

林 丽,陈泽斌,何群香,等. 烟草不同部位内生细菌的多样性[J]. 江苏农业科学,2017,45(22):274-278.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.22.073

烟草不同部位内生细菌的多样性

林 丽^{1,2}, 陈泽斌^{1,2}, 何群香¹, 徐松萍¹, 华金珠^{1,2}, 黄 丽^{1,2}, 徐胜光²

(1. 昆明学院, 云南昆明 650214; 2. 云南省高校生物炭工程研究中心, 云南昆明 650214)

摘要:为了揭示烟草不同器官中内生细菌的分布规律,应用 Illumina 测序平台的 MiSeq 高通量测序仪对烟草根、茎、叶中内生细菌的 16S rDNA-V4 区扩增子进行测序,对测得数据进行生物信息学分析,评价物种 α 多样性和 β 多样性。经 FLASH 软件对序列进行拼接,茎、叶、根样品分别获得 36 129、60 312、52 573 条原始序列,经 Qiime 软件过滤,再剔除宿主的叶绿体和线粒体序列,最终分别得到 35 190、58 938、51 268 条有效序列,在 97% 的序列相似性水平上,这些有效序列被 Uparse 软件划分为 1 447、1 141、1 220 个操作分类单元(OTUs)。序列比对结果表明,在根、茎、叶中芽球菌属(*Blastococcus*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)为优势菌。类诺卡氏菌属(*Nocardioideis*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、*Gemmatimonadaceae* 属、*Gaiella* 属、壤红杆菌属(*Solirubrobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)细菌表现出组织专一性,主成分分析表明,根和叶中内生细菌群落结构最为相似。烟草植株内蕴含丰富的细菌资源,受组织结构及成分因素影响表现出器官差异性,即茎>根>叶。通过对烟草不同部位内生细菌多样性进行研究,可为烟草植物生物活性内生菌株的发掘利用提供理论依据。

关键词:烟草;营养器官;内生细菌;组成;多样性;分布规律;生物信息学;宿主;优势菌;基因工程菌

中图分类号: S572.01; Q939.92 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)22-0274-05

植物内生细菌(endophytic bacteria)泛指那些在其生活中的一定阶段或全部阶段生活于健康植物体内对植物器官未引

收稿日期:2017-03-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:41361056);云南省教育厅科学研究项目(编号:2016ZDX096,2014Y390);昆明学院“人才引进”项目(编号:YJL14005);云南省高校优势特色重点学科(生态学)建设项目(编号:05000511311);云南省特色生物资源开发与利用重点实验室开放基金(编号:GXKJ201621)。

作者简介:林 丽(1976—),女,云南水富人,硕士,讲师,主要从事植物保护的教學及科研工作。E-mail:llysj4809@163.com。

通信作者:徐胜光,博士,研究员,主要从事污染生态的生物炭修复技术开发及产业化方向。E-mail:sgxu2011@126.com。

依据,可为政府决策部门制定相关政策提供可靠的参考。

参考文献:

- [1] Wackernagel M, Monfreda C, Erb K H, et al. Ecological footprint time series of Austria, the Philippines, and South Korea for 1961-1999: comparing the conventional approach to an 'actual land area' approach[J]. Land Use Policy, 2004, 21(3): 261-269.
- [2] 施开放,刁承泰,孙秀峰,等. 基于耕地生态足迹的重庆市耕地生态承载力供需平衡研究[J]. 生态学报, 2013, 33(6): 1872-1880.
- [3] 蓝盛芳,钦 佩,陆宏芳. 生态经济系统能值分析[M]. 北京:化学工业出版社, 2002: 384.
- [4] 张芳怡,濮励杰,张 健. 基于能值分析理论的生态足迹模型及应用——以江苏省为例[J]. 自然资源学报, 2006, 21(4): 653-660.
- [5] 赵雪雁,刘 霜,赵海莉. 基于能值分析理论的生态足迹在区域可持续发展评价中的应用——以甘肃省为例[J]. 干旱区研究, 2011, 28(3): 524-531.
- [6] 边淑娟,黄民生,李 娟,等. 基于能值生态足迹理论的福建省农

起明显病害症状的微生物^[1]。近年来,已知在地球上接近 30 种的高等植物中每个物种都与多种内生细菌共生^[2]。对烟草植物中内生细菌的报道早就出现了,但大多采用一代测序进行研究分析,运用二代测序进行研究分析的报道少之又少。因此,本研究采用 Illumina 高通量测序平台的 MiSeq 测序仪对烟草不同部位内生细菌的 16S rDNA 扩增子进行二代测序,相较于传统的组织培养法以及基于一代测序的非培养方法,测序费用低,测序深度更大,检测灵敏度更高,从而能更好地实现对烟草不同部位内生细菌种类的准确调查,从而加深对烟草内生细菌种群结构的了解。

内生细菌是一个多样性丰富的微生物类群,生活于健康植物的各个组织和细胞间隙内,具有稳定的生存空间,不易受

业废弃物再利用方式评估[J]. 生态学报, 2010, 30(10): 2678-2686.

- [7] 黄 春,邓良基,高雪松,等. 基于能值理论的秸秆利用生态足迹评估——以成都平原典型稻麦轮作区为例[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(6): 722-728.
- [8] 谢 霞,王宏卫. 塔西甫拉提·特依拜. 基于能值理论的艾比湖地区生态足迹分析[J]. 干旱区资源与环境, 2010, 24(6): 21-25.
- [9] 新疆维吾尔自治区统计局. 2005—2014 年新疆统计年鉴[M]. 北京:中国统计出版社, 2005-2014.
- [10] 中华人民共和国国家统计局. 2015 中国统计年鉴[M]. 北京:中国统计出版社, 2015.
- [11] 侯新强. 新疆农作物秸秆资源化综合利用模式研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学, 2012.
- [12] 毕于运. 秸秆资源评价与利用研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2010.
- [13] 韦茂贵,王晓玉,谢光辉. 中国各省大田作物田间秸秆资源量及其时间分布[J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(6): 32-44.

环境条件的影响,可以在植物体内独立地分裂繁殖和传递,并与宿主植物协同进化^[3]。内生细菌长期生活在植物组织内,与宿主形成共生关系,生态适应性强,产生活性物质,并参与信息转导作用直接作用于宿主本身,植物内生细菌能够促进宿主植物的生长、提高宿主植物的抗病虫害能力、增强宿主植物抗逆性^[4],提高宿主植物对环境的适应性,加强系统的生态平衡。研究表明,高等植物中普遍存在内生细菌,据不完全统计统计,截至 2010 年,在各种农作物及经济作物中发现的内生细菌已超过 129 种,分属于 54 个属,主要为假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、泛菌属(*Pantoea*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)等^[5]。陈泽斌等采用研磨组织稀释分离法分离烟草植株中的内生细菌,对不同组织器官、不同生长期的烟草内生细菌菌群密度进行研究。结果表明,烟株的根、茎、叶中均存在大量的内生细菌,烟草内生细菌的分布存在品种差异、生长期差异、组织部位差异。在整个生育期中,以成熟期内生细菌的数量最多^[6]。他们还采用稀释平板法从健康烟草的根、茎、叶组织中分离到 267 株内生细菌,并利用细菌菌落表征性状和 16S rRNA 序列对这些分离物进行多样性分析。经克隆测序分析表明,这 267 株分离物分别与 GenBank 中 6 类细菌中的 21 个已知种相似性达到 98%~99%^[7]。王茂胜等为揭示烟草内生细菌多样性,选择 K326、云 85 和红花大金元 3 个烤烟品种进行内生细菌的分离和 16S rDNA 序列分析鉴定,获得不同品种烟草内生细菌的多样性特征。结果显示,3 个品种的香农指数以 K326 最高,为 2.02;其次是云烟 85,为 1.48;红花大金元最低,为 1.30^[8]。这些研究进展所采用的都是一代测序技术,然而早期一代测序技术普遍存在诸如文库构建过程复杂、测序成本较高、通量低、难以做大量的平行测序等缺点。为了克服上述缺点,笔者利用近年来发展的二代测序技术,不仅在文库构建等方面取得了重要突破,进一步简化了测序操作,降低了测序成本,缩短了测序时间;而且二代测序技术的出现使 DNA 测序的通量有所提高,原来只有在大型测序中心才能完成的测序任务现在已经在更多的实验室展开。本研究采用近年来兴起的 Illumina MiSeq 二代测序技术对烟草根、茎、叶内生细菌种类组成进行分析,相较于传统的纯培养方法及以 16S rDNA 为基础的非培养方法,能够产生测序覆盖深度更大的数据量,从而对烟草内生细菌的种类进行全面而准确的调查,为丰富植物微生物生态学理论及基因工程菌的研究和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2016 年 7 月 27 日于云南省宣威市落水镇试验田随机选取 10 株成熟期健康无明显病害烟草,烟草品种为云烟 87,采集其根、茎、叶放入无菌样品袋中,均匀混合,低温保鲜,24 h 内进行表面消毒处理。

1.2 表面消毒

将烤烟根、茎、叶用灭菌水冲洗干净,先用 1% 次氯酸钠浸泡 5 min,再用 75% 乙醇浸泡 2 min,无菌水冲洗 3 次,用无菌滤纸吸干表面水分,表面消毒效果接近 100%^[9]。

1.3 总 DNA 提取

按参考文献[10]所采用的 CTAB 方法提取根、茎、叶的总 DNA,并用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 的完整度和浓度,并将剩余的样品存于 2 mL 离心管中,使用无菌水稀释样品 DNA 至 1 ng/ μ L。

1.4 16S rDNA - V4 区的 PCR 扩增

以稀释后提取的总 DNA 为模板,使用带条形码的 16S rDNA - V4 区特异引物 515F(5' - GTTTCGGTGCCAGCMGCC GCGGTAA - 3') 和 806R(5' - AGTTCGGACTACHVGGGTW TCTAAT - 3')^[11],使用美国纽英伦生物技术(北京)有限公司的 Phusion® High - Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 进行 PCR 扩增,扩增体系 50 μ L,PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 30 s; 94 $^{\circ}$ C 20 s,45 $^{\circ}$ C 20 s,65 $^{\circ}$ C 60 s,5 个循环;94 $^{\circ}$ C 20 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,20 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min^[12-13]。PCR 产物使用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,采用凯杰企业管理(上海)有限公司提供的胶回收试剂盒回收 DNA,委托北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成高通量测序。

1.5 数据分析

测序得到的原始数据存在一定比例的干扰数据,为了使信息分析的结果更加准确、可靠,首先对原始数据进行拼接、过滤,得到有效数据。然后基于有效数据进行操作分类单元(operational taxonomic units,OTUs)聚类 and 物种分类分析。根据 OTUs 聚类结果,选取每个样品或分组在各分类水平[门(phylum)、纲(class)、目(order)、科(family)、属(genus)]上最大丰度排名前 10 的物种,生成物种相对丰度柱形累加图,以便直观查看各样品在不同分类水平相对丰度较高的物种及其比例。一方面,对每个 OTU 的代表序列作物种注释^[4],得到对应的物种信息和基于物种的丰度分布情况。利用 Mothur 软件作稀释曲线分析,通过对 OTUs 进行丰度和采用 Chao1 指数及 Shannon 指数(香农指数)评估根、茎、叶内生细菌的多样性。采用 R 语言分析绘制样品 OTUs 的维恩图,通过主成分分析(PCA)挖掘根、茎、叶内生细菌群落结构的差异^[5,14-15]。另一方面,利用 Uparse 软件平台进行 OTU 聚类,采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,并在各个水平上统计每个样品的群落组成;利用 Shannon 指数、Chao1 指数和物种丰富度指数(ACE)公式计算细菌生态多样性指数;利用诺禾致源自主开发的 SVG 软件制作特定物种分类树图。

2 结果与分析

2.1 测序数据的质控及分析

根、茎、叶样品分别测得 52 573、36 129、60 312 条原始序列,经过滤后得到的序列拼接总数分别为 51 268、35 190、58 938 条,去除出现频率为 1、无法被聚类到 OTUs 的低频序列,最终分别得到 50 933、34 762、58 659 条有效序列,在 97% 的序列相似性水平上,这些有效序列分别可划分为 1 220、1 447、1 141 个 OTUs,相对应的文库覆盖率分别为 99.0%、98.9%、98.7% (表 1)。图 1 显示,3 个样品稀释曲线上升平缓,结合覆盖率可知,设计的测序深度已足够,可以代表样品中真实存在的大多数细菌种类,但仍有少数细菌种类未能检测到。

从细菌丰度稀释曲线(图 1)来看,随着序列数量的增加,

表 1 OTU 丰度和 α 多样性指数

样品名	标签序列	原始序列数	质控序列数	有效序列数	OTU 数量 (97%)	α 多样性			
						香农指数(97%)	ACE	Chao1 指数(97%)	覆盖率(%)
根	CGATGT	52 573	51 268	50 933	1 220	4.103	1 588.379	1 564.392	99.0
茎	ACAGTG	36 129	35 190	34 762	1 447	6.716	1 730.369	2 153.985	98.9
叶	AGTCAA	60 312	58 938	58 659	1 141	3.185	1 519.269	1 487.482	98.7

细菌的稀释曲线斜率逐渐趋向平坦但未进入平台期,说明即使再增加测序数量也只会产生少量新的 OTUs;测序数据量足够大,可以反映样品中细菌的物种量信息,总体来看,随着序列数量的增加,物种数量呈现出“茎>根>叶”的趋势。

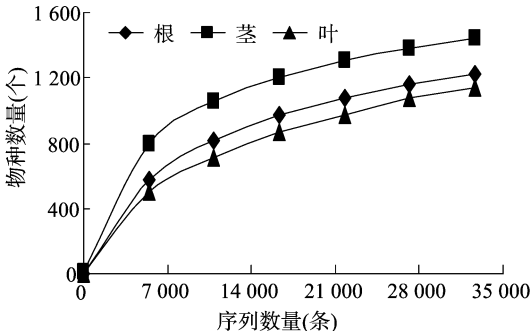


图1 丰度稀释曲线

2.2 不同部位内生细菌 OTUs 分布

根、茎、叶细菌文库共含 OTUs 3 808 个,特有的 OTUs 分别为 1 220、1 447、1 141 个,由此可看出茎部内生细菌多样性最高,其次为根部,最低为叶,这与 Chao1 指数、ACE、香农指数得出的结果一致(表 1)。有 887 个 OTUs 在根、茎、叶中均有分布,占文库 OTUs 总数的 23.29%,说明不同部位内生细菌的种类组成差异小;根和叶文库共含 OTUs 2 361 个,其中 936 个 OTUs 在根和叶中均有分布,占相应 OTUs 总数的 39.66%;叶和茎文库共含 OTUs 2 588 个,其中 1 038 个 OTUs 在叶和茎中均有分布,占相应 OTUs 总数的 40.11%;根和茎文库共含 OTUs 2 667 个,其中 1 111 个 OTUs 在根和茎中均有分布,占相应 OTUs 总数的 41.66%,由此可看出根茎叶中内生细菌的种类组成差异不大(图 2)。

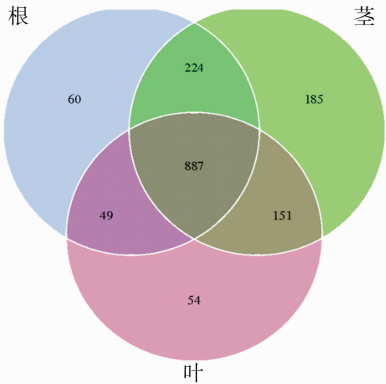


图2 OTUs 分布维恩图示

2.3 细菌中各样品中微生物群落分布特征分析

选取在属分类水平上相对丰度排名前 10 的属,生成物种相对丰度分布柱形图,结果见图 3、图 4、图 5,由于此试验采用 CTAB 法提取了烤烟根、茎、叶基因组 DNA,植物叶绿体

16S rDNA 和线粒体 18S rDNA 与细菌 16S rDNA 序列具有高度同源性,因此出现了蓝藻细菌门(Cyanobacteria, 70.09%)中无法辨别的叶绿体和变形菌门(Proteobacteria, 24.84%)中无法辨别的线粒体污染宿主的现象。3 个样品以变形菌门(Proteobacteria, 24.84%)、放线菌门(Actinobacteria, 4.45%)为主要的优势菌门,其次是芽单胞菌门(Gemmatimonadetes, 0.62%)。在变形菌门(Proteobacteria, 24.84%)中,鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales)中的鞘氨醇单胞菌属(Sphingomonas)占 2.26%, γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)中的假单胞菌属(Pseudomonas)占 0.53%。在放线菌门(Actinobacteria, 4.45%)中 Gaiella 属占 0.79%,壤红杆菌属(Solirubrobacter)占 0.95%,芽球菌属(Blastococcus)占 1.06%,类诺卡氏菌属(Nocardioideis)占 0.52%,链霉菌属(Streptomyces)占 1.13%。在芽单胞菌门(Gemmatimonadetes, 0.62%)中,芽单胞菌属(Gemmatimonadaceae)占 0.62%(图 6)。

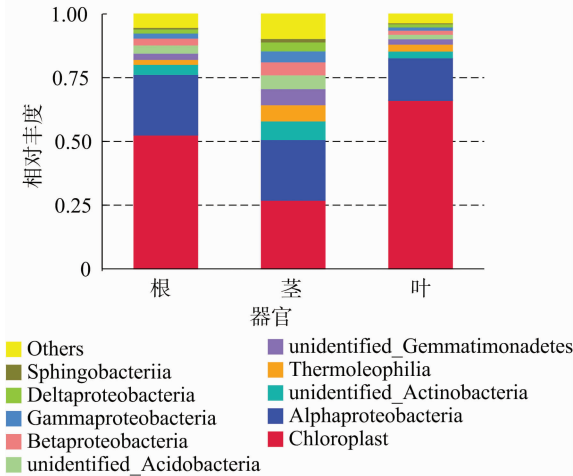


图3 纲水平上的物种相对丰度

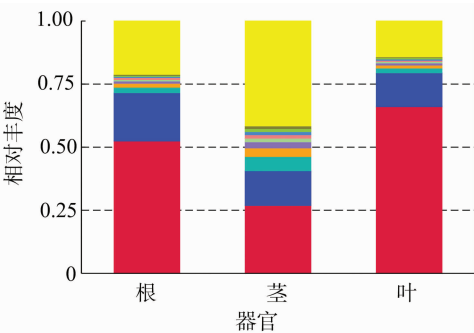


图4 科水平上的物种相对丰度

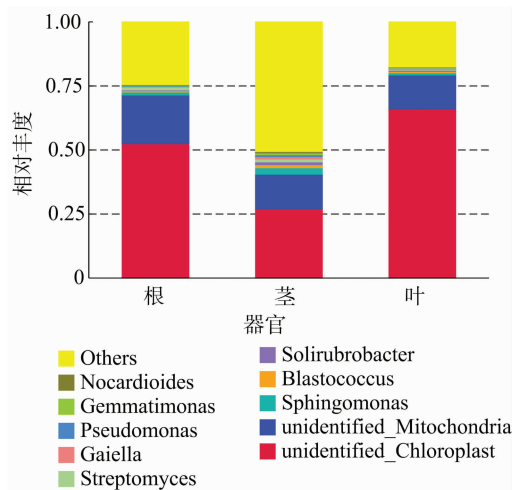


图5 属水平上的物种相对丰度

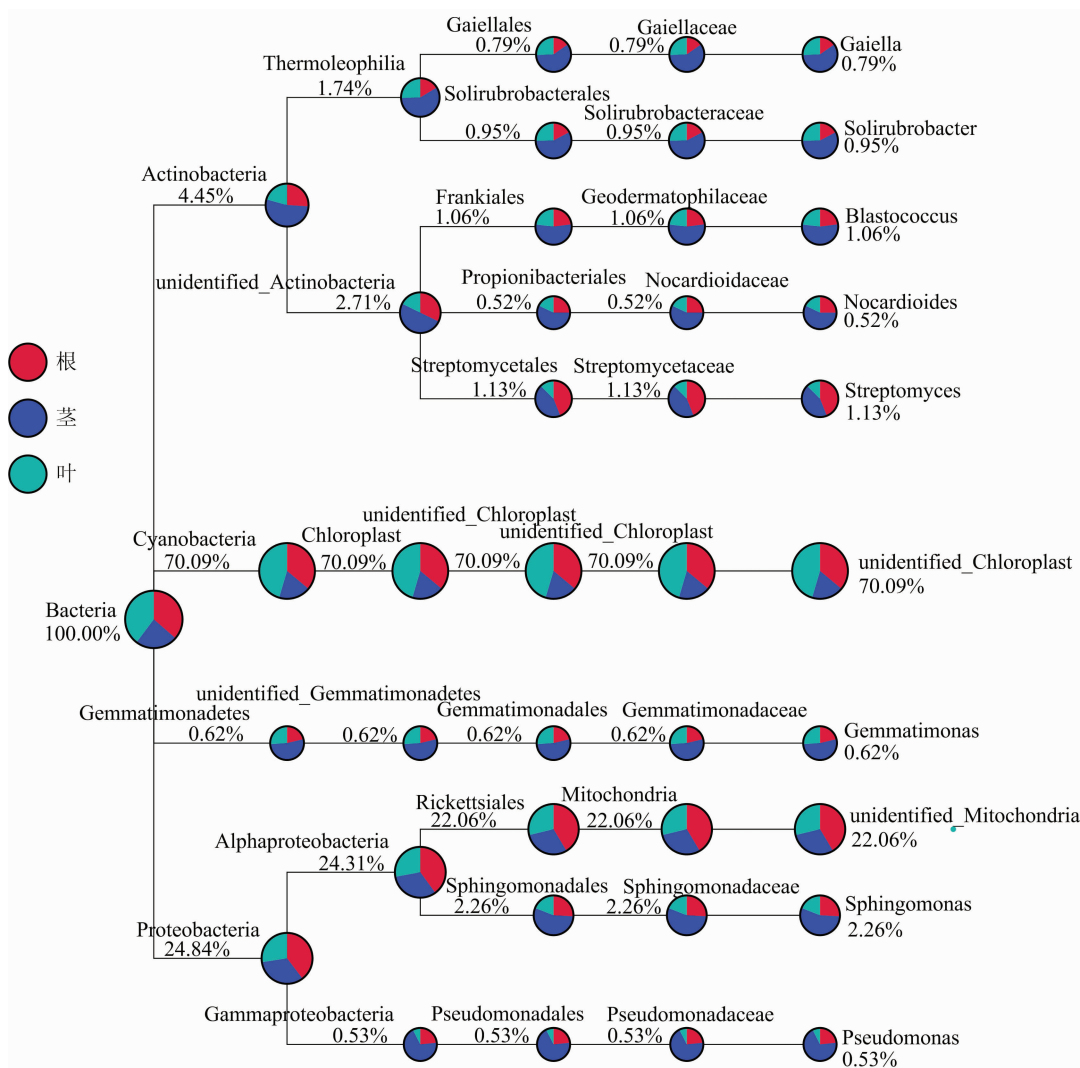


图6 多样性中特定物种分类树

2.4 PCA 聚类分析

PCA 主成分分析(图7)表明,主成分1(PC1)和主成分2(PC2)对样品差异性的解释度分别为68.26%和31.74%,合计为100%,是差异的主要来源。样品根和茎分别位于主成分PC2轴的正负两侧,但同时都位于主成分PC1轴的正值区域;样品根和茎不仅分别位于主成分PC2轴的正负两侧,而且也位于主成分PC1轴的正负两侧,且间隔较大的距离,说明根与茎间的主成分变异程度比根与叶显著。总体看来,内生细菌群落的分布随部位的不同有显著变化。

3 讨论与结论

研究植物内生菌最关键的是表面灭菌是否彻底,表面消毒效果检验参照文献[9]。本试验将烟草材料先置于1%次氯酸钠中浸泡5 min,再在75%乙醇中浸泡2 min,无菌水冲洗3次,最后一次冲洗的水没有培养出微生物。通过上述处

理后,烟草植株表面消毒达到98%~100%^[16]。本试验采用近年来兴起的Illumina MiSeq二代测序技术对烟草根、茎、叶内生细菌种类组成进行研究,利用MiSeq平台对16S rDNA的1个或多个高变区进行测序,具有测序覆盖深度高、利于鉴定低丰度群落物种以及费用低的特点,已成为研究微生物群落

多样性的首选之策。本研究首次采用二代高通量测序技术对烟草内生细菌16S rDNA-V4区进行测序,根、茎、叶样品分别平均测得49 659条序列,经序列比对后发现在根、茎、叶中常见的优势细菌主要属于变形菌门(Proteobacteria)。此外,还检测到一些几乎没有报道过的低丰度细菌类群(所占比例

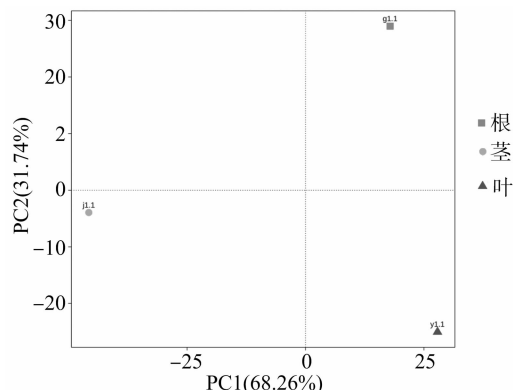


图7 细菌群落主成分分析

小于 1.00%), 如 *Gaiella* 属、壤杆菌属 (*Solirubrobacter*)、类诺卡氏菌属 (*Nocardioideis*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 显示出了新一代测序技术的优势。在以往通过传统组织分离方法对烤烟内生细菌进行分离鉴定的报道中均发现优势菌变形菌门 (Proteobacteria) 的芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 细菌^[17-18], 这与本研究的结果不一致, 这可能与芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 细菌在植物体内多是以孢子形式存在有关, 而提取植物组织 DNA 目前多采用 CTAB 法、SDS 法, 无法使其裂解, 导致未能获取到该类细菌的基因组 DNA。

根、茎、叶细菌文库共含 OTUs 3 808 个, 只有 887 个 OTUs 为根、茎、叶共有, 只占文库 OTUs 总数的 23.29%, 此外 ACE、Chao1 指数得出的结果为茎 > 根 > 叶, 体现出内生细菌的分布随组织器官的不同而各有特点, 具有明显的器官差异性, 这可能是由不同器官的组织结构不同、含有的化学成分不同造成的。本研究发现, 在根、茎、叶中变形菌门 (Proteobacteria) 为优势菌门, 因此推测这个属细菌的侵入能力强, 且在植株体内具有较强的竞争力。

在将 16S rDNA - V4 区测得序列与数据库进行比对的过程中发现, 大部分序列归属于宿主植物的叶绿体和线粒体, 因此为了防止在测序中依然出现此类现象, 可通过改良现有的 DNA 提取方法, 使之尽可能少地提取出细胞器 DNA 或者研发一种阻断技术, 阻止或降低真核宿主基因序列的扩增以避免线粒体和叶绿体的干扰^[19]。

参考文献:

- [1] 徐玲玲, 单庆红, 郭 斌. 植物内生菌研究进展及应用展望[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(13): 5641 - 5643, 5709.
- [2] 姚领爱, 胡之璧, 王莉莉, 等. 植物内生菌与宿主关系研究进展[J]. 生态环境学报, 2010, 19(7): 1750 - 1754.
- [3] 黄宝康, 秦路平. 药用植物内生菌的生物多样性及活性成分[J].

药实践杂志, 2006, 24(4): 193 - 196.

- [4] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194 - 2200.
- [5] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, et al. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73 (16): 5261 - 5267.
- [6] 陈泽斌, 夏振远, 雷丽萍, 等. 云南烟草内生细菌菌群密度及分布特征[J]. 西南农业学报, 2014, 27(2): 682 - 687.
- [7] 陈泽斌, 夏振远, 雷丽萍, 等. 烟草可培养内生细菌的分离及多样性分析[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1347 - 1354.
- [8] 王茂胜, 汪汉成, 马 莹, 等. 烟草内生细菌多样性研究[J]. 广东农业科学, 2015, 42(23): 59 - 64.
- [9] 陈泽斌, 代方平, 寸林江, 等. 烟草内生细菌分离方法的优化研究[J]. 中国烟草学报, 2014, 20(1): 90 - 95, 102.
- [10] 邱服斌. 培养方法与非培养方法对人参根内生细菌的研究[D]. 北京: 首都师范大学, 2007.
- [11] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(Suppl 1): 4516 - 4522.
- [12] Youssef N, Sheik C S, Krumholz L R, et al. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing - generated fragments in 16S rRNA gene - based environmental surveys[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(16): 5227 - 5236.
- [13] Hess M, Sczyrba A, Egan R, et al. Metagenomic discovery of biomass - degrading genes and genomes from cow rumen [J]. Science, 2011, 331(616): 463 - 467.
- [14] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996 - 998.
- [15] Desantis T Z, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a chimera - checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(7): 5069 - 5072.
- [16] 陈泽斌, 夏振远, 雷丽萍, 等. 非培养方法解析烟草根部内生细菌的群落结构[J]. 华北农学报, 2012, 27(1): 201 - 209.
- [17] 严 亮, 杨瑞娟, 王桥美. 云南铁皮石斛内生菌的分离与鉴定[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2015, 30(5): 760 - 765.
- [18] 林凤敏, 姬文秀, 李虎林. 烟草根际与非根际细菌的系统发育多样性研究[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(5): 1058 - 1062.
- [19] 邱服斌, 刘 琳, 宋 未. 人参细胞器核糖体小亚单位 DNA 的 PCR 扩增与序列测定[J]. 生物技术通报, 2008(1): 124 - 127.