

基于宏基因组测序的植物叶表微生物富集及 DNA 提取方法

张雨函¹ 范熠¹ 李婷婷¹ 庞爽¹ 刘为¹ 白可喻² 张西美¹

(1. 中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081; 2. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 国际生物多样性中心东亚办事处, 北京 100081)

摘要: 获得高质量的微生物基因组 DNA 是进行复杂微生物群落宏基因组学研究的基础和难点。植物叶表是一个微生物多样性丰富的复杂生态系统, 这些微生物群落可以调节叶片功能性状, 影响植物的适应性。深入了解叶表微生物群落的基本结构和功能原理, 有助于在促进植物生长和植物保护方面发挥重要的应用价值。由于叶表严苛的环境, 导致富集叶表微生物难度较大, 严重限制了高质量叶表微生物基因组 DNA 的提取。基于现有 DNA 提取方法, 加入表面活性剂 Silwet L-77 进行前处理, 同时循环利用洗脱液, 加强叶表微生物的富集, 以提高叶表微生物的获取量。结合商业试剂盒方法进行提取得到高纯度、高浓度的基因组 DNA。经过质量控制和建库测序验证, DNA 质量达到宏基因组建库的要求。通过此方法可以提高叶表微生物分离和收集效率的方法, 提高叶表微生物 DNA 提取成功率, 为应用高通量测序技术研究叶表微生物组成和其他植物分子生物学研究提供参考。

关键词: 叶表微生物; Silwet L-77; DNA 提取; 宏基因组测序; 质量控制

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-0550

Microbial Enrichment on Leaf Surface and DNA Extraction Method Based on the Metagenomics Sequencing

ZHANG Yu-han¹ FAN Yi¹ LI Ting-ting¹ PANG Shuang¹ LIU Wei¹ BAI Ke-yu² ZHANG Xi-mei¹

(1. Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; 2. Alliance of Bioversity International and CIAT, Beijing Office, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Obtaining high-quality total genomic DNA of microbial community is the basis and difficulty in the study of metagenomics of complex microbial communities. The plant leaf surface is a complex ecosystem with abundant microbial diversity, and the microbial community mediates leaf functional traits and affects plant adaptability. An in-depth understanding of the basic structure and functional principle of the microbial community on leaf surface will contribute to the applications of promoting plant growth and plant protection. Due to the harsh living environment of leaf surface, it is difficult to enrich microorganisms on leaf surface, which severely limits the extraction of high-quality genomic DNA of microorganisms on leaf surface. Based on the existing DNA extraction method, the surfactant Silwet L-77 was added for pretreatment, and the eluent was recycled, which increased the enrichment of microorganisms on leaf surface. The genomic DNA with high purity and concentration was extracted in combination with commercial kit methods. After quality control and library building sequencing as verification, DNA quality met the requirements for metagenomic library construction. This method may improve the enrichment and collection efficiency of microorganisms on leaf surface, increase the success rate of DNA extraction of microorganisms on leaf surface, and provide a reference for applying high-throughput sequencing technology to study the composition of microorganisms on surface and molecular biology research of plants.

Key words: microorganism on leaf surface; Silwet L-77; DNA extraction; metagenome sequencing; quality control

收稿日期: 2021-04-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32071547)

作者简介: 张雨函, 女, 硕士研究生, 研究方向: 农业水土环境; E-mail: zhangyh202102@163.com

通讯作者: 张西美, 男, 研究员, 研究方向: 微生物多样性与生物地理学; E-mail: zhangximei@caas.cn

叶表生境广阔,总表面积估计超过 $4 \times 10^8 \text{ km}^2$,植被模型估计的叶子总表面积大约是陆地表面积的两倍^[1],是陆生微生物的一个巨大且极其多样化的栖息地,也是地球上最大的微生物栖息地之一。叶表面的环境是复杂而动态的,叶表微生物在这样极端、紧张和变化的环境中仍有着丰富的多样性^[2],叶表面的微生物相互作用可以影响植物种群在自然生态系统中的适应性。叶表微生物不仅促进植物生长发育,还可以抑制病原菌的入侵和定殖,对植物有着重要的保护作用^[3]。由于植物的空中部分是不适宜微生物生存的开放系统,这些微生物极易受到各种环境条件和营养缺乏的影响,不同分类群的微生物在植物叶表面的数量波动变化很大^[4],导致对叶表微生物群落的组成和功能等基本问题仍然没有清晰的认知。研究表明叶表微生物群落较为复杂^[5],特别是通过与植物的相互作用进而影响整个生态环境系统,叶表微生物群落及其对植物生长、发育和保护的重要作用已经受到了人们的广泛关注^[6]。因此尽可能多地保留微生物多样性可以更好地理解生物多样性的结构、功能和生态多样性^[7]。

由于叶表微生物基因组 DNA 的提取难度较大,叶表微生物在推动生态系统功能和植物群落动态方面作用的研究较少。一直以来,人们对叶表微生物的认识是建立在纯培养的基础上,对叶表微生物多样性的认识不够深入。Yang 等^[5]采用培养和非培养方法对 7 种不同植物的叶表微生物群落进行了评价,结果表明与不依赖培养的方法相比,传统的基于培养的方法无法检测到大多数优势的叶表微生物。测序技术和生物信息学的快速发展为微生物生态学领域带来革命性的影响,以扩增子测序和宏基因组测序为代表的非培养测序技术极大地增强了对叶表微生物群落多样性和结构的评估。扩增子测序局限于研究物种的群落组成、物种间的进化关系和群落多样性^[8],无法对微生物的功能做出解释,而宏基因组测序通过环境 DNA 构建克隆文库,可以得到生态环境中的全部微生物基因的总和,包括可培养的和不可培养的微生物基因的总和^[9],提供叶表微生物分类群和功能更为准确的描述^[7, 10],帮助我们理解微生物与宿主和环境的联系和微生物组的整体功能^[11],进而可以开发新的叶表微生物资源。宏基因

测序同样为微生物物种鉴定开辟了新的研究途径,它能够对复杂环境背景下的基因组异质性和进化进行分析,并提供了远比在培养皿中观察到的微生物多样性更多的途径^[12-13]。目前,宏基因组学作为迄今为止最全面地了解微生物群落特征、最大限度地挖掘微生物资源的一种方法,已经成为了国际上微生物生态学主要的研究手段。到目前为止,宏基因组学研究已经开展了多种常见环境(如土壤、水等)和极端环境(如冰川、间歇泉等)的研究^[14],但是对自然生态中的各种植物的叶表微生物在生态系统中的功能和作用尚不清楚。

宏基因组学研究的第一步是直接从生活在特定环境中的所有微生物中提取出高质量、完整的微生物基因组 DNA^[15-16]。宏基因组数据的质量和准确性依赖于可靠的取样和 DNA 提取程序^[17]。取样的关键是收集到足够的微生物进行测序,为了保证获取足够的叶表微生物基因组 DNA,需要对叶表微生物进行有效的分离。已有的研究在改进 DNA 提取过程中,一般只涉及 DNA 的提取过程^[18],很少重视对叶表微生物的富集和前处理,对此本研究将目标集中在收集叶表微生物细胞的过程,尤其是对洗脱液的选择。对于洗脱液的选择,主要有磷酸缓冲液和无菌水^[19]等,不同洗脱液对于不同植物叶表微生物的洗脱效果没有统一的结论。由于微生物细胞通常附着在表面上,并可能被整合成生物膜^[20],使用磷酸缓冲液或无菌水作为洗脱液的方法无法洗脱形成生物膜的细胞,可能会导致样本微生物 DNA 的质量不佳,叶表微生物 DNA 总量不够。为了解决叶表微生物多样性丰富但可获取的数量少这一难点,本研究通过改良洗脱液成分,通过洗脱并收集更多的叶表微生物,以提高对叶表微生物 DNA 的提取质量。通过此方法能够提高叶表微生物 DNA 的提取效率,进而提高宏基因组文库构建的成功率,促进叶表微生物宏基因组学研究的发展。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究选取内蒙古呼伦贝尔草原常见的 6 种草本植物,分别为羊草(*Leymus chinensis* (Trin.) Tzel.)、叉分蓼(*Polygonum divaricatum* L.)、冷蒿

(*Artemisia frigida* Willd.), 马蔺 (*Iris lactea* Pall. var. *chinensis* (Fisch.) Koidz.), 披针叶黄华 (*Thermopsis lanceolata* R. Br.), 野韭 (*Allium ramosum* L.)。分别取其植物叶片, 放于灭菌的封口袋, 每袋大约 180 g, 每种 10 袋。迅速将样品转移到实验室, 存放于 -20℃ 冰箱。

1.2 方法

1.2.1 植物叶表微生物的分离和收集 (1) 实验以无菌水作为对照, 添加表面活性剂 Silwet L-77 的 PBS 缓冲液 (PBS+ Silwet L-77) 为处理。配置 PBS 磷酸缓冲盐溶液 (1×PBS: 137 mmol/L NaCl, 10 mmol/L phosphate, 2.7 mmol/L KCl, pH 7.4), 在每 1 000 mL 的 PBS 缓冲液中加入 200 μL 表面活性剂 Silwet L-77 (GE Bayer Silicones), 分别称取大约 30 g 叶片置于 2 个 500 mL 无菌玻璃瓶中, 分别加入一定量的可以淹没叶片的无菌水和 PBS+ Silwet L-77, 200 r/min 振荡 20 min, 将微生物细胞从叶上清洗掉, 取出叶片, 留下含有菌泥的洗脱液, 每组处理重复 2 次。(2) 将余下的植物样品采用的同样的方法, 循环利用洗脱液进行振荡, 以此循环, 直至将叶片全部洗完。这样可以保证叶表微生物更好的富集在一起。(3) 将洗脱液通过 100 μm 大小的细胞过滤器过滤到 50 mL 离心管中, 5 000×g 离心 10 min, 弃去上清液, 所得沉淀存于 -80℃ 冰箱, 用于 DNA 的提取。

1.2.2 植物叶表微生物 DNA 的提取与检测 使用 MoBio PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit 按照说明进行叶表基因组 DNA 的提取。为了获得足够量的 DNA 用于宏基因组测序, 将洗脱下来的沉淀全部用于 DNA 的提取 (每个重复 0.25 g 沉淀物)。每个重复最终得到的 DNA 即为用 100 μL 纯水洗脱下来的 DNA。用 Thermo NanoDrop2000 分光光度计测定各样本 DNA 的浓度及 A₂₆₀/A₂₈₀ 值。将使用不同洗脱液进行前处理收集得到的菌泥提取到的叶表微生物宏基因组 DNA 送到上海美吉生物医药科技有限公司, 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取质量, 判断哪一种分离和收集叶表微生物的方法提取得到的基因组 DNA 可以满足宏基因组建库的要求。

1.2.3 宏基因组测序 选取满足宏基因组建库的叶

表微生物基因组 DNA 样品进行鸟枪法宏基因组测序。准备用于测序的 DNA 库, 根据 Illumina 配对端准备试剂盒的描述对 DNA 提取液进行处理。机械剪切 DNA, 大小选择至 ~180 bp, 纯化凝胶。测序是在上海美吉生物医药科技有限公司的 Illumina HiSeq 2000 平台上进行的。

1.2.4 数据质控 为了提高后续分析的可靠性和质量, 对原始序列数据进行了以下两步处理。首先, 使用 fastp (<https://github.com/OpenGene/fastp>, version 0.20.0) 对 reads 3' 端和 5' 端的 adapter 序列进行质量剪切。其次使用 fastp (<https://github.com/OpenGene/fastp>, version 0.20.0) 去除剪切后长度小于 50 bp、平均碱基质量值低于 20 以及含 N 碱基的 reads, 保留高质量的 pair-end reads 和 single-end reads。

1.2.5 叶表微生物 COG 功能注释 使用 FLASH 对宏基因组的配对序列进行拼接, 将拼接序列上传到 STRING 数据库, 并使用 MBLASTX (E-value cutoff 1e⁻⁶) 对蛋白质序列进行直系同源聚类 (clusters of orthologous groups of proteins, COG) 功能注释, 并将注释结果进行分类统计。

2 结果

2.1 植物叶表微生物总DNA质量评估

宏基因组一次建库浓度/总量标准: 浓度 ≥ 10 ng/μL, 文库构建需要总量 5–10 μg 的环境 DNA。由表 1 可知以 PBS+ Silwet L-77 为洗脱液分离收集得到的植物叶表微生物 DNA 的浓度都大于 20 ng/μL 且总量都大于 5 μg, 能够满足宏基因组建库的要求。以无菌水作为洗脱液得到的叶表微生物最终获得的 DNA 浓度较低且总量不满足宏基因组文库构建所需的环境 DNA 总量。通常用 A₂₆₀/A₂₈₀ 检测 DNA 的纯度, 通过两种方法得到的每种植物叶表微生物 DNA 的 OD_{260/280} 在 1.8–2.0 之间, 说明 DNA 纯度都满足建库要求 (表 1)。对植物种类和提取方法对叶表微生物 DNA 浓度的方差分析结果表明, 植物种类对微生物 DNA 浓度无影响, 提取方法显著影响叶表微生物 DNA 浓度 (表 2), 以 PBS+ Silwet L-77 为洗脱液分离收集得到的植物叶表微生物 DNA 的浓度明显大

于以无菌水为洗脱液分离收集得到的 DNA 的浓度 (图 1)。琼脂糖凝胶电泳图 (图 2) 显示, 以 PBS+ Silwet L-77 为洗脱液分离和收集得到的叶表微生物最终得到的 DNA 质量, DNA 主带 ≥ 5 kb, DNA 溶液无严重 RNA、蛋白、糖类杂质污染, 而以无菌水作为洗脱液最后提取出来的 DNA 质量; 胶图条带弥散, DNA 溶液无严重 RNA、蛋白、糖类杂质污染,

DNA 浓度和总量较低, 不满足宏基因组建库需求。综上所述, 用无菌水洗脱得到微生物较少, 提取效率不高, 提取得到植物叶表微生物 DNA 浓度和质量不满足宏基因组建库标准, 以 PBS+ Silwet L-77 作为洗脱液所提取微生物相对较多, 提取效率高, 提取得到植物叶表微生物 DNA 都相对完整且 DNA 总量满足宏基因组标准建库需求。

表 1 无菌水和 PBS 缓冲液 +Silwet L-77 表面活性剂对叶表微生物基因组 DNA 的提取效果

Table 1 Extraction effect of sterile water and PBS buffer solution +Silwet L-77 surfactant on microbial genomic DNA from leaf surface

样品名称 Sample name	无菌水 Sterile water			PBS+Silwet L-77		
	DNA 浓度 DNA concentration/ (ng·μL ⁻¹)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	质量 Mass/μg	DNA 浓度 DNA concentration/ (ng·μL ⁻¹)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	质量 Mass/μg
LC	14.43 ± 2.79	1.86	2.94	40.08 ± 10.29	1.82	19.30
PD	13.61 ± 7.52	1.91	1.44	74.25 ± 5.77	1.96	19.85
AF	11.51 ± 2.33	1.84	1.15	49.55 ± 0.21	1.93	7.44
IL	19.51 ± 8.13	1.89	1.95	64.42 ± 13.03	1.93	34.97
TL	18.75 ± 3.61	1.99	1.78	35.45 ± 7.42	1.81	22.28
AR	18.14 ± 3.87	1.97	1.81	44.93 ± 31.67	1.96	30.31
All	15.99 ± 4.95	1.93	1.63	51.44 ± 18.10	1.86	22.36

注: LC、PD、AF、IL、TL 和 AR 和分别是羊草、叉分蓼、冷蒿、马蒿、披针叶黄华和野韭。下同
Note: LC, PD, AF, IL, TL and AR are *L. chinensis* (Trin.) Tzvel., *P. divaricatum* L., *A. frigida* Willd., *I. lactea* Pall. var. *chinensis* (Fisch.) Koidz., *T. lanceolata* R. Br., and *A. ramosum* L., respectively. The same below

表 2 植物种类与不同富集方法对 DNA 浓度的影响

Table 2 Effects of plant species and different enrichment methods on DNA concentration

	Df	F value	Pr (>F)
富集方法 Enrichment method	1	59.11	P<0.05
植物种类 Plant species	5	1.71	0.21
富集方法: 植物种类 Enrichment method: Plant species	5	1.96	0.16
残差 Residual	12	NA	NA

2.2 宏基因组测序结果

以 PBS+ Silwet L-77 为提取叶表微生物的洗脱液获取的 DNA 作为最终样品进行宏基因组测序。通过数据质量控制, 过滤掉低质量序列、接头序列等杂质, 得到的 Clean reads 占比在 98% 以上 (表 3), 表明原始数据的质量较高。综合各项指标确定在这 6 种植物的叶表提取得到用于宏基因组测序的 DNA 质量合格, 满足建库标准, 可以进行下游的生物信息学分析和统计学分析。经过宏基因组测序, 最终得到

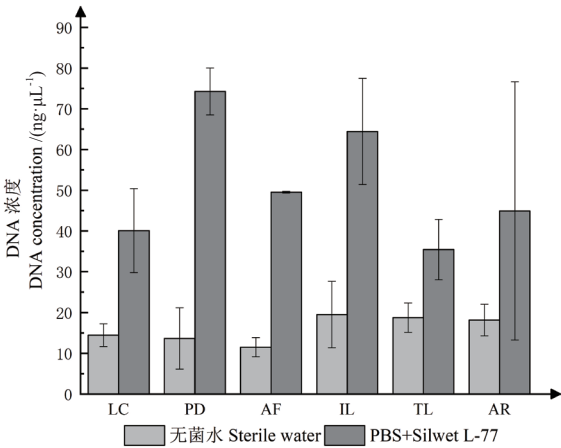
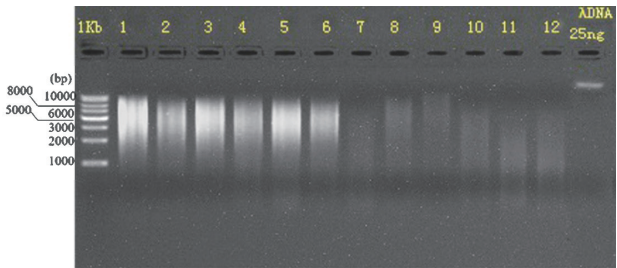


图 1 不同洗脱液提取不同植物种类叶表微生物的 DNA 浓度

Fig. 1 DNA concentration of leaf surface microorganism extracted from different plant species by different eluents

叶表微生物的各个分类群占叶表微生物群的相对比例 (图 3)。结果显示这 6 种植物的叶表微生物中的



1-6 和 7-12 分别是羊草、叉分蓼、冷蒿、马蔺、披针叶黄华和野韭, 1-6 以 PBS+ Silwet L-77 为洗脱液, 7-12 以无菌水为洗脱液
1-6 and 7-12 were *L. chinensis* (Trin.) Tzvel., *P. divaricatum* L., *A. frigida* Willd., *I. lactea* Pall. var. *chinensis* (Fisch.) Koidz., *T. lanceolata* R. Br. and *A. aramosum* L. PBS+ Silwet L-77 as eluent for 1-6, and sterile water as eluent for 7-12, respectively

图 2 六种植物叶表微生物 DNA 电泳图

Fig. 2 Microbial DNA electrophoresis patterns on the leaf surfaces of 6 plants

表 3 宏基因组测序统计

Table 3 Metagenomics sequencing statistics

样品名称 Sample name	Clean reads	Clean base/bp	Percent in raw reads/%	Percent in raw bases/%
LC	84554592	12743415315	99.08 ± 0.12	98.89 ± 0.26
PD	76636682	11558890595	98.97 ± 0.04	98.86 ± 0.09
AF	70985020	10682348648	98.70 ± 0.10	98.36 ± 0.14
IL	77764022	11727532109	99.11 ± 0.08	98.97 ± 0.11
TL	87048063	13081919500	98.93 ± 0.08	98.47 ± 0.24
AR	80930005	12202864242	98.82 ± 0.69	98.67 ± 0.74

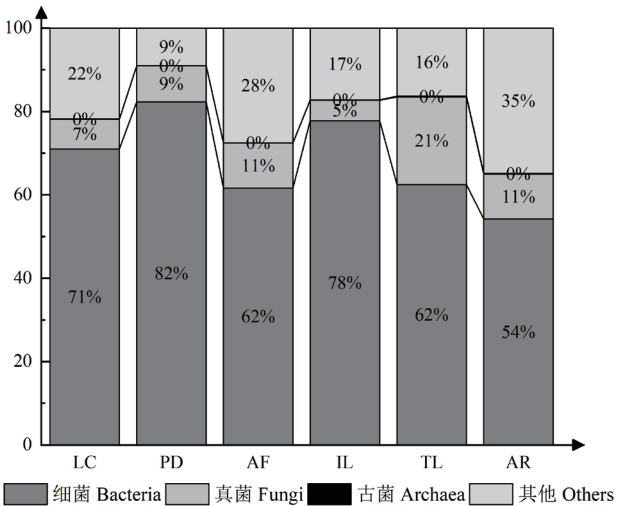


图 3 六种植物叶表微生物不同分类群的百分比

Fig. 3 Percentages of different taxa microorganism on the leaf surfaces of 6 plants

细菌在全基因组测序中占比达到了一半以上, 说明叶表微生物群落主体由细菌组成, 其次为真菌, 古菌最少, 几乎没有, 其他的非微生物的比例说明可能存在植物 DNA 污染。

与扩增子测序分析相比, 宏基因组学分析不仅能够进行物种注释, 还能够通过比对多个功能数据库, 进行功能注释, 揭示微生物群落的功能多样性和功能潜力。为了揭示优化方法后提取建库得到的叶表 DNA 宏基因组测序数据的质量, 在物种注释的基础上, 宏基因组分析通过比对直系同源聚类 (COG) 进行功能注释分析。通过 BLAST 将宏基因组拼接组装序列与 COG 数据库进行比对分析, COG 功能分类富集结果如图 4 所示, 说明宏基因组建库可以满足

物种注释和功能注释的需求, 达到揭示微生物群落功能多样性的研究目的, 进而表明以 PBS+ Silwet L-77 为洗脱液收集得到 DNA 可以通过宏基因组测序对植物的叶表微生物进行功能研究。

3 讨论

本研究以提高叶表微生物的收集和分离为目的, 只有获取足够多的叶表微生物, 才可能进一步提高 DNA 的获得量。进行 DNA 提取工作的第一步是将微生物从叶片中分离出来, 超声和震荡技术已用于这一目的, 但由于操作较为剧烈往往不容易得到大片段 DNA^[21]。稳定的大片段基因组文库能保证基因簇的完整性, 更利于目的基因的结构和功能分析^[22], 因此大片段 DNA 的提取是建立高质量宏基因组文库的关键。超声波利用声波产生高速、强烈的空化效应和搅拌作用会破坏植物细胞^[22], 为此本

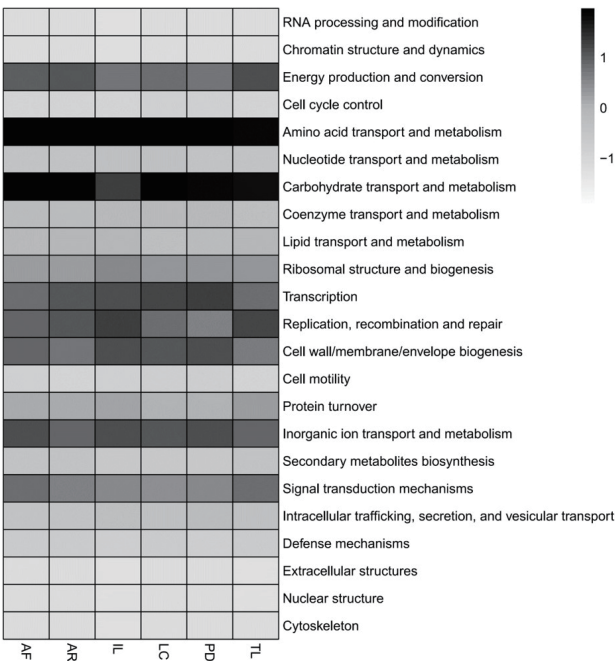


图 4 六种植物叶表微生物 COG 功能注释

Fig. 4 Functional annotation of microorganism COG on the leaf surfaces of 6 plants

研究只采用恒温摇床震荡，而没有选择超声波震荡。

由于叶片形态差异，叶片的结构和表面化学构成了一个特殊的微环境^[6]，各种叶片表面特征，如表皮细胞连接处形成的凹陷处、沿静脉和毛状体基部都被确定为微生物的优先附着位置^[2]，导致微生物在叶片表面的分布不均匀。之前研究表明无菌水和磷酸缓冲液这两种洗脱液对叶表微生物基因组 DNA 提取效果基本没有差别^[19]，目前多采用的是使用磷酸缓冲盐溶液作为洗脱液来获取叶表微生物^[23]。相较于无菌水，PBS 磷酸盐缓冲液具有盐平衡、可调整的适宜 pH 缓冲作用，可以使完整的、具有活性的微生物细胞保持其特性，面对复杂的叶表环境，微生物需要形成聚集体以及分泌生物活性化合物来克服这一困难^[2]。只使用 PBS 磷酸盐缓冲液不足以使我们获得足够多的叶表微生物。叶片最外侧的蜡质层具有疏水性，普通缓冲液的很难使叶面湿润，而表面活性剂可以降低溶液与叶表蜡质层之间的界面张力^[24]，使叶片更易被润湿，从而能更有效的收集叶表微生物。已有研究采用含有 0.01% Tween-80 的 PBS 缓冲液富集黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 叶片表

面的微生物^[25]，由于水的表面张力为 72.4 mN/m，0.1% 的 Silwet-L77 系列有机硅溶液的表面张力约为 21 mN/m^[26]，0.1% 的 Tween 80 水溶液的表面张力约为 48.21 mN/m^[27]，相比 Tween-80，Silwet L-77 更能降低水的表面张力。Silwet L-77 是一种高效有机硅表面活性剂，具有很强的表面活性，可以在难以湿化的表面迅速扩散，几乎可轻易湿润所有种类的叶面，增加叶子湿润性，产生的水膜可以让微生物在叶子表面活动起来^[26, 28]，促进微生物在叶平面上的运动，在震荡的过程中更容易将微生物从叶表面洗脱下来。PBS 磷酸缓冲液结合表面活性剂 Silwet L-77 作为洗脱液被成功应用到根际微生物的提取中^[29]，但在叶表微生物上的应用几乎没有，因此选择在 PBS 磷酸缓冲液中加入表面活性剂 Silwet L-77 提高对叶表微生物的富集。由于根系上会附着很多的土壤颗粒，很容易就可以得到足够的菌泥来获得足够量的根际微生物基因组 DNA，而植物叶片表面极少量的微生物以及形态各异的叶表皮环境增加了分离和收集叶表微生物的难度，需要大量的植物叶片才可富集得到足够的菌泥进行 DNA 提取^[30]。因此植物叶片样品的采集量也是获取足够叶表微生物基因组 DNA 的关键因素，由于采样量的限制，本研究每组处理做了两次重复，在以后的方法改进中需要注意。

目前，鸟枪法宏基因组测序仍然是适合研究叶表微生物的非培养方法，不仅可以对环境样本中存在的微生物进行分类^[31]，而且可以更深入地了解测序数据中识别出的微生物的结构、功能和代谢途径。对于叶表微生物，宏基因组测序可以实现物种注释和功能描述，通过增加测序深度和数据量，可以深度揭示植物叶表微生物群落，甚至是低丰度的但可能在生态系统功能中发挥重要作用的微生物也可以被发掘^[32]。宏基因组测序可以得到环境微生物的全基因组序列^[10]，能够全面显示样品中微生物群落的实际丰度和多样性。植物的叶表存在各种各样的微生物，包括细菌、古生菌、原生生物和真菌^[33]，具有高度的多样性和重要的生态学意义。本研究最终得到的每种植物叶表微生物的分类群在叶表微生物群中占比各不相同，可能是由于植物种类会影响叶

片的微生物携带能力。一直以来,大多数关于叶表微生物的研究大部分集中在细菌上,对叶表真菌的研究目前也有所增多,但叶表真菌和细菌很少被同时研究^[12],叶表很少有古菌,对叶表古菌的研究几乎没有。随着测序技术的进步,宏基因组测序可以对同一环境的所有微生物进行研究,打破迄今为止大多数与植物叶表微生物相关的研究只集中在单个微生物分类群(即细菌)的界限。通过 COG 功能注释,可以对基因功能进行预测,发掘微生物群落功能,对进一步揭示叶表微生物群落的结构和功能具有重要意义。

4 结论

本研究得到了一种可以更高效的分离和收集叶表微生物的方法,Silwet L-77 表面活性剂缓冲液的使用提高了叶表微生物的收集量,在震荡清洗的过程中,选择循环利用洗脱液,一方面可以节省实验成本,另一方面可以更好的富集叶表微生物。通过商业试剂盒提取得到的高纯度和高质量的 DNA,经过琼脂糖凝胶电泳,宏基因组测序、数据质控和功能注释的验证,此方法满足宏基因组建库的要求,并成功进行了宏基因组测序和建库。

参考文献

- [1] Zimmerman NB, Vitousek PM. Fungal endophyte communities reflect environmental structuring across a Hawaiian landscape [J]. PNAS, 2012, 109 (32): 13022-13027.
- [2] Vorholt JA. Microbial life in the phyllosphere [J]. Nat Rev Microbiol, 2012, 10 (12): 828-840.
- [3] 潘建刚, 呼庆, 齐鸿雁, 等. 叶际微生物研究进展 [J]. 生态学报, 2011, 31 (2): 583-592.
Pan JG, Hu Q, Qi HY, et al. Advance in the research of phyllospheric microorganism [J]. Acta Ecol Sin, 2011, 31 (2): 583-592.
- [4] Lindow SE, Brandl MT. Microbiology of the phyllosphere [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69 (4): 1875-1883.
- [5] Yang CH, Crowley DE, Borneman J, et al. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized [J]. PNAS, 2001, 98 (7): 3889-3894.
- [6] Chaudhry V, Runge P, Sengupta P, et al. Shaping the leaf microbiota: plant-microbe-microbe interactions [J]. J Exp Bot, 2021, 72 (1): 36-56.
- [7] Soni R, Kumar V, Suyal DC, et al. Metagenomics of plant rhizosphere microbiome [M] // Singh RP, Kothari R, Koringa PG, et al. Understanding host-microbiome interactions - an omics approach. Springer Singapore: Singapore, 2017: 193-205.
- [8] 张泽生, 王春龙, 刘清岱, 等. 扩增子测序技术分析红茶菌中优势微生物的研究 [J]. 食品研究与开发, 2016, 37 (16): 185-188.
Zhang ZS, Wang CL, Liu QD, et al. Study on analysis of the dominant microorganisms in kombucha by the technology of amplicon sequencing [J]. Food Res Dev, 2016, 37 (16): 185-188.
- [9] 田李, 张颖, 赵云峰. 新一代测序技术的发展和应 [J]. 生物技术通报, 2015, 31 (11): 1-8.
Tian L, Zhang Y, Zhao YF. The next generation sequencing technology and its applications [J]. Biotechnol Bull, 2015, 31 (11): 1-8.
- [10] 魏子艳, 金德才, 邓晔. 环境微生物宏基因组学研究中的生物信息学方法 [J]. 微生物学通报, 2015, 42 (5): 890-901.
Wei ZY, Jin DC, Deng Y. Bioinformatics tools and applications in the study of environmental microbial metagenomics [J]. Microbiol China, 2015, 42 (5): 890-901.
- [11] Zhang XM, Johnston ER, Barberán A, et al. Decreased plant productivity resulting from plant group removal experiment constrains soil microbial functional diversity [J]. Glob Change Biol, 2017, 23 (10): 4318-4332.
- [12] Laforest-Lapointe I, Whitaker BK. Decrypting the phyllosphere microbiota: progress and challenges [J]. Am J Bot, 2019, 106 (2): 171-173.
- [13] Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68 (4): 669-685.
- [14] Wang HX, Geng ZL, Zeng Y, et al. Enriching plant microbiota for a metagenomic library construction [J]. Environ Microbiol, 2008, 10 (10): 2684-2691.
- [15] National Research Council (US) Committee on Metagenomics Challenges. The new science of metagenomics [M]. Washington DC: National Academies Press, 2007.
- [16] Bag S, Saha B, Mehta O, et al. An improved method for high quality metagenomics DNA extraction from human and environmental samples [J]. Sci Rep, 2016, 6: 26775.
- [17] Schloss PD, Handelsman J. Metagenomics for studying unculturable

- microorganisms : cutting the Gordian knot [J] . *Genome Biol*, 2005, 6 (8) : 229.
- [18] 赵玲云, 范东颖, 李燕芳, 等. 枝干树皮宏基因组 DNA 的提取 [J] . *生物技术通报*, 2016, 32 (1) : 74-79.
- Zhao LY, Fan DY, Li YF, et al. The extraction of metagenom DNA in branch bark [J] . *Biotechnol Bull*, 2016, 32 (1) : 74-79.
- [19] 周育, 乔雄梧, 王静, 等. 植物叶际微生物提取方法研究 [J] . *植物研究*, 2006, 26 (2) : 2233-2237.
- Zhou Y, Qiao XW, Wang J, et al. Extraction methods of microorganisms from phyllosphere [J] . *Bull Bot Res*, 2006, 26 (2) : 2233-2237.
- [20] Schreiber L, Krimm U, Knoll D, et al. Plant-microbe interactions : identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability [J] . *New Phytol*, 2005, 166 (2) : 589-594.
- [21] 赵裕栋, 周俊, 何璟. 土壤微生物总 DNA 提取方法的优化 [J] . *微生物学报*, 2012, 52 (9) : 1143-1150.
- Zhao YD, Zhou J, He J. Optimization of soil microbial DNA isolation [J] . *Acta Microbiol Sin*, 2012, 52 (9) : 1143-1150.
- [22] 阳静, 张静, 邹伟, 等. 环境微生物 DNA 提取方法研究进展 [J] . *食品与机械*, 2017, 33 (3) : 207-210, 215.
- Yang J, Zhang J, Zou W, et al. Progress of study on extraction methods of environmental microbial DNA [J] . *Food Mach*, 2017, 33 (3) : 207-210, 215.
- [23] Kembel SW, O'Connor TK, Arnold HK, et al. Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest [J] . *PNAS*, 2014, 111 (38) : 13715-13720.
- [24] 逢森, 袁会珠, 李永平, 等. 表面活性剂 silwet408 提高药液在蔬菜叶片上润湿性能的研究 [J] . *农药科学与管理*, 2005, 26 (7) : 22-25, 19.
- Pang S, Yuan HZ, Li YP, et al. Study on the wetting property of surfactant Silwet408 on vegetable leaf surface [J] . *Pestic Sci Adm*, 2005, 26 (7) : 22-25, 19.
- [25] Luo L, Zhang Z, Wang P, et al. Variations in phyllosphere microbial community along with the development of angular leaf-spot of cucumber [J] . *AMB Express*, 2019, 9 (1) : 76.
- [26] 张丽, 郭佩瑶, 张春华, 等. 农杆菌介导的 eGFP 基因转化瓜叶菊技术体系的建立 [J] . *分子植物育种*, 2020, 18 (19) : 6350-6358.
- Zhang L, Guo PY, Zhang CH, et al. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation system of eGFP gene in *Pericallis hybrida* [J] . *Mol Plant Breed*, 2020, 18 (19) : 6350-6358.
- [27] 罗世地, 莫春生, 夏娇, 等. Tween 80 分子在气-液界面上的吸附动力学 [J] . *湛江海洋大学学报*, 2005, 25 (4) : 49-53.
- Luo SD, Mo CS, Xia J, et al. Adsorptive kinetics of aqueous tween 80 solutions at the air-water interface [J] . *J Zhanjiang Ocean Univ*, 2005, 25 (4) : 49-53.
- [28] Delmotte N, Knief C, Chaffron S, et al. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria [J] . *PNAS*, 2009, 106 (38) : 16428-16433.
- [29] Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, et al. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota [J] . *Nature*, 2012, 488 (7409) : 91-95.
- [30] Knief C, Delmotte N, Chaffron S, et al. Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice [J] . *Isme J*, 2012, 6 (7) : 1378-1390.
- [31] Fadji AE, Babalola OO. Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities : a review [J] . *J Microbiol Methods*, 2020, 170 : 105860.
- [32] Knief C. Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies [J] . *Front Plant Sci*, 2014, 5 : 216.
- [33] 高爽, 刘笑尘, 董铮, 等. 叶际微生物及其与外界互作的研究进展 [J] . *植物科学学报*, 2016, 34 (4) : 654-661.
- Gao S, Liu XC, Dong Z, et al. Advance of phyllosphere microorganisms and their interaction with the outside environment [J] . *Plant Sci J*, 2016, 34 (4) : 654-661.

(责任编辑 张婷婷)