

doi:10.7522/j.issn.1000-0240.2013.0086

Gu Yanling, Shi Xuewei, Zhu Jianbo, et al. Vertical distribution pattern of the archaea community within the permafrost active layer in front of the Glacier No. 1 at headwaters of Ürümqi River, Tianshan Mountains [J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2013, 35(3): 761-769. [顾燕玲, 史学伟, 祝建波, 等. 天山乌鲁木齐河源 1 号冰川前沿冻土活动层古菌群落的垂直分布格局[J]. 冰川冻土, 2013, 35(3): 761-769.]

天山乌鲁木齐河源 1 号冰川前沿冻土活动层古菌群落的垂直分布格局

顾燕玲¹, 史学伟², 祝建波¹, 倪永清^{2,3*}, 程国栋^{3*}

(1. 石河子大学 生命科学学院, 新疆 石河子 832000; 2. 石河子大学 食品学院, 新疆 石河子 832000;
3. 中国科学院 寒区旱区环境与工程研究所 冻土工程国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘 要: 采用免培养的 PCR-DGGE(变性梯度凝胶电泳)指纹、克隆测序、系统发育分析对天山乌鲁木齐河源 1 号冰川前沿高山草甸冻土活动层古菌群落的垂直分格局进行了研究. 结果表明: 1 号冰川前沿高山草甸冻土活动层存在一些优势种群, 在所有 6 个取样深度的土层中均有分布. 但不同深度土层古菌群落结构存在明显的差异, 在浅表层检测到一些特异的序列, 系统发育分析表明: 它们分别隶属于广古菌门(Euryarchaeota)的盐杆菌纲(Halobacteria)和热原体纲(Thermoplasmata), 而在深层土样没有检测到. 1 号冰川前沿高山草甸带冻土活动层古菌群落以奇古菌(Thaumarchaeota)类群占据绝对优势, 全部隶属于被称为 group1.1b 的谱系. 其中, 一些序列与不可培养的 *Nitrososphaera* 氨氧化古菌序列亲缘关系较近, 可能预示着这些中温泉古菌在氨氧化过程中发挥着重要作用, 对其群落结构及生态学贡献还有待更深入研究.

关键词: 乌鲁木齐河源 1 号冰川; 冻土活动层; 古菌群落; 垂直分布; PCR-DGGE

中图分类号: Q938 文献标识码: A

0 引言

地球上多年冻土、季节冻土和短期冻土区的面积约占陆地面积的 50%, 广泛分布于极地、亚极地高纬度和中低纬度的高山、高原地区^[1]. 近二十多年来, 科学家对陆地生态系统典型冻土环境中的微生物开展了许多研究工作^[2-3], 研究表明: 冻土微生物具有广泛的物种多样性, 已发现的冻土微生物既有细菌、蓝细菌, 又有酵母菌、真菌和藻类等真核生物^[1]. 同时, 研究发现全球气候变暖对冰川、冻土有显著的影响, 造成冰川持续退缩、冻土层解冻. 相反, 冻土中微生物介导的碳素转化循环对全球气候变化也有显著的影响, 因此各国科学家非常

重视对冻土微生物及其在生态系统的功能研究^[4]. 最近发现, 冻土中存在多样的耐低温古菌^[5], 最丰富的类群是隶属于广古菌门的产甲烷古菌(methanogen)和泉古菌(Crenarchaeota), 对于产甲烷古菌谱系(lineage)及其在全球甲烷平衡和甲烷循环的作用尤其关注. 近十多年来, 这些微生物的多样性、群落结构、地理分布以及在生物地球化学循环中的作用成为冻土研究关注的热点^[4].

人们早期发现的许多古菌大多来自于极端环境, 譬如冻土中产甲烷的耐冷古菌以及栖息于火山口的嗜热古菌, 但是近十多年来发现, 在海洋、湖泊、森林土壤、草地以及沉积物等非极端环境中, 也广泛分布着一类特殊的古菌——非嗜热的中温泉

收稿日期: 2013-01-13; 修订日期: 2013-05-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(40961002; 41140009; 41271268); 冻土工程国家重点实验室开放基金项目(SKLFSE200903); 中国博士后科学基金特别资助项目(20100339)资助

作者简介: 顾燕玲(1971-), 女, 甘肃张掖人, 1993年毕业于河西学院, 现为石河子大学在读硕士研究生, 主要从事冷环境微生物生态研究.

* 通讯作者: 倪永清, E-mail: niyqlzu@sina.com; 程国栋, E-mail: gdcheng@lzb.ac.cn

古菌(non-thermophilic Crenarchaeota)^[6-7]. 该类古菌不仅分布广泛,而且数量巨大,可占海洋全部浮游原核生物的20%,在深海海域中则成为优势类群. 研究显示,陆地土壤生态系统中的古菌也主要包括广古菌和泉古菌两大类. 其中,中温泉古菌约占全部原核生物的1%~5%,在酸性森林土壤中其丰度更高,在草地生态系统中泉古菌的数量甚至远远大于广古菌^[7]. 近来宏基因组学、功能基因序列以及分离到的可培养菌株的全基因组分析显示,这些中温泉古菌在系统进化中应该作为独立分支的一类古菌,被称为奇古菌(Thaumarchaeota)^[8-9],它们很可能参与了全球碳、氮等重要的生物地球化学循环,预示着它们在整个生态系统中的重要作用^[10].

尽管古菌在生态系统中的分布和数量已被广泛研究,然而在国内只有少数研究者对一些特殊的古菌如氨氧化古菌、产甲烷古菌等展开了研究^[11-12]. 最近,国外报道了退缩冰川前沿环境表层土壤中泉古菌种群的生态分布格局^[13-14]. 但是迄今为止,对于中、低纬度高山冰川周边环境冻土活动层土壤中古菌的多样性及群落结构的垂直分布格局及功能的相关报道很少. 天山乌鲁木齐河源1号冰川(以下简称1号冰川)是世界冰川检测服务处选定的全球10条代表性冰川之一,也是我国最系统且长时间序列观测水文气象变化、冰川物质平衡、退缩速度等数据最为完备的冰川^[15-16]. 文献显示,天山中西段冻土活动层厚度依据海拔与坡向的不同大致在0.5~3.5 m^[17]. 根据2009—2011年前后5次实地勘察和采样,1号冰川前沿冻土活动层具有明显的空间异质性,为我们研究微生物系统发育类群、功能类群的空间分布格局及其对环境分异的响应机制问题提供了理想的研究场所. 本研究初次报道了1号冰川前沿高山草甸冻土活动层土壤古菌的垂直分布格局,以期为进一步了解中、低纬度高山冻土活动层古菌的群落结构组成、科学评价其生态学功能提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 样品采集

1号冰川前沿海拔在3 600~3 750 m,取样显示冻土活动层厚度为2~3 m. 在直线距离1号冰川尾部约1 800 m处,选定100 m×100 m的样方(43°07.12' N, 86°48.70' E)内选取的两个样点(海拔分别为3 650 m、3 636 m),分别于2010年7月

22日、2011年9月10日由中国科学院天山冰川站协助完成取样. 取样的2个样点冻土活动层厚度分别为2.2 m、2.5 m,沿冻土活动层剖面间隔35~40 cm取样,按距离地表深度划分为6个土层:A(A'),1.8~2.3 m深的土层;B(B'),1.4~1.7 m深的土层;C(C'),1.0~1.2 m深的土层;D(D'),0.8~1.0 m深的土层;E(E'),0.4~0.6 m深的土层;F(F'),0.1~0.2 m深的土层. 每个取样点、每个土层取样3个平行,将样品迅速装入已灭菌的保鲜盒内,置于车载冰箱中保存. 运回实验室后,在超净工作台上削去表层可能受到污染的样品,于-70℃保存. 用标准pH计测定土壤浸出液的pH值.

1.2 土样DNA的提取

冻土活动层总DNA的提取利用Power Soil DNA Isolation Kit(MO BIO Laboratories, Inc.)试剂盒进行. 土样在37℃干燥后用80目过筛,取0.25~0.30 g土样依据生产商说明程序进行DNA提取. 每个取样点每个土层的3个平行样本分别提取DNA,混合后作为相应土层的总DNA,用于后续的PCR扩增. 提取的DNA在1%的琼脂糖凝胶电泳检测,并采用分光光度计对核酸浓度和纯度进行定量.

1.3 古菌16S rRNA基因的PCR片段扩增

由于冻土活动层产甲烷古菌丰度可能较低,采用巢式PCR扩增,第一轮采用古菌通用引物21F(5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3)和958R(5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3);反应采用降落PCR(TouchDown PCR)策略. 扩增体系:2×Taq PCR Master mix 25 μL,引物各1 μL(20 mmol·μL⁻¹),适当稀释的DNA模板1~2 μL,加灭菌ddH₂O至50 μL. 热循环参数:95℃预变性7 min;94℃变性1 min,63℃复性1 min,其后每个循环复性温度下降0.5℃,共进行20个循环,72℃延伸2 min,然后采用53℃的退火温度进行15次循环,72℃延伸2 min;最后72℃延伸10 min. 第二轮采用引物344FGC(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGAC GGGGTGCAGCAGGCGCGA-3)和529r(5'-ACCGCGGCKGCTGGC-3). 扩增体系同第一轮,用第一轮的扩增产物适当稀释后作为第二轮的模板. 扩增采用Tprofessional(Biometra)热循环仪,热循环参数:95℃预变性7 min;94℃变性1 min,53℃复性1 min,72℃延伸1 min,35个循环,最后

72 °C 延伸 10 min. PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 DGGE 分析

DGGE 分析采用基因突变检测系统(D-Code, Bio-Rad)进行, 用 8% (w/v) 的聚丙烯酰胺凝胶分离, 变性梯度为 45%~70% (100% 的浓度指 7M 的尿素、40% 的去离子甲酰胺), 运行条件: 1×TAE 电泳缓冲液, 60 °C、100 V、电泳 14 h. 电泳结束后用 SYBR green(1:10 000 dilution) 染色 20 min 后在 UV 下观察、照相。对 1 号冰川前沿冻土活动层不同深度土层提取总 DNA 进行 PCR 扩增 16S rRNA 基因 V3 区段, 依据其 DGGE 电泳条带的有无转化为 1、0 的距离矩阵, 采用非加权算术平均连锁法(UPGMA)对土壤样品进行聚类分析。

1.5 DGGE 条带回收及序列分析

选择 DGGE 图谱中条带分离明显、清晰且亮度高的优势性条带, 从凝胶上切下, 将胶块捣碎浸于 50 μL 灭菌 ddH₂O 中, 4 °C 过夜, 然后取 2~5 μL 作为模板进行 PCR 反应, 除引物不带夹子外其他反应条件同第二轮。经 AxyPrep PCR 纯化试剂盒纯化后的 PCR 产物用连接酶与 pGM-T 载体连接, 转化感受态细胞 *E. coli* DH5α 构建各回收条带的克隆文库, 经氨苄青霉素抗性和蓝白斑筛选阳性转化子, 沸水煮沸、离心后取 1~2 μL 上清作为模板, 采用载体引物 T7 和 SP6 进行 PCR 扩增, 扩增参数同第二轮。选择含有正确插入片段的克隆子送上海美吉测序, 将测序结果提交到 GenBank 数据库中, 利用 BLAST 在线进行同源性搜索。从数据库获得亲缘关系相近序列的 16S rRNA 基因序列, 用 CLUSTAL X 1.83^[18] 软件进行序列联配, 用邻接法计算进化距离, MEGA v. 5.0^[19] 软件分析建立系统发育树。进化树分支模式的稳定性采用 Bootstrap 法, 重复次数为 1000。

2 结果与分析

2.1 不同土层的 DGGE 带谱分析

以提取的总 DNA 为模板经过巢式 PCR 扩增出长度约 190 bp 的单一 DNA 片段, 大小与预期的目标片段相一致(包括引物)。在 DGGE 指纹图谱分析中, 由于采用了二次扩增克隆文库测序的技术, 后续割胶测序得到的序列长度约为 120 bp。指纹图谱泳道中条带的数量代表不同深度的冻土活动层古菌种群的数量, 而条带的明暗亮度反映相应种群在土层中的丰度。从图 1 可以看出, 整个取样活

动层土壤中古菌种群多样性并不复杂, 所有泳道存在的条带数在 7~13 之间, 其中编号为 a1(e1)、a2、b2(e'1)、a3(d2) 的 4 个条带亮度最强, 显然代表整个冻土活动层的优势种群, 它们几乎在两个取样点 6 个取样深度的土层中均有分布; 其中, 距离表层 0.8~1.0 m 的土层 D' 样品条带数最多, 而表层样品 F' 特异条带最多。两个样点同一深度土层样品之间条带数大多一致, 也存在一些小的差异, 如同样深度的土层 A' 没检测到与 a4 位置相当的带; 土层 B 中没有检测到 b'1, 而 B' 没有检测到 b4。不同深度冻土活动层存在明显差异, 如 b1、b3、c1 条带只在深度 1 m 之下的土层中分布, b3 只在 1.5 m 深度土层分布; 相反在 1 m 之上的浅表土层中发现存在 6 个独特的条带(d'2、d'3、d'4、d'5、f1、f2), 在深层这些带不存在。

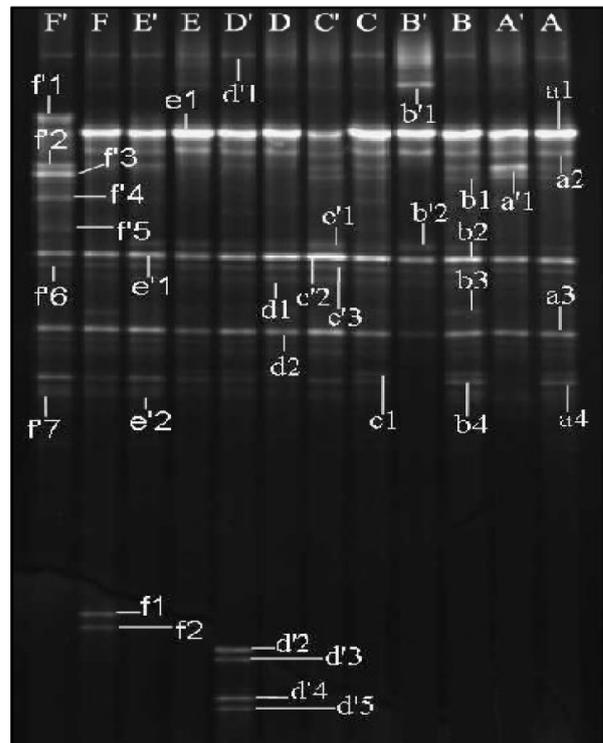


图 1 1 号冰川前沿环境高山草甸冻土活动层不同深度样品的变性梯度凝胶电泳分离图谱

Fig. 1 Archaea DGGE band patterns obtained from the samples of different soil horizons in the permafrost active layer in the foreland of the Glacier No. 1

2.2 古菌群落 DGGE 条带的系统发育及垂直分布格局

将 PCR 产物切胶纯化、构建克隆文库, 挑选大小合适的阳性克隆子测序, 共测序代表各条带的阳性克隆 34 个, 其中为验证不同泳道中迁移到同一

表 1 PCR-DGGE 优势条带克隆测序及系统发育归属
Table 1 Nucleotide sequence similarity of the sequenced DGGE bands

克隆序号 (DGGE band)	BLAST 搜索的最相近序列	序列确认	BLAST 匹配的环境	系统发育归属
YHBCA-1(a1)	KC841500(Uncultured archaeon clone YL-s-A37)	97%	Gut microbiota	Thaumarchaeota Group1. 1b
YHBCA-2(a2)	EF090655(Uncultured <i>crenarchaeota</i> isolate DGGE gel) band	97%	Near-surface permafrost sediments	Thaumarchaeota Group1. 1b
YHBCA-3(a3)	JX047156(Uncultured <i>Nitrososphaera</i> sp. Clone)	94%	Marine Hot Springs	Thaumarchaeota Group1. 1b
YHBCA-5(a'1)	HQ269033(Uncultured archaeon clone AV-LimYyy)	96%	Wet anoxic soil	Thaumarchaeota Group1. 1b
YHBCA-7(b2)	GQ126947(Uncultured archaeon clone ARCDr-800)	98%	Plateau meadow Soil	Thaumarchaeota Group1. 1b
YHBCA-9(b4)	JN205364(Uncultured archaeon clone BAV-GAR55)	97%	Rhizospheric	Thaumarchaeota Group1. 1b
YHBCA-11(b'2)	EF090672(Uncultured <i>crenarchaeota</i> isolate DGGE gel) band	100%	Near-surface permafrost sediments	Thaumarchaeota Group1. 1b
YHBCA-12(c1)	JN559217(Uncultured archaeon clone MF-20)	95%	Abandoned lands	Thaumarchaeota Group1. 1b
YHBCA-15(c'3)	EF090672(Uncultured <i>crenarchaeota</i> isolate DGGE gel band TS-AR22)	100%	Near-surface permafrost sediments	Thaumarchaeota Group1. 1b
YHBCA-17(d2)	HQ692972(Uncultured archaeon clone SY-539-79)	94%	Soils	Thaumarchaeota Group1. 1b
YHBCA-18(d'1)	EU218572(Uncultured archaeon clone Eur3ArchAL)	99%	Permafrost/ground ice core	Thaumarchaeota Group1. 1b
YHBCA-24(e'1)	EF090672(Uncultured <i>crenarchaeota</i> isolate DGGE gel band TS-AR22) EF090672	95%	Near-surface permafrost sediments	Thaumarchaeota Group1. 1b
YHBCA-25(e'2)	JX047156(Uncultured <i>Nitrososphaera</i> sp. Clone)	99%	Marine Hot Springs	Thaumarchaeota Group1. 1b
YHBCA-30(f'3)	EF430860(Unidentified archaeon clone P4002H09)	99%	Soil	Thaumarchaeota Group1. 1b
YHBCA-33(f'6)	JN205364(Uncultured archaeon clone BAV-GAR55)	98%	Mine sites	Thaumarchaeota Group1. 1b
YHBCA-34(f'7)	EF430900(Unidentified archaeon clone)	99%	Soil	Thaumarchaeota Group1. 1b
YHBCA-19(d'2)	HQ287554(Uncultured <i>Thermoplasmatales</i> archaeon clone MAD28)	99%	Amazon river sediment	Euryarchaeota Thermoplasmata
YHBCA-20(d 3)	HQ287557(Uncultured <i>Thermoplasmatales</i> archaeon clone MAD16)	94%	Amazon river sediment	Euryarchaeota Thermoplasmata
YHBCA-26(f1)	GQ925766(Uncultured <i>Halobacteriaceae</i> DGGE gel band Sa4)	99%	Calcite sediments	Euryarchaeota Halobacteria
YHBCA-27(f2)	DQ004703(Uncultured <i>Euryarchaeota</i> isolate SSCP band Bo64-04-08)	98%	Arable European soil	Euryarchaeota Halobacteria



图 2 1 号冰川前沿冻土活动层基于 DGGE 检测的古菌序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic trees based on 16S rRNA V3 sequences showing the relationship of Archaea in permafrost active layer soils of the Glacier No. 1 foreland

位置的条带是否代表相同的古菌种群，进行了重复平行测序。将测序结果提交到 GenBank 数据库中，利用 BLAST 在线进行同源性搜索，获得最相近序列(表 1)与数据库中的参考序列一起构建系统进化树(图 2)。

序列的系统发育分析表明，在测序的 34 条序列中，只有 5 条代表广古菌门(Euryarchaeota)，而其余的 29 条序列全部隶属于新的奇古菌门(Thau-

marchaeota)。其中，隶属于广古菌门的序列均来自于冻土活动层的浅表层，在 DGGE 图谱中这些条带均迁移到了泳道的下端，分别是条带 d'2、d'3、d'4 代表的热原体纲(Thermoplasmata)古菌和条带 f1、f2 代表的盐杆菌纲(Halobacteria)古菌(表 1，图 1)。由于目前在数据库中可培养广古菌 rRNA 基因序列很少，不能进一步将这些序列归属于更低层次的分单元。在 1 m 以下的深层冻土活动层

土样中, 没有检测到类似于以上代表广古菌门的条带。同时, 将数据库中的不同环境中的中温泉古菌类群与本研究其他 29 条序列建立的进化树显示, 分布在电泳图上端的 29 条带所代表的谱系全部属于之前被称为中温泉古菌, 而目前已经被升格为单独的一大类——奇古菌门(Thaumarchaeota)。依据 16SrRNA 基因相似性, 29 条序列在数据库中最匹配的序列均来自非培养的环境克隆文库序列。这些序列的环境来源分析显示, 1 号冰川高山草甸冻土活动层的古菌序列与来自高原草甸土、矿区、冻土表层、植物根际以及热泉的序列均表现出较高相似性(表 1), 说明这些古菌在地球上的生态分布极其广泛。目前, 奇古菌门获得的可培养物极少, 文献报道的大多数不可培养的文库序列隶属于被称为 Group1 的谱系^[7]。进一步分析显示, 1 号冰川前沿高山草甸带冻土活动层古菌群落以隶属于奇古菌门的 group1.1b 类群占据绝对优势, 但是没有检测到属于 Group1.1c、Group1.1a 的序列。

2.3 不同深度冻土活动层古菌群落结构的相似性分析

一般认为在 DGGE 电泳图谱上迁移到同一位置上的条带代表相同或者相近的谱系, 因此通过 DGGE 电泳图谱的聚类分析可以反映不同深度土层微生物群落结构的相似性。对 DGGE 电泳图谱聚类分析显示(图 3), 群落结构聚类分析的总体趋势是来自同样深度土层的样品首先聚在一起(如样

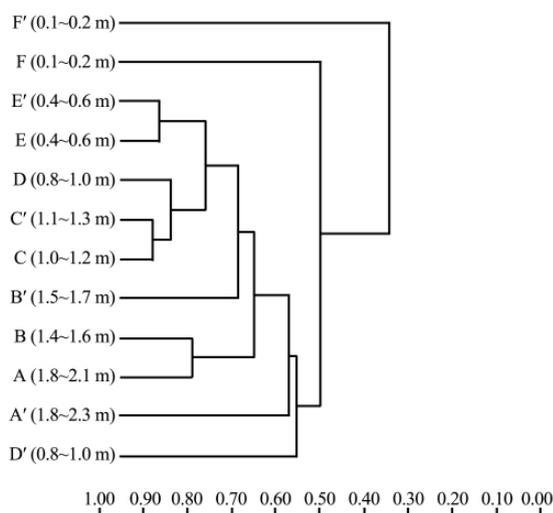


图 3 依据 16S rRNA 基因 V3 区段的 DGGE 指纹图谱对不同深度土层样品的聚类分析

Fig. 3 Dendrogram obtained by UPGMA cluster analysis of the PCR-DGGE fingerprint for the 16S rRNA gene V3 region

品 C 与 C'、E 与 E'), 浅表层样品聚类在一起, 深层土层样品聚在一起, 说明深层土样古菌群落组成不同于浅表层土层的群落, 不同深度土层的古菌群落存在明显的梯度分布格局, 尤其是表层样品 F、F' 与其他深度的样品差异很大。此外, 两个取样点中距离表层相近深度的冻土活动层土层群落结构并非完全相同, 如深度大约相近的土层 A 与 A'、B 与 B' 群落结构存在小的差异, 而浅层样品 D' 由于检测到特异的广古菌序列与相近深度的 D 存在较大的差异。这些差异很可能反映了两个取样点海拔高度和冻土活动层厚度存在差异, 导致取样土层深度和土层的划分并非完全一致。

3 讨论

最近十多年来, 由于分子生物学技术在环境微生物学领域的广泛应用, 越来越多的证据表明, 中温泉古菌(non-thermophilic Crenarchaeota)在海洋、淡水湖泊和土壤等非极端环境中广泛存在^[20-21]。根据 16S rRNA 基因的进化树分析, 绝大多数古菌被归属于广古菌门(Euryarchaeota)和泉古菌门(Crenarchaeota)两大类。然而最近基于宏基因组学、功能基因序列分析以及分离到的可培养古菌的全基因组分析显示, 广泛分布于海洋和陆地环境的这些参与氨氧化过程的被称为中温泉古菌的类群, 应从中分离出来, 作为单独的一大类, 称之为奇古菌门(Thaumarchaeota)^[21-22]。到目前为止, 通过可培养方法, 奇古菌门仅仅分离到 *Cenarchaeum symbiosum*、*Nitrosopumilus maritimus*、*Nitrososphaera viennensis* 以及 *Nitrososphaera gargensis* 等不到十个种^[21-23], 因此对于本研究获得的序列难于做出明确的种属归属。

我们对 1 号冰川前沿环境高山草甸土壤纵深剖面取样的 DGGE 分析显示, 在土壤表层 F' 检测到了多条独特的奇古菌序列, 如条带 f'1、f'3、f'7 与深层明显不同(图 1)。同时检测到 2 条广古菌序列的带(f1、f2), 系统发育上隶属于广古菌门的嗜盐杆菌类古菌。在浅层的土壤中检测到了另外 3 条广古菌序列。序列分析显示, 这些古菌属于非培养的热原体类, 但在深层冻土活动层没有检测到广古菌序列。早期有研究发现, 随着森林土壤剖面深度的增加, 土层中广古菌序列的丰度下降, 其与中温泉古菌的序列比值也随之显著下降^[24]。本研究仅在浅表冻土活动层检测到了广古菌序列, 而在深层主要以奇古菌为主, 没有发现广古菌, 是否支持以上

结论需要做进一步研究. 最近研究表明, 不同土层土壤的有机质含量、水分含量、pH、温度等理化因素以及人类的扰动(放牧)都可能驱动氮循环微生物群落结构及其地理分布和丰度的差异^[25-26]. 采样显示, 1 号冰川前沿冻土活动层浅表层样品在土壤结构、植被分布、温度、易受放牧扰动等方面显著不同于深层样品(资料未显示), 对 DGGE 图谱代表的群落结构聚类分析也反应了浅表层土样 F、F' 的群落结构显著不同于其他土层(图 2), 对其分布格局的驱动机制需要深入研究.

研究显示, 极地与环极地的高纬度地区的泥沼湿地中产甲烷的广古菌序列丰度较高^[1]. 最近有研究显示, 在冰川前沿环境表层土壤中存在少量的 Methanosarcinaceae、Methanobacteriaceae 产甲烷古菌^[24], 我们最近对 1 号冰川前沿环境的高通量 16S rRNA 基因测序也检测到了少量的产甲烷古菌. 但本实验采用 DGGE 技术在任何深度的冻土活动层土样均没有检测到隶属于广古菌门的产甲烷古菌序列, 很可能是由于中低纬度高山冻土活动层相对干燥, 产甲烷古菌丰度很低, DGGE 技术检测能力局限性所致. 此外, 土壤中广泛存在的奇古菌门古菌绝大多数隶属于 Group1. 1 谱系, 依据 16S rRNA 基因以及土壤中生态分布特征被划分为 Group1. 1a、Group1. 1b、Group1. 1c^[7]. 其中, Group1. 1a 主要分布于海洋环境, 其数量可达海洋全部浮游生物的 20%, 但在土壤中有少量分布的报道; Group1. 1b 和 1. 1c 主要分布于土壤和其他陆地环境, 约占土壤原核生物的 1%~5%, Group 1. 1c 在酸性土壤含量尤其丰富^[7,19-20]. 本研究对 1 号冰川前沿整个草甸土层剖面检测到的所有奇古菌序列均属于中温泉古菌 Group1. 1b 谱系, 其中, 克隆 YHBCA-25、YHBCA-3、YHBCA-9 代表的序列在系统发育上与 *Nitrososphaera* 古菌亲缘关系较近(图 2), 可能预示着这些古菌在氨氧化作用中发挥重要作用. 最近, 对瑞士 Damma 冰川退缩前沿环境的古菌研究显示, 随着距离冰川末端空间增加的时间序列, 冰川前沿的古菌多样性指数下降, 其中在冰川前沿早期裸地土壤以广古菌(Euryarchaeota)为优势类群, 也存在隶属于 Group1. 1a 的奇古菌谱系, 而远离冰川的较成熟土壤中古菌群落以 Group1. 1c 奇古菌为主, 而 Group1. 1b 只出现在中等发育成熟的土壤中^[27]. 本研究取样点距离 1 号冰川尾部海拔约 1 800~2 000 m, 属于冰川退缩后发育完全成熟的土壤, 浅表层检测到的古菌以

Group1. 1b 为绝对优势类群, 因此与以上研究结果不一致. Nicol 等^[13-14] 的研究显示, 阿尔卑斯山 Rotmoosferner 冰川前沿环境总体上隶属于 Group1. 1b 的古菌类群丰度最高, 而在较成熟的土壤中出现 group1. 1c 的奇古菌. 虽然本研究检测到的古菌绝大多数为隶属于 Group1. 1b 的 Thaumarchaeota, 但没检测到隶属于奇古菌门的 Group1. 1a、Group1. 1c 谱系, 很可能是由于 DGGE 技术检测深度的局限性所致. 因此, 对于 1 号冰川前沿高山冻土活动层纵深剖面古菌群落及冰川前沿环境古菌群落结构, 需要采用更高检测通量、分辨力更强的分子标记基因做深入研究, 进一步阐明古菌在冰川前沿环境土壤的分布格局及其在生物地球化学循环过程中的重要作用.

参考文献(References):

- [1] Margesin R. Permafrost Soils[M]. Berlin: Springer-Verlag, 2009.
- [2] Rodrigues D F, Tiedje J M. Coping with our cold planet[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, **74**(22): 1677-1686.
- [3] Margesin R, Miteva V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms[J]. Research in Microbiology, 2011, **162**(3): 346-361.
- [4] Steven B, Leveille R, Pollard W H, et al. Microbial ecology and biodiversity in permafrost[J]. Extremophiles, 2006, **10**: 259-267.
- [5] Cavicchioli R. Cold-adapted archaea[J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, **4**: 331-343.
- [6] Pester M, Schleper C, Wagner M. The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology[J]. Current Opinion in Microbiology, 2011, **14**(3): 300-306.
- [7] He Jizheng, Shen Jupei, Zhang Limei. Advance in the research of soil non-thermophilic *Crenarchaeota*[J]. Acta Ecologica Sinica, 2009, **29**(9): 5047-5055. [贺纪正, 沈菊培, 张丽梅. 土壤中温泉古菌研究进展[J]. 生态学报, 2009, **29**(9): 5047-5055.]
- [8] Spang A, Hatzepichler R, Brochier-Armanet C, et al. Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota[J]. Trends in Microbiology, 2010, **18**(8): 331-340.
- [9] Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, et al. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, **6**: 245-252.
- [10] Treusch A H, Leininger S, Kletzin A, et al. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling[J]. Environmental Microbiology, 2005, **7**(12): 1985-1995.
- [11] He J, Shen J, Zhang L, et al. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices[J]. Environmental Microbiol-

- ogy, 2007, **9**: 2364—2374.
- [12] Jiang H, Huang Q, Dong H, *et al.* RNA-based investigation of ammonia-oxidizing Archaea in hot springs of Yunnan Province, China[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, **76**: 4538—4541.
- [13] Nicol G W, Tscherko D, Chang L, *et al.* Crenarchaeal community assembly and microdiversity in developing soils at two sites associated with deglaciation[J]. Environmental Microbiology, 2006, **8**(8): 1382—1393.
- [14] Nicol G W, Tscherko D, Embley T M, *et al.* Primary succession of soil *Crenarchaeota* across a receding glacier foreland [J]. Environmental Microbiology, 2005, **7**(3): 337—347.
- [15] Li Zhongqin, Shen Yongping, Wang Feiteng, *et al.* Response of glacier melting to climate change—Take Ürümqi Glacier No. 1 as an example[J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2007, **29**(3): 333—342. [李忠勤, 沈永平, 王飞腾, 等. 冰川消融对气候变化的响应——以乌鲁木齐河源 1 号冰川为例[J]. 冰川冻土, 2007, **29**(3): 333—342.]
- [16] Li Zhongqin, Han Tianding, Jin Zhefan, *et al.* A summary of 40-year observed variation facts of climate and Glacier No. 1 at headwater of Ürümqi River, Tianshan, China[J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2003, **25**(2): 117—123. [李忠勤, 韩添丁, 井哲帆, 等. 乌鲁木齐河源区气候变化和 1 号冰川 40 a 观测事实[J]. 冰川冻土, 2003, **25**(2): 117—123.]
- [17] Marchenko S S, Gorbunov A P, Romanovsky V E. Permafrost warming in the Tien Shan Mountains, Central Asia[J]. Global and Planetary Change, 2007, **56**: 311—327.
- [18] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, **25**: 4876—4882.
- [19] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, **28**: 2731—2739.
- [20] 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[J]. Environmental Microbiology, 2003, **5**(9): 787—797.
- [21] Zhang Limei, He Jizheng. A novel archaeal phylum: Thaumarchaeota—A review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, **52**(4): 411—421. [张丽梅, 贺纪正. 一个新的古菌类群——奇古菌门(Thaumarchaeota)[J]. 微生物学报, 2012, **52**(4): 411—421.]
- [22] Brochier-Armanet C, Gribaldo S, Forterre P. Spotlight on the Thaumarchaeota[J]. The ISME Journal, 2012, **6**: 227—230.
- [23] Tournai M, Michaela S, Anja S, *et al.* Nitrososphaera viennensis, an ammonia oxidizing archaeon from soil[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, **108**(20): 8420—8425.
- [24] Pesaro M, Widmer F. Identification of novel Crenarchaeota and Euryarchaeota clusters associated with different depth layers of a forest soil [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, **42**(1): 89—98.
- [25] Wu Xiukun, Mao Wenliang, Tai Xisheng, *et al.* Progress in studies of microbial ecology in glacier foreland [J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2013, **35**(1): 217—223. [伍修锟, 毛文梁, 台喜生, 等. 冰川前沿裸露地微生物生态学进展[J]. 冰川冻土, 2013, **35**(1): 217—223.]
- [26] Zhang Gaosen, Zhang Wei, Liu Guangxiu, *et al.* Distribution of aerobic heterotrophic bacteria managed by environment factors in glacier foreland[J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2012, **34**(1): 965—971. [章高森, 张威, 刘光敦, 等. 环境因素主导着冰川前沿裸露地好氧异养细菌群落的分布[J]. 冰川冻土, 2012, **34**(1): 965—971.]
- [27] Zumsteg A, Luster J, Göransson H, *et al.* Bacterial, archaeal and fungal succession in the forefield of a receding glacier[J]. Microbial Ecology, 2012, **63**(3): 552—564.

Vertical Distribution Pattern of the Archaea Community Within the Permafrost Active Layer in Front of the Glacier No. 1 at Headwaters of Ürümqi River, Tianshan Mountains

GU Yan-ling¹, SHI Xue-wei², ZHU Jian-bo¹, NI Yong-qing^{2,3}, CHENG Guo-dong³

(1. School of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi Xinjiang 832000, China; 2. School of Food Sciences, Shihezi University, Shihezi Xinjiang 832000, China; 3. Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou Gansu 730000, China)

Abstract: The diversity and vertical distribution of archaea community within the permafrost active layer in the proglacial environments of the Glacier No. 1, Tianshan Mountains are described by PCR-DGGE fingerprinting in the present study. Of the total 34 DGGE bands selected for sequencing, none of the sequences are the same as reference sequences from cultured taxa. 29 are identified as representing of non-thermophilic Crenarchaeota (Thaumarchaeota), while the remaining five are assigned as representing of Euryarchaeota, and clustered with members of the Halobacteria and Thermoplasmata. No sequences from methanogen are observed. Particularly, members of Thaumarchaeota Group 1.1b are present within the perma-

frost active layer in the proglacial environments of the Glacier No. 1, Tianshan Mountains (though lacking the defined structure) and Euryarchaeota communities are present only in the upper 10~100 cm of the layer, suggesting the relative abundance of Euryarchaeota decreasing with depth. In addition, some of phylotypes, which belong to Thaumarchaeota Group 1.1b, are closely related to ammonia-oxidizing *Nitrososphaera*. These results suggest that Thaumarchaeota Group 1.1b are active contributors to the N cycle throughout the permafrost active layer in the proglacial environments of the glacier, of which the contribution to community structure and ecology are necessary to study in the future in this area.

Key words: Glacier No. 1, Tianshan Mountains; permafrost active layer; archaea community; vertical distribution; PCR-DGGE