

# 应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析 玉米内生细菌多样性

陈泽斌<sup>1,2</sup>, 李冰<sup>3</sup>, 王定康<sup>4</sup>, 余磊<sup>1</sup>, 徐胜光<sup>1</sup>, 任禛<sup>1</sup>, 靳松<sup>1</sup>, 戴丽君<sup>5</sup>

(1. 昆明学院农学院, 云南昆明 650214) (2. 云南省都市特色农业工程技术研究中心, 云南昆明 650214)

(3. 中国科学院昆明动物研究所, 云南昆明 650223) (4. 昆明学院生命科学与技术系, 云南昆明 650214)

(5. 彭阳县科技服务中心, 宁夏固原 756500)

**摘要:** 为了调查玉米内生细菌种类多样性, 应用高通量测序技术测定玉米内生细菌的 16S rDNA-V4 变异区序列, 应用 Qiime 和 Mothur 等软件整理和统计样品序列数目和操作分类单元 (OTUs) 数量, 分析物种的丰度、分布和 Alpha 多样性, 以及物种丰富度的差异。本研究获得用于分析的有效序列和 OTU 数为 96334/156; 稀疏曲线表明测序深度充分, OTU 的数量接近于饱和。玉米 (样品名 YM) 的 Chao1 指数为 156.0, Shanno 多样性指数为 1.211。玉米内生细菌分布于以下 6 个属: 鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*, 37.78%), 盐单胞菌属 (*Halomonas*, 33.33%), 假单胞菌属 (*Pseudomonas*, 13.33%), 希瓦氏菌属 (*Shewanella*, 6.67%), 甲基杆菌属 (*Methylobacterium*, 4.44%), 土地杆菌属 (*Pedobacter*, 4.44%); 玉米内生细菌优势菌属为鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*, 37.78%), 盐单胞菌属 (*Halomonas*, 33.33%)。Illumina MiSeq 高通量测序技术为植物内生细菌的研究提供了更加准确、科学的数据资源。

**关键词:** 高通量测序; 玉米; 内生细菌; 多样性

文章编号: 1673-9078(2016)2-113-120

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.2.018

## Study on the Diversity of Endophytic Bacteria in Maize using Illumina MiSeq High-throughput Sequencing System

CHEN Ze-bin<sup>1,2</sup>, LI Bing<sup>3</sup>, WANG Ding-kang<sup>4</sup>, YU Lei<sup>1</sup>, XU Sheng-guang<sup>1</sup>, REN Zhen<sup>1</sup>, JIN Song<sup>1</sup>, DAI Li-jun<sup>5</sup>

(1. Agriculture College, Kunming University, Kunming 650214, China) (2. Engineering Research Center for Characteristics

Agriculture of Yunnan Province, Kunming 650214, China) (3. Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences,

Kunming 650223, China) (4. Life Science and Technology Department, Kunming University, Kunming 650214, China)

(5. Technology Service Center of Pengyang, Guyuan 756500, China)

**Abstract:** To investigate the diversity of the endophytic bacterial communities, high-throughput sequencing technique was used to measure the sequence of 16S rDNA-V4 variable region of endophytic bacteria in maize. QIIME and Mothur software programs were employed to sort and calculate the number of sequences and operational taxonomic units (OTUs) for each sample. Thereafter, the abundance, distribution, and alpha diversity index of species and the differences of species abundance among the samples were analyzed. The number of effective sequences and OTUs for each sample was 96334/156; the rarefaction curves showed a sufficient sequencing depth, and the number of OTUs was close to saturation. The Chao1 and Shannon indices of sample YM were 156.0 and 1.211, respectively. The endophytic bacteria in maize belonged to the following six genera: *Sphingomonas* (37.78%), *Halomonas* (33.33%), *Pseudomonas* (13.33%), *Shewanella* (6.67%), *Methylobacterium* (4.44%), and *Pedobacter* (4.44%). The dominant species were *Sphingomonas* and *Halomonas*, and accounted for 37.78% and 33.33%, of the total bacteria identified, respectively. Illumina MiSeq high-throughput sequencing system provides a more accurate and scientific data resource for the study of endophytic bacteria in plants.

**Key words:** high-throughput sequencing; maize; endophytic bacteria; diversity

收稿日期: 2015-04-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41361056); 云南省教育厅科学研究项目 (2014Y390); 云南省高校优势特色重点学科 (生态学) 建设项目共同资助。

作者简介: 陈泽斌 (1985-), 男, 博士, 副教授, 主要从事环境微生物的教学及科研工作

通讯作者: 李冰 (1973-), 女, 工程师, 主要从事安全性评价工作

关于植物内生细菌, 现已从多种健康植物的根、茎、叶、果实、种子中分离出包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌共计达 129 种(隶属于 54 个属)的植物内生细菌<sup>[1]</sup>。目前研究比较系统的植物有棉花、小麦和花生。发现优势种类主要分布于假单胞属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)4 个属<sup>[2]</sup>。目前还没有发现不存在内生细菌的植物种类或器官。

玉米原产于中美洲墨西哥和秘鲁, 16 世纪传入我国, 至今有 400 余年的栽培历史<sup>[3]</sup>。中国的玉米产量居世界第 2 位, 全世界玉米播种面积仅次于小麦、水稻而居第三位。在我国各地都有种植, 尤以东北、华北和西南各省较多, 是我国北方和西南山区及其它旱谷地区人民的主要粮食之一<sup>[4]</sup>。玉米也是全世界总产量最高的粮食作物、比水稻产量还要高。玉米作为世界上分布最广泛的粮食作物之一, 被广泛应用于饲料原料、工业原料、食品生产等诸多领域<sup>[5]</sup>。玉米的功效与作用包括减肥、防癌抗癌、降血压降血脂、增加记忆力、抗衰老、明目、促进胃肠蠕动<sup>[6]</sup>。

已有研究表明植物内生细菌的种类组成随品种、生长期、器官不同而不同<sup>[7]</sup>。目前关于玉米内生细菌多样性的研究主要采用传统培养方法, 集中于不同品种、不同生长期玉米植株根系<sup>[8-9]</sup>, 而对于玉米粒-种子这一器官的内生细菌研究鲜见报道。种子不仅是植物特殊而重要的器官, 而且是植物的一个发育阶段, 还是有益细菌和病原菌的传递载体<sup>[10]</sup>, 因此有必要对玉米种子内生细菌的种类组成进行研究。本研究采用近年来兴起的 Illumina MiSeq 第二代测序技术全面而准确地对玉米种子内生细菌种类组成进行研究, 相较于传统的纯培养方法及以 16S rDNA 为基础的非培养方法, 能够产生测序覆盖深度更大的数据量, 检测到传统纯培养和非培养技术未能发现的低丰度植物内生细菌种类, 为丰富植物微生物生态学理论及基因工程菌的研究和应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

玉米(编号 YM)品种为云南省审定玉米品种“彩糯 3 号”, 是云南田瑞种业有限公司于 2008 年用 TRWL01×TRWL06 组配而成的糯玉米单交种。高感灰斑病、大斑病、纹枯病, 感小斑病、锈病、丝黑穗病, 中感穗腐病, 中抗茎腐病, 抗弯孢霉叶斑病。样品取自昆明学院农学院“果蔬实践园”, 取样时选择成熟期生长性状良好、无病害症状的健康植株, 随机采集 20

个玉米粒放入样品袋中, 低温保鲜, 12 h 内处理<sup>[11]</sup>。

### 1.2 主要试剂与仪器

植物基因组 DNA 快速提取试剂盒 DP305 为天根生化科技(北京)有限公司产品; GeneJET 胶回收试剂盒为美国 Thermo Scientific 公司产品; 引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成; 高保真 PCR 酶 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer、Illumina 建库试剂盒 NEB Next® Ultra™ DNA Library Prep Kit 为 New England Biolabs 公司产品; MiSeq 测序试剂盒 v2、高通量测序仪(MiSeq System SY-410-1003)为美国 Illumina 公司产品; 分光光度计(Nano drop 2000/2000C)为美国 Thermo Scientific 公司产品。

### 1.3 表面消毒

将玉米粒用自来水冲洗干净, 再用 75% 的乙醇浸泡 1 min, 无菌水冲洗 3 次, 用无菌滤纸吸干表面水分, 表面消毒效果检验参照文献<sup>[12]</sup>。

### 1.4 总 DNA 提取

按参考文献<sup>[13]</sup>的方法提取玉米粒总 DNA, 并用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 的纯度和浓度, 取适量的样品于离心管中, 使用无菌水稀释样品至 1 ng/μL。

### 1.5 16S rDNA-V4 区的 PCR 扩增

以稀释后的基因组 DNA 为模板, 使用带 Barcode 的 16S rDNA-V4 区特异引物 515F (5'-GTTTCGGT GCCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 806R (5'-GCCAA TGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), 使用高效和高保真酶(New England Biolabs 公司的 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer) 进行 PCR, 确保扩增效率和准确性。

### 1.6 PCR 产物的混样和纯化

PCR 产物使用 2% 浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测; 根据 PCR 产物浓度进行等浓度混样, 充分混匀后使用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 使用 Thermo Scientific 公司的 GeneJET 胶回收试剂盒回收产物。

### 1.7 16S rDNA 文库构建并测序

#### 1.7.1 构建文库

使用 New England Biolabs 公司的 NEB Next®

Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina 建库试剂盒进行文库的构建。通过 3'-5'核酸外切酶及聚合酶的共同作用,修复带有突出末端的 DNA 片段。在修复平整的 DNA 片段 3'端引入单碱基“A”,接头的 3'末端含有单碱基“T”,从而保证 DNA 片段和接头能够通过“A”、“T”互补配对连接,并防止接头连接 DNA 片段的过程中, DNA 片段彼此相连。在连接酶的作用下,孵育含有标签的接头与 DNA 片段,使其相连。利用 PCR 选择性地富集两端连有接头的 DNA 片段,同时扩增 DNA 文库。PCR 应尽量使用较少的循环数,避免 PCR 扩增中文库出现错误。构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测,合格后,使用 MiSeq 进行上机测序<sup>[14-17]</sup>。

### 1.7.2 均一化文库

将样品 DNA 文库均一化至 10 nmol/L 后等体积混合。

### 1.7.3 上机测序

将混合好的文库 (10 nmol/L) 逐步稀释定量至 4~5 pmol/L 后用 Illumina MiSeq 测序仪测序。进行生物信息分析。本研究的测序和生物信息服务在北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成。

## 1.8 生物信息学分析

测序得到的原始数据 (Raw Data), 存在一定比例的干扰数据 (Dirty Data), 为了使信息分析的结果更加准确、可靠, 首先对原始数据经过拼接、过滤、去嵌合体后, 得到有效数据 (Effective tags)<sup>[18]</sup>, 剔除宿主叶绿体和线粒体序列, 然后对有效数据在 97% 水平上进行 OUT 聚类, 并利用 Greengene 数据库进行物种注释<sup>[19]</sup>。通过对 OTUs 进行丰度、Alpha-diversity、Beta diversity 以及物种在各个分类水平上的群落结果统计分析, 得到微生物群落结构组成<sup>[20-21]</sup>。

## 1.9 数据分析

利用 uparse (version 7.1 <http://qiime.org/>) 软件平台进行 OTU 聚类, 采用 RDPclassifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析, 并在各个水平上统计每个样品的群落组成; 利用 Mothur 软件做稀释曲线分析; 分别利用香农指数 (Shannon)、辛普森指数 (Simpson) 和物种丰富度指数 (ACE) 公式计算细菌生态多样性指数; 利用 Excel 和 Mothur 软件制作 Venn 图; 利用 Fasttree 软件+R 语言制作热图; 利用诺禾致源自主开发的软件 SVG 制作特定物种分类树图。

## 2 结果与分析

### 2.1 序列长度分布

YM 样品所测得的 96345 条 PE Reads 长度分布在 189~349 bp 范围内, 长度为 255 bp 的序列最多, 有 96131 条 (图 1)。从序列长度的分布来看, 与 16S rDNA-V4 区序列长度大致吻合。

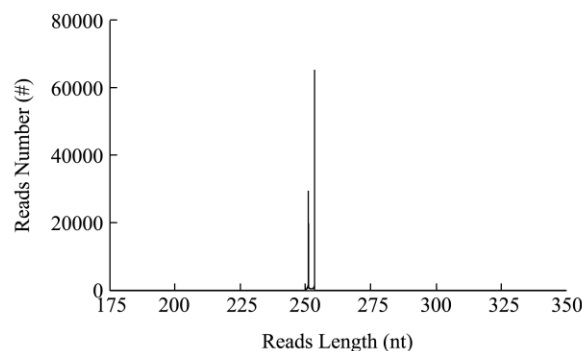


图 1 序列长度的分布

Fig.1 Distribution of sequence length

### 2.2 OTUs 数目统计及物种注释分析

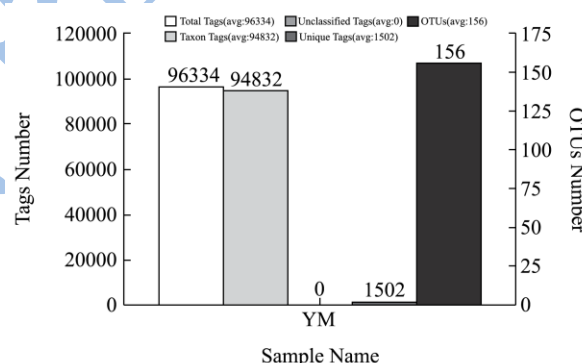


图 2 样品的 Tags 和 OTUs 数目统计

Fig.2 Statistics of the numbers of tags and OTUs in sample YM

表 1 各分类水平上的序列数目

Table 1 Number of sequences at each classification level

样品名	界	门	纲	目	科	属	种
YM	94832	94832	94832	94815	30239	45	5

YM 共获得 96334 条 Tags (过滤后得到的拼接序列数), 可分为 156 个 OTUs (97% 的序列相似性, 下同), 包括 94832 条可获得分类信息的 Tags, 1502 条低频 Tags (图 2)。YM 可以注释到 45 个属, 5 个种 (表 1)。图 3 展示了 YM 样品中相对丰度排名前 6 个属细菌所对应的 OTUs 的系统发生关系数据, 表明玉米内生细菌主要分布于以下 6 个属: 鞘氨醇单胞菌属 (*Spingomonas*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、土地杆

菌属(*Pedobacter*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)；从 OTUs 丰度聚类图来看(图4)，在属的分类水平上，相对丰度由大到小依次为：鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)>盐单胞菌属(*Halomonas*)>假单胞菌属(*Pseudomonas*)>希瓦氏菌属(*Shewanella*)>甲基杆菌属(*Methylobacterium*)=土地杆菌属(*Pedobacter*)。

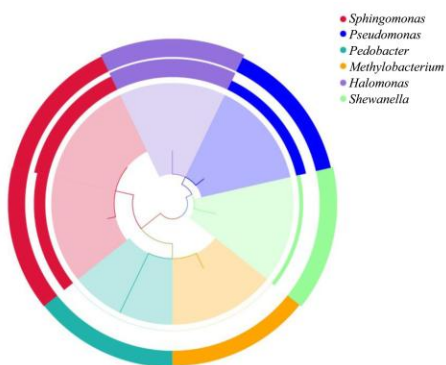


图3 OTUs 的系统发育关系及其物种注释

Fig.3 Phylogenetic relationship and species annotation of OTUs

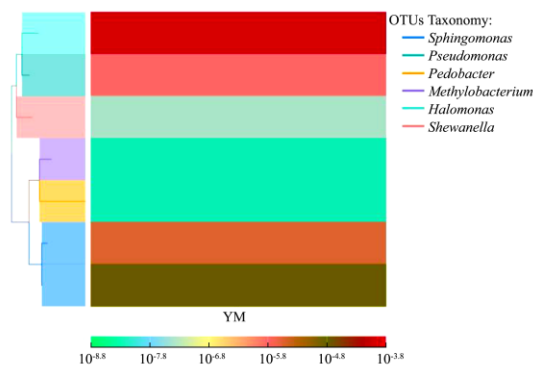


图4 OTUs 丰度聚类图

Fig.4 Abundance clustering plot of OTUs

### 2.3 多样品中特定物种分类树

从门的分类水平来看(图5)，玉米内生细菌在变形菌门(*Proteobacteria*, 95.56%)、

拟杆菌门(*Bacteroidetes*, 4.44%)中均有分布；从纲的分类水平来看(图5)，玉米内生细菌在 $\gamma$ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*, 53.33%)、 $\alpha$ -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*, 42.22%)、*Sphingobacteriia* 纲(4.44%)中均有分布；从目的分类水平来看(图5)，玉米内生细菌在鞘脂杆菌目(*Sphingobacteriales*, 4.44%)、根瘤菌目(*Rhizobiales*, 4.44%)、鞘脂单胞菌目(*Sphingomonadales*, 37.78%)、交替单胞菌目(*Alteromonadales*, 6.67%)、海洋螺菌目(*Oceanospirillales*, 33.33%)、假单胞菌目(*Pseudomonadales*, 13.33%)中均有分布；从科的分

类水平来看(图5)，玉米内生细菌在鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*, 37.78%)、盐单胞菌属(*Halomonas*, 33.33%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*, 13.33%)、希瓦氏菌属(*Shewanella*, 6.67%)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*, 4.44%)、土地杆菌属(*Pedobacter*, 4.44%)；由此可见，鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*, 37.78%)、盐单胞菌属(*Halomonas*, 33.33%)为玉米内生细菌的优势种群。

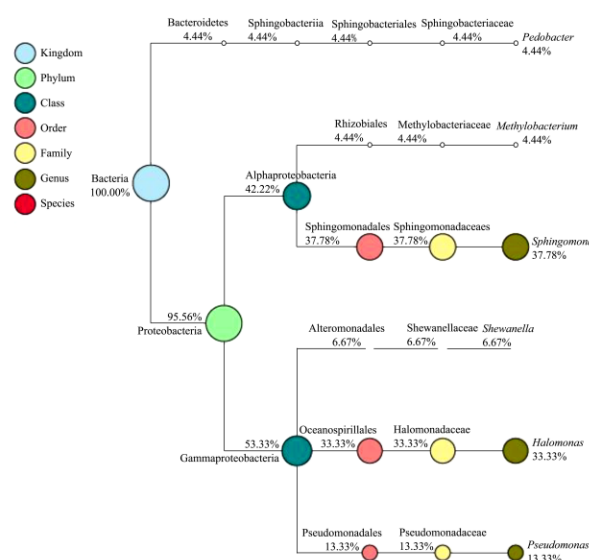


图5 样品 YM 中特定物种分类树

Fig.5 Classification tree of particular species from sample YM

注：数字表示该分类所占比例。

### 2.4 样品复杂度分析

从稀释曲线来看(图6)，随着测序数量的增加，稀释曲线斜率逐渐降低，趋向平坦但未进入平台期，说明再增加测序数量也只会产生少量新的 OTUs；从 Chao1 指数曲线来看(图7)，Chao1 指数在 0~2e+04 的测序数量范围内增幅最大，在 2e+04 以后曲线斜率下降；从 Shannon 指数曲线来看(图8)，Shannon 指数在 0~2e+04 的测序数量范围内增幅最大，在 2e+04 以后曲线斜率下降。3 条曲线在测序数量超过 2e+04 后都趋近平缓，说明测序数据量足够大，可以反映样品中绝大多数的微生物信息；从 Rank Abundance 曲线来看(图9)，YM 样品在水平方向的跨度较大，在垂直方向的平滑程度小，说明玉米内生细菌的丰度大，

且物种分布的均匀度低。

表 2 多样性指数统计表

**Table 2 Table of alpha diversity indices**

样品名称	OTU 数目 OTU (97%)	Chao1 指数 Chao1 (97%)	Shannon 指数 Shannon (97%)
YM	156	156.0	1.211

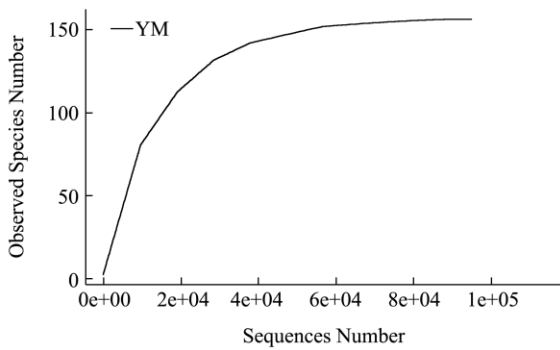


图 6 稀释曲线

Fig.6 Rarefaction curve

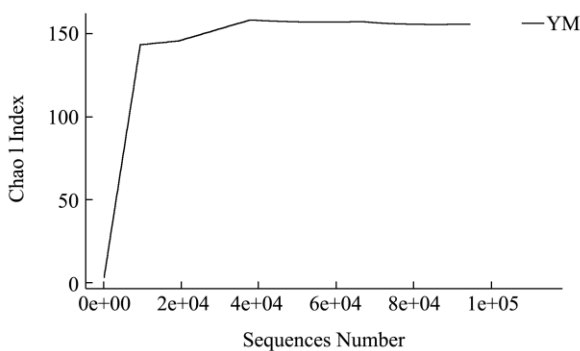


图 7 Chao1 指数曲线

Fig.7 Chao1 index curve

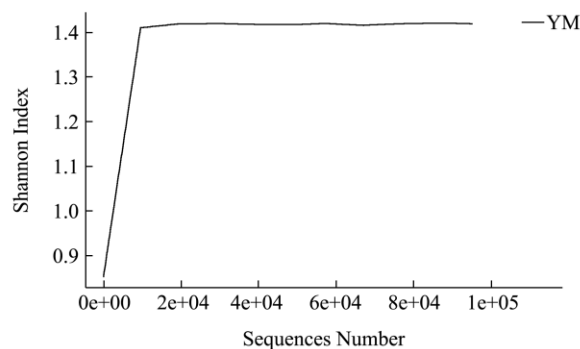


图 8 Shannon 指数曲线

Fig.8 Shannon index curve

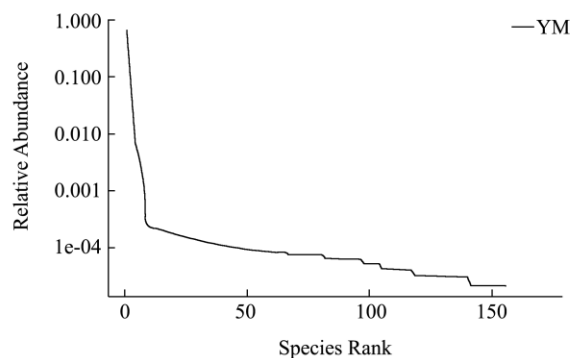


图 9 Rank abundance 曲线

Fig.9 Rank abundance curve

### 3 讨论

16S rRNA 基因很早就应用在微生物菌种鉴定上，但利用高通量测序进行 16S rRNA 分析最早出现在 2006 年，Sogin 等<sup>[22]</sup>应用该技术对深海微生物群落进行了分析，随后该技术在肠道微生物领域得到了广泛应用<sup>[23]</sup>。目前该技术应用于植物内生微生物的研究尚未见报道。本研究首次将近几年迅速发展并成为主流的 Illumina MiSeq 第二代测序技术应用于植物内生细菌研究，克服了传统分子生物学方法通量低的缺陷，从基因组的水平上解析微生物群落结构，突破了很多厌氧内生微生物尚不能被分离培养的技术瓶颈<sup>[24-25]</sup>，相较于传统的纯培养和以 16S rDNA 为基础的非培养方法，Illumina MiSeq 第二代测序技术可以检测到以往没有检测到的，同样扮演着重要角色的低丰度植物内生细菌种类，丰富植物内生细菌资源，例如：甲基杆菌属 (*Methylobacterium*, 4.44%)、土地杆菌属 (*Pedobacter*, 4.44%)。本研究对植物中好氧、厌氧和兼性厌氧内生微生物群落的种类、丰度和分布进行了分析，显示出高通量技术在植物内生微生物研究中的明显优势，相较于传统分子生物学的研究结果，高通量测序技术覆盖了整个内生微生物群落的信息，能更准确的反映植物内生微生物中不同丰度菌群的组成和真实比例，本研究可为今后其他研究者使用该技术开发同类研究提供参考。

就植物组织而言，叶绿体和线粒体与细菌在系统发育上具有高度的同源性<sup>[26]</sup>。在对核桃内生细菌的 16S rDNA-V4 变异区序列进行 Illumina MiSeq 高通量测序后，确实发现部分序列归属于宿主叶绿体和线粒体，存在一定比例的宿主污染现象，为了使细菌多样性的分析结果更加准确、可靠，本研究剔除了宿主叶绿体和线粒体序列。本研究只选择了 16S rDNA-V4 区作为测序区域，若要将高通量测序技术更好的应用于植物内生微生物研究，下一步应在不同高通量测序平台上针对 16S rDNA 不同可变区的选择及组合做尝试，评估样品的复杂程度以及宿主的污染情况，选择合理的测序区域或设计特异性更高的引物，制定更好的测序策略，以避免线粒体和叶绿体的干扰。

本研究结果只能将内生细菌注释到属的分类水平，而第一代 Sanger 测序可以将细菌注释到种的水

平,这是因为16S rRNA总长约1540 bp,包含9个可变区,第一代测序读长长、准确率较高,所以能根据测得的全长16S rRNA序列注释到种,但第一代Sanger测序通量较低,大规模测序成本高。Illumina MiSeq高通量测序技术,一般每个样品可以保证测定4-6万个序列数,由于覆盖深度非常大,对物种多样性的分析十分有利,但是通量的增加是以牺牲序列读长为代价,由于高通量测序读长短,不可能将16S rRNA的9个可变区全部测序,所以往往只选择1-3个可变区作为测序区域,单端测序长度可达到250 bp,双端测序长度可达到500 bp,测序片段越短,在后续对序列进行物种注释时的分辨率越低。

本研究发现玉米内生细菌的优势种群为鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)和盐单胞菌属(*Halomonas*)为玉米内生细菌的优势种群。这与前人通过培养方法得出植物优势类群为芽孢杆菌属(*Bacillus*)细菌的结果不同<sup>[27]</sup>,这是因为培养方法分析的细菌只限于那些能够在人工培养基上生长的细菌,而许多研究已经证实,通过传统的分离培养方法鉴定的微生物只占环境生物总数的0.1%~10%<sup>[28-29]</sup>,因此通过传统培养方法得到的结果并不能真实的反映出内生细菌多样性,这就使得用传统方法研究植物内生细菌的种群结构、多样性及与宿主之间的相互作用受到了极大的限制。采用近年来兴起的Illumina MiSeq高通量测序技术可为植物内生细菌的研究提供了更加准确、科学的数据资源。已有研究表明,鞘氨醇单胞菌属细菌能够利用的底物广泛,从多环芳烃类化合物、聚乙烯醇等高聚物到简单无机物 $N_2$ 都能利用,某些种属还能产生有价值的生物高分子(如 $\beta$ -胡萝卜素、结冷胶)<sup>[30]</sup>。说明玉米内生细菌可为复杂有机物的降解提供良好的微生物来源;还有研究表明,定殖生长于植物组织中的内生细菌,有些能够产生细胞壁降解酶类<sup>[31]</sup>。这些物质对植物抵抗病原菌侵入、潜伏、扩展蔓延等都是非常重要的。真菌细胞壁的主要组成成份是葡聚糖和几丁质,某些内生细菌产生细胞壁降解酶如葡聚糖酶( $\beta$ -glucanase)和几丁质酶(Chitinase),使真菌细胞水解或死亡,从而达到防病效果。例如,一种用于防治棉花黄萎病的内生菌,可产生某些蛋白酶降解毒素达到防病的效果<sup>[31]</sup>。因此推测玉米内生细菌的优势类群鞘氨醇单胞菌属细菌能够降解某些病原菌的细胞壁或毒素,与寄主植物的抗病性直接相关。据报道盐单胞菌属细菌主要分离自湖泊、海洋,其作为内生细菌的优势种群尚属首次报道<sup>[32]</sup>,关于盐单胞菌属细菌的功能、代谢的研究未见报道。

## 4 结论

本研究首次应用Illumina MiSeq高通量测序技术分析玉米内生细菌多样性,全面而准确地分析了玉米内生细菌的种类组成,发现玉米内生细菌主要分布于以下6个属:鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、土地杆菌属(*Pedobacter*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*),其中,鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*, 37.78%)、盐单胞菌属(*Halomonas*, 33.33%)为玉米内生细菌的优势种群。

## 参考文献

- [1] 周佳宇,贾永,王宏伟,等.茅苍术叶片可培养内生细菌多样性及其促生潜力[J].生态学报,2013,4:1106-1117  
Zhou Jia-yu, JIA Yong, WANG Hong-wei, et al. Diversity and plant growth-promoting potential of culturable endophytic bacteria isolated from the leaves of *Atractylodes lancea* [J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 4: 1106-1117
- [2] 刘波,郑雪芳,孙大光,等.柑橘黄龙病株不同部位内生细菌群落结构的多样性[J].生态学报,2011,24:7325-7342  
LIU Bo, ZHEN Xue-fang, SUN Da-guang, et al. The community structure of endophytic bacteria in different parts of huanglongbing-affected citrus plants[J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 24: 7325-7342
- [3] 杨红旗,路凤银,郝仰坤,等.中国玉米产业现状与发展问题探讨[J].中国农学通报,2011,6:368-373  
YANG Hong-qi, LU Feng-yin, Hao Yang-kun, et al. Situation analysis and development strategy of maize industry in China [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 6: 368-373
- [4] 代养勇,董海洲,王志刚,等.我国玉米深加工产业现状及发展趋势[J].中国食物与营养,2011,4:37-39  
DAI Yang-yong, DONG Hai-zhou, WANG Zhi-gang, et al. Current situation and developing trend of corn deep processing industry in China [J]. Food and Nutrition in China, 2011, 4: 37-39
- [5] 杨庆才.玉米产业经济发展战略的思考[J].玉米科学,2010, 1:135-138+145  
YANG Qing-cai. Thoughts on the development strategy of maize industrial economy [J]. Journal of Maize Sciences, 2010, 1: 135-138+145
- [6] 董树亨,张吉旺.建立玉米现代产业技术体系,加快玉米生产发展[J].玉米科学,2008,4:18-20+25

- DONG Shu-ting, ZHANG Ji-wang. The establishment of maize modern industrial technology system, accelerate the development of maize production [J]. Journal of Maize Sciences, 2008, 4: 18-20+25
- [7] 刘洋,左山,邹媛媛,等.杂交玉米农大 108 及其亲本种子内生细菌群落的多样性[J].中国农业科学,2011,23:4763-4771
- LIU Yang, ZUO Shan, ZOU Yuan-yuan, et al. Diversity of endophytic bacterial communities in seeds of hybrid maize (*Zea mays* L., Nongda108) and their parental lines[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 23: 4763-4771
- [8] 高增贵,陈捷,刘限,等.玉米品种遗传多态性与根系内生细菌种群的相互关系[J].生态学报,2006,6:1920-1925
- GAO Zeng-gui, CHEN Jie, LIU Xian, et al. The correlation between maize genetic polymorphisms and endophytic bacteria population in plant roots [J]. Acta Ecologica Sinica, 2006, 6: 1920-1925
- [9] 辜运富,张云飞,张小平.玉米苗期内生细菌的种群初探及有益内生细菌的筛选[J].微生物学通报,2008,7:1028-1033
- GU Yun-Fu, ZHANG Yun-Fei, ZHANG Xiao-Ping. Preliminary research on the flora of endophytic bacteria and selection of useful endophytic bacteria in the seedling of maize [J]. Microbiology China, 2008, 7: 1028-1033
- [10] 高增贵,庄敬华,陈捷,等.玉米根系内生细菌种群及动态分析[J].应用生态学报,2004,8:1344-1348
- GAO Zeng-gui, ZHUANG Jing-hua, CHEN Jie, et al. Preliminary research on the flora of endophytic bacteria and selection of useful endophytic bacteria in the seedling of maize [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 8: 1344-1348
- [11] 雷晓凌,李军,肖胜蓝,等.徐闻牡丹珊瑚共附生真菌分离鉴定及多样性分析[J].现代食品科技,2013,29(08):1766-1769
- LEI Xiao-ling, LI Jun, XIAO Sheng-lan, et al. Isolation and identification of endophytic fungi associated with pavonia lamarck of xuwen natural reserve [J]. Modern Food Science and Technology, 2013,29(08):1766-1769
- [12] 陈泽斌,代方平,寸林江,等.烟草内生细菌分离方法的优化研究[J].中国烟草学报,2014,01:90-95+102
- CHEN Ze-bin, DAI Fang-ping, CUN Lin-jiang, et al. Research on separation optimization of endophytic bacteria in Tobacco[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2014, 01: 90-95+102
- [13] 邱服斌.培养方法与非培养方法对人参根内生细菌的研究[D].北京:首都师范大学,2007
- QIU Fu-bin. Exploration on endophytic bacteria in *Panax ginseng* roots with culture-dependent and culture-independent approaches [D]. Beijing: Capital Normal University, 2007
- [14] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011, 108 Supp11: 4516-4522
- [15] Youssef N, Sheik CS, Krumholz LR, et al. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys [J]. Applied and Environmental Microbiology. 2009, 75(16): 5227-5236
- [16] Hess M, Sczyrba A, Egan R, et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen[J]. Science, 2011, 331(6016):463-467
- [17] Luo C, Tsementzi D, Kypides N, et al. Direct comparisons of illumina vs. roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample [J]. PloS One, 2012, 7(2): e30087
- [18] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection [J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194-200
- [19] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998
- [20] Wang Q1, Garrity GM, Tiedje JM, et al. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267
- [21] DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(7): 5069-72
- [22] Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "Rare Biosphere"[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(32): 12115-12120
- [23] 南春燕,马雅军,徐建农,等.中华按蚊幼虫肠道细菌宏基因组的组成研究[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2013, 31(2):114-119
- Nan CY, Ma YJ, Xu JN, et al. Taxonomic composition of metagenomic community in the larval gut of mosquito *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2013, 31(2): 114-119
- [24] Tholozan JL, Cappelletti JM, Tissier JP, et al. Physiological characterization of viable-but-nonculturable campylobacter

- jejuni cells [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65(3): 1110-1116
- [25] Ammann RR, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiol Rev., 1995, 59(1): 143-169
- [26] 胡楷,吴庆书.单细胞生物进化研究的进步[J].遗传,2002, 24(1):104-110  
HU Kai, WU Qing-shu. The basic outline of the evolution of single cell life-form [J]. Hereditas (Beijing), 2002, 24(1): 104-110
- [27] 高增贵,庄敬华,陈捷,等.玉米根系内生细菌种群及动态分析[J].应用生态学报,2004,15(8):1344-1348  
GAO Zeng-gui, ZHUANG Jing-hua, CHEN Jie, et al. Population of endophytic bacteria in maize roots and its dynamic analysis [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004,15(8):1344-1348
- [28] Tholozan JL, Cappelier JM, Tissier JP, et al. Physiological characterization of viable-but-nonculturable campylobacter jejuni cells [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65(3): 1110-1116
- [29] Ammann RR, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiol Rev., 1995, 59(1): 143-169
- [30] 胡杰,何晓红,李大平,等.鞘氨醇单胞菌研究进展[J].应用与环境生物学报,2007,13(3):431-437  
HU Jie, HE Xiao-hong, LI Da-ping, et al. Progress in research of *Sphingomonas* [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2007, 13(3): 431-437
- [31] COOK RJ. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens [J]. Annual Review of Phytopathology, 1993, 31: 53-80
- [32] 彭亚林,何培青,黄晓航,等.印度洋深海热液区一株盐单胞菌 *Halomonas* sp. YD-7 的分离鉴定及研究[J].海洋科学进展,2009,27(3):367-375  
PENG Ya-lin, HE Pei-qing, HUANG Xiao-hang, et al. Isolation, identification and study of *halomonas* sp. YD-7 from deep-sea hydrothermal vent in indian ocean[J]. Advances in Marine Science, 2009, 27(3): 367-375