

DOI: 10.5846/stxb202012163198

张爱梅,殷一然,孔维宝,朱学泰,孙坤.基于高通量测序分析西藏沙棘根瘤内生菌的多样性.生态学报,2021,41(20):8212-8221.

Zhang A M, Yin Y R, Kong W B, Zhu X T, Sun K. Diversity of endophytes associated with *Hippophae tibetana* root nodules based on high-throughput sequencing. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(20): 8212-8221.

基于高通量测序分析西藏沙棘根瘤内生菌的多样性

张爱梅*, 殷一然, 孔维宝, 朱学泰, 孙 坤

西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070

摘要:根瘤是微生物侵染植物根部并与之形成的共生结构,这些微生物都可被称为植物内生菌。豆科植物根瘤中的内生菌常常又被称为根瘤菌,而侵染非豆科植物形成根瘤的主要是放线菌弗兰克氏菌,这些非豆科植物又被称为放线菌结瘤植物。西藏沙棘是一种典型的放线菌结瘤植物,由于其分布生境的特殊性,对其根瘤内生菌的研究具有重要的生态意义。对于西藏沙棘根瘤内生菌的研究,培养方法因难以模拟自然条件而不易获得纯培养,高通量测序技术对其多样性的研究提供了便利。因此,本研究以生长在甘肃省天祝县金强河河滩地的西藏沙棘根瘤为材料,采用 16S rRNA 基因扩增子高通量测序方法,结合 OTU 分析,对西藏沙棘根瘤内生菌的多样性进行探讨。实验结果表明,西藏沙棘根瘤内生菌具有丰富的多样性,根瘤内的优势属为共生固氮的弗兰克氏菌属(*Frankia*),其相对丰度为 47.63%,共检测到 7 个弗兰克氏菌属的 OTUs;根瘤内除弗兰克氏菌外,还存在大量的非弗兰克氏菌,共检测到 1523 个 OTUs,隶属于 22 个门、33 个纲、69 个目、113 个科和 202 个属,相对丰度排名前 9 的属中有 25 个非弗兰克氏菌属的 OTUs。该研究也表明,西藏沙棘根瘤内生菌具有丰富的多样性,西藏沙棘根瘤中不仅存在着可共生固氮的弗兰克氏菌,并且还分布着非弗兰克氏菌;在同一根瘤样品中,弗兰克氏菌属还具有不同的物种。本研究不仅拓展了西藏沙棘根瘤内生菌多样性的研究方法,还为同一寄主植物中弗兰克氏菌多样性的研究提供了分析思路。

关键词:高通量测序;西藏沙棘根瘤;弗兰克氏菌;非弗兰克氏菌;多样性

Diversity of endophytes associated with *Hippophae tibetana* root nodules based on high-throughput sequencing

ZHANG Aimei*, YIN Yiran, KONG Weibao, ZHU Xuetai, SUN Kun

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

Abstract: Root nodules are the symbiotic structure formed by microorganisms invading the roots of host plants. These microorganisms can be collectively referred to endophytes. The endophytic bacteria in the nodules of leguminous plants are often called rhizobia, while the actinomycetes are the main bacteria that infect non-leguminous plants to form nodules. The main endophytic actinomycetes in non-leguminous plants is *Frankia* spp.. These non-leguminous plants are also known as actinorhizal plants. *Hippophae tibetana* is a typical actinorhizal plant. It is very important to study the endophytes of *H. tibetana* nodules because of the particularity of *H. tibetana* distribution habitat. For the study of endophytes from *H. tibetana* root nodules, the culture method is difficult to simulate the natural conditions and it is difficult to obtain pure culture, and the high-throughput sequencing technology provides convenience for the study of their diversity. In this study, the root nodules of *H. tibetana*, which grew in Jinqiang River beach in Tianzhu County, Gansu Province, were used as the material. The 16S rRNA gene amplification high-throughput sequencing method was adopted to analyze the diversity of *Frankia* and non-*Frankia* endophytic bacteria associated with *H. tibetana* root nodules combined with Operational Taxonomic Units (OTUs). The results showed that the endophytes of *H. tibetana* root nodules had a rich diversity. *Frankia* was single

基金项目:国家自然科学基金项目(31360005)

收稿日期:2020-12-16; 采用日期:2021-08-16

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

dominant genus comprising of 47.63% of the relative abundance of total endophytes, and a total of 7 OTUs of *Frankia* were detected in *H. tibetana* root nodules. In addition to *Frankia*, there were also a large number of non-*Frankia* endophytic bacteria in *H. tibetana* root nodules. A total of 1523 OTUs of non-*Frankia* endophytes were detected, belonging to 22 phyla, 33 classes, 69 orders, 113 families, and 202 genera. There are 25 non-*Frankia* OTUs among the top 9 genera in relative abundance. This research also revealed that there was rich diversity of endophytes associated with root nodules of *H. tibetana*. There was not only *Frankia* but also non-*Frankia* in *H. tibetana* root nodules. There were different species of *Frankia* in the same nodule sample. This study can provide reference for the analysis of *Frankia* spp. diversity based on high-throughput sequencing and enrich the database of host plants diversity and *Frankia* species diversity. This study not only expanded the methods of studying the diversity of endophytic bacteria in *H. tibetana* root nodules, but also provided an analytical approach for the diversity of *Frankia* spp. in the same host plant.

Key Words: high-throughput sequencing; *Hippophae tibetana* root nodules; *Frankia* spp.; non-*Frankia* actinomycetes; diversity

非豆科植物西藏沙棘(*Hippophae tibetana*)是一种典型的放线菌结瘤植物^[1],其根部也能形成根瘤,西藏沙棘的根瘤在形态结构和发育特点方面均与豆科植物和根瘤菌形成的根瘤不同^[2-3],西藏沙棘根瘤内的共生微生物主要是能够固氮的放线菌弗兰克氏菌(*Frankia* spp.)。对于沙棘属植物根瘤内弗兰克氏菌的研究,早在 1982 年 Burggraaf 等^[4]就从沙棘根瘤中分离到弗兰克氏菌的纯培养物,之后研究者也对沙棘根瘤内生弗兰克氏菌进行了分离培养^[5-6]、生理生化特征分析^[7]、分子特性^[8]以及不同生境及不同寄主植物来源多样性^[7-8]等方面的研究。对沙棘属植物不同种类来说,国内外也有学者开展了对柳叶沙棘^[9]、蒙古沙棘^[10]、中国沙棘^[8, 11]、大果沙棘^[12]等的弗兰克氏菌的相关研究工作,研究内容涉及沙棘弗兰克氏菌形态观察、结瘤机理、分离回接等^[1, 13]。所有这些研究大都是基于要从沙棘属植物中分离得到弗兰克氏菌的纯培养而开展的相关工作,在这些研究中,对弗兰克氏菌多样性研究,是研究者关注的一个热点,但由于弗兰克氏菌离体培养的难度较大,实验室条件下提供的培养基及培养环境与弗兰克氏菌所处的自然环境之间存在很大差异,大量弗兰克氏菌无法通过纯培养获得目标菌株^[14-15];加之其分离培养周期长、成功率低,大部分寄主植物的弗兰克氏菌仍未分离得到纯培养,分离到的菌株数量也极有限,使得弗兰克氏菌的多样性及其他应用研究进展缓慢^[16]。

随着高通量测序技术的发展,对弗兰克氏菌多样性的研究提供了更多便利。高通量测序等免培养分子生物学技术不仅能够检测到植物组织中相对丰度较低、难培养的内生微生物,且能为植物内生菌群落多样性、相对丰度和稀有微生物信息提供更可靠且更全面的信息^[17-18]。本课题组前期通过高通量测序发现,中国沙棘根瘤中除了弗兰克氏菌外,还存在着内生非弗兰克氏菌,且这些内生菌在同一寄主植物中还具有丰富的多样性^[19-20]。并且,高通量测序中,对沙棘属植物弗兰克氏菌的物种多样性分子数据库也缺乏足够的不同来源寄主的数据,分析过程中没有明确的划分种水平操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)的参考值。因此,本研究通过采用 16S rRNA 基因扩增子高通量测序技术,从门水平、属水平和 OTU 水平剖析西藏沙棘根瘤内生弗兰克氏菌和非弗兰克氏菌的多样性,以期对同一寄主植物中弗兰克氏菌多样性的研究提供思路。

1 研究方法

1.1 样地信息及样品采集

采样地位于甘肃省天祝县抓喜秀龙乡金强河地区,经纬度为 37°28'N, 104°09'E,全区海拔在 2900—4300 m 之间,地处北祁连山东段。气候寒冷潮湿,年均气温 -2 °C,年降水量 560 mm,年蒸发量 1592 mm,无绝对无霜期,仅分冷暖两季,属寒冷、干旱、半干旱高原性气候^[21]。于 2018 年 9 月 21 日在位于天祝县金强河滩地的西藏沙棘灌丛典型生境中,选取 6 株西藏沙棘植株,挖取其根瘤部分,并装入无菌袋中进行保存。西藏沙棘的根瘤形态如图 1 所示,西藏沙棘根瘤所处土壤环境的 pH 为 7.33±0.12,含水量为(26.47±0.34)%。

1.2 西藏沙棘根瘤总 DNA 的提取、PCR 扩增及高通量测序

根瘤内生菌总 DNA 的提取采用 CTAB 法并稍作修改^[22-23],并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的质量。使用带 Barcode 的特异引物对总 DNA 的 16S rRNA-V4 区进行 PCR 扩增。PCR 扩增采用 50 μ L PCR 扩增体系,扩增反应条件为 98 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,98 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,25 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,剩余样品 4 $^{\circ}$ C 保存备用^[24-25]。使用 Thermofisher 公司的 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 建库试剂盒进行文库的构建,构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测合格后,使用 Illumina HiSeq 最长测序平台进行上机测序。高通量测序过程由北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成。

1.3 高通量测序数据处理与分析

使用 Cutadapt (V1.9.1, <http://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/>)^[26] 先对 Reads 进行低质量部分剪切,再根据 Barcode 从得到的 Reads 中拆分出各样品数据,截去 Barcode 和引物序列初步质控得到原始数据经过以上处理后得到的 Reads 需要进行去除嵌合体序列的处理,Reads 序列通过 (<https://github.com/torognes/vsearch/>)^[27] 与物种注释数据库进行比对检测嵌合体序列,并最终去除其中的嵌合体序列,得到最终的有效数据。利用 Uparse 软件 (Uparse v7.0.1001, <http://www.drive5.com/uparse/>)^[28] 对所有样品的全部有效数据进行聚类,默认以 97% 的一致性将序列聚类成为不同的可操作分类单元,同时会选取 OTUs 中出现频数最高的序列作为 OTUs 的代表序列。对 OTUs 序列进行物种注释,用 Mothur 方法与 SILVA132 (<http://www.arb-silva.de/>)^[29] 的 SSUrRNA 数据库^[30] 进行物种注释分析,获得分类学信息并分别在各样本的各个分类水平统计群落组成。

2 结果与分析

2.1 根瘤内生菌的群落组成

高通量测序共得到根瘤内生菌原始序列 71858 条,有效序列 68265 条,优质序列 43219 条,样品测序覆盖度为 99.2%,测序深度达到分析要求且数据质量可靠。基于 97% 相似度的分类水平,共注释到 826 个细菌 OTU,分属于 22 个门、33 个纲、69 个目、113 个科和 203 个属。相对丰度排名前 10 的门和属如表 1 所示,结果表明,在门分类单元,西藏沙棘根瘤内生菌主要分布在放线菌门 (Actinobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 等,其中优势门为放线菌门 (Actinobacteria)。从属水平来看,西藏沙棘根瘤内生菌主要分布在弗兰克氏菌属 (*Frankia*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*) 等,优势属为弗兰克氏菌属 (*Frankia*)。

对丰度排名前 10 的属进行物种分类树绘制,结果如图 2 所示。以上结果均表明,在沙棘根瘤内生菌中,不仅存在着大量的弗兰克氏菌,还存在着非弗兰克氏菌。

2.2 土壤 pH 及含水量对西藏沙棘根瘤内生菌群落组成的影响

将西藏沙棘根瘤内生菌群落中优势属与土壤 pH 及含水量 (Water content, WC) 进行 RDA 分析,并使用 Canoco 5 进行结果可视化,结果如图 3 所示。

RDA 分析结果表明,排序轴 RDA1 和 RDA2 方差变量解释分别为 97.93% 和 2.07%;其中,弗兰克氏菌属和未鉴定-生氧光细菌的相对丰度与土壤 pH 及含水量的变化呈正相关,其余优势属的相对丰度则与土壤 pH 及含水量的变化呈负相关。



图 1 西藏沙棘的根瘤形态

Fig.1 Nodules morphology of *Hippophae tibetana*

表 1 西藏沙棘根瘤内生菌相对丰度

Table 1 Relative abundances of endophytes associated with *H. tibetana* root nodules

门水平 Phylum	相对丰度/% Relative abundance	属水平 Genus	相对丰度/% Relative abundance
Actinobacteria 放线菌门	59.52	<i>Frankia</i> 弗兰克氏菌属	47.63
Proteobacteria 变形菌门	35.38	<i>Pseudomonas</i> 假单胞菌属	4.45
Bacteroidetes 拟杆菌门	2.09	<i>Stenotrophomonas</i> 寡养单胞菌属	0.78
Acidobacteria 酸杆菌门	0.77	<i>Sphingomonas</i> 鞘氨醇单胞菌属	0.47
Planctomycetes 浮霉菌门	0.51	<i>Massilia</i> 马赛菌属	0.24
Firmicutes 厚壁菌门	0.32	Unidentified Oxyphotobacteria 未鉴定-生氧光细菌	0.14
Gemmatimonadetes 芽单胞菌门	0.26	<i>Fron dihabitans</i> 叶居菌属	0.07
Oxyphotobacteria 生氧光细菌门	0.14	<i>Friedmanniella</i> 弗莱德门氏菌属	0.03
Nitrospirae 硝化螺旋菌门	0.09	<i>Methylobacterium</i> 甲基杆菌属	0.02
Deinococcus-Thermus 异常球菌-栖热菌门	0.01	<i>Kineococcus</i> 动球菌属	0.02

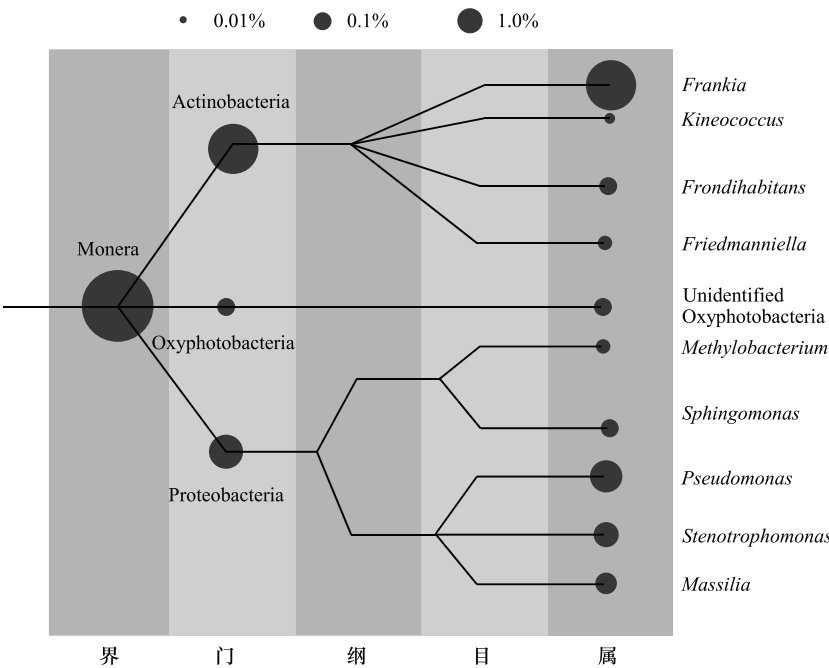


图 2 西藏沙棘根瘤内生菌物种分类树状图

Fig.2 Classification tree of endophytes associated with *H. tibetana* root nodules

Monera: 原核生物界; Actinobacteria: 放线菌门; Oxyphotobacteria: 生氧光细菌门; Proteobacteria: 变形菌门; *Frankia*: 弗兰克氏菌属; *Kineococcus*: 动球菌属; *Fron dihabitans*: 叶居菌属; *Friedmanniella*: 弗莱德门氏菌属; Unidentified Oxyphotobacteria: 未鉴定-生氧光细菌; *Methylobacterium*: 甲基杆菌属; *Sphingomonas*: 鞘氨醇单胞菌属; *Pseudomonas*: 假单胞菌属; *Stenotrophomonas*: 寡养单胞菌属; *Massilia*: 马赛菌属

2.3 根瘤内生弗兰克氏菌的多样性

在西藏沙棘的根瘤内生菌中,弗兰克氏菌为优势属。通过高通量测序技术检测到西藏沙棘根瘤样本中共含有 7 个弗兰克氏菌属的 OTUs,选择弗兰克氏菌属每个 OTU 的代表序列,与 NCBI 中已发表的 39 条弗兰克氏菌属 16S rRNA 基因序列进行比对,以与弗兰克氏菌属亲缘关系最近的 *Acidotherrnus cellulolyticus* 作为外类群^[31],构建系统发育树,结果如图 4 所示。

图 4 结果表明,高通量测序检测到的弗兰克氏菌 OTU 与来自欧洲、美洲、非洲、亚洲和大洋洲的鼠李科、胡颓子科、马桑科、蔷薇科、杨梅科、木麻黄科及桦木科等放线菌结瘤植物根瘤的弗兰克氏菌被分为 4 个明显的类群,包括未获得纯培养的根瘤弗兰克氏菌(Clade I, unisolated strains),赤杨-杨梅-木麻黄侵染组的弗兰克

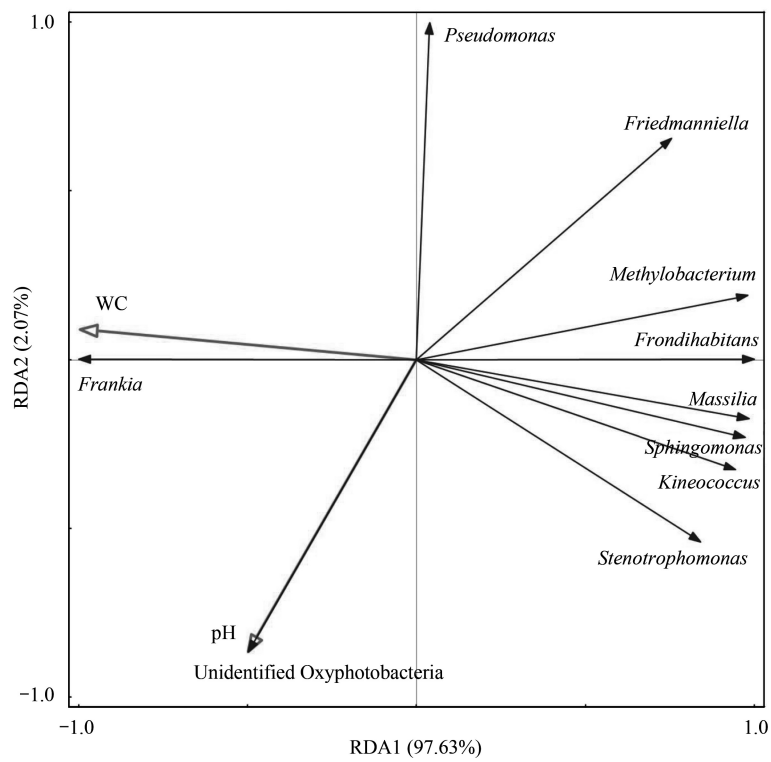


图 3 西藏沙棘根瘤内生菌优势属相对丰度与土壤 pH 及含水量的 RDA 分析

Fig.3 RDA analysis of relative abundances of dominant genera in *H. tibetana* root nodules with soil pH and water content

RDA: 冗余分析 Redundancy Analysis; WC: 含水量 Water Content

氏菌 (Clade II, *Alnus-Myrica-Casuarina* infective strains), 胡颓子科侵染组的弗兰克氏菌 (Clade III, *Elaeagnaceae* infective strains) 及非典型菌株 (Clade IV, Atypical strains)。OTU3 和 OTU241 属于胡颓子科侵染组的弗兰克氏菌 (Clade III), 其中 OTU3 与 Nouioui 等^[32] 鉴定的 *Frankia elaeagni* 相似度较高, 而 OTU241 未能精确鉴定到种; OTU88、OTU1030、OTU1958、OTU1524 和 OTU2669 属于赤杨-杨梅-木麻黄侵染组的弗兰克氏菌 (Clade II), 其中 OTU88 与 Nouioui 等^[32] 鉴定的 *Frankia alni* 相似度较高, 而 OTU1030、OTU1958、OTU1524 和 OTU2669 未能精确鉴定到种。

统计弗兰克氏菌每个 OTU 代表序列的比对结果、OTU 的序列数及其相对丰度, 结果如表 2 所示。结果表明, 各个弗兰克氏菌的 OTU 在西藏沙棘根瘤中的丰度不同。

表 2 西藏沙棘根瘤内生弗兰克氏菌 OTUs 序列数及其代表序列分类鉴定

Table 2 Sequences number of *Frankia* OTUs representative sequences associated with *H. tibetana* root nodules

OTU	序列数 Reads	相对丰度/% Relative abundance	相似种 Similar species	相似度/% Percent identity
OTU3	22103	45.04	<i>Frankia elaeagni</i>	99.20
OTU88	503	1.07	<i>Frankia alni</i>	99.47
OTU241	656	1.47	<i>Frankia elaeagni</i>	97.94
OTU1030	6	0.02	<i>Frankia elaeagni</i>	91.52
OTU1524	15	0.03	<i>Frankia elaeagni</i>	94.50
OTU1958	2	0.01	<i>Frankia alni</i>	92.65
OTU2669	5	0.01	<i>Frankia elaeagni</i>	94.26

以上分类鉴定结果均参考文献[32]; OTU: 可操作分类单元 Operational Taxonomic Unit

以上结果均表明, 在西藏沙棘根瘤中, 存在着大量未被鉴定的弗兰克氏菌, 因此后续实验可对西藏沙棘根

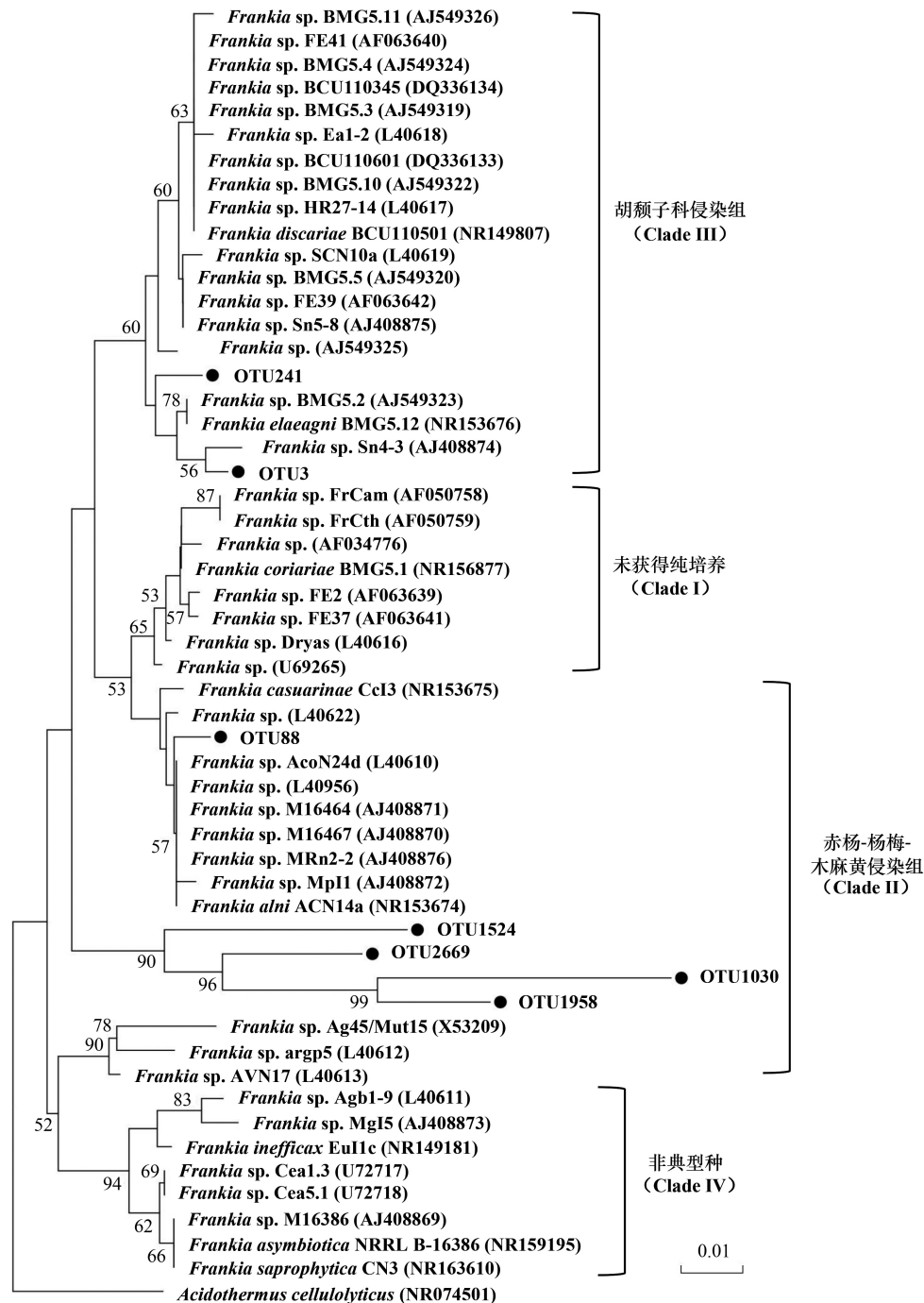


图 4 西藏沙棘根瘤内生弗兰克氏菌系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of *Frankia* species associated with *H. tibetana* root nodules

基于邻接法, 节点上的数值为步长值 (Bootstrap), 低于 50% 的数值 (1000 次重复) 没有显示, 括号内为含有 NCBI 中已发表弗兰克氏菌 16S rRNA 基因的序列登录号

瘤中的弗兰克氏菌进行富集培养, 并通过形态鉴定、生理生化和分子方法进行鉴定。

2.4 根瘤内生非弗兰克氏菌的多样性

在西藏沙棘的根瘤中, 除了共生固氮的弗兰克氏菌外, 还存在着丰富的非弗兰克氏菌。通过高通量测序发现, 在非弗兰克氏菌群中, 优势属为假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 相对丰度为 4.45%。除弗兰克氏菌外, 选择

相对丰度排名前 9 的西藏沙棘根瘤内生非弗兰克氏菌的 OTU 的代表序列,构建系统发育树,结果如图 5 所示。结果表明,在相对丰度前 9 的西藏沙棘根瘤内生非弗兰克氏菌中,鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*) 共含有 10 个不同的 OTUs,表明其具有较高的多样性;此外,甲基杆菌属(*Methylobacterium*) 含有 4 个不同的 OTUs,马赛菌属(*Massilia*) 含有 3 个不同的 OTUs,假单胞菌属(*Pseudomonas*)、未鉴定的生氧光细菌(unidentified Oxyphotobacteria)各含有 2 个不同的 OTUs,寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、动球菌属(*Kineococcus*) 和弗兰德门氏菌属(*Friedmanniella*) 在西藏沙棘的根瘤中仅被检测到 1 个 OTU。

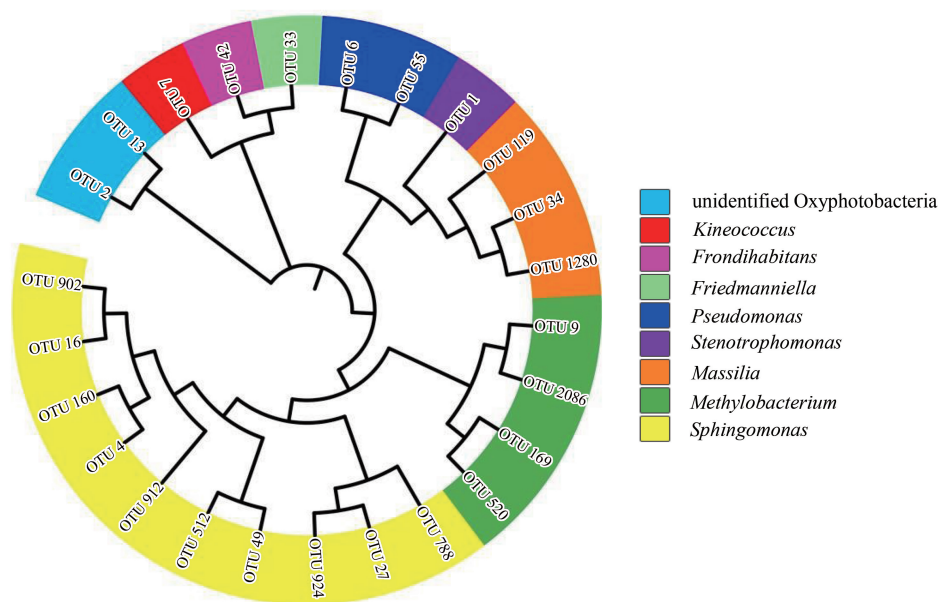


图 5 西藏沙棘根瘤内生非弗兰克氏菌系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of non-Frankia endophytes associated with *H. tibetana* root nodules

unidentified Oxyphotobacteria: 未鉴定-生氧光细菌; *Kineococcus*: 动球菌属; *Frondihabitans*: 叶居菌属; *Friedmanniella*: 弗莱德门氏菌属; *Pseudomonas*: 假单胞菌属; *Stenotrophomonas*: 寡养单胞菌属; *Massilia*: 马赛菌属; *Methylobacterium*: 甲基杆菌属; *Sphingomonas*: 鞘氨醇单胞菌属

对每个 OTU 的代表序列在 NCBI 里进行 BLAST 比对,对其进行分类鉴定,并统计其在西藏沙棘根瘤中的序列数,结果如表 3 所示。结果表明,不同的非弗兰克氏菌在西藏沙棘根瘤中的丰度不同;此外,属于未鉴定的生氧光细菌中的 OTU2 和 OTU13 代表序列经 NCBI 中的 BLAST 比对后,无法精确鉴定到种。表 3 和图 5 的结果均表明,西藏沙棘根瘤的内生非弗兰克氏菌存在着丰富的物种多样性。

3 讨论

本研究采用 16S rRNA 基因扩增子高通量测序技术,对生长于天祝县抓喜秀龙乡金强河地区的西藏沙棘根瘤内生菌多样性进行了研究。研究结果表明,西藏沙棘根瘤内生菌具有丰富的多样性,不仅包含人们研究较多的能够共生固氮的弗兰克氏菌,还包含其他非弗兰克氏菌。高通量测序方法检测结果还表明,弗兰克氏菌属是西藏沙棘根瘤内生菌中的绝对优势菌,其相对丰度高达 47.63%。樊梦颖^[33]采用高通量测序技术对沙棘属植物中的中国沙棘根瘤内生细菌群落也进行过研究,发现中国沙棘根瘤细菌群落是极其丰富和多样的,在根瘤中既有多种类型的放线菌也有多种类型的非放线菌,但均以弗兰克氏菌属细菌占绝对优势。可见,不同沙棘属植物根瘤内生菌中,弗兰克氏菌属均是优势属,其也是根瘤能够固氮的主要贡献者。

本研究在利用高通量测序对西藏沙棘根瘤内生菌多样性进行分子鉴定时,对测序所得的序列进行相关序列分析,以 OTU 作为参考,在不同分类水平上对每一条序列进行划分归类^[34],可将相似度大于 97% 的序列归

属于相同物种,即分子种(phylotype)^[35]。本研究通过高通量测序检测到西藏沙棘根瘤中共含有 7 个属于弗兰克氏菌属的 OTUs,通过分析比对被归属于弗兰克氏菌属 7 个 OTUs 的 16S rRNA 序列,发现在西藏沙棘根瘤中,存在着和已发表序列相似度较高的序列,也存在着未能和已发表序列进行聚类的新种序列。因此,对于在西藏沙棘根瘤中检测到的弗兰克氏菌,后续还可结合纯培养技术对分离获得的菌株进行形态鉴定、生理生化鉴定和分子鉴定,以确定其是否为新种。张明明^[36]采用相同方法,对中国沙棘根瘤弗兰克氏菌属的 OTUs 进行过分析,检测到只有 2 个属于弗兰克氏菌属的 OTUs,可见,位于高寒地区的西藏沙棘根瘤内相对于其他沙棘属植物根瘤可能含有更为丰富的弗兰克氏菌资源。

表 3 西藏沙棘根瘤内生非弗兰克氏菌 OTUs 序列数及代表序列分类鉴定

Table 3 Sequences number of non-Frankia OTUs and identification of their representative sequences associated with *H. tibetana* root nodules

属 Genus	OTU	序列数 Reads	相似种 Similar species	相似度/% Percent identity
未鉴定的生氧光细菌	OTU2	40	<i>Trichocoleus desertorum</i>	90.57
Unidentified Oxyphotobacteria	OTU13	22	<i>Trichocoleus desertorum</i>	91.03
动球菌属 <i>Kineococcus</i>	OTU7	9	<i>Kineococcus radiotolerans</i>	100.00
叶居菌属 <i>Fronidhabitans</i>	OTU42	28	<i>Fronidhabitans sucicola</i>	100.00
弗莱德门氏菌属 <i>Friedmanniella</i>	OTU33	3	<i>Friedmanniella luteola</i>	97.35
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	OTU6	1806	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>	100.00
	OTU55	14	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	100.00
寡养单胞菌属 <i>Stenotrophomonas</i>	OTU1	274	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100.00
马赛菌属 <i>Massilia</i>	OTU119	1	<i>Massilia varians</i>	98.24
	OTU34	6	<i>Massilia oculi</i>	97.61
	OTU1280	2	<i>Massilia aurea</i>	96.60
甲基杆菌属 <i>Methylobacterium</i>	OTU9	6	<i>Methylobacterium goesingense</i>	100.00
	OTU2086	1	<i>Methylobacterium gossipiicola</i>	97.39
	OTU169	15	<i>Methylobacterium bullatum</i>	99.71
	OTU520	1	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	99.12
鞘氨醇单胞菌属 <i>Sphingomonas</i>	OTU788	3	<i>Sphingomonas daechungensis</i>	97.62
	OTU27	59	<i>Sphingomonas lutea</i>	98.94
	OTU924	15	<i>Sphingomonas sediminicola</i>	98.16
	OTU49	2	<i>Sphingomonas qilianensis</i>	97.89
	OTU512	40	<i>Sphingomonas wittichii</i>	100.00
	OTU912	1	<i>Sphingomonas jatrophae</i>	96.83
	OTU4	14	<i>Sphingomonas faeni</i>	99.74
	OTU160	5	<i>Sphingomonas aerolata</i>	99.47
	OTU16	5	<i>Sphingomonas leidy</i>	99.74
	OTU902	1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	99.74

OTU: 可操作分类单元 Operational Taxonomic Unit

对于沙棘属植物根瘤内弗兰克氏菌多样性的研究,已有学者采用不同的方法进行过相关研究,陈立红等^[10]利用 PCR-RFLP 分子标记方法,对不同样地分布的中国沙棘根瘤内的弗兰克氏菌的遗传多样性研究发现,中国沙棘根瘤中的弗兰克氏菌在多数地点至少有 2 种不同基因型,且中国沙棘根瘤共生弗兰克氏菌具有丰富的遗传多样性,在不同采样点沙棘根瘤内弗兰克氏菌遗传多样性的丰富度不一样。徐瑞瑞^[8]采用了从根瘤内直接扩增 DNA 的技术,通过 16S rRNA 全长序列分析,研究了内蒙磴口和黑龙江孙吴沙棘根瘤弗兰克氏菌的系统发育关系,发现在根瘤共生体中,除了共生的弗兰克氏菌外,还广泛存在着非弗兰克氏放线菌,且鉴定沙棘根瘤中直接扩增的弗兰克氏菌,隶属于胡颓子侵染组。本研究通过构建系统发育树也发现,西藏沙棘根瘤中的部分弗兰克氏菌不仅可以侵染胡颓子科(Elaeagnaceae)沙棘属(*Hippophae*)的西藏沙棘,还能够侵

染桦木科 (Betulaceae) 桤木属 (*Alnus*) 的赤杨 (*Alnus japonica*) 及木麻黄科 (Casuarinaceae) 木麻黄属 (*Casuarina*) 的木麻黄 (*Casuarina equisetifolia*) 等非豆科植物,表明西藏沙棘根瘤中的某些弗兰克氏菌株具有寄主植物的多样性。

本研究还发现,西藏沙棘根瘤中的非弗兰克氏内生菌主要有假单胞菌属和鞘氨醇单胞菌属等。其中,假单胞菌属为本研究中检测到的相对丰度仅次于弗兰克氏菌属的优势属,其相对丰度为 4.45%,包含 2 个 OTUs。假单胞菌属细菌能够广泛分布于各种类型的生境中,包括在植物的根瘤内^[37]。徐瑞瑞^[8]采用根瘤匀浆法和根瘤切片法,对沙棘根瘤内生菌进行了纯培养,得到 18 株非弗兰克氏放线菌,分别属于诺卡氏菌属和小单胞菌属。可见,采用的研究方法不同,沙棘属植物根瘤内的非弗兰克氏放线菌的优势属也存在一定的差异;这主要与纯培养时采用的培养基与方法 and 内生菌生存的自然生态环境之间的差异有关。有研究表明,假单胞菌是宿主植物根内主要的促生菌群^[17,38]。但目前关于弗兰克氏菌和假单胞菌等非根瘤菌之间的相互作用,以及假单胞菌与西藏沙棘的互作关系仍有待于深入的探究。而在根瘤中的鞘氨醇单胞菌属,具有 10 个 OTUs,表明其在西藏沙棘根瘤内具有最为丰富的物种多样性。因此,为了探明西藏沙棘根瘤内生菌的多样性,仍需要开展进一步的研究,将高通量测序等免培养分子生物学技术与纯培养方法相结合,并对内生菌之间的相互作用进行探究及验证,不仅能够丰富西藏沙棘根瘤内生菌种资源,还能够为西藏沙棘适应高寒特殊生境的机制提供理论依据。

参考文献 (References):

- [1] Tian C J, He X Y, Zhong Y, Chen J K. Effects of VA mycorrhizae and *Frankia* dual inoculation on growth and nitrogen fixation of *Hippophae tibetana*. *Forest Ecology and Management*, 2020, 170(1/3): 307-312.
- [2] 张爱梅, 殷一然, 孙坤. 沙棘属植物弗兰克氏菌研究进展. *微生物学通报*, 2020, 47(11): 3933-3944.
- [3] 宁楚涵, 李文彬, 刘润进. 植物共生放线菌研究进展. *生态学杂志*, 2019, 38(1): 256-266.
- [4] Burggraaf A J P, Shipton W A. Estimates of *Frankia* growth under various pH and temperature regimes. *Plant and Soil*, 1982, 69(2): 135-147.
- [5] 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.
- [6] 张爱梅. 沙棘属植物根际可培养微生物的初步研究[D]. 兰州: 西北师范大学, 2008.
- [7] 张情. 沙棘根瘤形态结构及根瘤细菌的分离鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [8] 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.
- [9] Srivastava A, Singh S S, Mishra A K. Sodium transport and mechanism(s) of sodium tolerance in *Frankia* strains. *Journal of Basic Microbiology*, 2013, 53(2): 163-174.
- [10] 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.
- [11] 张情, 张明明, 樊梦颖, 张春丽, 刘西平. 沙棘根瘤及根瘤内弗兰克氏菌形态的显微观察. *西北林学院学报*, 2020, 35(1): 165-170.
- [12] 李利坤. 沙棘根瘤菌的分离鉴定及根瘤菌对植株生长发育的影响[D]. 长春: 吉林农业大学, 2018.
- [13] 申旭燕. 沙棘 *Frankia* 侵染草本植物结瘤的研究[D]. 太原: 山西大学, 2013.
- [14] Pozzi A C, Bautista-Guerrero H H, Abby S S, Herrera-Belaroussi A, Abrouk D, Normand P, Menu F, Fernandez M P. Robust *Frankia* phylogeny, species delineation and intraspecific diversity based on Multi-Locus Sequence Analysis (MLSA) and Single-Locus Strain Typing (SLST) adapted to a large sample size. *Systematic and Applied Microbiology*, 2018, 41(4): 311-323.
- [15] 张爱梅, 郭保民, 韩雪英, 李曦冉. 两种不同生境中国沙棘种子内生细菌的多样性. *生态学报*, 2020, 40(15): 5247-5257.
- [16] Tekaya S B, Guerra T, Rodriguez D, Dawson J O, Hahn D. *Frankia* diversity in host plant root nodules is independent of abundance or relative diversity of *Frankia* populations in corresponding rhizosphere soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(5): e02248-17.
- [17] Hakim S, Mirza B S, Imran A, Zaheer A, Yasmin S, Mubeen F, Mclean J E, Mirza M S. Illumina sequencing of 16S rRNA tag shows disparity in rhizobial and non-rhizobial diversity associated with root nodules of mung bean (*Vigna radiata* L.) growing in different habitats in Pakistan. *Microbiological Research*, 2020, 231: 126356.
- [18] Hahn D, Nickel A, Dawson J. Assessing *Frankia* populations in plants and soil using molecular methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29(3): 215-227.
- [19] 张爱梅, 韩雪英, 王嘉, 孔维宝, 牛世全, 朱学泰. 马街山中国沙棘根瘤内生共生细菌多样性研究. *生态学报*, 2019, 39(1): 294-301.
- [20] 张爱梅, 韩雪英, 孙坤, 张世虎, 孔维宝, 牛世全, 朱学泰. 高通量测序分析中国沙棘根瘤与根际土壤细菌多样性. *草原与草坪*, 2018, 38(2): 49-55.

- [21] 曹文侠, 徐长林, 方强恩, 马磊. 祁连山金强河流域种子植物区系分析. 草原与草坪, 2012, 32(6): 42-47.
- [22] 符德欢, 朱高倩, 郭佳玉, 王丽, 周培军, 蒲星宇, 李学芳. 改良 CTAB 法提取重楼属 3 种药用植物干燥根茎 DNA. 中药材, 2017, 40(6): 1295-1299.
- [23] 黄金芳. 福建省弗兰克氏菌遗传多样性研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2007.
- [24] Lundberg D S, Yourstone S, Mieczkowski P, Jones C D, Dangl J L. Practical innovations for high-throughput sequencing. Nature Methods, 2013, 10(10): 999-1002.
- [25] Kim H, Rim S O, Bae H. Antimicrobial potential of metabolites extracted from ginseng bacterial endophyte *Burkholderia stabilis* against ginseng pathogens. Biological Control, 2019, 128: 24-30.
- [26] Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet.journal, 2011, 17(1): 10-12.
- [27] Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ, 2016, 4: e2584.
- [28] Haas B J, Gevers D, Earl A M, Feldgarden M, Ward D V, Giannoukos G, Ciulla D, Tabbaa D, Highlander S K, Sodergren E, Methé B, DeSantis T Z, The Human Microbiome Consortium, Petrosino J F, Knight R, Birren B W. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. Genome Research, 2011, 21(3): 494-504.
- [29] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [30] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, Cole J R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [31] Gtari M, Nouioui I, Sarkar I, Ghodhbane-Gtari F, Tisa L S, Sen A, Klenk H P. An update on the taxonomy of the genus *Frankia* Brunchorst, 1886, 174^{Al}. Antonie van Leeuwenhoek, 2019, 112(1): 5-21.
- [32] Nouioui I, Ghodhbane-Gtari F, del Carmen Montero-Calasanz M, Göker M, Meier-Kolthoff J P, Schumann P, Rohde M, Goodfellow M, Fernandez M P, Normand P, Tisa L S, Klenk H P, Gtari M. Proposal of a type strain for *Frankia alni* (Woronin 1866) Von Tubeuf 1895, emended description of *Frankia alni*, and recognition of *Frankia casuarinae* sp. nov. and *Frankia elaeagni* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(12): 5201-5210.
- [33] 樊梦颖. 三种木本结瘤植物根瘤细菌多样性调查[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020.
- [34] ABhauer K P, Wemheuer B, Daniel R, Meinicke P. Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. Bioinformatics, 2015, 31(17): 2882-2884.
- [35] Lekberg Y, Gibbons S M, Rosendahl S. Will different OTU delineation methods change interpretation of arbuscular mycorrhizal fungal community patterns? New Phytologist, 2014, 202(4): 1101-1104.
- [36] 张明明. 陕西沙棘林地土壤和根瘤的细菌多样性及与土壤养分的关系[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [37] Afzal I, Shinwari Z K, Sikandar S, Shahzad S. Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. Microbiological Research, 2019, 221: 36-49.
- [38] 黎烨, 熊娟, 张婷, 金玲月, 桂楚伊, 田宝玉. 番茄根内生细菌的促生及其优势种群的筛选和分析. 福建农业科技, 2019, (11): 17-24.