

新疆沙尘暴源区塔克拉玛干空气 真菌群落的 T-RFLP 分析

段魏魏^{1,2}, 娄 恺², 曾 军², 胡 蓉¹, 史应武²,
何 清³, 刘新春³, 孙 建², 晁群芳¹

(1. 新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046; 2. 新疆特殊环境微生物实验室, 乌鲁木齐 830091;
3. 中国气象局乌鲁木齐沙漠气象研究所, 乌鲁木齐 830002)

摘 要:【目的】了解新疆塔克拉玛干沙漠周边地区空气真菌物种多样性及群落结构特征。【方法】应用末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术分析和比较塔克拉玛干沙漠空气真菌多样性。【结果】塔克拉玛干沙漠周边且末地区的空气真菌物种多样性最高, 尉犁地区最少, 9 个地区空气样品间相似性介于 8.3%~41.9%, 其中若羌和莎车地区的相似性最高, 达到 41.9%; 尉犁地区与且末、叶城的相似性最低, 为 8.3%, 与聚类分析结果大体上相一致。典型性相关分析(CCA)表明非生物环境因子(海拔、温度、风速等)影响空气真菌群落的多样性。【结论】塔克拉玛干沙漠周边 9 个地区空气真菌多样性较丰富, 且各地区的优势真菌种群和丰度不同; 限制性内切酶的种类对空气真菌群落信息的描述有较大影响。

关键词:塔克拉玛干沙漠; T-RFLP; 空气真菌多样性; 沙尘暴

中图分类号: S188+.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-4330(2011)04-0769-07

Analysis on Fungal Diversity of Air Microbial Communities from Sandstorm Source Areas of the Taklamakan Desert in Xinjiang

DUAN Wei-wei^{1,2}, LOU Kai², ZENG Jun², HU Rong¹, SHI Ying-wu²,
HE Qing³, LIU Xin-chun³, SUN Jian², CHAO Qun-fang¹

(1. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China; 2. Xinjiang Laboratory of Special Environmental Microbiology, Urumqi 830091, China; 3. Institute of Desert Meteorology, CMA, Urumqi, Urumqi 830002, China)

Abstract:【Objective】The aim of the test was to reveal the air fungal diversity and compare the characteristics and the differences of air fungal communities in different regions around the edge of Taklamakan desert.【Method】Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) was used to analyze and compare fungal diversity of air microbial communities from 9 regions of the Taklamakan Desert in Xinjiang.【Result】The diversity index based on T-RFLP fingerprint showed the air fungal communities were rich in the Taklamakan Desert, Of them the highest Shannon index exists in Qarqan and the lowest was in Yuli. The similarity coefficient indicated the air fungal community similarity among 9 samples was between 8.3% - 41.9%, Ruqiang and Shache had the highest similarity in all (41.9%) and Yuli, Qarqan and Kargilik were the lowest(8.3%). Hierarchical Cluster Analysis had the same results with the similarity coefficient. Quantitative study showed that 9 regions of each species abundances was greatly different and had difference between dominant species and endemic species. The typical corresponding analysis (CCA) showed that the diversity index was highly affected by some environmental factors, such as altitude, temperature and wind speed.【Conclusion】The results suggested that the air fungal community was abundant from T-RFLP fingerprint, and it is distinct between fungal species and abundance in different regions; the description of air microbial community was highly impacted by the choice of restriction enzymes.

Key words: the Taklamakan Desert; T-RFLP; air fungal diversity; sandstorm

收稿日期: 2011-03-22

基金项目: “973”计划前期研究专项(2008CB417214); 新疆特殊环境微生物实验室开放课题(XJYS0203-2008-06)

作者简介: 段魏魏(1985-), 女, 新疆人, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物学, (E-mail) dww630421@sina.com

通讯作者: 晁群芳(1967-), 女, 河北人, 副教授, 研究方向为环境微生物学, (E-mail) xjqhf@sina.com

0 引言

【研究意义】沙尘暴是干旱和荒漠区特有的灾害性天气。近年来,沙尘暴所携带的微生物对下游地区农业和生态的影响以及对人类健康的威胁已引起国际上普遍关注。塔克拉玛干沙漠为世界四大沙尘暴多发区之一,是我国沙尘暴和沙尘气溶胶的主要源地,其发生期可跨越整个春夏季节,对西北干旱区的气候变化和生态环境有着重要影响^[1]。塔克拉玛干的沙尘向东可吹至韩国、日本、夏威夷群岛及美国西海岸,影响着北极^[2],对该区空气微生物群落多样性的研究可为因沙尘暴病原菌致病的诊断和治疗提供一定参考。【前人研究进展】非洲和中东沙尘暴过程中的可培养微生物种群及数量已有报道^[3],真菌孢子能抗逆境,更有可能在远距离传输中存活下来^[4]。从北非沙尘源区之一马里分离到了土壤真菌广布类群^[4]:链格孢属(*Alternaria*)、曲霉属(*Aspergillus*)、枝孢属(*Cladosporium*),在其它受撒哈拉沙漠沙尘暴影响的下游地区也分离到这三个属的种群^[3]。塔克拉玛干沙尘暴微生物对韩国和中国台湾^[3]的影响也有研究,已分离到了链格孢属(*Alternaria*)、曲霉属(*Aspergillus*)、枝孢属(*Cladosporium*)。Kuwait 和 Turkey^[3]对中东沙尘暴研究中各分离到 7 属真菌,共有的真菌类群为链格孢属(*Alternaria*),青霉属(*Penicillium*)。值得注意的是,真菌有许多类群为强有力的过敏原^[3],包括支顶孢属(*Acremonium*)、链格孢属(*Alternaria*)、节菱孢属(*Arthrinium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、枝孢属(*Cladosporium*)、弯孢属(*Curvularia*)、裸胞壳属(*Emericella*)、镰孢菌属(*Fusarium*)、黑孢霉属(*Nigrospora*)、拟青霉属(*Paecilomyces*)、皮斯霉属(*Pithomyces*)、茎点霉属(*Phoma*)、青霉属(*Penicillium*)、毛癣菌属(*Trichophyton*)和单格孢属(*Ulocladium*)。【本研究切入点】现有对沙尘暴的研究多采用纯培养的方法,不能准确反映微生物群落信息。应用免培养方法对塔克拉玛干沙尘暴源区空气真菌多样性未见报道。【拟解决的关键问题】采用 T-RFLP 方法,以塔克拉玛干周边及腹地共 9 个地区空气真菌为研究对象,揭示其群落的多样性及其与非生物环境因子之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 空气样品采集

2009 年 3 月 31 日~4 月 11 日在新疆塔克拉玛干沙漠东南缘的尉犁、若羌、且末、民丰、和田、塔中、叶城、莎车和喀什共 9 个地区进行采样(图 1),采样点环境信息如表 1 所示。采用液体撞击式采样器(辽宁省康洁仪器研究所)将空气导入已装有 20 mL 灭菌的磷酸盐缓冲液(NaCl 135 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM, K_2HPO_4 8 mM, pH 7.2, 121℃ 灭菌 30 min)的采集瓶中,每次采样时间为 15 min,空气流量为 11 L/min。采集后的样品 4℃ 低温避光保藏。图 1,表 1



图 1 塔克拉玛干沙漠 9 个采样点示意

Fig.1 Diagrammatic sketch of the 9 sampling sites in the Taklamakan desert

表 1 采样点经纬度、海拔和气象信息
Table 1 Longitude, latitude, altitude and metcorological messages for sampling sites

地点	温度(℃)	海拔(m)	气压(pa)	湿度(%)	风速(m/s)	经度(°)	纬度(°)
Site	Temperature	Altitude	Air pressure	Humidity	Wind speed	Longitude	Latitude
尉犁	17.5	876	918.8	37	2.2	86.35	41.21
若羌	16	884	911.7	31	0.4	88.02	38.97
且末	15	1 219	866.5	40	0.4	85.14	38.2
民丰	11.4	1 409.7	855.4	34	0.6	82.69	37.07
和田	18.7	1 374.7	851.1	18	2.4	79.92	37.12
塔中	16.9	1 083	856.9	23	0.7	83.66	39.1
叶城	17.7	1 360	858.7	22	1.3	77.42	37.87
莎车	17.4	1 232	878.3	25	1.9	77.24	38.42
喀什	16.4	1 290.7	865.2	34	1.3	75.97	39.45

1.2 环境样品总 DNA 提取

采集的样品用孔径 0.22 μm 的滤膜过滤收集菌体,在放有滤膜的无菌离心管中加入 4 mL GTE buffer (50 mM Tris,40 mM EDTA,0.75 M 蔗糖)置于 -20℃ 保藏用于 DNA 提取。DNA 提取方法参照 Zhang et al^[5]的方法。

1.3 ITS 区的 PCR 扩增

采用正向引物 ITS1 和反向引物 ITS4 扩增真菌^[6],ITS1 为: 5'CTTGC GTTGATTACGTCCC 3';ITS4:5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'。正向引物 ITS1 5'端标记有 6-羟基亚磷酰胺 (FAM)。25 μL 的 PCR 反应体系为:总 DNA(70 ng/μL)1 μL;dNTP Mixture(2.5 mM)12.5 μL;上游引物和下游引物各 0.25 μL; 1 μL BSA;0.2 μL 5 U/μL *Taq* polymerase 和 9.8 μL H₂O。PCR 扩增条件为:94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 40 s, 49℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1.5 min,30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。PCR 产物用 1% TAE-琼脂糖凝胶进行检测。

1.4 酶切及 T-RFLP 分析

PCR 产物用 *Hae* III 和 *Hha* I (TaKaRa)分别进行酶切,20 μL 酶切体系:PCR 产物 17.5 μL,0.5 μL *Hae* III 或 *Hha* I ,2 μL 酶切 buffer,37℃ 温育 3 h,酶切完毕后 65℃ 水浴 16 min 终止反应。酶切产物的后续分析由上海基康生物技术有限公司完成。

1.5 T-RFs 的数据处理

首先对所有样品的 T-RFLP 图谱设定一个阈值,片段大小 < 40 bp 或 > 700 bp,荧光强度 < 50 荧光单位(FU),峰面积低于总峰面积 0.5% 的 T-RFs 都可以认为是噪音,以除去噪音的每一个限制性片段(T-RF)为一个 OTU(operational taxonomic unit),根据图谱中 OTU 的数目及其丰度用 BIO-DAP 程序进行多样性指数计算^[7],包括香农指数(Shannon index H)和均匀度指数(Eveness index E),同时通过 Jareeard measure 公式分析了 9 个样品微生物群落的相似性,用 SPSS13.0 进行聚类分析,应用 CANOCO 软件 (Version 4.5)进行典范对应分析(CCA)。

2 结果与分析

2.1 *Hae* III 和 *Hha* I 对 T-RFLP 的影响

限制性内切酶的种类是影响 T-FRLP 结果的关键因素^[8]。不同限制性内切酶的酶切所获 T-RFs 数量不同,但总体来说,酶 *Hha* I 相对于 *Hae* III 更好一些,采用 *Hha* I 酶切数据。图 2

2.2 多样性指数分析

根据 T-RFLP 图谱中末端限制性片段的数目及其相对峰高值,分别计算了 9 个样品的真菌多样性指数。尉犁地区的香农指数、辛普森指数(Simpson index)、均匀度指数均最低,且末地区的香农指数、均匀度指数最高,而和田地区的辛普森指数最高。图 3,表 2

2.3 样品间相似性分析

9 个地区空气真菌群落的相似性系数介于 0.083 ~ 0.419,若羌和莎车地区的相似性最高,达到 0.419;其次是和田与民丰地区,为 0.400,再次为塔中与民丰地区 0.343;尉犁地区与且末和叶城的相似性最低,为 0.083。总体上各地区相似性较低,表明 9 个地区空气真菌群落多样性有较大差异。表 3

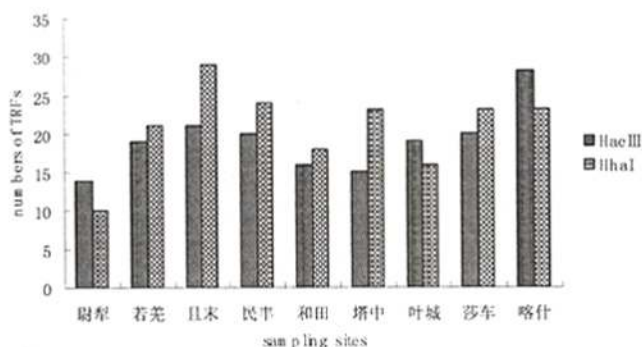
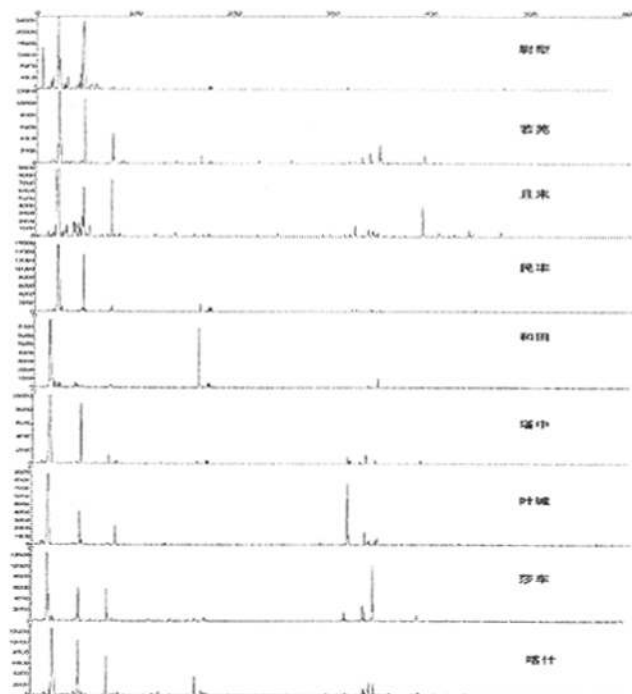


图2 两种酶9个样品酶切获得的 T-RFs 数量

Fig.2 Numbers of T-RFs of nine samples resulting from digestions by two enzymes

图3 *Hha* I 酶切后获得的 T-RF 图谱Fig.3 The T-RFLP atlas obtained from digestion with *Hha* I

聚类分析表明,若羌与莎车地区聚为一类,尉犁与喀什聚为一类,和田、民丰和塔中地区聚为一类,且末单独聚为一类,这与表3结果基本一致。图4

2.4 不同地区空气优势真菌群落的种类及丰度

由 T-RFLP 原理可知一个峰(片段)至少代表一种菌^[9],将相差 1~3 bp 的有效片段视为相同物种^[10],由峰面积可以定量描述微生物物种丰度。根据主要 T-RFs 所对应的真菌,9 个地区的优势种群及丰度有很大不同,尉犁地区优势种群由 56 bp 片段所代表,若羌、且末和喀什地区的为 77 bp,民丰地区的为 77 和 176 bp,和田地区的为 166 bp,塔中和叶城地区的为 318 bp,莎车为 346 bp。这与图3的结果一致,即峰面积较大的为优势类群。图5

表 2 9 个地区空气真菌群落的多样性指数

Table 2 Diversity index of air fungal community for nine regions

采样点	香农指数	辛普森指数	均匀度	T-RFs 数量
Sites	Shannon index	Simpson index	Evenness index	Number of T-RFs
尉犁	0.473	1.002	0.205	10
若羌	1.758	1.033	0.577	21
且末	2.274	1.028	0.725	29
民丰	1.677	1.014	0.528	24
和田	1.587	1.246	0.549	18
塔中	1.716	1.019	0.547	23
叶城	1.877	1.101	0.677	16
莎车	2.024	1.103	0.646	23
喀什	1.722	1.038	0.511	23

表 3 基于 T-RFLP 图谱的样品间相似性系数

Table 3 The similarity coefficient between samples based on T-RFLP atlas

	尉犁	若羌	且末	民丰	和田	塔中	叶城	莎车	喀什
尉犁	1								
若羌	0.107	1							
且末	0.083	0.190	1						
民丰	0.133	0.216	0.233	1					
和田	0.120	0.219	0.205	0.400	1				
塔中	0.179	0.222	0.182	0.343	0.323	1			
叶城	0.083	0.121	0.154	0.176	0.097	0.147	1		
莎车	0.100	0.419	0.209	0.237	0.242	0.345	0.182	1	
喀什	0.231	0.265	0.214	0.278	0.303	0.324	0.118	0.216	1

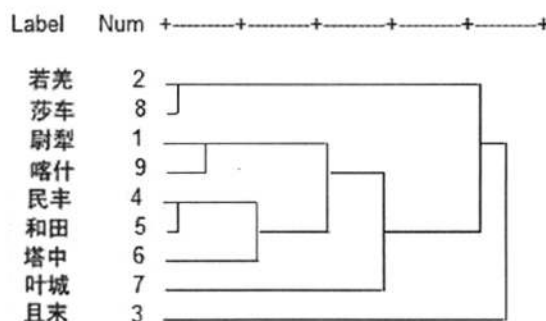


图 4 基于 T-RFLP 图谱的不同样品间聚类分析

Fig.4 The cluster analysis between different samples based on T-RFLP atlas

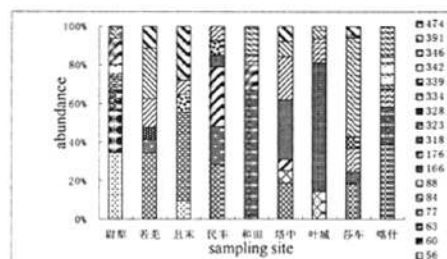


图 5 9 个地区真菌 T-RF 的丰度分布

Fig.5 The distribution of abundance of fungal T-RF in nine samples

2.5 非生物因素对空气真菌群落多样性指数的影响

非生物环境因子与空气真菌群落多样性指数的典型性相关分析表明,香农指数和均匀度指数与海拔成正相关,与风速、气压和纬度呈负相关,而辛普森指数和海拔、温度、风速成正相关,与湿度、经度呈负相关,这在一定程度上表明非生物环境因子对微生物群落有一定影响。图 6

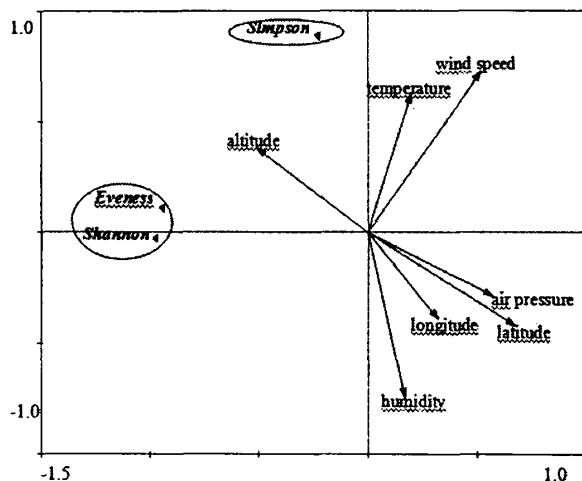


图 6 不同地区空气真菌多样性指数与环境因子的 CCA 分析排序

Fig.6 Sequence graph of CCA ordination for diversity index of different air fungal community and environment factors

3 讨论

T-RFLP 技术因其灵敏、高通量等优越性^[11],目前被广泛用于生态学研究。研究采用该技术研究了塔克拉玛干沙漠沙尘暴源区 9 个地区空气真菌物种多样性,但在 RDP 数据库中无真菌 ITS 方面的数据,无法进行属种水平的定性分析,但从 T-RFs 图谱仍可看出不同地区空气真菌群落特征的差异及特点。

T-RFs 数量常用来表征环境微生物物种丰度^[8],限制性内切酶的选择与此有较大关系。对相同样品用两种酶切,酶 *HhaI* 整体来说得到的 T-RFs 数量较多。目前还没有统一的标准选择限制性内切酶种类,使用 T-RFLP 对海水微生物群落的研究^[5]也证明了这一点。

T-RFLP 与其它基于 PCR 的方法一样存在缺陷^[12],比如微生物群落中不同种群 DNA 的差异性扩增等,多样性指数是基于 T-RFLP 指纹图谱中峰面积而计算得到,用其反映环境样品中微生物种类和丰度等信息有一定的局限,只有将 T-RFLP 技术与构建克隆文库结合才能更加准确反映微生物群落信息。

4 结论

塔克拉玛干沙漠周边 9 个地区空气真菌多样性较丰富,且各地区的优势真菌类群种类和丰度不同;限制性内切酶的选择对空气真菌群落信息的描述有很大影响。

参考文献:

- [1]牛生杰, 章澄昌. 贺兰山地区沙尘暴沙尘启动和垂直输送物理因子的综合研究[J]. 气象学报, 2002, 60(2):194-203.
- [2]Christina AK, Dale WG. Aerobiology and the global transport of desert dust[J]. Trends in Ecology and Evolution, 2006, 21(11):638-644.
- [3]Dale W. Griffin. Atmospheric movement of microorganisms in clouds of desert dust and implications for human health[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2007, 20(3):459-477.
- [4]Christina AK, Dale WG, Virginia HG, et al. Characterization of aerosolized bacteria and fungi from desert dust events in Mali, West Africa[J]. Aerobiologia, 2004, 20:99-110.
- [5]Rui Zhang, Vengatesen Thiagarajan, Pei - Yuan Qian. Evaluation of terminal - restriction fragment length polymorphism analysis in contrasting marine environments[J]. Federation of European Microbiological Societies Microbiol Ecology, 2008, 65:169-178.

- [6]王瑾. 小叶满江红内生菌多样性的 T-RFLP 分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- [7]袁三青, 薛燕芬, 高鹏, 等. T-RFLP 技术分析油藏微生物多样性[J]. 微生物学报, 2007, 47(2): 290-294.
- [8]贾俊涛, 宋林生, 李筠. T-RFLP 技术及其在微生物群落结构研究中的应用[J]. 海洋科学, 2004, 28(3): 64-68.
- [9]王晓丹, 李艳红. 分子生物学方法在水体微生物生态研究中的应用[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 777-781.
- [10]Vanessa M. Conn, Christopher M. M. Franco. Analysis of endophytic actinobacterial population in the roots of Wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16SrRNA clones[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(3): 1787-1794.
- [11]Jeff J. Engebretson, Craig L. Moyer. Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8): 4 823-4 829.
- [12]Friedrich v. Wintzingerode, Ulf B Gobel, Erko Stackebrandt. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis[J]. FEMS Microbiol Review, 1997, 21(3): 213-229.

我区冬油菜种植有望获得大面积推广

随着全球气候变暖, 近年来我区冬季温度不断升高, 冬季极端低温普遍高于往年。冬季温度的变化也使新疆从传统的春油菜区转向发展冬油菜种植。

冬油菜作为重要的生态作物, 不但解磷沃土, 而且是北方旱区寒区重要的冬春季覆盖作物。在 8 级大风下, 裸地土壤风蚀量为 36kg/亩, 冬油菜田土壤风蚀量为 1.1kg/亩, 风蚀量仅为裸地的 1/32。100 亩冬油菜相当于减排 50 吨 CO₂。冬油菜秋季播种, 冬季时已长出叶片, 当强寒天气出现时, 叶片开始覆于土壤表面, 可以降低贴地层风速等风蚀形成条件, 抑制沙尘暴的尘源供给, 减轻土壤风蚀和表层水分的流失, 保持和提高土壤肥力水平, 改善空气质量。开发利用西北旱寒区冬闲田发展冬油菜, 将一年一熟改为一年两熟或两年三熟耕作制, 可有效增加复种指数和单位面积经济效益。

我院通过实施科技部科技支撑计划“西北旱寒主要作物抗逆新品种筛选及栽培技术集成示范”项目课题“超强抗旱冬油菜新品种筛选及示范”, 已筛选出适宜新疆生态条件和耕作制度的超强抗寒冬油菜品系, 研究出新疆冬油菜安全越冬栽培技术, 提出新疆冬油菜综合栽培技术规程, 完整总结了适合新疆地区冬油菜栽培的适宜播期、密度、肥料施用比例, 返青后的病虫害防治方法及收获方法等主要技术指标。经过系统的研究与试验, 现已在阿勒泰、塔城、乌鲁木齐、奎屯、奇台、拜城、和田等县市示范推广, 推广示范面积在 4000 亩以上, 为冬油菜的大面积推广提供技术支撑, 对促进我国西北旱寒区油菜产业的发展、提高土地利用率、增加农民收入、实现生态效益与经济效益的耦合具有重要意义。(新疆农科院经作所 李强 张黎)