



## 高通量测序分析云南腾冲热海热泉真菌多样性

刘开辉<sup>1</sup>, 丁小维<sup>1\*</sup>, 张波<sup>1</sup>, 唐小飞<sup>1</sup>, 肖敏<sup>2</sup>, 鲜文东<sup>2</sup>, 李文均<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001

<sup>2</sup>中山大学生命科学大学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275

**摘要:**【目的】本研究揭示云南腾冲热海热泉真菌多样性及群落分布格局, 探讨其理化因子对真菌群落结构的影响。【方法】利用 Illumina HiSeq2500 高通量测序平台对腾冲热海热泉沉积物宏基因组 ITS 基因进行测序, 并进行生物信息分析。【结果】从 5 个热泉样品中共检测到 343484 条有效序列, 包括 5 个真菌门, 20 个纲, 66 个目。右姐妹泉(JMQR)、左姐妹泉(JMQL)、蛤蟆嘴泉(M)、桥泉(QQ)及鼓明泉(GMQP)分别以 Agaricales、Eurotiales、Capnodiales 和 Hypocreales 等为优势目。在属水平上, 共获得 365 个属, 从 JMQR 中检测到 212 个属, 以裂褶菌属(*Schizophyllum*)为最优势; 从 JMQL 中挖掘到 197 个属, 以青霉属(*Penicillium*)为最优势类群; 从 M 和 QQ 中分别获得 222 个和 270 个属, 均以枝孢属(*Cladosporium*)为最优势; 从 GMQP 中发现 179 个属, 以侧齿霉属(*Engyodontium*)丰度最高。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>含量、温度及 pH 影响不同优势真菌的分布, 其中以 pH 与优势类群(OTU>1%)结构变化显著性最高( $P=0.05$ )。【结论】云南腾冲热海高温热泉蕴藏着极其丰富的真菌物种, 其不同样品真菌分布具有差异性, pH 可能是影响热泉真菌群落分布的重要因素之一。

**关键词:** 腾冲热海热泉, 真菌多样性, 高通量测序

真菌是全球生物多样性的重要组成部分, 并在物质循环、能量流动等生态过程中发挥重要作用。据估计, 地球上可能至少存在 510 多万种真菌<sup>[1]</sup>, 这些资源无疑是人类最宝贵的财富之一。真菌几乎存在于地球的各类生态环境中, 如土壤、水体、粪肥、动植物体内及大气中。由于纯培养技术的不足, 人类所认识的真菌多样性非常有限,

环境中大量的真菌物种仍处于“未知”的状态。由于全球环境的变化, 真菌物种多样性可能在锐减。为了发现“新的”真菌资源, 一方面利用免培养技术如 DGGE<sup>[2]</sup>、高通量测序等探测环境微生物, 另一方面可挖掘极端环境如盐碱湖<sup>[3]</sup>、深海<sup>[4]</sup>、热泉<sup>[5]</sup>等环境中蕴藏的真菌资源。

在地球上广泛分布着热泉、火山口及堆肥等

基金项目: 国家自然科学基金(31100017); 陕西理工大学科研项目(SLGQD16-06)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-20-84111727; E-mail: 丁小维, dxw518@163.com; 李文均, liwenjun3@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2017-01-13; 修回日期: 2017-02-19; 网络出版日期: 2017-03-17

极端高温环境。这些环境中的嗜热微生物在生命进化历程中, 由于高温环境的选择作用, 形成独特的群落结构、遗传特性及生理代谢机制, 因具有重要的科学和应用价值而成为微生物学研究的热点之一<sup>[6]</sup>。近年来, 研究人员利用高通量测序对热泉中的细菌、古菌群落结构进行分析, 并对其微生物群落结构的影响因素进行分析<sup>[7-9]</sup>。Colman 等<sup>[9]</sup>报道了美国黄石公园的浮游生物群落结构, 发现 pH 和温度影响上述微生物的群落组成。Hou 等<sup>[10]</sup>系统研究云南腾冲热海热泉沉积物细菌、古菌多样性, 认为其优势群体可能受 pH 和温度影响。Jiang 等<sup>[11]</sup>发现除温度外, 腾冲热海姊妹泉中的硫、砷含量及可溶性氧气均影响细菌群落结构。目前, 利用高通量测序研究热泉微生物主要集中在细菌、古菌方面, 而有关嗜热真菌仍未见报道。

云南腾冲县蕴藏着丰富的地热资源, 境内热泉遍布各地, 其中以热海区热泉最具代表性。本研究通过高通量测序分析该地区热泉沉积物真菌群落格局及物种多样性, 探测到极其丰富的真菌物种, 并分析影响真菌群落结构的因素, 为再认识真菌适应高温的“边界”及其资源的发掘提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集

热泉样品于 2014 年 6 月分别采自云南腾冲热海区桥泉(QQ)、左姐妹泉(JMQL)、右姐妹泉(JMQR)、鼓明泉(GMQP)及蛤蟆嘴泉(M)底沙土沉积物, 并置放于 50 mL 无菌离心管中。采集的样品迅速放入液氮中冷冻, 用于宏基因组 DNA 的提取。为了探究热泉一些地化因素对真菌分布的影

响, 本研究选择的热泉区其 pH、温度、 $S^{2-}$ 及  $NH_4^+$  参数均呈现出明显的梯度特征, 并对上述因子进行原位测定, 数据如表 1 所示。

### 1.2 宏基因组 DNA 提取

约 10.0 g 热泉沙土样品经充分混匀, 并于液氮中反复研磨。各称取 0.5 g 经研磨的样品, 利用 Fast DNA<sup>®</sup> Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) 土壤 DNA 提取试剂盒, 依说明书抽提并纯化热泉沉积物微生物基因组总 DNA。每个样品的 DNA 完成 3 次重复抽提, 合并后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测所提取的基因组 DNA。

### 1.3 ITS 基因的扩增及 Illumina HiSeq 高通量测序

由于真菌 ITS2 区在揭示属间、属内及近似种的关系中具有十分突出的种类覆盖度和良好的多样性深度, 能较准确探测出环境样品真菌的群落结构, 因此本研究选用特异性引物 ITS2-F: GCATC GATGAAGAACGCAGC; ITS2-R: ATATGTAGGA TGAAGAACYAGYRAA 用于扩增真菌 ITS2 区, 用于扩增不同样品的 ITS2-F 引物融合了 7 个碱基的 barcode 序列, 以区别不同来源的 ITS 序列。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 53 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 反应体系 (25  $\mu$ L): 2 $\times$ PCR buffer 12.5  $\mu$ L, dNTPs (10 mmol/L) 0.5  $\mu$ L, 基因组 DNA 100 ng, ITS2-F/R

表 1. 热泉样品地化信息

Table 1. Geochemical information of hot spring samples

| Sample | pH   | T/°C | $c(S^{2-})/(\mu\text{g/L})$ | $c(NH_4^+)/(\text{mg/L})$ |
|--------|------|------|-----------------------------|---------------------------|
| QQ     | 6.22 | 75.6 | 4                           | 0.97                      |
| M      | 7.88 | 75.1 | 202                         | 0.13                      |
| JMQL   | 9.00 | 90.4 | 4990                        | 1.26                      |
| GMQP   | 9.05 | 84.5 | 3480                        | 1.19                      |
| JMQR   | 9.09 | 83.4 | 3010                        | 1.66                      |

(50  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , *Taq* (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$  及 8.5  $\mu\text{L}$  的 ddH<sub>2</sub>O。同一样品的 PCR 产物合并后经电泳检测, 通过胶回收试剂盒进行纯化。对 PCR 产物进行定量并均一化, 构建 ITS 测序文库, 利用 Illumina HiSeq2500 平台进行高通量测序。

#### 1.4 数据分析

利用 Mothur 软件分别去除长度小于 200 bp 序列、平均质量分值低于 25 的序列、含有模糊碱基、化学嵌合体及 barcode 序列中含有错配碱基的序列以获得有效序列(tags), 并进行去冗余处理, 从中挑选出 unique tag 序列<sup>[12]</sup>。基于 Naïve Bayesian 方法的分类器 RDP classifier 对序列进行物种注解, 选择 Confidence Threshold (bootstrapping) 参数为 0.5 进行物种分类。根据 97% 的序列相似度对有效序列进行同源比对, 并对操作分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTUs) 进行聚类, 计算香农指数(Shannon Index)、ACE 指数、Chao1 指数及文库覆盖率(Coverage)。根据 OTU 的表达谱数据, 利用 R 语言绘制热图。利用 Canoco 软件分析热泉环境因子对真菌群落的影响, 利用 Bray-Curtis 分析环境因子对真菌群落影响的显著性。

## 2 结果和分析

### 2.1 测序结果

去除不合格序列后, 5 个热泉样品中共获得 343484 条有效序列(表 2), 其中从 GMQP、JMQL、JMQR、M 及 QQ 中分别获得 80026、60813、82345、86815 和 33485 条有效序列, 基于 97% 相似度其 OTUs 数量分别为 3003、3669、2689、4099 和 4198, 组装出来的片段中位的片段长度 N50 为 344–360 bp, ACE 指数在 10200.5–18936.6, npShannon 指数在

表 2. 热泉样品测序数据统计分析

Table 2. Sequencing data of hot spring samples

| Sample | Tags  | OTUs | N50 | ACE     | npShannon | Coverage/% |
|--------|-------|------|-----|---------|-----------|------------|
| GMQP   | 80026 | 3003 | 356 | 11268.8 | 4.1       | 97.9       |
| JMQL   | 60813 | 3669 | 355 | 13757.0 | 4.1       | 96.5       |
| JMQR   | 82345 | 2689 | 352 | 10200.5 | 3.6       | 98.0       |
| M      | 86815 | 4099 | 360 | 14869.2 | 5.6       | 97.2       |
| QQ     | 33485 | 4198 | 344 | 18936.6 | 5.6       | 92.2       |

3.6–5.6 之间, 文库覆盖率在 92.2%–98.0%, 说明测得的 OTU 能基本反映所研究的腾冲热海热泉样品真菌的群落组成。

### 2.2 腾冲热泉真菌多样性及群落格局分析

利用 RDP classifier 分类器对 OTU 依次进行门(Phylum)、纲(Class)、目(Order)、科(Family)及属(Genus)水平上的物种分类注释。从云南腾冲热海 5 个热泉样品中共检测到 5 个真菌门, 包括子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、接合菌类(Zygomycota)、壶菌门(Chytridiomycota)及球囊菌门(Glomeromycota), 其中以子囊菌为优势菌群, 约占 OTUs 总数的 83.6%, 担子菌次之约为 16.1%, 其余类群丰度合计约为 0.1%。从上述样品中检测到 20 个纲, 其中座囊菌纲(Dothideomycetes)、散囊菌纲(Eurotiomycetes)、粪壳菌纲(Sordariomycetes)、伞菌纲(Agaricomycetes)及酵母纲(Saccharomycetes)等为优势纲, 分别占 OTUs 的 30%、26%、22%、13%和 4%。

除了未知真菌群体外, 从 5 个热泉中共检测到 66 个目, 在图 1-A 中, 从 JMQR 中获得 47 个目, Agaricales、Eurotiales、Pleosporales、Capnodiales 及 Trichosphaeriales 为优势类群, 分别占该热泉真菌 OTU 的 27%、25%、21%、6%及 5%; 在 JMQL 泉中获得 46 个目, 优势类群如 Eurotiales (60%)、Hypocreales (8%)、Pleosporales (7%)、Capnodiales (6%)、Agaricales (6%); 热泉 M 中共发现 45 个目,

优势类群 Capnodiales 占 28%，次之为 Eurotiales (16%)、Hypocreales (15%)、Pleosporales (13%)及 Saccharomycetales (8%)；在热泉 QQ 中共检测到 60 个目，其中超过 5%的优势类群如 Capnodiales (28%)、Pleosporales (19%)、Eurotiales (13%)、Hypocreales (5%)及 Agaricales (5%)；热泉 GMQP 中发现 41 个目，以 Hypocreales 为优势群体(45%)，次之为 Pleosporales (15%)、Eurotiales (14%)、Capnodiales (9%)。

从 5 热泉样品中共检测 365 个真菌属，不同样品在真菌属水平上分部格局如在图 1-B 所示，热泉 JMQR 中获得 212 个属，其中优势类群包括裂褶菌属 (*Schizophyllum*) 占 27%、青霉属 (*Penicillium*) 22%、茎点霉属(*Phoma*) 10%、链格孢属(*Alternaria*) 9%、黑孢属(*Nigrospora*) 5%及枝

孢属(*Cladosporium*) 5%；JMQL 热泉中共检测到 197 个属，优势属如 *Penicillium* 占 61%、侧齿霉属(*Engyodontium*) 6%、*Schizophyllum* 为 6%及 *Cladosporium* 为 5%；在 M 中获得 222 个属，以 *Cladosporium* (21%)、*Engyodontium* (13%)、*Aspergillus* (11%)、*Saccharomyces* (7%)、*Penicillium* (5%)及 *Devriesia* (5%)为优势属；在 QQ 中获得 270 个属，优势属如 *Cladosporium* (21%)、*Engyodontium* (13%)、曲霉(*Aspergillus*)占 11%、酵母属(*Saccharomyces*)占 7%、*Penicillium* (5%)及 *Devriesia* 为 5%；从 GMQP 中发现 179 个属，优势属包括 *Engyodontium*、*Penicillium*、拟盾壳霉属 (*Paraconiothyrium*)及 *Cladosporium*，分别占微生物 OTU 的 46%、13%、6%和 5%。上述研究结果表明在高温热泉环境中蕴藏着极其丰富多样的真菌类群。

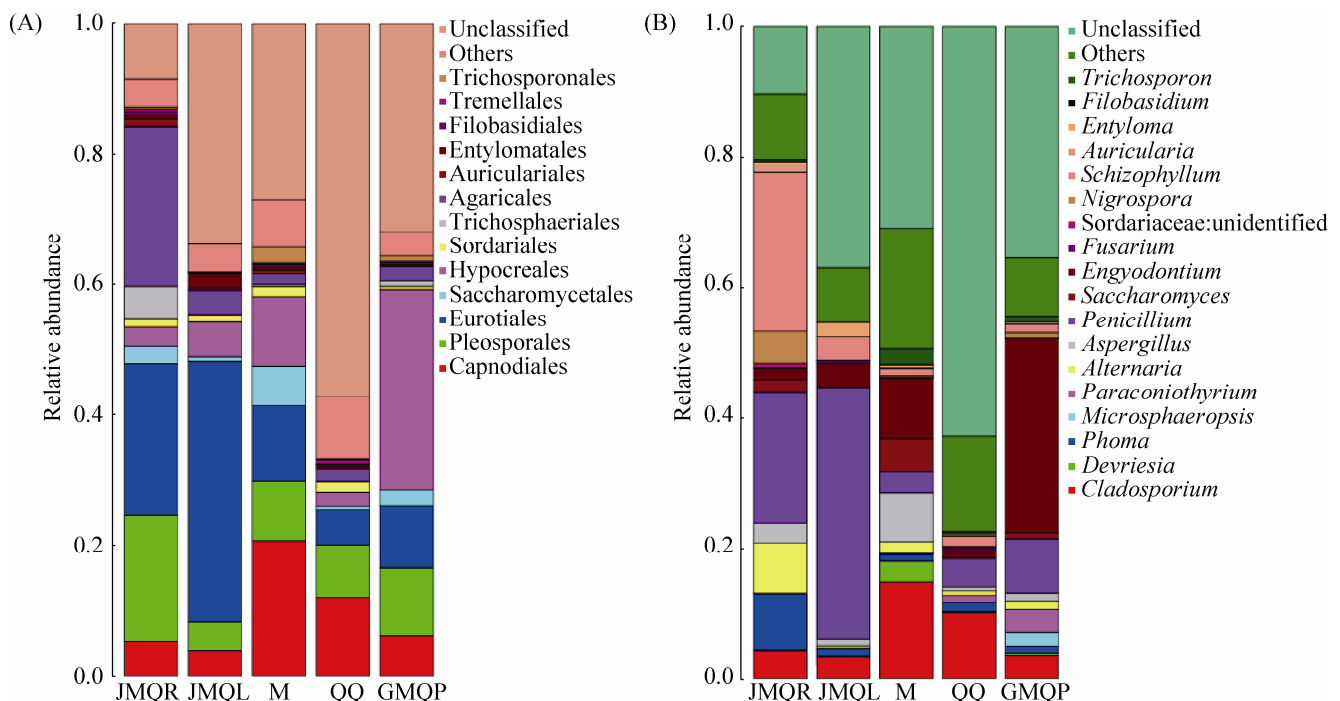


图 1. 热泉样品真菌类群目(A)和属(B)水平分布图

Figure 1. Order-(A), genus-level (B) distribution of fungi in hot samples from Tengchong, Yunnan. At each rank, fungal sequences that were not identified into anyone in databases were ‘Unclassified’; rare groups shown as ‘others’.

### 2.3 腾冲热泉真菌群落结构相似度分析

根据 OTU 的丰度数据, 热图可在属水平上将不同丰度的 OTU 分块聚类, 并根据颜色梯度反映不同样品的物种群落相似性、差异性及其物种聚类关系展示样本关系。本研究选择不同热泉样的丰度高的前 30 个真菌属, 利用 R 语言绘制热图 (图 2), JMQL 和 QQ 类聚为一个分支, 其他 3 个热泉样 GMQP、JMQR 及 M 分别同该分支类聚。JMQL 和 QQ 分别以 *Penicillium* 和 *Cladosporium* 丰度最高, GMQP 以 *Engyodontium* 丰度最高, JMQR 和 M 分别以 *Schizophyllum* 和 *Cladosporium* 最丰富。除了上述最丰富类群在不同热泉样品中

显著富集外, 其余多数真菌属在不同样品中的丰度具有相似性。

### 2.4 环境因子对热泉真菌群落结构的影响

为了分析腾冲热海热泉土壤沉积物理化因子对真菌群落格局的影响, 本研究进行典型对应分析, 结果如图 3 所示。热泉沉积物  $S^{2-}$ 、 $NH_4^+$ 、温度及 pH 矢量箭头之间夹角为锐角, 表明这 4 种理化因子之间可能具有协同效应; 样品 JMQR、JMQL 和 M 同  $NH_4^+$  相关性最高, QQ 和 GMQP 同 pH 相关性最高; *Alternaria*、*Nigrospora*、*Penicillium*、*Phoma* 和 *Schizophyllum* 同  $NH_4^+$  含量变化相关性最高, *Cladosporium* 同温度变化相关性最高,

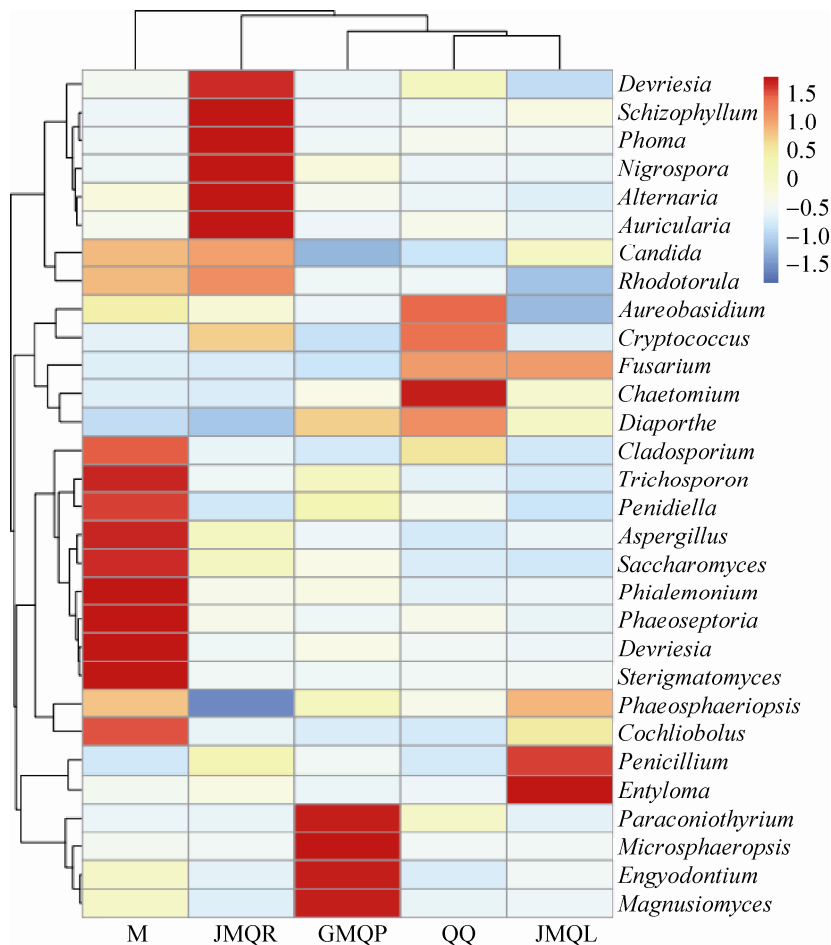


图 2. 不同热泉样品真菌的热图分析

Figure 2. Heatmap of different samples from hot springs in Tengchong, Yunnan.

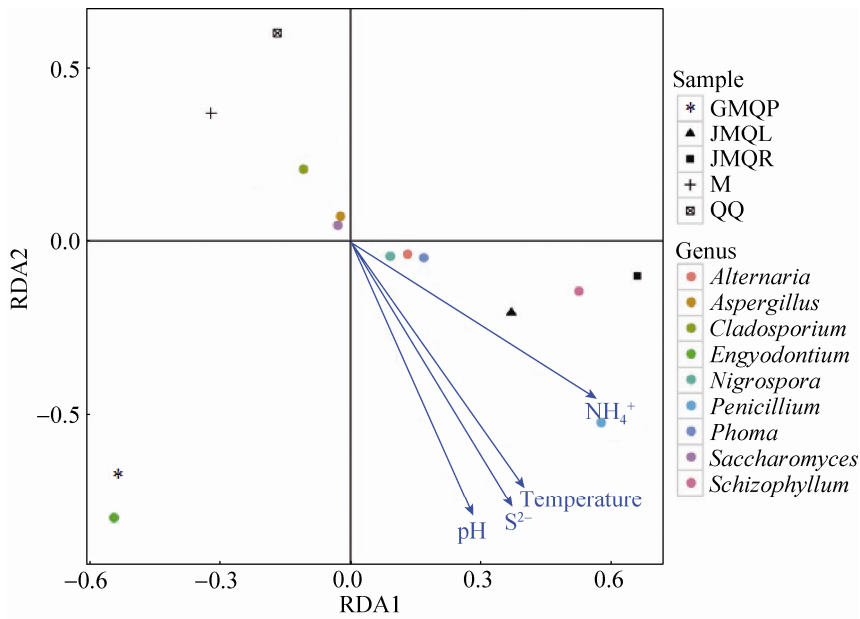


图 3. 真菌群落与环境因子的典型对应分析

Figure 3. RDA showing associations between environmental variables and fungal genera.

*Aspergillus*、*Saccharomyces* 和 *Engyodontium* 同样品 pH 值相关性最高。

为进一步分析热泉环境因子对真菌群落结构的影响,本研究选择热泉 2 个关键的环境变量 pH 和温度分别同热泉样品中 OTU 丰度大于 1% 的所有优势属<sup>[13]</sup>进行 Bray-Curtis 分析,结果如图 4 所示,

样品 pH 对优势属群落结构的影响显著性最高 ( $P=0.05$ ), 其相关性  $r=0.491$ , 然而, 温度对 OTU 丰度大于 1% 的群体结构影响不显著 ( $P=0.751$ ), 表明 pH 可能是影响腾冲热海热泉真菌群落分布的重要因素之一。

### 3 讨论

微生物在自然界中常以群落的形式存在, 承担着地球物质生物化学循环的重要角色, 因此微生物群落结构及功能特征的探究已成为微生物生态学研究热点。长期以来, 由于纯培养技术的局限性使我们微生物种类、丰度及其随环境变化的驱动规律的认识很不全面, 对群落生态功能及其代谢机制方面了解更少<sup>[14]</sup>。近年来, 随着高通量测序技术的不断更新, 微生物分子生态学的研究方法和研究途径也在不断变化。尤其是 Illumina HiSeq 2500 高通量测序平台的成熟和普及, 使我们能够对环境微生物进行深度测序分析,

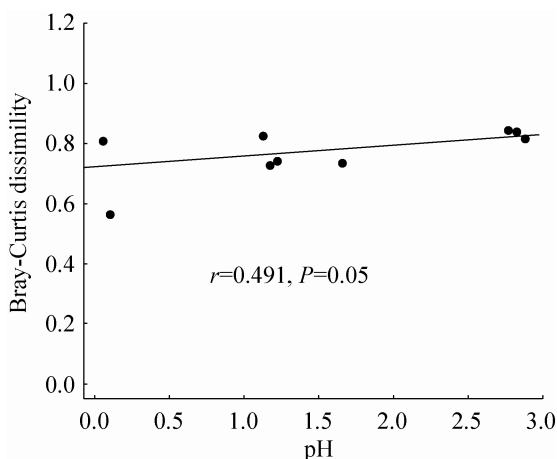


图 4. pH 和真菌优势群体的 Bray-Curtis 分析

Figure 4. Bray-Curtis dissimilarity of pH and fungal dominant genera.

能灵敏地探测出环境真菌群落组成随环境因子时空变化而发生的响应。因此,该技术在微生物群落结构及多样性研究方面深受学者认可<sup>[15-17]</sup>。

本研究通过高通量测序分析腾冲热海 5 个热泉真菌群落结构及物种多样性,共获得 343484 条有效序列,经分析获得 5 个真菌门、20 个纲,以子囊菌门为最优势类群。Mouchacca<sup>[18]</sup>认为嗜热真菌主要包括 Mucorales、Eurotiales、Sphaeriales、Hyphomycetes 和 Agonomycete 这 5 个目,然而我们从腾冲热海样品中共检测到 66 个真菌目、365 个属,以 *Schizophyllum*、*Penicillium* 及 *Phoma* 属为 JMQR 热泉的优势类群;*Penicillium* 则主导 JMQL 热泉的真菌群落结构;*Cladosporium* 在 M 热泉中丰度最高,*Engyodontium* 和 *Aspergillus* 次之;GMQP 泉以 *Engyodontium* 为最优势真菌。除了丰度最高的类群外,OTU>1%的所有优势属在不同热泉样品中的组成及其丰度也存在差异,暗示环境变量驱动热泉真菌的群落格局,这与环境因子影响热泉原核微生物群落结构的结论一致<sup>[8-11]</sup>。Redman 和 Chen 等研究发现 *Penicillium* 和 *Aspergillus* 是地热生态环境中可培养数目最多的微生物<sup>[5,19]</sup>。Pan 等<sup>[20]</sup>采用纯培养技术从腾冲热海 3 个碱性热泉中分离到 8 个真菌属,如 *Chaetomium*、*Coprinopsis*、*Malbranchea*、*Rhizomucor* 和 *Talaromyces* 等,以 *Talaromyces* 为最优势群体。其中 *Talaromyces* 和 *Chaetomium* 在该研究的 5 个高温热泉中均被检测到,而 *Coprinopsis* 仅在 JMQL、JMQR 和 QQ 热泉中存在,但这些真菌的丰度均较低。本研究表明高温热泉中蕴藏着极其丰富、多样的真菌物种资源。

大量研究表明,环境中某些理化因子例如 pH、温度和无机盐等影响微生物群落结构<sup>[21-23]</sup>。Colman 等<sup>[9]</sup>发现 pH 和温度是影响黄石公园的浮

游生物群落结构的主要因素。而 pH、温度、硫含量及可溶性氧则影响云南腾冲热泉不同细菌优势群体的分布<sup>[10-11]</sup>。除了影响细菌分布外,pH 也驱动真菌的群落结构<sup>[3]</sup>。在本研究中,热泉样品的优势属 *Cladosporium* 分布受温度变化影响,*Alternaria*、*Nigrospora*、*Penicillium*、*Phoma* 和 *Schizophyllum* 同  $\text{NH}_4^+$  含量有关,*Aspergillus*、*Saccharomyces* 和 *Engyodontium* 受 pH 驱动。此外,Bray-Curtis 分析显示 OTU 丰度大于 1%所有优势属同样品 pH 显著性最高( $P=0.05$ ),表明 pH 是驱动腾冲热泉真菌分布的一个重要因素。事实上,pH 影响环境有机质的可溶性和酶活性,影响微生物对有机质分解、转运及其他养分的利用能力<sup>[24]</sup>,进而影响微生物生长、繁殖,导致不同种属的群落组成及丰度不同<sup>[25]</sup>。

总之,利用 Illumina Hiseq 2500 高通量测序技术研究云南腾冲热海热泉沉积物中真菌群落结构,全面揭示出在高温热泉中存在极其丰富、多样的真菌类群,并探究影响真菌分布的因素,发现 pH、温度及  $\text{NH}_4^+$  含量可能是影响热泉不同真菌群落结构、物种丰度的重要环境因子,该研究工作将为热泉嗜热真菌资源的开发利用提供理论依据。

## 参考文献

- [1] Blackwell M. The fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 2011, 98(3): 426-438.
- [2] van Hannen EJ, Mooij W, van Agterveld MP, Gons HJ, Laanbroek HJ. Detritus-dependent development of the microbial community in an experimental system: qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(6): 2478-2484.
- [3] Liu KH, Ding XW, Wang HF, Zhang XM, Hozzein WN, Wadaan MAM, Lan A, Zhang B, Li WJ. Eukaryotic microbial communities in hypersaline soils and sediments from the alkaline hypersaline Huama Lake as revealed by 454 pyrosequencing. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2014, 105(5): 871-880.
- [4] Qu J, Liu KH, Ding XW, Deng BW, Chen WQ, Guo QL, Tian

- XP, Zhang S, Li WJ. Fungal diversity and enzyme activities in marine sediments in the South China Sea. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(5): 552–562. (in Chinese)
- 曲佳, 刘开辉, 丁小维, 邓百万, 陈文强, 郭庆兰, 田新朋, 张偲, 李文均. 南海局部海洋沉积物中真菌多样性及产酶活性. *微生物学报*, 2014, 54(5): 552–562.
- [5] Chen KY, Huang D, Liu CC. The mycoflora of hot spring soil in northern Taiwan. *Taiwania*, 2003, 48(3): 203–211.
- [6] Xie SC, Yin HF. Progress and perspective on frontiers of geobiology. *Science China Earth Sciences*, 2014, 44(6): 1072–1086.
- 谢树成, 殷鸿福. 地球生物学前沿: 进展与问题. *中国科学: 地球科学*, 2014, 44(6): 1072–1086.
- [7] Li HZ, Yang QH, Li J, Gao H, Li P, Zhou HY. The impact of temperature on microbial diversity and AOA activity in the Tengchong geothermal field, China. *Scientific Reports*, 2015, 5: 17056.
- [8] Xie W, Zhang CL, Wang JX, Chen YF, Zhu YQ, de la Torre JR, Dong HL, Hartnett HE, Hedlund BP, Klotz MG. Distribution of ether lipids and composition of the archaeal community in terrestrial geothermal springs: impact of environmental variables. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(5): 1600–1614.
- [9] Colman DR, Feyhl-Buska J, Robinson KJ, Fecteau KM, Xu H, Shock EL, Boyd ES. Ecological differentiation in planktonic and sediment-associated chemotrophic microbial populations in Yellowstone hot springs. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(9): fiw137.
- [10] Hou WG, Wang S, Dong HL, Jiang HC, Briggs BR, Peacock JP, Huang QY, Huang LQ, Wu G, Zhi XY, Li WJ, Dodsworth JA, Hedlund BP, Zhang CL, Hartnett HE, Dijkstra P, Hungate BA. A comprehensive census of microbial diversity in hot springs of Tengchong, Yunnan Province China using 16S rRNA gene pyrosequencing. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53350.
- [11] Jiang Z, Li P, Jiang DW, Dai XY, Zhang R, Wang YH, Wang YX. Microbial community structure and arsenic biogeochemistry in an acid vapor-formed spring in Tengchong geothermal area, China. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146331.
- [12] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537–7541.
- [13] Galand PE, Casamayor EO, Kirchman DL, Lovejoy C. Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(52): 22427–22432.
- [14] Liu KL, Wang JQ, Bu DP, Li D, Yu P, Zhao SG. Current progress in approaches to the study of structure and function diversities of environmental microbial communities. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(4): 1074–1080. (in Chinese)
- 刘开朗, 王加启, 卜登攀, 李旦, 于萍, 赵圣国. 环境微生物群落结构与功能多样性研究方法. *生态学报*, 2010, 30(4): 1074–1080.
- [15] Zhao S, Zhou N, Zhao ZY, Zhang K, Tian CY. Endophytic bacterial diversity and dynamics in root of *Salicornia europaea* estimated via high throughput sequencing. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(6): 1000–1008. (in Chinese)
- 赵帅, 周娜, 赵振勇, 张科, 田长彦. 基于高通量测序分析盐角草根内共生细菌多样性及动态规律. *微生物学报*, 2016, 56(6): 1000–1008.
- [16] Jin L, Gao XM, Du JH, Wang HX, Guan LM, Wang JC, Wei GW, Qiu XZ. Peat bacterial diversity and community structure in Gahai Lake wetland in Gan'nan. *Microbiology China*, 2016, 43(11): 2396–2404. (in Chinese)
- 靳亮, 高学梅, 杜建华, 王洪秀, 关丽梅, 王金昌, 魏国汶, 邱小忠. 尕海湖湿地泥炭细菌多样性分析. *微生物学通报*, 2016, 43(11): 2396–2404.
- [17] Chen L, Xu JM, Feng YZ, Wang JT, Yu YJ, Brookes PC. Responses of soil microeukaryotic communities to short-term fumigation-incubation revealed by MiSeq amplicon sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1149.
- [18] Mouchacca J. Thermophilic fungi: biodiversity and taxonomic status. *Cryptogamie Mycologie*, 1997, 18(1): 19–69.
- [19] Redman RS, Litvintseva A, Sheehan KB, Henson JM, Rodriguez R. Fungi from geothermal soils in Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(12): 5193–5197.
- [20] Pan WZ, Huang XW, Wei KB, Zhang CM, Yang DM, Ding JM, Zhang KQ. Diversity of thermophilic fungi in Tengchong Rehai National Park revealed by ITS nucleotide sequence analyses. *The Journal of Microbiology*, 2010, 48(2): 146–152.
- [21] Kan JJ, Clingenpeel S, Dow CL, McDermott TR, Macur RE, Inskeep WP, Nealson KH. Geochemistry and mixing drive the spatial distribution of free-living Archaea and Bacteria in Yellowstone Lake. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 210.
- [22] Gao PK, Tian HM, Wang YS, Li YS, Li Y, Xie JX, Zeng B, Zhou JF, Li GQ, Ma T. Spatial isolation and environmental factors drive distinct bacterial and archaeal communities in different types of petroleum reservoirs in China. *Scientific Reports*, 2016, 6: 20174.
- [23] Garcia-Pichel F, Loza V, Marusenko Y, Mateo P, Potrafka RM. Temperature drives the continental-scale distribution of key microbes in topsoil communities. *Science*, 2013, 340(6140): 1574–1577.
- [24] Persson T, Lundkvist H, Wirén A, Hyvönen R, Wessén B. Effects of acidification and liming on carbon and nitrogen mineralization and soil organisms in mor humus. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1989, 45(1): 77–96.
- [25] Bååth E, Berg B, Lohm U, Lundgren B, Lundkvist H, Rosswall T, Söderström B, Wirén A. Effects of experimental acidification and liming on soil organisms and decomposition in a Scots pine forest. *Pedobiologia*, 1980, 20(2): 85–100.



# High-throughput sequencing to reveal fungal diversity in hot springs of Rehai at Tengchong in Yunnan

Kaihui Liu<sup>1</sup>, Xiaowei Ding<sup>1\*</sup>, Bo Zhang<sup>1</sup>, Xiaofei Tang<sup>1</sup>, Min Xiao<sup>2</sup>, Wendong Xian<sup>2</sup>, Wenjun Li<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, Shaanxi Province, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, Guangdong Province, China

**Abstract:** [Objective] Fungal diversity and community structures were revealed in Rehai hot springs in Tengchong, Yunnan, and effects of sediment geochemical properties on fungal distribution were analyzed. [Methods] Fungal ITS genes were detected in the sediment metagenomes by high-throughput pyrosequencing and bioinformatic analysis. [Results] Total 343484 valid reads from 5 hot springs were obtained, and these reads included 5 phyla, 20 classes, and 66 orders. The hot springs Jiemeiquan right (JMQR), Jiemeiquan left (JMQL), Hamazui (M), Qiaoquan (QQ) and Gumingquan (GMQP) were dominated by communities such as Agaricales, Eurotiales, Capnodiales, and Hypocreales. A total of 365 genera were discovered in the hot springs studied. There were total 212 genera detected in JMQR, 197 in JMQL, 222 in M, 270 in QQ, and 179 in GMQP. *Schizophyllum* was a dominant genus of fungal community in JMQR, and *Penicillium* was highly frequent in JMQL. *Cladosporium* dominated fungal community in M and QQ, and *Engyodontium* was highly rich in GMQP. The geochemical variables such as NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, temperature, and pH, exerted effects on distribution of different dominant fungi in the hot springs. The pH in the hot springs had significant effect on fungal community composition. [Conclusion] Rehai hot springs in Tengchong, Yunnan, harbor surprisingly fungal diversity. Fungi in different samples had distinct community structures. The pH in the hot springs could be one of the factors determining the fungal community.

**Keywords:** Tengchong hot spring, fungal diversity, pyrosequencing

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31100017) and by the Shaanxi University of Technology Project (SLGQD16-06)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-84111727; E-mail: Xiaowei Ding, dxw518@163.com; Wenjun Li, liwenjun3@mail.sysu.edu.cn

Received: 13 January 2017; Revised: 19 February 2017; Published online: 17 March 2017



**李文均**, 中山大学生命科学学院百人计划/珠江学者特聘教授, 博士生导师。1996年于河南师范大学生物系获学士学位; 1999年于云南大学生命科学学院获硕士学位; 2002年毕业于中国科学院沈阳应用生态研究所获博士学位; 1999–2014年曾在云南大学云南省微生物研究所工作。现任国际原核微生物系统学委员会(International Committee on Systematics of Prokaryotes, ICSP)国际执委; 伯杰氏国际系统微生物学会(BISMIS)创始会员。兼任中国青年科技工作者协会常务理事、中国微生物学会微生物教学工作委员会副主任委员、中国微生物学会普通微生物专业委员会委员、中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会委员、微生物资源专业委员会委员。Antonie van Leeuwenhoek、*Frontiers in Microbiology*、*BioMed Research International*、*The Scientific World Journal*、*Journal of Arid Land*、*BISMIS Bulletin*、《微生物学报》、《微生物学杂志》等杂志编委及多个国内外期刊的通讯评审专家。主要从事高温、高盐等极端环境微生物分类及系统学, 微生物生态学, 极端酶学研究, 实验室主页: <http://www.liactlab.com/index.html>。