

DOI: 10.5846/stxb201906151267

张爱梅, 郭保民, 韩雪英, 李曦冉. 两种不同生境中国沙棘种子内生细菌的多样性. 生态学报, 2020, 40(15): 5247-5257.

Zhang A M, Guo B M, Han X Y, Li X R. Diversity of endophytic bacteria in seeds of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* in two different habitats. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(15): 5247-5257.

两种不同生境中国沙棘种子内生细菌的多样性

张爱梅^{1,*}, 郭保民¹, 韩雪英², 李曦冉¹

¹ 西北师范大学生命科学院, 兰州 730070

² 玉门市第一中学, 玉门 735200

摘要: 植物内生菌广泛分布于植物的各种组织及器官中, 对植物的生长表现出各种作用, 而植物种子中的内生菌对植物的作用也越来越受到人们的关注。以榆中县和秦安县两种不同生境的中国沙棘种子为材料, 分析中国沙棘种子内生细菌多样性, 以期探究生境对种子内生菌多样性的影响, 并为进一步研究种子内生菌与沙棘的相互作用提供依据。研究利用纯培养方法和高通量测序方法分别进行中国沙棘种子内生细菌多样性分析。对纯培养分离得到的内生细菌, 利用 16S rRNA 基因序列分析法结合形态学特征进行内生细菌的鉴定; 对高通量测序得到的数据进行基于 OTUs (Operational Taxonomic units, 可操作分类单元) 的物种注释分析。通过纯培养方法从榆中县中国沙棘种子中分离得到 4 株内生细菌, 分属于芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*); 秦安县中国沙棘种子中分离得到 5 株内生细菌, 分属于芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 和不动杆菌属 (*Acinetobacter*)。采用高通量测序方法检测到榆中县中国沙棘种子内生细菌分属于 7 个门、68 个属, 秦安县中国沙棘种子内生细菌分属于 5 个门、30 个属。在门分类水平, 榆中县中国沙棘种子内生细菌的主要优势门类是蓝藻门 (Cyanobacteria) 和变形菌门 (Proteobacteria), 相对丰度分别为 95.62% 和 2.03%; 秦安县中国沙棘种子的主要优势门类是变形菌门 (Proteobacteria) 和蓝藻门 (Cyanobacteria), 相对丰度分别为 91.68% 和 8.06%。在属分类水平, 榆中县中国沙棘种子内生细菌的优势菌属为蓝藻细菌属 (*Cyanobacteria*), 相对丰度为 95.09%; 秦安县中国沙棘种子内生细菌的优势菌属为寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*), 相对丰度为 85.60%。榆中县和秦安县两种不同生境中国沙棘种子内生细菌有着丰富的多样性, 且内生细菌的多样性和丰富度存在明显差异, 表现为榆中县中国沙棘种子内生细菌的多样性和丰富度均高于秦安县中国沙棘种子内生细菌。

关键词: 高通量测序; 纯培养; 内生细菌; 多样性; 沙棘种子

Diversity of endophytic bacteria in seeds of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* in two different habitats

ZHANG Aimei^{1,*}, GUO Baomin¹, HAN Xueying², LI Xiran¹

¹ College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China

² Yumen First Middle School, Yumen 735200, China

Abstract: Endophytic bacteria are widely distributed in various tissues and organs of plants and play various roles in the growth of plants. Moreover, the role of endophytic bacteria in plant seeds on plants has attracted more and more attention. In this paper, seeds of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* in Yuzhong County and Qin'an County were used as materials to analyze its endogenous bacteria diversity, in order to explore the impact of habitat on the endogenous bacteria diversity of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* seeds and to provide a basis for further research on the interaction between *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* and endophytic bacteria. The diversity of endophytic bacteria in *Hippophae rhamnoides* subsp.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31360005)

收稿日期: 2019-06-15; 网络出版日期: 2020-05-22

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhangaimai@nwnu.edu.cn

sinensis seeds was analyzed by plate culture method and high-throughput sequencing method. The endophytic bacteria isolated from plate culture method were identified by 16S rRNA gene sequence analysis combined with morphological characteristics. For high-throughput sequencing data based on the analysis of Operational Taxonomic units species annotation. Four strains of endophytic bacteria were isolated from the seeds of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* in Yuzhong County by plate culture method, which were classified into *Bacillus*, *Staphylococcus* and *Pseudomonas*. Five strains of endophytic bacteria were isolated from the seeds of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* in Qin'an County, which were classified into *Bacillus*, *Staphylococcus* and *Acinetobacter*. The endophytic bacteria of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* seeds in Yuzhong County belong to 7 phyla and 68 genera and the endophytic bacteria of *Hippophae rhamnoides* subsp. *Sinensis* seeds in Qin'an County belonging to 5 phyla and 30 genera were detected by high throughput sequencing. Among them, at the phylological classification level, the main dominant phylum of endophytic bacteria from *Hippophae rhamnoides* subsp. *Sinensis* seeds in Yuzhong County were Cyanobacteria and Proteobacteria, with relative abundance of 95.62% and 2.03%, respectively. The main dominant phyla of *Hippophae rhamnoides* subsp. *Sinensis* seeds in Qin'an County were Proteobacteria and Cyanobacteria, with relative abundance of 91.68% and 8.06%, respectively. At the level of genus classification, the dominant endophytic of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* seeds in Yuzhong County was *Cyanobacteria* with a relative abundance 95.09%. The dominant endophytic of *Hippophae rhamnoides* subsp. *Sinensis* seeds in Qin'an County was *Stenotrophomonas* with a relative abundance of 85.60%. The endophytic bacteria of *Hippophae rhamnoides* subsp. *Sinensis* seeds in Yuzhong County and Qin'an County were rich in diversity. The diversity and richness of endogenous bacteria were obviously different. The diversity and richness of endophytic bacteria in seeds of *Hippophae rhamnoides* subsp. *Sinensis* were higher in Yuzhong County than those in Qin'an County.

Key Words: high-throughput sequencing; plate culture; endophytic bacteria; diversity; *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* seeds

植物内生菌是指生活在健康植物的不同器官和组织内,并与宿主植物能够建立和谐共生关系的一类微生物^[1]。植物内生菌广泛存在于植物的根、茎、叶、花、果实和种子中,具有丰富的多样性^[2]。作为植物的繁殖器官,种子在植物性状和品质传承中发挥着重要作用。种子可作为多种有益细菌和病原菌的载体,已有研究证实植物种子内部携带有丰富的微生物种群^[3]。在植物种子萌发和发育过程中,种子内生菌还能产生吲哚乙酸(Indole-3-acetic acid),直接促进种子的生长,此外,种子内生菌具有溶磷和固氮作用,能促进种子对磷和氮元素的吸收利用,有效提高种子萌发率、幼苗存活率和生物量积累等^[4-5]。

中国沙棘(*Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis*)是胡颓子科沙棘属的灌木或小乔木,广泛分布于干旱、半干旱地区,根系发达。其根部由于弗兰克氏菌的侵染,能形成明显的根瘤^[6-7]。现有研究也表明,中国沙棘内生菌有着丰富的组织多样性,沙棘内生菌不仅存在于其根瘤中^[8],还存在于其根、茎和叶等组织中^[9],且在這些组织中的内生菌还具有丰富的种类多样性。但是,关于中国沙棘种子内生菌的研究还鲜有报道,为了深入了解中国沙棘种子内生细菌的多样性,明确沙棘种子内生细菌的群落结构组成及特点,本研究以分布在甘肃榆中县和秦安县的野生中国沙棘为材料,收集其种子,采用纯培养技术和高通量测序技术,研究中国沙棘种子内生细菌的多样性,获得具有潜在应用价值的种子内生细菌资源。以期探究两种不同生境的中国沙棘种子内生细菌多样性差异,为沙棘种子内生细菌多样性的研究与应用提供参考,并为更进一步开展种子内生细菌相关研究提供有价值的菌株材料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 采样地概况

于2017年9月,在甘肃省榆中县马衔山(样品编号为A)和秦安县王铺乡(样品编号为B)两个典型的野

生中国沙棘灌丛居群中,以五点取样法分别选取树龄基本相同的野生中国沙棘,采集树上成熟的果实,剥去果肉后,选择颗粒圆润、饱满的种子作为实验材料,样地信息详见表 1。

榆中县马衔山样地地处北纬 35°46′、东经 103°57′,海拔为 2791 m,样地为石质山地林区;秦安县王铺乡样地地处北纬 35°05′、东经 105°23′,海拔为 1960 m,样地为黄土梁地形;两样地均为黄土高原高寒阴湿区,采样地分布有大量的野生中国沙棘。榆中县马衔山和秦安县王铺乡两样地海拔、年降水量和年均气温存在较大差异,土壤类型和 pH 等环境因子差异均较小。

表 1 中国沙棘样地信息

Table 1 Sample plots information of the *Hippophae rhamnoides* subsp. *Sinensis*

样品 Sample	海拔 Altitude/m	生境 Habitat	土壤 pH Soil pH	土壤类型 Agrotype	经纬度 Longitude Latitude	土壤含水量 Soil Moisture/%	年降水量 Annual precipitation/ mm	年均气温 Annual average Temperature/℃
A	2791	沙棘灌丛	7.30	灰褐土	E103°57' N35°46'	26.9	650	10
B	1960		7.50		E105°23' N35°01'	27.5	550	7

A:榆中县中国沙棘种子;B:秦安县中国沙棘种子

1.1.2 主要设备与试剂

高压蒸汽灭菌锅(DSX-280B),上海博迅实业有限公司;超净工作台(5W-CJ-2FD),苏州安泰空气技术有限公司;凝胶成像仪(JS780),Bio-Rad 公司;PCR 仪(EPC-810),东胜创新生物科技有限公司;电泳仪(DYY-12),北京六一生物科技有限公司;恒温震荡摇床(H2Q-F160A),上海一恒科学仪器有限公司;高速台式离心机(TG20-WS),湖南湘立科学仪器有限公司;电热恒温培养箱(DHP-9080B),上海琅玕实验设备有限公司。

PCR 扩增引物,北京奥科鼎盛生物科技有限公司;2×ES Taq MasterMix,康为世纪生物科技有限公司;牛肉膏、蛋白胨、氯化钠和琼脂等(北京奥博星生物技术有限责任公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 沙棘种子内生细菌的纯培养

(1)沙棘种子可培养内生细菌的分离与纯化

称取 1 g 沙棘种子样品于 10 mL 离心管中,加 5 mL 75%酒精浸泡 1 min,再加 5 mL 5%次氯酸钠浸泡 5 min,最后用无菌水冲洗 3 次,置于无菌滤纸上,吸干残水备用^[10]。将已消毒的种子研磨后加 5 mL 无菌水稀释,吸取 150 μL 涂布于牛肉膏蛋白胨固体培养基,同时吸取 150 μL 洗涤水(消毒后第 3 次冲洗种子后的无菌水)为对照组检验表面消毒效果,涂布后置于 37℃ 条件下培养 72 h,每处理 3 组平行。待平板中长出菌落后,根据颜色、大小、形状等的不同挑取单菌落平板划线纯化,将纯化后得到的菌株编号,并斜面保存于 4℃ 冰箱。

(2)沙棘种子内生细菌的形态鉴定

对分离纯化得到的内生细菌菌株进行菌落形态和显微形态观察,形态特征观察主要参考《常见细菌系统鉴定手册》^[11]。

(3)沙棘种子内生细菌的分子鉴定

沙棘种子内生细菌 DNA 的提取采用碱裂法^[12]。PCR 扩增采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTA-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3')。反应体系为 25 μL:1 μL 27F,1 μL 1492R,15 μL Taq 聚合酶,4 μL ddH₂O,4 μL 模板。反应条件:94℃ 2 min,94℃ 1 min,56℃ 30 s,72℃ 1 min;30 个循环,72℃ 2 min^[13]。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测合格后,送北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序。所得序列信息提交 NCBI 数据库进行 BLAST 同源性比对,选取相似性最大的序列,用 MEGA7.0 软件进行同源性分析,然后以邻接法^[14]构建系统发育树。

1.2.2 沙棘种子内生细菌的高通量测序

种子消毒处理同方法 1.2.1。沙棘种子内生菌总 DNA 的提取采用 CTAB 法^[15],以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度和浓度^[16]。采用带 Barcode 的特异引物扩增 16S rDNA-V5 区。扩增体系 30 μL : Phusion Master Mix (2 $\times$) 15 μL , Primer (2 $\mu\text{mol/L}$) 3 μL , gDNA (1 ng/ μL) 10 μL , ddH₂O 2 μL 。反应程序: 98 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, PCR 产物使用 2% 浓度的琼脂糖凝胶电泳进行检测^[17-18]。PCR 扩增产物送北京诺禾致源科技股份有限公司,由 Illumina Miseq 测序仪进行高通量测序,首先对 PCR 产物进行混样与纯化,然后进行文库构建和上机测序,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, 首先对原始数据进行拼接、过滤, 得到有效数据 (Clean Data)。然后基于有效数据进行 OTUs 聚类 and 物种分类。为研究各样本的物种组成, 对所有样本的 Effective Tags, 以 97% 的一致性 (Identity) 进行 OTUs 聚类, 然后对 OTUs 的代表序列进行物种注释并进行生物学分析。

2 结果与分析

2.1 榆中县中国沙棘种子内生细菌多样性

2.1.1 榆中县中国沙棘种子内生细菌的纯培养

(1) 内生细菌的形态特征

从榆中县中国沙棘种子中共分离得到 4 株内生细菌, 编号分别为 YZ1709B01、YZ1709B02、YZ1709B03、YZ1709B04。4 株菌菌落表面均为湿润光滑状, 菌落颜色呈乳白色, 菌落形态为圆形或点状。除菌株 YZ1709B04 为革兰氏阴性菌外 (图 1), 其余 3 株菌均为革兰氏阳性菌, 其中, 菌株 YZ1709B01 和 YZ1709B03 为杆状菌, 菌株 YZ1709B02 和 YZ1709B04 为球状菌。

(2) 内生细菌的 16S rRNA 基因序列分析

对纯培养分离得到的内生细菌, 提取其 DNA 后, PCR 扩增其 16S rRNA 基因序列并进行测序分析, 以邻接法构建系统发育树 (图 2)。经 16S rRNA 基因序列和系统发育分析结果表明: 4 株中国沙棘种子内生细菌中, 3 株属于厚壁菌门 (Firmicutes), 其中 2 株为芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 1 株为葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)。另外 1 株属于变形菌门 (Proteobacteria) 的假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。

2.1.2 榆中县中国沙棘种子内生细菌的高通量测序

提取榆中县中国沙棘种子内生细菌总 DNA, 经检测合格后, 进行 PCR 扩增, 扩增产物用于文库构建和上机测序, 然后基于有效数据对 OTUs 的代表序列进行物种注释分析。

(1) 样品复杂度分析及 OTUs 数目统计

测序共得到 71080 条原始序列, 经过滤后得到 64452 条有效序列, 可分为 147 个 OTUs。序列平均长度为 368 bp, 有效率为 90.68%。从序列的分布长度来看, 与 16S rDNA-V5 区序列长度大致吻合, 表明测序数据量合理, 可以反映样品中绝大多数的微生物信息。

(2) 内生细菌群落结构组成

经高通量测序后, 选取相对丰度前 10 位的物种, 在门和属水平进行统计分析。从门水平看, 沙棘种子内生细菌主要分布在 7 个菌门。由图 3 可看出, 内生细菌的主要优势门是蓝藻门 (Cyanobacteria), 其相对丰度为 95.62%。变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、放线菌门

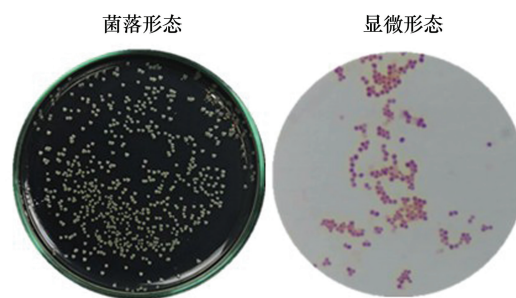


图 1 菌株 YZ1709B04 的形态特征

Fig.1 Morphological characteristics of strain YZ1709B04

(Actinobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteria)和异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus)在榆中县沙棘种子中均有分布,相对丰度依次为 2.03%、0.31%、0.22%、0.20%、0.01%和 0.01%;其他门类的相对丰度合计为 1.61%。

从属水平看(图 3),榆中县中国沙棘种子内生细菌的主要优势菌属是蓝细菌属(Cyanobacteria)和贪噬菌属(Variovorax),相对丰度分别为 95.09%和 0.63%。此外,甲基杆菌属(Methylobacterium)、鞘氨醇单胞菌属(Sphingomonas)、拟杆菌属(Bacteroides)、寡养单胞菌属(Stenotrophomonas)、气单胞菌属(Aureimonas)、红树林杆菌属(Mangrovibacter)、欧文氏菌属(Erwinia)和马赛菌属(Massilia)在沙棘种子中均有分布,相对丰度依次为 0.27%、0.26%、0.19%、0.12%、0.11%、0.09%、0.08%和 0.07%;其他菌属的相对丰度合计为 3.09%。

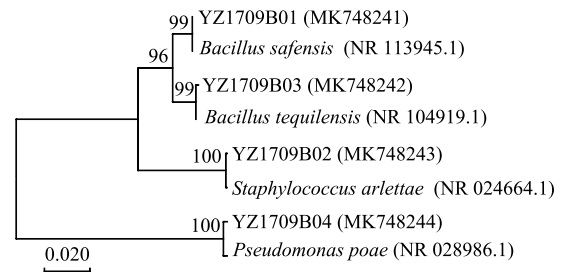


图 2 基于 16SrRNA 基因构建系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

Bacillus safensis: 沙福芽孢杆菌; *Staphylococcus arlettae*: 阿尔莱特葡萄球菌; *Bacillus tequilensis*: 特基拉芽孢杆菌; *Pseudomonas poae*: 草假单胞菌; 括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的序列登录号; 刻度 0.020 代表该长度下的进化距离

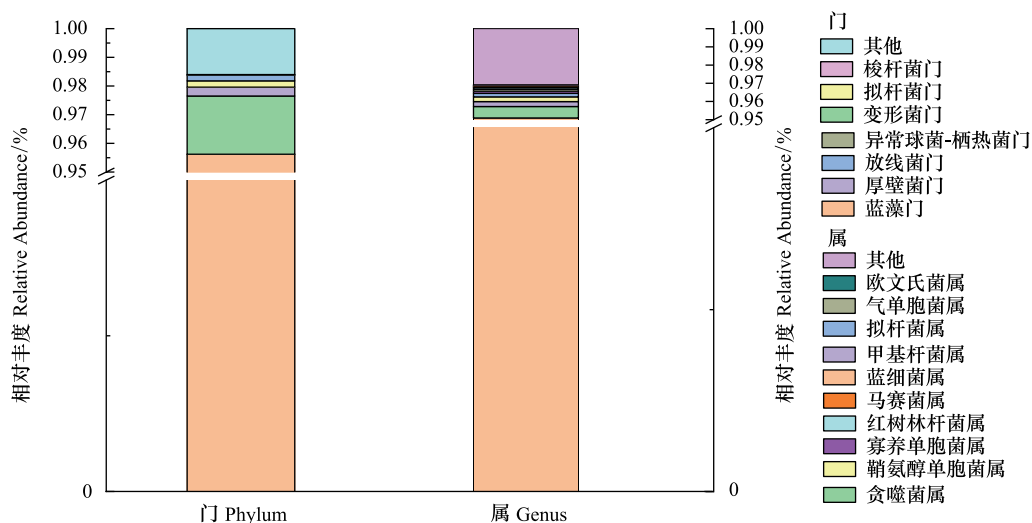


图 3 榆中县中国沙棘种子内生细菌在门和属水平上的物种组成和相对丰度

Fig.3 Species composition and relative abundance of endophytic bacteria of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* seeds in Yuzhong at phylum and genus level

2.2 秦安县中国沙棘种子内生细菌多样性

2.2.1 秦安县中国沙棘种子内生细菌的纯培养

(1) 内生细菌的形态特征

从秦安县中国沙棘种子中共分离得到 5 株内生细菌,编号分别为 QA1709B01、QA1709B02、QA1709B03、QA1709B04 和 QA1709B05。5 株菌落表面均为湿润光滑状,菌落颜色呈乳白色,菌落形态为圆形或点状。除菌株 QA1709B04 为革兰氏阴性菌外,其余 4 株菌均为革兰氏阳性菌,且 5 株菌均为杆状菌(图 4)。

(2) 内生细菌的 16S rRNA 基因序列分析

对纯培养分离得到的内生细菌,提取其 DNA 后,PCR 扩增其 16S rRNA 基因序列并进行测序分析,以邻接法构建系统发育树(图 5)。经 16S rRNA 基因序列和系统发育分析结果表明:5 株中国沙棘种子内生细菌中,4 株属于厚壁菌门(Firmicutes),其中 3 株为芽孢杆菌属(*Bacillus*),1 株为葡萄球菌属(*Staphylococcus*)。另

外 1 株属于变形菌门 (Proteobacteria) 的不动杆菌属 (*Acinetobacter*)。

2.2.2 秦安县中国沙棘种子内生细菌的高通量测序

提取秦安县中国沙棘种子内生细菌总 DNA, 经检测合格后, 进行 PCR 扩增, 扩增产物用于文库构建和上机测序, 然后基于有效数据对 OTUs 的代表序列进行物种注释分析。

(1) 样品复杂度分析及 OTUs 数目统计

测序共得到 82254 条原始序列, 经过滤后得到 80073 条有效序列, 可分为 75 个 OTUs, 序列平均长度为 372 bp, 有效率为 97.35%。从序列的分布长度来看, 与 16S rDNA-V5 区序列长度大致吻合, 表明测序数据量合理, 可以反映样品中绝大多数的微生物信息。

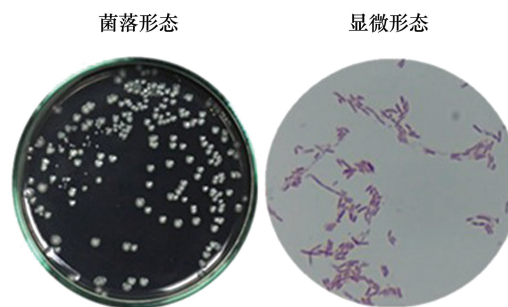


图 4 菌株 QA1709B01 的形态特征

Fig.4 Morphological characteristics of strain QA1709B01

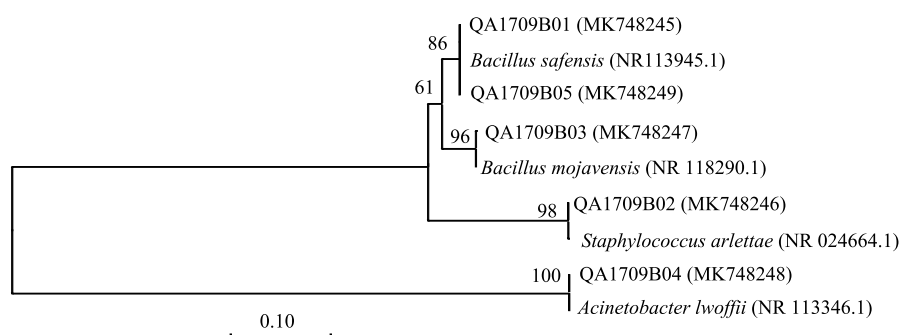


图 5 基于 16S rRNA 基因构建系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

Bacillus safensis: 沙福芽孢杆菌; *Staphylococcus arlettae*: 阿尔莱特葡萄球菌; *Bacillus mojavensis*: 莫哈韦芽孢杆菌; *Acinetobacter lwoffii*: 鲁氏不动杆菌; 括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的序列登录号; 刻度 0.10 代表该长度下的进化距离

(2) 内生细菌群落结构组成

经高通量测序后, 选取相对丰度前 10 位的物种, 在门和属水平进行统计分析。从门水平看, 沙棘种子内生细菌主要分布在 5 个菌门。由图 6 可看出, 内生细菌的主要优势门类是变形菌门 (Proteobacteria), 其相对丰度为 91.68%。蓝藻门 (Cyanobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 在秦安县沙棘种子中均有分布, 相对丰度依次为 8.06%、0.04%、0.01% 和 0.01%; 其他门类的相对丰度合计为 0.20%。

从属水平看 (图 6), 秦安县中国沙棘种子内生细菌的主要优势菌属是寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*), 相对丰度为 85.60%, 其次是蓝细菌属 (*Cyanobacteria*) 和叶杆菌属 (*Phyllobacterium*), 相对丰度为 7.86% 和 5.28%。此外, 代尔夫特菌属 (*Delftia*)、短波单胞菌属 (*Brevundimonas*)、甲基杆菌属 (*Methylobacterium*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、拜叶林克氏菌属 (*Beijerinckia*)、马赛菌属 (*Massilia*)、嗜酸菌属 (*Acidiphilium*) 在秦安县中国沙棘种子中均有分布, 相对丰度依次为 0.24%、0.05%、0.03%、0.02%、0.01%、0.01% 和 0.01%; 其他菌属的相对丰度合计为 0.88%。

2.3 榆中县和秦安县两种不同生境中国沙棘种子内生细菌多样性比较

2.3.1 内生细菌纯培养的差异

纯培养研究结果表明, 从榆中县和秦安县两种不同生境的中国沙棘种子中分离纯化得到的内生细菌种类有一定的差异。其中, 从榆中县和秦安县中国沙棘种子中分别分离纯化得到 4 株和 5 株内生细菌 (表 2)。在

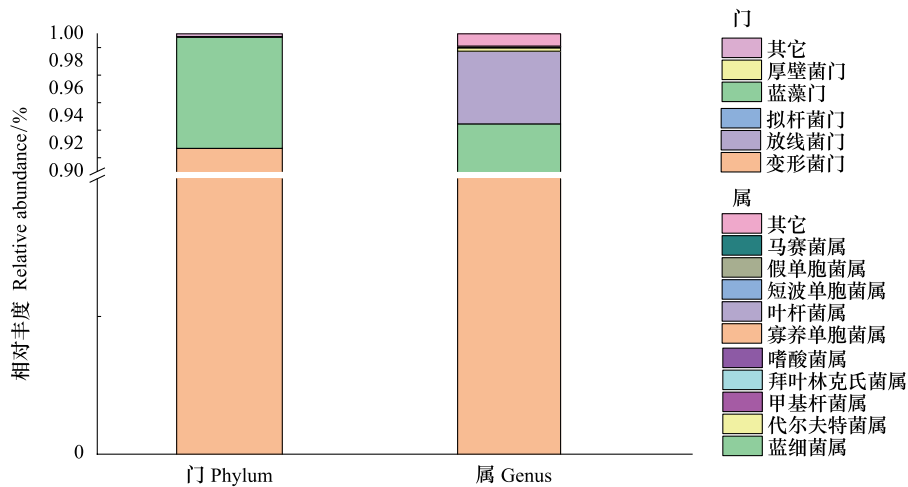


图 6 秦安县中国沙棘种子内生细菌在门和属水平上的物种组成和相对丰度

Fig.6 Species composition and relative abundance of endophytic bacteria of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* seeds in Qin'an at phylum and genus level

门分类水平,榆中县中国沙棘种子内生细菌中有 3 株属于厚壁菌门,1 株属于变形菌门;而秦安县中国沙棘种子内生细菌中有 4 株属于厚壁菌门,1 株属于变形菌门。

在属分类水平,榆中县中国沙棘种子内生细菌中,厚壁菌门中 2 株属于芽孢杆菌属,1 株属于葡萄球菌属;变形菌门的 1 株内生细菌为假单胞菌属。而秦安县中国沙棘种子内生细菌中,厚壁菌门中 3 株属于芽孢杆菌属,1 株属于葡萄球菌属,变形菌门的 1 株内生细菌为不动杆菌属。可见,芽孢杆菌属和葡萄球菌属细菌在两种不同生境的中国沙棘种子中均有分布,而假单胞菌属只分布于榆中县中国沙棘种子中,不动杆菌属只分布于秦安县中国沙棘种子中。

表 2 榆中县和秦安县两种不同生境中国沙棘种子内生细菌纯培养的差异

Table 2 The endophytic bacteria differences using plate culture method in seeds of *Hippophae rhamnoides* subsp. *Sinensis* in Yuzhong and Qin'an

门 Phylum	属 Genus	样品 A Sample A	样品 B Sample B
厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	YZ1709B01	QA1709B01
		YZ1709B03	QA1709B03
			QA1709B05
变形菌门 Proteobacteria	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	YZ1709B02	QA1709B02
	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	YZ1709B04	—
	不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	—	QA1709B04

—: 未分离到此属

2.3.2 内生细菌高通量测序的差异

(1) 内生细菌 Alpha 多样性指数分析

在 Alpha 多样性指数中,Chao1 和 ACE 指数表示细菌群落的丰富度,值越大,群落丰富度越高。Shannon 和 Simpson 指数表示细菌群落的多样性程度,Shannon 指数值越大,群落多样性越高,而 Simpson 指数值越小,群落多样性越高。从表 3 可以看出,榆中县中国沙棘种子内生细菌的多样性和丰富度均高于秦安县。

(2) 内生细菌 Venn 图分析

榆中县和秦安县两种不同生境中国沙棘种子内生细菌的 Venn 图结果如图 7 所示,从图 7 可见,榆中县中

国沙棘种子内生细菌的 OTUs 总数为 147 个,特有 OTUs 为 97 个。秦安县中国沙棘种子内生细菌的 OTUs 总数为 75 个,特有 OTUs 为 25 个,两者共有的 OTUs 为 50 个。结果表明榆中县中国沙棘种子内生细菌的种类明显高于秦安县中国沙棘种子内生细菌。

表 3 榆中县和秦安县两种不同生境中国沙棘种子内生细菌的 Alpha 多样性指数差异

样品 Sample	Chao 1 指数 Chao 1 index	ACE 指数 ACE index	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index
A	1438.06	1672.79	3.38	0.46
B	149.00	160.88	1.65	0.70

(3) 内生细菌群落结构组成分析

高通量测序方法检测到榆中县和秦安县两种不同生境的中国沙棘种子内生细菌的多样性存在明显的差异。榆中县中国沙棘种子中内生细菌包含 7 门、11 纲、31 目、44 科和 68 属,秦安县中国沙棘种子内生细菌包含 5 门、7 纲、17 目、22 科、30 属(表 4)。

从门分类水平看,榆中县中国沙棘种子内生细菌主要分布在 7 个门(表 5),秦安县中国沙棘种子内生细菌主要分布在 5 个门。其中蓝藻门为榆中县中国沙棘种子内生细菌的主要优势门类,相对丰度为 95.62%,变形菌门为秦安县中国沙棘种子内生细菌的主要优势门类,相对丰度为 91.68%。蓝藻门、变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌门在榆中县和秦安县两种不同生境的中国沙棘种子中均有分布,但相对丰度存在差异。而梭杆菌门和异常球菌-栖热菌门只分布于榆中县中国沙棘种子中,相对丰度均为 0.01%。

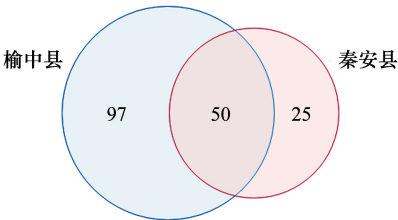


图 7 榆中县和秦安县中国沙棘种子内生细菌维恩图
Fig.7 Venn diagram of endophytic bacteria of *Hippophae rhamnoides* subsp. *Sinensis* in Yuzhong and Qin'an

表 4 各分类单元内生细菌的群落组成

样品 Sample	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
A	7	11	31	44	68
B	5	7	17	22	30

表 5 榆中县和秦安县两种不同生境中国沙棘种子内生细菌在门水平上的差异

Table 5 The endophytic bacteria differences in seeds of <i>Hippophae rhamnoides</i> subsp. <i>Sinensis</i> in Yuzhong and Qin'an at phylum level				
项目 Item	门 Phylum	样品 A 中的相对丰度 Relative abundance of sample A/%	样品 B 中的相对丰度 Relative abundance of sample B/%	
共有门 Common phylum	蓝藻门 Cyanobacteria	95.62	8.06	
	变形菌门 Proteobacteria	2.03	91.68	
	厚壁菌门 Firmicutes	0.31	0.01	
	拟杆菌门 Bacteroidetes	0.22	0.01	
	放线菌门 Actinobacteria	0.20	0.04	
特有门 Unique phylum	梭杆菌门 Fusobacteria	0.01	—	
	异常球菌-栖热菌门 Deinococcus-Thermus	0.01	—	

—: 未检测到此门

在属分类水平,榆中县中国沙棘种子内生细菌分布于 68 个属,秦安县中国沙棘种子内生细菌分布于 30 个属,其中榆中县中国沙棘种子特有的属有 37 个。榆中县中国沙棘种子内生细菌的主要优势属为蓝细菌属,

相对丰度为 95.09%(表 6),秦安县中国沙棘种子内生细菌的主要优势属为寡养单胞菌属,相对丰度为 85.60%。其中,在相对丰度前 20 的属中,榆中县和秦安县两种不同生境的中国沙棘种子共有的属有 13 个;榆中县中国沙棘种子特有的属有 7 个,秦安县中国沙棘种子特有的属有 7 个。

表 6 榆中县和秦安县两种不同生境中国沙棘种子内生细菌在属水平上差异

Table 6 The endophytic bacteria differences in seeds of <i>Hippophae rhamnoides</i> subsp. <i>sinensis</i> in Yuzhong and Qin'an at genus level			
项目 Items	属 Genus	样品 A 中的相对丰度/% Relative abundance of sample A	样品 B 中的相对丰度/% Relative abundance of sample B
共有属 Common genus	蓝细菌属 <i>Cyanobacteri</i>	95.09	7.86
	贪噬菌属 <i>Variovorax</i>	0.63	0.01
	甲基杆菌 <i>Methylobacterium</i>	0.27	0.03
	鞘氨醇单胞菌属 <i>Sphingomonas</i>	0.26	0.01
	寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas</i>	0.12	85.60
	马赛菌属 <i>Masilia</i>	0.07	0.01
	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	0.05	0.02
	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	0.04	0.01
	代尔夫特菌属 <i>Delftia</i>	0.04	0.24
	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	0.02	0.01
	短波单胞菌属 <i>Brevundimonas</i>	0.03	0.05
	叶杆菌属 <i>Phyllobacterium</i>	0.01	5.28
	嗜酸菌属 <i>Acidiphilium</i>	0.03	0.01
特有属 Unique genus	拟杆菌属 <i>Bacteroides</i>	0.19	—
	气单菌属 <i>Aureimonas</i>	0.11	—
	红树林杆菌属 <i>Mangrovibacter</i>	0.09	—
	欧文氏菌属 <i>Erwinia</i>	0.08	—
	无杆菌属 <i>Agathobacter</i>	0.06	—
	柔嫩梭菌属 <i>Faecalibacterium</i>	0.05	—
	罕见小球菌属 <i>Subdoligranulum</i>	0.03	—
	拜叶林克氏菌属 <i>Beijerinckia</i>	—	0.01
	雷尔氏菌属 <i>Ralstonia</i>	—	0.01
	动球菌属 <i>Kineococcus</i>	—	0.01
	阿非波菌属 <i>Afipia</i>	—	0.01
	成团泛菌属 <i>Pantoea</i>	—	0.01
	棍状杆菌属 <i>Clavibacter</i>	—	0.01
	梭菌属 <i>Clostridiales</i>	—	0.01

—: 选取相对丰度前 20 的属进行分析时未检测到此属

3 讨论

本研究采用纯培养方法和高通量测序方法,分别对榆中县和秦安县两种不同生境的中国沙棘种子内生细菌多样性进行了研究。两种方法均表明,两种不同生境中国沙棘种子内生细菌多样性存在一定的差异。通过纯培养方法,从榆中县中国沙棘种子中分离得到了 4 株内生细菌,从秦安县中国沙棘种子中分离得到了 5 株内生细菌。本实验在进行种子内生菌分离时,只使用了细菌培养的牛肉膏蛋白胨培养基,培养基种类相对单一,这可能是分离到的内生菌种类偏少的主要原因。本研究组前期使用相同培养基,曾对中国沙棘根瘤中的内生细菌进行过分离培养,共得到 17 株内生细菌^[8]。可见,同种植物的不同组织,采用相同的培养方法,可能会分离得到不同种类的内生菌,由于种子是受植物高度保护的封闭性的器官,导致内生细菌种类比其他植物器官要少。而时晓寒等^[19]从白皮锦鸡儿种子中分离得到 32 株内生细菌,与本实验结果有一定差异,这可能是由于植物种类的不同,而导致所分离得到的可培养内生细菌的种类存在差异。在分离内生细菌

时,培养条件对内生细菌的种类同样存在一定的影响,不同生境的植物可为微生物提供适宜生存的环境和营养条件,且微生物群体与植物之间能形成复杂的共生关系,而实验室无法完全模拟这种微生物所生存的自然生态环境,这也是所分离得到的内生细菌种类较少的原因之一^[20]。因此,在分离沙棘种子内生细菌时,除优化培养条件外,还应尽量模拟沙棘生存的自然生态环境,以获得更多内生细菌资源,最大程度反映沙棘种子内生细菌的多样性。

本研究通过高通量测序结果表明,在门分类水平,蓝藻门、变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门在榆中县和秦安县两种生境的中国沙棘种子中均有分布,但各门在两地种子中的相对丰度却存在明显差异。有研究表明,蓝藻门、变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌门是植物内生细菌常见的优势门类^[21-22],这说明不同生境的同一类植物,甚至是不同种类的植物,其内生细菌的物种组成在门水平上存在一定程度的相似性,但其相对丰度由于植株种类或生境的不同而有所差异,这与张芳芳等^[23]的研究结果相一致。本研究中梭杆菌门和异常球菌-栖热菌门只分布于榆中县中国沙棘种子中,这主要由于榆中县马街山年降水量与年均气温均优于秦安县王铺乡,为内生细菌提供了适宜的生存环境。在属分类水平上,贪噬菌属、甲基杆菌属、鞘氨醇单胞菌属、拟杆菌属、寡养单胞菌属、叶杆菌属、欧文氏菌属和马赛菌属在榆中县和秦安县两种不同生境的中国沙棘种子中均有分布,但相对丰度存在较大差异;可能是由于两地中国沙棘生长的土壤类型、pH 及含水量等因素差异较小,从而导致两地中国沙棘种子内生细菌组成相似。而气单菌属、红树林杆菌属、欧文氏菌属、无杆菌属、柔嫩梭菌属和罕见小球菌属只分布于榆中县中国沙棘种子中;拜叶林克氏菌属、雷尔氏菌属、动球菌属、阿菲波菌属、成团泛菌属、棍状杆菌属、梭菌属只分布于秦安县中国沙棘种子;可能是由于两地海拔、年均降水量以及年均气温存在较大差异,从而导致内生细菌种类存在差异。

本文对榆中县和秦安县两种不同生境的中国沙棘种子内生细菌的多样性研究结果可知,榆中县和秦安县两种不同生境的中国沙棘种子内生细菌均具有丰富的多样性,且二者的多样性存在一定差异,这可能是由于两地海拔相差较大而造成的。有研究表明,由于海拔的差异会导致地区气候特征及周围植被的不同,造成植物种子内生菌的组成存在差异^[24];海拔越高,阳光照射越充足,适应高海拔环境的植物生长状况越好,内生菌多样性越丰富。所以不同海拔的植物,其内分布着不同的优势内生菌,且海拔差异越大,内生菌的物种组成相似度越低^[25]。

参考文献 (References):

- [1] 冯永君, 宋未. 植物内生细菌. 自然杂志, 2001, 23(5): 249-252.
- [2] 曹焜, 王晓楠, 孙宇峰, 李振伟, 潘冬梅, 赵越. 植物根部内生细菌多样性及其生防作用研究进展. 农业与技术, 2017, 37(17): 1-3, 5-5.
- [3] 龙锡, 严希, 洪佳丽, 梁宗锁, 陈海敏. 植物种子内生菌的研究进展. 浙江农业科学, 2016, 57(8): 1319-1324.
- [4] Liu Y, Zuo S, Xu L W, Zuo Y Y, Song W. Study on diversity of endophytic bacterial communities in seeds of hybrid maize and their parental lines. Archives of Microbiology, 2012, 194(12): 1001-1012.
- [5] Compant S, Mitter B, Colli-Mull J G, Gangl H, Sessitsch A. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. Microbial Ecology, 2011, 62(1): 188-197.
- [6] 曾诚. 中国沙棘克隆生长调节的光合生理机制[D]. 昆明: 西南林业大学, 2016.
- [7] 张爱梅, 韩雪英, 张世虎, 孙坤, 吴菊艳, 于杰, 郭保民. 甘南高寒地区不同海拔西藏沙棘根瘤内生菌多样性. 生物资源, 2018, 40(2): 114-119.
- [8] 张爱梅, 韩雪英, 王嘉, 孔维宝, 牛世全, 朱学泰. 马街山中国沙棘根瘤内共生细菌多样性研究. 生态学报, 2019, 39(1): 294-301.
- [9] 李琦, 孙广宇. 沙棘内生菌的分离与初步鉴定. 中国农学通报, 2006, 22(10): 300-302.
- [10] 史应武, 娄恺, 李春. 天山北坡甜菜内生菌分离鉴定及其动态变化. 生态学报, 2009, 29(5): 2374-2382.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [12] 迟原龙, 唐焱, 金璐, 张凤, 姚开, 何强. 采用碱裂解法提取 DNA 鉴定细菌和酵母菌. 食品研究与开发, 2018, 39(2): 177-180.
- [13] Boers S A, Hays J P, Jansen R. Micelle PCR reduces chimera formation in 16S rRNA profiling of complex microbial DNA mixtures. Scientific Reports, 2015, 5: 14181.

- [14] 孙凯, 刘娟, 李欣, 凌婉婷. 两株具有芘降解功能的植物内生细菌的分离筛选及其特性. 生态学报, 2014, 34(4): 853-861.
- [15] 司杰, 黄文娟, 焦培培. 用改良的 CTAB 法提取胡杨、灰叶胡杨总 DNA (英文). 农业科学与技术 (英文版), 2016, 17(4): 826-828, 832-832.
- [16] 丁浩, 郑唐春, 梁德洋, 曲冠证. 一种简易高效提取多种植物纯净 DNA 的方法. 植物研究, 2015, 35(3): 457-461.
- [17] 黄萱, 高丽美, 张永彦, 徐子勤. 一种优化的植物总 DNA 提取方法. 西北植物学报, 2004, 24(6): 1103-1106.
- [18] 贺璐, 龙承星, 李丹丹, 张雪, 彭买姣, 谭周进. 四磨汤对脾虚便秘小鼠肠道细菌丰度及功能基因的影响. 中国微生态学杂志, 2017, 29(2): 133-138.
- [19] 时晓寒, 程聪, 李玉倩, 安登第. 白皮锦鸡儿种子内生细菌的分布与分离鉴定. 微生物学通报, 2016, 43(1): 164-171.
- [20] 彭伶俐, 王琴, 辛明秀. 自然界中不可培养微生物的研究进展. 微生物学杂志, 2011, 31(2): 75-79.
- [21] 邓平香, 郭荣荣, 余光伟, 种云霄, 龙新宪. 超积累和非超积累生态型东南景天茎、叶内生细菌多样性分析. 微生物学通报, 2017, 44(3): 533-544.
- [22] 陈梅春, 朱育菁, 刘波, 王阶平, 刘晓港, 杨文靖. 基于宏基因组的茉莉花内生细菌多样性分析. 热带亚热带植物学报, 2018, 26(6): 633-643.
- [23] 张芳芳, 宋希强, 朱国鹏. 不同生境下五唇兰根部可培养内生细菌多样性研究. 植物科学学报, 2016, 34(1): 135-142.
- [24] 刘学周, 赵智灵, 李绍宾, 张连学, 田义新, 孙福仁. 西洋参内生菌群落结构与多样性. 微生物学报, 2015, 55(3): 330-340.
- [25] 李小林, 江华明, 张波, 唐国庆, Penttinen P, 曾珍, 郑林用, 张小平. 应用 LH-PCR 研究党参、麻黄和独一味内生细菌多样性. 应用生态学报, 2013, 24(9): 2511-2517.