**农业土壤微生物核心菌群能够提升土壤生态功能**

**Abundance of kinless hubs within soil microbial networks are associated with high functional potential in agricultural ecosystems**

Impact Factor 7.943

第一作者：Yu Shi (时玉)

通讯作者 Haiyan Chu (褚海燕) （hychu@issas.ac.cn） Yong-Guan Zhu（朱永官）（[ygzhu@iue.ac.cn](mailto:ygzhu@iue.ac.cn)）

主要单位：土壤与农业可持续发展国家重点实验室，中国科学院南京土壤研究所。

巴布罗·德奥拉维戴大学

清华大学

巴塞罗那自治大学

中国科学院城市环境与健康重点实验室，中国科学院城市环境研究所。

**摘要**

复杂生态网络中的节点(类群)可以根据它们在网络中的连通性水平，基于它们的在网络中重要作用进行分类。理论上，一个生态网络内高度相连的类群(核心节点，kinless hubs)比关联较少的类群(peripherals)能够支持更高水平的生态系统功能。然而，核心节点在调节土壤微生物群落功能潜力中的作用在很大程度上尚未得到探索与研究。本研究通过对具有重要生态功能与经济价值的农业生态系统(小麦和玉米轮作)的华北平原243个土壤样本进行大规模调查，建立了土壤真菌和细菌类群的关联网络，发现生态网络中核心节点类群的相对丰度与土壤功能基因的丰度呈显著正相关，这些基因包括C固定、C降解、C甲醇、N循环、P循环和S循环等基因。结构方程模型分析进一步表明，核心节点，而不是模块或网络节点类群，与多种功能基因的丰度有直接显著的正相关关系。我们的结果表明，在微生物网络中被归类为核心节点（kinless hubs）的土壤微生物类群的相对丰度与土壤高功能潜力相关，这对于在大空间尺度上理解和管理(通过操纵微生物关键物种)农业生态系统具有重要意义。

**关键词**：微生物网络；Kinless hub；功能基因；真菌; 细菌

**一、背景**

土壤微生物共同生活在生态网络中，形成生态簇，彼此强烈共存。这些生态簇中的类群是重要的生态单元，具有共同的环境偏好，但在生态簇内和生态簇间的连通性水平上可能与其他类群不同。简单地说，有些类群在生态簇（provincial hubs）或生态簇间（kinless hubs）高度相连，而其他类群相关的网络连接数量要少得多（如peripheral and connector nodes）。与其他节点不同，Kinless hubs在生态网络的结构中至关重要，可以为其他类群创造生态位。

在植物群落中，已有研究发现Kinless hubs的相对丰度对生态系统功能的重要性。微生物Kinless hubs可能拥有更加重要的功能属性，如养分循环、碳循环以及氮固定等。这些节点之前被定义为植物群落的关键物种，它们在能量和物质流动中发挥着重要作用，为陆地生态系统提供生产动力。这些物种可能也代表了具有有限功能的生物体，这些生物体依赖于它们所关联的生态簇执行的生态功能。然而，目前支持微生物网络中kinless hubs相对丰度重要性的研究还较少。为了更好地了解陆地生态系统中微生物群落如何支持土壤功能，确定kinless hubs微生物类群的环境偏好和功能重要性显得尤为重要。

与已报道的植物相似，我们假设生态簇内和生态簇间高度连接的微生物类群（kinless hubs）可能与涉及多个生态系统过程的功能基因的丰度呈正相关，包括碳，氮，磷和硫的循环基因。这些功能对于维持植物生产非常重要。因此，我们假设，kinless hubs的丰度对于维持人类管理的生态系统的生产力至关重要。

为了验证这一假设，我们大尺度（> 1000 km）分析了华北平原243个土壤样本。上个世纪以来，该地区一直进行小麦-玉米双季轮作集约化管理，粮食消费提供占中国谷物总产量的50％以上。最近的研究表明，对农作物生长至关重要的多种土壤生态过程（例如养分循环）是由土壤微生物的功能特性驱动的，因此通过调节土壤微生物可以在很大程度上提高农业生产力和可持续性。然而，生态网络内的微生物类群对于维持这些生态系统中潜在功能的重要性仍不清楚。于是我们进行了qPCR分析，以计算参与C，N，P和S循环的功能基因的丰度；并对16Sr RNA和ITS扩增子进行测序，分析相关细菌和真菌的多样性和群落组成。

**二、方法和材料**

1. **采样地、DNA提取与土壤变量**

我们于2014年11月20日至11月30日在27个采样点采集了243个土壤样品(图S1A)来研究华北平原土壤微生物群落分布。这一地区的轮作制度是冬小麦和夏玉米。样品采集的详细信息见（Shi et al. 2018 Microbiome）.简而言之，在每个地点(100 km2)选择了9个地块，任意两个地块之间的距离为3.3 km (图S1B)。我们在每个地块收集了12个点，深度为15 cm，将它们混合在一起作为一个样本，所有的243个样本被保存在冰盒中，并立即运往实验室。土壤DNA 提取与土壤变量的测量见2018 Microbiome。采样点信息和土壤性质见表S1和表S2。



图 S1 麦田土壤样品采样图

1. **数据分析**

详细高通量细菌DNA分析见[1]。

[1] Shi, Y., Li, Y.T., Xiang, X.J., Sun, R.B., Yang, T., He, D., Zhang, K.P., Ni, Y.Y., Zhu,  
573 Y.G., Adams, J.M., Chu, H.Y., 2018. Spatial scale affects the relative role of  
574 stochasticity versus determinism in soil bacterial communities in wheat fields  
575 across the North China Plain. Microbiome 6,27.

使用引物(515F，5‘-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3’；806R，5‘-GGACTACHVGGGGTWTCTAAT-3’)结合适配序列和条形码序列，扩增细菌16Sr RNA V4高变区。使用引物(ITS1-F：CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA，ITS2-R：GCTGCGTCTTCATCGATGC) 结合适配序列和条形码序列，扩增真菌ITS1 区域。在50-μl反应体系中扩增出每个样品的三联体，条件为：30个循环，94°C变性，54°C退火30s，30°C延伸1min，72°C延伸7min。将样本的三重PCR产物混合用于细菌和真菌分析，使用QIA Quick 132 PCR纯化试剂盒(Qiagen，Hilden，德国)纯化，然后使用NanoDrop ND-1000分光光度计(Thermo Science，Waltham，美国)进行定量。PCR产物等摩尔比混合在单个试管中，使用Illumina MiSeq平台进行测序。

在的Wafergen Smart Chip Real-time qPCR平台上，通过高通量qPCR对共243个DNA样本进行71个功能基因(如C、N和P循环)分析。每个DNA样品用PCR扩增，一式三份，检测限为31个阈值周期。当被多个引物组靶向时，同一基因被认为是唯一的独特功能。按照Pfaffl的方法计算每个样本的功能基因的相对丰度(基因拷贝标准化为16S rRNA基因）。使用QIIME1.9.1对高通量真菌数据进行处理和分析，工作流程见http://nbviewer.ipython.org/github/biocore/qiime/blob/1.9.1/examples/ipynb/illumina\_overview\_tutorial.ipynb。使用在Greengenes 13\_8 16S rRNA数据库上训练的Ribosomal Database Project classifier，鉴定每种细菌的系统型。使用UNITE/QIIME ITS 参考OTU数据库对每个真菌OTU进行分类鉴定。随机选择20005个细菌序列和11076个真菌序列进行抽平，以确保所有数据集均匀采样。

**3、共发生网络分析**

使用R的WGCNA软件包基于SPARCC相关矩阵进行共发生网络分析。为了提高网络的可靠性，对OTU表进行筛选：在所有样本中只保留了>30%的OTU，样本中只保留了平均相对丰度>0.01%的OTU。共保留了4473个细菌OTU和685个真菌OTU，用来构建共发生网络。修正错误发现率以调整相关网络的P值。在构建网络之前，测试联合的可靠性。使用R的igraph包计算网络属性。使用Gephi(http://gephi.github.io/)生成网络图像。生成节点和边数与经验网络相同的随机网络，并基于Erdös-Réyni模型通过999次迭代总结拓扑指数，以确定网络属性是否容易发生错误。整个网络包含1239个节点和37203条边(表S3)。我们的相关网络包含8个模块(图S2)。结构化为微生物模块的微生物群落表明具有不同关联的不同生物群。



图S2 华北平原麦田土壤微生物网络

在本研究中，按照Guimera和Amaral(2005)描述的方法计算z-score 和 c-score。为了形象地描述节点的作用，根据其模块内度(z-score)和参与系数(c-score)阈值，划分kinless hubs (z-score > 2.5; c-score > 0.6) ，provincial hubs (z-score > 2.5; c-score< 0.6), connectors (z-score < 2.5; c-score> 0.6) 与peripherals (z-score < 2.5; c-score < 0.6)。 kinless hubs意味着节点在模块内和模块间都高度连接，这些类群预计会介导节模块内和模块之间的相互作用物种，并可能通过模块内和模块之间的能量和物质交换而对功能发挥至关重要；provincial hubs意味着节点在模块内高度连接，这些类群有望介导模块内的物种相互作用，并且可能通过模块内的能量和物质的交换而对功能行驶非常重要； Connectors在模块之间高度连接，这些类群有望介导模块之间的相互作用物种，并且对于允许模块之间进行能量和物质交换的功能可能非常重要；peripherals意味着该节点与其他节点的链接很少或没有链接。

**4、统计分析**

通过减少主轴回归分析网络枢纽、土壤性质和功能基因之间的关系，并利用基于AMOS的结构方程模型(SEM)推断土壤变量、kinless hubs, connectors, provincial hubs 与 peripherals对土壤功能的直接和间接影响。根据所有功能基因的平均标准化丰度计算出结构方程的功能潜力。使用kinless- hubs OTUs的平均标准化丰度鉴别kinless hubs。同理，分析connectors, provincial hubs 与 peripherals。

**5、数据和材料的可用性**

数据集保存在NCBI Sequence Read Archive，编号为SRP100578(细菌)和SRP116613(真菌)。功能基因数据见表S4。更多数据可以在补充信息中获得，也可以通过合理的请求从相应的作者那里获得。

**三、结果**

1. **真菌群落及功能基因分析**

Shi等人于2018年分析了取样地土壤细菌的多样性和群落组成。从243个土壤样本的15 184 073个高质量序列中总共鉴定了208个细菌OTU（97％相似性）。在门或纲水平上以放线菌门，α变形菌门，酸杆菌门，γ变形菌门，β变形菌门和绿湾菌门等类群占优势，占总序列的75%以上。细菌群落组成与土壤pH有较强的相关性。

【相关成果发表在Spatial scale affects the relative role of stochasticity versus determinism in soil bacterial communities in wheat fields across the North China Plain. Microbiome 6,27.】

使用Illumina下一代测序技术，我们获得了243个土壤的11076个真菌高质量序列，鉴定出5068个OTU (相似性为97%)。在门水平上，子囊菌门 (85.3%)、担子菌门 (6.0%)和接合菌门 (5.1%)为优势种，占总序列的96%以上（图S3，表S5)。经Mantel检验发现，土壤真菌群落组成与土壤pH、土壤水分、全磷、全氮呈极显著正相关 (表S6)，其中土壤pH对真菌群落影响最大。真菌α多样性指数如Simpson、Shannon、Chao1和observed species 随着土壤DOC、TN和AP的增加而显著降低 (表S7)。在9个样地的27个华北平原样点中，我们共检测到71个与碳(固定)、碳(甲醇)、碳(降解)、氮、磷和硫循环相关的不同功能基因。表S4很好地展示了样点上这些基因的相对丰度。经过Mantel检验，发现土壤真菌群落组成与土壤pH、TP和TK显著相关 (表S8)。大多数功能基因与土壤pH、TK呈显着正相关，与DTN、DON呈显著负相关 (表S9)。

1. **网络分析**

在相关网络分析中确定了八个生态簇。在生态网络中，大多数微生物(节点)(94%)被归类为peripherals，3%被归类为connector hubs，3%被归类为provincial hubs，只有0.2%被归类为kinless hubs (图1A)。这些网络节点角色不均匀地分布在已识别的生态簇上。kinless hubs (两个系统型)都在module 7中(图1B)，划分为细菌类群。这两个相对罕见的kinless hubs占总reads的0.17%。kinless hubs包括来自芽单胞菌门和Phycisphaerae的系统型。大多数connector位于module 6和module 8中，包括变形菌门、放线菌门、酸杆菌门、拟杆菌门、疣微菌門、接合菌门和子囊菌门。Provincial hubs分布在module 11、 module 2与module 4。各生态簇的群落组成如图S4和 S5以及表S10所示。provincial and connector hubs的物种分类如表S11所示。



**图1**. A，基于网络角色的细菌和真菌OTU的分布图。网络中的节点根据其在网络中的角色分为peripherals, modular hubs, network hubs 或connectors。

B. peripherals (紫色), provincial hubs (绿色), kinless hubs (蓝色) and connectors (红色) 的相对丰度

1. **节点相对丰度与功能基因之间的联系**

基于实验数据，我们的研究表明：生态网络中kinless-hubs物种的相对丰度与参与C、N、P和S循环的功能基因的丰度呈显著正相关，其中包括C固定、C降解、C甲醇、N循环、P循环和S循环基因 (图2，表1)。Connector-hubs物种的相对丰度与壤功能基因丰度呈弱正相关。(图S6、表S12)。相反，被归类为模块中心和peripherals的物种的相对丰度与这些功能基因的丰度呈负相关(图S7、S8，表S12)。



**图2.** Kinless-hub OTUs (网络节点：OTU237047，OTU575940)的平均标准化丰度与功能基因的丰度之间的关系。按C\_降解(碳降解)、C\_固定(碳固定)、C\_甲醇(碳甲醇)、N(氮循环)、P(磷循环)和S(硫循环)分组。减少主轴回归分析见表S12。

在同时考虑土壤变量后，结构方程模型进一步证明了每个网络角色中的类群的相对丰度与功能基因的相对丰度之间的关系(表1，图S9-S12，表S13)。结构方程模型证实，kinless-hubs物种的相对丰度与多功能基因丰度呈正相关(β=0.32，标准化回归权重)(图3A，表S14)，provincial-hubs and peripherals物种与功能基因丰度呈显著负相关(β=-0.27和-0.26，标准化回归权重)(图3B和D)。connector-hubs物种的相对丰度与土壤功能的相关性很弱(β=0.0 1，标准化回归权重)(图3C)。不同网络角色的物种相对丰度与不同的土壤性质有关。例如，pH、全P、全K、Ca和Cd对kinless hubs有直接的正相关（图3A)；

土壤AP和Mg对provincial hubs有强烈的正相关（图3B）；connector-hubs物种的丰度与土壤pH和铜呈正相关 (图3C)；而几乎没有因素正相关peripherals (图3D，表S15)。土壤变量对节点和功能基因有不同的影响，但pH对所有节点和功能基因都有直接影响，如对kinless , connector hubs及功能基因有正效应，对provincial, peripheral hubs有负效应。



**图3.** 土壤变量与功能基因丰度kinless hubs(A), provincial hubs (B), connector hubs (C) and peripheral hubs (D)关系的结构方程模型。实心白色箭头代表显著正相关(P<0.05)，虚白色箭头代表显著负相关(P<0.05)，实心灰色箭头6代表不显著正相关(P>0.05)，虚灰色箭头代表不显著负相关(P>0.05)。报告路径系数(标准化效果大小)。模型适合性的详细信息见表S3。Cd，镉；K，钾；Ca，钙；TK，全钾；TP，总磷；Mg，镁；Cu，铜；AP，有效磷；DOC，溶解有机碳；Fe，铁；Mn，锰；As，砷。黄点和红点是网络中的节点。黄点是模块中的公共节点，红点是模块中的集线器。

**四、讨论**

我们的研究发现类似于植物群落，生态网络中被归类为kinless-hubs微生物的相对丰度与高水平的功能潜力有关。Connector-hubs物种的相对丰度对维持网络中的多种功能基因也很重要，但peripheral and provincial物种的相对丰度与参与C、N、P和S循环的功能基因丰度呈显著负相关。即使在考虑了多种土壤性质后，这些结果仍然有效。我们的研究表明，相关网络中相对罕见但高度关联的类群与参与C、N、P和S循环的重要功能基因的丰度呈显著正相关。在利用结构方程模型同时考虑多种土壤性质的影响的后，这些结果仍然成立，即kinless taxa丰度高的地点与高功能潜力呈正相关。我们的结果表明，在生态网络中扮演不同角色的类群在不同的环境梯度上对功能 基因的丰度有不同的影响。

1. ***kinless taxa*的相对丰度与功能基因的丰度呈正相关**

我们量化了华北平原27个样点中参与C、N、S和P循环的71个功能基因的丰度(表S4)。超过90%的功能基因与两个已鉴定的kinless hubs的相对丰度呈正相关，约70%的基因与connector-hubs类群的相对丰度呈正相关(表S16)。因此，网络和连接器集线器作为功能潜力的调节器的重要性可能与其在网络中的拓扑角色有关。Kinless和Connector Hub与生态簇内和生态簇间的其他类群相关(C scores >0.62)，表明这些类群可以通过促进养分交换和资源可获得性，在维持多种生态系统过程中发挥多重作用。

我们的结果强调了这些类群对参与调节多种生态系统功能的多种功能基因的重要性，这些功能基因包括C固定、N固定、P矿化和凋落物分解。Provincial- and Peripheral-类群的相对丰度与功能基因的丰度呈负相关，与Kinless-、Connector- 类群不同，这跟Deng（2015）长期田间试验的结果中provincial hubs与C循环基因呈负相关保持一致。Provincial hubs与一个模块中的类群高度相关，在这个模块里，微生物个体共享相似的生态位或执行相似的功能。其中高丰度的类群可能与其他模块中的成员存在激烈的竞争，这对形成完整生态网络可能没有帮助。由于整个生态网络包含多个模块，执行各种功能，一个模块中某些高丰度的类群可能会对生态网络的稳定造成不利影响。这可能是为什么我们发现provincial hubs与最主要的功能基因呈负相关，而模块中一些高丰度的门与功能基因呈负相关的原因。类似地，peripherals的高丰度类群可能影响整个生态网络的多功能，因此我们发现两者之间也存在负相关关系。

关键功能基因的丰度与稀有但高度相连的kinless and connector hubs的相对丰度之间的显著正相关性表明，这些物种可能在维持在包括小麦和玉米种植在内的重要农业生态系统中的多个生态系统过程的功能中发挥重要作用。属于芽单胞菌门和噬菌体的kinless-hubs类群的相对丰度与功能基因的丰度正相关，这些功能基因包括C固定，C降解，C甲醇，N循环，P循环和S循环（表S17，代表序列见表S18中找到）。例如， exoPG(果胶酶)、pmoA(甲烷/氨328单加氧酶亚单位A)和kinless-hubs之间的最强正相关表明可能有很强的积累N的能力。**芽单胞菌门**含有以叶绿素为基础的光营养物种，这表明其有很强的能力支持基本的生物过程。芽单胞菌门中的类群可以适应干燥的条件。华北平原总体上是干旱的，进一步表明该类群在全球占主导地位的生态系统中可能占有重要的功能，如旱地的生态系统。例如，**芽单胞菌门**被鉴定为华北地区烟草土壤中的关键种。另一个kinless hub属于浮霉菌门的Phycisphaerae，而在不同的栖息地都发现了浮霉菌门。例如，一些物种在厌氧条件下具有氧化铵的能力，通过这个过程，这些物种可以生活在温泉中或南极水域。此外，浮霉菌门经常与植物根际联系在一起，如棉花、野生甜菜和冬小麦。根际是养分交换和元素循环的枢纽，并生活着数以百万计的微生物，发挥调节营养循环或抑制病原体的重要作用。因此，浮霉菌门可能通过参与多种生态过程间接促进植物生长。未来的研究目标应该是培养这两个微生物类群，并检测它们在控制条件下促进农田生态系统功能的潜在适用性。

我们还发现connector-hubs类群的相对丰度与土壤功能基因的绝对丰度之间存在显著正相关的关系。不同于kinless类群，connector类群既包括细菌，也包括真菌。子囊菌门Sordariomycetes的一个连接子与大多数基因呈正相关（表S17），Sordariomycetes可以分解凋落物和木材，在各种土壤生境中普遍存在。另一种疣微菌门连接子与大多数基因呈显著正相关(表S17)，而已有研究发现疣微菌门的丰度与C循环相关的各种基因呈正相关。我们的结果揭示了微生物网络中高度相连的类群的丰度与土壤功能基因之间的直接联系，这表明研究hub-related物种的丰度将为维持或改善农业生态系统的功能提供重要信息。

1. **土壤性质对kinless 和 connector类群相对丰度的影响**

土壤性质对kinless 和 connector类群的相对丰度影响较大。例如，pH与kinless 和 connector hubs的相对丰度呈正相关，而与provincial 和peripheral hubs的相对丰度呈负相关。这些结果表明，施用有机肥或石灰调节pH可能通过增加kinless 和 connector hubs的丰度，降低provincial 和 peripheral hubs的丰度来改善土壤功能。调节其他土壤变量，如钙和全钾，也可以通过改变网络中这些枢纽的丰度来改善土壤的功能。对于重要的谷类作物小麦，找到一种更加环境友好的方法来抵御疾病和适应气候变化是至关重要的。有研究建议最大限度地发挥农业生态系统微生物群落的核心功能可能是应对农业生态系统退化和资源短缺的最佳选择。今后的研究应深入了解土壤因子、功能基因和微生物群落核心功能之间的关系，确定高度联系类群的相对丰度是否可以通过各种农业实践来操纵微生物关键物种，从而减少土壤病害和提高作物的适应性。

**五、总结**

综上所述，我们的研究结果表明，数量较少的高链接度类群的相对丰度对于保持较高的功能潜力至关重要，对于理解大型空间集约化农业生态系统的功能具有重要意义。要在土壤中培养数以千计的微生物是不可行的，然而，聚焦本研究中确定的减少的关键类群亚集，可能对维持人类管理的生态系统下的生态系统功能具有重要意义。

本文章得到了中国科学院战略性先导科技专项（B 类） (XDB15010101)等项目的资助。