and latitude (B) gradients.

个典型地区水稻土中产甲烷古菌群落组成。优势产甲烷古菌的物种分别隶属于乙酸营养型的 *Methanosarcinaceae* 和 *Methanosaetaceae* 2 个科,以及 H_2/CO_2 利用型的 *Methanoregulaceae*, *Methanocellaceae* 和 *Methanobacteriaceae* 3 个科。其中以 *Methanocellaceae* 和 *Methanobacteriaceae* 生态型为多。该结果和本课题组利用 PCR-DGGE^[19] 和高通量测序^[7] 的结果相一致,说明 8 个地区的水稻土中均含有多多样性丰富的产甲烷古菌。

PCR-DGGE 指纹图谱不仅明确了 8 个地区产甲烷古菌群落组成,还显示了各自优势物种数量和多样性的差异,结合生物信息学分析,很好的揭示了其空间分异规律。虽然 8 个地区优势产甲烷古菌都隶属于 5 个科,但是各自优势物种数量和多样性却不相同,其中以嘉兴和扬州地区的条带数最为丰富,海

伦地区的条带数最少。由于 PCR-DGGE 只能半定量的表征物种的多样性, 所以本研究没能找到与多样性指数相关的环境变量。

pH 值是主要影响水稻土中产甲烷古菌群落组成的环境因子。从 PCR-DGGE 指纹图谱 (图 1)、CCA 分析 (图 4) 和维恩图 (图 5-A) 均可以看出, 虽然影响水稻土中产甲烷古菌组成的环境因素很多, 但是土壤 pH 值是最主要的驱动因子。pH 是土壤的一个重要环境因子, 它是由多种环境因素所共同决定的结果^[20]。在本研究中, 我们发现土壤 SOC、全氮和 NH_4^+ 等都和土壤 pH 有很高的相关性 (图 4)。土壤 pH 被发现是驱动土壤细菌群落组成空间分异的主要驱动因子^[21-24], 例如在北美地区已经证实 pH 值能够很好地预测土壤细菌的群落结构^[25]。但是, pH 值与土壤功能微生物群的相关性却报告不多, 特别是土壤 pH 驱动水稻土产甲烷古菌群落组成的结论目前还尚未见报告。近期, 本课题组研究了北极地区土壤紫色光合细菌群落组成的空间分异, 发现其群落组成和多样性均与土壤 pH 值密切相关^[26]。紫色光合细菌和产甲烷古菌在水稻土中的生态位相似, 均处于碳循环末端, 都主要以 H_2/CO_2 和乙酸为碳源, 所以这也间接佐证了产甲烷古菌群落组成和土壤 pH 值相关 (图 4 和 5-A)。实际上, pH 既能影响产甲烷古菌的活性, 又能影响产甲烷古菌的群落结构。Kotsyurbenko 等^[27] 对俄罗斯西西伯利亚沼泽研究发现, 在 pH 为 6.0 和 4.8 时乙酸营养型产甲烷古菌对稻田甲烷排放的贡献在 60% - 68%, 而当 pH 降到 3.8 的条件下, 氢营养型产甲烷菌成为土壤产甲烷的主要途径 (> 92%)。与之相一致, 本研究中隶属于乙酸营养型产甲烷古菌 *Methanosaeta* 的条带 22 只出现在相对高 pH 值的雷州 (图 1 和 3)。

除了土壤 pH 值外, 纬度或者温度也是影响水稻土产甲烷古菌群落组成的重要环境因子 (图 4 和 5-B)。温度是控制不同类型湿地生态系统甲烷排放的重要因子之一^[28-29]。其主要原因是温度变化会改变湿地生态系统产甲烷菌群落结构和多样性, 并使得产甲烷优势菌群发生演替^[30]。一方面, 升温提高底物有效性从而影响产甲烷古菌群落组成和功能。温度升高增加了土壤微生物数量和多样性^[31], 增强了土壤微生物代谢活性^[6], 从而促进土壤碳转化速率^[26]。产甲烷古菌是碳循环末端的微生物, 温度升高通过增加底物供应而影响产甲烷菌群落的结

构和功能^[32]。另一方面, 温度对产甲烷古菌的生长和代谢速率也会产生直接影响^[32]。在本研究中我们发现某些 *Methanosaeta* 出现在高温度、低纬度地区, 如低纬度地区共有的条带 10 和雷州特有的条带 22。该现象和 Hoj 等在北极湿地中产甲烷古菌群落对全球升温响应的研究结果相一致^[30]。他们也发现温度的增加会改变北极湿地生态系统产甲烷菌群落结构, 其中某些 *Methanosaeta* 生态型在群落中的相对丰度随着温度的增高而增加。因此, 温度较高的低纬度地区产甲烷古菌的群落组成会不同于高纬度地区^[33]。

综上所述, 本研究通过研究我国不同纬度 8 个地区水稻土中产甲烷古菌的群落组成, 发现土壤 pH 和温度是影响水稻土中产甲烷古菌群落组成的 2 个重要因素。由于 PCR-DGGE 指纹图谱只能靶标土壤中少数优势微生物, 所以在以后的工作中我们还需要在更高的分辨率和更大的基因序列通量下更深入的研究水稻土中产甲烷古菌的空间分异规律。

参考文献

- [1] Roger PA. Biology and Management of the Floodwater Ecosystem in Ricefields. 1996. Philippines: International Rice Research Institute, 1996.
- [2] Sass RL. Short summary chapter for methane. Minami K, Mosier A, Sass RL. CH_4 and N_2O : Global emissions and controls from rice fields and other agricultural and industrial sources. Tsukuba, Japan: NIAES Series 2, 1994.
- [3] Ehhalt D, Prather M, Dentener F, Derwent R, Dlugokencky E, Holland E, Isaksen I, Katima J, Kirchhoff V, Matson P, Midgley P, Wang M. Atmospheric chemistry and greenhouse gases. //Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M, van der Linden PJ, Dai X, Maskell K, Johnson CA. Climate change 2001: the scientific basis. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2001.
- [4] Cheng WG, Yagi K, Sakai H, Kobayashi K. Effects of elevated atmospheric CO_2 concentrations on CH_4 and N_2O emission from rice soil: An experiment in controlled-environment chambers. *Biogeochemistry*, 2006, 77 (3): 351-373.
- [5] Lou YS, Inubushi K, Mizuno T, Hasegawa T, Lin Y, Sakai H, Cheng WG, Kobayashi K. CH_4 emission with differences in atmospheric CO_2 enrichment and rice cultivars in a Japanese paddy soil. *Global Change*

- Biology, 2008, 14 (11) : 2678-2687.
- [6] Peng JJ, Lü Z, Rui JP, Lu YH. Dynamics of the methanogenic archaeal community during plant residue decomposition in an anoxic rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (9) : 2894-2901.
- [7] Feng YZ, Lin XG, Yu YC, Zhang HY, Chu HY, Zhu JG. Elevated ground-level O₃ negatively influences paddy methanogenic archaeal community. *Scientific Reports*, 2013, 3 : 3193.
- [8] Wang XH. Spatial variation of organic matter in horizontal zonal soils in China. *Scientia Geographica Sinica*, 2001, 21 (1) : 19-23. (in Chinese)
王秀红. 我国水平地带性土壤中有机质的空间变化特征. *地理科学*, 2001, 21 (1) : 19-23.
- [9] Cao HJ, Wang JK, Li SY, Li ZQ. Effect of gradients of precipitation and temperature and fertilization on organic carbon and nitrogen of soils in northeastern China. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2007, 21 (4) : 122-125. (in Chinese)
曹宏杰, 汪景宽, 李双异, 李执强. 水热梯度变化及不同施肥措施对东北地区土壤有机碳氮影响. *水土保持学报*, 2007, 21 (4) : 122-125.
- [10] Li ZQ, Wang JK, Cao HJ, Li SY, Yu S. Effect of Gradients of Precipitation and Temperature and Fertilization on Light Fraction Organic Carbon and Nitrogen of Soils in Northeastern China. *Chinese Journal of Soil Science*, 2009, 40 (5) : 1014-1017. (in Chinese)
李执强, 汪景宽, 曹宏杰, 李双异, 于树. 水热梯度变化及不同施肥处理对东北地区土壤轻组有机碳氮的影响. *土壤通报*, 2009, 40 (5) : 1014-1017.
- [11] Lu YH, Conrad R. In situ stable isotope probing of methanogenic archaea in the rice rhizosphere. *Science*, 2005, 309 (5737) : 1088-1090.
- [12] Conrad P, Klose M, Claus P, Dan JG. Activity and composition of the methanogenic archaeal community in soil vegetated with wild versus cultivated rice. *Soil Biology & Biochemistry*, 2009, 41 (7) : 1390-1395.
- [13] Watanabe T, Kimura M, Asakawa S. Distinct members of a stable methanogenic archaeal community transcribe *mcrA* genes under flooded and drained conditions in Japanese paddy field soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2009, 41 (2) : 276-285.
- [14] Galand PE, Fritze H, Yrjala K. Microsite-dependent changes in methanogenic populations in a boreal oligotrophic fen. *Environmental Microbiology*, 2003, 5 (11) : 1133-1143.
- [15] Galand PE, Saarnio S, Fritze H, Yrjala K. Depth related diversity of methanogen Archaea in Finnish oligotrophic fen. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 42 (3) : 441-449.
- [16] Kotsyurbenko OR, Chin KJ, Glagolev MV, Stubner S, Simankova MV, Nozhevnikova AN, Conrad R. Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog. *Environmental Microbiology*, 2004, 6 (11) : 1159-1173.
- [17] Luke C, Krause S, Cavigliolo S, Greppi D, Lupotto E, Frenzel P. Biogeography of wetland rice methanotrophs. *Environmental Microbiology*, 2010, 12 (4) : 862-872.
- [18] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [19] Feng YZ, Xu YP, Yu YC, Xie ZB, Lin XG. Mechanisms of biochar decreasing methane emission from Chinese paddy soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2012, 46 : 80-88.
- [20] Lauber CL, Strickland MS, Bradford MA, Fierer N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40 (9) : 2407-2415.
- [21] Baker KL, Langenheder S, Nicol GW, Ricketts D, Killham K, Campbell CD, Prosser JI. Environmental and spatial characterisation of bacterial community composition in soil to inform sampling strategies. *Soil Biology & Biochemistry*, 2009, 41 (11) : 2292-2298.
- [22] Chu HY, Fierer N, Lauber CL, Caporaso JG, Knight R, Grogan P. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environmental Microbiology*, 2010, 12 (11) : 2998-3006.
- [23] Jesus ED, Marsh TL, Tiedje JM, Moreira FMD. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *ISME Journal*, 2009, 3 (9) : 1004-1011.
- [24] Jones RT, Robeson MS, Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *ISME Journal*, 2009, 3 (4) : 442-453.
- [25] Fierer N, Jackson RB. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103 (3) : 626-631.
- [26] Feng YZ, Grogan P, Caporaso JG, Zhang HY, Lin XG, Knight R, Chu HY. pH is a good predictor of the distribution of anoxygenic purple phototrophic bacteria in Arctic soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2014, 74 : 193-

200.

- [27] Kotsyurbenko OR, Friedrich MW, Simankova MV, Nozhevnikova AN, Golyshin PN, Timmis KN, Conrad R. Shift from acetoclastic to H₂-dependent methanogenes in a West Siberian peat bog at low pH values and isolation of an acidophilic Methanobactetium strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (7) : 2344-2348.
- [28] Avery GB, Shannon RD, White LR, Martens CS, Alperin MJ. Controls on methane production in a tidal freshwater estuary and a peatland: methane production via acetate fermentation and CO₂ reduction. *Biogeochemistry*, 2003, 62(1) : 19-37.
- [29] Ding WX, Cai ZC, Wang DX. Preliminary budget of methane emissions from natural wetlands in China. *Atmospheric Environment*, 2004, 38 (5) : 751-759.
- [30] Hoj L, Olsen RA, Torsvik VL. Effects of temperature on the diversity and community structure of known methanogenic groups and other archaea in high Arctic peat. *ISME Journal*, 2008, 2 (1) : 37-48.
- [31] Noll M, Klose M, Conrad R. Effect of temperature change on the composition of the bacterial and archaeal community potentially involved in the turnover of acetate and propionate in methanogenic rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 73 (2) : 215-225.
- [32] Conrad R, Klose M, Noll M. Functional and structural response of the methanogenic microbial community in rice field soil to temperature change. *Environmental Microbiology*, 2009, 11 (7) : 1844-1853.
- [33] Liu DY, Ding WX. Progress on spatial Variation of Methanogens and their influencing factors in natural wetlands. *Scientia Geographica Sinica*, 2011, 31 (2) : 136-142. (in Chinese)
刘德燕, 丁维新. 天然湿地土壤产甲烷菌及其影响因素研究进展. *地理科学*, 2011, 31 (2) : 136-142.

Spatial shifts in methanogenic archaeal community composition in eight Chinese paddy soils

Qianhui Zu^{1,2}, Baozhan Wang¹, Yan Zheng^{1,2}, Zhongjun Jia¹, Xiangui Lin^{1*}, Youzhi Feng^{1*}

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

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

Abstract: [Objective] The methanogenic archaea plays many ecological roles in paddy ecosystems such as the regulation of CH₄ emissions. However, knowledge gaps exist about the mechanisms of their spatial shift in population. [Methods] We collected 8 latitudinal paddy soil samples from 20.55° N to 47.43° N in China, and studied their methanogenic archaeal community compositions by PCR-DGGE fingerprinting and phylogenetic analyses. Mechanism of spatial shift in community composition was unraveled by canonical correspondence analysis and Venn diagram. [Results] Soil pH was one of the main environmental triggers to the composition of methanogenic archaea community in paddy soils. In addition, community composition shifted along latitudinal gradients. [Conclusion] It is the first report on biogeography of methanogenic archaeal community in arable soils and its environmental driving factors. The information would contribute to understanding spatial shifts in the transformation of organic matters along Chinese latitudinal gradient.

Keywords: Paddy soil, Methanogenic archaea, Spatial shift in community composition, PCR-DGGE fingerprint, Canonical correspondence analysis

(本文责编: 张晓丽)