

红豆杉免培养内生细菌多样性的初步研究

张晶晶¹ 兰阿峰^{1,2} 邓百万^{1,2*} 陈文强^{1,2} 孔亚男¹

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院 陕西 汉中 723001)

(2. 陕西省食药菌工程技术研究中心 陕西 汉中 723001)

摘要: 【目的】了解红豆杉(*Taxus chinensis*)内生细菌的组成及多样性。【方法】提取红豆杉组织总 DNA, 选用细菌通用引物 799F 和 1492R 对总 DNA 进行 16S rDNA 特异性扩增, 构建红豆杉内生细菌 16S rDNA 克隆文库, 对阳性克隆进行 PCR-RFLP (限制性内切酶片段长度多态性)分析, 并对酶切带谱不同的菌液进行测序, 构建系统发育树。【结果】根据酶切带谱分析和测序结果的不同, 将随机挑取的 158 个阳性克隆归为 26 个不同的可操作分类单元(OUTs), 系统发育分析表明这些克隆序列分别属于变形菌门(Proteobacteria, 包含 Alpha、Beta、Gamma、Delta 亚群)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes) 4 个门。其中, 变形菌门(Proteobacteria, 占克隆总数的 58.86%)为最优势类群。序列比对结果表明这些克隆序列分别与已报道的 20 个属具有较高的相似性。此外, 还有一个 OUTs 在系统发育树上形成独立分支且未能确定其分类。【结论】红豆杉内生细菌多样性丰富, 并且可能存在新的分类单元。

关键词: 免培养, 红豆杉, 内生细菌, 多样性

基金项目: 陕西省重点实验室项目(No. 08JZ21); 陕西省教育厅项目(No. 08JK248, 08JK244)

*通讯作者: ✉: Dengbw2008@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-07-26; 接受日期: 2012-10-09

Culture-independent analysis of endophytic bacterial diversity in *Taxus chinensis*

ZHANG Jing-Jing¹ LAN A-Feng^{1,2} DENG Bai-Wan^{1,2*}

CHEN Wen-Qiang^{1,2} KONG Ya-Nan¹

(1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001, China)

(2. Shaanxi Engineering Research Center of Edible and Medicated Fungi, Hanzhong, Shaanxi 723001, China)

Abstract: [Objective] We investigated the composition and diversity of endophytic bacterial in *Taxus chinensis*. [Methods] The composition and diversity of endophytic bacterial in *Taxus chinensis* were analyzed by culture-independent method. When total community DNA were extracted, a pair of bacterial PCR primers were used for endophytic bacterial 16S rDNA gene amplification and a clone library was constructed for the *Taxus chinensis* DNA samples. Positive clones were analyzed by PCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and the clones with unique patterns were selected for sequencing and constructing 16S rRNA gene phylogenetic tree. [Results] Based on *Hae* III digestion and sequencing result, a total of 158 positive clones that randomly screened from the library were fall into 26 operational taxonomic units (OTUs). These clone sequences were divided into 4 phyla with phylogenetic analysis, which consisted of Alpha, Beta, Gamma and delta subclasses of the Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria and Bacteroidetes, of which Proteobacteria accounting for 58.86% of the total number of clones was the absolutely dominant group. Sequence alignment showed these clone sequences have high similarities with 20 genus that had been reported. In addition, one OUTs on phylogenetic tree is independent and failed to determine its classification. [Conclusion] *Taxus chinensis* harbors a diversity endophytic bacterial and maybe existence new taxon.

Keywords: Culture-independent, *Taxus chinensis*, Endophytic bacterial, Biodiversity

植物内生细菌是指能够从表面消毒后的植物组织内分离到或者从植物内提取到, 并且对植物不造成可见危害的细菌^[1]。自 Strobel 等^[2]首次从短叶紫杉(*Taxus brevifolia*)中分离得到一株产紫杉醇的内生真菌起, 植物内生菌的研究受到了普遍重视与广泛开展, 药用植物内生细菌已成为近年微生物资源研究的一个热点^[3]。

几十年来, 对于植物内生细菌的研究一直沿用传统的微生物培养和分离技术, 而许多研究已证实, 通过传统的分离方法鉴定的微生物只占环境微生物总数的 0.1%–10%^[4]。近年来, 基于 rRNA 基因分析的免培养技术开始应用植物内生细菌的研究, 通过 DNA 水平上的研究, 直接探讨内生细菌多样性和种群结构, 一定程

度上克服了传统培养的欠缺^[5];其主要应用在大豆^[6]、水稻^[7]、马铃薯^[8]、春兰^[9]、人参^[10]、醉马草^[11]和甘草^[12]等少数被子植物内生细菌及动态研究。目前,构建细菌 16S rDNA 文库也成为研究植物内生细菌多样性的一个主要趋势。Ikeda 等^[6]利用细胞富集法构建的大豆茎内生细菌 16S rDNA 克隆文库中包括变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes) 4 个类群的 72 个 OTUs,提供了大豆茎内生细菌多样性最综合的数据。Birgit 等^[13]利用免培养方法构建野花 *Crocus albiflorus* 16S rDNA 克隆文库包含假单胞菌属(*Pseudomonas*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)等 13 个属,而纯培养法仅得到芽孢杆菌属(*Bacillus*)一个属。因此,构建 16S rDNA 克隆文库大大地增加了人们检测和鉴定植物中不可培养微生物的能力,极大地丰富了微生物资源库^[9]。

红豆杉(*Taxus chinensis*)又名紫杉、赤柏松,为红豆杉科(Taxaceae)红豆杉属(*Taxus*)植物,是含有抗癌药物紫杉醇的珍稀裸子植物^[14]。目前,有关红豆杉内生菌的研究主要采用传统的分离培养方法,并集中在内生真菌方面,免培养法研究其内生细菌也鲜有系统报道。本文通过免培养法构建红豆杉内生细菌 16S rDNA 克隆文库研究红豆杉内生细菌的组成及多样性,以期为深入研究红豆杉内生细菌生态系统的功能微生物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料: 红豆杉(*Taxus chinensis*)采自陕西省留坝县野生植株。将根、茎截取后与叶分别装于密封的食品保鲜袋中,于-70℃冰箱冻存。

1.1.2 主要仪器和试剂: 凝胶扫描成像系统(Gel Doc, 美国 Bio-Rad 公司)、高速冷冻离心机

(Centrifuge 5424R, 德国 Eppendorf 公司)、PCR 扩增仪(Mycycler, 美国 Bio-Rad 公司)、核酸测定仪(Bio Photometer plus, 德国 Eppendorf 公司)、移液器系列(Eppendorf, 德国 Eppendorf 公司); Sanprep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、PCR 产物快速克隆试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、PCR 引物、X-gal、IPTG 等均购自上海生工。

1.2 红豆杉内生细菌 16S rDNA 克隆文库的构建

1.2.1 材料表面消毒: 取新鲜材料,用无菌手术刀片轻轻刮去表皮上的污物及损伤部位,并裁成合适大小,用自来水淋洗样品表面 2 h,吸水纸吸干水分。表面消毒:分别取等量根、茎、叶,75% 乙醇浸泡 30 s,无菌去离子水冲洗,之后浸泡在 0.1% HgCl₂ 中 5 min,无菌去离子水冲洗 5 次,最后一次同时用超声波处理 5 min^[15],无菌滤纸吸干水分。取最后一次冲洗的无菌水一部分分别涂布 LB 平板,28℃倒置培养 72 h;剩余部分作为 PCR 模板,用于检验表面消毒效果。

1.2.2 提取总 DNA: 总 DNA 的提取参照文献[16]并加修改:(1) 破壁:将表面消毒后的材料用无菌解剖刀裁成适合大小,放入无菌研钵中,加石英砂并适量多次添加液氮用力将材料充分研磨成粉末;(2) 提取:取 1 g 粉末加入 1.5 mL Eppendorf 管中,按 1/9 (W/V)的比例加入 CTAB 提取缓冲液(2% CTAB; 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0; 1.4 mol/L NaCl; 20 mmol/L EDTA; 1.5% Polyvinylpyrrolidone, PVP; 0.5% β-Mercaptoethanol)涡旋混匀后 65℃水浴 1 h(期间每隔 5 min 上下颠倒混匀一次);(3) 抽提:4℃、12 000 r/min 离心 10 min,取上清,加入 Tris 饱和酚:氯仿:异戊醇混合液(25:24:1, V/V/V) 600 μL,涡旋混匀;(4) 重复步骤(3)直至上下分层间无白色沉淀出现;(5) 沉淀:4℃、12 000 r/min 离心 10 min,取上清,加入 1 000 μL 预

冷的异丙醇, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存 30 min, 离心 10 min, 弃上清, 将离心管倒扣于滤纸上使液体流尽; (6) 洗涤: 沉淀用 70% 乙醇洗涤脱盐, 8 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; (7) 洗脱: 干燥 DNA, 加入 20 μL TE 缓冲液溶解 DNA, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

1.2.3 16S rDNA 扩增: 细菌 16S rDNA 通用引物选择参考邱服斌^[10]、李振东^[17]的研究, 采用 799F: 5'-AACAGGATTAGATACCCTG-3' 和 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' 进行扩增, 预期扩增长度为 730 bp 左右。PCR 反应体系(20 μL): 2 \times Taq Master Mix 10 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上下引物各 1 μL , 模板 DNA 2 μL , ddH₂O 6 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 53 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 共 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖电泳检测。

1.2.4 克隆文库的构建及阳性克隆的筛选: San-prep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(购自上海生工)将扩增后 730 bp 左右的目的条带切胶纯化回收。纯化产物与 pMD-18T vector (购自上海生工)连接, 连接产物转化到大肠杆菌 JM109 感受态细胞。阳性克隆子的初步筛选参照文献[18]: 将转化后的细胞涂布含氨苄青霉素(100 mg/L)、X-gal、IPTG 的 LB 琼脂平板 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 14–16 h 进行蓝白斑筛选。

1.3 PCR-RFLP 分析

挑取阳性克隆子用 pMD-18T vector 通用引物 M13-47 和 M13-48 对插入片段进行菌落 PCR 扩增, PCR 产物电泳检测对目标插入片段进一步进行验证。限制性内切酶 *Hae* III 对菌落 PCR 产物进行酶切, 酶切体系 20 μL : 10 \times Buffer 2 μL ; *Hae* III 1 μL ; PCR 产物 5 μL ; ddH₂O 12 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 4 h。酶切产物用 2.5% 的琼脂糖电泳检测。酶切图谱用 Quantity One 软件进行分析, 选取酶切带型不同的代表克隆对应的菌液送往上海生工进行测通测序。将 *Hae* III 酶带谱切分析不同且测

序结果也不同的克隆的归为 1 个 OTUs。克隆文库覆盖率统计分析应用公式: $C=[1-(n/N)]\times 100\%$ ^[19], 这里 n 代表在 16S rDNA 克隆文库仅出现一次的 OTU 的数量, N 代表 16S rDNA 克隆文库的总数。

1.4 克隆文库发育分析

测序结果用 VECTER SCREEN 去除载体序列后提交到 EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Kim et al., 2012)进行 BLAST 检索, 下载同源性较高的模式菌株的数据, 生成 Fasta 格式文件。用 ClustalX 软件对所得序列进行人工校正及比对分析。利用 MEGA 5.0, 按照 Neighbor-Joining 法聚类, 选择 1 000 个重复做 Bootstrap 值分析, 构建系统发育树。所得的 16S rDNA 序列已提交 GenBank 数据库, 登录号分别为: JX266270–JX266329 和 JX312550–JX312557。

2 结果与分析

2.1 材料表面消毒

取最后一次冲洗用灭菌去离子水涂布 LB 平板, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h, 平板上未见菌落长出; 取最后一次冲洗用灭菌去离子水作为 PCR 模板, 没有扩增出基因组片段, 表明经表面消毒后, 样品表面附生菌的影响已消除。

2.2 总 DNA 提取及 16S rDNA 特异性扩增

提取红豆杉的总 DNA 较完整, 大于 23 kb, 条带较为清晰, 可用于下游实验, 见图 1。应用细菌 16S rDNA 通用引物进行特异性扩增, 得到约 730 bp 的目标片段, 见图 2。另外还可看到位于 1 000–2 000 bp 之间较模糊的条带, 推测可能为红豆杉线粒体 18S rDNA 片段。切胶纯化回收位于 730 bp 的目标条带可避免其影响。

2.3 PCR-RFLP 分析

从构建的 16S rDNA 克隆文库中随机挑选了 180 个阳性克隆, 以质粒通用引物进行菌落 PCR

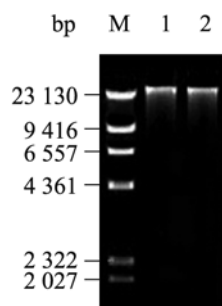


图1 红豆杉总 DNA 提取电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total DNA of the *Taxus chinensis*

Note: M: Lambda DNA marker; 1-2: Total DNA.

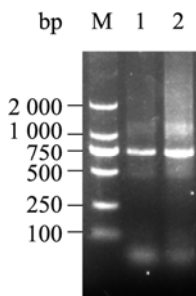


图2 红豆杉内生细菌 16S rDNA 基因片段的 PCR 扩增图

Fig. 2 Amplification results of 16S rDNA of endophytic bacteria in the *Taxus chinensis*

Note: M: DL2000 marker; 1-2: Bacterial 16S rRNA gene products.

扩增, 扩增产物(>900 bp)用 *Hae* III 进行插入目的片段的 RFLP 分析, 初步获得了 32 个酶切带谱不同的克隆。部分片段检测结果见图 3。由图 3 可见酶切较为充分, 条带均在 100–750 bp 之间, 其总和均接近于菌落 PCR 产物大小。将 32 个带谱对应的克隆对应的菌液送往上海生工进行测序。测序结果去除嵌合序列(共 22 个序列, 代表 5 个 OTUs), 并排除重复序列后共得到 26 个 OTUs (代表 158 个有效序列)。根据公式, 计算得克隆文库的覆盖率 C 为 83.54%, 基本可以代表红豆杉内生细菌的多样性。

2.4 细菌 16S rDNA 系统发育分析

选取不同酶切带谱对应的阳性克隆进行测序, 系统发育将 158 个阳性克隆其归为 4 个类群:

变形菌门(Proteobacteria)包含(Alpha、Beta、Gamma、Delta 亚群), 包括 93 个克隆序列, 占总克隆总数的 58.86%, 为最本文库的最优势类群; 厚壁菌门(Firmicutes), 占总克隆总数的 18.35%; 放线菌门(Actinobacteria), 占总克隆总数的 8.23%; 拟杆菌门(Bacteroidetes)最少, 仅占总克隆总数的 6.96%。另外还存在 7.59% 与未培养的细菌 16S rDNA 具有较高的相似性, 未能确定种属。这些克隆分别属于甲基杆菌科(Methylobacteriaceae)、叶杆菌科(Phyllobacteriaceae)、根瘤菌科(Rhizobiaceae)、醋杆菌科(Acetobacteraceae)、伯克氏菌科(Burkholderiaceae)、草酸杆菌科(Oxalobacteraceae)、生丝单胞菌科(Hyphomonadaceae)、肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae)、蛭弧菌科(Bdellovibrionaceae)、芽孢杆菌科(Bacillaceae)、黄色单胞菌科(Xanthomonadaceae)、鞘脂杆菌科(Sphingobacteriaceae)、黄杆菌科(Flavobacteriaceae)、梭菌科(Clostridiaceae)、诺卡氏菌科(Nocardiaceae)、链霉菌科(Sterptomycetaceae)、小单胞菌科(Micromonosporaceae) 18 个科。文库中有 80.38% 与已报道的假单胞菌属(*Pseudomonas*)、泛菌属(*Pantoea*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、紫色杆菌属(*Janthinobacterium*)等 16 个属的细菌 16S rDNA 具有较高的相似性。20.25% 的 16S rDNA 序列与已知基因序列相似性小于 97%, 具体结果见表 1。根据细菌 16S rDNA 序列构建的系统发育树, 见图 4。

(1) Proteobacteria: 克隆文库中 Gammaproteobacteria 包含了 55 个序列, 占总克隆文库的 34.81%, 代表了 4 个 OUTs, 它们与已报道序列具有极高的相似性, 均在 98%–100%, 为该克隆文库的优势亚类群。其中, 20 个克隆与假单胞

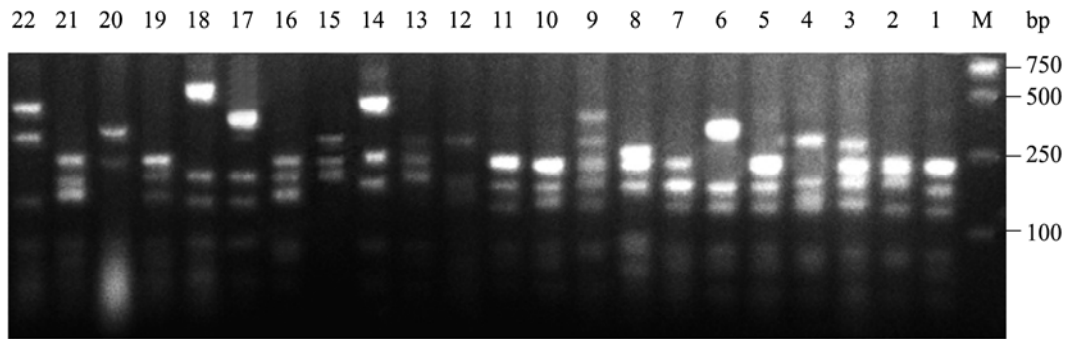


图3 部分细菌阳性克隆子的 *Hae* III 酶切图谱

Fig. 3 *Hae* III restriction patterns of some amplified 16S rRNA genes

Note: M: DL2000 marker; 1–22: Positive clones.

菌属(*Pseudomonas*)具有较高的相似性, 占总整个克隆文库的 12.66%, 为该克隆文库的最优势菌属; 17 个克隆与寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)具有较高的相似性; 其余 2 个 OUTs 分别与泛菌属(*Pantoea*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)在系统发育树上聚为一簇。

Alphaproteobacteria 包含 21 个序列, 占总克隆文库的 13.29%, 为文库中数量仅次于 Gamma proteobacteria 的亚群。除 3 个克隆与叶杆菌属(*Phyllobacterium*)的相似度为 96%外, 其余克隆与已知序列相似性均大于 97%。其中, 9 个克隆与葡糖醋杆菌属(*Gluconacetobacter*)聚为一簇; 其余 OUTs 分别归为甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、剑菌属(*Ensifer*)和生丝单胞菌属(*Hyphomonas*)。

文库中有 13 个克隆属于 Betaproteobacteria, 占克隆文库的 8.23%, 代表 4 个 OUTs, 包含伯克氏菌属(*Burkholderia*)、草螺菌属(*Herbaspirillum*)、紫色杆菌属(*Janthinobacterium*) 3 个属。其中草螺菌属(*Herbaspirillum*)拥有与已知序列相似性高达 100%的相似度。

Deltaproteobacteria 是文库中包含序列最少的亚门, 仅有 4 个克隆, 代表 1 个 OUTs。与已知蛭弧菌属(*Bdellovibrio*)有 96%的相似度。

(2) Firmicutes: 29 个克隆与 Firmicutes 类群聚在一起, 代表 4 个 OUTs, 分别为梭菌属

(*Clostridium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*), 与已报道序列相似性在 95%–99%。

(3) Actinobacteria: Actinobacteria 类群仅包含 13 个 16S rDNA 克隆序列, 却代表 3 个 OUTs。其中, 1 个克隆与小单孢菌属(*Micromonospora*)聚在一簇, 其余克隆分别与链霉菌属(*Streptomyces*)、拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)具有较高的相似性。

(4) Bacteroidetes: Bacteroidetes 类群有 11 个克隆, 占克隆文库的 6.96%, 分别与鞘脂杆菌属(*Sphingobacterium*)、*Winogradskyella rapida* 具有较高相似性。

(5) Uncultured bacteria: 克隆文库中有 12 个序列与 Uncultured bacteria 聚在一起, 这 12 个序列与已知 Uncultured bacteria 相似性较低, 为 93%–96%, 代表 3 个 OUTs。其中一个 OUTs 在系统发育树上形成独立分支。

3 讨论

药用植物中含有复杂多样的次生代谢产物, DNA 提取的影响因素较农林作物更为复杂^[17], 因此得到优质的植物总 DNA 是本实验的前提。本研究前期在提取液体积不变的前提下, 适当地增加材料的质量, 以期提高目标产物的得率。但随材料质量的增加, 总 DNA 反而下降。因此, 后期采用适量多次提取, 分别扩增, 这样即可提高产物的量, 又能避免 DNA 提取过程中产生的偏差。

本克隆文库的大多数细菌 16S rDNA 序列与已报道的药用植物如人参^[10]、醉马草^[11]、甘草^[12]

内生细菌克隆的具有较高的相似性,且优势类群均为变形菌门(Proteobacteria)。然而,该文库中放

表 1 红豆杉内生细菌 16S rDNA 序列比对结果
Table 1 Sequence alignment results of the endophytic bacterium 16S rDNA in *Taxus chinensis*

类群 Group	克隆数量 Clone numbers	代表克隆 Representative clones	最相似菌株 The most similar strains	相似性 Identity (%)
Gammaproteobacteria (34.81%)	55			
	20	BC175	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> (AB009457)	99.86
	17	BC072	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> (AB009457)	100
	9	BC063	<i>Pantoea brenneri</i> (EU216735)	98.96
	2	BC118	<i>Pantoea agglomerans</i> (AJ233423)	98.76
	7	BC059	<i>Erwinia psidii</i> (Z96085)	98.76
Alphaproteobacteria (13.29%)	21			
	5	BC128	<i>Methylobacterium adhaesivum</i> (AM040156)	99.56
	3	BC113	<i>Phyllobacterium ifriqiense</i> (AY78325)	100
	1	BC062	<i>Ensifer fredii</i> (D14516)	99.59
	9	BC009	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (AY78325)	99.86
	3	BC094	<i>Hyphomonas jannaschiana</i> (AJ227814)	96.18
Betaproteobacteria (8.23%)	13			
	1	BC004	<i>Burkholderia mimosarum</i> (AY752958)	98.31
	3	BC012	<i>Herbaspirillum huttiense</i> (AB021366)	100
	2	BC150	<i>Janthinobacterium lividum</i> (Y08846)	99.72
Deltaproteobacteria (2.53%)	7	BC013	<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i> (Y00846)	99.86
	4			
	4	BC153	<i>Bdellovibrio exovorus</i> (EF687743)	94.09
Firmicutes (18.35%)	29			
	6	BC085	<i>Clostridium saccharobutylicum</i> (U16147)	96.84
	4	BC130	<i>Clostridium sartagoforme</i> (Y18175)	99.86
	16	BC164	<i>Bacillus pocheonensis</i> (AB245377)	98.35
Actinobacteria (8.23 %)	3	BC028	<i>Bacillus aryabhatai</i> (EF114313)	99.86
	13			
	1	BC010	<i>Micromonospora citrea</i> (X92617)	99.45
	8	BC058	<i>Streptomyces galilaeus</i> (AB045878)	98.76
Bacteroidetes (6.96 %)	4	BC030	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> (AB184655)	99.73
	11			
	7	BC057	<i>Sphingobacteriaceae faecium</i> (AJ438176)	96.18
Uncultured bacteria (7.59 %)	4	BC018	<i>Winogradskyella rapida</i> (U64013)	100
	12			
	5	BC020	Uncultured alpha proteobacterium (HM109652)	94.36
	1	BC054	Uncultured bacterium (HM920027)	95.19
6	BC008	Uncultured bacterium (GQ263888)	93.57	

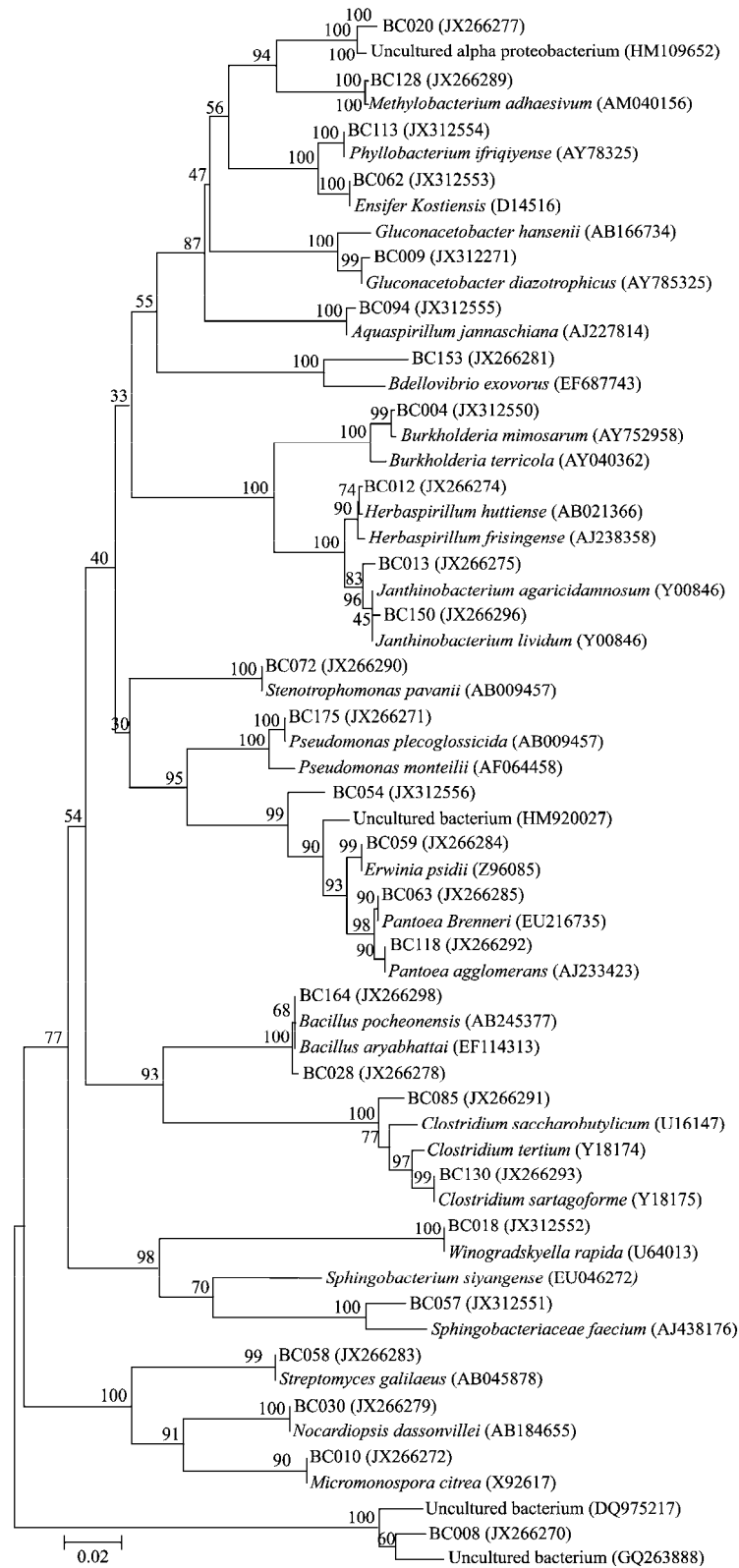


图 4 红豆杉内生细菌 16S rDNA 克隆文库系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on bacterial 16S rRNA gene clone library in the *Taxus chinensis*

线菌门 (Actinobacteria) 的小单孢菌属 (*Micromonospora*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 是在其他克隆文库所未见到的。另外, 文库中 20.25% 的克隆与已知序列相似度小于 97%, 部分克隆与 Uncultured bacteria 具有较高的相似性, 且 1 个 OUTs 在系统发育树上形成独立的分支, 未能确定其种属, 这表明红豆杉内生细菌多样性丰富, 并且可能存在新的分类单元或种属。

本研究采用免培养法, 直接提取红豆杉总 DNA, 利用细菌 16S rDNA 引物进行特异性扩增, 利用适宜的载体克隆到宿主细胞中构建细菌克隆文库。构建的文库中检测到 20 个属, 其中蛭弧菌属 (*Bdellovibrio*)、梭菌属 (*Clostridium*)、*Winogradskyella* 等是本实验室前期采用传统的培养方法所未得到的, 这就充分体现了免培养方法在挖掘红豆杉中的未能培养或不可培养生物基因资源的潜力。

尽管免培养法能够探知红豆杉中存在着大量的未培养的细菌类群, 但研究这些类群的生化特征及其功能, 仍需结合传统的纯培养法来共同完成。

参 考 文 献

- [1] Chiari M, Etori C, Righetti PG, et al. Oxidation of cysteine to cysteic acid in proteins by peroxyacids, as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377.
- [2] Strobel GA, Stierle A, Stierle D. Taxomyces andreanae a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew (*Taxus brevifolia*)[J]. Mycotaxon, 1993, 40(7): 71-80.
- [3] 丁小维, 刘开辉, 邓百万, 等. 中国红豆杉内生细菌的分离鉴定及活性研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(10): 1577-1580.
- [4] Adams PD, Klopper JW. Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. Plant and Soil, 2002, 240(1): 181-189.
- [5] 孙磊, 宋未. 非培养方法在植物内生和根际细菌研究中的应用[J]. 自然科学进展, 2006, 12(6): 140-144.
- [6] Ikeda S, Kaneko T, Okubo T, et al. Development of a bacterial cell enrichment method and its application to the community analysis in soybean stems[J]. Microbial Ecology, 2009, 58(4): 703-714.
- [7] Sun L, Qiu F, Zhang X, et al. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis[J]. Microbial Ecology, 2008, 55(3): 415-424.
- [8] Garbeva P, Overbeek LS, van Vuurde JW, et al. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments[J]. Microbial Ecology, 2001, 41(4): 369-383.
- [9] 邵红. 春兰内生细菌群落多样性及功能菌株筛选 [D]. 保定: 河北大学硕士学位论文, 2011.
- [10] 邱服斌. 培养方法与非培养方法对人参根内生细菌的研究[D]. 北京: 首都师范大学博士学位论文, 2007.
- [11] 张雪兵, 史应武, 曾军, 等. 醉马草免培养内生细菌的多样性[J]. 生态学报, 2011, 31(8): 2178-2187.
- [12] 程晓燕, 李文军, 王芸, 等. 新疆野生胀果甘草内生细菌多样性的非培养初步分析[J]. 微生物学报, 2009, 49(6): 718-725.
- [13] Reiter B, Sessitsch A. Bacterial endophytes of the wildflower *Crocus albiflorus* analyzed by characterization of isolates and by a cultivation-independent approach[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2006, 52(2): 140-149.
- [14] 中国科学院植物研究所编辑委员会. 中国植物志第七卷[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 438-443.
- [15] 罗胜联, 陈亮, 陈觉梁, 等. 一种应用于群落分析的植物内生菌基因组总 DNA 提取及纯化方法: CN, 201010602185[P]. 2011-09-07.
- [16] 刘杰, 高连明. 红豆杉属植物三种不同总 DNA 提取方法的分析比较[J]. 广西植物, 2011, 31(2): 444-249.
- [17] 李振东. 东祁连山高寒草地优势植物内生细菌多样性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010.
- [18] Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids[J]. Gene, 1990, 96(1): 23-28.
- [19] Good IJ. The population frequencies of species and the estimation of population parameters[J]. Biometrika, 1953, 40(3/4): 237-264.
- [20] 郭宝林, 刘万水, 黄文华, 等. 影响总 DNA 提取因素的探讨[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(11): 924-926.