

# 植物内生细菌测定方法的研究进展

陈丽莹<sup>1,2</sup>, 方荣祥<sup>2,3</sup>, 吴建祥<sup>\*1</sup>, 张莉莉<sup>\*2,3</sup>

1 浙江大学农业与生物技术学院 水稻生物学国家重点实验室, 浙江 杭州 310058

2 中国科学院微生物研究所 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101

3 中国科学院大学, 北京 100049

陈丽莹, 方荣祥, 吴建祥, 张莉莉. 植物内生细菌测定方法的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1105-1119

Chen Liying, Fang Rongxiang, Wu Jianxiang, Zhang Lili. Research progress in the detection methods of endophytic bacteria[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1105-1119

**摘要:** 伴随全功能体(holobiont)和全基因组(hologenome)概念的出现, 植物微生物群落被看作植物全功能体的重要组成部分, 其结构和功能逐渐得到研究和解析。内生细菌是植物微生物群落的成员之一, 由于其定殖在组织内部而与宿主的接触更为紧密, 因而其与植物的相互作用也更加直接、高效且不容易受到环境条件变化的影响。本文介绍了植物内生细菌的基本特点, 并重点综述了植物内生细菌测定方法的国内外进展。了解内生细菌的基本特点并掌握其测定方法, 将促进对内生细菌与植物互作机制的探索及对全功能体中内生细菌与宿主共生机理的解析, 为植物的营养和抗病育种提供内生细菌角度的新策略。

**关键词:** 植物内生细菌; 内生细菌群落; 表面消毒; 16S rRNA 基因; 荧光原位杂交; 16S rRNA 基因扩增子二代测序

## Research progress in the detection methods of endophytic bacteria

CHEN Liying<sup>1,2</sup>, FANG Rongxiang<sup>2,3</sup>, WU Jianxiang<sup>\*1</sup>, ZHANG Lili<sup>\*2,3</sup>

1 State Key Laboratory of Rice Biology, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

2 State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Plant host, together with all associated microorganisms living on or in it, constitute a plant

基金项目: 国家自然科学基金(31871932)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31871932)

\*Corresponding authors: E-mail: WU Jianxiang: wujx@zju.ecd.cn; ZHANG Lili: zhangll@im.ac.cn

Received: 2021-08-01; Accepted: 2021-09-13; Published online: 2021-12-16

holobiont, and the hologenome is comprised of the genomes of host and microbiota. In recent years, the structure and function of plant microbiota have gradually been elucidated. As a part of plant microbiota, endophytic bacteria colonize inside plant tissues. Therefore, endophytic bacteria have closer and more direct interaction with plants and are less affected by environmental changes than epiphytic or environmental bacteria. This review introduced endophytic bacteria and summarizes the research progress in the development of specific detection methods for endophytic bacteria. Improved and standard analytical methods will greatly facilitate the elucidation of the interaction and symbiosis mechanisms between plants and their endophytic bacteria, leading to new strategies for improving plant nutrition and disease resistance from the perspective of endophytic bacteria.

**Keywords:** endophytic bacteria; endophytic bacterial community; surface sterilization; 16S rRNA gene; fluorescence *in situ* hybridization; next-generation sequencing of 16S rRNA gene amplicons

内生菌是指定殖在植物体内且不致病的微生物<sup>[1-3]</sup>。自然状态下, 每一个动植物个体并不是孤立地存在, 而是与生活在其体表及体内的多种微生物(包括细菌、古菌、真菌、病毒等)共同存在, 动植物与其微生物群落之间互相影响, 共同构成一个生命整体, 称为全功能体(holobiont)<sup>[4]</sup>。从全功能体角度来看, 内生菌是植物全功能体不可或缺的一部分, 对宿主的营养、健康、发育等具有重要作用, 内生菌的研究对于认识植物全功能体中宿主与微生物之间的相互作用具有重要意义。细菌是植物微生物组的优势组分<sup>[5]</sup>, 也是内生菌的重要组成部分, 本综述的关注焦点为植物内生细菌(endophytic bacteria)。

Chen 等在植物内生细菌组的测定方法上, 建立了能排除植物细胞器 DNA 污染的内生细菌 16S rRNA 基因(16S rDNA)特异性扩增方法, 该方法与二代高通量测序技术相结合, 实现了对植物内生细菌的无污染非培养法测序解析, 并可用于植物内生细菌的非培养法定量分析<sup>[6]</sup>。该测序方法应用于水稻揭示了水稻叶和根的内生细菌群落结构, 应用于茶树鉴定了选择性富集于茶叶部的内生细菌<sup>[7]</sup>。本文根据国内外研究现状及课题组研究进展, 综述植物

内生细菌的基本特点, 包括分布、组成、来源、传播及内生细菌与植物的互作; 重点介绍植物内生细菌的测定方法, 包括植物内生细菌个体和群体水平的定性、定位及定量测定方法; 提出了本领域待解决的科学问题和内生细菌作为载体工程菌应用于农业生产的展望。

## 1 植物内生细菌的基本特点

### 1.1 内生细菌的分布及组成

在植物的生命周期中, 内生细菌在种子、幼苗、地下根系、地上的茎叶等多种组织器官内均有分布(图 1A), 部分内生细菌能通过种子传递到下一代<sup>[8-10]</sup>。内生细菌通常定殖在植物组织细胞间(图 1B、1C), 少数(如根瘤菌)可生活在植物细胞内<sup>[11]</sup>。

植物内生细菌在组成上具有复杂的物种多样性。门水平上, 优势组分是变形菌门(*Proteobacteria*), 还有少量的厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)等<sup>[12-13]</sup>。植物内生细菌在群落水平上的组成具有以下特点: 细胞密度和物种多样性较低<sup>[13-14]</sup>, 菌群的组成结构随宿主植物的生理状态、发育阶段和基因型的变化而不同<sup>[15-17]</sup>(图 1D)。

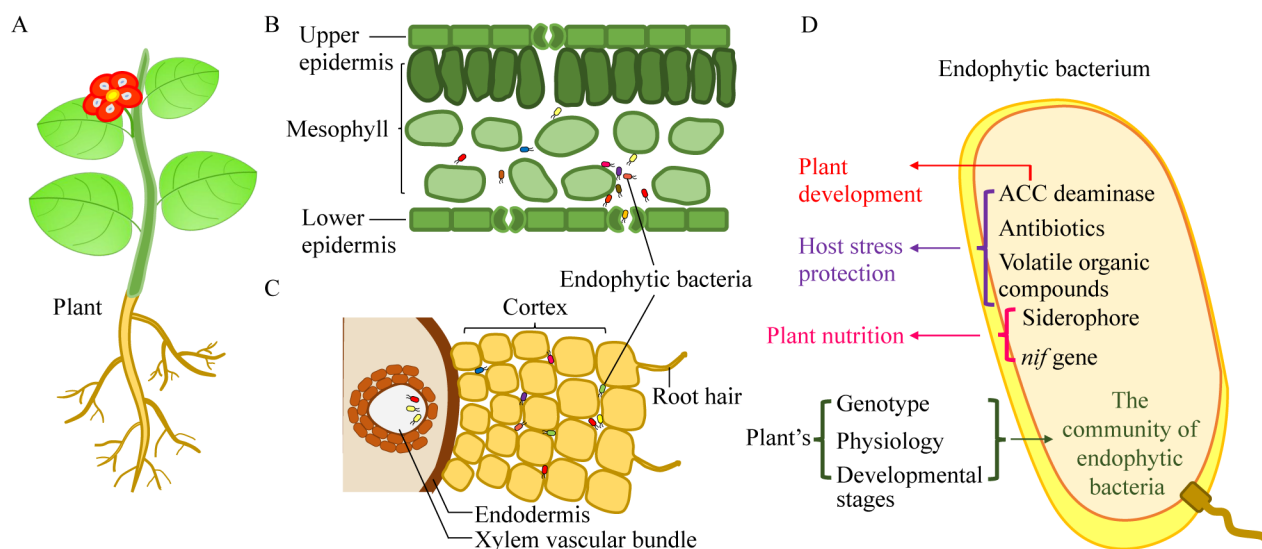


图 1 内生细菌的定殖及与植物的互作 A: 植物的根、茎、叶、花等多种器官组织内部均有内生细菌分布; B: 内生细菌定殖在叶肉薄壁组织细胞间; C: 内生细菌定殖在根部的木质部维管束内和皮层组织细胞间; D: 内生细菌与植物的互作, 内生细菌对植物的益生作用表现为调控植物生长发育、帮助植物抵御胁迫、促进植物营养吸收 3 个方面, 植物的基因型、生理状态和发育阶段会影响内生细菌的组成

Figure 1 The localization of endophytic bacteria and the interaction between endophytic bacteria and plants. A: Endophytic bacteria colonize in many plant organs, including root, stem, leaf and flower. B, C: Endophytic bacteria colonize among the mesophyll parenchyma cells (B), root cortex cells and inside the xylem vascular system of the root (C). D: The interaction between endophytic bacteria and plants. The probiotic function of endophytic bacteria on plants is manifested in regulating plant growth and development, helping plants resist stress, and promoting plant nutrient absorption. The composition of endophytic bacteria is affected by plant genotype, physiological conditions and development stage.

## 1.2 内生细菌的来源及传播

植物内生细菌的来源是丰富多样的。2010年, Marquez-Santacruz 等研究发现, 墨西哥皮番茄 (*Physalis ixocarpa*) 内生细菌的主要组分也是其根际菌群的常见组分, 由此提出了内生细菌来源于根际菌群的假说<sup>[18]</sup>。2015 年, Edwards 等通过对水稻根系微生物组的微生物生态测序分析发现, 水稻根部内生细菌来源于水稻生长的土壤环境<sup>[13]</sup>。土壤是植物内生细菌的主要来源<sup>[19-20]</sup>, 除土壤之外, 植物生长的空气环境<sup>[21-22]</sup>、植食性昆虫<sup>[23]</sup>、种子<sup>[10]</sup>也都是植物内生细菌的来源。

内生细菌侵入植物内部的方式多种多样, 土壤中的细菌通过根毛、根部的伤口和裂缝侵入根内; 空气中的细菌通过气孔、水孔、皮孔、伤口、顶端分生组织等侵入地上组织的内部; 植食性昆虫通过刺吸或咀嚼传播细菌; 内生细菌还可以借助种子进入到下一代植物组织内<sup>[24]</sup>。

植物内生细菌的传播途径有 2 条, 分别是水平传播和垂直传播, 不同的传播途径对应内生细菌不同的来源。水平传播是指植物逐代从环境获得内生细菌, 这是内生细菌主要的传播方式<sup>[5]</sup>, 水平获得内生细菌的途径主要有 3 条:

植物的根从根际土壤中获得,地上部分从周围空气获得,以及植物不同部位在被植食性昆虫取食过程中获得<sup>[21]</sup>。垂直传播是指细菌通过种子在植物不同代际之间传播。部分内生细菌能通过垂直传播稳定定殖于植物的生命循环中,这些细菌通过种子传递到下一代植株,通过植物地上部分的顶端分生组织进入生殖器官再进入下一代种子<sup>[21]</sup>。

### 1.3 内生细菌-植物互作

内生细菌在植物组织内成功定殖需要克服宿主植物的防御体系,包括物理性屏障和免疫防御反应。内生细菌与病原菌有2个共有特征:产生植物多聚物降解酶和活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)解毒活性,能帮助内生细菌侵入植物组织并抵抗植物免疫反应<sup>[25]</sup>。内生细菌在植物内部成功定殖后,其生长繁殖依赖于组织内部的微环境,因此内生细菌在代谢上表现出一些适应性特征<sup>[26-27]</sup>。

内生细菌与植物共生,对植物的影响表现为中性或益生。内生细菌对植物的益生作用表现在多个方面(图 1D),主要包括:(1) 促进植物的营养吸收,如氮、磷、离子等;(2) 通过调节植物激素(生长素、细胞分裂素、乙烯等)来调控植物的生长发育;(3) 帮助植物抵御胁迫,包括生物胁迫和非生物胁迫(图 1B)。其中,促进植物的营养吸收和调控植物的生长发育是内生细菌对植物的直接益生作用,而抵御病原菌则是内生细菌通过一系列生化途径间接实现的,这些生化途径包括:分泌抗生素和细胞壁降解酶;降低植物的乙烯水平;诱导植物产生系统性抗性;降低病原菌所需离子的浓度;合成抑制病原菌的挥发性有机物等<sup>[24]</sup>。

内生细菌有很多使其成功定殖并发挥益生功能的重要基因。例如, *gumD* 基因参与胞外多糖的合成,是细菌生物膜形成及在植物中定

殖所必需的<sup>[28]</sup>;固氮内生细菌重氮营养葡萄糖醋杆菌(*Gluconacetobacter diazotrophicus*)的 *gr* 基因和 *sod* 基因分别编码谷胱甘肽还原酶和超氧化物歧化酶,这2个酶对于 *G. diazotrophicus* 在水稻中的定殖至关重要<sup>[29]</sup>;根瘤菌的 *nif* 固氮基因簇能够将周围环境中的  $N_2$  转化为有机氮,从而为植物提供氮素营养<sup>[30-31]</sup>;内生细菌 *acds* 基因的表达产物能够降解植物根部的1-氨基环丙烷-1-羧化酶,从而减少乙烯的合成,进而促进植物在胁迫条件下的营养生长<sup>[32-34]</sup>。

## 2 植物内生细菌的测定方法

植物内生细菌的测定方法包括可培养测定法与免培养测定法两大类,利用这些方法能够对内生细菌进行定性测定、定殖分析及定量检测。

### 2.1 植物内生细菌测定前的预处理

分离或测定内生细菌之前需要对植物组织进行表面消毒,植物组织表面消毒的方法国内外还没有形成统一的标准,目前采用的方法种类繁多,不同的植物组织也有所不同。叶片表面消毒通常采用乙醇或次氯酸钠处理,Horton等测定拟南芥叶片内生细菌的表面除菌方法为:先用0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 8.0)清洗,再用70%乙醇清洗,最后用无菌水洗3遍<sup>[35]</sup>。Chen等测定拟南芥叶片内生细菌的表面除菌方法为:将拟南芥叶片用5%次氯酸钠清洗1 min 再用无菌水清洗2遍<sup>[14]</sup>。植物根部生活在土壤环境中,根表附着大量细菌,因此,根组织的表面消毒过程略为复杂,一般使用磷酸盐等盐离子缓冲液涡旋振荡清洗,通常结合表面活性剂处理,再辅以超声振荡处理以去除根表面紧密附着的细菌。Bulgarelli等和Lundberg等检测拟南芥根部内生细菌的表面除菌方法大致相同:首先去除根表附着的土壤颗粒,然后

用含有表面活性剂 Silwet L-77 的磷酸盐缓冲液清洗, 最后超声振荡处理 5–10 min<sup>[36–37]</sup>。Carrión 等分离培养甜菜根部内生细菌之前对甜菜根组织表面除菌的方法为: 去除根表附着的土壤颗粒后, 用不同浓度的硫酸盐缓冲液结合次氯酸钠和表面活性剂 Tween-20 多次清洗<sup>[38]</sup>。种子表面消毒通常采用乙醇结合次氯酸钠处理的方法。Díaz Herrera 等分离培养小麦种子内生细菌时的表面除菌方法为: 先用 70%乙醇漂洗 30 s, 然后用活性 Cl<sub>2</sub> 处理 2.5 min, 再用 70%乙醇漂洗 30 s, 最后用无菌水洗 3 遍<sup>[39]</sup>。Khalaf 等分离培养葫芦科植物种子内生细菌的表面除菌方法为: 先用 2.5%–3.5%的次氯酸钠清洗, 然后用 95%乙醇清洗, 最后用无菌水洗 3 遍<sup>[40]</sup>。通常, 研究人员将植物组织表面消毒处理过程中的最后一遍漂洗液涂布于微生物通用培养基上, 如 LB、TSA、R2A、PDA 等培养基, 以培养一段时间(2–7 d 左右)后培养基上无菌落生长作为表面消毒成功的标准<sup>[38–40]</sup>。

## 2.2 植物内生细菌的可培养测定方法

可培养测定法首先根据细菌的生长需求选择合适的培养基获得内生细菌的纯培养物, 然后, 扩增其 16S rRNA 基因并测序, 进行初步的分类学鉴定, 并结合菌株的理化性质测定、形态观察及全基因组测序等手段进行准确鉴定。Khalaf 等对分离培养到的葫芦科植物种子内生细菌进行 16S rRNA 基因扩增测序, 获得每一株内生细菌的 16S rRNA 基因序列和分类学初步鉴定结果, 并以此构建了多株内生细菌的系统发育树<sup>[40]</sup>。

通过对分离培养到的内生细菌进行遗传改造使其表达荧光蛋白, 能够追踪内生细菌在植物中的定殖。Verma 等将从表面除菌的水稻种子中分离到的 2 株细菌 *Pantoea* sp. 和 *Ochrobactrum* sp. 通过遗传改造使其携带绿色

荧光蛋白标记, 然后通过共聚焦显微镜观察发现, 这 2 株内生细菌都定位在水稻根部的皮层组织细胞间<sup>[41]</sup>。*Klebsiella pneumoniae* 是一株分离自玉米的内生细菌, 将其标记绿色荧光蛋白再接种到玉米植株后发现该内生细菌定位于玉米茎的皮层组织和根部的成熟区, 并且 *K. pneumoniae* 的代谢产物二氧化氮还原酶能够通过特异性抗体进行免疫荧光标记, 从而能够同时观察该内生细菌在植物组织内部的分布和代谢产物的表达情况<sup>[42]</sup>。

## 2.3 植物内生细菌的免培养测定方法

研究者发现受到培养方法和技术的限制, 在实验室能够培养并进行研究的微生物仅占自然界全部微生物的很小一部分, 未培养微生物占自然界微生物的绝大多数<sup>[43–45]</sup>。免培养法技术的发展极大地促进了研究者对植物内生细菌的认识, 植物内生细菌的免培养测定法包括核酸测定、免疫组化检测、显微镜观察等, 具体包括: (1) 使用特异性引物对内生细菌在核酸水平上进行 PCR 检测和 qPCR 定量分析; (2) 使用特异性核酸探针, 利用荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)技术检测内生细菌; (3) 通过内生细菌表达产物的特异性抗体进行免疫荧光检测, 明确内生细菌在植物组织中的定殖; (4) 使用化学染色法或者透射电子显微镜观察植物组织内部具有明确形态特征的内生细菌<sup>[46]</sup>。

植物内生细菌在利用荧光原位杂交方法观察其定殖时, 内生细菌探针上标记的生物素可以选择 Cy5 或者 Cy5.5, 这 2 种生物素在观察时使用远红光波段, 可以避免植物自发荧光的干扰<sup>[47]</sup>。Bulgari 等开发了一种荧光原位杂交实验方法, 能够实现在新鲜植物组织切片中观察植原体和内生细菌的共定位, 核心原理是将植原体探针 R16(V)F1 和细菌通用探针 pB-00542

(5'-GACGGGCGGTGTGTACA-3')一起加到杂交液中,通过2种探针不同荧光颜色的交叠判断二者的共定位<sup>[48]</sup>。

以上这些方法应用于植物内生细菌个体水平的检测相对简单,但应用于植物内生细菌群落水平的检测时却遇到很多问题,植物内生细菌群落水平的免培养测定也随之出现了一系列不同于个体水平的检测方法。

### 2.3.1 植物内生细菌群落的定性分析

植物内生细菌群落水平的免培养定性分析方法包括长度异质性PCR扩增(length heterogeneity PCR, LH-PCR)、基于PCR的变性梯度凝胶电泳(PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)技术、末端限制性片段长度多态性(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)指纹图谱、16S rRNA基因扩增子二代测序等。这些方法都基于对细菌核糖体RNA(通常是16S rRNA,少数采用23S rRNA)基因的分析,并且都以PCR技术为基础。

LH-PCR、PCR-DGGE和T-RFLP先用细菌核糖体RNA基因的通用引物对植物内生细菌进行PCR扩增,然后基于不同的原理对扩增子文库中多种内生细菌的核糖体RNA基因进行区分,从而获得植物内生细菌群落的物种多样性信息。其中,LH-PCR和PCR-DGGE这2种方法与一代测序结合可以对内生细菌的核糖体RNA基因扩增子进行测序分类鉴定,进而了解植物内生细菌群落的物种组成情况<sup>[9,49-51]</sup>。T-RFLP的PCR扩增中一个引物标有荧光基团,对菌群的多样性结果由计算机程序通过对荧光的读取自动化实现,并且分辨率较高,该方法主要检测植物内生细菌群落的物种多样性,由于内生细菌的核糖体RNA基因扩增子

被限制性内切酶切断,无法进行扩增子序列测定,因此不能通过该方法了解植物内生细菌的物种分类信息<sup>[52]</sup>。

16S rRNA基因存在于所有原核生物中,突变率低,由9个序列可变区和10个序列保守区间隔排列组成,能够很好地反映原核生物的系统发育。在该基因的保守区设计引物,通过PCR将群落中所有细菌按比例扩增出来,然后根据可变区序列将细菌定性到不同的分类单元。16S rRNA基因扩增子二代测序已经广泛应用于多种植物(拟南芥、玉米、水稻、番茄、甜菜、香蕉、大豆、茶树等)不同器官(根、叶、种子等)的内生细菌群落鉴定分析(表1)。相比于LH-PCR、PCR-DGGE和T-RFLP等技术,16S rRNA基因扩增子二代测序由于具有操作简便、数据通量高和对菌群解析全面等优点,逐渐取代其他方法,成为目前植物内生细菌群落测定领域应用最为广泛的免培养测定方法。

LH-PCR、PCR-DGGE、T-RFLP及16S rRNA基因扩增子二代测序等植物内生细菌免培养法测定的技术方法都基于对细菌16S rRNA基因的分析,这些方法存在一些共同的缺点:(1)由于很多细菌的16S rRNA基因为多拷贝,并且不同细菌的16S rRNA基因拷贝数不同<sup>[58]</sup>,因此,这些方法对植物内生细菌群落组成的测定存在一定的偏差;(2)16S rRNA基因的引物具有偏好性,不能100%覆盖所有种类的细菌<sup>[59]</sup>,由此导致对菌群的测定结果中某些类群的细菌无法被展示,比如,植物内生细菌常用的检测引物799F不能扩增蓝细菌(*Cyanobacteria*)<sup>[60]</sup>;(3)植物细胞器DNA(线粒体18S rRNA基因和叶绿体16S rRNA基因)与细菌16S rRNA基因保守区的序列高度相似<sup>[59,61]</sup>,导致PCR扩增产物中存在大量宿主DNA污染。

表 1 16S rRNA 基因扩增子二代测序在植物内生细菌群落测定的应用

Table 1 The application of 16S rRNA gene amplicon next-generation sequencing in characterizing plant endophytic bacterial community

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	16S rRNA 基因 可变区 Variable region of 16S rRNA gene	植物物种 Plant species	植物器官或组织 Plant organ or tissue	参考文献 References
799F	AACMGGATTAGATACCKG	V5-V7	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	叶、根 Leaf and root	[35]
1193R	ACGTCATCCCCACCTTCC		茶树 Tea	叶 Leaf	[7]
515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	V4	水稻 Rice	根 Root	[13]
806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT				
1114F	GCAACGAGCGCAACCC	V7-V8	拟南芥	根 Root	[37]
1392R	ACGGGCGGTGTGTRC		<i>Arabidopsis</i>		
L-V3	CCTACGGGAGGCAGCAG	V3	甜菜	整株	[53]
R-V3	TTACCGCGGCTGCTGGC		Sugarbeet	The whole plant	
27F	AGRGTTTGATCMTGGCTCAG	V1-V3	番茄 Tomato	种子 Seed	[54]
519R	GTNTTACNGCGCKGCTG				
341F	CCTACGGGNGGCWGCAG	V3-V4	玉米 Maize	秸秆 Stalk	[55]
805R	GACTACHVGGGTATCTAATCC				
S17	CCTACGGGNGGCWGCAG	V3-V4	香蕉 Banana	叶、根	[34]
A21	GACTACHVGGGTATCTAATCC			Leaf and root	
S-D-Bact-0341-b-S-17	CCTACGGGNGGCWGCAG	V3-V4	大豆 Soybean	根瘤 Root nodule	[56]
S-D-Bact-0785-a-A-21	GACTACHVGGGTATCTAATCC		水稻 Rice	根、茎、芽	[57]
				Root, stem and shoot	

注: 引物序列中的 M、K、H、V、W、R、N 为简并碱基, M=A/C, K=G/T, H=A/C/T, V=A/G/C, W=A/T, R=A/G, N=A/G/C/T。341F/805R、S17/A21、S-D-Bact-0341-b-S-17/S-D-Bact-0785-a-A-21 这 3 对引物的序列完全相同, 在不同研究中引物名称不同

Note: M, K, H, V, W, R and N in primer sequence are degenerate bases, M=A/C, K=G/T, H=A/C/T, V=A/G/C, W=A/T, R=A/G, N=A/G/C/T. The three primer pairs, 341F/805R, S17/A21 and S-D-Bact-0341-b-S-17/S-D-Bact-0785-a-A-21 are identical in primer sequence, but different in primer name in different studies.

鉴于 16S rRNA 基因扩增子二代测序相比于其他方法的应用优势, 对于该技术的宿主 DNA 污染问题有多种解决方案。

(1) 在 PCR 扩增之前从植物组织中富集微生物。在 DNA 提取过程中, 通过结合使用 NaCl 和十二烷基硫酸钠实现从植物组织总 DNA 中富集细菌的 16S rRNA 基因<sup>[62]</sup>, 也可以通过植物原生质体制备结合差速离心等方法最大限度地去除线粒体和叶绿体<sup>[63-64]</sup>。

(2) 利用 PCR 夹钳封闭植物宿主 DNA 的

扩增。PCR 夹钳包括肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)和锁核酸(locked nucleic acid, LNA), 其核心原理是: 第一轮扩增使用 16S rRNA 基因通用引物对植物样本总 DNA 进行扩增, 然后在第二轮扩增时加入 PNA 或 LNA, 特异性结合植物源 DNA 从而阻断植物源 DNA 的扩增<sup>[61,65-66]</sup>。然而, Jackrel 等发现 PNA 也会封闭部分细菌序列从而导致对菌群的扩增产生偏好性<sup>[67]</sup> (图 2A)。

(3) 利用 CRISPR/Cas9 系统消除植物源

DNA。该方法先用 16S rRNA 基因通用引物对水稻组织 DNA 样本进行扩增,然后利用 CRISPR/Cas9 系统中的 Cas9 核酸酶和特异性向导 RNA (gRNA)靶向消除 16S rRNA 基因扩增子二代测序文库中的宿主序列,并保留完整的细菌 16S rRNA 基因信息。该系统使得水稻根、叶两类样本中的宿主污染率分别从 63.2%降到 2.9%、从 99.4%降到 11.6%,从而显著降低了水稻内生细菌 16S rRNA 基因扩增子文库中的宿主序列污染<sup>[68]</sup>(图 2B)。

(4) 使用 16S rRNA 基因通用引物构建扩增子文库,测序后滤除宿主序列。Edwards 等使用引物对 515F 和 806R 解析水稻根部内生细菌时,通过测序鉴定后滤除分类为线粒体和叶绿体数据的方法对水稻根部内生菌群进行后续分析<sup>[13]</sup>。多项研究都采用了这种方法<sup>[37,53-54]</sup>。但是,由于植物细胞器数量众多,该方法需要加大测序数据量以保证滤除宿主序列后剩余的数据能够进行有效的菌群分析,特别对一些内生细菌丰度偏低的样本,尤其需要较高的测序深度。

(5) 通过特异性引物实现对植物内生细菌的特异性扩增。引物 799F 能够有效避免对植物叶绿体序列的扩增<sup>[60]</sup>,该引物与 1193R<sup>[36]</sup>组成引物对的线粒体扩增子长度通常比细菌扩增子长度长约 350 bp,因此可以通过琼脂糖凝胶电泳分离细菌扩增子条带,然后测序分析<sup>[35-36]</sup>。有些植物(如茶树)的细胞器 DNA 与细菌 16S rRNA 基因保守区同源性较低,该引物对可以实现对这些植物内生细菌的无污染扩增<sup>[7]</sup>。然而,Chen 等通过序列比对分析发现,水稻线粒体序列的 799F/1193R 扩增子产物比细菌的 799F/1193R 扩增子产物仅长 50 bp 左右<sup>[6]</sup>。而且,对于线粒体数量远高于内生细菌的植物样品,799F/1193R 难以有效扩增其中的细菌 16S

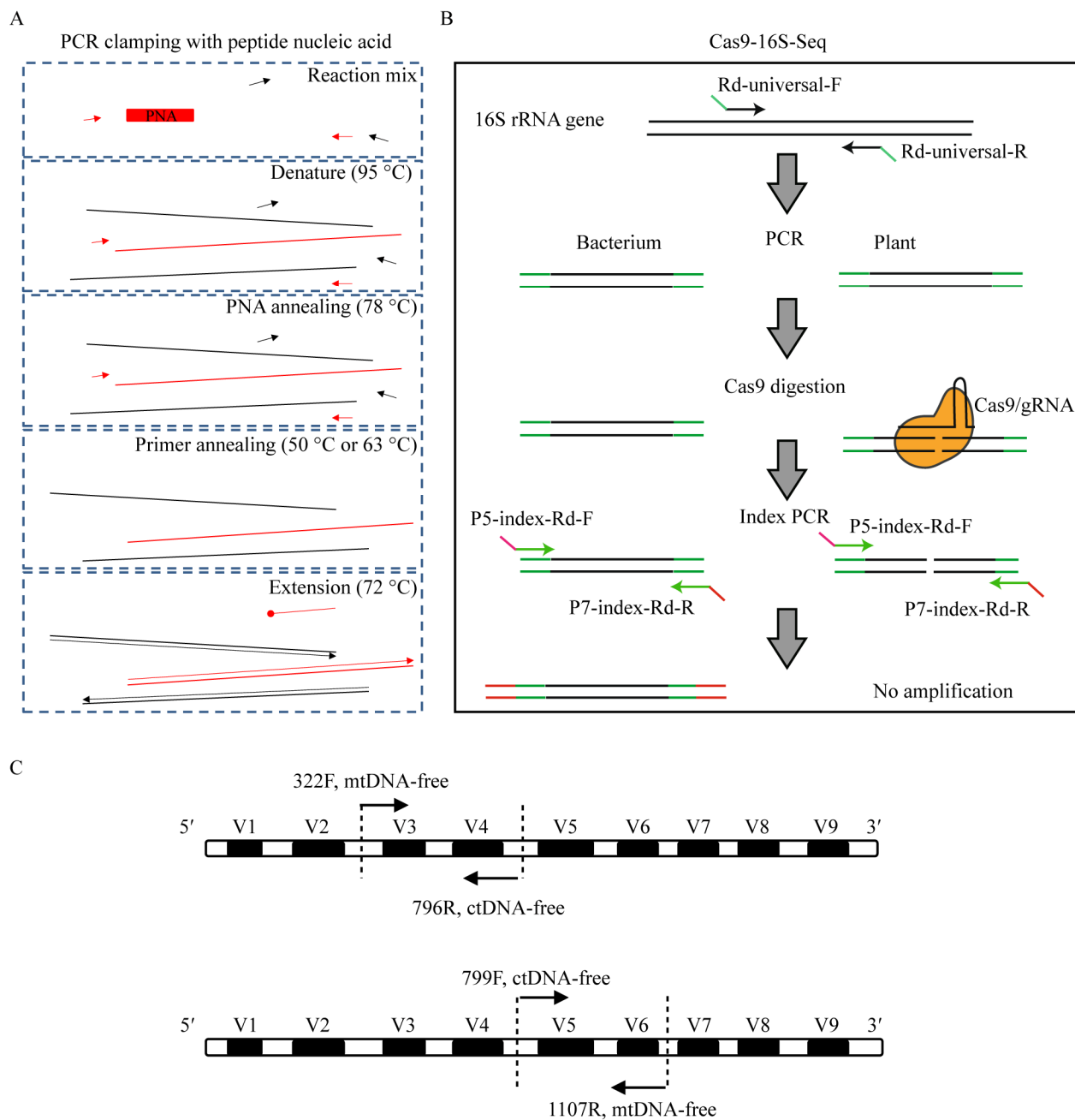
rRNA 基因<sup>[19]</sup>。

Chen 等<sup>[6]</sup>设计了能够在扩增过程中高效规避植物源细胞器 DNA 序列的引物,包括规避植物线粒体 18S rRNA 基因的 322F-Drs、1107R 及规避植物叶绿体 16S rRNA 基因的 796R,结合引物 799F,设计出能够从植物组织总 DNA 中特异性扩增细菌 16S rRNA 基因的引物对——322F-Drs/796R 和 799F/1107R (图 2C)。这 2 对引物具有良好的细菌覆盖度,其扩增子文库中植物源 DNA 的相对丰度低于 5%。此外,这 2 对引物均可以应用于水稻、拟南芥、番茄、柑橘等多种植物的内生细菌组无污染测序解析。该方法相比于其他排除宿主污染的方法具有高效排除宿主污染、操作简便(只需要 PCR 过程)、测序数据量需求低、避免数据浪费等优点,将有力促进植物内生细菌非培养法测序解析的发展。

### 2.3.2 植物内生细菌群落的定殖及定量分析

16S rRNA 基因由于其序列特征而作为细菌系统发育分类鉴定的标志基因,基于该基因的荧光原位杂交技术在植物表面细菌的定殖及定量检测有很好的应用。Lundberg 等使用探针 EUB338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') 和 CARD (catalysed reporter deposition)-FISH 技术检测拟南芥根表菌群时发现,拟南芥根表常有细菌分布<sup>[37]</sup>。Remus-Emsermann 等采用荧光原位杂交技术检测拟南芥叶表的细菌分布并对叶表细菌进行定量,结果表明,拟南芥叶表的细菌密度为  $5.4 \times 10^6$  个/cm<sup>2</sup>,  $1.5 \times 10^8$  个/g·鲜重<sup>[69]</sup>。

EUB338 的序列位于细菌 16S rRNA 基因的第 3 个保守区,对细菌的检测具有广谱覆盖度<sup>[37]</sup>;通过对 EUB338 探针序列和多种细菌的 16S rRNA 基因序列进行比对分析发现,该探针序列与拟南芥、水稻、小麦、玉米、番茄、大麦、大豆等植物的线粒体 18S rRNA 基因相



**图 2 PCR 过程去除植物源 DNA 污染的方法** A: 利用肽核酸作为 PCR 夹钳封闭植物宿主 DNA 的方法示意图<sup>[61]</sup>; B: Cas9-16S-Seq 消除植物宿主 DNA 的方法示意图<sup>[68]</sup>; C: 细菌 16S rRNA 基因特异性引物对避开植物宿主 DNA 的方法示意图<sup>[6]</sup>

Figure 2 The methods to eliminate plant DNA contamination during PCR process. A: The diagram to block plant DNA using peptide nucleic acid as PCR clamping<sup>[61]</sup>. B: The diagram to eliminate plant DNA by Cas9-16S-Seq<sup>[68]</sup>. C: The diagram to avoid amplification of plant DNA by bacterial specific 16S rRNA gene primer sets<sup>[6]</sup>.

应序列有 2 个碱基不匹配,但与上述所有植物的叶绿体 16S rRNA 基因相应序列完全匹配(图 3)。因此, EUB338 理论上可以应用于不含叶绿体等质体的植物组织内生细菌的荧光原位杂交检测,但是,对于茎、叶等含有叶绿体的绿色组织来说,该探针会同时与叶绿体和内生细菌的 16S rRNA 基因杂交结合,因而不能对内生细菌的定殖位点及分布数量进行准确检测。目前,对于植物内生细菌群落(特别是茎、叶等绿色组织)的定殖检测,尚无能够有效区分内生细菌 16S rRNA 基因与植物细胞器 DNA 的探针。

传统的 16S rRNA 基因扩增子二代测序只能展示内生细菌在菌群中的相对丰度,而无法测定植物内生细菌的总量。在不了解微生物总量的情况下,所得出的相对丰度分析结果很可能是错误的<sup>[70-71]</sup>。要真正搞清楚内生细菌与植物之间的互作关系,必须对内生细菌进行绝对定量而不仅仅是相对丰度的分析。Chen 等通过对

拟南芥叶片菌群进行定量检测和 16S rRNA 基因扩增子测序综合分析发现,植物菌群失调与植物的免疫状态存在直接联系<sup>[14]</sup>。Guo 等通过设计含有植物特异性基因、细菌和真菌条形码基因引物的人工质粒作为内参,与荧光定量 PCR 和扩增子二代测序技术相结合,实现了对植物中细菌和真菌相对于植物总量的测定分析,结果发现,在健康的水稻和小麦植株中,细菌、真菌与植物基因组拷贝数之比分别约为 1.07–6.61、0.40–2.26<sup>[70]</sup>。Chen 等<sup>[6]</sup>开发的细菌 16S rRNA 基因特异性引物对(322F-Drs/796R 和 799F/1107R)可以直接应用于荧光定量 PCR 以定量分析植物内生细菌含量。该研究发现,水稻根部内生细菌与水稻基因组拷贝数之比约为 10:1,而叶部内生细菌与水稻基因组拷贝数之比不足根部的 1/1 000。利用该引物对制作植物组织含菌量测定标准曲线并对水稻组织内生细菌进行绝对定量分析发现,水稻叶部、根部内生细菌的细胞密度分别约为 10<sup>6</sup>/g·鲜重、

EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT
<i>Arabidopsis</i> Mt18S	CCACTGCTGCCCGCCCGTGGGAGTCCGGG
Rice Mt18S	CCACTGCTGCCCGCCCGTGGGAGTCCGGG
Wheat Mt18S	CCACTGCTGCCCGCCCGTGGGAGTCCGGG
Maize Mt18S	CCACTGCTGCCCGCCCGTGGGAGTCCGGG
Tomato Mt18S	CCACTGCTGCCCGCCCGTGGGAGTCCGGG
Barley Mt18S	CCACTGCTGCCCGCCCGTGGGAGTCCGGG
Soybean Mt18S	CCACTGCTGCCCGCCCGTGGGAGTCCGGG
<i>Arabidopsis</i> Ct16S	CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG
Rice Ct16S	CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG
Wheat Ct16S	CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG
Maize Ct16S	CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG
Tomato Ct16S	CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG
Barley Ct16S	CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG
Soybean Ct16S	CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG

图 3 EUB338 与植物线粒体 18S rRNA 基因(Mt18S)和叶绿体 16S rRNA 基因(Ct16S)的序列比对结果

Figure 3 The sequence alignment of EUB338 and plant mitochondrial 18S rRNA genes (Mt18S) and chloroplast 16S rRNA genes (Ct16S).

$10^9/\text{g}$ -鲜重<sup>[6]</sup>。该定量方法与 16S rRNA 基因扩增子测序的相对丰度分析相结合, 能够准确分析不同样本中各细菌类群的实际丰度, 将有力促进植物共生细菌组的相关研究。

### 3 讨论与展望

灵敏、高效和标准化的内生细菌测定方法是研究内生细菌功能的基础。目前内生细菌的测定方法依然存在一些难点, 包括内生细菌的分离培养、定殖过程解析和定量检测等。近年来, 针对这些难点, 一系列研究取得了突破性进展。

获得纯培养菌株是对其进行全基因组测序、理化性质测定、定殖特点分析及与植物互作机制解析的前提, 但内生细菌的分离培养目前仍是限制其功能研究的一大障碍。一方面, 定殖在植物组织内部的细菌在与宿主植物长期的共进化过程中可能会丢失许多代谢途径的相关基因<sup>[27]</sup>; 另一方面, 很多内生细菌兼性内生, 在植物体内的定殖具有不确定性<sup>[72]</sup>。这些因素导致内生细菌难以被人工培养。多种基本培养基与选择性培养基结合使用<sup>[73]</sup>及根系菌群高通量分离培养技术<sup>[74]</sup>的应用极大地提高了内生细菌的分离培养效率。

内生细菌的定殖过程涉及多种检测技术。可视化示踪是研究内生细菌定殖过程最直观的手段。荧光蛋白标记示踪细菌的定殖过程<sup>[41]</sup>需要对菌株进行遗传改造, 对于非模式微生物难度较大。化学染色法和组织切片显微观察能根据形态特点对细菌定殖进行初步研究<sup>[46]</sup>。多组学分析、分子生化检测及遗传学验证等手段的联合使用促进了内生细菌定殖过程中与宿主互作机制的解析。Carrión 等通过对甜菜根部内生细菌群落的多组学分析, 结合分子生物学实验, 揭示了甜菜根部内生黄杆菌通过 *NRPS-PKS* 基因

簇抑制枯萎病菌 *Rhizoctonia solani* 的侵染<sup>[38]</sup>, 该研究或为内生菌群与植物互作的研究提供方法借鉴。

内生细菌的定量方法近年来取得了技术突破。对植物内生细菌进行定量分析时, 大多数研究都是针对可培养细菌、通过菌落计数进行定量<sup>[9,75-76]</sup>。受到微生物培养技术和内生细菌生长条件的限制, 很多内生细菌难以培养。免培养定量技术将有力促进对内生细菌丰度和定殖模式的解析。Guo 等建立了定量检测宿主微生物组的技术(host-associated quantitative abundance profiling, HA-QAP), 首次实现对植物相关细菌群落的定量分析<sup>[70]</sup>。Chen 等设计的细菌 16S rRNA 基因特异性引物能排除植物 DNA 的污染, 可对内生细菌含量很低的植物样本进行相对定量和绝对定量分析<sup>[6]</sup>。灵敏的菌群定量检测技术还将促进无菌植物培养体系和菌群移植体系的建立, 为在无菌体系中研究菌群功能及将特定共生菌或菌群定殖到植物内部的方法提供基础。

与植物表面、土壤和环境定殖的细菌相比, 内生细菌与植物的共生关系更为稳定。内生细菌与宿主的共同进化可能意味着宿主植物更容易从外部环境中选择这些内生细菌并富集于植物内部。因此, 使用内生细菌作为植物促生或抗病的载体, 是发展可持续农业中相对新颖但很有潜力的新领域, 内生细菌作为载体工程菌为植物提供优良性状也是未来农业发展的一个新趋势。将内生细菌通过遗传转化开发为载体工程菌, 以监测植物的胁迫和营养情况, 或者为植物引入目标性状, 以期实现增加营养利用率、提升作物抗病抗逆能力等目的。灵敏高效的植物内生细菌高通量测序及定量技术, 以及细菌的高通量培养技术的进步, 将促进内生细菌领域的快速发展。

## REFERENCES

- [1] Wilson D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition[J]. *Oikos*, 1995, 73(2): 274-276
- [2] Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW. Bacterial endophytes in agricultural crops[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1997, 43(10): 895-914
- [3] Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites[J]. *Natural Product Reports*, 2001, 18(4): 448-459
- [4] Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(5): 723-735
- [5] Müller DB, Vogel C, Bai Y, Vorholt JA. The plant microbiota: systems-level insights and perspectives[J]. *Annual Review of Genetics*, 2016, 50: 211-234
- [6] Chen LY, Zhang MT, Liu D, Sun HB, Wu JX, Huo Y, Chen XY, Fang RX, Zhang LL. Designing specific bacterial 16S rRNA gene primers to sequence and quantitate plant endo-bacteriome[J]. *Science China Life Sciences*, 2021. DOI: 10.1007/s11427-021-1953-5
- [7] 陈丽莹, 张玉满, 陈晓英, 方荣祥, 张莉莉. 茶树叶际选择性富集的内生细菌的鉴定[J]. *微生物学报*, 2018, 58(10): 1776-1785  
Chen LY, Zhang YM, Chen XY, Fang RX, Zhang LL. Identification of endophytic bacteria selectively enriched in *Camellia sinensis* leaf[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(10): 1776-1785 (in Chinese)
- [8] Kandel LS, Joubert MP, Doty LS. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants[J]. *Microorganisms*, 2017, 5(4): 77
- [9] Hardoim PR, Hardoim CCP, Van Overbeek LS, Van Elsas JD. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30438
- [10] Kaga H, Mano H, Tanaka F, Watanabe A, Kaneko S, Morisaki H. Rice seeds as sources of endophytic bacteria[J]. *Microbes and Environments*, 2009, 24(2): 154-162
- [11] Hardoim PR, Van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M, Sessitsch A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2015, 79(3): 293-320
- [12] Trivedi P, Leach JE, Tringe SG, Sa TM, Singh BK. Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(11): 607-621
- [13] Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S, Eisen JA, Sundaresan V. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice[J]. *PNAS*, 2015, 112(8): E911-E920
- [14] Chen T, Nomura K, Wang XL, Sohrabi R, Xu J, Yao LY, Paasch BC, Ma L, Kremer J, Cheng YT, et al. A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere[J]. *Nature*, 2020, 580(7805): 653-657
- [15] Reinhold-Hurek B, Hurek T. Living inside plants: bacterial endophytes[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14(4): 435-443
- [16] Meij A, Willemse J, Schneijderberg MA, Geurts R, Raaijmakers JM, Wezel GP. Inter- and intracellular colonization of *Arabidopsis* roots by endophytic actinobacteria and the impact of plant hormones on their antimicrobial activity[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2018, 111(5): 679-690
- [17] Raj G, Shadab M, Deka S, Das M, Baruah J, Bharali R, Talukdar NC. Seed interior microbiome of rice genotypes indigenous to three agroecosystems of Indo-Burma biodiversity hotspot[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 924
- [18] Marquez-Santacruz HA, Hernandez-Leon R, Orozco-Mosqueda MC, Velazquez-Sepulveda I, Santoyo G. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2010, 9(4): 2372-2380
- [19] Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64: 807-838
- [20] Cordovez V, Dini-Andreote F, Carrión VJ, Raaijmakers JM. Ecology and evolution of plant microbiomes[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2019, 73(1): 69-88
- [21] Frank AC, Saldierna Guzmán JP, Shay JE. Transmission of bacterial endophytes[J]. *Microorganisms*, 2017, 5(4): 70
- [22] Prospero JM, Blades E, Mathison G, Naidu R. Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust[J]. *Aerobiologia*, 2005, 21(1): 1-19
- [23] López-Fernández S, Mazzoni V, Pedrazzoli F, Pertot I,

- Campisano A. A phloem-feeding insect transfers bacterial endophytic communities between grapevine plants[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 834
- [24] Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Del Carmen Orozco-Mosqueda M, Glick BR. Plant growth-promoting bacterial endophytes[J]. *Microbiological Research*, 2016, 183: 92-99
- [25] Mitter B, Petric A, Shin MW, Chain PSG, Hauberg-Lotte L, Reinhold-Hurek B, Nowak J, Sessitsch A. Comparative genome analysis of *Burkholderia phytofirmans* PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 120
- [26] Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T, Mitter B, Hauberg-Lotte L, Friedrich F, Rahalkar M, et al. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis[J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2012, 25(1): 28-36
- [27] Pinto-Carbó M, Gademann K, Eberl L, Carlier A. Leaf nodule symbiosis: function and transmission of obligate bacterial endophytes[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2018, 44: 23-31
- [28] Meneses CHSG, Rouws LFM, Simoes-Araujo JL, Vidal MS, Baldani JI. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*[J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2011, 24(12): 1448-1458
- [29] Alquéres S, Meneses C, Rouws L, Rothballer M, Baldani I, Schmid M, Hartmann A. The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5[J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2013, 26(8): 937-945
- [30] Hu YL, Ribbe MW. Biosynthesis of the metalloclusters of molybdenum nitrogenase[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2011, 75(4): 664-677
- [31] Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes?[J]. *Trends in Microbiology*, 2009, 17(10): 458-466
- [32] Sessitsch A, Coenye T, Sturz AV, Vandamme P, Barka EA, Salles JF, Van Elsas JD, Faure D, Reiter B, Glick BR, et al. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(3): 1187-1192
- [33] Sun YL, Cheng ZY, Glick BR. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 296(1): 131-136
- [34] Liu YP, Zhu AP, Tan HM, Cao LX, Zhang RD. Engineering banana endosphere microbiome to improve *Fusarium* wilt resistance in banana[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 74
- [35] Horton MW, Bodenhausen N, Beilsmith K, Meng DZ, Muegge BD, Subramanian S, Vetter MM, Vilhjálmsson BJ, Nordborg M, Gordon JI, et al. Genome-wide association study of *Arabidopsis thaliana* leaf microbial community[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 5320
- [36] Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, Van Themaat EVL, Ahmadinejad N, Assenza F, Rauf P, Huettel B, Reinhardt R, Schmelzer E, et al. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota[J]. *Nature*, 2012, 488(7409): 91-95
- [37] Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrektson A, Kunin V, Rio TGD, et al. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome[J]. *Nature*, 2012, 488(7409): 86-90
- [38] Carrión VJ, Perez-Jaramillo J, Cordovez V, Tracanna V, De Hollander M, Ruiz-Buck D, Mendes LW, Van Ijcken WFJ, Gomez-Exposito R, Elsayed SS, et al. Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome[J]. *Science*, 2019, 366(6465): 606-612
- [39] Díaz Herrera S, Grossi C, Zawoznik M, Groppa MD. Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*[J]. *Microbiological Research*, 2016, 186/187: 37-43
- [40] Khalaf EM, Raizada MN. Taxonomic and functional diversity of cultured seed associated microbes of the cucurbit family[J]. *BMC Microbiology*, 2016, 16(1): 131
- [41] Verma SC, Singh A, Chowdhury SP, Tripathi AK. Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(5): 425-429

- [42] Chelius MK, Triplett EW. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(2): 783-787
- [43] Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere[J]. Science, 1997, 276(5313): 734-740
- [44] Tholozan JL, Cappelletti JM, Tissier JP, Delattre G, Federighi M. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(3): 1110-1116
- [45] Steen AD, Crits-Christoph A, Carini P, DeAngelis KM, Fierer N, Lloyd KG, Cameron Thrash J. High proportions of bacteria and archaea across most biomes remain uncultured[J]. The ISME Journal, 2019, 13(12): 3126-3130
- [46] Wang Q, Huang YG, Ren ZJ, Zhang XX, Ren J, Su JQ, Zhang C, Tian J, Yu YJ, Gao GF, et al. Transfer cells mediate nitrate uptake to control root nodule symbiosis[J]. Nature Plants, 2020, 6(7): 800-808
- [47] Watt M, Hugenholtz P, White R, Vinall K. Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots quantified by fluorescence *in situ* hybridization (FISH)[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(5): 871-884
- [48] Bulgari D, Casati P, Faoro F. Fluorescence *in situ* hybridization for phytoplasma and endophytic bacteria localization in plant tissues[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 87(2): 220-223
- [49] Sessitsch A, Reiter B, Pfeifer U, Wilhelm E. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomyces*-specific PCR of 16S rRNA genes[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 39(1): 23-32
- [50] Dent KC, Stephen JR, Finch-Savage WE. Molecular profiling of microbial communities associated with seeds of *Beta vulgaris* subsp. *Vulgaris* (sugar beet)[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(1): 17-26
- [51] Bulgari D, Casati P, Brusetti L, Quaglino F, Brasca M, Daffonchio D, Bianco PA. Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR[J]. The Journal of Microbiology, 2009, 47(4): 393-401
- [52] Johnston-Monje D, Mousa WK, Lazarovits G, Raizada MN. Impact of swapping soils on the endophytic bacterial communities of pre-domesticated, ancient and modern maize[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 233
- [53] Shi YW, Yang HM, Zhang T, Sun J, Lou K. Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of Tianshan mountain[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(14): 6375-6385
- [54] Cobo-Díaz JF, Baroncelli R, Le Floch G, Picot A. Combined metabarcoding and co-occurrence network analysis to profile the bacterial, fungal and *Fusarium* communities and their interactions in maize stalks[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 261
- [55] López S, Pastorino G, Franco M, Medina R, Lucentini C, Saparrat M, Balatti P. Microbial endophytes that live within the seeds of two tomato hybrids cultivated in Argentina[J]. Agronomy, 2018, 8(8): 136
- [56] Sharaf H, Rodrigues RR, Moon J, Zhang B, Mills K, Williams MA. Unprecedented bacterial community richness in soybean nodules vary with cultivar and water status[J]. Microbiome, 2019, 7(1): 63
- [57] Wang WF, Zhai YY, Cao LX, Tan HM, Zhang RD. Endophytic bacterial and fungal microbiota in sprouts, roots and stems of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Microbiological Research, 2016, 188/189: 1-8
- [58] Gulati A, Sood S, Rahi P, Thakur R, Chauhan S, Chadha ICN. Diversity analysis of diazotrophic bacteria associated with the roots of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 21(6): 545-555
- [59] Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(1): e1
- [60] Chelius MK, Triplett EW. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L.[J]. Microbial Ecology, 2001, 41(3): 252-263
- [61] Lundberg DS, Yourstone S, Mieczkowski P, Jones CD, Dangl JL. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 999-1002
- [62] Wang HX, Geng ZL, Zeng Y, Shen YM. Enriching plant microbiota for a metagenomic library construction[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(10): 2684-2691
- [63] Jiao JY, Wang HX, Zeng Y, Shen YM. Enrichment for

- microbes living in association with plant tissues[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(4): 830-837
- [64] Qin S, Chen HH, Zhao GZ, Li J, Zhu WY, Xu LH, Jiang JH, Li WJ. Abundant and diverse endophytic actinobacteria associated with medicinal plant *Maytenus austroyunnanensis* in Xishuangbanna tropical rainforest revealed by culture-dependent and culture-independent methods[J]. Environmental Microbiology Reports, 2012, 4(5): 522-531
- [65] Ikenaga M, Sakai MS. Application of locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide-PCR clamping technique to selectively PCR amplify the SSU rRNA genes of bacteria in investigating the plant-associated community structures[J]. Microbes and Environments, 2014, 29(3): 286-295
- [66] Ikenaga M, Katsuragi S, Handa Y, Katsumata H, Chishaki N, Kawauchi T, Sakai MS. Improvements in bacterial primers to enhance selective SSU rRNA gene amplification of plant-associated bacteria by applying the LNA oligonucleotide-PCR clamping technique[J]. Microbes and Environments, 2018, 33(3): 340-344
- [67] Jackrel SL, Owens SM, Gilbert JA, Pfister CA. Identifying the plant-associated microbiome across aquatic and terrestrial environments: the effects of amplification method on taxa discovery[J]. Molecular Ecology Resources, 2017, 17(5): 931-942
- [68] Song LY, Xie KB. Engineering CRISPR/Cas9 to mitigate abundant host contamination for 16S rRNA gene-based amplicon sequencing[J]. Microbiome, 2020, 8(1): 1-15
- [69] Remus-Emsermann MNP, Lückner S, Müller DB, Potthoff E, Daims H, Vorholt JA. Spatial distribution analyses of natural phyllosphere-colonizing bacteria on *Arabidopsis thaliana* revealed by fluorescence *in situ* hybridization[J]. Environmental Microbiology, 2014, 16(7): 2329-2340
- [70] Guo XX, Zhang XN, Qin Y, Liu YX, Zhang JY, Zhang N, Wu K, Qu BY, He ZS, Wang X, et al. Host-associated quantitative abundance profiling reveals the microbial load variation of root microbiome[J]. Plant Communications, 2020, 1(1): 100003
- [71] Vandeputte D, Kathagen G, D'hoë K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, Wang J, Tito RY, De Commer L, Darzi Y, et al. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load[J]. Nature, 2017, 551(7681): 507-511
- [72] 王志伟, 纪燕玲, 陈永敢. 植物内生菌研究及其科学意义[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 349-363
- Wang ZW, Ji YL, Chen YG. Studies and biological significances of plant endophytes[J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 349-363 (in Chinese)
- [73] Bai Y, Müller DB, Srinivas G, Garrido-Oter R, Potthoff E, Rott M, Dombrowski N, Münch PC, Spaepen S, Remus-Emsermann M, et al. Functional overlap of the *Arabidopsis* leaf and root microbiota[J]. Nature, 2015, 528(7582): 364-369
- [74] Zhang JY, Liu YX, Guo XX, Qin Y, Garrido-Oter R, Schulze-Lefert P, Bai Y. High-throughput cultivation and identification of bacteria from the plant root microbiota[J]. Nature Protocols, 2021, 16(2): 988-1012
- [75] Hacquard S, Garrido-Oter R, González A, Spaepen S, Ackermann G, Lebeis S, McHardy AC, Dangl JL, Knight R, Ley R, et al. Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms[J]. Cell Host & Microbe, 2015, 17(5): 603-616
- [76] Truyens S, Weyens N, Cuypers A, Vangronsveld J. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants[J]. Environmental Microbiology Reports, 2015, 7(1): 40-50