

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
52(10):1297-1308; 4 October 2012  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 新疆醉马草内生菌群落结构

史应武<sup>1</sup>, 张雪兵<sup>1,2</sup>, 娄恺<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>新疆农业科学院微生物应用研究所, 乌鲁木齐 830091

<sup>2</sup>新疆农业大学食品学院, 乌鲁木齐 830052

**摘要:** 【目的】揭示醉马草不同组织内生细菌和内生真菌种群组成和分布。【方法】采用液氮研磨法分别提取醉马草种子、叶、茎、根组织总 DNA, 采用通用引物扩增内生细菌 16S rDNA 和真菌 ITS, 通过限制性内切酶 *Hha* I 和 *Rsa* I 对 16S rDNA PCR 产物酶切, *Hhae* III 和 *Hinf* I 对真菌 rDNA ITS PCR 产物酶切得到不同的 TRFs 片段。TRFs 经 T-RFLP 分析程序结合基因文库比对后, 分析醉马草不同组织中内生细菌和内生真菌的群落组成及内生菌群落相似性。【结果】研究表明醉马草根部分内生细菌多样性最高, 而种子内生真菌多样性最为丰富。醉马草各组织内生细菌优势菌属均为 *Bacillus* (29% 以上), 种子、叶、茎、根内生真菌优势菌属分别为 *Mycosphaerella* (6.5%), *Teratosphaeria* (4.5%), *Fragum* (1.1%), *Sebacina* (11.3%)。聚类分析表明茎和叶内生细菌群落结构相似, 种子和其他组织内生细菌群落结构相似性较远, 而茎和种子内生真菌群落结构相似, 叶和其他组织内生真菌群落结构相似性较远。醉马草内生菌多样性丰富且存在尚未认识的新类群。

**关键词:** 植物内生菌, 末端限制性片段长度多态性(T-RFLP), 细菌群落, 真菌群落

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 10-1297-12

醉马草 [*Achnatherum inebrians* (Hance) Keng] 为禾本科 (Gramineae) 芨芨草属 (*Achnatherum* Beauv), 多年生草本植物, 原产于欧亚两洲, 在我国主要分布于甘肃、新疆、内蒙古等地。醉马草具有抗高寒、耐干旱等优势, 所以分布广、适应性强。醉马草是我国北方主要的烈性毒草之一, 主要危害马属动物 (马、驴、骡), 尤其是近些年来由于过度放牧造成草场退化, 而醉马草乘机蔓延成为畜牧业一大危害。在新疆醉马草广泛分布于天山南北, 覆盖度最高可达 85% [1]。

植物内生菌 (endophyte) 是指那些在其生活史

的一定阶段或全部阶段生活于健康植物各种组织和器官内部, 又不引起植物明显病害的细菌、真菌、放线菌 [2]。据报道, 已从棉花、水稻、马铃薯、番茄、辣椒等植物中分离到内生菌, 且内生菌对棉花黄萎病、马铃薯环腐病、番茄青枯病、辣椒炭疽病等植物病害具有一定的防治效果, 并具增产能力 [3]。1994 年美国学者首次在我国新疆的醉马草种子中发现了内生真菌 [4]。1996 年新西兰学者 Miles 等也从采自新疆的醉马草种子和幼苗中检测到了内生真菌, 并分离到了纯培养 [5]。1998 李学森报道了新疆醉马草种子和幼苗带菌率分别为 98% 和 85% [6]。2000 年南

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31060018); 新疆特殊环境微生物实验室开放课题 (XJYS0203-2008-03)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-991-4521590; E-mail: loukai02@mail.tsinghua.edu.cn

作者简介: 史应武 (1973-), 男, 甘肃人, 博士, 副研究员, 主要从事环境微生物多样性研究。E-mail: syw1973@126.com

收稿日期: 2012-03-13; 修回日期: 2012-05-26

志标和李春杰调查发现,我国甘肃省醉马草植株的内生真菌带菌率近乎 100%<sup>[7]</sup>。利用内生菌防治作物病虫害、开发有益内生菌以提高作物产量和品质,对农业可持续发展具有重要意义。

研究醉马草内生菌群落结构,有助于阐明内生菌与醉马草共生过程中功能和潜在作用。目前对于植物内生菌的研究主要采用培养的方法<sup>[8]</sup>,然而培养的方法仅能分离到很少的植物内生菌,不足以反映植物内生菌群落结构。非培养方法可以补充培养方法的不足,较为完整的解析植物内生菌群落结构,但是目前仅本实验室利用非培养方法对醉马草内生细菌多样性进行了研究。

近年来,随着分子生物学的发展,基于 16S rDNA 和 ITS 序列的非培养技术为揭示微生物的群落结构和遗传多样性开辟了一条全新的途径,为我们全面准确认识微生物多样性提供强有力的分析工具。T-RFLP 技术是一种快速高效的分子生态学检测方法,具有分辨率高、重复性好、可以定量分析等优点,而被用于多种微生物群落多样性研究中,但在醉马草内生菌研究方面未见报道。

本课题组前期采用组织和研磨分离法从醉马草中分离到 89 株内生细菌,与拟杆菌门 (Bacteroidetes),厚壁菌门 (Firmicutes),变形菌门 (Proteobacteria),放线菌门 (Actinobacteria) 中的 8 个属的 16S rDNA 相似性达到 97% - 100%,主要优势种群为芽孢杆菌属 (*Bacillus*);真菌 2 株,分别属于麦角菌属 (*Claviceps*) 和毛壳菌属 (*Chaetomium*)<sup>[9]</sup>。利用构建 16S rDNA 克隆文库的方法对新疆醉马草内生细菌多样性进行了初步分析,结果显示 57 个阳性克隆子大部分与变形杆菌门 (Proteobacteria) 的  $\alpha$  亚群、 $\beta$  亚群、 $\gamma$  亚群、 $\delta$  亚群、 $\epsilon$  亚群,厚壁菌门 (Firmicutes),放线菌门 (Actinobacteria),拟杆菌门 (Bacteroidetes) 的 37 个属的相似性较高 (97% - 100%)<sup>[10]</sup>。

本文采用 T-RFLP 技术分析醉马草内生菌群落结构,根据 T-RFLP 图谱,运用多样性指数和群落相似性分析比较醉马草不同组织间的内生菌群落多样性及其相似度,同时运用 MiCA 数据库 (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>) 进行在线比对,结合克隆文库方法获得各组织中具体分类信息,为醉马草内生菌的开发利用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品:**样品采于 2008 年 5 月和 7 月,采样地位于乌鲁木齐南山,海拔 1074-1700 m,东经 87°21'31",北纬 43°36'49"。采用间隔 10 m 的 5 点取样法 (东、南、西、北、中),每点选取供试草 1 株,每株草取根、茎、叶、种子 (成熟期),每种器官取样 2 个。将样品装入无菌食品保鲜袋,带回实验室 4℃ 保藏。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**PCR 仪为 Eppendorf AG 22331 Hamburg;凝胶成像系统 GK-330C 购自美国联合生物科技有限公司;PCR 引物、TaqDNA 聚合酶和 PMD19-T Vector 载体购自 TaKaRa 公司;PCR 产物回收试剂盒 (Macherey-Nagel, Germany);内切酶 *Hha* I、*Hinf* I 和 *Hhae* III、*Rsa* I (上海生工)。

### 1.2 样品的表面消毒

将醉马草的根、茎、叶 (包括叶鞘)、种子分别用自来水冲洗干净,再用无菌水冲洗一次;在 75% 的乙醇浸泡 30 s,然后在 0.1% 的升汞中浸泡 1 min;无菌水淋洗 5 次,在无菌条件下晾干;取最后一次淋洗水涂于 LB 平板上,28℃ 培养 72 h,检测表面灭菌效果<sup>[11]</sup>。

### 1.3 样品总 DNA 的提取

参照文献 [11] 并稍做修改:取表面灭菌处理的醉马草不同部位各 1 克于无菌研钵,用液氮将醉马草组织研成粉末,转至无菌离心管中,按 (1:9, W/V) 比例加 CTAB 抽提缓冲液 (2% CTAB; 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0; 1.4 mol/L NaCl; 20 mmol/L EDTA; 1.5% Polyvinyl-pyrrolidone, PVP; 0.5% 2-mercaptoethanol) 混匀。60℃ 水浴 45 min,加入等体积氯仿:异戊醇 (24:1),4℃,13400 × g 离心 10 min,上清转至无菌离心管,重复步骤 4 一次,上清转至无菌离心管,加 2/3 体积预冷异丙醇混匀,-20℃ 放置 2 h。4℃,13400 × g 离心 10 min,弃上清,沉淀用 70% 乙醇脱盐,离心,弃上清,干燥 DNA,加适量无菌水或 TE (pH 8.0) 溶解。加 RNase (使用前 100℃ 煮沸 10 min 以灭活残留的 DNase) 使终浓度达 50  $\mu$ g/mL,37℃ 水浴 30 min,储于 -20℃ 备用。

### 1.4 16S rDNA 和真菌 rDNA ITS 的 PCR 扩增

分别以制得的 DNA 和醉马草表面消毒时的最后一次淋洗水作为 PCR 扩增的模板,使用细菌通用

引物<sup>[12]</sup> 799f: 5'-AACAGGATTAGATACCCTG-3' 和 1492r: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。真菌<sup>[13]</sup> (ITS1: 5'-FAMTCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 和 ITS4: 5'-TCCTCCGTTATTGATATGC-3')。PCR 反应体系 (25  $\mu$ L): 25  $\mu$ L Premix Taq, 各 0.5  $\mu$ L 引物 (10  $\mu$ mol/L), 1  $\mu$ L DNA (100 ng), 23  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min。

### 1.5 T-RFLP 分析

采用限制性内切酶 *Hha* I 和 *Rsa* I 对 16S rDNA PCR 产物酶切, *Hae* III 和 *Hinf* I 对真菌 rDNA ITS PCR 产物酶切。限制性内切酶酶切反应体系 (20  $\mu$ L): 0.6  $\mu$ L *Hha* I, 2  $\mu$ L Tango Buffer, 17.4  $\mu$ L PCR 产物, 37 $^{\circ}$ C 酶切 4 h, 然后 65 $^{\circ}$ C 15 min 使酶失活。酶切后采用乙醇沉淀法脱盐, 脱盐后体积为 10  $\mu$ L<sup>[14]</sup>。基因扫描由上海基康生物技术有限公司完成。取 2  $\mu$ L 样品、10  $\mu$ L 甲酰胺、1  $\mu$ L 内标 (liz500), 混匀后 95 $^{\circ}$ C 变性 4 min, 马上置于冰浴中, 然后上样进行毛细管电泳, 胶型为 POP<sub>4</sub>, 电泳时间 30 min, 然后 65 $^{\circ}$ C 15 min 使酶失活。使用 Excel 对各样品的限制性内切片段 (T-RFs) 进行筛选, 将片段小于 35 bp, 荧光强度小于 100 单位的峰进行剔除。为了降低毛细管电泳所带来的误差, 对个样品峰图采用 0.5% 的峰面积置信度分析 (即  $P_i = (n_i / N) \times 100\%$ ,  $n_i$  为单个信号峰的面积,  $N$  为所有信号峰的总面积)。将筛选后的 T-RFs 数据录入 MiCA 数据库 (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>) 进行在线比对以获得各组织中具体分类信息, 其中对不同样品图谱中片段大小相差 1 bp 的 T-RFs 认为是相同的。选择在线分析中的 TAP T-RFLP 程序对 4 个样品中都出现的优势 T-RFs 进行分析<sup>[15]</sup>。

### 1.6 群落多样性及不同样品图谱聚类分析

以 T-RFLP 图谱中每一个限制性片段 (T-RF) 为一个可操作分类单元 OUT (operational taxonomic unit)。使用公式  $H' = -\sum (P_i \times \log P_i)$  对醉马草各组织中内生菌多样性指数 (Shannon-Weaver index,  $H'$ ) 进行计算,  $P_i$  的计算同上<sup>[11-12]</sup>。利用 Jaccard 指数  $S_j = n_{AB} / (n_A + n_B - n_{AB})$  进行相似性指数计算, 进而比较不同组织间相似性, 其中  $n_A$  表示样品 A 中总的信号峰个数,  $n_B$  表示样品 B 中总的信号峰个数,  $n_{AB}$  表示样品 A 和 B 中共同有的信号峰个数<sup>[13]</sup>。根据文献 [14] 方法进行均匀度指数计算

(Evenness,  $E'$ )。用 SPSS 13.0 软件中的聚类分析工具 (Classify-heierarchical cluster analysis) 对不同样品的 T-RFLP 图谱进行聚类分析<sup>[15]</sup>, 取每个不同的 T-RF 为一个变量, 采用分层聚类分析进行计算<sup>[16]</sup>。

### 1.7 克隆文库构建和测序

扩增后将 730 bp 的条带用 PCR 产物纯化试剂盒回收和纯化, 并与 PMD19-T Vector 载体连接, 转化 *E. coli* DH 5 $\alpha$  感受态细胞。以氨苄青霉素 (100  $\mu$ g/mL) 抗性和蓝白斑筛选阳性转化子。选择的阳性转化子进行扩增, 扩增引物, 正向 Primer M13F (-47) 5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'; 反向 Primer M13R (-48) 5'-AgCGGATAACAATTTCACACAGGA-3'。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 8 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳进一步验证插入的外源片段应大约为 750 bp 左右。取 17.5  $\mu$ L 的 16S rDNA 的菌落 PCR 产物, 加入 0.5  $\mu$ L *Hae* III、2  $\mu$ L 相应的 10  $\times$  M Buffer, 使反应体系为 20  $\mu$ L。37 $^{\circ}$ C 恒温过夜酶切。酶切产物用 2.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。选取酶切图谱不同的克隆送到上海生工进行 16S rDNA 的直接测序 (以 M13-47 为正向引物, M13-48 为反向引物)<sup>[16]</sup>。

### 1.8 序列系统发育学分析

通过 NCBI 的 VECTER SCREEN 去除测序所得的 16S rDNA 的载体片段, 用 Blast 搜索程序从 GenBank 数据库中调出相似性较高的相关菌株的 16S rDNA 序列, 序列相似性  $\geq 97\%$  的认为是一个同样的类型并且用一个单独的序列来代表, 用 CLUSTSL X 进行多序列比对<sup>[17]</sup>, 系统进化距离矩阵根据 Kimura 模型估算, 用 MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 软件包采用邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统进化树<sup>[18]</sup>。重复取样 1000 次进行自展值 (bootstrap value) 分析来评估系统进化树的拓扑结构的稳定性<sup>[19]</sup>。这是结果, 建议移至结果部分。

## 2 结果和分析

### 2.1 样品总 DNA 提取、16S rDNA 和真菌 rDNA ITS 的扩增

提取的醉马草根、茎、叶、种子的 DNA 片段较为完整, 基因组片段大于 23 kb (图 1-A)。通过细菌

16S rDNA 特异性 PCR 扩增,得到大小为 750 bp 左右的目的片段(图 1-B),同时还扩增出 1000 bp 左右的片段,推测可能是醉马草线粒体 18S rRNA 的部分序列。真菌 ITS 特异性扩增得到 600bp 左右的目的片段(图 1-C)。醉马草表面消毒时的最后一次淋洗水作为 PCR 扩增的模板没有扩增出基因组的片段,表明扩增结果的有效性。

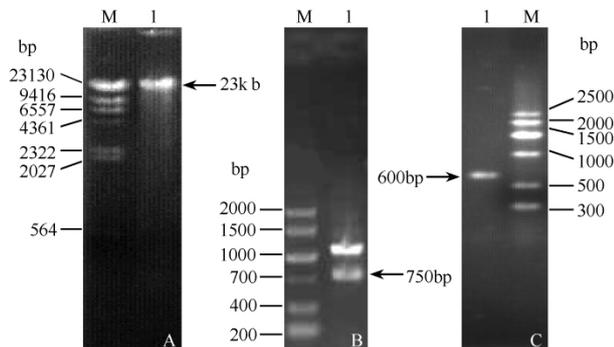


图 1 醉马草总 DNA (A) 和醉马草内生细菌 16S rDNA (B), rDNA ITS (C) PCR 扩增结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total DNA of *Achnatherum inebrians* (A) and the results of 16S rDNA (B), rDNA ITS amplification (C). A: M: Lambda DNA Marker; Lane 1: total DNA of *Achnatherum inebrians*. B: M: Marker V; Lane 1: *Achnatherum inebrians* products from PCR reaction.

## 2.2 微生物群落结构分析

T-RFLP 图谱上每个 T-RF 对应的微生物种类可根据相应的内生细菌和内生真菌克隆文库得到。根据 T-RF 不同,挑选相应的克隆测序,构建细菌系统发育树(图 2), GenBank 数据库收录号分别为 GU942752-GU942808。根据酶切图谱和克隆测序结果,将 249 个克隆分为 57 个 OTUs。归属于  $\alpha$ -proteobacteria 类群的 40 个克隆序列与相应的已知细菌具有相近亲缘关系,包括 5 个 OTUs。其中 19 个克隆序列与细菌 *Ochrobactrum anthropi* 的序列相似性为 90%; 2 个克隆与 *Phenyllobacterium lituiforme* 序列相似性为 96%; 2 个克隆聚在 *Rhizobium galegae* 簇,与 *Rhizobium galegae* 的序列相似性高达 100%; 7 个克隆与 *Devosia insulae* (EF012357) 的序列相似性为 97%; 有 5 个克隆序列 *Brevundimonas* 的序列相似性分别为 99%。 $\beta$ -proteobacteria 是该文库中的最优势类群,包含 70 个克隆,代表了 18 个 OTUs。其中有 11 个克隆序列与 *Janthinobacterium agaricidamnorum* (AY167838) 的序列相似性高达 99%,是该克隆文库中第二大优势菌属。有 1 个克

隆序列与 *Oxalicibacterium faecigallinarum* (AB469788) 的序列相似性较低,为 90%。5 个克隆序列分别与 *Oxalobacteraceae bacterium* (DQ337591) 和 *Janthinobacterium lividum* (EU275366) 的序列相似性较低,均为 90%。有 29 个克隆分别与食酸菌属 *Acidovorax delafieldii* (AB269774)、*Massilia aurea* (AM231588)、*Polaromonas rhizosphaerae* (EF127651)、嗜甲基菌属 *Methylophilus freyburgensis* (AJ517772)、*Massilia niabensis* (EU808006)、*Janthinobacterium sp.* (D84590)、*Pelomonas saccharophila* (AM501432) 的相似性均在 97% 以上。克隆文库中的 20 个克隆子聚在  $\gamma$ -proteobacteria 簇,与其中的 5 个已知属的相似性在 97% 以上。各有一个克隆子分别与  $\delta$ -proteobacteria 中的 *Geobacter bremensis* (NR\_026076)、*Myxobacterium* (AB246770)、*Geobacter bemidjensis* (CP001124) 相似性在 95% 以上。 $\epsilon$ -proteobacteria 是本克隆文库中占 OUTs 数最少的种群。17 个克隆与放线菌门 (Actinobacteria) 系统发育关系密切,其中的 4 个克隆序列与 *Arthrobacter sulfonivorans* 的细菌序列相似性为 100%,还有 10 个克隆序列与 *Rhodococcus sp.* (DQ337546) 和 *Actinobacterium* (GU167988) 的序列相似性为 99%。1 个克隆序列与 *Actinoplanes nipponensis* (AB047498) 的细菌的序列相似性为 94%。21 个克隆与 *Bacillus subtilis* (GQ980239) 聚在一起,其中有 29 个克隆序列与厚壁菌门的枯草芽孢杆菌属 *Bacillus subtilis* (GQ980239) 的序列相似性高达 98%,是该克隆文库中第一大优势菌属。29 个克隆分别属于拟杆菌门 (Bacteroidetes) 的黄杆菌纲 (Flavobacteria) 和鞘脂杆菌纲 (Sphingobacteria)。

经过计算,4 个样品内生细菌 T-RF 片段分布如表 1 所示。在 4 个样品中均出现的 *Rsa* I 和 *Hae* III 酶切的末端限制性片段 (T-RF),图 1-a 中有 331bp (*Bacillus*) 和 116 bp (*Sphingobacteriales*),图 1-c 中是 41 bp (*Mycosphaerella*) 和 134bp (*Fragum*),这些 T-RFs 代表着 4 个样品中的优势微生物。还有一些结合 *Hha* I 和 *Hinf* I 酶切 T-RFLP 图谱中的优势峰,对 TAP-T-RFLP 程序进行分析(表 1)。经过查询 RDP 数据库,推测 4 个样品中可能存在 *Bacillus* 属, *Sphingomonas* 属。T-RFs 只在其中一个样品中出现,如种子中出现的 212bp (*Paenibacillus*) 占 11%,根中出现的 142 bp (*Methylobacterium*) 占 2%,此峰

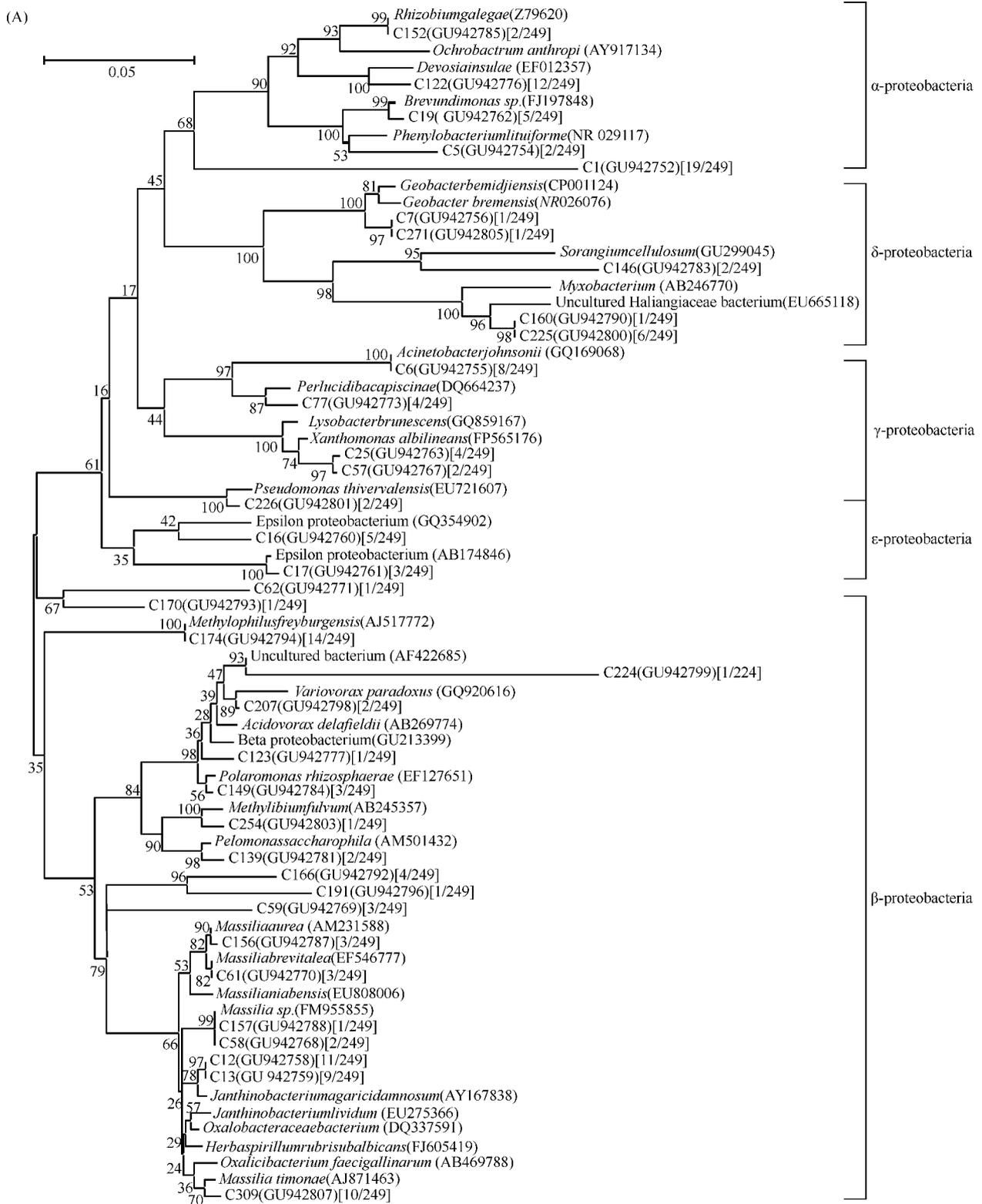
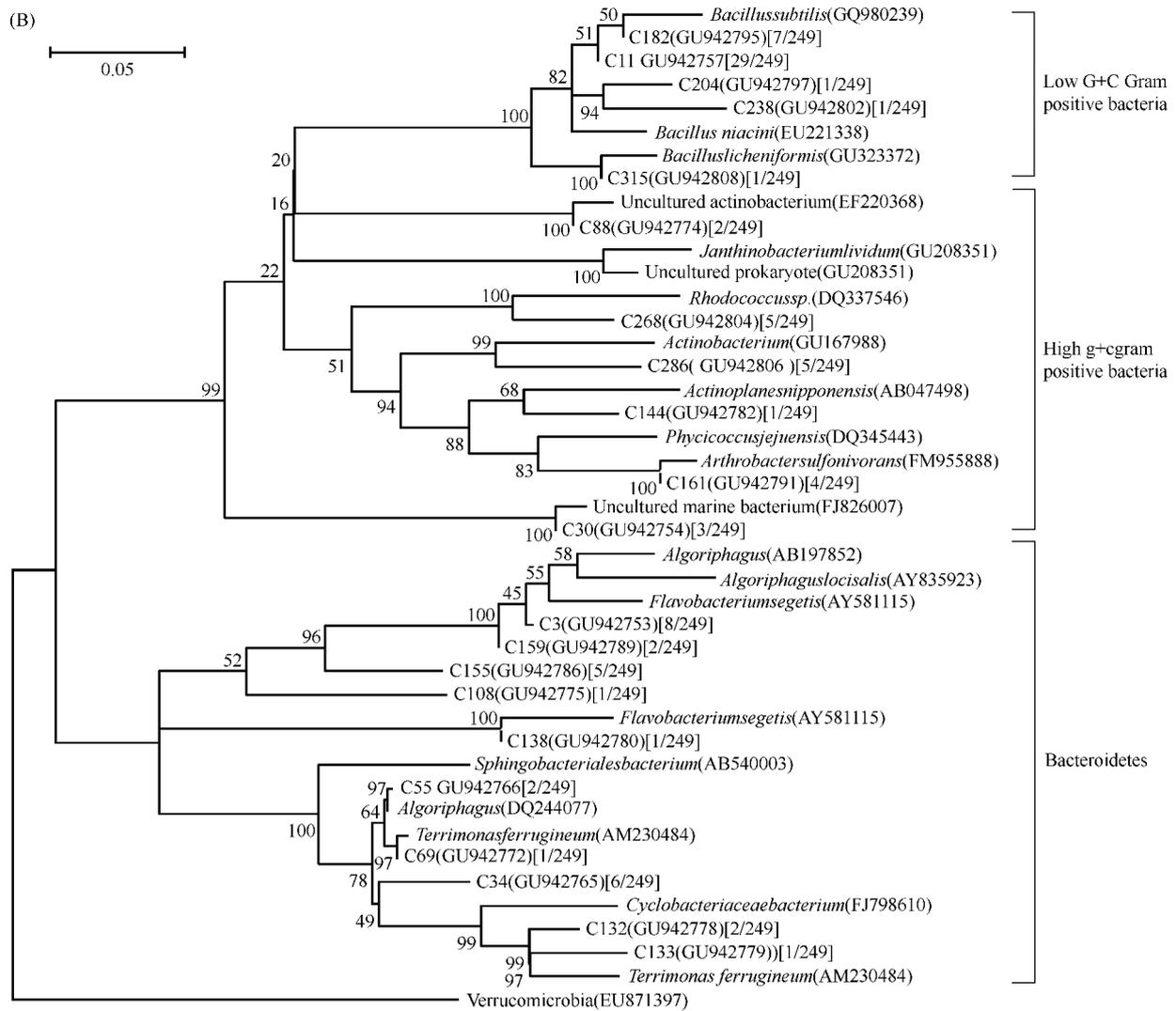


图 2 Neighbor-joining 法构建醉马草内生细菌 16S rDNA 克隆文库系统发育树

Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree based on bacterial 16S rDNA clone library from Achnatherum inebrians. A: α-proteobacteria, β-proteobacteria, γ-proteobacteria, δ-proteobacteria, ε-proteobacteria, B: High GC gram positive bacteria, Bacteroidetes, Low GC gram positive bacteria. Tree length = 1.37972352, 1 000 bootstrap replications.



续表 2

对应的也是这一样品中的优势菌,各样品中都有的优势峰占 3%~37.2%。Rsa I 酶切后种子、叶、茎、根中的 TRF 所占比例(分别为 41.7%、15.3%、33.4%、95.3%)均比 Hha I 酶切后(分别为 22.8%、7.40%、19.5%、50.3%)所占群落比例大,表明内切酶 Rsa I 更适合醉马草内生细菌的 16S rDNA 酶切。根据克隆文库的结果,种子中的优势峰为 104bp (*Acetobacterium*),叶中的优势峰有 76bp (*Dechloromonas*),茎中的优势峰还有 110 bp (*marine bacterium*)。

醉马草内生真菌的群落结构相对于内生细菌较简单,各样品中内生真菌组成结构见表 1。各样品都有的优势峰占 0.1%~19.0%。根据克隆文库的结果,根和种子中的优势峰均为 50 bp (*Cladosporium*),

叶中的优势峰有 76 bp (*Tremiscus*),茎中的优势峰还有 110 bp (*Fragum*)。醉马草不同组织中的内生真菌的 ITS 序列经内切酶 *Hae* III 和 *Hinf* I 消化后产生的 TRF 经比对种子、叶、茎、根中的 TRF 所占比例分别为 29.9%、9.67%、35.1%、25.3% 和 34.5%、23.3%、24.9%、17.3%。

### 2.3 微生物群落多样性分析

从图 3 可以看出,醉马草细菌(图 3-A、B)和真菌(图 3-C、D)随植株器官的不同存在显著的变化。在 4 个醉马草植株器官中内生细菌均出现 Rsa I 和 Hae III 酶切的末端限制性片段(T-RF),图 3-A 中有 109 bp (*Bacillus*)和 244 bp (*Paenibacillus*),图 3B 中是 41 bp (*Mycosphaerella*)和 134 bp (*Fragum*),这些 T-RFs 代表着 4 个植株器官中的优势类群。醉马草

内生真菌的群落结构相对于内生细菌简单,根和种子中的优势峰均为 104bp (Cladosporium), 叶中的优势峰有 76bp (Tremiscus), 茎中的优势峰还有 110 bp (Fragum)。根据 *Hha* I、*Rsa* I 和 *Hae* III、*Hinf*

I 酶切 T-RFLP 图谱(图 3)中末端限制性片断的数目及其相对峰高值,分别计算了 4 个样品内生细菌和内生真菌多样性指数(图 4)。

表 1 醉马草内生细菌 16S rDNA 和内生真菌 rDNA ITS 基因相似性分析

Table 1 16 S rDNA and rDNA ITS analysis of endophytic bacteria and fungi of *Achnatherum inebrians*

ActureT-RF size/bp	Clone NCBI	Closest NCBI match (accession number)	Homology /%
<b>Bacteria</b>			
331	C11	<i>Bacillus subtilis</i> GQ980239 (EU221338)	98
116	C133	<i>Sphingobacteriales bacterium</i> (AB540003)	97
152	C226	<i>Pseudomonas thivervalensis</i> (EU721607)	100
110	C30	Uncultured marine bacteriumclone (FJ826007)	99
106	C138	<i>Flavobacterium segetis</i> (AY581115)	99
109	C19	<i>Brevundimonas sp.</i> ( FJ197848)	99
<b>Fungi</b>			
96	F2	<i>Chaetomium</i> (FJ595483)	97
112	F1	<i>Claviceps</i> (AB160991)	99
50	F9	<i>Cladosporium</i> (EU167592)	94
35	F14	<i>Phoma herbarum</i> (AY864822)	92

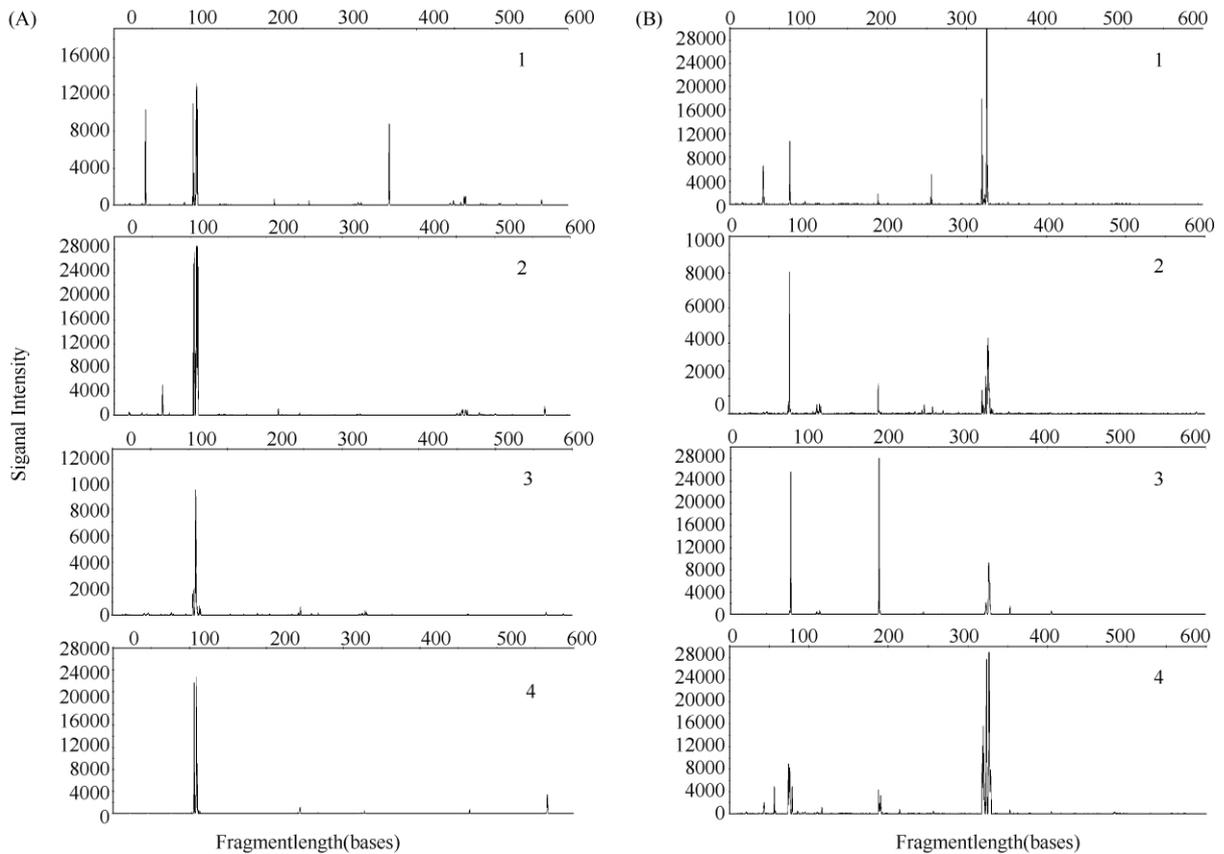
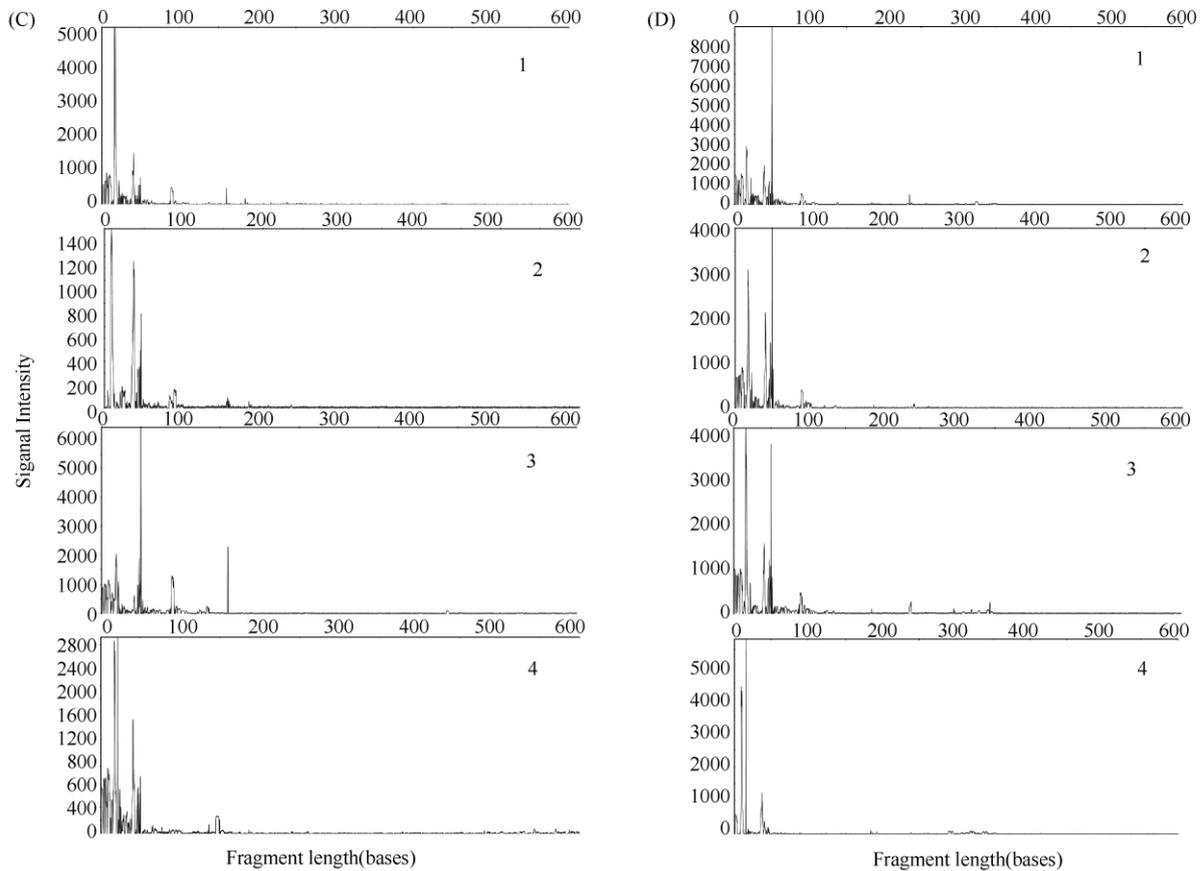


图 3 醉马草种子、叶、茎、根中内生菌 T-RFLP 分析图谱

Fig.3 T-RFLP profiles of seeds, leaves, stems and roots of *Achnatherum inebrians*. a: *Rsa* I -T-RFLP profiles for endophyte Bacteria; b: *Hha* I -T-RFLP profiles for endophyte Bacteria; c: *Hae* III -T-RFLP profiles for endophyte fungi; d: *Hinf* I -T-RFLP profiles for endophyte fungi; 1: sample of the seed; 2: sample of the leaf; 3: sample of the stem; 4: sample of the root.



续图 3

从不同样品的内生细菌和内生真菌多样性指数 (Shannon Diversity  $H'$ ) 来看, 醉马草根中内生细菌多样性最丰富, 而茎中内生真菌多样性最丰富。从均匀度指数 (Shannon Evenness  $E'$ ) 来看, 各物种的丰度相差不明显。对同一个样品的内生细菌和内生真菌多样性进行比较, 发现种子、叶、根中内生细菌多样性更丰富, 而茎中内生真菌多样性较细菌多样性略高 (图 4)。

#### 2.4 微生物群落结构相似性分析

对四个样品中内生细菌和内生真菌 T-RF 进行聚类分析, 可通过聚类分析的结果判断不同样品微生物群落的相似程度。根据内生细菌图谱的聚类分析结果, 茎和叶聚在一起, 内生细菌群落结构相似度高, 种子距离其它样品距离较远, 细菌结构差异较大 (图 5)。在聚类分析的树状图中, 内生真菌群落结构也呈现出层状分布, 种子和茎聚在一起, 表明其内生真菌群落结构相似程度高, 叶和其它样品距离最远, 说明叶中内生真菌和其它组织中的内生真菌微生物群落的差异较大 (图 6)。

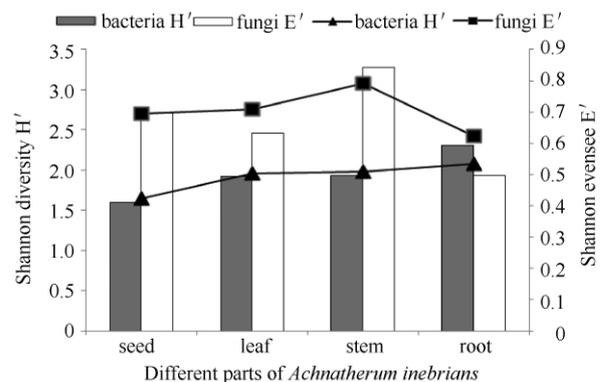


图 4 基于 T-RFLP 图谱的微生物多样性分析

Fig. 4 Species diversity of bacteria and fungi based on T-RFLP profiles.

### 3 讨论

醉马草内生菌存在丰富的多样性, 本文采用 T-RFLP 技术研究表明, 醉马草根内生细菌多样性最高, 而种子内生真菌多样性最为丰富。这与本课

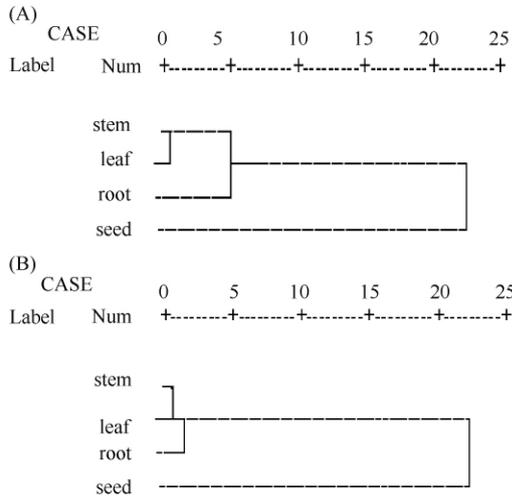


图5 醉马草种子、叶、茎、根中内生细菌图谱的聚类分析树状图

Fig. 5 Dendrogram of endophyte Bacteria at seeds, leaves, stems and roots of *Achnatherum inebrians*. a: *Rsa* I; b: *Hha* I.

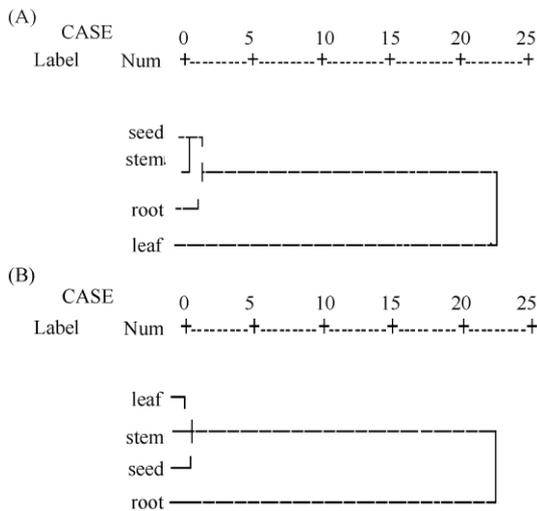


图6 醉马草种子、叶、茎、根中内生真菌图谱的聚类分析树状图

Fig. 6 Dendrogram of endophyte fungi at seeds, leaves, stems and roots of *Achnatherum inebrians*. a: *Hae* III; b: *Hinf* I.

课题组前期采用培养方法研究结果醉马草各组织内生细菌仅 8 个属,真菌 2 个属相比,基于 T-RFLP 技术的非培养方法在研究微生物群落结构方面具有极其明显的优势,目前仅本实验室利用构建 16S rDNA 克隆文库的方法对醉马草内生细菌多样性进行了研究,结果显示醉马草内生细菌有 8 个属,本研究结果

也表明非培养方法可以补充培养方法的不足,能够较为完整的解析植物内生菌群落结构。

基于 T-RFLP 技术的非培养方法在研究微生物群落结构方面具有极其明显的优势,但同时又存在着一些不足之处。PCR 差异性扩增直接影响 T-RFLP 结果。在 T-RFLP 的峰值图上,一个峰代表的有可能不只是一个种。峰值图上每个峰定量的结果不可能真正代表该微生物在某一生态系统中的绝对含量。因此,为了解决上述局限性,需要根据研究目的、样品、环境条件等对 T-RFLP 分析的各个步骤进行优化,克服不足,尽可能地使分析结果准确、真实,并结合其他分子生态学方法。

样品总 DNA 的提取和限制性内切酶的选择是影响 T-RFLP 分析结果的关键因素。对于后者,可以分别用几种限制酶进行分析,综合几种酶切的结果并对多个图谱进行综合分析,这样可以提高检出效率。任玉晶等研究表明:限制性内切酶种类对 T-RFLP 分析结果的可重复性影响最大,PCR 次之,而毛细管电泳对结果的可重复性几乎没有影响<sup>[20]</sup>。不同 DNA 片段进行限制性酶切有可能得到相同的 T-RF,所以为了了解每个 T-RF 所代表的物种,还需要对 T-RF 对应的 DNA 片段的序列进行分析。通常做法是对群落 DNA 进行克隆、筛选、测序以及分析进化史来了解每个 T-RF 所代表的物种。本研究表明,选择合适的限制性内切酶对 T-RFLP 分析至关重要。

本研究中醉马草内生细菌多样性也是在根部最高(图 3,图 4),这与其它种类植物内生菌的报导<sup>[21-23]</sup>相一致。本研究结果也验证了禾草内生真菌多数情况下,在叶鞘和种子中分布量最多的规律,而叶片和根中含量极微<sup>[24]</sup>。禾草内生真菌具有一定的组织专一性,即菌丝体只存在于植株的一定部位,并且不同的部位菌丝体的形态也有差异<sup>[25-26]</sup>。在种子中,内生真菌菌丝体多分布于稃片与种子之间的糊粉层中。根直接与土壤接触,因而醉马草根内生细菌受土壤微生物影响,类群多样性高于茎叶。Boehm 等(1997)<sup>[27]</sup>和 Tiquia 等(2002)<sup>[28]</sup>研究指出,土壤有机质含量和组成是影响微生物生物量、群落组成、生物活性的关键因素。

本研究表明,醉马草种子、叶、茎、根中优势菌属均为 *Bacillus* (29% 以上),这与本课题组前期的醉马草内生分离结果相一致<sup>[9]</sup>。本研究对醉马草不同

组织器官内生菌的类群比对发现:茎和叶内生细菌群落结构相似,种子和其他组织内生细菌群落结构相似性较远,而茎和种子内生真菌群落结构相似,叶和其他组织内生真菌群落结构相似性较远。群落结构差异可能由于不同的土壤微生态环境所致,土壤有机质含量较高,适合于各种微生物的生存,因而分离出内生菌的种类比较丰富。醉马草根直接与土壤接触,因而醉马草块根内生菌受土壤菌影响,类群多样性高于茎叶。其优势类群差异的原因可能与不同的土壤微生态环境有关。

本研究用古菌特异性引物从醉马草叶和根中扩增出了内生古菌的16S rDNA,以非培养方法研究植物生态系统中古菌的报道并不多。可能由于模板浓度低或引物的选择等原因检测到的内生古菌丰富度较低,要全面、客观、真实的了解醉马草内生古菌多样性还需做进一步的研究。禾草内生真菌具有宿主专化性和地域专化性,所以同一种禾草在不同的地理区域具有不同的内生真菌类群分布,在不同气候带(如热带和温带)内生真菌分布也有明显区别<sup>[29]</sup>。李春杰课题组对甘肃、青海、新疆和内蒙醉马草内生真菌分离鉴定表明,这些醉马草内生真菌均为*Neotyphodium*属。而本研究中未检测到醉马草内生真菌*Neotyphodium*属,这是由于模板浓度低或引物等检测方法的选择不当,还是由于新疆特殊地理区域的影响,有待进一步研究。

综上所述,醉马草内微生物群落具有丰富的多样性,且醉马草根、茎、叶、种子内生菌多样性有较大差异。只有明确内生菌-醉马草-生长环境之间的相互关系,通过培养方法和非培养方法的结合才能对植物微生态系统中微生物多样性有客观全面的认识,才能为开发利用醉马草内生菌等提供理论依据和基础资料。

## 参考文献

- [1] Arachevaleta M, Bacon CM. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agronomy Journal*, 1989, 81: 83-90.
- [2] 何劲,刘蕴哲,康冀川. 植物内生菌及其在农业和医学上的用途. *贵州农业科学 (Gui Zhou Agricultural Sciences)*, 2006, 34(3): 113-115.
- [3] 朱育菁,陈璐,蓝江林,苏明星,刘波. 茶叶内生菌的分离鉴定及其生防功能初探. *福建农林大学学报 (Journal of Fujian Agriculture and Forestry University)*, 2009, 38: 129-130.
- [4] Bruehl W, Kaiser WJ, Klein RE. An Endophyte of *Achnatherum Inebrians*, An Intoxicating Grass of Northwest China. *Mycologia*, 1994, 86: 773-776.
- [5] Miles CO, Lane GA, Di Menna ME, Garthwaite I, Piper EL, Ball OJP, Latch GCM, Allen JM, Hunt MB, Bush LP, and others (1996) High levels of ergonovine and lysergic acid amide in toxic *Achnatherum inebrians* accompany infection by an *Acremonium*-like endophytic fungus. *Journal of agricultural and food chemistry*, 44: 1285-1290.
- [6] 李学森,张学洲,顾祥,郑瑛. 醉马草有毒物质与其内生真菌的关系. *草食家畜 (Grass-Feeding Livestock)*, 1998, 4: 44-46.
- [7] Nan ZB, Li CJ. *Neotyphodium* in native grasses in China and observations on endophyte/host interaction. In: Paul V H ed. *Proceedings of the 4th International Neotyphodium/grass Interactions Symposium*. Germany: Soest, 2000, 41-50.
- [8] 胡桂萍,郑雪芳,尤民生,刘波. 植物内生菌的研究进展. *福建农业学报 (Journal of Fujian Agriculture and Forestry University)*, 2010, 25: 226-234.
- [9] 张雪兵,史应武,王晓霞,张伟,娄恺. 醉马草内生菌的分离、鉴定及杀虫效果. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2010, 50(4): 530-536.
- [10] 张雪兵,史应武,曾军,娄恺. 醉马草免培养内生细菌的多样. *生态学报 (Acta Ecologica Sinica)*, 2011, 31(8): 2178-2187.
- [11] 姜玲,蔡礼鸿. 一种提取银杏中DNA的方法. *植物生理学通讯 (Plant Physiology Communications)*, 2000, 36(4): 340-342.
- [12] Chelius MK, Triplett EW. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbiology Ecology*, 2001, 41: 252-263.
- [13] White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, 1990: 315-322.
- [14] Marsh TL, Saxman P, Cole J, Tiedje J. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Applied and Environment Microbiology* 2000, 66: 3616-3620.
- [15] Maidak BL, Cole JR, Parker CT Jr, Garrity GM, Larsen N, Li B, Lilburn TG, McCaughey MJ, Olsen GJ, Overbeek R, Pramanik S, Schmidt TM, Tiedje JM, Woese CR. A new version of the RDP (Ribosomal

- Database Project). *Nucleic Acids Research*, 1999, 27: 171-173.
- [16] Ulrich K, Ulrich A, Ewald D. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 63: 169-180.
- [17] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24: 876-888.
- [18] Kimura MA. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16: 111-120.
- [19] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, 39: 783-791.
- [20] 任玉晶, 芦晓飞, 万方浩, 刘万学. 末端限制性片段长度多态性 (T-RFLP) 技术的系统误差分析. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2010, 37 (12): 1820-1824.
- [21] 陈泽斌, 夏振远, 雷丽萍, 刘飞, 陈海如, 钟永丽. 非培养方法解析烟草根部内生细菌的群落结构. 华北农学报 (*Acta Agriculturae Boreali-Sinica*), 2012, 27 (1): 201-209.
- [22] 王涛, 游玲, 崔晓龙, 田文, 黄乃耀, 李欣龙. 油樟内生芽孢细菌的系统发育多样性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49 (5): 573-579.
- [23] 王松, 游玲, 李涛, 魏琴, 王涛. 香樟产芽孢内生细菌的系统发育多样性. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2010, 37 (8): 1123-1129.
- [24] Clay K. Fungal endophytes, herbivores and the structure of grass land communities. In: Gange A C ed. *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems*. Oxford: Blackwell, 1997, 151-169.
- [25] Sehardl CL, Moon CD. Processes of species evolution in *Epichloe neotyphodium* endophytes of grasses. // White JF Jr ed. *Clavicipitalean fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol and cultural impacts*. New York: Mareel Dekker Inc. 2003, 273-310.
- [26] 王银华, 任安芝, 魏宇昆, 张欣, 谢凤行, 林枫, 高玉葆. 内蒙古中东部草原羽茅内生真菌的分类. 菌物学报 (*Mycosystema*), 2008, 27 (6): 841-851.
- [27] Boehm MJ, Wu T, Stone AG, Kraakman B, Iannotti DA, Wilson GE, Madden LV, Hoitink H. Cross-Polarized Magic-Angle Spinning (sup13) C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Characterization of Soil Organic Matter Relative to Culturable Bacterial Species Composition and Sustained Biological Control of Pythium Root Rot. *Applied Environmental and Microbiology*, 1997 63:162-168.
- [28] Tiquia SM, Lloyd J, Herms DA, Hoitink HAJ, Michel Jr FC. Effects of mulching and fertilization on soil nutrients, microbial activity and rhizosphere bacterial community structure determined by analysis of TRFLPs of PCR-amplified 16S rDNA. *Applied Soil Ecology*, 2002, 21: 31-48.
- [29] 王志伟, 纪燕玲, 陈永敢, 亢燕. 禾本科植物内生真菌资源及其物种多样性. 生态学报 (*Acta Ecologica Sinica*), 2010, 30 (17): 4771-4781.

# Endophyte microbial community in *Achnatherum inebrians*

Yingwu Shi<sup>1</sup>, Xuebing Zhang<sup>1,2</sup>, Kai Lou<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China

<sup>2</sup> College of Food Science of Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China

**Abstract:** [Objective] The aim of this study was to investigate the composition and distribution variation of endophytic bacteria and fungi in *Achnatherum inebrians*. [Methods] The DNA of seed, leaf, stem and root was extracted with liquid nitrogen grinding method. Then, 16S rDNA and Internally Transcribed Spacer (ITS) sequence were digested with restriction enzymes *Hha* I, *Rsa* I and *Hhae* III, *Hinf* I to obtain terminal restriction fragments. The terminal restriction fragments were matched to bacterial and fungal genera by the T-RFLP Analysis Program, and the community component and similarity of endophyte in *Achnatherum inebrians* were analyzed. [Results] The diversity of endophytic bacteria and fungi was the most abundant in root and seed of *Achnatherum inebrians*. All the predominant bacterial population was *Bacillus* (above 29%) in different organs of *Achnatherum inebrians*. The predominant fungal population was *Mycosphaerella* (6.5%), *Teratosphaeria* (4.5%), *Fragum* (1.1%), *Sebacina* (11.3%) in seed, leaf, stem and root, respectively. The structure of the bacterial communities in the stem and leaf were similar, whereas the structure of the bacterial communities in the seed and other tissue were different. The structure of the fungi communities in the stem and seed were similar, whereas the structure of the fungi communities in the leaf and other tissue were different. [Conclusion] There was abundant endophytic microbial diversity in *Achnatherum inebrians*.

**Keywords:** endophyte, terminal restriction fragment length polymorphism, bacterial community, fungal community

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31060018)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-991-4521590; E-mail: loukai02@mail.tsinghua.edu.cn

Received: 13 March 2012/Revised: 26 May 2012

## 科学出版社新书推介(2012年8月)

### 实用生物统计学



顾志峰, 叶乃好, 石耀华; ISBN: 9787030347626; 定价: 58; 开本: 16; 装帧: 平装; 页码: 316; 专业分类: 生物医学、免疫学

**内容简介:**主要针对生命科学研究领域中的常见问题,以生物统计学的基础理论知识、试验资料的收集整理、资料的统计分析和试验设计为主线来安排主要内容。每章内容先以具体的科学问题引出相应的生物统计学问题,然后对其基本理论进行介绍,结合相应的统计软件(包括SPSS、DPS、Minitab、Excel等)对实际问题进行具体分析,同时采用截图法对具体使用的统计方法进行直观形象的介绍,最后结合专业知识对分析结果进行科学阐释。《实用生物统计学》的设计和编排使每位读者能够很清晰地理解每个问题的解题要领,科学合理地选用相应的统计软件来分析和解决实际问题,同时能够很直观、形象地掌握每种软件的使用方法和技巧。

订购方式 1: 网上购书

淘宝商城科学出版社旗舰店: <http://kxpbs.tmall.com/>

卓越亚马逊: <http://www.amazon.cn/>

当当网: <http://www.dangdang.com/>

京东图书: <http://book.360buy.com/>

订购方式 2: 电话购书

联系人: 科学出版社 贾海涛 13501022258 010-64017321

订购方式 3: 邮件购书

生物分社: [lifescience@mail.sciencep.com](mailto:lifescience@mail.sciencep.com); 贾海涛: [jiahaitao@mail.sciencep.com](mailto:jiahaitao@mail.sciencep.com)