

# 读书报告

穆广亚 2016年07月30日

**Received:** November 20, 2015

**Accepted:** February 19, 2016

**Published:** March 14, 2016

RESEARCH ARTICLE

# Influences of Plant Species Season and Location on Leaf Endophytic Bacterial Communities of Non-Cultivated Plants

Tao Ding<sup>‡</sup>, Ulrich Melcher\*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, United States of America

<sup>‡</sup> Current address: Department of Biology, New York University, New York, New York, United States of America

\* [u-melcher-4@alumni.uchicago.edu](mailto:u-melcher-4@alumni.uchicago.edu)



CrossMark  
click for updates

PLOS ONE PLOS ONE

3.057

影响因子

ISSN : 1932-6203; 年文章 : 28114; 经验 : 3693条  
投稿命中率 : 命中率约50.13%; 一审周期 : 平均3.0月

[P](#) [经验](#) [MI指数](#) [介绍](#) [主页](#) [论坛](#) [文章](#)

[IF曲线](#)



华裔科学家丁涛与密西根大学医学院微生物和免疫学副教授史洛斯，2014年，*Nature*，发表“人类微生物组研究”，这项报告指出，人体内的健康微生物组(Microbiome)，受到生活经历、菌群与环境、饮食和服用药物等方面的互相影响，并没有单一标准，而研究也发现改变肠道，非常有可能通过改变口腔微生物研究多年。



Tao Ding

Follow

Postdoctoral researcher at the Department of Biology, New York University  
 Microbiome, Metagenome, Meta-transcriptome, System Biology, Microbial Ecology  
 Verified email at nyu.edu

Title	1-7	Cited by	Year
Dynamics and associations of microbial community types across the human body	T Ding, PD Schloss Nature 509 (7500), 357	144	2014
Non-cultivated plants of the Tallgrass Prairie Preserve of northeastern Oklahoma frequently contain virus-like sequences in particulate fractions	V Muthukumar, U Melcher, M Pierce, GB Wiley, BA Roe, MW Palmer, ... Virus research 141 (2), 169-173	41	2009
Community terminal restriction fragment length polymorphisms reveal insights into the diversity and dynamics of leaf endophytic bacteria	T Ding, MW Palmer, U Melcher BMC microbiology 13 (1), 1	29	2013
Detection of members of the Tombusviridae in the Tallgrass Prairie Preserve, Osage County, Oklahoma, USA	K Scheets, O Blinkova, U Melcher, MW Palmer, GB Wiley, T Ding, BA Roe Virus research 160 (1), 256-263	15	2011
Influences of plant species, season and location on leaf endophytic bacterial communities of non-cultivated plants	T Ding, U Melcher PloS one 11 (3), e0150895	1	2016
Mo1796 The Gut Microbiome Differentiates Clinical Phenotypes in Moderate to Severe Crohn's Disease: Results From the CERTIFI Study	T Ding, S Telesco, CS Monast, C Brodmerkel, T Yatsunenko, A Das, ... Gastroenterology 148 (4), S-713		2015
Analysis of the Diversity and Distribution of Leaf Endophytic Bacterial Communities	T Ding Oklahoma State University		2012

# 目录

CONTENTS

01

背景前言

02

材料方法

03

结果分析

PART  
01

# 背景前言

[Click here to add your title](#)



## 测序技术

- 1、测序技术简介
- 2、高通量测序
- 3、454测序技术

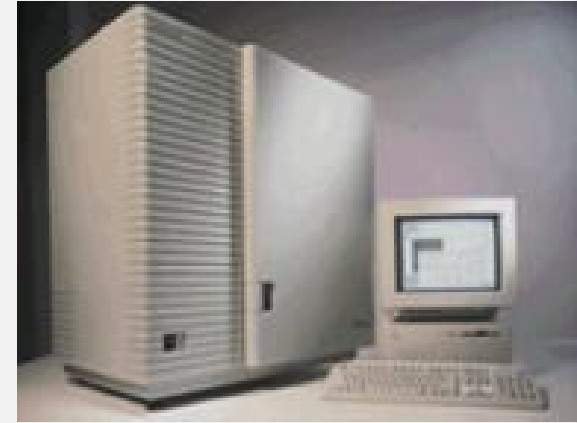


## 内生菌研究

- 1、定义
- 2、研究现状

## ■ DNA测序发展过程

- **0<sup>th</sup>-Generation** (第零代, 1975-1985)
  - 手工Sanger测序法
- **1<sup>st</sup>-Generation** (第一代, 1986-2006)
  - 自动化荧光标记链终止测序法
- **2<sup>nd</sup>-Generation** (第二代, 2006-Present)
  - DNA链合测序法
- **3<sup>rd</sup>-Generation** (第三代, in 2-5years)
  - 实时单分子合成测序法
- **4<sup>th</sup>-Generation** (第四代, In 5-10years ? )
  - 直接测序法



## 第一代DNA测序技术：

传统的化学降解法、双脱氧链终止法以及在它们的基础上发展来的各种DNA测序技术。

第一代DNA测序技术包括：化学降解法、双脱氧链终止法、荧光自动测序技术和杂交测序技术。



第二代测序技术，主要包括罗氏454公司的GS FLX测序平台、Illumina公司的Solexa Genome Analyzer测序平台和ABI公司的SOLiD测序平台。

第二代测序技术最显著的特征是**高通量**，一次能对几十万到几百万条DNA分子进行序列测序，使得对一个物种的转录组测序或基因组深度测序变得方便易行。

第二代测序技术将片段化的基因组DNA两侧连上接头,随后用不同的方法产生几百万个**空间固定的PCR克隆阵列**。每个克隆由单个文库片段的多个拷贝组成。然后进行**引物杂交和酶延伸反应**。由于所有的克隆都在同一平面上,这些反应就能够大规模平行进行,每个延伸反应所掺入的**荧光标记**的成像检测也能同时进行,从而获得测序数据。DNA序列延伸和成像检测不断重复,最后经过**计算机分析**就可以获得完整的DNA序列信息。

第二代测序技术包括：**454测序技术、Solexa测序技术和SOLiD测序技术**。

公司	系统名	测序长度	优点	缺点
Roche/454	FLX System	200 x 700	读长最长；通量高	同聚性错误；仪器和试剂价格贵
Illumina	HiSeq 2000/miSeq	2 x 150	通量非常高	价格贵；后期分析复杂
ABI/SOLiD	5500xl SOLiD	25 x 35	通量高；试剂消耗少	读长太短
Helicos	HeliScope	25 x 30	通量高	读长太短



# 植物内生菌

- 定义：内生菌 (Endophyte) 概念是在1866年首先由Bary提出的，是指那些在其生活史的**一定阶段或全部阶段**生活于**健康植物**的**组织或器官内部**的微生物(主要为真菌和细菌)。
- 直到20世纪30年代，由于牲畜食用了有内生真菌感染的牧草，给畜牧业造成重大损失，人们才开始对植物内生菌有了初步认识。
- 北京大学邱德有等和中国科学院植物研究所朱至清联合进行的前驱性研究，从云南红豆杉中分离得到能够合成抗癌药物紫杉醇的内生真菌，以及后来南京大学邹文欣等的创新性研究等起到了明显的范式化作用。

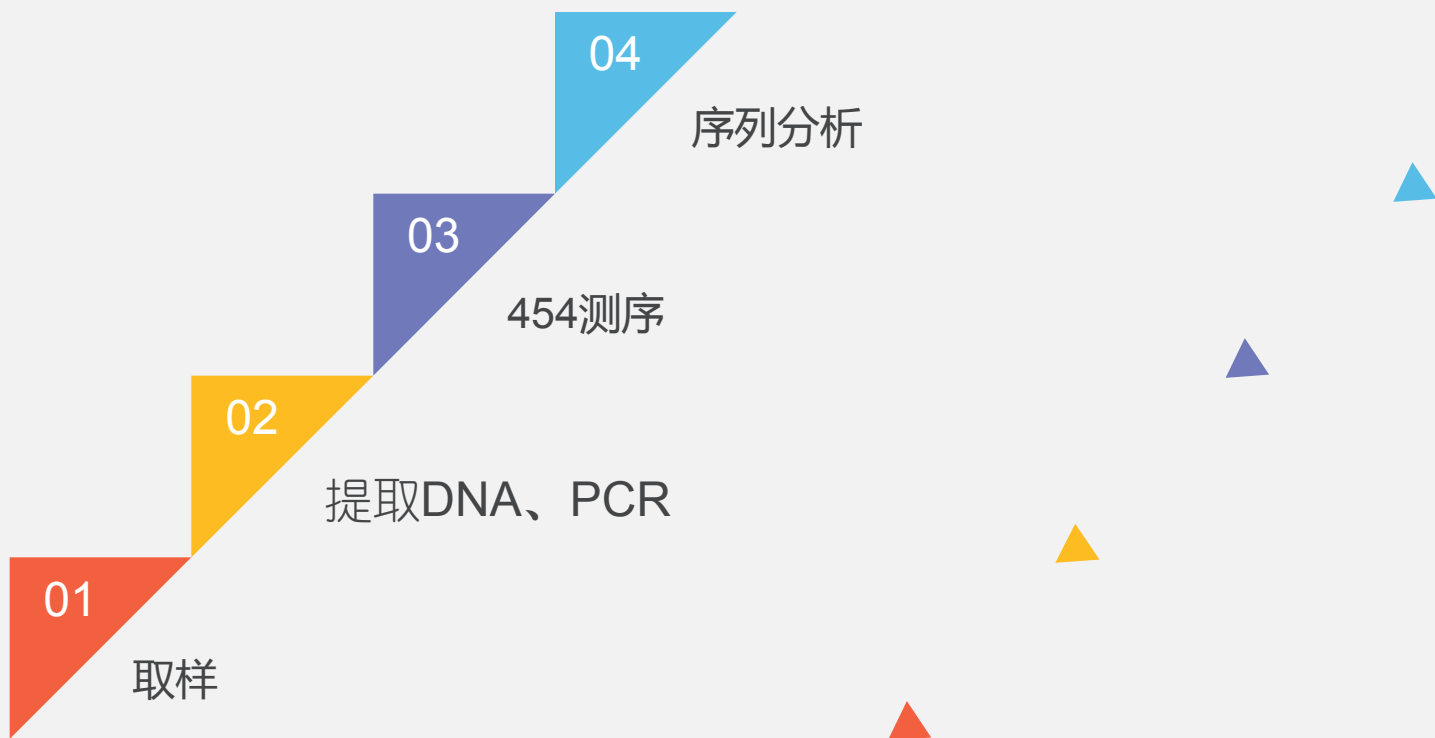
- George C. Carroll 等的关于松科 (Pinaceae) 针叶树花旗松 (Douglas fir; *Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco) 内生真菌研究向人们展示了林木茎叶内其实含有很多的微生物，它们种类繁多，生物量多变，除了植物种类以外，还受季节、地点、降雨量、海拔等因素影响。
- 内生菌的分类：内生菌可以根据其存在位置的不同分为根内生菌和叶内生菌。
- 目前关于内生菌的研究，更多的是研究根际内生菌，对于叶内生菌的研究相对较少。

PART  
02

# 材料方法

[Click here to add your title](#)

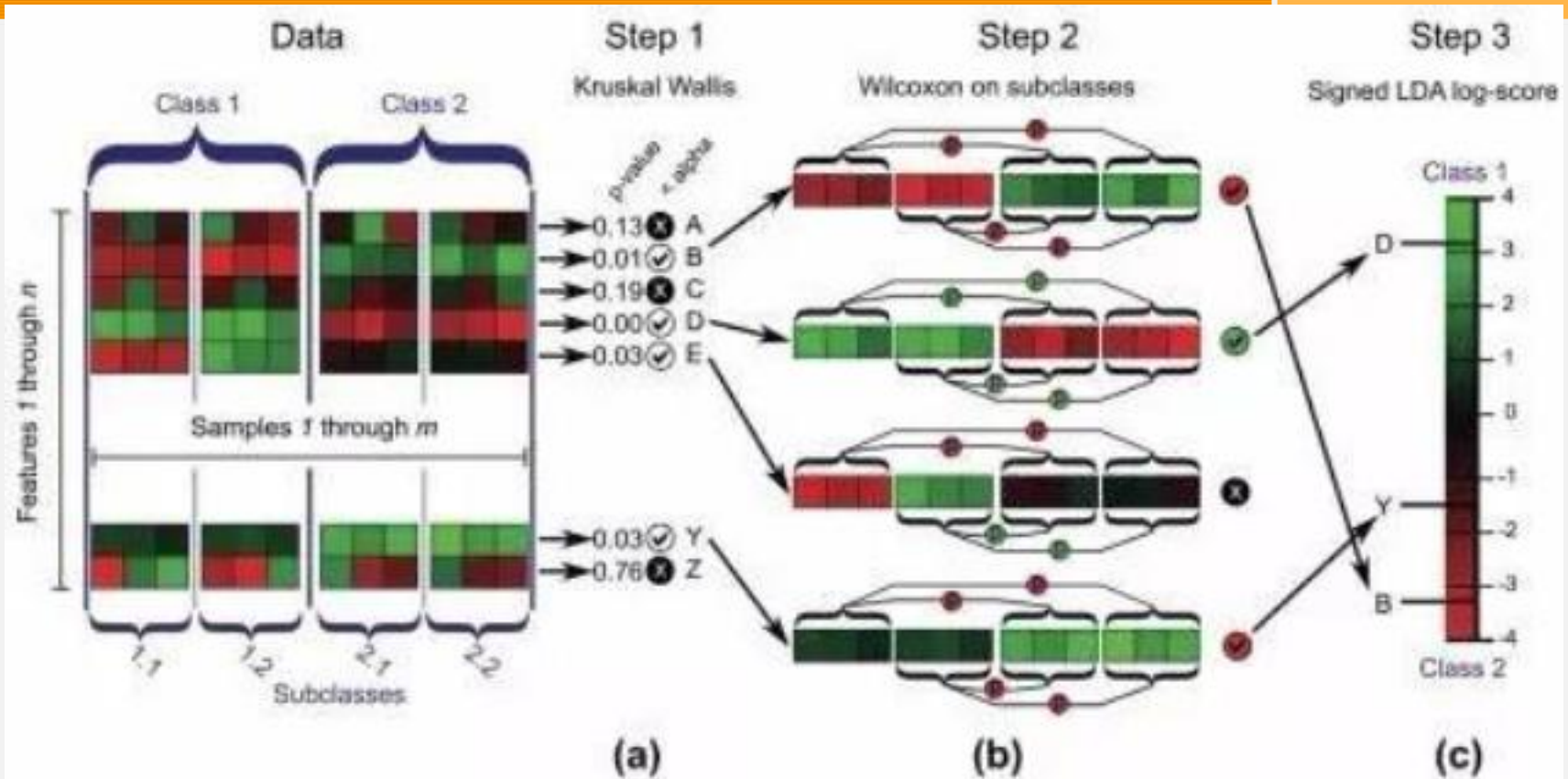
# 实验路线



- 取样（5种植物）叶片
- *Ambrosia psilostachya* DC.（多年生豚草）、*Asclepias viridis* Walt.（马利藻华）、*Panicum virgatum* L.（柳枝稷）、*Sorghastrum nutans* (L.) Nash、*Ruellia humilis* Nutt.
- 收集时间5、6、7、8月
- 设置了4个不同的采样点
- 共收集81个样本



# 微生物LEfSe原理



首先在多组样本中采用的非参数因子Kruskal-Wallis秩和检验检测不同分组间丰度差异显著的物种  
然后在上一步中获得的显著差异物种，用成组的Wilcoxon秩和检验来进行组间差异分析；  
最后用线性判别分析（LDA）对数据进行降维和评估差异显著的物种的影响力（即LDA score）。

# T-RFLP

- Terminal restriction fragment length patterns

末端标记限制性片段长度多态性技术是一种发明于上个世纪末的指纹图谱技术，可以分析样品中某一类微生物的群落结构。



# T-RFLP在微生物群落结构研究中的重要性

- 传统调查一直是建立在分离和培养的基础上。这种方法不但费时费力，而且不够准确。这反映在如下几个方面：
  - 1) 微生物群落组成极度复杂，采用传统方法**工作量巨大**。
  - 2) 反应结果的阳性阴性有时不好判断，容易产生偏差，导致**鉴定错误**。
  - 3) 培养的方法对菌**有选择性**。
  - 4) 环境中的绝大多数微生物是**不可培养**的。

PART  
03

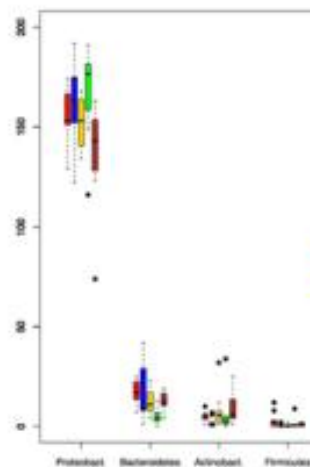
# 结果分析

Click here to add your title

- **OTU (operational taxonomic units)** 是在系统发生学研究或群体遗传学研究中，为了便于进行分析，人为给某一个分类单元（品系，种，属，分组等）设置的同一标志。通常按照 97% 的相似性阈值将序列划分为不同的 OTU，每一个 OTU 通常被视为一个微生物物种。相似性小于97%就可以认为属于不同的种，相似性小于93%-95%，可以认为属于不同的属。样品中的微生物多样性和不同微生物的丰富度都是基于对OTU的分析。

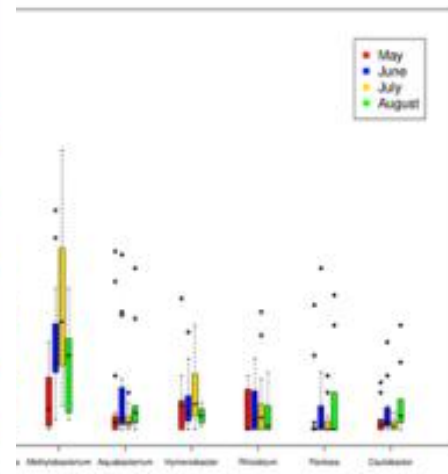
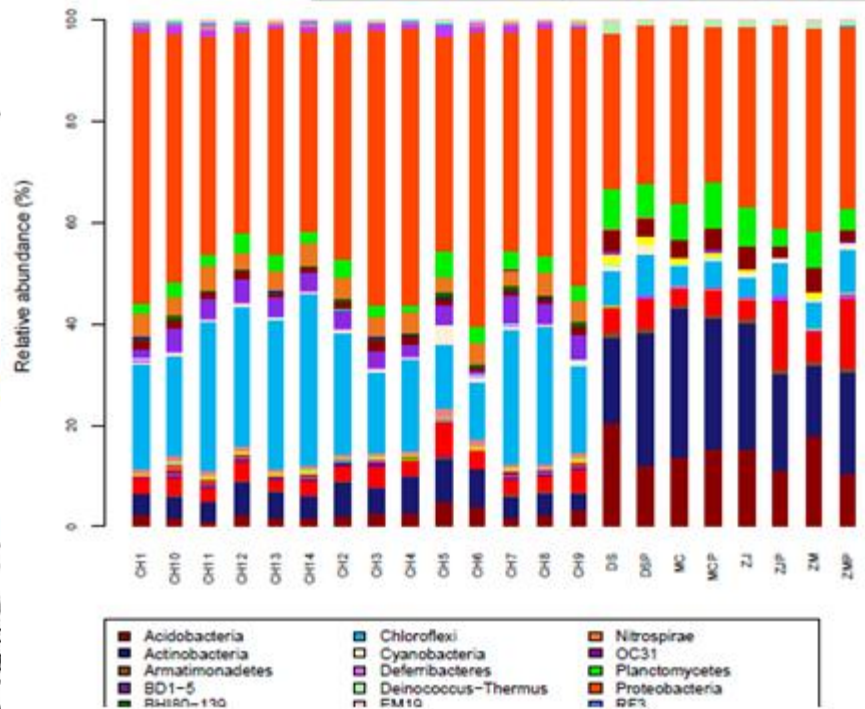
通过**454**高通量测序共获得**64952**原始序列，**5**种植物产生的**55**个样本共获得**335 OTUs**

A



**Fig 1. Variation of relative a dominant phyla in the leaf endophytes of different host plant species (B)**

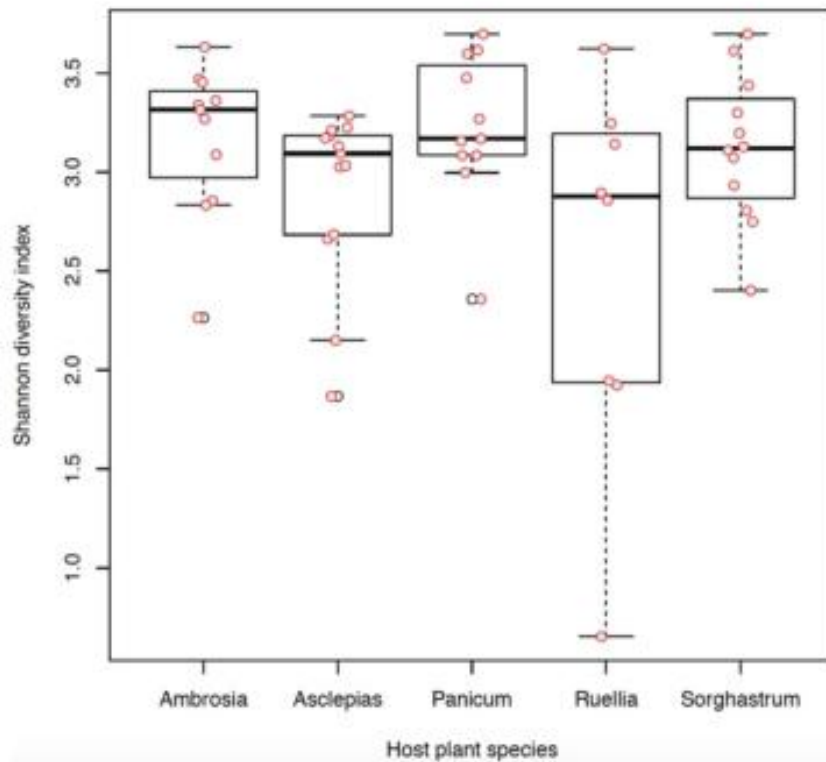
doi:10.1371/journal.pone.0150895.g



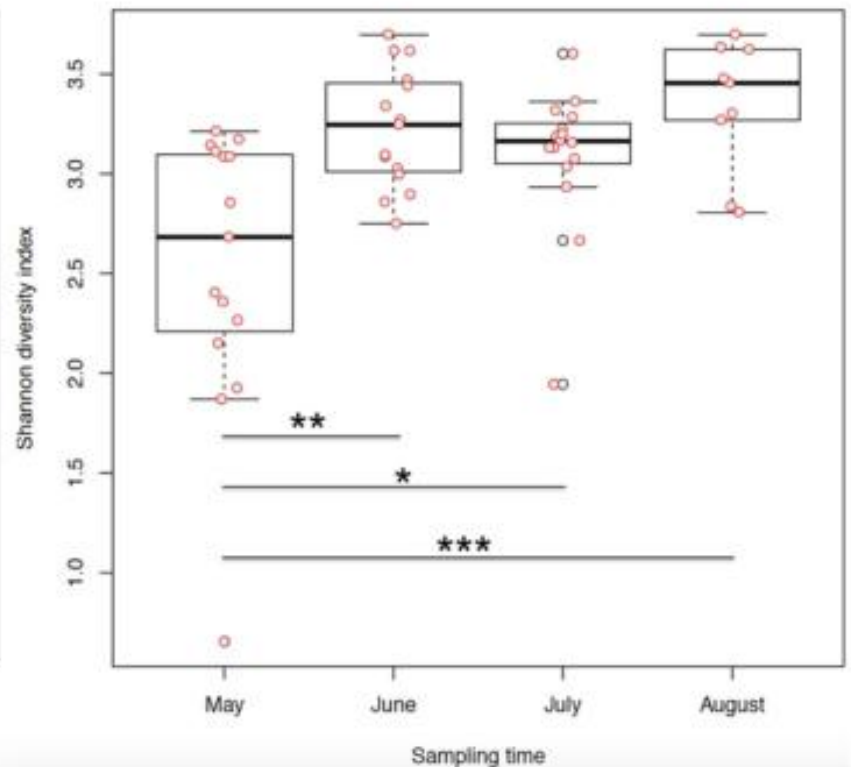
**Fig 1. Relative abundances of the dominant bacterial genera across sampling months.**

- 门水平不同的寄主植物内生细菌主要类群的相对丰度(A);在不同寄主植物物种占主导地位的内生菌属的相对丰度 (B) 不同的取样月份 (C).

## A 宿主对内生菌 $\alpha$ 多样性的影响



## B 月份对内生菌 $\alpha$ 多样性的影响



**Fig 2.** Alpha diversities of each endophytic bacterial community grouped by host plant species (A) and by sampling time (B).

doi:10.1371/journal.pone.0150895.g002



**Table 1. AMOVA analysis of differences in diversity of endophytic bacteria in different. sampling months.**

<b>p-value</b>	<b>May</b>	<b>June</b>	<b>July</b>
June	0.024		
July	< 0.001	0.068	
August	0.016	0.373	0.02

Comparing all four months:  $p = 0.001$

doi:10.1371/journal.pone.0150895.t001

**Table 2. AMOVA analysis of differences in diversity of endophytic bacteria in different host plant species.**

<b>p-value</b>	<b><i>A. psilostachya</i></b>	<b><i>A. viridis</i></b>	<b><i>P. virgatum</i></b>	<b><i>S. nutans</i></b>
<i>A. viridis</i>	< 0.001			
<i>P. virgatum</i>	0.016	< 0.001		
<i>S. nutans</i>	0.106	< 0.001	0.962	
<i>R. humilis</i>	0.019	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Comparing all five species:  $p < 0.001$ .

doi:10.1371/journal.pone.0150895.t002

# 叶的核心内生菌群落

- 共**335 OTUs**，共**55**个样，二次抽样数据处理之后发现，没有哪一种**OUT**同时存在于这**55**个样中，但是有**4 OTUs**同时存在于**33**个样中（总样本**60%**），最低相对丰度为**1%**。

<u>OTUs</u>	属别	<u>OTUs</u>	属别
2476	鞘氨醇单胞菌	2857	甲基杆菌属
1327	鞘氨醇单胞菌	3184	甲基杆菌属

**OUT 2476**具有非常高的丰度，在至少**36**个样（占总数**65%**）中其相对丰度大于**2%**，在至少**27**个样（占总数**50%**）中其相对丰度超过**5%**。

表3:不同种类  
宿主内生菌群  
落生物标记物  
的LEfSe分析  
鉴定

Table 3. LEfSe analysis identification of biomarker microbes for endophytic bacterial communities for different host plant species.

OTU	Type	LDA	p-Val	Phylum	Genus	Ambrosia	Asclepias	Panicum	Ruellia	Sorghastrum
Otu1327	Asclepias	4.701	0.0002	Proteobacteria	Sphingomonas	18.2	65.6	12.4	16.2	10.3
Otu2476	Sorghastrum	4.568	0.0106	Proteobacteria	Sphingomonas	27.9	31.5	42.1	5	45
Otu2857	Asclepias	4.592	0.0255	Proteobacteria	Methylobacterium	9.4	46.9	19.1	6.7	16.7
Otu1215	Sorghastrum	4.341	0.0376	Bacteroidetes	Hymenobacter	2.1	7.9	6.7	1.2	7.5
Otu2934	Asclepias	4.395	0.0483	Bacteroidetes	Hymenobacter	16.7	28.5	8.5	2.9	12.2
Otu1088	Ambrosia	4.359	0.0668	Proteobacteria	Pseudomonas	21.5	2.1	7.6	2.5	6.7
Otu1252	Asclepias	4.358	0.0785	Proteobacteria	Methylobacterium	3	26.4	6.1	5.4	9.2
Otu514	Asclepias	4.368	0.0994	Proteobacteria	Sphingomonas	10.9	20.3	3.9	3.3	2.2
Otu2528	Ruellia	4.745	0.3059	Proteobacteria	Aquabacterium	37.3	11.3	7.9	77.5	18.6
Otu2245	Ruellia	5.139	0.3455	Proteobacteria	Pseudomonas	40.9	18.2	24.8	192.9	35.6
Otu3184	Asclepias	4.331	0.4293	Proteobacteria	Methylobacterium	30.6	37.2	13.6	14.6	9.2

doi:10.1371/journal.pone.0150895.t003

A

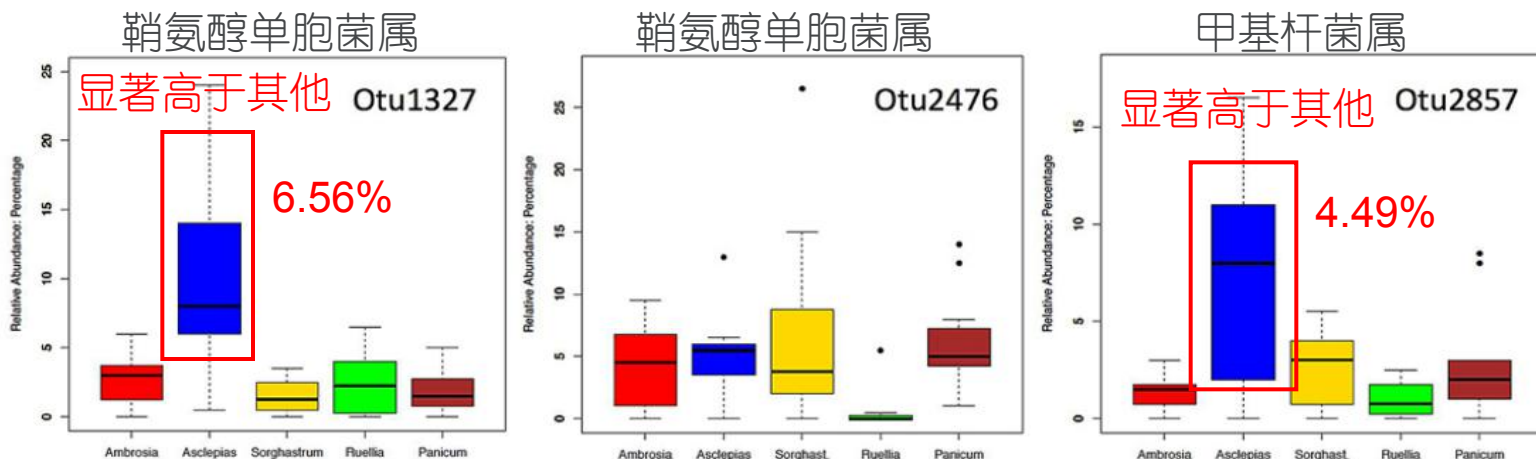


图3A: 在不同  
宿主植物中通  
过LEfSe分析  
选择的主要物  
种相对丰度分  
析

Table 4. LEfSe analysis identification of biomarker microbes for endophytic bacterial communities for different months of sample collection.

OTU	Type	LDA	pValue	Phylum	Genus	May	June	July	August
Otu2245	May	5.042	0	Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	12.8	3.24	3.02	0.44
Otu1252	July	4.302	0.0004	Proteobacteria	<i>Methylobacterium</i>	0.27	0.49	2.54	0.85
Otu3184	June	4.38	0.0027	Proteobacteria	<i>Methylobacterium</i>	0.64	3.18	3.27	1.11
Otu2476	July	4.573	0.0038	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	1.2	3.04	5.6	2.52
Otu1088	August	4.203	0.0083	Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	0.11	0.62	0.96	2.04
Otu1333	August	4.24	0.0505	Proteobacteria	<i>Caulobacter</i>	1.02	1.62	0.42	2.52
Otu2857	July	4.346	0.0661	Proteobacteria	<i>Methylobacterium</i>	1.07	1.98	3.6	1.59
Otu1709	July	3.94	0.0736	Proteobacteria	Unclassified	0.22	0.56	0.83	0.41
Otu1327	July	4.345	0.085	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	2.22	2.11	4.19	1.37
Otu2528	August	4.408	0.1715	Proteobacteria	<i>Aquabacterium</i>	2.78	3.73	0.96	3.96
Otu2934	July	4.12	0.188	Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i>	1.6	1.4	1.96	0.59
Otu1724	August	4.087	0.3628	Proteobacteria	Unclassified	0.78	1.24	1.56	1.85
Otu514	June	4.078	0.3672	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	0.76	1.64	0.58	0.3
Otu1863	June	3.894	0.5506	Actinobacteria	<i>Curtobacterium</i>	0.24	0.98	0.92	0.56
Otu1215	July	3.873	0.7169	Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i>	0.49	0.33	0.81	0.52
Otu2077	July	3.862	0.7716	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	0.58	0.82	0.94	0.44
Otu980	May	4.275	0.8057	Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	5.82	4.91	5.62	5.78
Otu2573	July	4.036	0.8927	Proteobacteria	<i>Rhizobium</i>	1.58	1.96	2.19	1.26
Otu269	July	3.767	0.9565	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	0.38	0.38	0.42	0.41

B

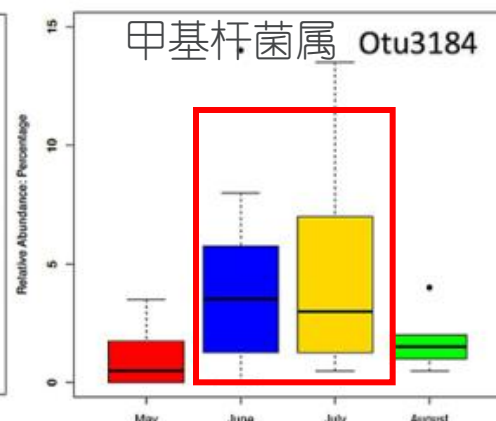
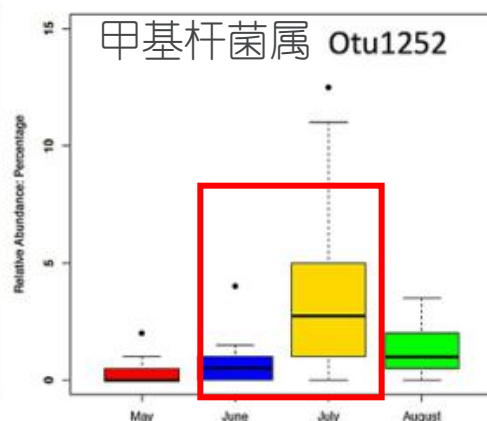
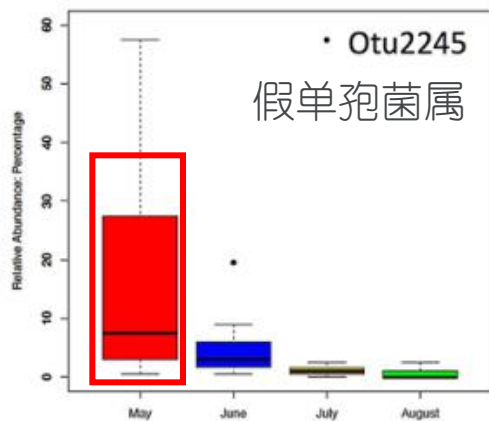


表4:不同月份宿主内生菌群落生物标记物的LEfSe分析鉴定

图3B: 在不同月份通过LEfSe分析选择的主要物种相对丰度分析

# THANKS

---

敬请批评指正

---