

DOI: 10.5846/stxb201711082004

张爱梅, 韩雪英, 王嘉, 孔维宝, 牛世全, 朱学泰. 马衔山中国沙棘根瘤内共生细菌多样性研究. 生态学报, 2019, 39(1): - .

Zhang A M, Han X Y, Wang J, Kong W B, Niu S Q, Zhu X T. Diversity of endophytic bacteria in root nodules of *Hippophae rhamnoides* in the Maxian Mountains. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(1): - .

马衔山中国沙棘根瘤内共生细菌多样性研究

张爱梅*, 韩雪英, 王 嘉, 孔维宝, 牛世全, 朱学泰

西北师范大学 生命科学学院, 兰州 730070

摘要: 采集甘肃省兰州市马衔山中国沙棘 (*Hippophae rhamnoides*) 根瘤样品, 采用高通量测序和纯培养方法, 分析中国沙棘根瘤内定殖的内共生细菌的组成、相对丰度和物种多样性, 并比较两种方法研究结果的差异。在不同的微生物分类单元, 高通量测序检测到中国沙棘根瘤内共生细菌 24 门 50 纲 90 目 167 科 215 属; 而纯培养方法仅检测到 3 门 5 纲 7 目 8 科 8 属。进一步分析沙棘根瘤内共生细菌主要类群的相对丰度, 发现高通量测序与纯培养方法的结果有明显差异, 在科和属的分类单元上差异尤其显著。两种方法都表明中国沙棘根瘤内共生细菌具有丰富的多样性, 但高通量测序能够较为全面的反映中国沙棘根瘤内共生细菌的群落组成, 而纯培养方法仅能够分离到部分可培养的中国沙棘根瘤内共生细菌, 在很大程度上极可能低估中国沙棘根瘤内共生细菌的物种组成并高估其丰度。

关键词: 高通量测序; 纯培养; 根瘤内共生细菌; 多样性

Diversity of endophytic bacteria in root nodules of *Hippophae rhamnoides* in the Maxian Mountains

ZHANG Aimei*, HAN Xueying, WANG Jia, KONG Weibao, NIU Shiquan, ZHU Xuetai

College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Root nodules of *Hippophae rhamnoides* were collected in the Maxian Mountains. The plate culture method and high-throughput sequencing were used to study the diversity of endophytic bacteria in the root nodules of *Hippophae rhamnoides*. Microbial composition, abundance, and diversity of the nodule endophytic bacteria were analyzed. The differences in the results of the two techniques were compared. The results showed that 24 phyla, 50 classes, 90 orders, 167 families, and 215 genera of nodule endophytic bacteria were detected by high-throughput sequencing, and 3 phyla, 5 classes, 7 orders, 8 families, and 8 genera were obtained by plate culture. The relative abundances of the dominant nodule endophytic bacteria revealed that the differences between the results of the two techniques were greater at lower classification levels, especially at the family and genus levels, than at higher levels. Both plate culture and high-throughput sequencing showed an abundant diversity of nodule endophytic bacteria. High-throughput sequencing provides a more comprehensive and accurate picture of microbial community structure than the plate culture method does. Plate culture can only detect a few dominant taxa of nodule endophytic bacteria. The results of this study indicated that plate culture greatly underestimates microbial community composition and overestimate their abundance.

Key Words: high-throughput sequencing; plate culture; nodule endophytic bacteria; diversity

基金项目: 国家自然科学基金 (31360005)

收稿日期: 2017-11-08; 网络出版日期: 2018-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhangaimai@nwnu.edu.cn

植物内生菌是在一定阶段或全部阶段生活于健康植物的组织和器官内部的一大类微生物^[1]。内生菌具有丰富的生物多样性,对于一种植物而言,从中可分离到的内生真菌或细菌通常为几种至几十种,有的甚至可达几百种^[2]。内生菌数量庞大,种类繁多,包括内生真菌、内生细菌和内生放线菌等^[3]。在同一种植物的根、茎、叶、花、果实和种子中均有内生菌被发现,且植物内生菌具有一定的植物和组织专一性^[4]。

内生菌多样性的研究主要应用传统的微生物培养技术,通过分离、培养等过程从特定的样品中获得微生物纯培养物,再进行菌株的分类鉴定。由于实验室条件下提供的培养基及培养环境与微生物所处的自然环境之间存在很大差异,大量微生物无法通过纯培养获得目标菌株。高通量测序技术的快速发展,为内生菌多样性的研究提供了更有效的途径,可灵敏地探测待测样品中包括稀少种群在内的绝大多数微生物,能更全面客观地揭示目标环境中微生物群落结构,同时获得定性及相对定量的信息^[5]。

中国沙棘(*Hippophae rhamnoides*)可在贫瘠干旱及高寒环境生存,根系发达,且能形成明显的根瘤,是一种典型的放线菌结瘤植物,能与弗兰克氏菌(*Frankia*)共生结瘤固氮。研究发现,除弗兰克氏菌外,沙棘根瘤中还存在大量的非弗兰克氏内共生菌^[6-7]。用纯培养方法研究沙棘内共生菌时还发现,沙棘内共生菌具有系统内生性和组织专化性^[8]。

为了全面了解沙棘根瘤内共生细菌的多样性,明确根瘤内共生细菌群落结构特点及组成,以分布在甘肃马衔山高寒地区的中国沙棘根瘤为研究材料,将高通量测序技术和纯培养技术联合使用,以期能更系统地揭示中国沙棘根瘤内共生细菌的多样性,并获得具有潜在应用价值的内共生细菌资源。同时,比较两种方法研究结果的差异,为沙棘根瘤内共生细菌多样性的研究与应用提供参考,并为更进一步开展内生共细菌相关研究提供方向及有价值的菌株材料。

1 材料与方法

1.1 样品采集

采样地为马衔山自然保护区,地理位置位于甘肃省兰州市榆中县马坡乡(海拔 2792 m,年平均气温 3.2℃,经纬度:103°58'42"E, 35°47'21"N)。2016 年 9 月在沙棘根瘤生长期,在人为干扰相对较少的河滩地生长的中国沙棘灌丛典型生境,选取 6 株中国沙棘植株采集沙棘根瘤,带回实验室于 4℃ 冰箱保存,并尽快进行根瘤内共生细菌的分离培养和根瘤总 DNA 的提取^[9]。

1.2 沙棘根瘤表面消毒

选取新鲜幼嫩的沙棘根瘤样品,除去沙棘根瘤表面的泥沙等杂质,依次用自来水、蒸馏水和无菌水分别冲洗。然后用 75%乙醇和 1% NaClO 溶液分别进行表面消毒,再用无菌水反复冲洗,收集最后一次冲洗的无菌水进行无菌检测^[10]。

1.3 沙棘根瘤内共生细菌的纯培养

1.3.1 内共生细菌的分离

沙棘根瘤内共生细菌的分离采用根瘤切片法^[11]。采用牛肉膏蛋白胨培养基和加入沙棘根浸出物的牛肉膏蛋白胨培养基分离细菌;采用高氏 I 号培养基和加入沙棘根浸出物的高氏 I 号培养基分离放线菌;采用 Qmod 和加入沙棘根浸出物的 Qmod 培养基分离弗兰克氏菌。用无菌刀片将沙棘根瘤尖端含菌组织切成约 1 mm 的薄片,分别置于上述培养基的平板中,28℃ 培养。挑取平板上不同菌落形态特征的内共生细菌,划线纯化后保存于试管斜面备用。

1.3.2 内共生细菌的初步鉴定

沙棘根瘤内共生细菌的传统鉴定采用形态观察和生理生化实验相结合的方法。形态观察与生理生化特征主要参考《常见细菌系统鉴定手册》、《放线菌快速鉴定与系统分类》以及《土壤与环境微生物研究法》^[12-14]。

1.3.3 内共生细菌的分子鉴定

沙棘根瘤内共生细菌 DNA 的提取采用碱解法^[15],放线菌 DNA 提取采用微波法^[16]。16S rRNA 基因扩增

采用通用引物: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')。PCR 反应体系为 25 μ L; 引物各 1 μ L, 模板 4 μ L, Taq MasterMix (Dye) 15 μ L, 加 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 扩增反应条件为 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 1 min, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送去北京奥科鼎盛生物科技有限公司进行测序。

将所得到的序列用 NCBI 的 BLAST 进行比对, 用 MEGA7.0 软件采用邻接法构建系统发育树进行系统进化分析; 将 16S rRNA 基因序列相似性在 97% 以上划分为同一个操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU), 进一步根据公式计算 Shannon 指数和 Simpson 指数。

$$H_{\text{shannon}} = 1 - \sum_{i=1}^s (p_i \log_2 p_i) \quad D_{\text{simpson}} = - \sum p_i^2$$

式中, S 代表所有 OTUs 的总数, p_i 代表划分到同一个属的 OTUs 数占总 OTUs 的百分比^[17]。

1.4 沙棘根瘤内共生细菌的高通量测序分析

1.4.1 内共生细菌总 DNA 提取与 16S rDNA-V4 区 PCR 扩增

根瘤内共生细菌总 DNA 的提取参照彭源东与李志真等采用的 CTAB 法^[18-19]。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的效果。

细菌 16S rDNA-V4 区的 PCR 扩增采用带 Barcode 的特异性引物 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') 和 806R (5'-GCCAATGGACTAHVGGGTWTCTAAT-3')。PCR 扩增采用 50 μ L PCR 扩增体系, 扩增反应条件为 98℃ 预变性 5 min, 98℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 25 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min。部分 PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 其余样品 -20℃ 保存备用。

1.4.2 文库构建和上机测序

根据 PCR 产物浓度进行等量混样, 充分混匀后使用 2% 琼脂糖凝胶检测 PCR 产物, 对目的条带使用 Qiagen 公司的胶回收试剂盒回收产物。使用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 文库试剂盒进行文库构建, 构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量, 文库合格后, 使用 HiSeq 2500 PE250 进行上机测序。本研究测序工作由北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成。

1.4.3 高通量测序数据处理

将测序得到的原始数据截去 Barcode 和引物序列后进行拼接, 拼接得到的序列经过严格的过滤, 并去除其中的嵌合体序列得到最终的有效数据。利用 Uparse 软件对样品的全部有效序列在 97% 水平上进行 OTU 聚类, 并筛选出 OTU 中出现频率最高的序列作为 OTUs 代表序列, 用 Mothur 方法与 SILVA 的 SSUrRNA 数据库进行物种注释分析, 并在各个水平上统计样品的群落组成。高通量测序数据处理与分析由北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 纯培养方法分析中国沙棘根瘤内共生细菌群落结构

利用不同培养基从采集的中国沙棘根瘤中分离纯化得到 17 株内共生细菌, 所有菌株均可传代培养。所有菌株培养后, 提取其 DNA, 再将菌株的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增并测序, 测序得到的基因序列通过 BLAST 程序与 GenBank 数据库中已报道的 16S rRNA 序列进行相似性对比, 并构建系统发育树 (图 1)。

同时进行 17 株菌株的形态学观察和生理生化实验, 将二者结果与系统进化树结果结合进行分析, 分离到的 17 株沙棘根瘤内共生细菌分属于放线菌门 (Actinobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和变形菌门 (Proteobacteria) 3 个门。在属分类单元, 17 株菌株分属于 8 个属, 其中: 链霉菌属 (*Streptomyces*) 4 株、韩国生工菌属 (*Kribbella*) 1 株、拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*) 1 株、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*) 1 株、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 7 株、芽生杆菌属 (*Bosea*) 1 株、马赛菌属 (*Massilia*) 1 株和沙雷氏菌属 (*Serratia*) 1 株; 优势属为芽孢杆菌属和链霉菌属。

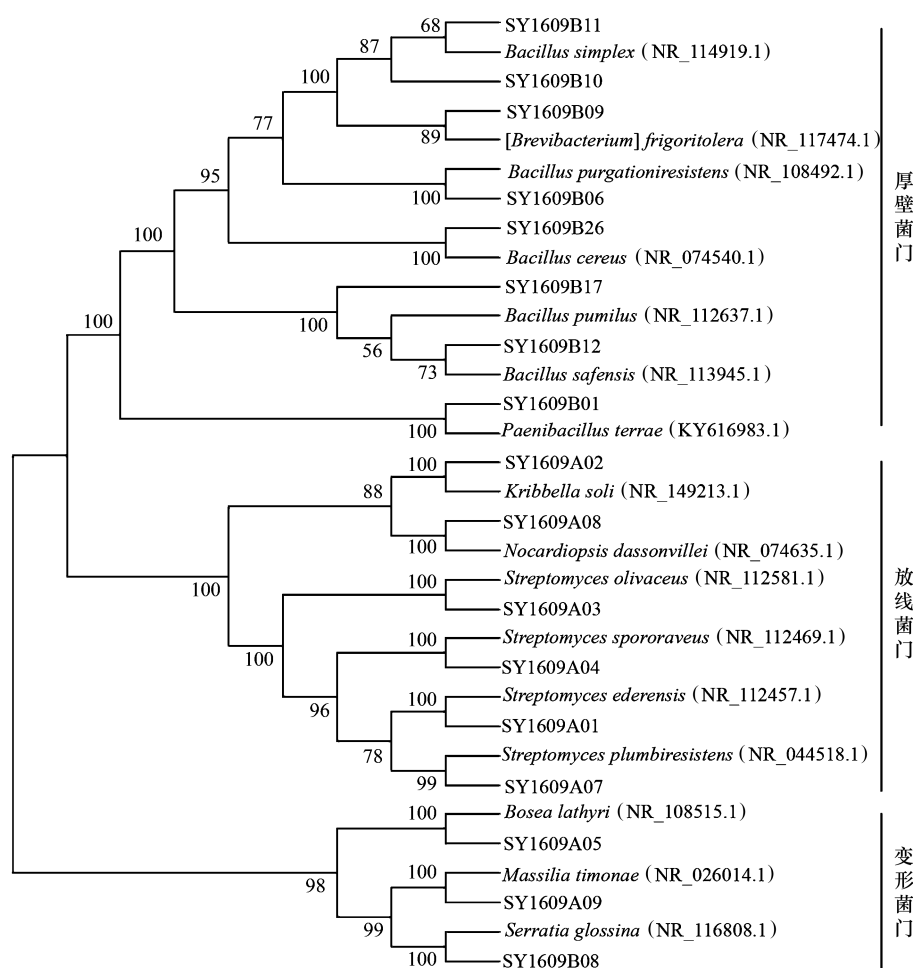


图1 基于16S rRNA基因构建系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

2.2 高通量测序分析中国沙棘根瘤内共生细菌群落结构

2.2.1 样品复杂度分析

采用 Illumina HiSeq 测序平台进行测序,得到 51566 条原始数据,拼接和质控后进行嵌合体过滤,得到可用于后续分析的有效序列 50234 条,其平均长度约 422bp,与 16S rDNA-V4 区序列长度基本一致。以 97% 的一致性将有效序列聚类为 1805 个 OTU。

结果表明样品覆盖度为 99.3%,ACE 指数为 1318,Chao1 指数为 1271,且稀释曲线趋于平稳,表明测序数据合理可靠。

2.2.2 OTU 物种注释

对 OTU 代表序列进行物种注释,获得分类学信息并分别在各分类单元统计样品的群落组成,沙棘根瘤内共生细菌可以注释到 24 门、50 纲、90 目、167 科、215 属(表 1)。

2.2.3 内共生细菌群落结构组成

在门和属分类单元进行物种分类树统计,各分类单元相对丰度前 10 的物种分别如图所示(图 2)。在门分类单元,沙棘根瘤内共生细菌主要分布在蓝细菌门(Cyanobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、衣原体门(Chlamydiae)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)和柔膜菌门(Tenericutes)等;其中蓝细菌门、变形菌门、放线菌门和厚壁菌门为优势门。

表 1 各分类单元的序列数目及群落组成

项目 Items	界 Kingdom	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
序列数 Sequence number	15973	55221	55169	54795	53925	49011
物种数 Species number	1	24	50	90	167	215

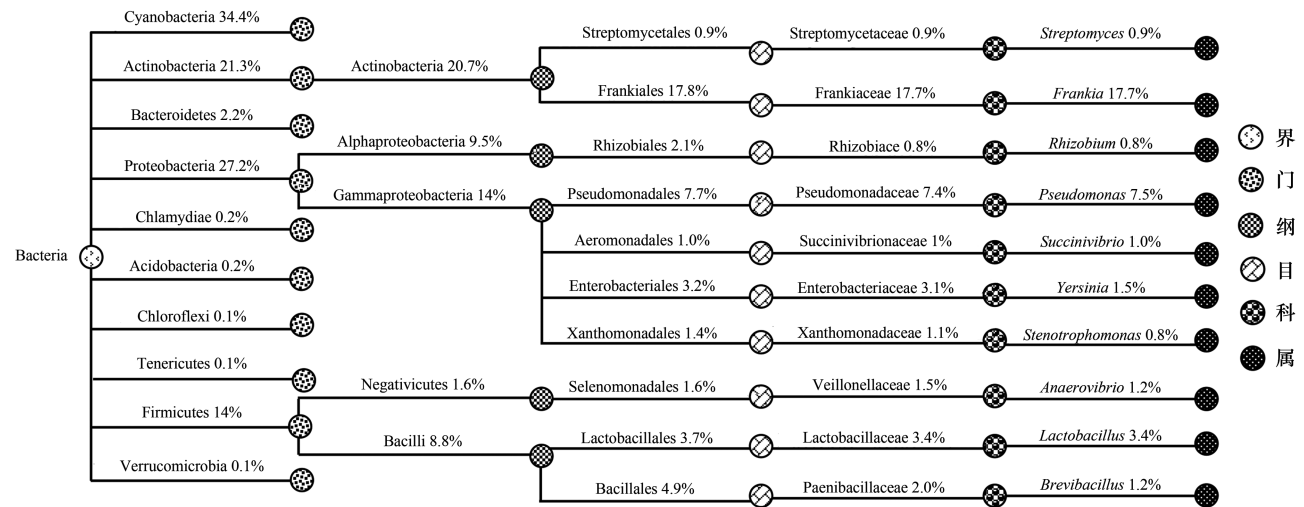


图 2 物种分类树

Fig.2 Classification tree of microbial species

Cyanobacteria: 蓝细菌门; Actinobacteria: 放线菌门; Bacteroidetes: 拟杆菌门; Proteobacteria: 变形菌门; Chlamydiae: 衣原体门; Acidobacteria: 酸杆菌门; Chloroflexi: 绿弯菌门; Tenericutes: 柔膜菌门; Firmicutes: 厚壁菌门; Verrucomicrobia: 疣微菌门; Actinobacteria: 放线菌纲; Alphaproteobacteria: α -变形菌纲; Gammaproteobacteria: γ -变形菌纲; Bacilli: 芽孢杆菌纲; Frankiales: 弗兰克氏菌目; Rhizobiales: 根瘤菌目; Pseudomonadales: 假单胞菌目; Aeromonadales: 气单胞菌目; Enterobacterales: 肠杆菌目; Xanthomonadales: 黄单胞杆菌目; Selenomonadales: 月牙单胞菌目; Lactobacillales: 乳杆菌目; Bacillales: 芽孢杆菌目; Streptomycetales: 链霉菌目; Frankiales: 弗兰克氏菌科; Rhizobiaceae: 根瘤菌科; Pseudomonadaceae: 假单胞菌科; Succinivibrionaceae: 琥珀酸弧菌科; Enterobacteriaceae: 肠杆菌科; Xanthomonadaceae: 黄单胞菌科; Veillonellaceae: 韦荣球菌科; Lactobacillaceae: 乳杆菌科; Paenibacillaceae: 类芽孢杆菌科; Streptomyces: 链霉菌属; Frankia: 弗兰克氏菌属; Rhizobium: 根瘤菌属; Pseudomonas: 假单胞菌属; Succinivibrio: 琥珀酸弧菌属; Yersinia: 耶尔森氏鼠疫杆菌属; Stenotrophomonas: 寡养单胞菌属; Anaerovibrio: 厌氧弧菌属; Lactobacillus: 乳酸杆菌属; Brevibacillus: 短芽孢杆菌属

在属分类单元,沙棘根瘤内共生细菌主要包括弗兰克氏菌属 (*Frankia*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、耶尔森氏鼠疫杆菌属 (*Yersinia*)、厌氧弧菌属 (*Anaerovibrio*)、短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*)、琥珀酸弧菌属 (*Succinivibrio*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*) 和寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*);优势属为弗兰克氏菌属和假单胞菌属,相对丰度分别达到 17.7% 和 7.5%,为沙棘根瘤内的绝对优势类群。

2.3 纯培养和高通量测序分析中国沙棘根瘤内共生细菌的差异

2.3.1 内共生细菌群落结构的差异

在门、纲、目、科和属分类单元,纯培养方法只检测到 3 门、5 纲、7 目、8 科和 8 属,而高通量测序共检测到 24 门、50 纲、90 目、167 科和 215 属(表 2)。后者的检测灵敏度分别是前者的 8、10、12.9、20.9 和 26.9 倍。这一结果表明,纯培养方法严重低估了沙棘根瘤内共生细菌的物种组成;分类单元越低,高通量测序方法检测到的微生物物种数越多,与纯培养方法相比具有越明显的优势。

2.3.2 内共生细菌相对丰度的差异

在门分类单元,比较纯培养和高通量测序方法检测到的根瘤内共生细菌的相对丰度,结果发现,纯培养方

法检测到的放线菌门和厚壁菌门的内生细菌相对丰度明显高于高通量测序方法,而变形菌门的相对丰度却低于高通量测序方法(表3)。蓝细菌门、变形菌门、放线菌门和厚壁菌门均为高通量测序的优势菌门,蓝细菌门在纯培养时却没有分离得到。

表 2 纯培养与高通量测序检测到的各分类单元的内共生细菌群落组成

项目 Items	界 Kingdom	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
纯培养方法 Plate culture method	1	3	5	7	8	8
高通量测序 High throughput sequencing	1	24	50	90	167	215
检测灵敏度(高通量测序/纯培养) Ratio of plate culture method to high throughput sequencing	1.0	8.0	10.0	12.9	20.9	26.9

表 3 根瘤内共生细菌在门分类单元的相对丰度差异(%)

方法 Method	放线菌门 Actinobacteria	厚壁菌门 Firmicutes	变形菌门 Proteobacteria
纯培养方法 Plate culture method	35.3	47.1	17.6
高通量测序 High throughput sequencing	21.3	14.0	27.2

在属分类单元,比较纯培养和高通量测序方法检测到的根瘤内共生细菌的相对丰度,发现纯培养方法检测到的内共生细菌的相对丰度普遍高于其高通量测序方法中的丰度(表4)。纯培养方法分离得到的芽孢杆菌属的相对丰度为41.2%,而在高通量测序分析中只占0.70%;纯培养分离得到的链霉菌属的相对丰度为23.5%,但在高通量测序中只占0.92%;纯培养分离得到的拟诺卡氏菌属和沙雷氏菌属,高通量测序却没有检测到。相反地,高通量测序检测到的优势属弗兰克氏菌属(17.7%)和假单胞菌属(7.5%),纯培养方法却没有分离得到。

表 4 根瘤内共生细菌在属分类单元的相对丰度差异(%)

方法 Method	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	韩国生 工菌属 <i>Kribbella</i>	拟诺卡 氏菌属 <i>Nocardiopsis</i>	类芽孢 杆菌属 <i>Paenibacillus</i>	沙雷氏菌属 <i>Serratia</i>	马赛菌属 <i>Massilia</i>	芽生杆菌属 <i>Bosea</i>
纯培养方法 Plate culture method	41.2	23.5	5.88	5.88	5.88	5.88	5.88	5.88
高通量测序 High throughput sequencing	0.70	0.92	0.19	0.00	0.20	0.00	0.18	0.12

2.3.3 内共生细菌多样性差异

将沙棘根瘤内共生细菌的微生物多样性指数进行统计,结果表明,基于纯培养的根瘤内共生细菌香农指数为2.462,辛普森指数为0.754,而高通量测序得到的根瘤内共生细菌香农指数为4.967,辛普森指数为0.869,说明高通量测序检测到的内共生细菌的群落多样性要高于纯培养方法,同时也说明,沙棘根瘤内共生细菌群落结构更为复杂,群落更为稳定。

3 讨论

本研究通过纯培养和高通量测序方法检测马衔山中国沙棘根瘤内共生细菌,两种方法都表明中国沙棘根瘤内共生细菌具有丰富的多样性。在采用纯培养方法检测时,由于培养条件的影响,只得到相对较少的纯培养物,其根本原因可能是由于大量的微生物还未找到合适的培养条件^[20]。沙棘根瘤内共生细菌的生长与一些生物因素和非生物因素也有关系,为了使实验室培养的营养条件更接近自然环境,在沙棘根瘤内共生细菌

分离时,还应尝试模拟自然生态环境,以利于更多的内共生细菌被分离培养。

本研究中,采用纯培养方法检测到中国沙棘根瘤内共生细菌的优势属为芽孢杆菌属和链霉菌属。刘志强^[21]和徐瑞瑞^[7]等均对沙棘根瘤中的微生物进行过研究,也发现沙棘根瘤内共生细菌多样性丰富,但分离得到的根瘤内共生细菌的种类与本次研究得到的种类存在一定差异,说明植物内共生细菌多样性可能受植物种类、地理位置、生长环境和气候条件等因素的影响^[22]。本研究中马衔山中国沙棘生长在海拔 2800 m 左右的高寒区,其根瘤内共生细菌的多样性与其所处的特殊生境有关^[23]。

本研究采用高通量测序方法检测沙棘根瘤内共生细菌时,优势门为蓝细菌门、变形菌门、放线菌门和厚壁菌门,并且变形菌门、放线菌门和厚壁菌门的微生物在纯培养时也被分离到,说明分类单元越高,纯培养和高通量测序方法研究根瘤内共生细菌多样性的差异越小。蓝细菌门细菌分布极广,在极端环境中也能生长,还能与一些植物共生^[24]。而蓝细菌门的微生物在本研究中利用纯培养方法分离时却未被分离到,因此,其在中国沙棘根瘤中的存在状况以及与沙棘之间的关系还有待进一步研究。

本研究在采用高通量测序方法检测沙棘根瘤内共生细菌时,优势属为弗兰克氏菌属和假单胞菌属。弗兰克氏菌能与沙棘共生形成根瘤^[25],是沙棘根瘤内的绝对优势菌,其丰度达到 17.7%。但采用纯培养方法分离时却未分离到弗兰克氏菌,可能因为弗兰克氏菌在人工培养条件下生长缓慢,离体培养需要 2—3 周或更长时间,且容易被杂菌污染^[26]。本研究在中国沙棘根瘤内共生细菌分离过程中采用根瘤切片法,培养一段时间后,根瘤切片周围很快铺满生长较快的细菌菌苔,这也可能是阻碍生长较慢的弗兰克氏菌的生长繁殖的重要因素^[27]。因此,探索合适的培养条件及合适的培养方法,缩短弗兰克氏菌生长周期,减少弗兰克氏菌离体培养中的污染,是非常必要的^[28]。假单胞菌属为本研究中高通量测序检测到的仅次于弗兰克氏菌的优势菌,其丰度达到 7.5%。假单胞菌属细菌广泛存在于各种生境中,包括植物的根瘤内^[29],但本研究中利用纯培养方法分离时也未分离到此菌,可能与培养条件有关,假单胞菌属细菌与中国沙棘的互作关系也有待深入探究。已有研究也发现,在其他植物中发现的内共生细菌以假单胞菌属和芽孢杆菌属等为最常见的属^[30]。本研究在沙棘根瘤中检测到的内共生细菌有一部分与上述其他植物内共生细菌相同,说明沙棘根瘤内共生细菌与其他植物内共生细菌也具有相似性。另外,本研究中纯培养分离得到的拟诺卡氏菌属和沙雷氏菌属,在高通量测序并未检测到,可能与高通量测序技术存在漏检有关。

尽管高通量测序能够更全面的反映中国沙棘根瘤内共生细菌的多样性,提供更多的生物学信息,对沙棘根瘤内共生细菌多样性研究具有指导意义。但传统纯培养方法仍为获取目标菌株的基本途径,在获取具有潜在应用价值的内共生细菌资源,并进行深入研究方面具有优势。如纯培养方法能分离得到一些具抑菌和促生活性的根瘤内共生细菌,这些内共生细菌产生的具有多种生理活性的代谢产物的开发具有广阔的应用前景^[31]。

为了探明中国沙棘根瘤内共生细菌的多样性,需要展开进一步的资源调查,收集尽可能多的不同生境宿主来源的菌株,积累丰富的形态、生理生化指标,并建立精确可靠的分子特征数据库,更科学地界定这些内共生细菌的功能和分类地位。将高通量测序和纯培养方法相结合,既可以最大限度的反映沙棘根瘤内共生细菌的多样性,又能够有针对性的进行纯培养,收集到根瘤内共生细菌菌种资源,为后续研究提供材料。

4 结论

高通量测序和纯培养方法都表明中国沙棘根瘤内共生细菌具有丰富的多样性,但高通量测序方法能够较为全面的反映中国沙棘根瘤内共生细菌的群落组成,而纯培养方法仅能够分离到少数可培养的中国沙棘根瘤内共生细菌。

高通量测序和纯培养方法检测中国沙棘根瘤内共生细菌多样性时,分类单元越低,高通量测序方法检测到的微生物物种数越多,与纯培养方法相比具有越明显的优势。

高通量测序方法获得的中国沙棘根瘤内共生细菌多样性信息,为优化选择纯培养的适宜培养基及培养条

件,实现有目的地分离特定物种奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] 石晶盈, 陈维信, 刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展. 生态学报, 2006, 26(7): 2395-2401.
- [2] 黄贵修, 刘先宝. 植物内生菌. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2013: 282-290.
- [3] Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Del Orozco-Mosqueda M, Glick B R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. Microbiological Research, 2016, 183: 92-99.
- [4] 王志伟, 纪燕玲, 陈永敢. 植物内生菌研究及其科学意义. 微生物学通报, 2015, 42(2): 349-363.
- [5] 王鹏, 陈波, 张华. 基于高通量测序的鄱阳湖典型湿地土壤细菌群落特征分析. 生态学报, 2017, 37(5): 1650-1658.
- [6] 张爱梅, 韩雪英, 张世虎, 孙坤, 吴菊艳, 于杰, 郭保民. 甘南高寒地区不同海拔西藏沙棘根瘤内生菌多样性. 生物资源, 2018, 40(2): 114-119.
- [7] 徐瑞瑞. 沙棘弗兰克氏和非弗兰克氏放线菌的分离、培养及分子鉴定[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2011: 40-60.
- [8] 李琦, 孙广宇. 沙棘内生菌的分离与初步鉴定. 中国农学通报, 2006, 22(10): 300-302.
- [9] 张爱梅, 牛世全, 孙坤, 曹文侠, 达文燕. 沙棘属植物结瘤特性及 *Frankia* 根瘤菌分离. 草原与草坪, 2010, 30(2): 43-46.
- [10] 史应武, 娄恺, 李春. 天山北坡甜菜内生菌分离鉴定及其动态变化. 生态学报, 2009, 29(5): 2374-2382.
- [11] 冯健玲, 何新华, 李一伟, 李峰, 秦荣耀. 广西杨梅根瘤 *Frankia* 菌的分离和培养特性研究. 西南农业学报, 2012, 25(1): 236-239.
- [12] 阮继生, 黄英. 放线菌快速鉴定与系统分类. 北京: 科学出版社, 2011: 60-62.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 353-390.
- [14] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法. 北京: 科学出版社, 2008: 146-201.
- [15] 冯广达, 陈美标, 羊宋贞, 朱红惠. 用于 PCR 扩增的细菌 DNA 提取方法比较. 华南农业大学学报, 2013, 34(3): 439-442.
- [16] 徐平, 李文均, 徐丽华, 姜成林. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. 微生物学通报, 2003, 30(4): 82-84.
- [17] 孔凡洲, 于仁成, 徐子钧, 周名江. 应用 Excel 软件计算生物多样性指数. 海洋科学, 2012, 36(4): 57-62.
- [18] 彭源东, 柯丹兵, 张忠泽. *Frankia* 基因组 DNA 提取及其 PCR 带型. 微生物学杂志, 1997, 17(3): 1-15.
- [19] 李志真. 福建弗兰克氏菌 (*Frankia*) 研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2002: 46-47.
- [20] 姬洪飞, 王颖. 分子生物学方法在环境微生物生态学中的应用研究进展. 生态学报, 2016, 36(24): 8234-8243.
- [21] 刘志强, 张利平. 沙棘和沙枣根瘤中固氮放线菌物种多样性研究. 安徽农业科学, 2010, 38(11): 5533-5534, 5536-5536.
- [22] Yang T, Chen Y, Wang X X, Dai C C. Plant symbionts: keys to the phytosphere. Symbiosis, 2013, 59(1): 1-14.
- [23] 张爱梅, 孙坤, 达文燕. 马街山两种不同生境沙棘根际微生物研究. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2008, 44(1): 69-73.
- [24] 王元贞, 潘廷国, 柯玉琴. 微生物与植物共生关系的研究及其利用. 中国生态农业学报, 2003, 11(3): 95-98.
- [25] 张小民, 王岚, 林美珍, 张吉科. 论沙棘根系与功能 II——*Frankia* 菌侵染和结瘤. 沙棘, 2006, 19(1): 1-11.
- [26] 刘洪章, 齐洁, 李玉. 沙棘根系分布及根瘤研究. 吉林农业大学学报, 2005, 27(6): 631-633, 638-638.
- [27] 曲东明, 王双, 韩善华. 沙棘共生固氮根瘤及其内生弗兰克氏菌. 西北植物学报, 1998, 18(1): 60-65.
- [28] 陈立红, 闫伟, 梁金慧, 李鹏飞. 内蒙古沙棘共生菌 *Frankia* 的遗传多样性. 西北植物学报, 2006, 26(12): 2458-2462.
- [29] 钟宇舟, 余秀梅, 陈强, 谭渊, 刘汉军, 陈翠平, 李艳梅, 赵燕. 四川盆地大豆根瘤内生细菌的分离鉴定及促生效果. 应用与环境生物学报, 2017, 23(1): 46-53.
- [30] Liotti R G, Da Silva Figueiredo M I, Da Silva G F, De Mendonça E A F, Soares M A. Diversity of cultivable bacterial endophytes in *Paullinia cupana* and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. Microbiological Research, 2018, 207: 8-18.
- [31] Abbamondi G R, Tommonaro G, Weyens N, Thijs S, Sillen W, Gkorezis P, Iodice C, De Melo Rangel W, Nicolaus B, Vangronsveld J. Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 2016, 3: 1.