

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2019.09.007

基于 DNA 宏条形码的 莼菜大田土壤真菌多样性研究^①

滕左¹, 宋春红², 于杰¹

1. 西南大学园艺园林学院, 重庆 400716; 2. 中国烟草总公司重庆市公司彭水分公司, 重庆 彭水 409699

摘要: 高通量测序与 DNA 条形码结合产生的 DNA 宏条形码技术(DNA-Metabarcoding), 能快速鉴定混合样本中的物种, 现已成为检测群类物种多样性和丰富度的常用方法。本试验采用这一方法分析了莼菜大田不同种植年限土壤真菌多样性, 结果表明: 10 年生土壤中含有最多的真菌种类, 多样性及丰富度最高; 在属水平上表现为蛙粪霉属、裂梗霉属、酵母属等占优势; 群类组成分析显示, 种植年限的变化对土壤真菌群落组成有一定的影响; 聚类分析中 10 年与 15 年生莼菜土壤物种多样性相似度较高。

关键词: 种植年限; 莼菜; DNA 条形码; 高通量测序; 鉴定

中图分类号: S154.3; Q949.91

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2019)09-0052-07

DNA 宏条形码(DNA metabarcoding)技术是一种以 DNA 条形码技术与下一代测序技术为基础、可用于分析混合样品 DNA 以获得群类物种多样性的方法^[1-3]。DNA 条形码技术是利用一段标准的 DNA 条形码序列来对物种进行鉴定与分类, 由加拿大动物学家 Hebert 最早提出^[4]。传统的 sanger 测序仅能对单一样品进行 DNA 测序, 而高通量测序技术可对混合 DNA 进行同时测序, 可获得大量具有生物学信息的 DNA 片段, 进行物种多样性研究及组分分析^[5]。随着 DNA 条形码与测序技术的不断进步以及条形码数据库的逐步完善, DNA 宏条形码技术现已成为现代生物学研究热点, 广泛应用于生物多样性研究^[6-8]。

DNA 宏条形码自创立以来, 已被应用于诸多领域。Farrugia 等利用此技术检测放牧食草动物粪便, 分析其膳食结构及植物多样性^[9]; 宋颍等利用 COI 基因分析了太白山土壤动物多样性^[10]; Taberlet 等利用高山草甸土壤样品分析了植物多样性, 并为开展生物多样性调查的全面标准化提供了可能性^[11]。此外, DNA 宏条形码技术还应用于食性分析^[12]、古生物研究^[13]、生态评估^[14]等领域。

莼菜(*Brasenia schreberi*)是睡莲科水生草本植物, 富含蛋白质、膳食纤维和多糖物质, 具有降血脂、降血糖、抗氧化和抗癌等多种生理活性^[15-16]。前人研究结果表明, 土壤微生物多样性将直接影响到作物的正常生长^[17]。本文选取 ITS(Internal Transcribed Spacer)基因序列作为分子标记, 应用 DNA 宏条形码技术对莼菜大田不同种植年限的土壤真菌多样性进行研究, 为莼菜资源的保护及科学利用提供数据支持。

① 收稿日期: 2018-06-27

基金项目: 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项项目(cstc2017shms-kjfp80009); 西南大学石柱创新基金项目/校县合作项目(Sz201802)。

作者简介: 滕左(1994-), 男, 硕士研究生, 主要从事水生植物开发利用研究。

通信作者: 于杰, 副教授。

1 材料与方法

1.1 样品采集与准备

2017 年 5 月上旬,采集重庆市石柱县冷水镇八龙村种植年限分别为 1 年、5 年、10 年、15 年、20 年的莼菜大田土壤,每种生境选取 5 m×5 m 的 3 个样方,采用五点取样法在样方内随机采取 3 份土样,取样深度(0~25) cm. 土样上层与下层的比例相同,取样后干冰运输. 采集样地如表 1 所示.

表 1 样地信息

种植年限	编号	采样地点	海拔/m
1 年	1y	30.148 898°N, 108.532 048°E	1 153
		30.148 675°N, 108.534 808°E	1 125
		30.147 865°N, 108.537 806°E	1 135
5 年	5y	30.148 623°N, 108.531 898°E	1 148
		30.147 956°N, 108.532 045°E	1 162
		30.148 507°N, 108.533 205°E	1 154
10 年	10y	30.146 095°N, 108.532 602°E	1 135
		30.146 568°N, 108.533 052°E	1 145
		30.146 523°N, 108.532 257 2°E	1 158
15 年	15y	30.148 114°N, 108.53 3097°E	1 158
		30.148 265°N, 108.532 056°E	1 147
		30.149 002°N, 108.534 026°E	1 143
20 年	20y	30.144 992°N, 108.533 312°E	1 167
		30.144 356°N, 108.533 405°E	1 152
		30.142 506°N, 108.532 356°E	1 125

1.2 样品总 DNA 提取

使用 MoBio 强力土壤微生物 DNA 提取试剂盒(北京昊成铭泰科技有限公司)进行各样品的总 DNA 提取,得到 15 份总 DNA. 将相同生境的 3 份 DNA 进行等浓度混合,得到后续 PCR 的 5 份总 DNA.

1.3 PCR 扩增及测序

PCR 反应体系为 25 μ L, 含 dNTP Mixture(大连宝生物公司, 2.5 mmol/L)2 μ L、PCR buffer(大连宝生物公司, 10 \times)2.5 μ L、正反向引物(2.5 μ mol/L)各 1.0 μ L、Taq DNA 聚合酶(大连宝生物公司)1 μ L、总 DNA 约 1 μ L(30~50 ng), 其余用 ddH₂O 补至 25 μ L.

PCR 扩增引物 ITS1(大约 250 bp), 正向引物序列为 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG, 反向引物序列为 GCTGCGTTCTTCATCGATGC. PCR 的循环程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 退火温度 55 $^{\circ}$ C 持续 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min.

每份总 DNA 扩增 3 次, 然后将 3 份 PCR 产物等浓度混合. PCR 产物的测序使用 Illumina MiSeq 平台, 采用 250PE 测序策略, 由上海派森诺生物科技有限公司完成.

1.4 数据处理与分析

1.4.1 原始数据整理、过滤及质量评估

采用滑动窗口法对 FASTQ 的双端序列逐一做质量筛查, 利用 FLASH 软件进行配对连接, 通过 QIIME 软件调用 USEARCH 检查并剔除模糊碱基和嵌合体序列, 从而获得每个样本的有效序列.

1.4.2 OTU 划分和分类地位鉴定

试验用 QIIME 软件, 调用 UCLUST 对前述序列按 97% 的序列相似度进行 OUT 聚类, 选取每个 OTU 中最长序列为代表序列; 利用 QIIME 中的 BLAST, 将代表序列与 UNITE 数据库比对, 获得 OUT 分类学信息.

首先进行 OTU 划分并对分类地位鉴定结果进行统计, 再用 Excel 和 Mothur 软件做目水平上的群落组成图和样品间 VENN 图.

1.4.3 Alpha 多样性分析

使用 R 软件 vegan 程序包对各样本的 Chao1 丰富度指数、ACE 丰富度指数、Shannon 多样性指数和 Shannon-Wiener 多样性指数进行计算.

1.4.4 分类学组成分析

使用 GraPhlAn, 对样本总体在各分类水平的组成构建等级树, 同时以不同颜色区分各分类单元, 并通过节点大小反映它们的丰度分布.

使用 R 软件中的 pheatmap 程序包, 对丰度前 50 位的属进行聚类分析并绘制热图.

2 结 果

2.1 OTU 分类学鉴定

通常, 每 1 个 OTU 被视为 1 个微生物物种, 试验对 OTU 在门、纲、目、科、属、种各分类水平进行了鉴定. 结果表明, 随着种植年限的增加, OTU 数呈先增加后减少的规律, 说明蔬菜土壤真菌数量先增后减, 在 10 年生蔬菜土壤中达到峰值(表 2).

表 2 OTU 划分和分类地位鉴定结果统计

样本	门	纲	目	科	属	种
1y	235	211	204	181	156	238
5y	680	585	568	517	431	718
10y	1060	893	879	809	707	1 138
15y	984	883	868	808	695	1 067
20y	789	674	659	619	519	838

通过共有 OTU 的 Venn 图, 发现 5 个样本共有的 OTU 数为 36, 1 年生样本独有 OTU 数为 120, 5 年生样本独有 OTU 数为 437, 10 年生样本独有 OTU 数为 651, 15 年生样本独有 OTU 数为 649, 20 年生样本独有 OTU 数为 378. 可以看出样本之间的相似性和差异性(图 1).

2.2 Alpha 多样性分析

各蔬菜土壤真菌群落中, Chao1 丰富度估计指数从小到大依次为 1 年生、5 年生、20 年生、15 年生、10 年生; ACE 丰富度估计指数大小次序和 Chal 指数相同; Simpson 多样性指数和 Shannon 多样性指数从小到大依次为 1 年生、20 年生、5 年生、15 年生、10 年

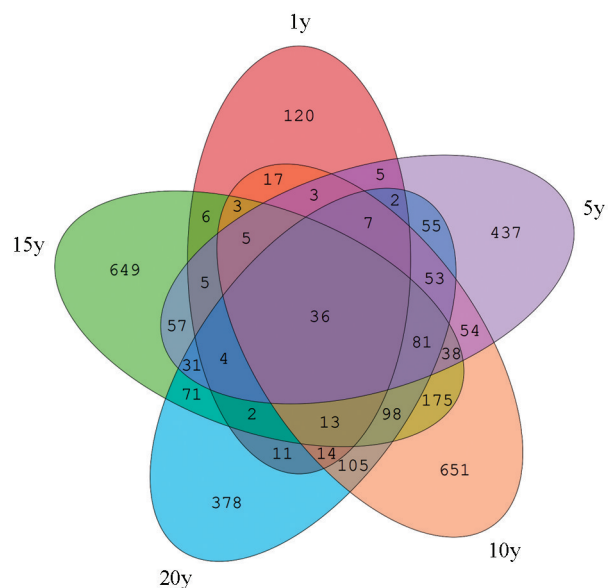


图 1 共有 OTU 的 Venn 图

生。试验结果看出, 莼菜土壤真菌的群落丰富度和多样性指数均呈先增后减的趋势(表 3)。

表 3 菌群微生物多样性指数

样本	Chao1 指数	ACE 指数	Simpson 指数	Shannon-Wiener 指数
1y	261.43	266.74	0.869 223	4.17
5y	873.00	873.00	0.986 820	7.92
10y	1 363.90	1 376.50	0.991 564	8.43
15y	1 274.11	1 275.98	0.987 933	8.14
20y	965.10	973.81	0.984 933	7.52

注: 每个样本的测序深度相同。

2.3 不同年限莼菜土壤真菌群落的组成

通过 OTU 划分和分类鉴定, 1 年生莼菜真菌群落由 7 门、18 纲、45 目、70 科、83 属、138 种构成; 5 年生莼菜真菌群落由 7 门、21 纲、54 目、95 科、136 属、244 种构成; 10 年生莼菜真菌群落由 7 门、22 纲、61 目、110 科、173 属、295 种构成; 15 年生莼菜真菌群落由 7 门、19 纲、57 目、87 科、119 属、210 种构成; 20 年生莼菜真菌群落由 7 门、22 纲、52 目、94 科、136 属、217 种构成(表 4)。不同年限莼菜土壤真菌在科、属、种水平上呈现出不同的群落组成, 但均在 10 年生莼菜土壤中数量最多。

表 4 各分类水平的微生物类群数统计

样本	门	纲	目	科	属	种
1y	7	18	45	70	83	138
5y	7	21	54	95	136	244
10y	7	22	61	110	173	295
15y	7	19	57	87	119	210
20y	7	22	52	94	136	217

基于 GraPhlAn 的样本总体分类等级树图能快速发现优势微生物类群。在属的水平上蛙粪霉属、裂梗霉属、*Archaeorhizomyces* 属、酵母属为优势属。蛙粪霉属在样本中的相对丰度随着生长年限的增加而增加; 裂梗霉属有随着生长年限增加含量增加的趋势, 但在 15 年生样本中含量低于 10 年生样本。*Archaeorhizomyces* 属真菌主要集中在 1 年生莼菜土壤中, 相对丰度达到 67.2%, 在其他样本中含量较低; 酵母属在 1 年生样本中含量较低, 15 年生样本中含量较高, 在其他 3 个样本中含量基本一致(图 2)。

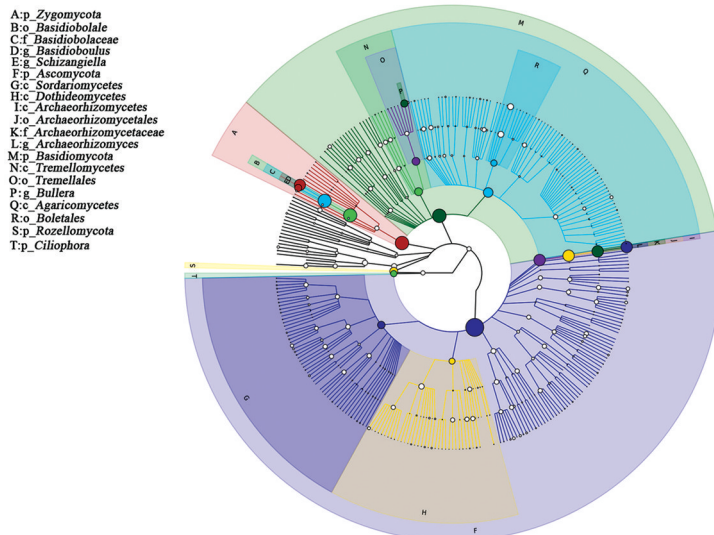


图 2 基于 GraPhlAn 的样本总体分类等级树

通过聚类, 可以反映样本之间的群落组成相似度. 图 3 中, 红色代表在对应样本中丰度较高的属, 绿色代表丰度较低的属. 由图 3 可知, 10 年生蔬菜土壤与 15 年生蔬菜土壤首先聚类, 然后与 20 年生蔬菜土壤聚类, 然后与 5 年生蔬菜土壤聚类, 最后与 1 年生蔬菜土壤聚类.

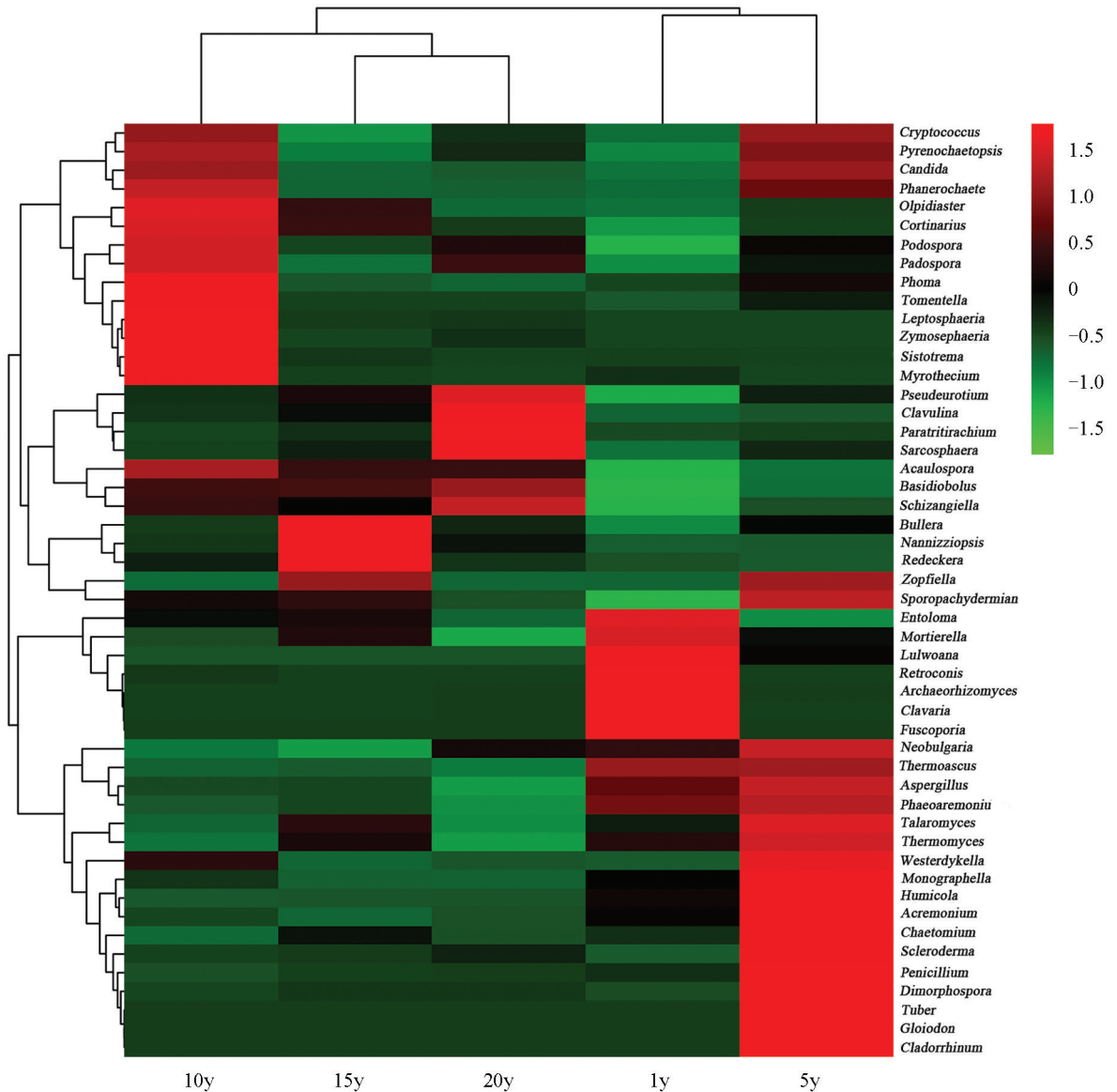


图 3 结合聚类分析的属水平群落组成

3 结论与讨论

研究发现, 随着种植年限的增加, 蔬菜土壤真菌的 chaol 指数、ACE 指数、simpson 指数、Shannon-Wiener 指数均呈现先增加后减少的趋势, 都在第 10 年达到峰值. 纳小凡等发现宁夏枸杞土壤微生物多样性与种植年限有密切关系^[17]. 胡凯等研究发现桉树土壤真菌数量年际变化显著, 随着种植年限的增加呈明显下降趋势^[18]. 谢光新等在对茶树的土壤真菌群落研究中发现, 10 年生茶园根际真菌数量比 2 年生茶园多^[19], 说明土壤真菌群落的变化受所生长的植株的影响而成差异性变化. 通过对门、纲、目、科、属各个水平的分析, 发现不同年限真菌的变化呈现一定的规律. 不同年限各种真菌的数量呈现不同变化, 有的升高, 有的降低, 有的则维持相对稳定状态. 因为影响土壤真菌数量的因素不只年限的变化, 还有土壤因子、生态扰动等作用^[20-21]. 在后续研究中, 应加入其他因素对蔬菜大田真菌群落进行综合评价.

DNA 宏条形码技术相比传统测序单一物种鉴定,可同时对混合样本进行测序分析,具有省时省力的优点,现已成为物种多样性分析的利器^[22-23]。研究者认为 DNA 宏条形码技术利用序列数的多少来表示物种个体数量的多少,两者之间变化趋势一致,但没有完美契合,因此 DNA 宏条形码技术做定性分析的结果是可靠的,但定量分析仍需进一步验证^[24-25]。随着高通量测序技术的不断发展和分析方法的进一步完善,DNA 宏条形码技术将成为现代生态学物种多样性研究的有效措施和必然趋势。

参考文献:

- [1] POMPANON F, COISSAC E, TABERLET P, et al. A New Way of Analysing Biodiversity [J]. *Biofutur*, 2011, 30(319): 30-32.
- [2] COISSAC E, RIAZ T, PULLANDRE N. Bioinformatic Challenges for DNA Metabarcoding of Plants and Animals [J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 1834-1847.
- [3] 邢冉冉, 吴亚君, 陈颖. 宏条形码技术在食品物种鉴定中的应用及展望 [J]. *食品科学*, 2018, 39(13): 280-288.
- [4] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological Identifications through DNA Barcodes [J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [5] TABERLET P, COISSAC E, POMPANON F, et al. Towards Next-Generation Biodiversity Assessment Using DNA Metabarcoding [J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 2045-2050.
- [6] SCHUSTER S C. Next-Generation Sequencing Transforms Today's Biology [J]. *Nature Methods*, 2008, 5(1): 16-18.
- [7] 陈炼, 吴琳, 刘燕, 等. 环境 DNA metabarcoding 及其在生态学中的应用 [J]. *生态学报*, 2016, 36(15): 4573-4582.
- [8] 王荣亮, 段润平, 包丹, 等. 从物种识别到生物多样性评估——DNA 条形码与 DNA metabarcoding 技术 [J]. *生物学通报*, 2016, 51(4): 10-13.
- [9] FARRUGGIA A, POMPANON F, GINANE C, et al. Reconstituting the Diet of Grazing Domestic Herbivores Using Metabarcoding [J]. *Fourrages*, 2012, (209): 43-51.
- [10] 宋颺, 黄原. DNA 复合条形码在太白山土壤动物多样性研究中的应用 [J]. *生态学报*, 2016, 36(14): 4531-4539.
- [11] TABERLET P, PRUD'HOMME S M, CAMPIONE E, et al. Soil Sampling and Isolation of Extracellular DNA from Large Amount of Starting Material Suitable for Metabarcoding Studies [J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 1816-1820.
- [12] LUTHEDS. Cover Cropping Alters the Diet of Arthropods in a Banana Plantation: A Metabarcoding Approach [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93740. DOI: 10.1371/journal.pone.0093740.
- [13] MURRAY D C, HAILE J, DORTCH J, et al. Scrapheap Challenge: A Novel Bulk-Bone Metabarcoding Method to Investigate Ancient DNA in Faunal Assemblages [J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 3371.
- [14] KELLY R P, PORT J A, YAMAHARA K M, et al. Using Environmental DNA to Census Marine Fishes in a Large Mesocosm [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86175. DOI: 10.1371/journal.pone.0086175.
- [15] 吴永尧, 陈建英. 莼菜营养成分的初步研究 [J]. *资源开发与市场*, 2000, 16(6): 342-366.
- [16] 刘美玉, 刁向银, 罗丽娟, 等. 莼菜资源利用研究综述及展望 [J]. *长江蔬菜*, 2011(10): 7-10.
- [17] 纳小凡, 郑国琦, 彭励, 等. 不同种植年限宁夏枸杞根际微生物多样性变化 [J]. *土壤学报*, 2016, 53(1): 241-252.
- [18] 胡凯, 王微. 不同种植年限桉树人工林根际土壤微生物的活性 [J]. *贵州农业科学*, 2015, 43(12): 105-109.
- [19] 谢光新, 张荣先, 黄雪飞, 等. 不同生长年限茶树根际微生物分布的差异 [J]. *湖北农业科学*, 2012, 51(15): 3177-3179.
- [20] 徐红梅, 倪方方, 宋腾蛟, 等. 高通量测序揭示杭白芍根际真菌群落年际变化 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2016, 40(12): 942-947.
- [21] 吴雪莲, 周倩, 辜夕容, 等. 西南林区 3 株外生菌根真菌对酸铝胁迫的营养响应与抗铝性 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2015, 37(8): 13-19.
- [22] SCOLES J. International Barcode of Life: Evolution of a Global Research Community [J]. *Genome*, 2015, 58(5):

151-162.

- [23] 王苗苗,王孝仕,左龙亚,等. 基于ITS序列的竹亚科植物分子鉴定研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2018, 40(7): 44-50.
- [24] PIÑOL J, MIR G, GOMEZ-POLO P, et al. Universal and Blocking Primer Mismatches Limit the Use of High-Throughput DNA Sequencing for the Quantitative Metabarcoding of Arthropods [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(4): 819-830.
- [25] RACLARIU A C, HEINRICH M, ICHIM M C, et al. Benefits and Limitations of DNA Barcoding and Metabarcoding in Herbal Product Authentication [J]. *Phytochemical Analysis*, 2018, 29(2): 123-128.

A DNA-Metabarcoding-Based Study of the Diversity of Soil Fungi in the *Brasenia schreberi* Field

TENG Zuo¹, SONG Chun-hong², YU Jie¹

1. School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. China National Tobacco Corp (Pengshui Division), Pengshui Chongqing 409699, China

Abstract: DNA-Metabarcoding, which is a combination of high-throughput sequencing and DNA barcoding, enables the rapid identification of species in mixed samples and has become a common method for detecting species diversity and abundance. In an experiment reported herein, this method was used to analyze the diversity of soil fungi in *Brasenia schreberi* J. F. Gmel fields with different cultivation years. The results indicated the soil on which *B. schreberi* had been planted for 10 years contained the most fungal species with the highest diversity and abundance. At the genus level, *Trichoderma*, *Phyllospora* and *Saccharomyces* were predominant. Group composition analysis showed that the change of the cultivation year had a certain influence on the composition of soil fungal communities. In the cluster analysis, the similarity of soil species diversity between the 10th and 15th years was higher, and they were clustered together. The results of this study may lay a theoretical foundation for the scientific cultivation of *B. schreberi*.

Key words: cultivation year; *Brasenia schreberi*; DNA barcoding; high-throughput sequencing; identification

责任编辑 王新娟