

植物微生物组 DNA 提取扩增及溯源分析

DNA Extraction, Amplification and Source-tracking Analysis for Plant Microbiomes

熊超^{1,2}, 贺纪正^{1,2}, 张丽梅^{1,2*}

¹中国科学院生态环境研究中心, 城市与区域生态国家重点实验室, 北京, 100085

²中国科学院大学, 北京, 100049

*通讯作者邮箱: zhanglm@rcees.ac.cn

摘要: 植物微生物组在促进植物生长发育、养分吸收、病害抵御及环境胁迫适应等方面发挥重要作用。探究土壤-植物连续体上微生物组的群落组成及潜在来源可以进一步阐明植物微生物组群落构建的基本生态过程, 对认识和调控土壤、植物微生物组结构与功能, 促进农业可持续发展具有重要意义。本文主要围绕典型农田作物 (玉米、小麦和大麦) 微生物组研究涉及到的实验及分析方法进行介绍, 描述了植物不同部位样品的采集过程, 植物表面及内部微生物 DNA 提取的实验方法, 以及植物细菌及真菌微生物组的扩增测序及生物信息分析流程; 并着重讲解了植物微生物组来源模型构建及溯源分析的方法和过程。通过这些实验及分析方法的介绍, 以期将来植物微生物组的相关科学研究提供技术参考及思路。

关键词: 土壤-植物连续体, 作物微生物组, DNA 提取, 扩增测序, 植物-微生物互作, 菌群来源模型

材料与试剂

1. 一次性口罩、无菌手套及自封袋
2. 剪刀及铁铲/土钻
3. 酒精棉球
4. 冰袋、干冰及可移动保温箱/泡沫盒
5. 250 ml 无菌玻璃瓶及 50 ml 无菌离心管
6. 无菌缓冲液 (0.1 M 磷酸钾缓冲液, 含 0.1% 甘油, 0.15% 吐温 80, pH 7.0)
7. 0.22 μ m 滤膜 (直径 47 mm, Millipore)
8. 70%酒精、5.25%次氯酸钠溶液及无菌水

9. 液氮及无菌研钵
10. PowerSoil DNA 提取试剂盒
11. 799F/1115R 及 fITS7/ITS4 引物
12. QIAquick 纯化试剂盒

仪器设备

1. 4/-40/-80 °C 冰箱
2. 高压灭菌锅
3. 多联抽滤装置
4. 超声清洗仪
5. 摇床
6. 无菌工作台
7. DNA 提取及扩增相关设备 (如电子天平、细胞破碎仪、离心机、PCR 仪等)

软件

1. USEARCH v10
2. QIIME v1.91
3. SILVA 数据库及 UNITE 数据库
4. SourceTracker v1.0

实验步骤

一、植物和土壤样品采集

1. 采样前佩戴口罩及一次性无菌手套，不同小区间更换一次性手套，并使用酒精棉球对剪刀及铁铲/土钻进行消毒，避免交叉污染。
2. 以田间种植的玉米及小麦/大麦为例 (图 1. A)，每个小区随机选取约 5 株玉米及 20-30 株小麦/大麦，使用剪刀对每株植物中上部的 1-2 片健康叶 (各小区采集~50 g 叶片) 进行采集。
3. 用铁锹尽可能完整挖出植物的整个根系，先小心去除根上携带的大块土壤，然后剧烈抖动获取紧密附着在根系上的土壤作为根际土壤，然后使用剪刀对植物根系 (各小区采集~20 g 根) 进行采集。

4. 使用铁铲/土钻采集距离根系 20 cm 外的表层土 (0-15 cm) 作为非根际土壤, 每个小区进行 5 点取样, 混合均匀后作为一个生物重复。
5. 将采集得到的样品分装为分子样品 (如用于 DNA 提取的植物和土壤样品, 使用干冰进行运输) 及普通样品 (如土壤理化性质测定样品, 使用冰袋进行运输), 尽快运输到实验室进行保存, 分子样品放入 -40/-80 °C 冰箱冷冻保存, 普通样品放入 4 °C 冷藏冰箱保存。

二、DNA 提取

1. 对于植物表面微生物组 DNA, 将 10-15 g 叶片及 3-5 g 根 (如果表面附着大量土壤, 可先使用无菌棉签小心去除) 放入带有无菌缓冲液 (0.1 M 磷酸钾缓冲液, 含 0.1% 甘油, 0.15% 吐温 80, pH 7.0) 的 250 ml 无菌玻璃瓶 (用于叶片, 约 150 ml 缓冲液) 或 50 ml 无菌离心管 (用于根系, 约 35 ml 缓冲液) 中。在 40 kHz 下超声 1 分钟, 然后在速度为 200 rpm 的摇床上震荡 4 分钟对微生物细胞进行收集, 这个过程重复 2-3 次。接着将带有微生物细胞的缓冲液通过 0.22 µm 滤膜 (可使用多联抽滤装置提高效率), 得到的滤膜可放入无菌培养皿中在 -40/-80 °C 冰箱冷冻保存。在无菌工作台使用无菌剪刀将滤膜剪碎后使用 PowerSoil DNA 提取试剂盒按照说明书进行 DNA 提取。
2. 对于植物内生微生物组 DNA, 按上述方法处理去除植物表面大部分微生物细胞, 将得到的叶片或者根系用无菌水洗净后进行下一步的表面消毒。主要步骤为: 先放入 70% 酒精中浸泡 5 分钟, 再放入 5.25% 次氯酸钠溶液中浸泡 5 分钟, 然后放入 70% 酒精中浸泡 30 秒, 最后用无菌水清洗至少 5 次避免酒精残留。使用液氮及无菌研钵对这些处理后的叶片及根系进行研磨, 称取 0.4 g 粉末样品使用 PowerSoil DNA 提取试剂盒按照说明书进行 DNA 提取。
3. 对于根际及非根际土壤 DNA, 称取 0.4 g 土壤样品使用 PowerSoil DNA 提取试剂盒按照说明书进行 DNA 提取。

三、细菌及真菌群落扩增测序

1. 采用 799F/1115R 引物 (Kembel *et al.*, 2014) 对细菌 16S rRNA V5-V6 区进行扩增 (该引物可减少对植物叶绿体的扩增), 反应体系为 25 µl, 包含 12.5 µl Premix Taq DNA 聚合酶, 0.5 µl 前后引物 (10 µM), 2 µl 模板 DNA (~5 ng µl⁻¹), 以及 9.5 µl PCR 级别水。PCR 扩增 (每个样品扩增 3 次后进行混合) 条件为: 94 °C 变性 2

分钟，30 个循环反应 (94 °C 变性 30 秒，55 °C 退火 30 秒及 72 °C 延伸 45 秒) ，
最后 72 °C 延伸 10 分钟。

2. 采用 fITS7/ ITS4 引物 (White *et al.*, 1990; Ihrmark *et al.*, 2012) 对真菌 ITS2 区进行扩增，反应体系与细菌一致为 25 µl。PCR 扩增 (每个样品扩增 3 次后进行混合) 条件为：94 °C 变性 5 分钟，35 个循环反应 (94 °C 变性 30 秒，56.5 °C 退火 30 秒及 72 °C 延伸 30 秒) ， 最后 72 °C 延伸 7 分钟。
3. 得到的 PCR 产物使用 QIAquick 纯化试剂盒进行纯化，下一步进行文库构建及高通量测序。

结果与分析

一、生物信息分析

1. 使用 USEARCH 10 (Edgar 2010) (软件及相关脚本: <http://drive5.com/usearch/>) 进行分析， 首先将引物序列及低质量 (Q score < 30) 序列末端去除 (-fastq_truncat)，然后将双端序列拼接成单条序列 (-fastq_mergepairs)，并对这些序列进行下一步质控 (-fastq_filter, maximum expected error 0.5) 及去冗余 (-fastx_uniques) 分析。
2. 在 USEARCH 中使用 UNOISE3 (-unoise3) 按 100% 相似度挑选正确的生物序列 (即 zero-radius operational taxonomic units, ZOTUs) ， 并构建 ZOTU 表 (-otutab) 。
3. 在 QIIME 1.91 (Caporaso *et al.*, 2010) (软件及相关脚本: <http://qiime.org/scripts/index.html>) 中使用 BLAST 算法将这些代表性序列与物种数据库 (细菌: SILVA 数据库, 真菌 UNITE 数据库) 进行比对 (assign_taxonomy.py) 。
4. 对于细菌群落，去除得到的非细菌 ZOTUs (包括叶绿体、线粒体及植物界相关的 ZOTUs) 。对于真菌群落，去除得到的非真菌 ZOTUs (包括原生生物及植物界相关的 ZOTUs) (filter_taxa_from_otu_table.py) 。
5. 按所有样品中最低的序列数对 ZOTU 表进行抽平 (single_rarefaction.py) ， 抽平后的 ZOTU 表用于分析微生物群落的 alpha/beta 多样性， 或者也可以使用 CSS (cumulative-sum scaling) 方法对 ZOTU 表进行标准化分析群落的 beta 多样性 (normalize_table.py) 。

二、溯源分析

1. 为了构建植物微生物组来源模型 (Source Model of Plant Microbiome, SMPM) , 首先基于已有的知识体系及植物不同部位微生物群落的潜在来源及互作关系构建植物微生物组来源概念模型 (即将不同部位的微生物群落设置为需要分析的目标样本及其潜在的来源) (图 1. B) 。

2. 下载 SourceTracker 软件 (Knights *et al.*, 2011) (官方软件及相关脚本: <https://github.com/danknights/sourcetracker>) , 文件夹 “sourcetracker-master” 包括相关 R 脚本及数据格式, 其中 “README.md” 文件中有相关使用教程及说明。

3. 以在 QIIME 中运行 SourceTracker 为例, 根据 sourcetracker-master/data/metadata.txt 准备实验设计的表格, 至少包括以下几列: 1. “SampleID” (样品编号, 与 ZOTU 表对应), 2. “Env” (样品分组, 如植物不同的部位), 3. “SourceSink” (来源及目标), 其中将需要评估的目标样本命名为 sink (如探究叶表的来源, 所有来自叶表的样品分组名字为 sink), 其次可能的微生物来源命名为 source (如非根际土壤、根际土壤、根表等环境可能是叶表的潜在来源, 其样品分组名字均为 source) 。

4. 根据 sourcetracker-master/data/otus.txt 准备 ZOTU 表格 (数值为整数, 不能是相对丰度或小数) 。

5. 在服务器中运行 SourceTracker 软件首先需要将 SourceTracker 文件夹路径存储在环境变量“SOURCETRACKER_PATH”中, 脚本参考 “README.md” 文件中的说明。例如在分析目录下运行: “echo "" >> ~/.bash_profile; echo "export SOURCETRACKER_PATH=\$HOME/Desktop/sourcetracker-master" >> ~/.bash_profile; source ~/.bash_profile” (\$HOME/Desktop/sourcetracker-master 为分析目录地址) 。

6. 根据构建的概念模型 (图 1. B) , 分别运行 SourceTracker 脚本对模型中的各条来源关系进行计算及验证。例如首先探究叶表微生物组的来源, 在 metadata.txt 文件中将“SourceSink”列下所有叶表样品命名为 sink, 其他潜在的来源如非根际土壤、根际土壤、根表等样品命名为 source, 然后进行分析。例如在虚拟机 QIIME 环境中运行的脚本为: “R --slave --vanilla --args -i otus.txt -m metadata.txt -o sourcetracker_out < sourcetracker_for_qiime.r” 。

7. 重复第 6 条步骤，分别探究叶内、根表、根内等其他植物部位微生物组的潜在来源。
SourceTracker 软件主要基于贝叶斯算法，根据 source 样本和 sink 样本的群落结构预测 sink 样本中来源于各 source 样本的比例。
8. 根据 “sourcetracker_out” 输出文件夹下的分析结果计算植物各部位微生物组的平均潜在来源比率，对概念模型进行优化并赋值，绘制植物微生物组来源模型示意图 (图 1. C)。本文溯源分析所涉及的运行脚本、测试数据及视频教程已上传至 GitHub (https://github.com/ChaoXiong2020/Source_tracking_Analysis)。
9. 基于此分析方法，可探究不同植物种类、不同生境、及不同生物 (如病害) 及非生物 (如干旱) 胁迫下植物微生物组 (如细菌、真菌、丰富物种、稀有物种、抗生素抗性基因等) 来源模式的变化，以揭示不同条件下植物-微生物互作的微生态过程及机制。

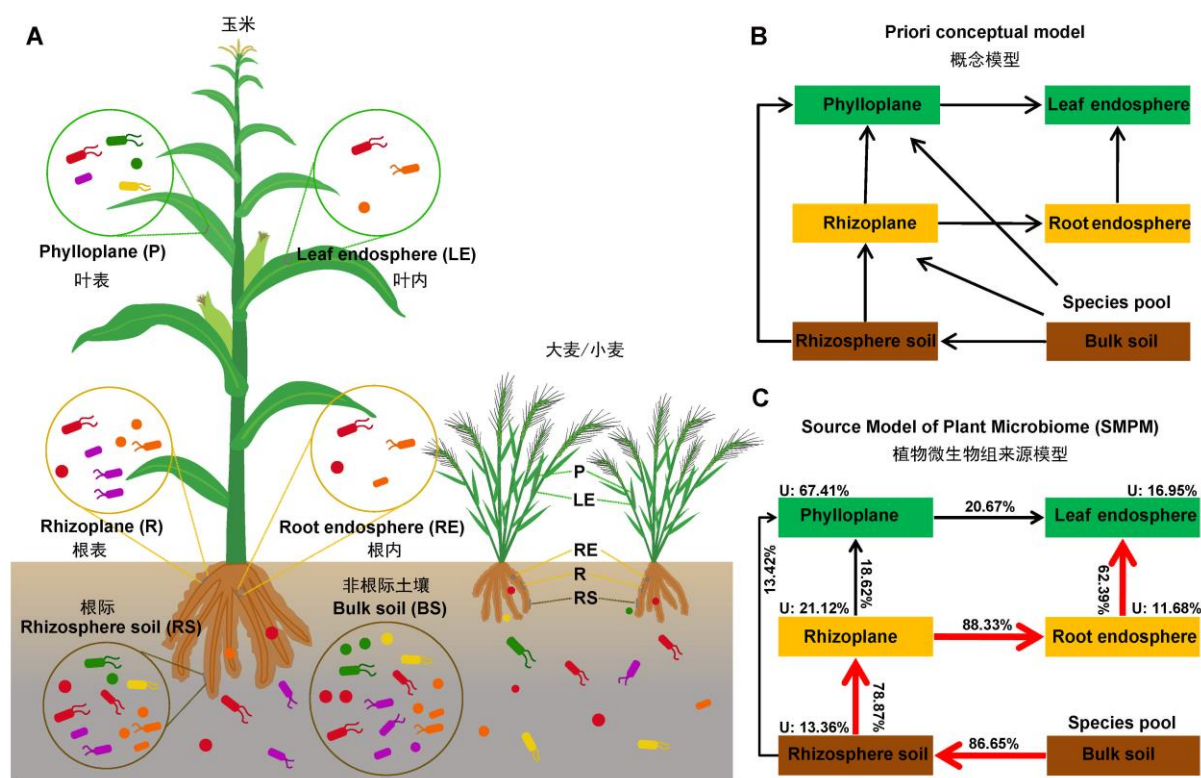


图 1 土壤-植物连续体上微生物群落分布示意图。(A) 宿主植物不同部位为微生物群落提供了不同的微生境 (生态位)。(B) 植物微生物组来源概念模型。(C) 基于溯源分析构建的植物微生物组来源模型。相关结果及示意图来自课题组先前发表的文章 (Xiong *et al.*, 2021)。

致谢

本方案主要来源于课题组先前发表的相关文章 (Xiong *et al.*, 2021; Xiong *et al.*, 2021) 。相关研究得到了中国科学院战略性先导专项 B (XDB15020200) 、国家重点研发计划项目 (2017YFD0200600) 和中科院青年创新促进会 (Y201615) 等项目的资助。

参考文献

1. Caporaso, J., Kuczynski, J. and Stombaugh, J., *et al.* (2010). [QIIME allows analysis of highthroughput community sequencing data](#). *Nat. Methods* 7(5): 335-336.
2. Edgar, R. C. (2010). [Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST](#). *Bioinformatics* 26(19): 2460-2461.
3. Ihrmark, K., Bodeker, I. T., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandstrom-Durling, M., Clemmensen, K. E. and Lindahl, B. D. (2012). [New primers to amplify the fungal ITS2 region-evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities](#). *FEMS Microbiology Ecology* 82(3): 666-677.
4. Kembel, S. W., O'Connor, T. K., Arnold, H. K., Hubbell, S. P., Wright, S. J. and Green, J. L. (2014). [Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest](#). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 111(38): 13715-13720.
5. Knights, D., Kuczynski, J., Charlson, E. S., Zaneveld, J., Mozer, M. C., Collman, R. G., Bushman, F. D., Knight, R. and Kelley, S. T. (2011). [Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking](#). *Nat. Methods* 8(9): 761-763.
6. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). [Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics](#). *PCR Protocols*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. San Diego, Academic Press: 315-322.

7. Xiong, C., He, J. Z., Singh, B. K., Zhu, Y. G., Wang, J. T., Li, P. P., Zhang, Q. B., Han, L. L., Shen, J. P., Ge, A. H., Wu, C. F. and Zhang, L. M. (2021). [Rare taxa maintain the stability of crop mycobiomes and ecosystem functions](#). *Environmental Microbiology*.
8. Xiong, C., Zhu, Y. G., Wang, J. T., Singh, B. K., Han, L. L., Shen, J. P., Li, P. P., Wang, G. B., Wu, C. F., Ge, A. H., Zhang, L. M. and He, J. Z. (2021). [Host selection shapes crop microbiome assembly and network complexity](#). *New Phytologist* 229(2): 1091-1104.