

铁皮石斛不同部位内生细菌群落高通量分析

陈泽斌¹,李冰^{2*},高熹³,王定斌⁴,靳松¹,郭丽红⁵

(1.昆明学院农学院,云南昆明650214;2.中国科学院昆明动物研究所,云南昆明650223;
3.云南农业大学植物保护学院,云南昆明650201;4.宣威市阿都乡农业综合服务中心,云南宣威655425;
5.云南省高校特色生物资源开发与利用重点实验室,云南昆明650214)

摘要:为揭示铁皮石斛不同器官中内生细菌的分布规律,应用Illumina测序平台的MiSeq高通量测序仪对铁皮石斛根、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Alpha多样性和Beta多样性。经FLASH软件对序列进行拼接,茎、叶、根样品分别获得64 851、77 499、52 157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64 742、77 351、52 064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61、134、112个操作分类单元(OTUs)。序列比对结果表明,假单胞菌属(*Pseudomonas*)和食酸菌属(*Acidovorax*)细菌在根、茎、叶中都是优势菌,瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、*Faecalibacterium*属、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)细菌表现出组织专一性。丰度聚类分析及主成分分析表明,根和叶中内生细菌群落结构最为相似。铁皮石斛植株内蕴含丰富的细菌资源,其分布受组织结构及成分因素影响表现出器官差异性。

关键词:铁皮石斛;内生细菌;多样性;高通量分析

中图分类号:S567.239 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-3268(2017)11-0098-06

High Throughput Analysis of the Endophytic Bacterial Community in
Different Parts of *Dendrobium candidum*

CHEN Zebin¹, LI Bing^{2*}, GAO Xi³, WANG Dingbin⁴, JIN Song¹, GUO Lihong⁵

(1. Agriculture College of Kunming University, Kunming 650214, China;
2. Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;
3. Plant Protection College, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
4. Xuanwei City Adu Township Comprehensive Agricultural Service Center, Xuanwei 655425, China; 5. Key Laboratory of Special Biological Resource Development and Utilization of Universities in Yunnan Province, Kunming 650214, China)

Abstract: In order to disclose the distribution rule of endophytic bacteria in different organs of *Dendrobium candidum*, the MiSeq high-throughput sequencer of Illumina sequencing platform was used to sequence the amplicon of 16S rDNA-V4 of endophytic bacteria in the root, stem and leaves of *Dendrobium candidum*. Further Bioinformatics analysis was conducted to evaluate the Alpha and Beta diversities of species. After sequence assembly using FLASH software, 64 851, 77 499 and 52 157 original sequences were obtained from the stem, leaf and root samples, respectively. Filtered by Qiime software, the chloroplast and

收稿日期:2017-06-27
基金项目:国家自然科学基金项目(31460491);云南省科技厅基础研究项目(2013FD040);云南省教育厅科学研究项目(2014Y390);昆明学院大学生科研项目(XJD16081);昆明学院人才引进项目(YJL14005);云南省高校特色生物资源开发与利用重点实验室开放基金项目(GXKJ201621);云南省高校优势特色重点学科(生态学)建设项目(05000511311)
作者简介:陈泽斌(1985-),男,云南昆明人,副教授,博士,主要从事环境微生物的教学及科研工作。
E-mail:zbchenkmu@163.com
* 通讯作者:李冰(1973-),女,辽宁沈阳人,高级工程师,硕士,主要从事非临床药物安全性评价工作。
E-mail:libing@mail.kiz.ac.cn

mitochondria sequences were eliminated, and 64 742, 77 351 and 52 064 valid sequences were finally obtained. Based on 97% sequence similarity, these valid sequences were divided into 61, 134 and 112 operational taxonomic units (OTUs). The sequence alignment result showed that both *Pseudomonas* and *Acidovorax* bacteria were in the root, stem and leaves, the *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Methylobacterium* and *Shewanella* bacteria presented tissue specificity. The abundance clustering analysis and main component analysis showed that the endophytic bacteria in root and leaves had the most similar community structure. The *Dendrobium candidum* plant contains rich bacterial resources, which present organ differentiation under the influence of organizational structure and composition factors.

Key words: *Dendrobium candidum*; endophytic bacteria; diversity; high throughput analysis

石斛可分为黄草、金钗、马鞭等数十种,铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)为石斛中经济价值最高的一种,有“中华九大仙草之首”的美称,分布于安徽西南部、浙江东部、福建西部、广西西北部、四川、云南东南部海拔 1 600 m 的山地半阴湿的岩石上^[1-2]。以铁皮石斛的茎入药,具有增加胃液分泌、助消化、促进肠胃蠕动、降血糖、降血压、增强机体免疫力等作用^[3-6]。

植物内生菌是指整个生活周期都存在于宿主植物体内的细菌、真菌和放线菌,目前还没有发现不存在内生菌的植物^[7]。内生菌在石斛属植物促进生长^[8]、抑制病原菌^[9]、影响宿主代谢成分^[10-11]方面起着重要的作用,因此有必要对铁皮石斛内生菌多样性进行研究。洪群艳等^[12]认为,刺盘孢属(*Colletotrichum*)为野生石斛茎和叶的优势种群,占总菌株数的 39.5%。此外还发现,石斛内生真菌具有组织差异性和专一性。章华伟等^[13]发现,铁皮石斛内生细菌分布在芽孢杆菌属(*Bacillus*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、泛菌属(*Pantoea*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、梭菌属(*Clostridium*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)共 7 个属。严亮等^[14]发现,*Bacillus oceanisediminis*、*Bacillus beringensis* 和 *Bacillus licheniformis* 3 种菌同时存在于根部和叶部。

目前,对于石斛内生菌多样性的研究仍是采用传统的组织培养方法进行,然而由于表面消毒过重、所用培养基营养成分单一、有氧的培养条件等因素,实际上只分离到真实存在微生物总数的 0.1% ~ 10%^[15-16],随着分子生物学技术的不断发展,为了无偏差地了解内生细菌群落的真实组成,可采用免培养技术手段直接从 DNA 层面解析群落中的物种组成。因此,本研究首次采用 Illumina 高通量测序平台的 MiSeq 测序仪对铁皮石斛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 Sanger 测序的非培养方法,测序成本更低,深度更大,检测灵敏度更高,从而

实现对铁皮石斛不同部位内生细菌种类的准确调查,为丰富植物微生态学理论及基因工程菌的研究和应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 样品采集

2016 年 8 月于云南省普洱市景东彝族自治县铁皮石斛人工栽培基地,采用 3 点取样法挖取 20 株无明显病虫害的 1 年生栽培型铁皮石斛,去除腐叶,将根、茎、叶分别放入无菌样品袋中,混合均匀,低温保鲜,于 24 h 内进行表面消毒处理,根、茎、叶样品分别命名为 SG、SJ、SY。

1.2 表面消毒

用无菌水将铁皮石斛根、茎、叶冲洗干净,吸干表面水分,再用 75% 乙醇浸泡 30 s,0.1% 升汞振荡浸泡 5 min,无菌水冲洗 4 次,无菌滤纸吸干表面水分,表面消毒效果检验参照文献^[17]。

1.3 基因组 DNA 的提取

采用改进的 CTAB 法^[18]提取表面彻底消毒的根、茎、叶组织基因组 DNA,并用 0.5% 的琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 的浓度和纯度。

1.4 16S rDNA - V4 区的 PCR 扩增

以根、茎、叶基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 16S rDNA 的 V4 可变区,引物为 515F(5' - GTGCCAGC-MGCCGCGGTAA - 3') 和 806R(5' - GGACTACH-VGGGTWTCTAAT - 3')^[19],根、茎、叶引物序列前插入 6 个碱基组成的标签序列,以区分根、茎、叶样品。PCR 反应体系参照文献^[19]。采用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物并切胶回收目的条带,送北京诺禾致源生物信息科技有限公司,用 Illumina 高通量测序平台的 MiSeq 测序仪测序。

1.5 测序数据的质控

根据插入标签序列,将下机数据拆分为根、茎、叶数据,剔除标签序列和引物序列,使用 FLASH 软件^[20]分别对不同样品的读长序列进行拼接,Qiime 软件^[21]过滤,经过以上处理后得到的序列与数据库

(Golddatabase, http://drive5.com/uchime/uchime_download.html) 进行比对,UCHIME 软件^[22]检测嵌合体序列,并去除其中的嵌合体序列,得到最终的有效序列。

1.6 测序数据的分析

在 97% 的相似性水平上用 Uparse 软件^[23] (Up-arse v7.0.1001, <http://drive5.com/uparse/>) 对有效序列进行操作分类单元 (OTUs) 聚类,选取代表序列用 RDP classifier 软件^[24] (V2.2, <http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>) 与 GreenGene 数据库^[25] (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>) 进行物种注释分析,剔除宿主叶绿体和线粒体序列,利用 Mothur 软件做稀释度曲线分析,计算文库覆盖率,采用 Chao 1 指数及香农 (Shannon) 指数评估根、茎、叶内生细菌多样性,计算方法参见文献^[26]。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。

2 结果与分析

2.1 测序数据的质控及分析

茎、叶、根样品分别测得 64 851、77 499、52 157 条原始序列,经过滤后得到的序列拼接总数分别为 64 748、77 361、52 069 条,去除出现频度为 1、无法被聚类到 OTUs 的低频序列,再剔除宿主的叶绿体和线粒体序列,最终分别得到 64 742、77 351、52 064 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 61、134、112 个 OTUs,相对应的文库覆盖率分别为 99.91%、99.83%、99.78% (表 1),物种丰度稀释曲线见图 1,3 个样品稀释曲线上升平缓,结合覆盖率数据认为,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。

表 1 铁皮石斛样品 OTUs 丰度和 α 多样性指数

样品名	标签序列	原始序列数/条	质控序列数/条	有效序列数/条	OTUs 数量 (97%) /个	α 多样性		
						香农指数 (97%)	Chao 1 指数 (97%)	覆盖率/%
SJ	CGATGT	64 851	64 748	64 742	61	0.898	65.000	99.91
SY	ACAGTG	77 499	77 361	77 351	134	1.549	146.083	99.83
SG	AGTCAA	52 157	52 069	52 064	112	0.973	112.477	99.78

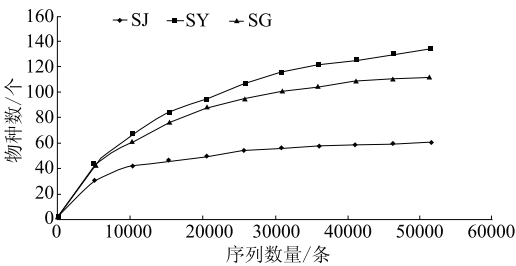


图 1 物种丰度稀释曲线

OTUs 总数的 17.34%。可以看出,根和叶中内生细菌的种类组成较相似。

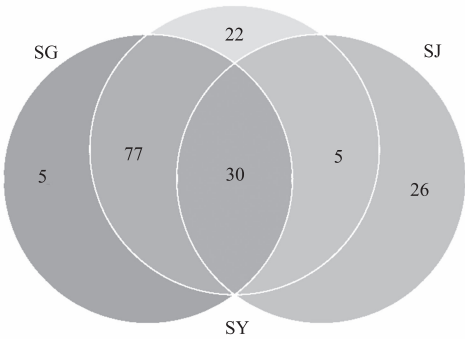


图 2 内生细菌 OTUs 分布维恩图

2.2 不同部位内生细菌 OTUs 分布

根、茎、叶细菌文库共含 OTUs 的数量为 307 个,特有的 OTUs 数量分别为 112、61、134 个,由此可看出,叶片内生细菌多样性最高,其次为根,最低为茎,这与 Chao 1 指数、香农指数得出的结果一致 (表 1)。从图 2 可知,有 30 个 OTUs 在根、茎、叶中均有分布,只占文库 OTUs 总数的 9.77%,说明不同部位内生细菌的种类组成差异大;根和叶文库共含 OTUs 的数量为 246 个,其中 107 个 OTUs 在根和叶中均有分布,占相应 OTUs 总数的 43.50%;叶和茎文库共含 OTUs 的数量为 195 个,其中 35 个 OTUs 在叶和茎中均有分布,占相应 OTUs 总数的 17.95%;根和茎文库共含 OTUs 的数量为 173 个,其中 30 个 OTUs 在根和茎中均有分布,占相应

2.3 不同部位内生细菌多样性

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图 (图 3)。在茎样品中,内生细菌优势属为假单胞菌属 (*Pseudomonas*, 54.84%),其次是食酸菌属 (*Acidovorax*, 22.58%);在叶样品中,内生细菌优势属为假单胞菌属 (*Pseudomonas*, 26.00%),其次是鞘脂单胞菌属 (*Sphingomonas*, 24.00%) 和食酸菌属 (*Acidovorax*, 10.00%);在根样品中,内生细菌优势属为食酸菌

属 (*Acidovorax*, 36.96%), 其次是假单胞菌属 (*Pseudomonas*, 26.09%) 和鞘脂单胞菌属 (*Sphingomonas*, 10.87%)。可发现假单胞菌属和食酸菌属细菌在根、茎、叶中都是优势菌。此外还发现, 盐单胞菌属 (*Halomonas*)、布赫纳氏菌属 (*Buchnera*) 在根、茎、叶中少量分布。瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*, 8.00%) 和 *Faecalibacterium* 属 (8.00%) 只在叶样品中检测到, 甲基杆菌属 (*Methylobacterium*) 和希瓦氏菌属 (*Shewanella*) 只在根 (2.17%、4.35%) 和叶 (8.00%、2.00%) 样品中检测到, 甲基嗜菌属 (*Methylocaldum*, 6.45%) 只存在于茎部。

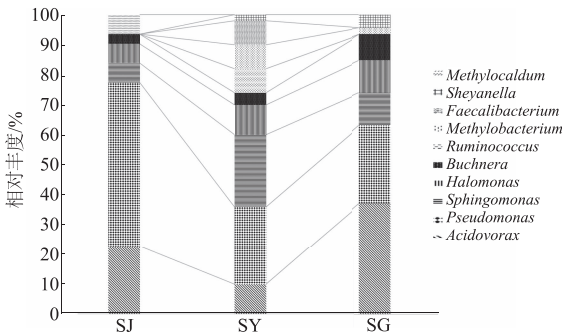


图 3 内生细菌属水平上的相对丰度

2.4 内生细菌丰度聚类分析

根据根、茎、叶在属水平上的物种注释及丰度信息, 选取丰度排名前 10 的属及其在不同部位中的丰度信息绘制热图 (图 4), 并从样品间差异层面进行聚类, 发现样品 SG 和 SY 处于同一分支, 最为邻近, 而与样品 SJ 距离较远, 说明根和叶中内生细菌群落结构最为相似。

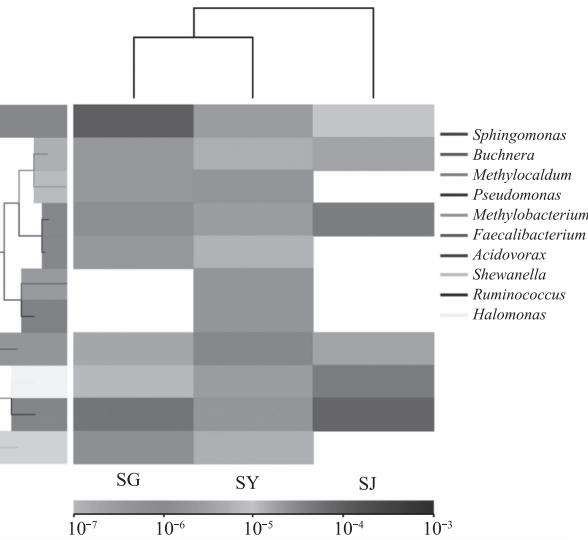


图 4 内生细菌 OTUs 丰度聚类分析

2.5 内生细菌群落主成分分析

主成分分析表明 (图 5), 主成分 1 (PC1) 和主成分 2 (PC2) 对样品差异性的解释度分别为 59.80% 和 40.19%, 合计为 99.99%, 是差异的主要来源。样品 SG 和 SY 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 SG 和 SJ 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的显著, 总体看来, 内生细菌群落的分布随部位的不同有显著变化。

分 2 (PC2) 对样品差异性的解释度分别为 59.80% 和 40.19%, 合计为 99.99%, 是差异的主要来源。样品 SG 和 SY 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 SG 和 SJ 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的显著, 总体看来, 内生细菌群落的分布随部位的不同有显著变化。

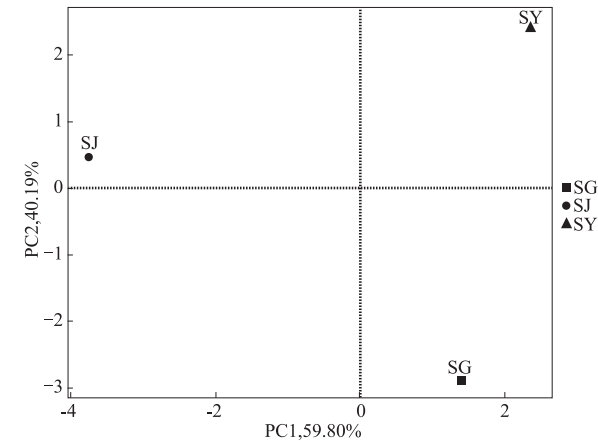


图 5 内生细菌群落主成分分析

3 结论与讨论

随着 MiSeq 平台双端 PE250 和 PE300 测序策略的发展, 读长不断增长, 使得基于 MiSeq 测序研究物种多样性的准确性大幅度提高。利用 MiSeq 平台对 16S rDNA 的一个或多个高变区测序, 具有测序深度高、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铁皮石斛内生细菌 16S rDNA - V4 区进行测序, 经序列比对发现在根、茎、叶中常见的优势细菌种类为变形菌门 (Proteobacteria) 的假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和食酸菌属 (*Acidovorax*), 此外还检测到一些没有报道过的低丰度细菌类群 (所占比例小于 10.00%), 例如布赫纳氏菌属 (*Buchnera*)、瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*)、甲基杆菌属 (*Methylobacterium*)、*Faecalibacterium* 属、希瓦氏菌属 (*Shewanella*), 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铁皮石斛内生细菌进行分离鉴定的报道中, 均发现优势菌为厚壁菌门 (Firmicutes) 的芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 细菌^[27], 与本研究的结果不一致, 这可能与芽孢杆菌属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、SDS

法,无法使其裂解,导致未能获取到该类群细菌的基因组 DNA。

根、茎、叶细菌文库共含 OTUs 的数量为 307 个,只有 30 个 OTUs 为根、茎、叶共有,只占文库 OTUs 总数的 9.77%,此外 Chao 1 指数、香农指数得出的结果为叶 > 根 > 茎,说明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,这可能是由于不同器官的组织结构不同、含有的化学成分不同造成的。瘤胃球菌属和 *Faecalibacterium* 属只在叶样品中检测到,甲基杆菌属和希瓦氏菌属只在根和叶样品中检测到,甲基暖菌属只存在于茎部,表现出部分细菌种群的组织专一性,这与 Petrini 等^[28]的研究结果一致,宿主植物受体蛋白能够影响内生细菌在对其侵入时的识别,同时内生细菌的定殖也受到宿主植物的调控,这些因素共同造成了内生细菌分布的专一性。本研究发现,假单胞菌属和食酸菌属细菌在根、茎、叶中都是优势菌,推测这 2 个属细菌的侵入能力强,且在植株体内具有较强的竞争力。已有报道表明,假单胞菌属具有一定的固氮功能,与兰科植物共生,为其供给氮源。除此之外,假单胞菌属细菌还可以降解土壤中有有机磷农药残留物,避免污染环境^[29]。食酸菌属细菌曾多次作为植物内生细菌被报道,宿主植株包括水稻、烟草、油菜、薄荷、烟草等^[30],但是关于其功能、代谢的研究目前还未见报道。

在将 16S rDNA - V4 区测得序列与数据库进行比对的过程中发现,一部分序列归属于宿主植物的叶绿体和线粒体,因此,在进行后续分析之前,剔除了这部分无关的序列。本研究只选择了普遍用于水体、土壤、粪便等环境样品^[31]细菌多样性研究的 16S rDNA - V4 区作为测序区域,但从研究结果看来,选择 V4 区进行植物内生细菌研究,效果并不理想,由于叶绿体和线粒体与细菌在系统发育上具有高度的同源性^[32],产生了宿主污染的现象。下一步应尝试测序 16S rDNA 9 个可变区中的其他区域或者几个区域,寻找能够避开线粒体和叶绿体干扰的理想测序区域。

参考文献:

[1] 于萌萌,吴令上,斯金平,等. 基于多糖和黄酮类成分的铁皮石斛优良内生真菌筛选[J]. 中国中药杂志, 2016,41(12):2208-2212.

[2] 屠艳拉,肖芳,张敬泽,等. 发生在铁皮石斛栽培田中的 2 种黏菌病[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2016,42(2):137-142.

[3] 安红强,范静,梁易,等. 铁皮石斛泛素结合酶基因 *DoUBC24* 的克隆及表达分析[J]. 生物技术通讯, 2016,27(5):643-648.

[4] 屈小媛,武玉祥,张久磊. 石斛化学成分与药理活性研究进展[J]. 天津农业科学,2015,21(4):19-23.

[5] 肖春宏,黄飞燕,杨波. 鼓槌石斛研究进展[J]. 山西农业科学,2014,42(6):647-649.

[6] 武荣花,栗燕. 石斛资源保护研究进展[J]. 河南农业科学,2009(12):9-12,17.

[7] 王明月,陶茜,李克艳,等. 铁皮石斛内生细菌群落结构分析[J]. 西部林业科学,2014,43(5):106-111.

[8] 侯晓强,郭顺星. 铁皮石斛促生长内生真菌的筛选与鉴定[J]. 中国中药杂志,2014,39(17):3232-3237.

[9] 何劲,雷帮星,宋贞富,等. 石斛内生细菌 DEB-2 对 5 种辣椒病原真菌的抑制作用[J]. 植物保护学报, 2014,41(2):157-162.

[10] 杨绍周,吴毅歆,邵德林,等. 鼓槌石斛内生细菌分离、鉴定及功能分析[J]. 中国农学通报,2014,30(25):171-176.

[11] 赵昕梅,远凌威,张苏锋,等. 铁皮石斛内生真菌的分离鉴定及其促宿主生长作用[J]. 河南农业科学, 2012,41(6):101-105.

[12] 洪群艳,董文汉,徐文婷,等. 几种云南野生石斛内生真菌的鉴定及分布[J]. 生物技术进展,2012,2(3):190-194.

[13] 章华伟,钟超群. 铁皮石斛内生细菌的分离和初步鉴定[J]. 湖北农业科学,2013,52(8):1811-1813.

[14] 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,2015,30(5):760-765.

[15] Tholozan J L, Cappelletti J M, Tissier J P, et al. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(3):1110-1116.

[16] Ammann R R, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiol Rev, 1995, 59(1):143-169.

[17] 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.

[18] 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.

[19] 陈泽斌,李冰,王定康,等. Illumina MiSeq 高通量测序分析核桃内生细菌多样性[J]. 江苏农业学报,2015, 31(5):1129-1133.

[20] Magoc T, Salzberg S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21):2957-2963.