

新疆野生胀果甘草内生细菌多样性的非培养初步分析

程晓燕^{1,2}, 李文军², 王芸², 杨红梅², 娄恺^{2*}

(¹石河子大学食品学院, 石河子 832003)

(²新疆特殊环境微生物实验室, 乌鲁木齐 830091)

摘要:【目的】了解新疆野生甘草内生细菌多样性, 为开发新的微生物资源奠定基础。【方法】采用改进的CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法提取新疆野生胀果甘草根部总DNA, 利用细菌16S rDNA基因通用引物对甘草总DNA进行16S rDNA基因扩增, 构建甘草内生细菌16S rDNA基因文库; 挑选具有不同酶切图谱的克隆进行测序、比对并构建16S rDNA基因系统发育树。【结果】构建的甘草内生细菌16S rDNA基因文库中, 150个克隆分属于32个不同的分类单元, Blast结果表明大部分克隆与已知细菌的16S rDNA基因序列相似性较高, 分别归属于变形菌门(Proteobacteria)的alpha、gamma亚群, 厚壁菌门(Firmicutes), 放线菌门(Actinobacteria), 拟杆菌门(Bacteroidetes)中的鞘脂菌属(*Sphingobium*)、叶杆菌属(*Phyllobacterium*)、生丝单胞菌属(*Hyphomonas*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)等14个属, 其中26%的克隆与已知细菌16S rDNA基因相似性小于96%, 可能代表新的分类单元。【结论】甘草内生细菌多样性丰富且存在尚未被认识的新物种。

关键词: 非培养法; 内生细菌; 胀果甘草; 生物多样性

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)06-0718-08

甘草是我国最常用的药材之一, 在制药、食品、化工和印染等方面都有广泛应用, 甘草也是一种耐旱、寒、热和盐碱性的固沙草本植物, 有重要的生态价值^[1]。胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 在新疆主要分布于天山南坡的哈密盆地、吐鲁番及塔里木盆地的河流两岸, 其根茎是甘草酸的主要原料^[2]。

近年来, 有研究表明植物内生菌有可能通过类似于根际促生菌的方式来促进植物生长并且抑制病害^[3]。研究甘草内生菌多样性, 有助于阐明其与甘草共生过程中的功能和潜在作用。国内主要集中在用可培养法对甘草内生细菌种类和分布进行研究, 国外未有相关报道。李文军等采用组织分离法和研磨分离法从甘草根中分离到60株内生细菌, 分属于9个属^[4]。宋素琴等从甘草的根中分离到107株内

生细菌, 分属于12个属^[2]。张敏等对内蒙古野生及栽培甘草内生细菌的多样性进行了初步研究, 从根、茎、叶分离到120株内生细菌, 与变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)中的19个已知属的16S rDNA基因相似性达到97%~100%, 主要优势种群为芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[5]。本文采用非培养法研究了新疆野生胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 根部内生细菌多样性, 对了解和保护甘草及开发新的微生物资源有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 2008年6月在新疆库尔勒紫泥泉

基金项目: 国家科技基础条件平台项目(2005DKA21201-12); 新疆特殊环境微生物实验室开放课题(XJYS0203-2005-05)

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

作者简介: 程晓燕(1981-), 女, 新疆人, 硕士研究生, 研究方向为生物技术与酶工程。E-mail: chengxiaoyan19810523@126.com

收稿日期: 2008-12-31; **修回日期:** 2009-02-12

甘草自然保护区(41°53'55"N, 86°22'22"E)采集胀果甘草完整植株, 无菌包装运回实验室。库尔勒属暖温带大陆性干旱气候, 总日照数 2990 h, 无霜期平均 210 d, 年平均气温 11.4℃, 最低为 -28℃, 年平均降水量 58.6 mm, 年最大蒸发为 2788.2 mm, 主导风向东北风, 土壤的物质组成主要以亚砂土和粉砂土为主。

1.1.2 主要试剂和仪器: PCR 仪为 Eppendorf AG 22331 Hamburg; PCR 引物、*Taq* DNA 聚合酶和 PMD18-T Vector 载体购自 TaKaRa 公司; 凝胶成像系统 GK-330C 购自美国联合生物科技有限公司。

1.2 甘草的表面消毒

将甘草的根用自来水冲洗干净, 再用无菌水冲洗 1 次; 在含有有效氯为 2.6% 的次氯酸钠溶液中浸泡 5 min, 再用 70% 乙醇浸泡 30 s, 无菌水淋洗 5 次, 在无菌条件下晾干; 同时取最后一次淋洗水 150 μ L 涂于 LB 平板上, 28℃ 培养 72 h, 检测表面灭菌效果。

1.3 甘草根部的总 DNA 的提取

采用改进的 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法^[6]: (1)将表面灭菌处理后的实验材料放入无菌研钵中, 适量添加液氮用力将甘草根组织研成粉末; (2)将粉末转移至无菌离心管中, 并按 1:9(W/V)的比例加入 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)颠倒混匀; (3)60℃ 水浴 45 min, 期间颠倒混匀数次; (4)加入等体积的氯仿: 异戊醇(24:1, V/V), 彻底混匀, 4℃, 15300 \times g 离心 10 min; (5)上清转移至一新的无菌离心管中, 重复步骤 4 一次; (6)将上清转移至一新的无菌离心管中, 加入 RNase(使用前 100℃ 煮沸 10 min 以灭活残留的 DNase)使终浓度达 50 μ g/ml, 37℃ 水浴 30 min; (7)加入等体积氯仿: 异戊醇(24:1, V/V), 彻底混匀, 4℃, 15300 \times g 离心 10 min; (8)上清转移至一新的无菌离心管中, 加入 2/3 体积预冷的异丙醇, 颠倒数次; 4℃, 15300 \times g 离心 5 min, 弃上清; (9)沉淀用 70% 乙醇洗涤脱盐, 离心, 弃上清; (10)干燥 DNA, 加适量无菌水溶解, -20℃ 保存备用。

1.4 16S rDNA 基因的 PCR 扩增

分别以制得的 DNA 和甘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 799f^[7]: 5'-AACAGGATTAGATACCCTG-3' 和 1492r^[8]: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系(25 μ L): 12.5 μ L Premix *Taq*, 0.5 μ L 引物(10 μ mol/L), 0.5 μ L DNA(100 ng), 11 μ L ddH₂O。

PCR 反应条件: 95℃ 4 min; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 8 min。

1.5 16S rDNA 基因文库的构建

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 PMD18-T Vector 载体连接, 转化 *E. coli* DH 5 α 感受态细胞。以氨苄青霉素(100 μ 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, 正向引物 47 5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'; 反向引物 48 5'-AGCGGATAACAATTTTCACACA GGA-3'。PCR 扩增条件: 95℃ 5 min; 95℃ 45 s, 53℃ 30 s, 72℃ 2 min, 共 30 个循环; 72℃ 5 min。通过电泳进一步验证插入的外源片段应大约为 730 bp 左右。

1.6 酶切分析及 16S rDNA 基因的序列测定

取 5 μ L 的 16S rDNA 基因的菌落 PCR 产物, 分别加入 1 μ L *Hae* III、2 μ L 相应的 10 \times Buffer 和 12 μ L 去离子灭菌水, 使反应体系为 20 μ L。37℃ 恒温放置 2~3 h。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生物技术有限公司进行直接测序(以 M13-47 为上游引物, M13-48 为下游引物)。

1.7 多样性指数分析

采用覆盖率(coverage value, C)、香农多样性指数(Shannon Diversity Index, H')、辛普森指数(Simpson Index, D)对 16S rDNA 基因克隆文库进行微生物多样性评价分析。C 值理论上表示 16S rDNA 基因克隆文库中所包含的微生物种类(OTU)占样品中全部微生物种类的比例。C = 1 - n1/N, N 代表 16S rDNA 克隆文库的库容, n1 代表在 16S rDNA 克隆文库仅出现一次的 OTU 的数量^[9]。香农多样性指数和辛普森指数的计算通过 Biodap(BIODIVERSITY DATA ANALYSIS PACKAGE)软件进行分析^[10]。

1.8 基于 16S rDNA 基因的系统发育树构建

通过 NCBI 的 VECTER SCREEN 去除测序所得的 16S rDNA 基因的载体片段, 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 基因序列, 用 CLUSTAL X 进行多序列比对^[11], 系统进化距离矩阵根据 Kimura 模型估算, 用 MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)软件包采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统进化树^[12]。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^[13]。本研究得到的序列已提交 GenBank 数据库, 登录号分别为 FJ1527525、FJ1527555 和 FJ1541182。

2 结果和分析

2.1 样品总 DNA 提取和 16S rDNA 基因的 PCR 扩增

提取的甘草根总 DNA 片段较为完整,基因组片段大于 10 kb(图 1-A)。通过细菌 16S rDNA 基因特异性 PCR 扩增,得到大小为 730 bp 左右的的目的片段,同时还扩增出 1200 bp 左右的片段,推测可能是甘草线粒体 18S rDNA 的部分序列,以甘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,如图 1-B。最后一次淋洗水 150 μ L 涂于 LB 平板上,28 $^{\circ}$ C 培养 72 h,无菌落生长。

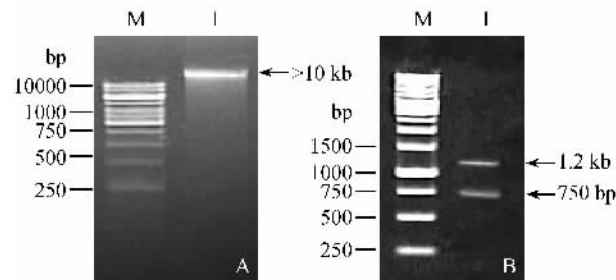


图 1 甘草基因组 DNA (A) 和甘草内生细菌 16S rDNA 的基因片段的 PCR 扩增结果(B)

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total DNA of Glycyrrhiza roots (A) and the results of 16S rDNA amplification (B). A: M.10 kb markerladder; Lane 1.Total DNA of Glycyrrhiza roots. B: M.10 kb markerladder; Lane 1.Glycyrrhiza roots products from PCR reaction.

2.2 16S rDNA 基因克隆文库阳性转化子的筛选与酶切分析

从所构建的 16S rDNA 基因文库中共选择了 150 个阳性克隆,用质粒上的通用引物进行菌落 PCR 扩增,扩增产物以六碱基限制性内切酶 *Hae* III 对大约



900 bp 的阳性克隆插入片段(包括载体片段)进行酶切。部分酶切图谱检测结果如图 2。

由图 2 可见酶切产物得到片段大小在 100 ~ 700 bp 之间,其总和都接近于未消化的 PCR 产物全长。得到了 42 个酶切图谱不同的克隆,进行外源 PCR 产物的直接测序。根据酶切图谱和克隆测序结果的不同,将 150 个克隆分为 32 个 OTUs。

2.3 基因文库多样性指数分析

采用 coverage value、Shannon Index、Simpson Index 进行克隆文库的细菌多样性评价分析。根据公式计算得到克隆文库的多样性指数。克隆文库包含 150 个克隆,覆盖率(coverage value)为 78.67%,有 32 种 16S rDNA 基因型(genotypes),香农多样性指数 H' 为 2.63,均匀度(evenness)为 0.76,辛普森指数 D 为 0.0128,基本可以代表本甘草样品的内生细菌多样性。

2.4 基于 16S rDNA 基因序列的系统发育分析

选择 16S rDNA 基因不同酶切带型所对应的阳性克隆进行测序,序列比对表明 150 个阳性克隆序列分属于细菌域的 4 个类群:变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)。分别属于 16 个科,鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae)、叶杆菌科(Phyllobacteriaceae)、生丝单胞菌科(Hyphomonadaceae)、根瘤菌科(Rhizobiaceae)、生丝微菌科(Hyphomicrobiaceae)、醋杆菌科(Acetobacteraceae)、红螺菌科(Rhodospirillaceae)、芽孢杆菌科(Bacillaceae)、食碱菌科(Alcanivoraceae)、军团菌科(Legionellaceae)、肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、诺卡氏菌科(Nocardiaceae)、Nocardioidaceae、Promicromonosporaceae、Microbacteriaceae、泉发菌科

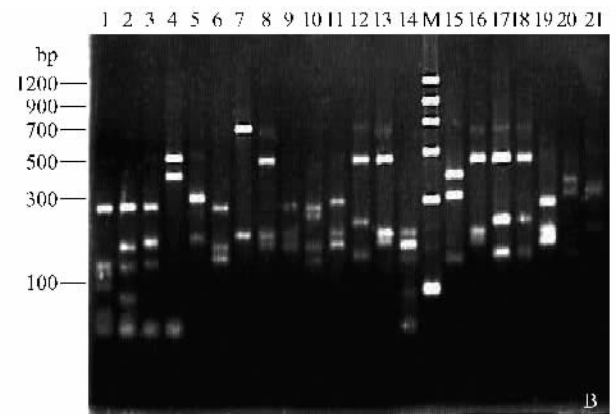


图 2 甘草内生细菌部分阳性克隆的 *Hae* III 酶切图谱

Fig.2 Partial positive clones of Glycyrrhiza roots from Xinjiang digested by *Hae* III. A: M.10 kb ladder marker; Lane 1-24. Restriction patterns of 16S rDNA gene digested by *Hae* III; B: M.10 kb ladder marker; Lane 1-21. Restriction patterns of 16S rDNA digested by *Hae* III.

(Crenotrichaceae)。文库中 74% 的克隆分别与鞘脂菌属(*Sphingobium*)、叶杆菌属(*Phyllobacterium*)、生丝单胞菌属(*Hyphomonas*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)等 14 个属的细菌 16S rDNA 基因相似性大于 96%; 有 17% 的克隆序列与 *Promicromonospora*、*Nocardia*、*Legionella* 和 *Novosphingobium* 属的细菌的相似性分别在 93% ~ 95% 之间; 还有约 9% 的克隆序列与非可培养细菌(Uncultured bacteria)的相似度较高, 结果表明甘草内生菌中还存在新的分类单元。变形杆菌门(Proteobacteria)是该克隆文库中的优势类群, 包含

了 79 个克隆, 占克隆文库的 53%; 而其中 α -proteobacteria 占克隆文库的 16%, γ -proteobacteria 的克隆最多, 为 55 个, 约占克隆文库的 37%。厚壁菌门是该克隆文库的第二大优势类群, 占克隆文库的 28%, 包含了 42 个克隆子, 这些克隆子与 *Bacillus* 的细菌序列相似性都大于 97%, 据此 *Bacillus* 为该克隆文库中的最优势菌属, 与张敏等对内蒙古野生及栽培甘草内生细菌研究结果相似。放线菌门的细菌占克隆文库的 6%。拟杆菌门的细菌占克隆文库的 4%。具体结果见表 1。

表 1 甘草内生细菌克隆的 16S rDNA 基因序列分析结果

Table 1 Distribution of 16S rDNA clones detected from endophytes in *Glycyrrhiza*

Group	No. of OTUs	No. of clones	Total clones/%	Closest NCBI match	Identity/%
Alpha-proteobacteria	10	24	0.16		
	xjgc-248	8	0.05	<i>Sphingomonas</i> sp. (AJ717392)	99
	xjgc-99	1	0.01	<i>Phyllobacterium</i> sp. (AJ968699)	100
	xjgc-207	1	0.01	<i>Phyllobacterium trifolii</i> (AY786080)	99
	xjgc-242	1	0.01	<i>Hyphomonas</i> sp. (AM990830)	98
	xjgc-170	2	0.01	<i>Novosphingobium</i> sp. TUT562 (AB177883)	95
	xjgc-140	1	0.01	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AFM2 (EU592041)	99
	xjgc-13	1	0.01	<i>Hyphomicrobium vulgare</i> ATCC 27500 (Y14302)	97
	xjgc-53	5	0.03	<i>Roseomonas genomospecies</i> ATCC 49960 (AY150049)	98
	xjgc-247	1	0.01	<i>Rhodospirillaceae bacterium</i> CL-UU02 (DQ401091)	96
	xjgc-40	3	0.02	<i>Tistrella</i> sp. Zp5 (DQ659596)	97
Low G + C Gram positive bacteria	2	42	0.28		
	xjgc-153	2	0.01	<i>Bacillus</i> sp. CSS-7 (DQ084468)	97
	xjgc-24	40	0.27	<i>Bacillus subtilis</i> PRE23 (EU880528)	100
Gamma-proteobacteria	8	55	0.37		
	xjgc-132	2	0.01	<i>Alcanivorax dieselolei</i> PR56-2 (EU440990)	96
	xjgc-5	3	0.02	Gamma-proteobacterium KA5-B gene (AB174844)	99
	xjgc-136	1	0.01	Gamma-proteobacterium (AB174846)	99
	xjgc-78	5	0.03	<i>Legionella spiritensis</i> (M36030)	93
	xjgc-186	3	0.02	<i>Alcanivorax dieselolei</i> (AY683537)	99
	xjgc-106	1	0.01	Bacterium m5 (DQ453814)	94
	xjgc-55	7	0.05	Gamma-proteobacterium Y-134 (AB096215)	93
	xjgc-86	33	0.22	<i>Serratia plymuthica</i> DSM 4540 (AJ233433)	99
High G + C Gram positive bacteria	4	9	0.06		
	xjgc-201	1	0.01	<i>Nocardia salmonicida</i> (Z46750)	94
	xjgc-258	2	0.01	<i>Aeromicrobium alkaliterrae</i> (AY822044)	99
	xjgc-196	3	0.02	<i>Promicromonospora sukumoe</i> (AB023375)	95
	xjgc-173	3	0.02	<i>Leifsonia</i> sp. wged11 (DQ473536)	97
Bacteroidetes	1	6	0.04		
	xjgc-88	6	0.04	<i>Chitinophaga terrae</i> Gsoil 238 (AB267724)	98
Uncultured bacteria	7	14	0.09		
	xjgc-174	7	0.05	Uncultured bacterium clone (AY945873)	96
	xjgc-160	1	0.01	Uncultured gamma-proteobacterium clone (EU979067)	93
	xjgc-36	1	0.01	Uncultured gamma-proteobacterium clone (AB252886)	97
	xjgc-64	1	0.01	Uncultured delta-proteobacterium clone (EU050856)	95
	xjgc-200	2	0.01	Uncultured alpha-proteobacterium clone Y270 (EU328098)	94
	xjgc-109	1	0.01	Uncultured bacterium clone (EF157264)	97
	xjgc-3	1	0.01	Uncultured organism clone (DQ395414)	90

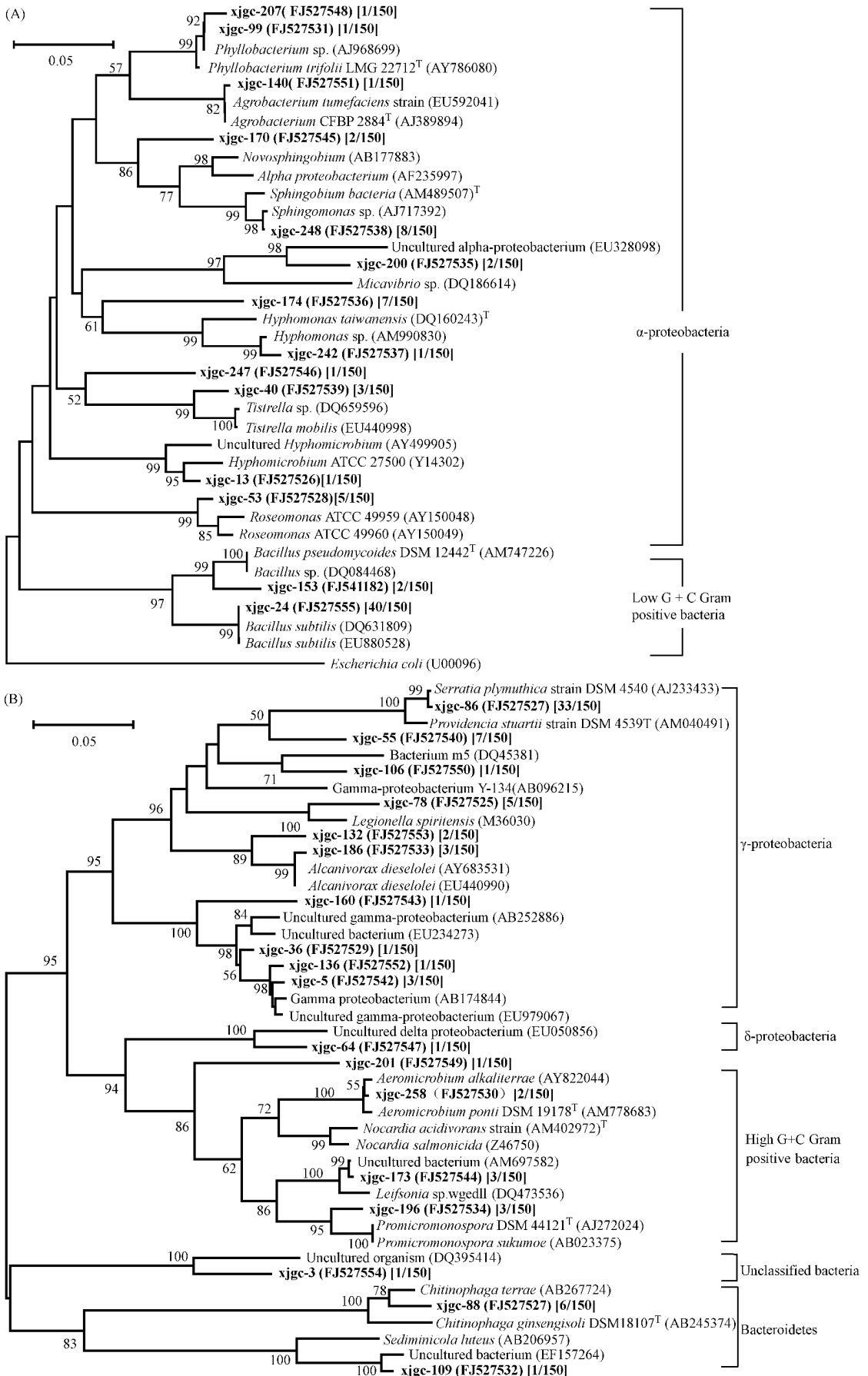


图 3 甘草根部内生细菌克隆文库中部分克隆的系统发育分析



3. 16S rDNA-based dendrogram showing the phylogenetic relationship of clones from *Glycyrrhiza* roots. Phylogenies were inferred using the neighbor-joining analysis. As out-group reference, sequences of *E. coli* are related to α -proteobacteria and Gram-positive bacteria. Trees were generated using MEGA 3. 1. Numbers in parentheses represent the sequence accession numbers in NCBI GenBank. Numbers in square brackets indicate the clone number out of the total clones. Numbers at branch points indicate bootstrap values above a 50% threshold. The scale bar represents a 5% estimated difference in nucleotide sequence. A- α -proteobacteria and Gram-positive bacteria. B- γ -proteobacteria, High G + C Gram positive bacteria and Bacteroidetes.

根据所获得的 16S rDNA 基因序列构建细菌系统发育树(图 3-A), 归属于 α -proteobacteria 类群的 24 个克隆序列与相应的已知细菌具有相近亲缘关系, 包括 10 个 OTUs。其中 8 个克隆序列与 *Sphingomonas* 属的细菌的序列相似性为 99%; 7 个克隆与 *Hyphomonas taiwanensis* (DQ160243^T) 聚为一簇, 和 Uncultured bacterium clone (AY945873) 序列相似性为 96%; 5 个克隆聚在 *Roseomonas* 簇, 与 *Roseomonas* ATCC 49959 (AY150048) 的序列相似性高达 98%; 3 个克隆与 *Tistrella* sp. (DQ659596) 的序列相似性为 97%; 各有 2 个克隆序列与叶杆菌属 *Phyllobacterium* 和 *Novosphingobium* 属的细菌序列相似性分别为 99% 和 95%。各有 1 个克隆序列与 *Agrobacterium*、*Hyphomonas* 和 *Hyphomicrobium* 属的细菌序列相似性都大于 97%; 1 个克隆序列与 *Rhodospirillaceae bacterium* CL-UU02 (DQ401091) 序列相似性为 96%, 聚在 *Tistrella* 一簇。 *Bacillus* 为该克隆文库中的最优势菌属, 42 个克隆序列与 *Bacillus* 属的细菌序列相似性都大于 97%。

γ -proteobacteria 是该文库中的最优势类群, 包含 55 个克隆, 代表了 8 个 OTUs。其中有 33 个克隆序列与沙雷氏属 *Serratia plymuthica* strain DSM 4540 (AJ233433) 的序列相似性高达 99%, 是该克隆文库中第二大优势菌属。有 7 个克隆序列与 γ -proteobacterium Y-134 (AB096215) 的序列相似性较低, 为 93%。5 个克隆序列与军团菌属 (*Legionella*) 的 *Legionella spiritensis* (M36030) 的序列相似性较低, 为 93%。5 个克隆序列与食碱菌属 (*Alcanivorax*) 的细菌序列相似性大于 96%。3 个克隆序列与 γ -proteobacterium (AB174844) 的序列相似性为 99%。1 个克隆序列分别于与未分类的 *Bacterium* m5 (DQ453814) (94%) 和 Uncultured γ -proteobacterium (EU979067) (93%) 的序列相似性低, 2 个克隆与未分类的 Uncultured γ -proteobacterium (AB252886) (97%) 和 γ -proteobacterium (AB174844) (99%) 序列相似性较高。1 个克隆序列与 Uncultured δ -

proteobacterium (EU050856) 的序列相似性为 97%。9 个克隆与放线菌门 (*Actinobacteria*) 系统发育关系密切, 其中的 3 个克隆序列与 *Promicromonospora* 属的细菌序列相似性为 95%, 还有 3 个克隆序列与 *Leifsonia* sp. wged11 和 Uncultured bacterium (AM697582) 的序列相似性分别为 97% 和 99%, 从系统发育树上可以推测它们归属于 *Leifsonia*。2 个克隆序列与 *Aeromicrobium* 属的细菌的序列相似性高达 99%, 1 个克隆序列与 *Nocardia* 属的细菌序列相似性为 94%。属于 Bacteroidetes 菌门的有 6 个克隆, 它们的序列与 *Chitinophaga* 属的细菌序列相似性为 98%。另有 1 个克隆序列与 Uncultured bacterium (EF157264) 的序列相似性为 97%, 聚在 *Sediminicola* 一簇, 推测其应归属于为拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 的黄杆菌纲 (*Flavobacteria*)。剩下 1 个克隆序列与未分类 Uncultured organism 的序列相似性较低, 为 94%。

3 讨论

在本研究中, 对 CTAB 法^[6]进行了改进, 得到的总 DNA 基因完整性较好。由于植物叶绿体 16S 和线粒体 18S rDNA 基因与细菌的 16S rDNA 基因高度同源, 因此在扩增植物内生细菌的 DNA 基因过程中, 选择合适引物以排除植物叶绿体和线粒体的干扰是非常关键的^[14]。Chelius^[7]、孙磊^[15]及邱服斌^[16]等, 先后将 799f-1492r 这对引物用于玉米、水稻和人参根部内生细菌 16S rDNA 基因克隆文库的构建, 取得了较好效果。据孙磊^[15]等推测, 在一定研究范围内, 799f-1492r 这对引物可作为非培养方法研究绿色植物内生细菌的通用引物。本研究表明, 这对引物也适用于构建甘草内生细菌的 16S rDNA 基因克隆文库。

内蒙古鄂尔多斯甘草内生细菌分别与变形菌门 (*Proteobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、放线菌门 (*Actinobacteria*) 3 类细菌中的 19 个已知属相似性达到 97% ~ 100%^[5], 而本克隆文库的内生菌除了包含上述菌门的细菌外, 还有 Bacteroidetes 门的细菌; 另

有 1 个克隆与 Uncultured δ -proteobacterium (EU050856) 的相似性为 97%, 说明 δ -proteobacteria 可能也存在于野生胀果甘草内生细菌 16S rDNA 基因克隆文库中, 由此可见新疆野生甘草内生细菌多样性较丰富。

在本克隆文库中, 变形菌门 (Proteobacteria) 为优势类群, 与其他植物 (水稻、玉米、人参和野生芥末根部或茎) 内生细菌^[6-14, 17] 的优势类群一致; γ -proteobacteria 为优势亚类群, 与水稻和人参根部的研究结果相同。在本克隆文库和药用人参内生细菌克隆文库中存在放线菌门的细菌, 但在水稻非培养内生细菌克隆文库中未发现。因此可推断, 作为药用植物, 甘草和人参内生细菌的类群比较相似。与水稻和人参根部 16S rDNA 基因克隆文库的优势菌属不同, 本研究为芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 与野生胀果甘草内生细菌可培养研究结果一致^[2, 4]。这可能与两者所处环境不同有关, 甘草生长在年降水量少、土壤含盐量高、温差大以及强光照等荒漠与半荒漠地带, *Bacillus* 属的细菌更加适应这种生境^[1]。本克隆文库中有 4 个属的细菌属于放线菌门, 而在甘草内生细菌的可培养研究都没有得到过放线菌门的细菌培养物^[2, 4]; 系统发育分析表明有 9% 的克隆与不可培养的细菌具有较高相似性, 还有一些克隆与已知的可培养细菌相似性较低, 这说明甘草内生细菌种群中存在着丰富的未培养、或存活的但不可培养的细菌, 因此非培养法具有巨大的优势, 可以更全面的反映甘草内生细菌种群的多样性。

本研究结果表明, 相对于培养方法, 非培养方法得到的甘草内生细菌群落多样性要丰富许多。

参考文献

- [1] 孟宪泽, 苏永华, 朱德增. 科学利用甘草, 保护我国生态环境和药材资源. *中西医结合学报 (Journal of Chinese Integrative Medicine)*, 2006, 4(6): 556 – 559.
- [2] 宋素琴, 欧提库尔·玛合木提, 张志东, 等. 新疆胀果甘草内生菌的分离和鉴定. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2007, 34(5): 867 – 870.
- [3] Feng Y, Shen D, Song W. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100: 938 – 945.
- [4] 李文军, 郑素慧, 毛培宏, 等. 新疆胀果甘草内生菌的分离及产甘草酸菌株的筛选. *生物技术 (Biotechnology)*, 2008, 18(5): 28 – 31.
- [5] 张敏, 沈德龙, 饶小丽, 等. 甘草内生细菌多样性研究. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2008, 35(4): 524 – 528.
- [6] 邱服斌. 培养方法与非培养方法对人参根内生细菌的研究. 首都师范大学博士论文, 2007.
- [7] Chelius MK, Triplett EW. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbial Ecology*, 2001, 41: 252 – 263.
- [8] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. //Stackebrandt E, Goodfellow W. ed. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester: J. Wiley and Sons, 1991, 115 – 175.
- [9] Good IL. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 1953, 40: 237 – 264.
- [10] 雷娟丽. 蔬菜土壤生态系统微生物分子生态学研究. 浙江大学博士论文, 2006.
- [11] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24(4): 876 – 488.
- [12] 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.
- [13] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, 39: 783 – 791.
- [14] 孙磊. 非培养方法和培养方法对水稻内生细菌和根结合细菌的研究. 首都师范大学博士论文, 2006.
- [15] Sun L, Qiu F, Zhang X, et al. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology*, 2008, 55: 415 – 424.
- [16] Qiu F, Huang Y, Sun L, et al. *Leifsonia ginsengi* sp. nov., isolated from ginseng root. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57: 405 – 408.
- [17] Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, et al. A bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 2667 – 2677.

Endophytic bacterial diversity in *Glycyrrhiza inflata* Bat. from Xinjiang by culture-independent method

Xiaoyan Cheng^{1,2}, Wenjun Li², Yun Wang², Hongmei Yang², Kai Lou^{2*}

(¹ College of Food Science, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

(² The Key Lab of Microbiology in Xinjiang Specific Environment, Urumqi 830091, China)

Abstract: [Objective] We investigated endophytic bacterial diversity in *Glycyrrhiza inflata* Bat. from Xinjiang. [Methods] We investigated endophytic bacterial diversity in root of *Glycyrrhiza inflata* Bat. from Xingjian by culture-independent method. Total DNA genome of *Glycyrrhiza* sample was extracted using CTAB (Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide) procedure with some modifications. A pair of bacterial PCR primers were used for endophytic bacterial 16S rDNA gene amplification and a clone library was constructed for the *Glycyrrhiza* DNA samples. Clones screened from clone library on the basis of *Hae* III digestion patterns were sequenced and compared, flowed by constructing Neighbor-Joining tree. [Results] In total 150 clones were grouped to 32 operational taxonomic units, most of the clones showed high similarity to the known cultured bacteria. Sequence analysis revealed diverse phyla of bacteria in the 16S rDNA library, which consisted of alpha, gamma subclasses of the Proteobacteria, Bacteroides, Firmicutes, Actinobacteria, and Uncultured bacteria; 74% of the clones were highly related to the known bacteria in the genus *Sphingobium*, *Phyllobacterium*, *Hyphomonas*, *Agrobacterium* etc (> 96% sequence similarity); whereas 26% of the clones showed lower affiliation with known genus (< 96% sequence similarity) and may represent novel taxa. [Conclusion] There was abundant endophytic bacterial diversity in *Glycyrrhiza inflata* Bat. from Xinjiang as well as many unknown organisms.

Keywords: culture-independent; endophytic bacterial; *Glycyrrhiza inflata* Bat.; biodiversity

(本文责编: 张晓丽, 谷志静)

Supported by the Project of China National Science and Technology Platform(2005DKA21201-12) and the Open Project of the Key Lab of Microorganisms in Xinjiang Specific Environment (XJYS0203-2005-01)

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

Received: 31 December 2008/Revised: 12 February 2009

《微生物学报》答作者问——关于审稿

问: 贵刊的审稿程序是怎样的? 一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答: 我们的承诺是争取在 2 个月之内给予答复, 5~7 个月之内刊出。

- (1) 收到来稿后, 首先将请 2 位专家进行初审, 再送主编进行最后的总审, 这个过程一般不会超过 2 个月。如果初审的 2 位专家的意见分歧较大, 编辑部将再请第 3 位专家进行初审, 之后再送主编总审, 那么此稿的审理时间可能会超过 2 个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见), 编辑会给出作者发出 e-mail 告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的), 作者在返回修改稿后经本刊审核合格后方可被录用。在此提醒作者不要在远程系统中看到初审意见时就急于修改稿件。

问: 如我的投稿没有被贵刊录用, 是否告知退稿原因? 对退稿有异议怎么办?

答: 本着对每一篇投稿负责的原则, 本刊一贯遵循三审制的制度, 即: 编辑部内审、专家初审、主编总审。所以无论录用和退稿, 都会给作者一份比较全面的审稿意见。

- (1) 对于每一篇退稿, 我们都会详细写明退稿原因, 为您进一步修改论文提供帮助。
- (2) 如您对退稿意见有异议, 可以给我们写信表明看法, 本刊将请专家予以复审。

问: 我可否指定审稿人, 或言明请某审稿人回避?

答: 您在投稿时可以附上您推荐的审稿人名单, 或请予回避的审稿人名单, 供编辑部参考, 但编辑部是否采纳将视具体情况而定。