



我国东部土壤氮转化微生物的功能分子生态网络结构及其对作物的响应

汪峰^{①②}, ZHOU JiZhong^③, 孙波^{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, 南京 210008;

② 中国科学院大学, 北京 100049;

③ Institute for Environmental Genomics and Department of Botany and Microbiology, University of Oklahoma, Norman OK 73019, USA

* 联系人, E-mail: bsun@issas.ac.cn

2013-06-25 收稿, 2013-07-19 接受, 2013-09-12 网络版发表

国家自然科学基金(41271258, 40871123)、国家重点基础研究发展计划(2011CB100506)和中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-407)资助

摘要 农田土壤-植物系统的氮素循环影响了生产力和环境, 但土壤微生物之间的相互作用对氮素循环的影响机制仍不清楚, 同时这种相互作用如何响应种植作物等管理方式也不明确. 本研究在中国东部 3 个气候带, 选择 3 种典型的地带性土壤类型(寒温带黑土、暖温带潮土和中亚热带红壤)设置不种植(裸地, non-cropping)和种植玉米(cropping)的田间试验, 基于高通量基因芯片测定不同土壤共有的氮转化基因(核心氮转化基因), 利用随机矩阵方法建立土壤核心氮转化基因的分子生态网络, 揭示种植玉米对土壤核心氮转化基因网络结构的影响. 研究表明种植玉米增加了土壤中大部分核心氮转化基因的丰度, 显著提高了核心氮转化基因网络的复杂程度. 网络拓扑结构的模块数由裸地处理的 8 个增加到种植玉米的 28 个. 裸地土壤核心氮转化基因网络有 2 个模块枢纽, 其关键基因为固氮基因(*nifH*); 种植玉米后网络有 9 个模块枢纽, 其关键基因包含固氮(*nifH*)和反硝化基因(*narG* 和 *nosZ*). 土壤核心氮转化基因的功能分子生态网络结构与植物、气候、土壤等因素显著相关, 说明农田管理和环境条件的变化可以通过改变微生物的分子生态网络结构, 影响其驱动农田养分循环的功能.

关键词

氮转化基因
功能分子
生态网络
种植玉米
黑土
潮土
红壤

氮素是植物生长必需的养分元素^[1], 农田氮素循环过程影响了生态系统生产力, 同时由于不合理的氮肥管理产生的活性氮也影响了水体和大气的环境质量^[2-4]. 土壤微生物是氮素等养分元素循环的引擎^[5], 大量的研究表明土壤微生物群落结构控制了不同生态系统中的氮素转化^[6-10], 但这些研究大多分析微生物物种的数量(丰度)以及多样性指数(如 Shannon 和 Simpson 指数)特征, 无法揭示出微生物之间的相互作用, 从而制约了微生物群落结构和功能之间关系的研究.

生态网络分析技术是一种基于数学模型分析生态系统中内在作用关系的系统分析方法^[11]. 近年来, 生态网络分析技术在研究大型生物群落物种之间的相互作用中显示出良好的效果^[12-14], 也开始应用于探索微生物生态网络结构^[15-18]. 微生物生态网络中相互关系异常复杂, 既包括捕食和寄生等对抗关系, 也包括共生和共栖等互惠互利关系, 此外, 微生物还可通过其他物种建立一些间接联系, 分析生态网络的结构可以揭示出生态系统复杂性和生态系统稳定性之间的关系^[13]. 高通量测序技术和基因芯片等分

引用格式: 汪峰, Zhou J Z, 孙波. 我国东部土壤氮转化微生物的功能分子生态网络结构及其对作物的响应. 科学通报, 2014, 59: 387-396

Wang F, Zhou J Z, Sun B. Structure of functional ecological networks of soil microbial communities for nitrogen transformations and their response to cropping in major soils in eastern China (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2014, 59: 387-396, doi: 10.1360/972013-751

析技术的应用,也为土壤微生物分子生态网络研究提供了坚实的数据基础^[15]. 针对草原生态系统的高通量分析表明, CO₂ 倍增显著改变了土壤微生物系统发育分子生态网络(phylogenetic molecular ecological networks, pMENs)和功能分子生态网络(functional molecular ecological networks, fMENs),同时改变了土壤微生物群落的结构及其相互作用关系^[17,19,20].

地上植被强烈影响地下微生物的群落结构^[21,22]. 在农田生态系统中,种植作物通过根系分泌物、秸秆还田以及改变土壤环境条件(如温度和含水量)影响土壤微生物群落^[23,24]. 研究发现,种植玉米改变了反硝化细菌微生物群落结构^[25]. 虽然不同土壤中氮转化微生物群落不同,但不同土壤中存在共有的氮转化微生物(称为“核心氮转化微生物”, core nitrogen transforming microbiome). 目前种植作物等管理措施对不同土壤的核心氮转化微生物网络结构(相互作用关系)的影响仍不清楚,而这是调控农田土壤氮循环功能的理论基础. 我国东部从北到南的热量梯度带上分布着不同的地带性土壤类型,我们选择寒温带黑土、暖温带潮土和中亚热带红壤,建立种植(cropping)和不种植玉米(裸地, non-cropping)的田间试验,利用 GeoChip 3.0 技术分析 3 种土壤中不受气候和土壤等环境因素影响的核氮转化基因(core gene)的特征,基于随机矩阵理论(random matrix theory, RMT)方法构建土壤氮转化功能基因的分子生态网络,分析种植玉米对核心氮转化基因间相互作用关系的影响,回答以下 3 个问题: (1) 种植玉米是否影响土壤核心氮转化基因间的相互作用关系(网络结构)? (2) 种植和不种植玉米的土壤核心氮转化基因网络中起关键作用的基因是否相同? (3) 种植玉米是通过影响哪些环境因子从而改变土壤核心氮转化功能分子生态网络结构?

1 材料与方法

(i) 试验设计及采样分析. 在中国东部南北热量梯度带上,选择 3 种主要类型的农田土壤: 寒温带黑土(黄土母质发育, Phaeozem)、暖温带潮土(黄河冲积物发育, Cambisol)和中亚热带红壤(第四纪红黏土发育, Acrisol), 3 类土壤分布面积分别为 7.0×10^4 , 1.3×10^5 和 1.0×10^6 km². 在其典型分布区的 3 个中国科学院农业生态试验站(即黑龙江海伦、河南封丘和江西鹰潭),于 2005 年建立黑土、潮土和红壤长期土壤互置试验^[26-28]. 海伦年均温 1.5℃, 年均降水 550 mm;

封丘年均温 13.9℃, 年均降水 605 mm; 鹰潭年均温 17.6℃, 年均降水 1795 mm. 本研究以长期土壤互置试验中海伦黑土、封丘潮土和鹰潭红壤为对象,每个对象 2 个试验处理(每处理设置 3 个重复): (1) 种植玉米处理(cropping),从 2006 年开始每年种植 1 季玉米,品种为海育 6 号(海伦)、郑单 958(封丘)和澄海 11 号(鹰潭),不施肥,不灌溉(雨养),其他农业管理措施与当地相同; (2) 裸地对照处理(non-cropping),2006 年起不种植作物,不施肥,不灌溉,定期除草. 利用 18 个土壤样品(3 种土壤 $\times$ 2 个处理 $\times$ 3 次重复),研究种植玉米对土壤微生物网络结构的影响. 土壤样品于 2009 年玉米收获后 2 日内采集,用直径为 2 cm 的不锈钢土钻按“S”形采集表层 20 cm 耕层土壤,在种植处理小区采样时避开根系. 土壤混合后采用四分法留取试验用土样(约 500 g),装入无菌密封塑料袋中于 4℃ 低温保藏带回. 除去石块和细根后,一部分土样采用常规农业化学分析方法^[29]分析土壤的理化性质,另一部分放入 -70℃ 冰箱,利用 GeoChip 3.0 进行土壤微生物的功能基因组成分析^[19,30].

(ii) 氮转化微生物网络构建. 选择 GeoChip 的氮转化功能基因用于构建土壤氮转化功能分子生态网络. 构建网络、获取网络性质参数均在 IEG (Institute for Environmental Genomics)网站(<http://ieg2.ou.edu/mena/>)上完成^[17,18,20]. 利用 GeoChip 芯片数据构建网络的简要过程如下: 对 GeoChip 杂交信号强度数据进行 Log 转换; 计算任意 2 个基因的皮尔森相关性(Pearson correlation),并用成对相关系数的绝对值来检验相关矩阵^[31,32]; 将相关矩阵转化为相似性矩阵; 根据随机矩阵理论运用一个特定的阈值(similarity threshold),将相似性矩阵转换为邻接矩阵(基因节点间的关联程度)^[33,34].

(iii) 氮转化微生物网络性质. 利用软件 Cytoscape 2.8.2^[35]对网络进行可视化处理,得到可视网络结构图及相关信息,包括类别、模块化属性、相关性、模块枢纽等. 在可视化网络结构图中,节点(本文以圆点表示)代表群落中的功能基因,节点之间的连线代表基因之间的相互作用关系(正、负相关性等).

描述网络的指标^[17,18]包括: (1) 连通度(connectivity),代表一个基因与其他基因之间的连通强度; (2) 路径长度(path length),代表 2 个基因之间的最短距离; (3) 群聚系数(clustering coefficient),描述一个节点与其他节点连通程度的好坏; (4) 模块性(modularity),

描述微生物生态网络中模块化特性,一个网络分割成若干模块,每个模块在生物学系统中通常被考虑为功能单元。

为了检验不同种植处理间的土壤氮转化功能分子生态网络的差异显著性,本文利用 Maslov-Sneppen 程序构建了 100 次随机网络(random network)^[36]。该方法不改变原网络的节点数和连接数,仅重新连接网络中不同位置的节点。然后利用 z 检验分析随机网络与上述(ii)中构建的氮转化功能分子生态网络之间的差异显著性,同时利用 t 检验比较不同种植处理间的网络性质差异。

采用 Mantel test 方法评估种植作物、土壤环境条件等因子对土壤氮转化功能分子生态网络的影响, Mantel test 在 R 软件中完成^[37]。

2 结果与分析

2.1 土壤核心氮转化基因数量和比例

裸地处理中土壤核心氮转化基因数为 78 个,种植玉米处理中为 318 个。种植玉米处理显著增加了不同氮转化基因的丰度(图 1),在裸地处理中没有检出氨化基因(*gdh*),仅检出 1 个源自氨氧化古菌的氨单加氧酶基因(*amoA*),但在种植处理中检出 2 个 *gdh* 和 5 个源自氨氧化古菌和细菌的 *amoA*。与裸地处理相比,种植玉米处理对不同基因所占比例的影响也不同,如固氮基因(*nifH*)占氮转化基因的比例由 52.6% 降至 39.6%,而反硝化基因(*narG*)所占比例由 5.1% 增加到 11.6%。

2.2 土壤核心氮转化基因网络性质

分别利用裸地处理中 78 个和种植玉米处理中 318 个土壤核心氮转化基因构建了 2 个功能分子生态网络。基于 RMT 方法构建的 2 个网络的相关性阈值均为 0.86(表 1),高于大部分基于该方法构建网络的

阈值^[18],说明不同基因间的相关性达到极显著水平,可以用于随后微生物相互关系的研究。

与裸地相比,种植玉米的土壤中核心氮转化基因数量、节点数和连接数均增加(表 1),同时每个节点的平均连接数也增加,表明种植玉米增加了氮转化微生物之间的相互作用,导致其网络结构更为复杂。此外,虽然种植玉米的土壤核心氮转化基因 fMENs 中平均连通度较高,但其平均路径长度较大、聚集能力稍弱,表明种植玉米可以更好地缓冲环境变化对网络的干扰。对随机网络性质的分析表明,种植和不种植玉米导致其平均路径和聚集系数存在显著差异 ($P<0.01$)。

在种植和不种植玉米的土壤核心氮转化基因 fMENs 中,只有 40 个网络节点是相同的,但相应的节点连通度没有呈现显著的相关性。由于绝大部分网络节点在 2 个种植处理下是不同的,我们针对 2 个

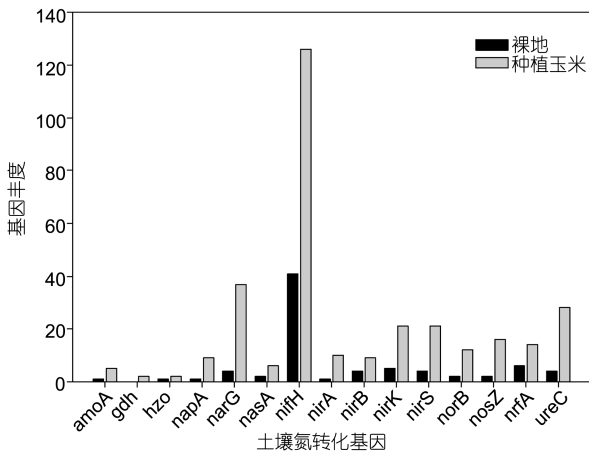


图 1 裸地和种植玉米处理下土壤核心氮转化功能基因的丰度

氮转化基因为硝化作用基因(*amoA*)、氨化作用基因(*gdh* 和 *ureC*)、厌氧氨氧化基因(*hzo*)、异化氮还原氨基因(*napA* 和 *nrfA*)、反硝化基因(*narG*, *nirK*, *nirS*, *norB* 和 *nosZ*)、固氮基因(*nifH*)和同化氮还原氨基因(*nasA*, *nirA* 和 *nirB*)

表 1 裸地和种植玉米处理下土壤核心氮转化功能分子生态网络的拓扑性质以及随机网络的相关性质

处理	氮转化功能分子生态网络 ^{a)}						随机网络				
	基因数量	阈值	节点数	连接数	r^2	平均连通度	平均路径长	平均聚集系数	模块性(模块数)	平均路径长	平均聚集系数
裸地	78	0.86	45	82	0.84 ($P<0.01$)	3.64	1.25	0.47	0.39 (8)	2.63±0.30	0.127±0.030
种植玉米	318	0.86	272	634	0.70 ($P<0.01$)	4.66	4.41	0.42	0.79 (28)	3.51±0.13	0.027±0.006

a) 基因数量指参与构建网络的基因数量; r^2 是网络服从幂分布 $\log[P(k)] \sim \gamma \log(k)$ 的相关系数平方, 其中 $P(k)$ 是连通度 k 的分数, γ 是常数, 网络连通性符合幂分布表明构建网络符合无标度特征

网络中共有的 40 个节点进行网络复杂度比较, 从基因类群层次上分析种植玉米对 fMENs 结构的影响(图 2). 与裸地相比, 种植玉米的 fMENs 中大部分氮转化基因的网络复杂度(与该基因连接的节点数总和)显著提高, 如硝化作用相关基因(*amoA*)、反硝化基因(*narG*)、氮同化还原基因(*nirB*, *nasA* 和 *nrfA*)及氨化基因(*ureC*); 但反硝化基因(*nirK*)的网络复杂度降低; 部分基因如反硝化基因(*norB* 和 *nosZ*)、氮同化还原基因(*nirA*)及固氮基因(*nifH*)的网络复杂度变化不大. 以上的这些结果表明, 种植玉米不仅改变了土壤核心氮转化基因的整体网络结构, 同时也显著改变了网络中不同氮转化功能基因类群的网络相互作用关系.

2.3 土壤核心氮转化基因网络拓扑结构和可视化

在功能分子生态网络的拓扑结构中, 节点代表氮转化功能基因, 不同节点的拓扑学角色可以作为识别关键基因的依据. 节点的拓扑角色可由模块内连通度(Z_i)和模块间连通度(P_i)表征. 模块内连通度描述了一个节点在模块中与其他节点的连接程度, 而模块间连通度反映了一个节点连接到不同模块的程度. 网络节点一般分为 4 类^[38]: (1) 外围节点(peripherals), Z_i 和 P_i 值较低, 连接数很少且总是与模块内的节点相连; (2) 连接器(connectors), Z_i 低、 P_i 很高, 在模块内部连接程度很低, 但与某几个模块高度相连; (3) 模块枢纽(module hubs), Z_i 高、 P_i 较低, 与本模块的许多节点高度连接, 但与其他模块连接

很少; (4) 网络枢纽(network hubs), Z_i 和 P_i 较高, 同时具有模块枢纽和连接器的作用.

从土壤核心氮转化基因 fMENs 中网络节点的拓扑角色看(图 3), 绝大多数网络节点属于外围节点, 大多数外围节点与外界模块没有联系($P_i=0$). 裸地土壤 fMENs 中没有连接器节点, 而在种植玉米的土壤 fMENs 中存在一个连接器节点, 该节点是与反硝化作用有关的 *nirS* 基因(表 2). 裸地土壤 fMENs 中有 2 网络模块枢纽, 由 2 个固氮基因 *nifH* 构成; 种植玉米的 fMENs 中含有 9 个模块枢纽, 包括 4 个 *nifH* 基因, 4 个反硝化基因(*narG* 和 *nosZ* 各 2 个), 1 个来自 β -Proteobacteria 的氨化作用基因 *ureC*(表 2). 这说明裸地(不种植作物)条件下, 固氮微生物对土壤氮转化微生物群落及功能起着重要的作用, 而种植作物后固氮和反硝化细菌在氮转化基因网络中同时行使重要的作用.

土壤核心氮转化基因的可视化网络结构图(图 4)显示了不同处理下土壤不同氮转化基因在整个网络中的作用及其与其他基因的相互联系. 在可视化网络中, 不同的颜色代表节点的基因类别, 节点上的数字是 GenBank ID; 若干个节点可构成一个网络模块, 裸地土壤 fMENs 由 8 个模块组成, 而种植玉米的土壤 fMENs 包括 28 个模块; 节点之间的红色连线代表节点之间的负相互作用, 蓝色连线代表正相互作用. 连接器节点和模块枢纽用大的圆圈重点标出, 在种植玉米的土壤 fMENs 中同时重点标出了连接数最多

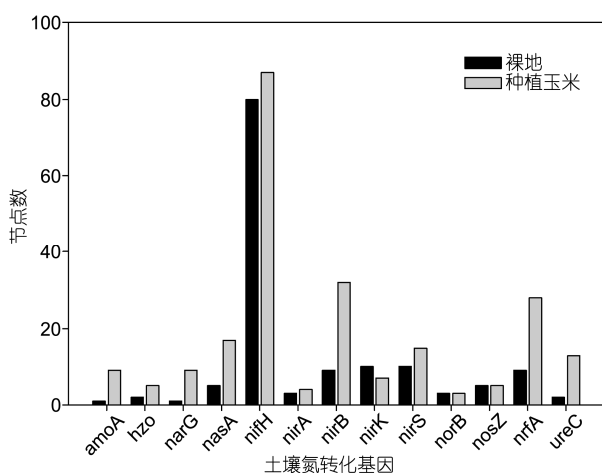


图 2 裸地和种植玉米处理下土壤核心氮转化功能基因网络中共有网络节点的基因分布

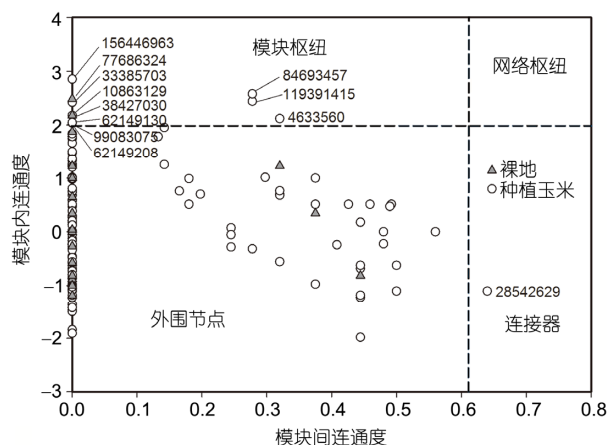


图 3 裸地和种植玉米处理下土壤核心氮转化功能基因网络的拓扑角色

符号所处位置为网络节点, 模块枢纽和连接器节点标记的数字为基因序列号(GenBank ID)

表 2 氮转化网络模块连接器和模块枢纽的生态学信息

处理	基因序列号	基因名	基因功能	来源
裸地	77686324	<i>nifH</i>	固氮	<i>Alkaliphilus</i>
	10863129	<i>nifH</i>	固氮	enrichment culture clone
种植玉米	28542629A ^{a)}	<i>nirS</i>	反硝化	uncultured bacterium
	84693457	<i>ureC</i>	氨化	<i>Polaromonas</i>
	119391415	<i>narG</i>	反硝化	uncultured bacterium
	38427030	<i>narG</i>	反硝化	uncultured bacterium
	156446963	<i>nosZ</i>	反硝化	uncultured bacterium
	4633560	<i>nosZ</i>	反硝化	uncultured bacterium
	33385703	<i>nifH</i>	固氮	<i>Desulfotomaculum</i>
	62149130	<i>nifH</i>	固氮	uncultured bacterium
	99083075	<i>nifH</i>	固氮	uncultured bacterium
	62149208	<i>nifH</i>	固氮	uncultured bacterium

a) 网络连接器

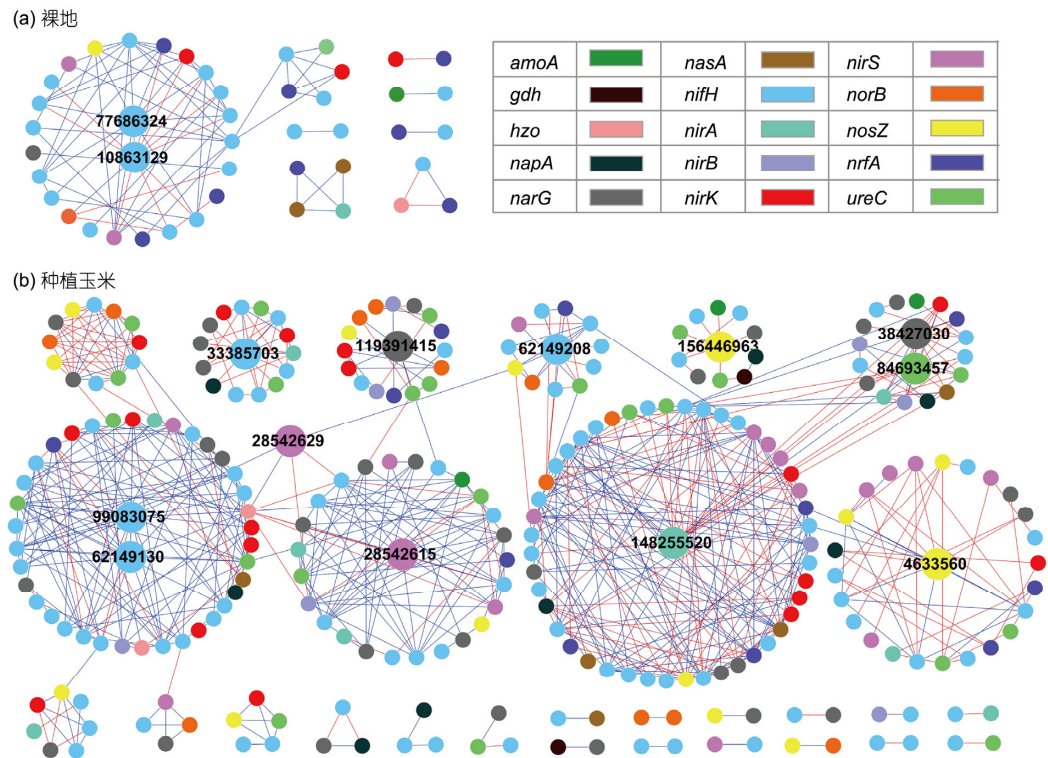


图 4 裸地和种植玉米处理下土壤核心氮转化功能基因网络的拓扑结构图

每个节点表示一个功能基因，不同颜色的节点表示不同基因类别；蓝色连线表示基因间的正相互作用，红色连线表示节点间的负相互作用；模块枢纽、连接器和部分连接数高的节点标记基因序列号

的节点——亚硝化还原酶基因 *nirA*(148255520)以及重要模块节点——反硝化基因 *nirS* (28542615)。从可视化网络图中可以看出，裸地和种植玉米的土壤 fMENs 结构存在显著差异，裸地网络简单、模块较

少、仅存在 1 个以 2 个 *nifH* 为枢纽的主要网络模块，基因之间的联系也远不如种植玉米的土壤密集；种植玉米后增加了土壤氮转化基因的相互作用，其中起关键作用的氮转化基因也发生了显著的改变。

2.4 影响土壤核心氮转化基因网络结构的环境因子

对影响土壤核心氮转化基因网络结构的环境因子进行了偏 Mantel test 分析, 结果(表3)表明, 裸地处理中年均降水量和土壤含水量与网络连通度显著相关($P<0.05$); 而种植玉米处理中综合环境因子、土壤物理变量、植物变量以及其他单一变量(如土壤 pH、硝态氮、土壤水分等)与网络连通度均呈极显著相关($P<0.01$), 表明土壤核心氮转化基因的相互作用受土壤、气候和植物等因素的共同影响。

3 讨论

明确土壤微生物群落在碳、氮、磷、硫元素地球化学循环过程中的功能十分重要^[39]。针对我国东部农区分布的主要土壤(黑土、潮土和红壤)已经开展了施肥等管理措施对氮转化功能微生物的影响研究^[8,9,27,40], 这些研究通常利用微生物物种数、多样性指数表征单一的氮转化微生物群落结构特征, 发现长期施肥处理可以显著改变红壤中氨氧化细菌和古菌的 *amoA* 基因^[40]及固氮菌 *nifH* 基因^[9]的分布。然而, 针对单个氮转化基因的研究难以全面揭示土壤氮转

化微生物的群落特征, 也无法揭示出土壤微生物在网络中的相互作用。本研究首次将功能分子生态网络研究方法运用到农田土壤微生物群落结构和功能的研究, 利用高通量基因芯片数据和微生物群落的网络分析方法研究农田生态系统中种植玉米对土壤核心氮转化功能基因网络结构的影响, 发现种植作物显著增加了土壤氮转化功能基因丰度、改变了核心氮转化功能基因在分子生态网络中的相互作用, 揭示了农田种植管理通过影响土壤环境因子改变了土壤微生物功能基因的网络结构, 显著提升了研究土壤微生物群落结构的定量化和可视化水平。

分子生态网络的构建的方法较多, 如基于微分方程的网络方法(differential equation-based network methods)、贝叶斯网络方法(Bayesian network methods)以及关联网络方法(relevance/coexpression network methods)^[41]。构建分子生态网络应用最多的是基于相关性的网络方法。上述方法对阈值的判断缺乏定量指标, 大多凭借研究者根据生物学知识进行的经验性判断, 在研究复杂的土壤微生物系统时精确度不足。Luo 等人^[33,34]提出基于随机矩阵理论的生态网络构建方法, 利用基因测序和基因芯片方法对草地土壤微生物网络进行了系列研究^[17,18,20]。随机矩阵理论网络构建方法的优点是: 基于泊松分布和高斯分布临界矩阵理论, 能够自动获得阈值信息, 避免主观判断; 能够消除网络分析中的噪音干扰; 能够分析不同来源的生态学研究数据, 分析时间和空间上的变化^[17]。该方法主要是基于网络中不同因子之间存在皮尔森线性相关, 而在实际的网络中因子之间可能为非线性的复杂关系, 因此需要在非线性相关模型方面进行修正。

一般复杂系统具有诸如无标度(scale free)、小世界(small world)、模块化(modular)以及层次性(hierarchical)等重要的网络特征^[42-44]。无标度的网络特征是大多数节点的连接数都很少, 只有极少部分节点会在网络中与其他节点有很多连接, 因此一般无标度网络的连通度符合幂律分布特征; 本研究裸地和种植玉米的 2 个土壤核心氮转化基因网络的幂律分布系数(r^2)分别为 0.84 和 0.70(表 1), 表明网络具有无标度特征。小世界网络是指网络中的多数节点均非两两相邻, 但绝大多数节点都可从其他任意节点经由很少步数到达; 本研究中网络平均路径长和聚集系数与随机网络相应性质呈现显著差异(表 1),

表 3 环境因子与网络连通度之间相关性的偏 Mantel test 分析

网络	环境因子	相关系数 r	P
裸地	土壤含水量	0.126	0.029
	年均降水量	0.123	0.006
	综合环境变量 ^{a)}	0.181	0.001
	土壤物理变量 ^{b)}	0.275	0.001
	植物变量 ^{c)}	0.140	0.001
种植玉米	土壤 pH	0.126	0.001
	速效磷	0.267	0.001
	速效钾	0.289	0.001
	硝态氮	0.093	0.001
	地上生物量	0.089	0.003
	叶绿素含量	0.153	0.001
	土壤含水量	0.241	0.001
	土壤温度	0.155	0.001

a) 综合环境变量包括: 土壤 pH、有机质含量、全磷含量、全钾含量、碱解氮含量、速效磷含量、速效钾含量、硝态氮含量、铵态氮含量、地上生物量、抽雄期叶片的叶绿素含量、土壤含水量、土壤温度、年均降水量、年均温和空气相对湿度; b) 土壤物理变量包括: 土壤含水量和土壤温度; c) 植物变量包括: 地上生物量和抽雄期叶片的叶绿素含量

表明所构建的氮转化基因网络为小世界网络。模块是指一组在内连接程度很高,但是与其他模块的连接很少的功能基因;本研究中裸地和种植玉米的2个土壤核心氮转化基因网络均表现出很好的模块性(表1)。层次性是一个复杂网络的中心原则,虽在拓扑学上没有给出明确的定义,但是一个特征是群聚系数与连通性呈一定的关系。与其他研究中报道的生态网络的特征相比,本研究中构建的土壤氮转化基因网络符合无标度、小世界、模块化以及层次性的网络特征,可以揭示土壤微生物功能分子生态网络对环境变化的响应。

在复杂的微生物群落中找出控制生态功能的关键物种是生态学研究中的一个难点,鉴于微生物群落的复杂性、多样性以及含有大量未培养微生物,找出微生物群落中的关键种十分困难。在本研究中识别土壤氮转化的关键功能基因是基于网络拓扑结构和模块组成,在网络节点的4个拓扑角色(外围节点、模块枢纽、连接器节点、网络枢纽)中,网络枢纽最为重要,因为它既是自身模块的核心枢纽也是不同模块的交流中心,影响了整个网络的连通性和稳定性。但在本研究中,我们在构建的土壤氮转化基因网络中没有发现网络枢纽,因此将模块枢纽和连接器节点作为网络中的关键基因。我们发现固氮菌是裸地(不种植玉米)的土壤氮转化功能分子生态网络中的重要物种(图4),而种植玉米后扩展为固氮菌、反硝化细菌和氨化细菌(图4)。此外,我们发现 *nirA* 基因(148255520)和 *nirS* 基因(28542615)也十分重要,主要是由于这2个基因在各自模块中的节点连接数很高,是模块的重要交流中心。在这里需要强调的是,网络中的外围节点虽然是一群与其他物种联系较少的群体,但其数量庞大,作为一个整体对于生态系统功能也有很大的影响。总体上,本研究提供了一个识别影响生态功能的关键种(或类群)的基本研究框架,可以促进简化复杂土壤微生物群落结构、构建生态模型的研究^[20]。

土壤微生物群落结构对环境干扰的响应机制是调控微生物生态功能的理论基础。以往的研究已经提出地上部植物可以影响地下土壤微生物的自组织结构^[21],由于受研究方法的限制,迄今仍未揭示出植物影响土壤微生物群落的作用机制。而微生物功能分子生态网络研究提供了一个很好的方法,本文的研究不仅表明这种方法可以揭示出种植作物显著

增加了土壤氮转化基因网络的复杂程度,而且揭示出这种网络结构的改变受植物、气候、土壤物理及化学性质因子的影响(表3)。裸地系统中土壤微生物网络结构主要与降水量和土壤含水量等环境因子相关,但种植玉米后植物、气候和土壤变量均影响了土壤微生物的网络结构。由于土壤微生物网络具有“小世界”的特征,微生物间的相互作用能迅速响应环境因子的变化,具有较短路径长度的网络可以在很短的时间内将环境波动传递到整个网络,迅速改变整个网络的结构和功能。本文的研究表明,土壤核心氮转化基因网络的平均路径长度在裸地处理下较种植玉米处理的短,表明裸地土壤中氮转化基因网络对环境因子的响应更加迅速。另一方面,网络的“模块性”能够减少环境波动影响到整个网络^[45],模块的“层次性”又保障了网络枢纽之间的联系相当迅速。同时,“无标度”网络中模块枢纽易受干扰影响而丢失,但与其相似的节点能够很快替代它成为新的枢纽^[44],这样网络能够在遭受干扰后保持网络的稳定性。土壤微生物网络对于环境干扰的影响反应相当迅速,但是网络的自动调节功能会保证网络的相对稳定,因此这种功能对于维持土壤微生物生态系统的健康性和稳定性有着重要的意义^[17,44]。由于微生物群落结构存在季节性和年际差异^[40,46],本研究仅在一个时间点分析了微生物氮转化基因网络在不同种植处理间的差异,在后续工作中已开始研究不同土壤中微生物网络在长时间序列上的连续变化规律和影响因素。

探寻土壤微生物群落结构和生态功能的关系是当今生态学上的一个挑战^[16]。虽然功能基因的研究可以避免研究核糖体序列(16S或18S)时出现的功能类群和系统发育类群关系不对应的问题^[47,48],而稳定同位素探针技术(如DNA-SIP和RNA-SIP)能够标记复杂环境中微生物生理代谢过程^[49-52],但是由于土壤微生物之间复杂的相互作用,在自然环境中直接找寻目标微生物与相应功能的关系十分困难,因此需要集成高通量分析技术和生物网络技术,深入研究土壤微生物群落的结构和相互关系。本研究构建的土壤氮转化基因可视化网络图显示,氮转化微生物网络关系以正相互作用为主(图4),证实了每个氮转化过程均是由不同类群微生物共同作用的结果,未来需要拓展不同养分(碳、氮、磷、硫)转化过程相关微生物之间相互作用关系的研究,揭示土壤微生物群落结构对地球化学循环过程的协同驱动机制。

4 结论

本研究针对我国东部 3 种主要类型土壤, 利用 GeoChip 3.0 分析方法和 RMT 网络构建理论, 研究了种植作物对土壤核心氮转化功能基因网络结构的影响. 研究表明基于 RMT 方法可以构建土壤微生物分

子生态网络, 构建的网络表现出了无标度、小世界、模块化以及层次性等基本网络性质; 种植玉米显著改变了土壤核心氮转化基因网络的结构, 增加了网络的复杂性, 改变了氮转化基因网络中的关键基因; 植物、气候、土壤等因素均影响了土壤氮转化功能基因网络结构.

致谢 特别感谢俄克拉荷马大学邓晔博士, 清华大学环境学院杨云锋教授以及赵梦欣、刘姗姗、彭雨薇、冯佳界、孙欣等在网络构建和分析上提供的帮助.

参考文献

- Gutierrez R A. Systems biology for enhanced plant nitrogen nutrition. *Science*, 2012, 336: 1673–1675
- Zhang F, Chen X, Vitousek P. Chinese agriculture: An experiment for the world. *Nature*, 2013, 497: 33–35
- Galloway J N, Townsend A R, Erisman J W, et al. Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, 2008, 320: 889–892
- Gruber N, Galloway J N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 2008, 451: 293–296
- Falkowski P G, Fenchel T, Delong E F. The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science*, 2008, 320: 1034–1039
- Leininger S, Urlich T, Schlöter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, 442: 806–809
- Francis C A. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 14683–14688
- Chu H, Fujii T, Morimoto S, et al. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 73: 485–491
- Teng Q, Sun B, Fu X, et al. Analysis of *nifH* gene diversity in red soil amended with manure in Jiangxi, South China. *J Microbiol*, 2009, 47: 135–141
- Prieme A, Braker G, Tiedje J M. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 1893–1900
- Fath B D, Scharler U M, Ulanowicz R E, et al. Ecological network analysis: Network construction. *Ecol Model*, 2007, 208: 49–55
- Holland M D, Hastings A. Strong effect of dispersal network structure on ecological dynamics. *Nature*, 2008, 456: 792–794
- Montoya J M, Pimm S L, Sole R V. Ecological networks and their fragility. *Nature*, 2006, 442: 259–264
- Cattin M F, Bersier L F, Banasek-Richter C, et al. Phylogenetic constraints and adaptation explain food-web structure. *Nature*, 2004, 427: 835–839
- Raes J, Bork P. Molecular eco-systems biology: Towards an understanding of community function. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6: 693–699
- Fuhrman J A. Microbial community structure and its functional implications. *Nature*, 2009, 459: 193–199
- Zhou J, Deng Y, Luo F, et al. Functional molecular ecological networks. *MBio*, 2010, 1: 1592–1601
- Deng Y, Jiang Y H, Yang Y F, et al. Molecular ecological network analyses. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13: 113
- He Z, Xu M, Deng Y, et al. Metagenomic analysis reveals a marked divergence in the structure of belowground microbial communities at elevated CO₂. *Ecol Lett*, 2010, 13: 564–575
- Zhou J, Deng Y, Luo F, et al. Phylogenetic molecular ecological network of soil microbial communities in response to elevated CO₂. *MBio*, 2011, 2: e00122–11
- Wardle D A, Bardgett R D, Klironomos J N, et al. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*, 2004, 304: 1629–1633
- Hines J, Meekins J P, Denno R F. Nutrient subsidies to belowground microbes impact aboveground food web interactions. *Ecology*, 2006, 87: 1542–1555
- Aira M, Gómez-Brandón M, Lazcano C, et al. Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. *Soil Biol Biochem*, 2010, 42: 2276–2281
- van Elsas J D, Garbeva P, Salles J. Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. *Biodegradation*, 2002, 13: 29–40

- 25 Philippot L, Piutti S, Martin-Laurent F, et al. Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 6121–6128
- 26 Sun B, Wang X, Wang F, et al. Assessing the relative effects of geographic location and soil type on microbial communities associated with straw decomposition. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79: 3327–3335
- 27 汪峰, 曲浩丽, 丁玉芳, 等. 三种农田土壤中氨氧化细菌 *amoA* 基因多样性比较分析. *土壤学报*, 2012, 49: 347–353
- 28 孙波, 郑宪清, 胡锋, 等. 水热条件与土壤性质对农田土壤硝化作用的影响. *环境科学*, 2009, 30: 206–213
- 29 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
- 30 He Z, Van Nostrand J D, Zhou J. Applications of functional gene microarrays for profiling microbial communities. *Curr Opin Biotech*, 2012, 23: 460–466
- 31 Horvath S, Dong J. Geometric interpretation of gene coexpression network analysis. *PLoS Comput Biol*, 2008, 4: e1000117
- 32 Horvath S, Zhang B, Carlson M, et al. Analysis of oncogenic signaling networks in glioblastoma identifies ASPM as a molecular target. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 17402–17407
- 33 Luo F, Yang Y, Zhong J, et al. Constructing gene co-expression networks and predicting functions of unknown genes by random matrix theory. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8: 299
- 34 Luo F, Zhong J X, Yang Y F, et al. Application of random matrix theory to biological networks. *Phys Lett A*, 2006, 357: 420–423
- 35 Smoot M E, Ono K, Ruscheinski J, et al. Cytoscape 2.8: New features for data integration and network visualization. *Bioinformatics*, 2011, 27: 431–432
- 36 Maslov S, Sneppen K. Specificity and stability in topology of protein networks. *Science*, 2002, 296: 910–913
- 37 R Development Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation Statistical Computing, 2008
- 38 Olesen J M, Bascompte J, Dupont Y L, et al. The modularity of pollination networks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 19891–19896
- 39 Fitter A H, Gilligan C A, Hollingworth K, et al. Biodiversity and ecosystem function in soil. *Funct Ecol*, 2005, 19: 369–377
- 40 He J Z, Shen J P, Zhang L M, 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. *Environ Microbiol*, 2007, 9: 2364–2374
- 41 Zhang B, Horvath S. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Stat Appl Genet Mol*, 2005, 4: 1–43
- 42 Barabasi A L. Scale-free networks: A decade and beyond. *Science*, 2009, 325: 412–413
- 43 Alon U. Biological networks: The tinkerer as an engineer. *Science*, 2003, 301: 1866–1867
- 44 Barabasi A L, Oltvai Z N. Network biology: Understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet*, 2004, 5: 101–113
- 45 Kitano H. Biological robustness. *Nat Rev Genet*, 2004, 5: 826–837
- 46 Jackson S T, Betancourt J L, Booth R K, et al. Ecology and the ratchet of events: Climate variability, niche dimensions, and species distributions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106 (Suppl 2): 19685–19692
- 47 van der Heijden M G A, Bardgett R D, van Straalen N M. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett*, 2008, 11: 296–310
- 48 Stres B, Tiedje J M. New frontiers in soil microbiology: How to link structure and function of microbial communities? In: Nannipieri P, Smalla K, eds. *Nucleic Acids and Proteins in Soil*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. 1–22
- 49 Jia Z, Conrad R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environ Microbiol*, 2009, 11: 1658–1671
- 50 Lu Y, Conrad R. *In situ* stable isotope probing of methanogenic archaea in the rice rhizosphere. *Science*, 2005, 309: 1088–1090
- 51 Wellington E M H, Berry A, Krsek M. Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: Exploiting genomics and stable isotope probing. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6: 295–301
- 52 贾仲君. 稳定性同位素核酸探针技术 DNA-SIP 原理与应用. *微生物学报*, 2011, 51: 1585–1594

Structure of functional ecological networks of soil microbial communities for nitrogen transformations and their response to cropping in major soils in eastern China

WANG Feng^{1,2}, ZHOU JiZhong³ & SUN Bo¹

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

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

³ Institute for Environmental Genomics and Department of Botany and Microbiology, University of Oklahoma, Norman OK 73019, USA

It is well established that nitrogen cycling in agricultural soil-plant systems greatly affects productivity and the environment. However, the impact of microbial interactions on nitrogen cycling and its response to management practices such as cropping and fertilization remain unclear. In this study, three typical soils were selected (a black soil located in the cold temperate region, a Chao soil in the warm temperate region and a red soil in the middle subtropical region) along a North-South transect of eastern China, and a controlled field experiment was set up with non-cropping (bare soil) and cropping (planting maize) treatments. The core microbial communities (with members shared across different habitats) associated with N transformations were identified from high-throughput functional gene array hybridization data. Functional molecular ecological networks (fMENs) were then developed by a random matrix theory (RMT)-based conceptual framework. Cropping increased the richness of most N transforming core genes and the complexity of N transforming fMENs. The number of modules in the topological structure of fMENs increased from eight under non-cropping to 28 under the cropping treatment. Two module hubs (key genes) of the nitrogen fixation gene (*nifH*) were present under the non-cropping treatment, and nine module hubs including the nitrogen fixation gene (*nifH*) and the denitrification genes (*narG* and *nosZ*) were present under the cropping system. Additionally, changes in the network structure were significantly correlated with plant, climate and soil variables. In conclusion, agricultural management practices and environmental changes can alter the network interactions in soil microbial communities, and consequently affect their nutrient cycling functions.

core nitrogen transforming genes, functional molecular ecological networks, maize cropping, black soil, Chao soil, red soil

doi: 10.1360/972013-751