•研究报告•

腾格里沙漠东南缘藓结皮微生物组 基因多样性及功能

李靖宇^{1,2*} 刘建利^{1,2} 张 琇^{1,2} 王 猛¹ 杨 洲¹
靳新影¹ 苟 琪¹ 张翼飞³

1 (北方民族大学生物科学与工程学院, 银川 750021)

2 (宁夏特殊生境微生物资源开发与利用重点实验室, 银川 750021)

3 (内蒙古自治区环境科学研究院, 呼和浩特 010010)

摘要: 本研究对腾格里沙漠东南缘沙坡头地区藓结皮土壤样品进行了宏基因组测序, 以揭示该地区藓结皮土壤中参与固碳、固氮等生态功能的微生物基因及其代谢通路。结果表明, 藓结皮土壤中细菌域微生物最多, 其次为古生菌域和真核生物域。在细菌域中, 放线菌门(Actinobacteria)数量最多, 其次是变形菌门(Proteobacteria)和蓝细菌门(Cyanobacteria)。基于eggNOG和KEGG数据库对构建的非冗余基因集进行功能预测, 藓结皮土壤中微生物基因多样性和代谢路径多样性高。藓结皮土壤中与固氮相关的代谢通路丰度低可能是藓结皮固氮量微弱的根本原因, 造成利用大气中氮气合成氨的生态功能减弱。而藓结皮已经形成的氮库主要通过硝酸盐还原途径将硝酸盐还原成铵盐, 可能用于藓结皮微生物组自身的氨基酸合成, 也可能为藓类植物的生长提供有效氮源。

关键词: 微生物群落; 生物土壤结皮; 沙坡头沙漠; HiSeq测序

Gene diversity and its function in the soil microbiome for moss crusts found southeast of the Tengger Desert

Jingyu Li^{1,2*}, Jianli Liu^{1,2}, Xiu Zhang^{1,2}, Meng Wang¹, Zhou Yang¹, Xinying Jin¹, Qi Gou¹, Yifei Zhang³

1 College of Biological Science & Engineering, North Minzu University, Yinchuan 750021

2 Ningxia Key Laboratory of Microbial Resources Development and Applications in Special Environment, Yinchuan 750021

3 Inner Mongolia Academy of Environmental Science, Hohhot 010010

Abstract: Metagenomics sequencing was used to reveal the diversity of genes and their metabolic pathways involved in carbon sequestration and nitrogen fixation in moss crusts in Shapotou region, located southeast of the Tengger Desert. Results showed that the microbial community related to the bacteria domain in the moss crust was the largest, followed by archaea and eukaryota. In the bacterial domain, the most abundant phyla was the Actinobacteria, followed by the Proteobacteria and Cyanobacteria. Based on the functional classification of eggNOG and KEGG databases for the functional prediction of non-redundant gene catalog, the diversity of gene and metabolic pathways in the moss crust soil was high. Low nitrogen fixation was found in the moss crust as there are less metabolic pathways related to nitrogen-fixation, weakening the ecological function of ammonia synthesis from atmosphere nitrogen. The nitrate from the nitrogen pool formed by moss crust were mainly reduced to ammonium salt by nitrate reduction pathway, which may be used for the synthesis of amino acids for microbiome in the moss crust, and may also provide an effective nitrogen source for the growth of mosses.

Key words: microbial communities; biological soil crust; Shapotou Desert; HiSeq sequencing

收稿日期: 2018-01-29; 接受日期: 2018-03-16

基金项目: 国家自然科学基金(41661053)、2018 年度北方民族大学校级一般科研项目(2018XYZSK01)和宁夏特色微生物资源开发与利用创新团队科研项目(2018TSW04)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: lijingyu1986@126.com

生物土壤结皮(biological soil crusts, BSCs)是干旱半干旱荒漠地表景观的重要组成部分,由隐花植物如蓝细菌、绿藻、硅藻、地衣、苔藓和土壤中微生物以及其他相关生物体通过菌丝体、假根和分泌物等与土壤表层颗粒胶结形成十分复杂的有机复合体(李新荣等, 2009; 张元明和王雪芹, 2010; Pointing & Belnap, 2012; 刘艳梅等, 2014)。其覆盖度占荒漠地表活体覆盖的40%以上,是荒漠生态系统的重要构建者和组成成分(Bowker, 2007)。随着结皮的发育演替,结皮中生物群落结构不断变化,显著改变了干旱、半干旱环境中表层土壤的物理属性(韩炳宏等, 2017)。不同发育演替阶段生物土壤结皮在固碳/固氮效率、抗压强度、土壤质地、土壤孔隙度等方面存在明显差别(吴丽等, 2014; 韩炳宏等, 2017)。腾格里沙漠东南缘沙坡头地区生物土壤结皮一般按照“藻结皮→地衣结皮→藓结皮”的模式发育演替(吴丽等, 2014),其中,藻结皮和藓结皮中变形菌(Proteobacteria)和蓝细菌(Cyanobacteria)丰度存在明显差异,在藻结皮向藓结皮演化的过程中,变形菌丰度增加明显,蓝细菌丰度下降明显(李靖宇等, 2017)。微生物是生物土壤结皮的重要组成部分,其中具有固氮能力的可以增加表层土壤的氮输入,具有固碳能力的可以增加表层土壤的有机质含量(高丽倩等, 2018)。土壤藻类、地衣、藓类是沙丘生物土壤结皮不同发育阶段提高土壤养分含量的主要因子(何芳兰等, 2017)。目前对于导致生物土壤结皮这些生态功能及理化特性方面差异的内在机制并没有进行深入的研究(吴丽等, 2014)。

土壤微生物多样性作为土壤生态系统的—个基本生命特征,存在于基因、物种、种群以及群落等4个层面(林先贵和胡君利, 2008)。土壤微生物通过具有生物活性的酶参与一系列的代谢活动,编码相关酶的功能基因作为土壤微生物功能标记物,成为了解微生物功能多样性信息与土壤功能之间关系的纽带(张晶等, 2006)。为了更好地描述环境中微生物群落的生态功能,宏基因组技术通过非培养的手段,基于环境样品中所有微生物的DNA来获得微生物群落遗传信息(刘洋荧等, 2017)。借助生物信息学分析软件和蛋白质数据库,可以预测分析蛋白质序列并注释蛋白质功能,分析潜在的基因功能(马海霞等, 2015)。揭示土壤微生物的物种和基因多样性形成机制与时空分布格局对于深入认识地下生

态系统的结构和功能具有重要意义(李香真等, 2016)。诸如细菌和古细菌的16S rRNA基因等标记经常用于表征环境样品的分类组成和系统发育多样性,可以回答“群落中有谁在?”的基本问题(Langille et al, 2013)。目前,针对腾格里沙漠东南缘沙坡头地区生物土壤结皮中微生物多样性的报道主要是通过16S rRNA Illumina MiSeq测序技术对不同生物土壤结皮中微生物物种多样性的描述(Liu et al, 2017; 李靖宇等, 2017)。然而,标记基因研究主要集中在一个或几个通用基因上,所以不能直接鉴定微生物的代谢或其他功能(Langille et al, 2013)。相反,宏基因组测序旨在对群落中所有基因进行采样,并能够产生详细的代谢和功能特征,可以解释“菌群具体能干什么?”的问题(Langille et al, 2013)。

本文借助宏基因组学技术的优势,以腾格里沙漠东南缘广泛分布的生物土壤结皮优势组分藓类结皮土壤中微生物基因组DNA为研究对象,试图回答以下几个科学问题:(1)在宏基因组水平上,藓结皮土壤微生物群落结构的组成情况如何?(2)在基因及其代谢路径水平上,与固碳、固氮等重要生态功能相关的通路主要有哪些?(3)通过宏基因组学分析,能否找到解释藓结皮固氮效率低的原因?本文利用Illumina HiSeq测序技术,预测腾格里沙漠东南缘藓结皮土壤中会存在很高的基因以及代谢通路多样性,可为深入分析藓结皮在荒漠生态系统中参与物质循环和能量代谢过程中的基因多样性提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究区域与藓结皮土壤样品采集

研究区域主要设在宁夏回族自治区中卫市沙坡头地区腾格里沙漠东南缘(37°32' N, 105°02' E)。该地区年均气温10.0℃,低温极值-25.1℃,高温极值38.1℃,全年日照时数3,264 h,年均降水量186.2 mm (1956–2012年),年潜在蒸发量3,000 mm,年均风速2.9 m/s,年均沙尘暴天数59天(李靖宇等, 2017)。2017年6月12日选取沙坡头地区生物土壤结皮形成带中藓结皮发育良好的位点进行取样,以藓结皮形成的自然厚度为取样深度,样点设置共6个,每个样点按照五点取样法进行取样。将土样带回实验室,过2 mm筛子,将6个采样点样品混合均匀,于-80℃冷冻保存,用于后续宏基因组DNA提取分析。取样点位见附录1。

1.2 藓结皮土壤宏基因组DNA提取和Illumina高通量测序

按照FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)提取试剂盒说明书提取土壤宏基因组DNA, 利用1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA。将纯化后的宏基因组DNA破碎成片段, 按照TruSeq™ DNA Sample Prep Kit试剂盒说明书构建PE (paired-end)文库, 文库质检DNA片段的峰值为468 bp。然后根据HiSeq 3000/4000 PE Cluster Kit试剂盒说明书进行桥式PCR扩增。随后, 按照Illumina公司提供的标准实验流程, 通过HiSeq 2000高通量测序平台(Illumina)进行测序。

1.3 基因多样性及其功能分析

PE文库的测序原始数据分别存放在fq1和fq2两个文件里。为了提高后续分析的质量和可靠性, 使用软件Seqprep (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>)对序列3'端和5'端进行质量剪切, 在此基础上, 使用软件Sickle (<https://github.com/najoshi/sickle>)去除剪切后长度小于50 bp、平均质量值低于20以及含N碱基(N代表A、T、C、G四种碱基)的reads。在获得高质量reads的基础上, 使用IDBA-UD (http://i.cs.hku.hk/~alse/hkubrg/projects/idba_ud/)对其进行拼接, 获得contigs, 然后将所有reads映射到拼接好的contigs上, 没有映射上的reads继续进行IDBA-UD拼接。拼接结果产生的contigs中, 将长度小于1,000 bp的contigs使用newbler (https://swes.cals.arizona.edu/maier_lab/kartchner/documentation/index.php/home/docs/newbler)软件继续进行拼接, 最后获得总的contigs。使用MetaGene (<http://metagene.cb.k.u-tokyo.ac.jp/>)对拼接结果中的contigs进行ORF (open reading frame)预测。将藓结皮土壤样品中预测出来的基因序列, 用CD-HIT 软件 (<http://www.bioinformatics.org/cd-hit/>)进行聚类(参数为: 95% identity, 90% coverage), 每一类取最长的基因作为代表序列, 构建非冗余基因集(non-redundant gene catalog)。使用SOAPaligner 软件(<http://soap.genomics.org.cn/>), 分别将每个样品的高质量reads与非冗余基因集进行比对(95% identity), 统计基因在对应样品中的丰度信息。使用BLASTP (BLAST Version 2.2.28+, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)将基因集序列与eggNOG数据库进行比对, 获得基因对应的COG (clusters of orthologous groups of proteins)。使用BLASTP (BLAST

Version 2.2.28+, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 将基因集序列与KEGG的基因数据库(GENES)进行比对; 根据比对结果, 使用KOBAS 2.0 (KEGG Orthology Based Annotation System, <http://kobas.cbi.pku.edu.cn/home.do>)进行功能注释。使用BLASTP (BLAST Version 2.2.28+, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)将本研究中构建的非冗余基因集与NR数据库进行比对, 并通过NR库对应的分类学信息数据库获得物种注释, 然后使用物种对应的基因丰度总和计算该物种的丰度, 并在域、界、门、纲、目、科、属、种各个分类学水平上统计物种在各个样品中的丰度。

2 结果

2.1 藓结皮土壤中宏基因组轮廓

通过Illumina Hiseq技术对藓结皮土壤样品进行宏基因组测序, 共获得189,477,554条高质量序列; 经过序列拼接, 共获得512,025条contigs; 对其进行ORFs预测, 共获得752,235个潜在的基因。在此基础上, 通过构建一个非冗余基因集(non-redundant gene catalog)来描述该类环境所有基因的整体信息(Qin et al, 2010)。通过聚类, 选择每类中最长的基因作为代表序列, 构建非冗余基因集, 共获得741,233个基因, 对应13,444,207条reads (约占所有高质量reads的7.1%), 意味着92.9%的reads目前还不能确定其相应的功能分类, 可能在藓结皮土壤宏基因组参与的其他生命活动过程中发挥着重要作用。从物种多样性角度讲, 属于细菌域的reads有12,217,378条, 占有reads的6.45%。其中, 放线菌门数量最多, 其次是变形菌门和蓝细菌门; 属于古生菌域的reads有167,442条, 占有reads的0.09%; 属于真核生物域的reads有76,170条(图1)。在189,477,554条高质量reads中, 仅有约6.58%的序列可以匹配到现有数据库中的细菌域、古生菌域以及真核生物域, 仍有93.42%的reads没有匹配到已有数据库中记录的任何已知生物序列。

2.2 基于非冗余基因集的基因功能预测

本文基于宏基因组测序数据, 主要利用KEGG (<http://www.kegg.jp/>)和eggNOG (<http://eggnogdb.embl.de/#/app/home>)对预测到的非冗余基因集进行了基因功能预测, 以便从宏观层面初步了解该地区藓结皮土壤中微生物群落整体所包含的基因功能轮廓。

图1 藓结皮土壤中微生物宏基因组在域(A)和门(B)水平上的轮廓

Fig. 1 The profile of microbial metagenome in the moss-crust soil at the domain (A) and phylum (B) level

基于eggNOG数据库,对腾格里沙漠东南缘沙坡头地区藓结皮土壤中获得的非冗余基因集进行了基因功能预测,共有11,223,167条reads可以对应到相应的功能注释结果中,其中2,924,602条reads属于未知功能类别,占可预测reads的26.06%。在已知的基因功能分类中,氨基酸转运和代谢类别所含reads最多,其次是复制、重组和修复>信号转导机制>能量产生与转换>碳水化合物转运与新陈代谢>细胞壁、细胞膜、细胞被膜生物合成>转录>无机离子转运和新陈代谢>翻译、核糖体结构与生物合成>翻译后修饰、蛋白质周转、分子伴侣>次生代谢产物生物合成,运输与分解代谢>脂类转运与新陈代谢>辅酶运输与代谢>核苷酸转运与代谢>防御机制>细胞内运输、分泌与液泡运输>细胞周期控制、细胞分裂、染色体分配>细胞运动(图2)。

基于KEGG数据库,对腾格里沙漠东南缘沙坡头地区藓结皮土壤中获得的非冗余基因集进行了基因功能预测,共有6,759,763条reads可以对应到相应的功能注释结果中。在level-1水平上,属于代谢类别的reads有4,584,836条,属于遗传信息处理类别的有713,450条,属于人类疾病类别的有592,556条,属于环境信息处理类别的有511,292条,属于细胞

过程类别的有439,024条,属于生物系统类别的有203,430条。在level-2水平上,属于代谢类别的功能分类中丰度依次为碳水化合物代谢>氨基酸代谢>能量代谢>辅因子和维生素的代谢>核苷酸代谢>脂质代谢>其他氨基酸代谢>异生素生物降解与新陈代谢>萜类和聚酮化合物代谢>其他次生代谢物生物合成>多糖生物合成与代谢;属于遗传信息处理类别的功能分类中丰度依次为翻译>复制与修复>折叠,分类与降解>转录;属于人类疾病类别的功能分类中丰度依次为传染性疾病(细菌)>癌症(概述)>耐药性(抗菌)>内分泌和代谢疾病>耐药性(抗肿瘤)>心血管疾病>神经退行性疾病>癌症(特定类型)>传染病(寄生虫)>物质依赖>免疫疾病>传染性疾病(病毒);属于环境信息处理类别的功能分类中丰度依次为膜运输>信号转导>信号分子与相互作用;属于细胞过程类别的功能分类中丰度依次为细胞群落(原核生物)>细胞生长与死亡>细胞运动>运输与分解代谢>细胞群落(真核生物)(图3A)。在level-3水平上,主要功能分类中丰度最多的主要是与碳代谢、氨基酸生物合成、嘌呤代谢、ABC转运体、嘧啶代谢、群体感应、氧化磷酸化、双组分体系等功能相关,图3B列出了腾格里沙漠东南缘沙坡

图2 基于eggNOG基因功能分类对非冗余基因集的功能注释

Fig. 2 Functional annotation for non-redundant gene sets based on the functional classification of eggNOG genes

头地区藓结皮土壤中丰度前50个相关功能分类。

2.3 碳、氮代谢路径预测及其生态功能分析

为了深入分析腾格里沙漠东南缘沙坡头地区藓结皮土壤中微生物组从大气中固定CO₂的碳代谢潜在合成路径,通过基于非冗余基因集的预测,初步获得藓结皮固碳过程中的一些主要代谢路径(图4),包括存在于原核生物中的:(1)还原性柠檬酸循环途径;(2)二羧酸-羟基丁酸循环途径;(3)羟基丙酸酯-羟基丁酸酯循环途径;(4)3-羟基丙酸酯循环途径;(5)还原性乙酰-CoA途径;(6)磷酸乙酰转移酶-乙酸激酶途径;且其对应的相对丰度依次递减,但这并不能说明丰度高的代谢路径就一定比其他代谢路径在固碳效率上贡献大。在光合生物固碳途径中主要包括:(1)卡尔文循环;(2)还原性戊糖磷酸循环(甘油醛-3P =>核酮糖-5P);(3)C4-二羧酸循环(NADP-苹果酸酶类型);(4)还原戊糖磷酸循环(核酮糖-5P =>甘油醛-3P);(5)C4-二羧酸循环(NAD-苹果酸酶类型);(6)景天酸代谢(光照);(7)景天酸代谢(黑暗);(8)C4-二羧酸循环(磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶类型)(图4B)。

本文从代谢通路角度分析了腾格里沙漠东南缘沙坡头地区藓结皮土壤中氮代谢的相关路径,主要包括异化性硝酸盐还原、同化性硝酸盐还原、反硝化作用以及固氮作用(图4C)。其中,异化性硝酸盐还原以及同化性硝酸盐还原路径主要围绕硝酸盐还原的方向进行,主要代谢产物为铵态氮,这可能与eggNOG与KEGG预测的功能分类中氨基酸代谢相关reads较高有关,这可为氨基酸代谢提供氨基反应原料。

3 讨论

在土壤学的研究中,长期将土壤作为一个“黑箱”系统来对待,对其中的生物组成及其参与的生化过程知之甚少(贺纪正等,2012)。对于腾格里沙漠东南缘沙坡头地区藓结皮土壤来说,不论从基因角度还是物种角度看,都存在很高的多样性(Liu et al, 2017; 图3)。因其在干旱、半干旱环境中独特的生态功能,藓结皮土壤“黑箱”中微生物驱动的物质循环和养分转化在基因层面或代谢功能中发挥的作用成为进一步深入了解藓结皮的重要切入点。基于

图3 基于KEGG基因功能分类在水平2(A)和水平3(B)对非冗余基因集的功能注释(纵坐标中, KEGG功能分类的中文翻译见附录2)

Fig. 3 Functional annotation at level 2 (A) and level 3 (B) for non-redundant gene sets based on the functional classification of KEGG

宏基因组学技术的快速发展及其优势, 本研究克服了基于传统的培养方法对于认识土壤微生物群落组成和功能的局限性, 从基因层面及其相关代谢通路预测着手, 较为深入地分析了藓结皮土壤中宏基因组轮廓, 从物种组成、基因预测、基因功能注释以及代谢路径分析的角度, 初步描绘了腾格里沙漠东南缘沙坡头地区藓结皮在荒漠生态系统中参与物质循环和能量代谢过程的基本情况。腾格里沙漠

东南缘广泛分布着不同发育阶段的生物土壤结皮, 藓类结皮作为生物土壤结皮层的优势组分, 其繁衍与拓殖对养分循环过程具有深远影响(虎瑞等, 2014)。微生物群落结构及其多样性的变化通常会导致生态系统过程速率的改变, 但这种改变更可能是微生物群落包含的功能特征导致的结果(Griffiths & Philippot, 2013)。有研究表明, 一些微生物过程的强弱可能受相关功能基因的丰度和多样性的影响, 这

图4 基于KEGG基因功能分类的碳、氮代谢途径注释

Fig. 4 Carbon and nitrogen metabolic pathway modules based on the functional classification of KEGG

些基因可用来作为评估微生物群落潜在功能的参数(Paula et al, 2014)。土壤微生物组通过宏基因组技术手段, 基于环境样品中所有微生物DNA序列信息来预测潜在的基因功能, 从而给出特定土壤环境中可能的代谢路径, 为深入分析具体生态系统过程的速率提供科学依据。对于腾格里沙漠东南缘沙坡头地区藓结皮在固碳、固氮、改变土壤质地等方面的具体生态功能, 微生物参与的过程发挥了重要作用。然而, 本研究没有设置参照系, 无法比较藓结皮和藻结皮以及裸沙土壤微生物组之间的差异, 对于理解不同结皮类型的形成机制提供信息不够充分, 但可为后续深入探讨分析不同结皮的形成机制提供一些基本数据和参考。

土壤有机质是土壤的最关键属性, 是土壤质量的核心(潘根兴等, 2015)。微生物是土壤最活跃的组份, 从定植于土壤母质的蓝绿藻开始, 到土壤肥力的形成, 土壤微生物参与了土壤发生、发展、发育的全过程(宋长青等, 2013)。土壤微生物作为BSCs的重要组成部分之一, 推动着荒漠生态系统的能量流动和物质循环, 在维持荒漠生态系统整体服务功能方面发挥着重要作用。生物土壤结皮作为具有光合固碳活性的土壤与大气系统界面层, 对于固定大气中CO₂至关重要, 其中卡尔文循环主要存在于绿色植物、蓝细菌、绝大多数光合细菌和全部好氧的化能自养菌中, 还原柠檬酸循环存在于少数光合紫色细菌和绿硫细菌中, 二羧酸-羟基丁酸循环途径和羟基丙酸-羟基丁酸循环途径两者存在一些相同的反应步骤, 存在于泉古生菌中, 3-羟基丙酸双循环途径存在于*Chloroflexus aurantiacus*等光合细菌中, 还原性乙酰-CoA途径存在于产甲烷菌、硫酸盐还原菌和产乙酸菌等化能自养的厌氧细菌和古生菌中, 这些固碳过程被认为是地球上最重要的生命过程之一(王洪杰等, 2013; 辜晨等, 2017)。在受氮素限制的干旱荒漠生态系统中, 外部氮素的输入对荒漠生态系统具有重要意义。氮素限制在陆地生态系统中普遍存在, 在干旱环境中表现得尤为明显, 氮素可利用性是除水分之外影响该区域生态系统生物活性的关键控制因子(张鹏等, 2011)。氮素可利用性的动态变化及其影响因素对于了解荒漠生态系统初级生产力、养分循环和土壤氮循环过程具有重要意义(虎瑞等, 2015)。BSCs的氮固定是荒漠生态系统土壤氮素提高的一个重要生物来源, 目前主要集中在

在土壤净氮矿化作用、微生物生物量碳氮、固氮酶活性及其影响因子等方面的研究(张鹏等, 2011; Hu et al, 2015a; 虎瑞等, 2015)。土壤中80%以上的氮不能被植物直接吸收利用, 需要通过微生物的矿化作用转化为铵态氮和硝态氮形式的有效氮(虎瑞等, 2015)。少量的氮素增加能够带来生态系统结构和功能的显著改变(周晓兵等, 2016)。而藓类结皮的主要组成部分苔藓植物并不具有固氮作用, 其微弱的固氮量是结皮中混生的少量蓝细菌或地衣所致(张鹏等, 2011), 这与本研究在固氮通路预测的reads数量少的结果一致。藓类结皮的繁衍与拓殖能够调节土壤有效氮含量, 本研究与氮矿化相关的代谢路径预测到的reads数量较多, 可促进土壤氮矿化过程, 增加氮的可利用性, 是影响土壤氮素循环的重要生物因素(Hu et al, 2014, 2015; 虎瑞等, 2015)。

4 结论

腾格里沙漠东南缘藓结皮土壤微生物组参与的碳、氮生物地球化学过程在代谢路径上多样性高, 在物种多样性上主要形成以细菌域为优势类群, 包含低丰度古生菌域和真核生物域的群落结构特征。在细菌域中形成主要以放线菌门、变形菌门和蓝细菌门为主要类群的群落结构特征。与碳输入相关的代谢路径多样性高对于藓结皮生产力、土壤肥力的形成至关重要。藓结皮土壤中与固氮相关的代谢通路丰度低可能是该地区藓结皮固氮量微弱的根本原因。藓结皮已经形成的氮库主要通过硝酸盐还原途径将硝酸盐还原成铵盐, 可能用于藓结皮微生物组自身的氨基酸合成, 也可能为藓类植物的生长提供有效氮源。

本文没有比较藓结皮与藻结皮或者裸沙土壤样品中微生物宏基因组的异同点, 在目前情况下还不能清晰地描绘出藓结皮特有的功能微生物类群, 特别是参与碳、氮等重要生命元素输入过程的一些重要功能微生物、功能基因以及功能代谢路径。基于藓结皮宏基因组数据, 通过已有数据库能够注释的基因序列较少, 这些未知序列在微生物组参与藓结皮生物地球化学循环过程中的具体作用未知。

参考文献

Bowker MA (2007) Biological soil crust rehabilitation in theory and practice: An underexploited opportunity. Restoration

Ecology, 15, 13–23.

- Gao LQ, Zhao YG, Xu MX, Sun H, Yang QY (2018) The effects of biological soil crust succession on soil ecological stoichiometry characteristics. *Acta Ecologica Sinica*, 38, 678–688. (in Chinese with English abstract) [高丽倩, 赵允格, 许明祥, 孙会, 杨巧云 (2018) 生物土壤结皮演替对土壤生态化学计量特征的影响. *生态学报*, 38, 678–688.]
- Griffiths BS, Philippot L (2013) Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, 112–129.
- Gu C, Jia XH, Wu B, Cheng L, Yang ZW, Yang DF, Zhao XB (2017) Effect of simulated precipitation on the carbon flux in biological-soil crusted soil in alpine sandy habitats. *Acta Ecologica Sinica*, 37, 4423–4433. (in Chinese with English abstract) [辜晨, 贾晓红, 吴波, 成龙, 杨占武, 杨德福, 赵雪彬 (2017) 高寒沙区生物土壤结皮覆盖土壤碳通量对模拟降水的响应. *生态学报*, 37, 4423–4433.]
- Han BH, Niu DC, He L, Ren YT, Wu R, Fu H (2017) A review on the development and effect of biological soil crusts. *Pratacultural Science*, 34, 1793–1801. (in Chinese with English abstract) [韩炳宏, 牛得草, 贺磊, 任运涛, 吴让, 傅华 (2017) 生物土壤结皮发育及其影响因素研究进展. *草业科学*, 34, 1793–1801.]
- He FL, Guo CX, Wu H, Liu ZJ, Xu W, Jin HX (2017) Effect of biological soil crust succession on soil texture, nutrient contents, and microbial populations of dune surfaces at the edge of the Minqin Oasis. *Acta Ecologica Sinica*, 37, 6064–6073. (in Chinese with English abstract) [何芳兰, 郭春秀, 吴昊, 刘左军, 徐文, 金红喜 (2017) 民勤绿洲边缘沙丘生物土壤结皮发育对浅层土壤质地、养分含量及微生物数量的影响. *生态学报*, 37, 6064–6073.]
- He JZ, Yuan CL, Shen JP, Zhang LM (2012) Methods for and progress in research on soil metagenomics. *Acta Pedologica Sinica*, 49, 155–164. (in Chinese with English abstract) [贺纪正, 袁超磊, 沈菊培, 张丽梅 (2012) 土壤宏基因组学研究方法与进展. *土壤学报*, 49, 155–164.]
- Hu R, Wang XP, Pan YX, Zhang YF, Zhang K, Zhang H (2014) Responses of net soil nitrogen mineralization rate in moss-covered soil to hydrothermic factors in Shapotou regions, northern China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 25, 394–400. (in Chinese with English abstract) [虎瑞, 王新平, 潘颜霞, 张亚峰, 张珂, 张浩 (2014) 沙坡头地区藓类结皮土壤净氮矿化作用对水热因子的响应. *应用生态学报*, 25, 394–400.]
- Hu R, Wang XP, Pan YX, Zhang YF, Zhang H, Chen N (2015) Seasonal dynamics of soil net nitrogen mineralization under moss crust in Shapotou region, northern China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 26, 1106–1112. (in Chinese with English abstract) [虎瑞, 王新平, 潘颜霞, 张亚峰, 张浩, 陈宁 (2015) 沙坡头地区藓类结皮土壤净氮矿化作用的季节动态. *应用生态学报*, 26, 1106–1112.]
- Hu R, Wang XP, Pan YX, Zhang YF, Zhang H (2014) The response mechanisms of soil N mineralization under biological soil crusts to temperature and moisture in temperate desert regions. *European Journal of Soil Biology*, 62, 66–73.
- Hu R, Wang XP, Pan YX, Zhang YF, Zhang H, Chen N (2015) Seasonal variation of net N mineralization under different biological soil crusts in Tengger Desert, North China. *Catena*, 127, 9–16.
- Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepile DE, Vega Thurber RL, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C (2013) Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31, 814–821.
- Li JY, Zhang X (2017) Microbial diversity analysis of different biological soil crusts in Tengger Desert. *Ecological Science*, 36, 36–42. (in Chinese with English abstract) [李靖宇, 张琇 (2017) 腾格里沙漠不同生物土壤结皮微生物多样性分析. *生态科学*, 36, 36–42.]
- Li XR, Zhang YM, Zhao YG (2009) A study of biological soil crusts: Recent development trend and prospect. *Advances in Earth Science*, 24, 11–24. (in Chinese with English abstract) [李新荣, 张元明, 赵允格 (2009) 生物土壤结皮研究: 进展、前沿与展望. *地球科学进展*, 24, 11–24.]
- Li XZ, Guo LD, Li JB, Yao MJ (2016) Soil microbial diversity observation in China: Current situation and future consideration. *Biodiversity Science*, 24, 1240–1248. (in Chinese with English abstract) [李香真, 郭良栋, 李家宝, 姚敏杰 (2016) 中国土壤微生物多样性监测的现状和思考. *生物多样性*, 24, 1240–1248.]
- Lin XG, Hu JL (2008) Scientific connotation and ecological service function of soil microbial diversity. *Acta Pedologica Sinica*, 45, 892–900. (in Chinese with English abstract) [林先贵, 胡君利 (2008) 土壤微生物多样性的科学内涵及其生态服务功能. *土壤学报*, 45, 892–900.]
- Liu L, Liu Y, Zhang P, Song G, Hui R, Wang Z, Wang J (2017) Development of bacterial communities in biological soil crusts along a revegetation chronosequence in the Tengger Desert, northwest China. *Biogeosciences*, 14, 3801–3814.
- Liu YM, Yang HY, Li XR (2014) Effects of biological soil crusts on soil microbial biomass in desert area. *Acta Pedologica Sinica*, 51, 394–401. (in Chinese with English abstract) [刘艳梅, 杨航宇, 李新荣 (2014) 生物土壤结皮对荒漠区土壤微生物生物量的影响. *土壤学报*, 51, 394–401.]
- Liu YY, Wang S, Li SZ, Deng Y (2017) Advances in molecular ecology on microbial functional genes of carbon cycle. *Microbiology China*, 44, 1676–1689. (in Chinese with English abstract) [刘洋洋, 王尚, 厉舒祯, 邓晔 (2017) 基于功能基因的微生物碳循环分子生态学研究进展. *微生物学通报*, 44, 1676–1689.]
- Ma HX, Zhang LL, Sun XM, Zhang HQ, He MX, Chen GJ, Wang LS (2015) Understanding microbial communities and their functions by meta-omics approaches. *Microbiology*

- China, 42, 902–912. (in Chinese with English abstract) [马海霞, 张丽丽, 孙晓萌, 张怀强, 何明雄, 陈冠军, 王禄山 (2015) 基于宏组学方法认识微生物群落及其功能. 微生物学通报, 42, 902–912.]
- Pan GX, Lu HF, Li LQ, Zheng JF, Zhang XH, Cheng K, Liu XY, Bian RJ, Zheng JW (2015) Soil carbon sequestration with bioactivity: A new emerging frontier for sustainable soil management. *Advances in Earth Science*, 30, 940–951. (in Chinese with English abstract) [潘根兴, 陆海飞, 李恋卿, 郑聚锋, 张旭辉, 程琨, 刘晓雨, 卞荣军, 郑金伟 (2015) 土壤碳固定与生物活性: 面向可持续土壤管理的新前沿. 地球科学进展, 30, 940–951.]
- Paula FS, Rodrigues JL, Zhou J, Wu L, Mueller RC, Mirza BS, Bohannan BJ, Nusslein K, Deng Y, Tiedje JM, Pellizari VH (2014) Land use change alters functional gene diversity, composition and abundance in Amazon forest soil microbial communities. *Molecular Ecology*, 23, 2988–2999.
- Pointing SB, Belpap J (2012) Microbial colonization and controls in dryland systems. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 551–562.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, Ehrlich SD (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 59–65.
- Song CQ, Wu JS, Lu YH, Shen QR, He JZ, Huang QY, Jia ZJ, Leng SY, Zhu YG (2013) Advances of soil microbiology in the last decade in China. *Advances in Earth Science*, 10, 1087–1105. (in Chinese with English abstract) [宋长青, 吴金水, 陆雅海, 沈其荣, 贺纪正, 黄巧云, 贾仲君, 冷疏影, 朱永官 (2013) 中国土壤微生物学研究10年回顾. 地球科学进展, 10, 1087–1105.]
- Wang HJ, Ni J, Zhang Y, Zhang L, Xin YY (2013) The progress of studies on a unique carbon dioxide fixation pathway: 3-hydroxypropionate cycle. *Microbiology China*, 40, 304–315. (in Chinese with English abstract) [王洪杰, 倪俊, 张怡, 张玲, 辛越勇 (2013) 新型固碳途径—3-羟基丙酸循环的研究进展. 微生物学通报, 40, 304–315.]
- Wu L, Zhang GK, Chen XG, Lan SB, Zhang DL, Hu CX (2014) Development and succession of biological soil crusts and the changes of microbial biomasses. *Environmental Science*, 35, 1479–1485. (in Chinese with English abstract) [吴丽, 张高科, 陈晓国, 兰书斌, 张德禄, 胡春香 (2014) 生物结皮的发育演替与微生物生物量变化. 环境科学, 35, 1479–1485.]
- Zhang J, Zhang HW, Li XY, Su ZC, Zhang CG (2006) Soil microbial ecological process and microbial functional gene diversity. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 17, 1129–1132. (in Chinese with English abstract) [张晶, 张惠文, 李新宇, 苏振成, 张成刚 (2006) 土壤微生物生态过程与微生物功能基因多样性. 应用生态学报, 17, 1129–1132.]
- Zhang P, Li XR, Jia RL, Hu YG, Huang L (2011) Nitrogenase activity of biological soil crusts and its response to hydrothermic factors in the Shapotou region of northern China. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 35, 906–913. (in Chinese with English abstract) [张鹏, 李新荣, 贾荣亮, 胡宜刚, 黄磊 (2011) 沙坡头地区生物土壤结皮的固氮活性及其对水热因子的响应. 植物生态学报, 35, 906–913.]
- Zhang YM, Wang XQ (2010) Summary on formation and developmental characteristics of biological soil crusts in desert areas. *Acta Ecologica Sinica*, 30, 4484–4492. (in Chinese with English abstract) [张元明, 王雪芹 (2010) 荒漠地表生物土壤结皮形成与演替特征概述. 生态学报, 30, 4484–4492.]
- Zhou XB, Yin BF, Zhang YM (2016) The effects of simulated nitrogen deposition on growth and photosynthetic physiology of three types of biocrusts. *Acta Ecologica Sinica*, 36, 3197–3205. (in Chinese with English abstract) [周晓兵, 尹本丰, 张元明 (2016) 模拟氮沉降对不同类型生物土壤结皮生长和光合生理的影响. 生态学报, 36, 3197–3205.]

(责任编辑: 贺纪正 责任编辑: 时意专)

附录 Supplementary Material

附录1 本研究中的藓结皮采样点

Appendix 1 The sampling sites for moss crusts in this study
<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2018026-1.pdf>

附录2 本文图3中基于KEGG基因功能分类对非冗余基因集的功能注释(level 3)英-中文名词对照表

Fig. 3 The Chinese translation of the functional annotation at level 3 for non-redundant gene sets based on the functional classification of KEGG
<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2018026-2.pdf>

李靖宇, 刘建利, 张琇, 王猛, 杨洲, 靳新影, 苟琪, 张翼飞. 腾格里沙漠东南缘藓结皮微生物组基因多样性及功能. 生物多样性, 2018, 26 (7): 727–737.
<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2018026>

附录1 本研究中的藓结皮采样点

Appendix 1 The sampling sites for moss crusts in this study

李靖宇, 刘建利, 张琇, 王猛, 杨洲, 靳新影, 苟琪, 张翼飞. 腾格里沙漠东南缘藓结皮微生物组基因多样性及功能. 生物多样性, 2018, 26 (7): 727–737.
<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2018026>

附录2 本文图3中基于KEGG基因功能分类对非冗余基因集的功能注释(level 3)英-中文名词对照表
Appendix. 2 The Chinese translation of the functional annotation at level 3 for non-redundant gene sets based on the functional classification of KEGG

beta-Alanine metabolism	β-丙氨酸代谢
Pantothenate and CoA biosynthesis	泛酸盐与辅酶 A 生物合成
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	苯丙氨酸, 酪氨酸与色氨酸生物合成
Cell cycle - Caulobacter	细胞周期-杆菌属
Carbon fixation in photosynthetic organisms	光合生物体中的碳固定
RNA polymerase	RNA 聚合酶
Fatty acid biosynthesis	脂肪酸生物合成
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	缬氨酸, 亮氨酸与异亮氨酸生物合成
Peptidoglycan biosynthesis	肽聚糖生物合成
Nitrogen metabolism	氮代谢
DNA replication	DNA 复制
Benzoate degradation	苯甲酸酯降解
Mismatch repair	错配修复
Arginine biosynthesis	精氨酸生物合成
Lysine degradation	赖氨酸降解
Nucleotide excision repair	核苷酸切除修复
Arginine and proline metabolism	精氨酸与脯氨酸代谢
Phenylalanine metabolism	苯丙氨酸代谢
Pentose phosphate pathway	磷酸戊糖途径
Homologous recombination	同源重组
Porphyrin and chlorophyll metabolism	卟啉与叶绿素代谢
Tryptophan metabolism	色氨酸代谢
Fatty acid degradation	脂肪酸降解
RNA degradation	RNA 降解
Cysteine and methionine metabolism	半胱氨酸与蛋氨酸代谢
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	氨基糖与核苷酸糖代谢
Starch and sucrose metabolism	淀粉与蔗糖代谢
2-Oxocarboxylic acid metabolism	2-氧代羧酸代谢
Fatty acid metabolism	脂肪酸代谢
Methane metabolism	甲烷代谢
Butanoate metabolism	丁酸代谢
Valine, leucine and isoleucine degradation	缬氨酸, 亮氨酸与异亮氨酸降解
Propanoate metabolism	丙酸酯代谢
Citrate cycle (TCA cycle)	柠檬酸循环 (TCA 循环)
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	氨酰-tRNA 生物合成
Glycine, serine and threonine metabolism	甘氨酸, 丝氨酸与苏氨酸代谢
Ribosome	核糖体
Glycolysis / Gluconeogenesis	糖酵解/糖异生
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	丙氨酸, 天冬氨酸与谷氨酸代谢

李靖宇, 刘建利, 张琇, 王猛, 杨洲, 靳新影, 苟琪, 张翼飞. 腾格里沙漠东南缘藓结皮微生物组基因多样性及功能. 生物多样性, 2018, 26 (7): 727–737.
<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2018026>

Carbon fixation pathways in prokaryotes	原核生物中碳固定途径
Pyruvate metabolism	丙酮酸代谢
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	乙醛酸与二羧酸代谢
Two-component system	双组分体系
Oxidative phosphorylation	氧化磷酸化
Quorum sensing	群体感应
Pyrimidine metabolism	嘧啶代谢
ABC transporters	ABC 转运体
Purine metabolism	嘌呤代谢
Biosynthesis of amino acids	氨基酸生物合成
Carbon metabolism	碳代谢