

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.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.05.029

Illumina MiSeq 高通量测序分析核桃内生细菌多样性

陈泽斌^{1,2}, 李 冰³, 王定康⁴, 余 磊¹, 徐胜光¹, 任 祺¹, 靳 松¹, 张永福¹, 彭声静¹

(1. 昆明学院农学院, 云南 昆明 650214; 2. 云南省都市特色农业工程技术研究中心, 云南 昆明 650214; 3. 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223; 4. 昆明学院生命科学与技术系, 云南 昆明 650214)

摘要: 应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术测定核桃内生细菌的 16S rDNA-V4 变异区序列, 使用 Uparse 等软件整理和统计样品序列数目和操作分类单元(OTUs)数量, 分析内生细菌的丰度和 α -多样性。获得了用于分析的有效序列 63 183 条, OTU 数为 103。稀释曲线表明测序深度充分, OTU 数量接近于饱和。核桃样品的 Chao1 指数为 105.143, Shannon 多样性指数为 1.823。核桃内生细菌主要分布于鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*, 27.27%)、盐单胞菌属(*Halomonas*, 27.27%)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*, 45.45%), 这 3 个属是核桃内生细菌优势菌属。

关键词: Illumina MiSeq; 高通量测序; 核桃; 内生细菌; 多样性

中图分类号: S664.143.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)05-1129-05

Diversity of endophytic bacteria in walnut analyzed by Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology

CHEN Ze-bin^{1,2}, LI Bing³, WANG Ding-kang⁴, YU Lei¹, XU Sheng-guang¹, REN Zhen¹, JIN Song¹, ZHANG Yong-fu¹, PENG Sheng-jing¹

(1. College of Agriculture, Kunming University, Kunming 650214, China; 2. Engineering Research Center for Characteristic Agriculture of Yunnan Province, Kunming 650214, China; 3. Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 4. Department of Life Science and Technology, Kunming University, Kunming 650214, China)

Abstract: In this study, the species abundance and alpha diversity of walnut endophytic bacteria were analyzed by Illumina MiSeq high-throughput sequencing of the 16S rDNA-V4 region. Softwares such as Uparse, Flash, and Qiime were employed to sort and calculate the number of sequences and operational taxonomic units (OTUs). The numbers of effective

sequences and OTUs for each sample were 63183 and 103, respectively. The rarefaction curves showed that adequate sampling was achieved, and the number of OTUs was close to saturation. Majority of the endophytic bacteria belonged to *Sphingomonas* (27.27%), *Halomonas* (27.27%) and *Agrobacterium* (45.45%) which were therefore the dominant bacterial families in walnut. Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology provided more accurate and scientific data resources for the study of endophytic bacteria.

Key words: high-throughput sequencing; walnut; endophytic bacterium; diversity

收稿日期: 2015-04-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(41361056); 云南省教育厅科学研究项目(2014Y390); 云南省都市型休闲农业工程技术研究中心项目(XXNY1402); 昆明学院大学生科学研究项目(XJD15054); 云南省高校优势特色重点学科(生态学)建设项目

作者简介: 陈泽斌(1985-), 男, 云南昆明人, 博士, 副教授, 主要从事环境微生物的教学及科研工作。(Tel) 18687102882; (E-mail) zbchenkmu@163.com

通讯作者: 李 冰, (Tel) 18987895038; (E-mail) libing@mail.kiz.ac.cn

关于植物内生细菌,现已从多种健康植物的根、茎、叶、果实、种子中分离出包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌共计 129 种(隶属于 54 个属)^[1]。植物内生细菌的优势种主要分布于假单胞属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)4 个属^[2],研究较系统的植物有棉花、小麦和花生^[3]。迄今还未发现不存在内生细菌的植物种类或器官。

核桃,又称胡桃、羌桃,为胡桃科植物,与扁桃、腰果、榛子并称为世界著名的“四大干果”,被誉为“万岁子”、“长寿果”^[4-7]。核桃中 86% 的脂肪是不饱和脂肪酸,富含铜、镁、钾、维生素 B6、叶酸和维生素 B1,也含有纤维、磷、烟酸、铁、维生素 B2 和泛酸,能破血祛瘀、润燥滑肠,并能防癌抗癌、补脑^[8]。中国核桃的分布很广,主要产区在云南、陕西、山西、四川、河北、甘肃、新疆、安徽等省(区)。

已有研究结果表明植物内生细菌的种类组成随植物的品种、生长期、器官的不同而异^[9]。目前关于核桃内生菌多样性的研究均采用传统培养方法,研究的部位集中于核桃植株的根、茎、叶^[10-11],而对于可供食用的部分——核桃仁这一器官的内生细菌研究未见报道。本研究拟采用 Illumina MiSeq 第二代测序技术对核桃仁内生细菌种类组成进行分析,该方法相较于传统的纯培养及以 16S rDNA 为基础的非培养方法,能够产生覆盖深度更大的数据量,检测到纯培养和非培养技术未能发现的低丰度植物内生细菌种类,为丰富植物微生物生态学理论及基因工程菌的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品来源

供试材料为云南省林业科学院经济林研究所提供的核桃品种(无性系)——细香核桃。

1.2 样品消毒

将新鲜核桃仁用自来水冲洗干净后用 75% 的乙醇浸泡 1 min,无菌水冲洗 3 次,用无菌滤纸吸干表面水分。消毒效果检验参照文献^[12]。

1.3 核桃仁总 DNA 提取

按参考文献^[13]的方法提取核桃仁总 DNA,并用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 的纯度和浓度。取适量的样品于离心管中,使用无菌水稀释样品至 1 ng/ μ l。

1.4 16S rDNA-V4 区的 PCR 扩增

以稀释后的基因组 DNA 为模板,使用带 Barcode 的 16S rDNA-V4 区特异引物 515F(5'-GTTTCG-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 806R(5'-GAT-CAGGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),并用高效和高保真酶(New England Biolabs 公司的 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer)进行 PCR,确保扩增效率和准确性。

1.5 PCR 产物的混样和纯化

PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,目的条带用 Qiagen 公司提供的胶回收试剂盒回收产物。

1.6 文库构建和测序

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 QPCR 定量,合格后使用 Miseq 测序^[14-17]。测序委托北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成。

1.7 生物信息学分析

测序得到的原始数据存在一定比例的干扰数据,为了使信息分析的结果更加准确、可靠,首先对原始数据用 FLASH 软件拼接、Qiime 软件过滤、UCHIME Algorithm 软件去除嵌合体后,得到有效数据(Effective tags)^[18],剔除宿主叶绿体和线粒体序列,然后用 Uparse 软件对有效数据在 97% 水平上进行操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)聚类,并利用 Greengene 数据库进行物种注释^[19],利用 Mothur 软件做稀释曲线分析,通过对 OTUs 进行丰度和 α -多样性分析,得到微生物群落结构组成^[20-22]。

2 结果与分析

2.1 序列长度分布

在核桃仁样品总 DNA 的 16S rDNA V4 区中测得的 63 190 条序列,双末端读长(PE, Paired-end reads)分布在 189 ~ 359 bp 范围内,长度为 249 bp 的序列最多,有 62 621 条(表 1)。从序列长度的分布来看,与 16S rDNA-V4 区序列长度大致吻合。

2.2 OTUs 数目统计及物种注释分析

核桃仁样品总 DNA 的 16S rDNA V4 区中共测得 63 183 条标记(Tags,过滤后得到的拼接序列数),分为 103 个 OTUs(97% 的序列相似性),包括 61 980 条获得分类信息的标记,1 203 条低频标记(图 1),被注释到 11 个属(表 2)。从 OTUs 丰度聚类图(图 2)来看,相对丰度为土壤杆菌属(*Agrobacterium*)>鞘

氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) = 盐单胞菌属 (*Halomonas*)。

表 1 核桃仁内生细菌 16S rDNA V4 区序列长度的数量分布
Table 1 Distribution of sequence length of 16S rDNA V4 region of endophytic bacteria in walnut kernel

长度 (bp)	数量
189	5
199	10
209	5
219	15
229	28
239	105
249	62 621
259	9
269	1
279	0
289	234
299	59
309	20
319	58
329	4
339	14
349	2
359	0
共计	63 190

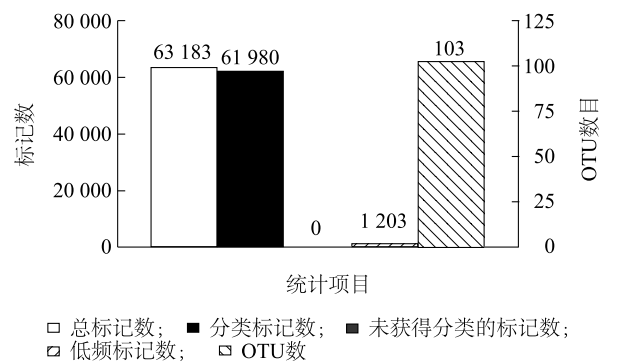


图 1 样品中内生细菌序列的标记和 OTUs 的数目
Fig. 1 The quantities of tags and OTUs of endophytic bacteria in the sample

表 2 核桃仁内生细菌 16S rDNA 序列各分类水平上的序列数目
Table 2 Sequence number at each classification level of 16S rDNA of endophytic bacteria in walnut kernel

样品名	界	门	纲	目	科
核桃仁内生细菌	61 980	61 972	61 964	61 959	16 180

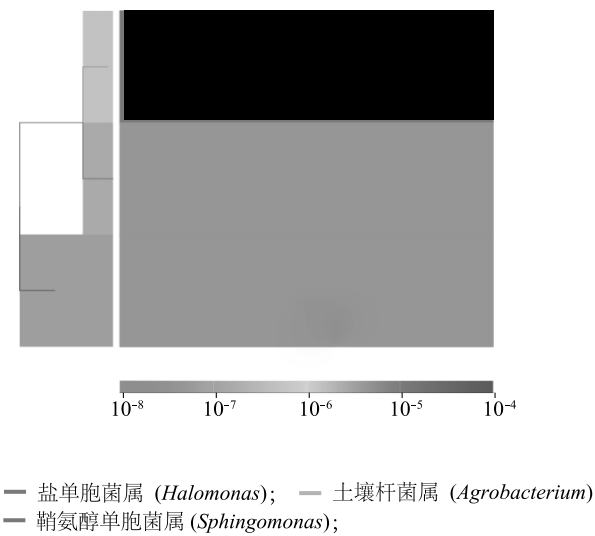


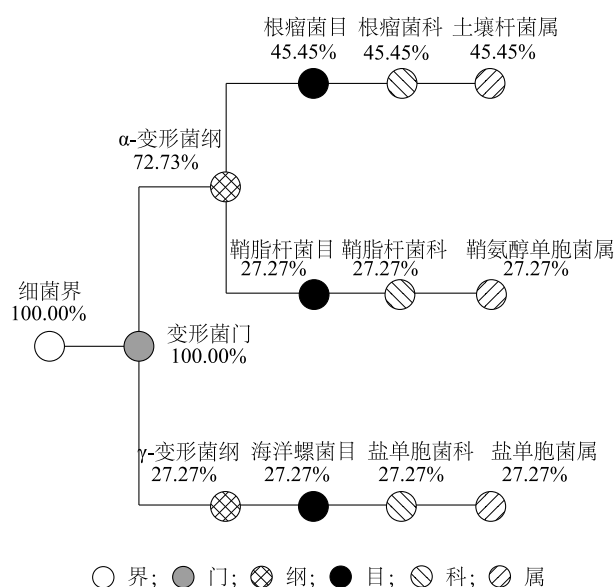
图 2 核桃仁内生细菌 16S rDNA 序列 OTUs 丰度聚类图
Fig. 2 Abundance clustering of OTUs of 16S rDNA of endophytic bacteria in walnut kernel

2.3 样品中内生细菌物种分类树

从门的分类水平看,核桃仁内生细菌主要分布在变形菌门(Proteobacteria);从纲的分类水平看,核桃内生细菌在 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria, 27.27%)、 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria, 72.73%)中均有分布;从目的分类水平看,核桃内生细菌在鞘脂杆菌目(Sphingobacteriales, 27.27%)、根瘤菌目(Rhizobiales, 45.45%)、海洋螺菌目(Oceanospirillales, 27.27%)中均有分布;从科的分类水平看,核桃内生细菌在根瘤菌科(Rhizobiaceae, 45.45%)、鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae, 27.27%)、盐单胞菌科(Halomonadaceae, 33.33%)中均有分布;从属的分类水平看,核桃内生细菌在鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*, 27.27%)、盐单胞菌属(*Halomonas*, 27.27%)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*, 45.45%)中均有分布。由此可见,鞘氨醇单胞菌属、盐单胞菌属、土壤杆菌属是核桃内生细菌的优势种群(图 3)。

2.4 α -多样性分析

随着测序数量的增加,稀释曲线(图 4)、Chao1 指数曲线(图 5)、Shannon 指数曲线(图 6)的斜率在 0 ~ 10 000 的测序数量范围内逐渐上升,后趋向平坦并进入平台期,说明再增加测序数量也不会产生新的 OTU,也表明本研究测序数据量足以反映样品中绝大多数的微生物信息。



数字表示该分类所占比例。

图3 核桃仁中内生细菌的分类

Fig. 3 Classification of endophytic bacterial species in sample walnut kernel

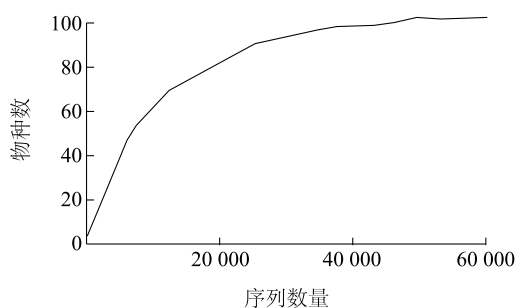


图4 稀释曲线

Fig. 4 Rarefaction curve

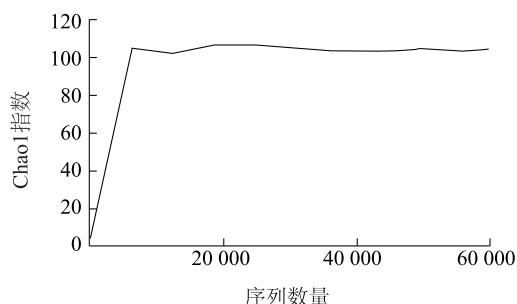


图5 Chao1 指数曲线

Fig. 5 Chao1 index curve

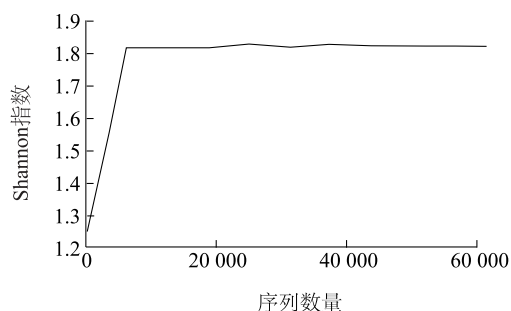


图6 Shannon 指数曲线

Fig. 6 Shannon index curve

3 讨论

16S rDNA 很早就应用在微生物菌种鉴定上,但利用高通量测序进行 16S rDNA 分析最早出现在 2006 年, Sogin 等^[22]应用该技术对深海微生物群落进行了分析,随后该技术在肠道微生物领域得到了广泛应用^[23]。目前该技术应用于植物内生微生物的研究尚未见报道。本研究首次将近几年迅速发展并成为主流的 Illumina MiSeq 第二代测序技术应用于植物内生细菌研究,克服了传统分子生物学方法通量低的缺陷,从基因组水平上解析微生物群落结构,突破了很多厌氧内生微生物尚不能被分离培养的技术瓶颈^[24-25],检测到以往没有检测到的同样扮演着重要角色的低丰度植物内生细菌种类,丰富了植物内生细菌资源,更准确地反映了植物内生微生物中不同丰度菌群的组成和比例。

就植物组织而言,叶绿体和线粒体与细菌在系统发育上具有高度的同源性^[26]。在对核桃内生细菌的 16S rDNA-V4 变异区序列进行 Illumina MiSeq 高通量测序后,发现部分序列归属于宿主叶绿体和线粒体,存在一定比例的宿主污染现象,为了使细菌多样性的分析结果更加准确、可靠,本研究剔除了宿主叶绿体和线粒体序列。但本研究只选择了 16S rDNA-V4 区作为测序区域,未来研究应在不同高通量测序平台上评估样品的复杂程度以及宿主的污染情况,选择合理的测序区域或设计特异性更高的引物,制定更好的测序策略,以避免线粒体和叶绿体的干扰。

第一代 Sanger 测序由于其读长长、准确率高,能根据测得的全长 16S rDNA 序列注释到种,但第一代 Sanger 测序通量较低,大规模测序成本高。Illumina MiSeq 高通量测序技术,一般每个样品可以

保证测定40 000 ~ 60 000个序列数,覆盖深度非常大,对物种多样性的分析十分有利,但是高通量测序读长短,不可能将16S rDNA的9个可变区全部测序,所以往往只选择1~3个可变区作为测序区域,单端测序长度为250 bp,双端测序长度为500 bp,测序片段越短,后续对序列进行物种注释时的分辨率越低,只能将内生细菌注释到属的分类水平。

本研究发现核桃内生细菌主要分布于鞘氨醇单胞菌属、盐单胞菌属、土壤杆菌属,这3个属是核桃内生细菌优势菌属。已有研究结果表明,鞘氨醇单胞菌属细菌的底物广泛,从多环芳烃类化合物、聚乙烯醇等高聚物到简单无机物氮都能利用,某些种属还能产生有价值的生物高分子(如 β -胡萝卜素、结冷胶)^[27]。说明核桃内生细菌可为复杂有机物的降解提供良好的微生物来源。目前关于盐单胞菌属细菌功能、代谢的研究尚未见报道,其作为内生细菌的主要类群尚属首次报道,未来应进一步加强对其功能和代谢的研究。

参考文献:

- [1] 赵旭,常思静,景春娥,等. 我国植物内生菌研究进展[J]. 中国沙漠, 2010, 30(1): 87-91.
- [2] 徐亚军. 植物内生菌资源多样性研究进展[J]. 广东农业科学, 2011(24): 149-152.
- [3] 胡桂萍,郑雪芳,尤民生,等. 植物内生菌的研究进展[J]. 福建农业学报, 2010, 25(2): 226-234.
- [4] 王伟,翟梅枝,徐文涛,等. 核桃内生菌研究 I 核桃内生菌的分离及代谢产物活性研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(1): 77-81.
- [5] 高美娟,任建军,师光禄,等. 核桃青皮复配营养液对设施草莓的杀螨及营养效果[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(6): 1320-1325.
- [6] 刘广勤,俞卫东,曹仁勇,等. 薄壳山核桃食药价值及加工利用研究进展[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(12): 306-303.
- [7] 李丽,翟梅枝,杨惠,等. 核桃叶部内生真菌发酵产物抑菌活性及 GC-MS 分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 292-295.
- [8] 李晓红,傅本重,麻春花,等. 不同表面消毒方法对核桃叶内生菌分离效果的比较[J]. 中国农学通报, 2012, 28(28): 163-168.
- [9] 高智辉,翟梅枝,王云果,等. 核桃内生真菌的分离鉴定[J]. 西北林学院学报, 2012, 27(5): 121-123.
- [10] 李丽,翟梅枝,杨惠,等. 核桃内生真菌 G3 的分子鉴定及其生物学特性研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(10): 35-39.
- [11] 王建文,陈华红,段亚霞,等. 楚雄核桃内生真菌分离及抗菌活性研究[J]. 楚雄师范学院学报, 2013, 28(3): 70-75.
- [12] 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.
- [13] 陈泽斌,夏振远,雷丽萍,等. 非培养方法解析烟草根部内生细菌的群落结构[J]. 华北农学报, 2012, 27(1): 201-209.
- [14] CAPORASO J G, LAUBER C L, WALTERS W A, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(Suppl 1): 4516-4522.
- [15] YOUSSEF N, SHEIK C S, KRUMHOLZ L R, et al. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(16): 5227-5236.
- [16] HESS M, SCZYRBA A, EGAN R, et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen[J]. Science, 2011, 331(6016): 463-467.
- [17] LUO C, TSEMENTZI D, KYRPIDES N, et al. Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample[J]. PloS One, 2012, 7(2): e30087.
- [18] EDGAR R C, HAAS B J, CLEMENTE J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194-2200.
- [19] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [20] WANG Q L, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [21] DESANTIS T Z, HUGENHOLTZ P, LARSEN N, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(7): 5069-5072.
- [22] SOGIN M L, MORRISON H G, HUBER J A, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored 'rare biosphere'[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(32): 12115-12120.
- [23] 南春燕,马雅军,徐建农,等. 中华按蚊幼虫肠道细菌宏基因组的组成研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2013, 31(2): 114-119.
- [24] THOLOZAN J L, CAPPELIER 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.
- [25] 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.
- [26] 胡楷,吴庆书. 单细胞生物进化研究的进步[J]. 遗传, 2002, 24(1): 104-110.
- [27] 胡杰,何晓红,李大平,等. 鞘氨醇单胞菌研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(3): 431-437.

(责任编辑:孙宁)