



新疆棉花黄萎病棉株与健康棉株内生古菌定量及其时空变化规律

刘萍^{1,2} 管力慧^{1,2} 党文芳^{1,2} 杨红梅^{2,3} 牛新湘^{4,6} 楚敏^{2,3} 李萍⁵ 高雁^{2,3} 娄恺^{2,3}
史应武^{*1,2,3,6}

1 新疆大学生命科学与技术学院 新疆 乌鲁木齐 830052

2 新疆农业科学院微生物应用研究所 新疆 乌鲁木齐 830091

3 新疆特殊环境微生物实验室 新疆 乌鲁木齐 830091

4 新疆农业科学院土壤肥料与农业节水研究所 新疆 乌鲁木齐 830091

5 新疆库尔勒市农业技术推广站 新疆 库尔勒 841000

6 农业农村部西北绿洲农业环境重点实验室 新疆 乌鲁木齐 830091

摘要:【背景】现今棉花黄萎病严重阻碍棉花的稳定高产，妨碍棉花产业的发展。在生物防治中内生菌潜力巨大，但关于内生古菌含量在棉花黄萎病棉株的变化规律鲜有报道。【目的】研究不同生育期以及不同植棉地区黄萎病棉株和健康棉株内生古菌的分类学信息和数量变化规律。【方法】采用 MiSeq 高通量测序和 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 技术，对新疆棉花黄萎病棉株、健康棉株不同生育期和不同典型生态区的内生古菌进行定量分析。【结果】内生古菌在新疆各采样地和不同生育期的棉花黄萎病棉株、健康棉株内的群落组成相似。在不同生育期，新疆黄萎病、健康棉株内生古菌数量呈先增加后减少然后趋于平缓的趋势，蕾期达到最高值。在不同地区，新疆黄萎病棉株内生古菌数量在北疆地区最高，其次是东疆地区，最后是南疆地区。健康棉株则是南疆地区最高，东疆次之，北疆最低。【结论】新疆黄萎病棉株、健康棉株内生古菌数量在不同的生育期以及不同空间存在较大差异，整体变化趋势显著，可为后续研究提供相关理论支撑。

关键词: 内生古菌，新疆棉花黄萎病，定量，不同生育期变化规律，空间变化规律

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (41471220, 31860024); Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2018D01A44); National Key Research and Development Program of China (2017YFD0200600)

*Corresponding author: E-mail: syw1973@126.com

Received: 24-12-2019; Accepted: 09-06-2020; Published online: 15-09-2020

基金项目: 国家自然科学基金(41471220, 31860024); 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2018D01A44); 国家重点研发计划(2017YFD0200600)

*通信作者: E-mail: syw1973@126.com

收稿日期: 2019-12-24; 接受日期: 2020-06-09; 网络首发日期: 2020-09-15

Quantitative analysis of endophytic archaea and its spatiotemporal variation in verticillium wilt and healthy cotton plants from Xinjiang

LIU Ping^{1,2} GUAN Li-Hui^{1,2} DANG Wen-Fang^{1,2} YANG Hong-Mei^{2,3} NIU Xin-Xiang^{4,6}
CHU Min^{2,3} LI Ping⁵ GAO Yan^{2,3} LOU Kai^{2,3} SHI Ying-Wu^{*1,2,3,6}

1 College of Life Sciences and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830052, China

2 Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang 830091, China

3 Xinjiang Special Environmental Microbiology Laboratory, Urumqi, Xinjiang 830091, China

4 Institute of Soil and Fertilizer and Agricultural Water Conservation, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang 830091, China

5 Xinjiang Korla Agricultural Technology Extension Station, Korla, Xinjiang 841000, China

6 Key Laboratory of Northwest Oasis Agricultural Environment, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Urumqi, Xinjiang 830091, China

Abstract: [Background] At present, verticillium wilt of cotton seriously hinders the stable and high yield of cotton and hinders the development of cotton industry. Endophytic bacteria have great potential in biological control, but the variation of endophytic archaea in verticillium wilt of cotton is rarely reported. **[Objective]** In order to provide theoretical support for the following studies, the quantitative changes of endophytic archaea in cotton plants with verticillium wilt and healthy plants in different growth periods and different planting areas were studied. **[Methods]** Using MiSeq high-throughput sequencing and TaqMan probe real-time fluorescence quantitative PCR technology, the endophytic archaea of verticillium wilt and healthy strains in Xinjiang cotton were quantitatively analyzed at different growth stages and in different typical ecological regions. **[Results]** The community composition of endophytic archaea was similar to that of verticillium wilt and healthy cotton plants at different sampling sites and different growth stages in Xinjiang. At different growth stages, the number of endophytic archaea in verticillium wilt and healthy cotton plants in Xinjiang increased first, then decreased, then tended to be flat, and reached the highest value in bud stage. In different regions, the number of endophytic archaea of verticillium wilt cotton in Xinjiang was the highest in the northern region, followed by the eastern region and the southern region. Health plant is the highest in the southern region, followed by the eastern region, the lowest in the northern region. **[Conclusion]** The quantity of endophytic archaea in cotton plants with verticillium wilt and healthy plants in Xinjiang was significantly different in different growth periods and different spaces, and the overall variation trend was significant.

Keywords: Endophytic archaea, Xinjiang verticillium wilt cotton, Quantitative, The changing rules of different growth stages, Different spatial variation laws

棉花黄萎病起源于美国, 于 1914 年初次发现, 棉花植株感染黄萎病后, 产量会大幅降低, 严重阻碍棉花产业的发展, 该病的特点是危害严重、分布广泛、传播途径多、寄主范围宽、存活时间久等^[1-2], 属于土传病害, 目前尚无有效的防控办法^[3-5]。黄萎病菌在土壤中可大量增殖, 病原菌侵染棉株时以根部为起点, 而后进入维管束, 进而导致棉花发病^[6]。新疆以地域优势成为棉花主

要的生产基地, 高效防治此病害成为新疆棉花高产首要解决的问题。研究表明棉花黄萎病由于没有抗原, 而且病原菌的变异能力高、致病性强, 因此植株抗性极易丢失^[7]。使用常规的杀菌剂防治效果很不理想, 防治该病的传统途径是培育具有抗性的棉花新品种。然而赵丽芬等^[8-10]研究显示, 品种的抗病性越好, 丰产性反而会降低。近年来, 植物内生菌成为研究热点, 内生菌会在自身

生活史中的某一阶段或完整生命期存在于植物组织内,对宿主不会造成明显疾病损害。棉花植物组织的内生菌,有些可促进植株生长,有些则可以起到防治病害、增强抗逆性的作用^[11]。研究表明内生菌的不同种类、定殖率及定殖量等因素使其在棉花体内表现出不同的定殖规律,可直接影响其对宿主植物的作用。王娜等^[12-13]研究表明,内生菌在棉苗中有一定的定殖量后,对棉花黄萎病的防控效果才能表现出来。因此,对内生菌在棉花黄萎病棉株不同生育期和典型生态区进行定量,可为内生菌防治棉花黄萎病提供科学依据。

古菌^[14-16]被称为生命除真核生物和细菌之外的第三种形式,具有自身独特的性质,虽然古菌和细菌均属于原核生物,但从进化树上看却是与真核生物之间有更近的亲缘关系。最初的研究认为古菌主要生活在极端环境中(如强碱、强酸或者高盐等环境),因此最初古菌大都被归类为极端微生物。后来研究人员在海洋浮游生物中发现了“泉古菌”,随后又在其他环境中发现了古菌的存在(包括陆地泥土、湖泊沉积物、海洋环境等)^[17-18],打破了人们对古菌的既定认识,如今研究者们越来越关注其在生态环境中的存在。

目前棉花植株中细菌和真菌时空数量动态变化都已有报道,然而对于棉花内生古菌数量的时空动态尚不明确,因此,本文采用快捷灵敏的RT-qPCR和MiSeq高通量测序技术,对不同生育期、地点的棉花黄萎病棉株和健康棉株中的古菌进行定量检测及高通量测序,研究新疆内生古菌在黄萎病棉株和健康棉株体内的群落组成结构和时空动态规律,了解黄萎病对棉花内生古菌的影响,以期为内生古菌防治棉花黄萎病提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 棉花样品采集

分别在新疆东疆哈密和南疆库尔勒、图木舒

克、阿拉尔及北疆精河、石河子、乌苏7个地区进行采样,采样标准为在健康棉花植株和黄萎病发病较为均匀的田块进行随机采样,其中健康棉花植株和黄萎病棉株主要依据RT-qPCR定量结果并结合症状区分。从样品中剔除含有棉花黄萎病病原但症状尚未表现出来的取样植株。在以上各个地区棉花的苗期、蕾期、花期、吐絮期采集整株棉花样品,于装有变色硅胶的保鲜袋中脱水带回。实验室冰箱4℃保存,后期用于内生古菌的RT-qPCR检测使用。

1.1.2 主要试剂和仪器

质粒纯化试剂盒、Ezup柱式植物基因组DNA抽提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司。

微量分光光度计,济南利科医疗器械有限公司;超低温冰箱,杭州艾普仪器设备有限公司;荧光定量PCR仪,罗氏医学仪器公司;全自动凝胶成像系统、电泳仪,北京市六一生物科技股份有限公司;PCR仪,杭州博日科技股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 棉花内生菌DNA的提取

首先进行样品处理,将各个棉区随机抽取的不同生育期的棉花植株根部于水龙头下冲洗,去除表面粘附物,取棉株地下5-10cm的根部,使用无菌手术刀切割为1-2cm的小块,对其进行表面消毒。具体操作为:75%酒精浸泡4min,然后于2.0%次氯酸钠溶液中浸泡5min,最后使用无菌水清洗5次。消毒是否彻底采用两种方式进行判断:(1)将最后一次冲洗根部的无菌水取100μL涂布于TSA培养基^[19]中,28℃恒温培养3d,设置3个重复,观察平板中是否有菌落生长;(2)采用无菌镊子夹住消毒后的棉花根部,在TSA培养基上轻轻划过,注意不要损害培养基,28℃恒温培养3d,设置3个重复,观察平板中是否有菌落生长。

将消毒的根部样品在液氮中充分研磨,取约30mg样品粉末于1.5mL无菌EP管中,然后依照DNA提取试剂盒的说明书步骤操作,每个设置

3个平行,共84个样品,分别对应标记,提取的棉花总DNA置于 -20°C 保存待用。

1.2.2 样品 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及 RT-qPCR 反应系统的优化

用内生古菌 16S rRNA 基因通用引物 524F (5'-TGYCAGCCGCCGCGGTAA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')扩增内生古菌 16S rRNA 基因片段,探针用 fam/BHQ1 (5'-CCGT-CATTTCMTTGTGAGTTT-3')标记。以棉花内总DNA作为模板进行 PCR 扩增,以不加模板作为阴性对照组,各个反应体系建立3个平行。然后对扩增体系进行优化,以扩增效率接近100%确定反应 C_t 值和最佳退火温度,最后得到荧光定量 PCR 的优化反应体系(20 μL):模板 5.0 μL ,正、反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.8 μL ,FSEssential DNA Probes Master 10.0 μL ,探针 0.4 μL 。PCR 反应条件: 95°C 10 min; 95°C 25 s, 50°C 120 s, 72°C 90 s,45个循环。PCR产物经1.8%琼脂糖凝胶电泳检测后,委托美吉生物医药科技有限公司(上海)进行高通量测序。

1.2.3 重组质粒的构建

将PCR扩增产物按DNA胶回收试剂盒说明书的步骤进行纯化。用纯化后的扩增产物构建质粒,然后再将所得质粒转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,进行蓝白斑试验,筛选出阳性转化菌。

1.2.4 重组质粒标准曲线的建立

按照质粒纯化试剂盒说明书的步骤提取阳性克隆重组质粒DNA,使用超微量分光光度计测定重组质粒DNA的浓度。按照阿伏伽德罗常数(6.02×10^{23} 分子数/mol)和已知重组质粒全序列计算拷贝数,得到拷贝数为 1.145×10^2 copies/g-FRW。以10倍稀释梯度稀释重组质粒,共稀释7次,稀释后的重组质粒拷贝数分别为: 1.145×10^2 、 1.145×10^3 、 1.145×10^4 、 1.145×10^5 、 1.145×10^6 、 1.145×10^7 、 1.145×10^8 copies/g-FRW。以此作标准曲线,其中纵坐标是循环数,横坐标是拷贝数的

对数,用Origin Pro 8.5制作扩增曲线,用Excel软件作出 C_t 值与棉花黄萎病棉株内生古菌浓度之间的线性关系图。

1.2.5 不同时空样品的荧光定量 PCR 检测

以1.2.2所得的优化反应体系对不同生育期、棉区的棉花内生古菌DNA样品进行PCR扩增,用RT-PCR检测扩增后的内生古菌,将检测所得 C_t 值作好标记,带入1.2.4所得的标准曲线方程中,得到相对应的不同棉区棉株在苗期、蕾期、花期、吐絮期的内生古菌含量。

1.2.6 生物信息学分析与数据处理

将通过MiSeq测序所得的PE reads依据Overlap关系使用Flash软件(<https://omictools.com/flash-tool>)进行拼接,获得高质量的Tags序列,用Trimmomatic软件(<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>)对拼接序列质量进行质控和过滤。然后在USEARCH V7.0 (<http://www.drive5.com/usearch/>)平台,按照97%相似性对非重复序列(不含单序列)进行操作分类单元(operation taxonomic unit, OTU)聚类,在聚类过程中去除嵌合体,得到OTU的代表序列。采用RDP classifier贝叶斯算法对97%相似水平的OTU代表序列在Silva数据库(www.arb-silva.de)进行分类学分析,可得到每个OTU相对应的物种分类信息,此分析在美吉生物医药科技有限公司(上海)的生物云平台(i-sanger)上完成。所得数据采用Origin Pro 8.5和Excel软件进行数据分析处理并制图。

2 结果与分析

2.1 重组质粒标准曲线的建立

以拷贝数 1.145×10^2 copies/g-FRW为基础,按10倍倍比稀释成7个浓度梯度,稀释后的重组质粒拷贝数范围是: 1.145×10^2 – 1.145×10^8 copies/g-FRW。然后再进行RT-qPCR检测(是以上7个标准浓度的DNA),用Origin Pro 8.5和Excel软件制图,结果如图1所示。

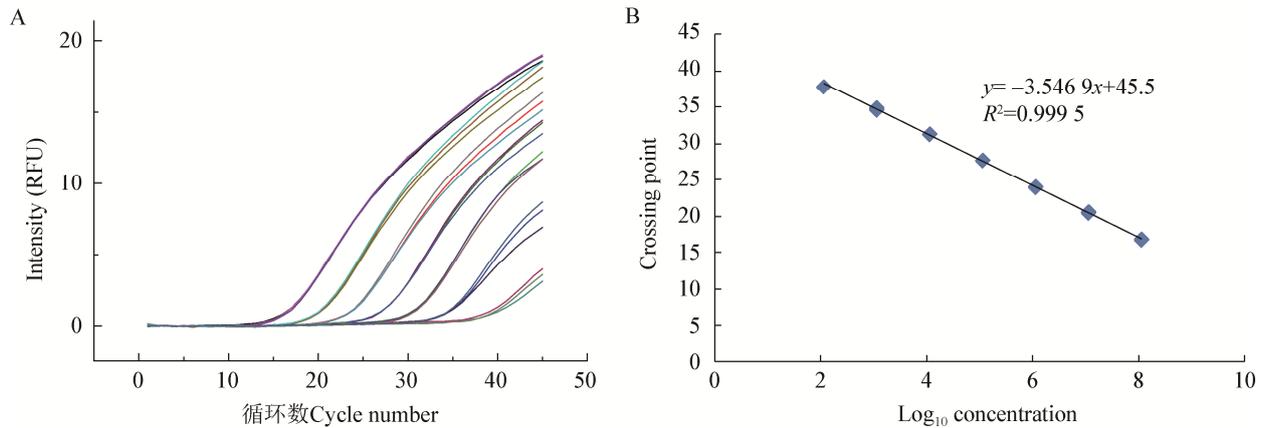


图 1 RT-qPCR 扩增曲线(A)和标准曲线(B) (10 倍比梯度稀释的阳性质粒)

Figure 1 Amplification curve (A) and standard curve (B) of RT-qPCR (10-fold gradient diluted positive plasmid)

由图 1B 可看出, 曲线的截距为 45.5, 斜率为 -3.5469 , 相关性系数为 $R^2=0.9995$, 充分说明循环数 C_t 与标准品浓度之间存在很强的相关性。因此, 棉花植株内生古菌的 DNA 起始浓度对数值和循环数 C_t 值之间的标准曲线方程为 $y=-3.5469x+45.5$, 其中 x 是棉花植株内生古菌的 DNA 起始浓度的对数值, y 是扩增反应 C_t 值。

2.2 棉花黄萎病病株和健康棉株内生古菌在不同生育期的变化规律

由图 2 可以看出, 病株和健康棉株在不同生育期古菌组成相似, 其中病、健康棉株在苗期均以来源于奇古菌门的土壤古菌纲(病株 92.28%, 健康棉株 90.49%)为主, 患病棉株苗期未确定分类地位的古菌纲由 7.60%降至 0.83%, 且苗期病株较健康棉株古菌群落结构更为丰富, 蕾期、花期、吐絮期病、健康棉株以未确定分类地位的古菌纲为主, 均在 98%以上。

由图 3 可知, 棉花黄萎病棉株内生古菌数量在不同生育期除石河子以外, 库尔勒、哈密、图木舒克、阿拉尔, 精河、乌苏这 6 个地区的不同生育期均呈现出先增加后减少的趋势, 并且增加和减少的幅度较大。这 6 个地区古菌数量都在苗期至蕾期期间大幅上升, 并在蕾期达到最高值, 由高到低依次为: 精河 1.33×10^7 copies/g-FRW, 乌苏 1.22×10^7 copies/g-FRW, 哈密 1.18×10^7 copies/g-FRW,

库尔勒 1.06×10^7 copies/g-FRW, 图木舒克 9.94×10^6 copies/g-FRW, 阿拉尔 9.90×10^6 copies/g-FRW; 然后在蕾期至花期期间内生古菌数量迅速下降, 依次为: 精河 1.04×10^4 copies/g-FRW, 乌苏 1.68×10^2 copies/g-FRW, 哈密 3.69×10^4 copies/g-FRW, 库尔勒 3.09×10^4 copies/g-FRW, 图木舒克 4.29×10^4 copies/g-FRW, 阿拉尔 2.54×10^4 copies/g-FRW; 花期至吐絮期变化不大。石河子地区则呈现先降低后升高再降低的趋势, 相较于其他 6 个地区, 石河子内生古菌数量的变化较为平缓, 其中苗期达到最高值 2.59×10^5 copies/g-FRW, 蕾期降到最低值 2.88×10^3 copies/g-FRW。

由图 4 可知, 健康棉花植株在不同生育期内生古菌数量变化趋势为: 石河子地区苗期至蕾期数量降低, 蕾期至花期缓慢上升, 花期至吐絮期大幅上升, 吐絮期上升至 8.27×10^6 copies/g-FRW; 图木舒克整个生育期持续下降, 其中蕾期至花期降低显著, 由 9.61×10^6 copies/g-FRW 降至 2.34×10^4 copies/g-FRW; 库尔勒、哈密、阿拉尔、精河、乌苏这 5 个地区在不同生育期均呈现先增加后减少而后近于平缓的趋势, 而且增加和减少的幅度较大。这 5 个地区内生古菌数量均在苗期至蕾期期间大幅上升, 并在蕾期达到最高值, 其中最高值为库尔勒 1.33×10^7 copies/g-FRW, 蕾期至花期期间快速下降, 花期至吐絮期变化不大。

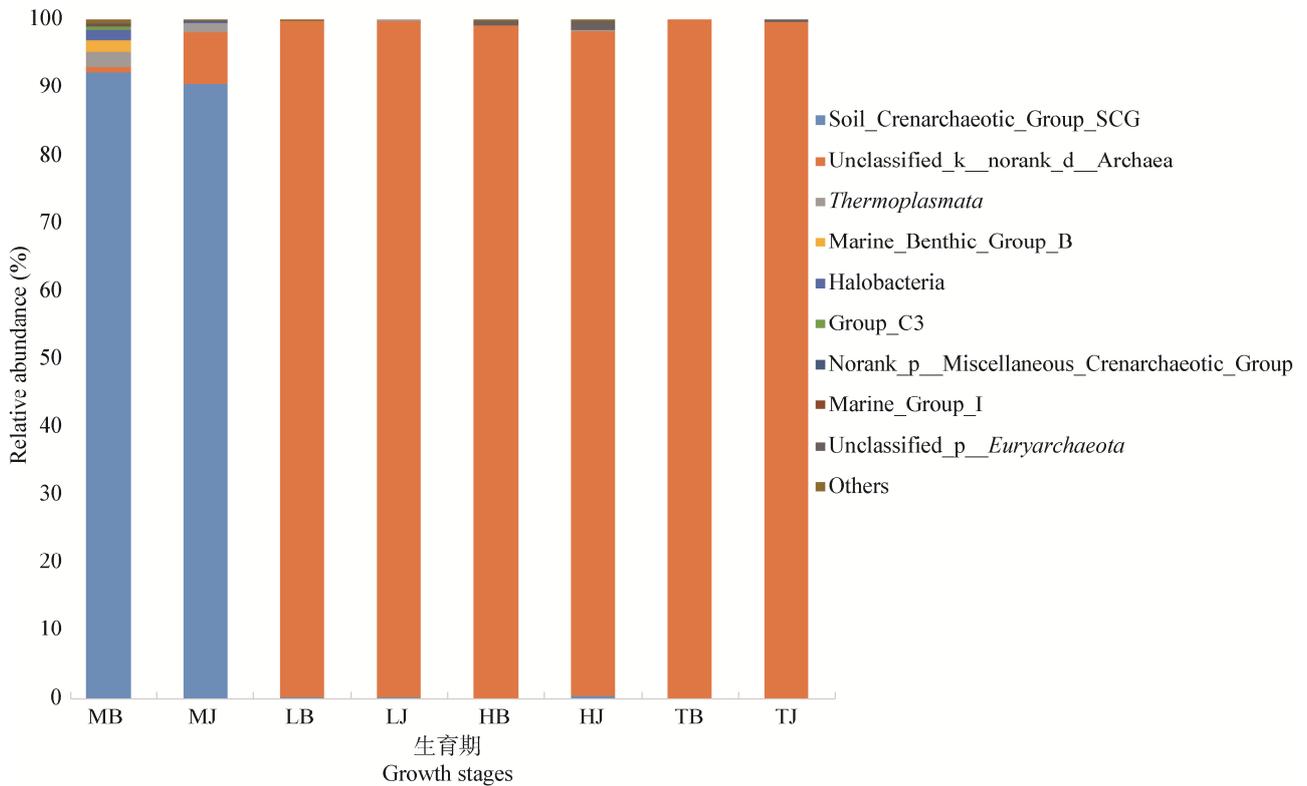


图 2 古菌在病、健康棉株不同生育期纲分类

Figure 2 Archaea were classified in different growth stages of diseased plant and healthy plant

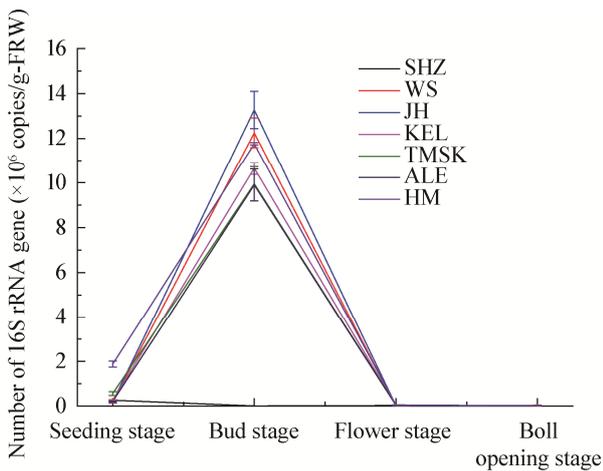


图 3 棉花黄萎病棉株内生古菌数量在不同生育期上的变化

Figure 3 Different growth stages changes of the total number of endophytic archaea in cotton infected by verticillium wilt

2.3 棉花黄萎病病株和健康棉株内生古菌在不同地区的变化规律

由图 5 可知, 病株和健康棉株在北疆、南疆、东疆古菌组成相似, 主要由来源于奇古菌门的土壤泉古菌纲(23%左右)和未确定分类地位的古菌纲(75%左右)组成, 其中南疆库尔勒病株较健康棉株古菌群落结构更为丰富, 北疆石河子地区棉株黄萎病发生后未确定分类地位的古菌纲由 74.82%降至 49.37%, 来源于奇古菌门的土壤泉古菌纲由 24.34%升至 48.54%。

由图 6 可看出, 不同地区棉花黄萎病棉株内生古菌数量的变化规律, 棉花病株内生古菌的数量在北疆地区最大, 其次是东疆地区, 最后是南疆地区。其中北疆的精河在蕾期高达 1.33×10^7 copies/g-FRW, 东疆地区的哈密在蕾期高

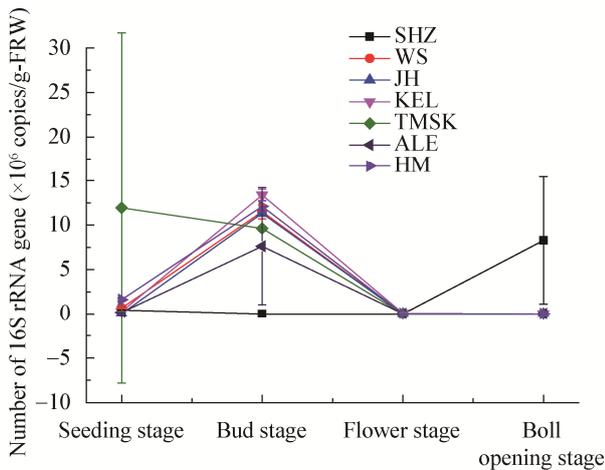


图4 棉花健康棉株内生古菌数量在不同生育期的变化
Figure 4 Different growth stages changes of the total number of endophytic archaea in healthy cotton

注: MB、LB、HB、TB、MJ、LJ、HJ、TJ: 病株苗期、病株蕾期、病株花期、病株吐絮期、健康棉株苗期、健康棉株蕾期、健康棉株花期、健康棉株吐絮期。HM、KEL、TMSK、ALE、JH、SHZ、WS: 采样地点哈密、库尔勒、图木舒克、阿拉尔、精河、石河子、乌苏。

Note: MB, LB, HB, TB, MJ, LJ, HJ, TJ show the diseased and healthy plant in seedling stage, bud stage, flowering stage, boll opening stage respectively. HM, KEL, TMSK, ALE, JH, SHZ, WS show sampling locations in Hami, Korla, Tumu Shuker, Alar, Jinghe, Shihezi and Wusu respectively.

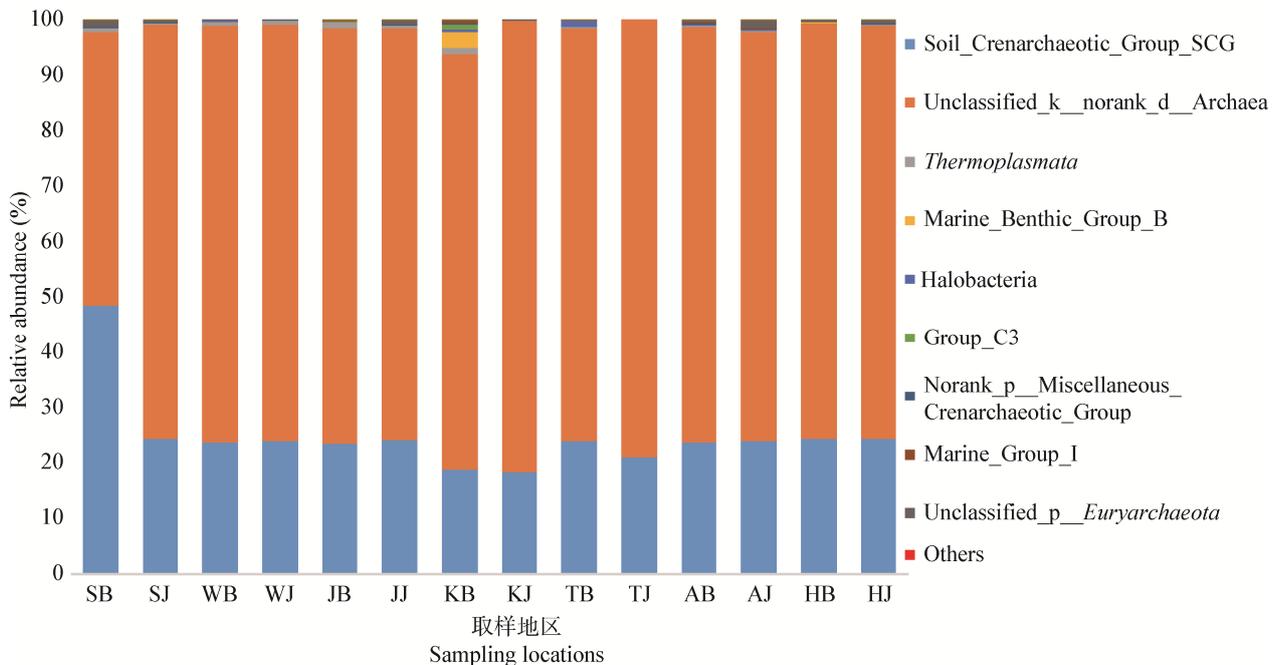


图5 古菌在病、健康棉株不同采样点纲分类
Figure 5 Archaea were classified in different sampling sites of diseased plant and healthy plant

达 1.18×10^7 copies/g-FRW, 南疆地区的库尔勒在蕾期高达 1.06×10^7 copies/g-FRW。但是相较于其他 6 个地区, 北疆的石河子地区整体菌量偏低, 在蕾期降到最低值, 为 2.88×10^3 copies/g-FRW。石河子的内生古菌量在苗期是北疆地区最高的, 为 2.59×10^5 copies/g-FRW。

由图 7 可以看出, 健康棉花植株内生古菌数量在不同地区整体变化趋势为: 南疆>东疆>北疆。其中最高值出现在南疆地区库尔勒的蕾期 1.33×10^7 copies/g-FRW, 此外, 苗期最高值为南疆地区图木舒克 1.19×10^7 copies/g-FRW。北疆地区石河子于吐絮期达到最高值, 精河于蕾期达到最高值。

3 讨论

目前古菌已成为微生物学研究的热点之一, 虽然还正处于刚刚起步的阶段, 但是研究古菌对于阐明生命起源以及揭示生命运动的基本规律、物种进化、生物与环境、生物与生物之间的相互作用都具有十分重要的意义^[20]。目前对于古菌的研究主要包括 3 个方面: (1) 某些存在于极端环境中的古菌研究; (2) 地球化学循环中古菌的作用;

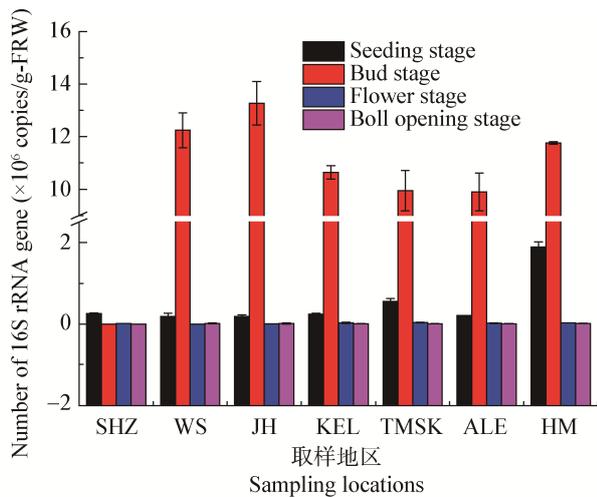


图6 棉花黄萎病棉株内生古菌数量在空间上的变化
Figure 6 Sampling sites changes of the total number of endophytic archaea in cotton infected by verticillium wilt

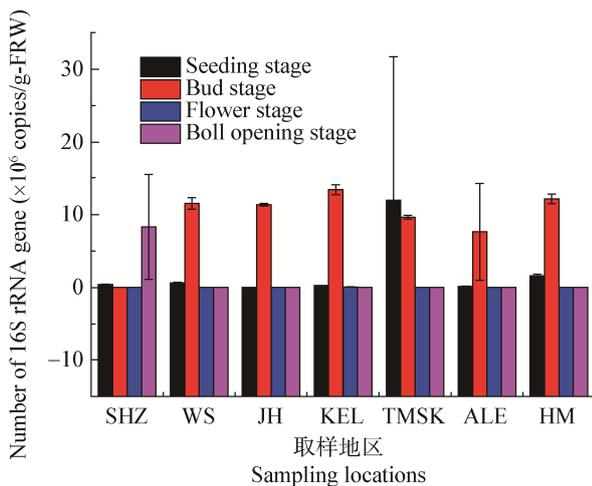


图7 棉花健康棉株内生古菌数量在空间上的变化
Figure 7 Sampling sites changes of the total number of endophytic archaea in healthy cotton

注: SB、WB、JB、KB、TB、AB、HB、SJ、WJ、JJ、KJ、TJ、AJ、HJ: 石河子病株、乌苏病株、精河病株、库尔勒病株、图木舒克病株、阿拉尔病株、哈密病株、石河子健康棉株、乌苏健康棉株、精河健康棉株、库尔勒健康棉株、图木舒克健康棉株、阿拉尔健康棉株、哈密健康棉株。HM、KEL、TMSK、ALE、JH、SHZ、WS: 采样地点哈密、库尔勒、图木舒克、阿拉尔、精河、石河子、乌苏。

Note: SB, WB, JB, KB, TB, AB, HB, SJ, WJ, JJ, KJ, TJ, AJ, HJ show the cotton infected by verticillium wilt and healthy cotton in Shihezi, Wusu, Jinghe, Korla, Tumu Shuker, Alar and Hami respectively. HM, KEL, TMSK, ALE, JH, SHZ, WS show sampling locations in Hami, Korla, Tumu Shuker, Alar, Jinghe, Shihezi and Wusu respectively.

(3) 环境特征和古菌群落结构之间的相互关系^[16]。如今黄萎病严重阻碍新疆棉花产业的发展, 但关于棉花内生古菌对黄萎病的影响几乎没有相关报道, 而生防菌充分发挥作用的首要前提是在宿主内有效定殖。深入系统地研究内生古菌在棉花病株内的定殖规律, 可为今后研究内生古菌的生防作用机理及与植株的互作机制提供帮助, 同时也增大了棉花黄萎病生防菌资源的开发利用, 对减轻该病害有重要意义。因此, 建立一种高通量、灵敏准确又快速便捷的定量检测植株内生古菌方法非常必要。

定量检测方法有很多, 比如细菌培养技术、荧光定量 PCR、多重 PCR^[21]等。细菌培养技术对设备以及操作人员的技术要求较高, 较为费时费力^[22]; 多重荧光定量 PCR 的检测经常会受到限制, 因为引物之间存在竞争关系, 而且在检测之后还需进一步做电泳分析, 操作较为繁琐^[23]; 在实验室中较为常用的检测方法是平板菌落计数法, 但此法对研究人员来说操作繁琐、耗时长、劳动强度大、误差较大, 难以实现大批样品的快速检测, 而 RT-qPCR 则不仅可以在很短时间内完成定量与检测, 而且还具备快捷、高通量、自动化程度高、灵敏等优点, 整套技术已经发展得相当成熟, 广泛应用于各种定量检测^[24-27], 如用于各种植物真菌、病毒病原及细菌的检测和定量, 对土传病害的生物防治有重要意义^[15]。因此, 本文采用 RT-qPCR 技术对不同生育期、不同地点的棉花黄萎病棉株中的古菌进行定量检测, 同时对棉花内生古菌进行了绝对定量, 较大程度地提升了检测的准确性。

实验结果显示, 由分类学信息可知棉花黄萎病棉株和健康棉株中的古菌在不同生育期和不同采样点的群落组成相似, 来源于奇古菌门的土壤泉古菌纲和未确定分类地位的古菌纲为优势菌群, 说明目前仍存在较多待发现的潜在新种。由荧光定量 PCR 结果可知, 棉花黄萎病棉株内生古菌在不同生育期含量不同, 在棉花植株生育期呈

现先增加后减少的趋势,而且增加和减少的幅度较大,蕾期达到最高值,最高值为精河 1.33×10^7 copies/g-FRW;不同典型生态区的棉花黄萎病株内生古菌含量也不同,其中北疆地区最高。健康棉花植株内生古菌在不同生育期整体上的变化趋势与黄萎病株相同,于蕾期达到最高值,其中最高值为库尔勒 1.33×10^7 copies/g-FRW,不同典型生态区中南疆地区数量较高。整体上健康棉株与病株在整个生育期变化趋势相同,说明棉花根部内生古菌的数量变化与棉花的不同生育期是密切相关的,于蕾期达到最高值可能是因为随着苗期至蕾期的生长发育,内生古菌协同增长,于蕾期至花期快速下降可能是因为此时黄萎病进入中后期阶段,病原菌棉株内大量增殖,形成空间和营养条件的不足与恶化,导致内生古菌数量锐减。棉株黄萎病发生后内生古菌的数量变化情况为:苗期健康棉株>病株(石河子、乌苏、库尔勒、图木舒克),苗期健康棉株<病株(精河、阿拉尔、哈密);蕾期健康棉株>病株(库尔勒、哈密),蕾期健康棉株<病株(石河子、乌苏、精河、图木舒克、阿拉尔);花期健康棉株>病株(石河子、乌苏、精河、阿拉尔),花期健康棉株<病株(库尔勒、图木舒克、哈密);吐絮期健康棉株>病株(石河子、库尔勒),吐絮期健康棉株<病株(乌苏、精河、图木舒克、阿拉尔、哈密)。由此可知,不同地区与生育期的黄萎病发生所带来的内生古菌数量变化趋势不一,可能是与不同时空的地理位置和气候条件不同带来的植株内部微生物状态和所处外部环境差异有关,相关成因仍需进一步研究。本文基于高通量测序确定内生古菌在棉花健康棉株和黄萎病棉株内的分类学信息,以荧光定量检测其时空变化规律,以期为后续研究提供理论支持。

4 结论

本实验通过高通量测序技术表明内生古菌在新疆不同地区(南疆、北疆、东疆)和不同生育期(苗期、蕾期、花期、吐絮期)的患黄萎病棉株、健康棉

株内的群落组成相似,患病棉株在苗期和南疆库尔勒较健康棉株群落结构更为丰富。用实时荧光定量PCR技术定量检测新疆不同地区 and 不同生育期的患黄萎病棉株、健康棉株内生古菌的数量,分析其数量变化规律发现,就整体而言,新疆棉花黄萎病棉株、健康棉株内生古菌数量在不同生育期变化趋势类似:呈先大幅升高(苗期至蕾期),而后几乎相同趋势降低(蕾期至花期),然后趋于平缓的趋势(花期至吐絮期),其中蕾期的古菌数量最高,不同地区病株呈现出从南疆、东疆、北疆依次升高的变化趋势,健康棉株表现为北疆、东疆、南疆依次升高的变化趋势。

REFERENCES

- [1] Zhang D, Xie L, Zhang LP, et al. Study on biological control of cotton verticillium wilt[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2007, 35(11): 3302-3303,3357 (in Chinese)
张铎, 解莉, 张丽萍, 等. 棉花黄萎病生物防治研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(11): 3302-3303,3357
- [2] Liu AH, He QC, Hu H. Study on the model of high-yielding and -efficiency potato culture[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2006, 34(12): 2711-2712,2714 (in Chinese)
刘爱华, 何庆才, 胡辉. 马铃薯高产高效栽培模型研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(12): 2711-2712,2714
- [3] Lin L, Zhang X, Deng S. Research advances in cotton verticillium wilt[J]. Cotton Science, 2014, 26(3): 260-267 (in Chinese)
林玲, 张昕, 邓晟. 棉花黄萎病研究进展[J]. 棉花学报, 2014, 26(3): 260-267
- [4] Liang H, Huang J, Zhao J, et al. Studies on biocontrol of cotton verticillium wilt[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(5): 1-6 (in Chinese)
梁宏, 黄静, 赵佳, 等. 生物防治棉花黄萎病的研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(5): 1-6
- [5] Jian GL, Zou YF, Ma C. Causes and countermeasures of cotton verticillium wilt[J]. China Cotton, 2003, 30(3): 13-14 (in Chinese)
简桂良, 邹亚飞, 马存. 棉花黄萎病连年流行的原因及对策[J]. 中国棉花, 2003, 30(3): 13-14
- [6] Liu Z, Li Y, Sun Y, et al. Diversity of endophytic bacterial communities in cotton roots infected by *Verticillium dahliae*[J]. Cotton Science, 2016, 28(2): 170-178 (in Chinese)
刘政, 李燕, 孙艳, 等. 重病田和无病田棉花根组织中细

- 菌群落结构的差异[J]. 棉花学报, 2016, 28(2): 170-178
- [7] Zhao M, Zhou Y, Ma H, et al. Research review of biological control on cotton verticillium wilt[A]//Cotton Branch of Chinese Society of Agronomy. 2007 Annual Meeting of China Cotton Society Paper Compilation[C]. Qingdao: China Cotton Association, 2007 (in Chinese)
赵鸣, 周玉, 马惠, 等. 棉花黄萎病的生物防治研究进展[A]//中国农学会棉花分会. 中国棉花学会 2007 年年会论文汇编[C]. 青岛: 中国棉花学会, 2007
- [8] Zhao LF, Li ZS, Zhang HS, et al. Resource identification of cotton germplasm to verticillium wilt and selection of resistance variety[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2007, 22(S2): 254-256 (in Chinese)
赵丽芬, 李增书, 张寒霜, 等. 棉花黄萎病种质资源鉴定及抗性品种选择[J]. 华北农学报, 2007, 22(S2): 254-256
- [9] Zhang XH, Tian SR, Li J, et al. Comparison of resistance to Verticillium wilt between transgenic cotton with double disease-resistant genes (*Chi+Glu*) and other cotton varieties with different traits[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2012, 24(2): 61-63 (in Chinese)
张兴华, 田绍仁, 李捷, 等. 转双价抗病基因(*Chi+Glu*)棉和多种不同性状棉抗黄萎病性比较[J]. 江西农业学报, 2012, 24(2): 61-63
- [10] Qiao YY, Zhang XH, Li J, et al. Screening of cotton varieties (Lines) resistant to Verticillium wilt[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2013, 25(5): 66-68 (in Chinese)
乔艳艳, 张兴华, 李捷, 等. 抗黄萎病棉花品种(系)的筛选[J]. 江西农业学报, 2013, 25(5): 66-68
- [11] Liu YY, Pang XB, Li G, et al. Screening for bio-control bacteria against cotton verticillium wilt and detection of volatile antimicrobial substances[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2019, 28(5): 820-829 (in Chinese)
刘元元, 庞学兵, 李国, 等. 棉花黄萎病生防菌的筛选及挥发性抑菌物质检测[J]. 西北农业学报, 2019, 28(5): 820-829
- [12] Wang N, Tao W, Chen SL, et al. Colonization trends of endophytic bacteria in cotton and their biological control effect on cotton verticillium wilt[J]. Journal of Plant Protection, 2016, 43(2): 207-214 (in Chinese)
王娜, 陶伟, 陈双林, 等. 植物内生细菌在棉花体内的定殖动态及对棉花黄萎病的生物防治效果[J]. 植物保护学报, 2016, 43(2): 207-214
- [13] Li CH, Deng YY, Zhao MW, et al. Population dynamics and antagonism toward *Fusarium oxysporium* f. sp. *Vasinfestum* and *Verticillium dahliae* Kleb of endophytic bacteria from cotton[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(9): 1196-1202 (in Chinese)
李春宏, 邓渊钰, 赵明文, 等. 棉花内生细菌数量动态及其对棉花黄、枯萎病菌的拮抗作用[J]. 微生物学报, 2009, 49(9): 1196-1202
- [14] Tang L, Zhang YJ, Wu XL. Bacterial and archaeal community structure in rhizosphere soil planting Bt transgenic cotton[J]. Acta Pedologica Sinica, 2007, 44(4): 717-726 (in Chinese)
唐黎, 张永军, 吴晓磊. 转 Bt 基因棉花根际细菌与古菌群落结构分析[J]. 土壤学报, 2007, 44(4): 717-726
- [15] Li SG, Pi YD, Zhang CL. The study of archaea: a review and perspectives[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2007, 37(8): 830-838 (in Chinese)
李曙光, 皮昀丹, Zhang CL. 古菌研究及其展望[J]. 中国科学技术大学学报, 2007, 37(8): 830-838
- [16] Deng F. Research progress of archaea[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(28): 11-14, 47 (in Chinese)
邓霏. 古菌研究进展[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(28): 11-14, 47
- [17] Fuhrman JA, McCallum K, Davis AA. Novel major archaeobacterial group from marine plankton[J]. Nature, 1992, 356(6365): 148-149
- [18] DeLong EF. Archaea in coastal marine environments[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(12): 5685-5689
- [19] Qin XW, Li FX, Hu FZ. Quality control procedures of soybean casein agar medium (TSA)[J]. Medical Equipment, 2015, 28(17): 33-34 (in Chinese)
秦霄雯, 李凤霞, 胡方峥. 大豆酪蛋白琼脂培养基(TSA)质量控制程序[J]. 医疗装备, 2015, 28(17): 33-34
- [20] Pan XJ, Jiao NZ. Advances in research of marine archaea[J]. Marine Sciences, 2001, 25(2): 20-23 (in Chinese)
潘晓驹, 焦念志. 海洋古菌的研究进展[J]. 海洋科学, 2001, 25(2): 20-23
- [21] Neogi SB, Chowdhury N, Asakura M, et al. A highly sensitive and specific multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51(3): 293-300
- [22] Pei ZH, Shi SG, Niu ZY, et al. Comparative study of three quantitative methods for periodontal bacteria quantification[J]. Beijing Journal of Stomatology, 2012, 20(6): 327-330 (in Chinese)
裴振华, 施生根, 牛忠英, 等. 三种牙周细菌定量方法的比较[J]. 北京口腔医学, 2012, 20(6): 327-330
- [23] Wei S, Wang TJ, Long Y, et al. Multiplex enrichment quantitative PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(23): 4619-4627 (in Chinese)

- 魏霜, 汪天杰, 龙阳, 等. 多重富集定量 PCR (ME-qPCR) 同时检测 4 种食源性病原弧菌[J]. 中国农业科学, 2016, 49(23): 4619-4627
- [24] Xiao R, Yu ZZ, Elsharawy AA, et al. SYBR Green I real time RT-PCR assay for quantitatively detecting the occurrence of *Verticillium dahliae* of cotton in naturally infested soil[J]. *Mycosystema*, 2011, 30(4): 598-603 (in Chinese)
- 肖蕊, 余真真, Elsharawy AA, 等. 土壤中棉花黄萎病菌 SYBR Green I 荧光 RT-PCR 定量检测技术研究[J]. 菌物学报, 2011, 30(4): 598-603
- [25] Liu YC, He Z, Zhang S, et al. Development and application of a fluorescent quantitative real-time PCR technique for detection of methane-oxidizing bacteria in oil and gas field soil[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(6): 1071-1081 (in Chinese)
- 刘雅慈, 何泽, 张胜, 等. 油气田土壤甲烷氧化菌实时荧光定量 PCR 检测技术的建立与应用[J]. 微生物学通报, 2014, 41(6): 1071-1081
- [26] Li DM, Liu YY, Du PC, et al. Detection of *Bartonella bacilliformis* by real-time PCR with TaqMan-MGB probe[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(2): 427-435 (in Chinese)
- 栗冬梅, 刘云彦, 杜鹏程, 等. 实时荧光定量 TaqMan-MGB 探针法检测杆菌样巴尔通体[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 427-435
- [27] Sun XK. Application of fluorescence quantitative PCR in biological control of soil-borne diseases[J]. *Jilin Agricultural*, 2010(5): 25 (in Chinese)
- 孙显科. 荧光定量 PCR 技术在土传病害生物防治中的应用研究[J]. 吉林农业, 2010(5): 25

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 我刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者专业和研究背景的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。