

研究报告

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

邓平香 郭荣荣 余光伟 种云霄 龙新宪*

(华南农业大学资源环境学院 广东 广州 510642)

摘要:【目的】探究和比较超积累和非超积累生态型东南景天茎、叶微生物群落结构的异同。【方法】采用高通量测序技术研究野外两种生态型东南景天茎和叶片的内生细菌群落结构。【结果】4个样品总共得到366 783条有效序列和39 948个OTU(97%相似度)。从Shannon指数得知:两种生态型东南景天叶片内生菌的多样性均高于茎;超积累生态型东南景天叶片内生菌的多样性高于非超积累生态型,但非超积累生态型东南景天茎组织中内生菌多样性高于超积累生态型东南景天。超积累生态型东南景天的叶片和茎中的内生菌分别包括26和21个门,123和117个科;非超积累生态型东南景天叶片和茎中的内生菌分别包括43和22个门,175和83个科,4个样品的优势菌群均为变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和蓝藻细菌门(Cyanobacteria)。在属分类水平上,超积累生态型东南景天叶片和茎第一优势菌属分别为 *Synechococcus* 和 *Plesiomonas*;非超积累生态型东南景天叶片和茎组织第一优势菌群分别为 *Pseudomonas* 和 *Dechloromonas*。【结论】两种生态型东南景天的叶片和茎中均具有丰富的内生细菌,但超积累生态型东南景天叶片内生菌多样性最大,且存在一些独有的功能菌群。

关键词: 东南景天, 内生细菌多样性, 高通量测序

Characterization of endophytic bacterial communities from leaves and stems of two ecotype of *Sedum alfredii* by high-throughput sequencing

DENG Ping-Xiang GUO Rong-Rong YU Guang-Wei CHONG Yun-Xiao
LONG Xin-Xian*

(College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: [Objective] The ability of accumulation of Zn and Cd between the hyperaccumulating and non-hyperaccumulating ecotypes of *Sedum alfredii* differed significantly, which might be related to their endophytic bacterial communities. Thus, the objective of this study is to investigate and compare the endophytic bacterial communities between two ecotypes of *S. alfredii*. [Methods] By

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 41471264)

*Corresponding author: Tel: 86-20-85280296; E-mail: longxx@scau.edu.cn

Received: March 02, 2016; Accepted: May 06, 2016; Published online (www.cnki.net): August 01, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41471264)

*通讯作者: Tel: 86-20-85280296; E-mail: longxx@scau.edu.cn

收稿日期: 2016-03-02; 接受日期: 2016-05-06; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-08-01

using high-throughput sequencing technique, a research on the diversity of endophytic bacterial communities in leaves and stems samples of the hyperaccumulating and non-hyperaccumulating of *S. alfredii* was conducted. The samples of the hyperaccumulating of *S. alfredii* were collected from an old lead-zinc mine located in Quzhou city, the west of Zhejiang province, and the non-hyperaccumulating of *S. alfredii* were collected from a tea garden located in Jiuxi, Hangzhou city, the north of Zhejiang province. **[Results]** A total of 366 783 sequences and 39 948 operational taxonomic units (OTUs) were obtained from the four samples (at the level of 97%). The index of Shannon indicated that endophytic bacterial biodiversity in the leaves of two ecotype of *S. alfredii* were consistently higher than in the stems, endophytic bacterial biodiversity in the leaves of hyperaccumulator ecotype of *S. alfredii* were higher than in the leaves of non-hyperaccumulator ecotype of *S. alfredii*, while the reverse was true for the stem samples. Endophytes in the leaves and stems samples of the hyperaccumulator ecotype of *S. alfredii* included 26 and 21 phyla, 123 and 117 families respectively, while the non-hyperaccumulator ecotype of *S. alfredii* included 43 and 22 phyla, 175 and 83 families respectively. In addition, the most abundance associated with the four sample libraries were consistently found to be related to Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria and Cyanobacteria. On the genus level, the most abundance bacteria associated with the leaves and stems of hyperaccumulator ecotype of *S. alfredii* were *Synechococcus* and *Plesiomonas*, while *Pseudomonas* and *Dechloromonas* were for the leaves and stems of non-hyperaccumulator ecotype of *S. alfredii*. **[Conclusion]** Diverse communities endophytes inhabit leave and stems of the two ecotype of *S. alfredii*, while the most endophytes diversity of the four samples was the leave of hyperaccumulator ecotype of *S. alfredii*.

Keywords: *Sedum alfredii*, Endophytic bacterial biodiversity, High-throughput sequence

内生菌是植物组织内的正常菌群,包括了互惠共利的和中性的共生细菌,它们的存在不会使植物出现可见的伤害或功能的改变^[1]。近年来,重金属超积累植物的内生细菌引起了广大研究者的关注,研究者陆续从超积累植物中分离和纯化具有抗金属的、促植物生长特征的内生细菌,并将这些功能菌应用于植物修复中^[2]。Idris 等(2004)首次研究了 Ni 超积累遏蓝菜(*Thlaspi goesingense*)的内生菌群落结构,其优势菌属为变形菌(Proteobacteria)的鞘氨醇菌属^[3]。Shin 等(2012)从 Pb 超积累植物桉木(*Alnus firma*)的根部分离出 14 株内生细菌,其中芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) MN3-4 能够产铁载体和吲哚乙酸(IAA),对 Pb 具有很强的去除率^[4]。一些研究者认为,植物超积累重金属的机制很可能与定殖于其组织内的内生菌多样性有着十分密切的关系。Li 等(2012)研究发现,不同组织器官的重金属浓度不同会导致其体内定殖的内生菌对重金属的敏感性和耐受性不同^[5];Weyens 等(2010)也发现,生长在同一重金属污染土壤上的两种不同品种的柳树,它们对金属

抗性和积累能力与其根系和地上部的内生菌多样性呈正相关^[6]。这说明不同植物对污染物的耐性、积累和解毒能力与其体内定殖的内生菌息息相关。

目前,研究植物内生菌多样性的方法主要有培养法和非培养法。通常,培养法难以模拟自然界中微生物生长的真实条件,相当多的内生细菌处于活的不可培养状态。随着分子生物学技术的发展,基于 16S rRNA 基因的指纹图谱技术如变性梯度凝胶电泳(DGGE)、温度梯度凝胶电泳(TGGE)、单链构象多态性检测(SSCP)、核糖体 DNA 扩增片段限制性内切酶分析(ARDRA)和末端限制性片段长度多态性指纹技术(T-RFLP)等被广泛用于微生物群落的研究^[7],尤其是近年来发展迅速的高通量测序技术,具有速度快、成本低、覆盖度深、产出巨大等优势^[8]。Chen 等(2012)利用 16S rRNA 基因克隆文库技术对龙葵的内生菌进行测序,主要为变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria)^[9]。Lundberg 等(2012)采用高通量测序对 600 多株拟南

芥植物的根系内生菌进行研究,发现内生菌群落结构和多样性主要受植物的生育期和基因型的影响^[10]。Liu 等(2014)采用高通量测序技术研究了诺丽(*Morinda citrifolia* L.)种子内生菌群落结构,丰度排名前 10 的 OTUs (Operational taxonomic unites)主要属于 *Pelomonas* sp.、*Ochrobactrum intermedium*、*Kinneretia* sp.、*Serratia* sp.、*Paucibacter* sp.、*Leptothrix* sp.、*Inhella* sp.、*Ewingella* sp.、*Thiomonas* sp.和 *Massilia* sp.^[11]。

东南景天(*Sedum alfredii* Hance)是一种以无性繁殖为主、生物量大、生长速率较快的锌、镉超富集植物,不仅是研究植物超积累重金属机理的模式植物,且已经应用到我国重金属污染土壤的修复实践中^[12]。Long 等(2011)从东南景天的叶片、茎、根中分离和纯化了 14 株具有较强的 Zn、Cd 抗性的细菌,一些内生菌还具有产吡啶、溶解磷、产铁载体和固氮作用^[13]。张新成(2012)的土培实验也发现,接种内生菌 SaZR4、SaMR12 和 SaNR1 促进了东南景天的生长及对重金属的吸收^[14]。为了对东南景天内生细菌群落多样性进行全面系统的研究,本研究拟采用高通量测序技术对两种生态型东南景天叶片和茎中的内生菌多样性进行比较分析。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

Plant DNA Kit (D4105)植物 DNA 提取试剂盒,广州捷倍斯生物科技有限公司;TE Buffer ,GBCBIO Technologies;3%次氯酸钠、30%双氧水,广州化学试剂厂;95%乙醇,天津市富宇精细化工有限公司。原子吸收光谱仪(火焰) Z-5300,日本 Hitachi 公司;自动高压灭菌锅 Hirayama autoclave HVE-50,日本 Wada Stainless Kogyo 公司;CT14RD 高速离心机,天美控股有限公司;Nanodrop 2000 超微量分光光度计,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;MiSeq 平台,美国 Illumina 公司。

1.2 植物与土壤样品的采集

2013 年 10 月中旬,于浙江衢州铅锌矿山选择 3 个代表性的采样点,采集数株超积累生态型东南景天植物,组成一个混合样品;浙江杭州九溪选择

3 个代表性样点,采集具有代表性的非超积累生态型东南景天数株,组成一个混合样品。将植物连同根际土壤放入无菌的封口袋中,地上部裸露于袋外,保持鲜活状态,然后置于纸盒中,于 3 d 内活体带回实验室。

回到实验室后,立即将植物根际土壤小心抖落在称量纸上,挑去根、种子等杂物,自然风干后研磨,分别过 20 目和 100 目筛。土壤理化性质的测定参考《土壤农化分析》^[15]:土壤 pH 采用玻璃电极法,水土比为 2.5:1;有机质测定采用重铬酸钾外加热容量法;土壤全 N 测定采用浓硫酸消煮-半微量开氏法;全 P 测定采用高氯酸-硫酸消煮,钼锑抗比色法;全 K 采用 NaOH 熔融-火焰光度法;碱解 N 采用碱解扩散法、有效 K 采用火焰光度计测定;有效 P 采用钼锑抗比色法;重金属 Zn、Cd、Pb 全量采用硝酸-氢氟酸-高氯酸消煮法,原子吸收光谱测定(Z-2000);重金属 Zn、Cd、Pb 有效态含量采用 1 mol/L NH_4NO_3 浸提法,水土比为 2.5:1。

1.3 DNA 提取、测序

将采集的东南景天植株用蒸馏水清洗干净,在超净工作台晾干水分。将部分东南景天的叶、茎、根分开,分别进行样品表面消毒,即:95%乙醇 1 min→30%双氧水+3%次氯酸钠(30 min)→95%乙醇 1 min→无菌水冲洗 3 次。液氮速冻,−80 °C 保存,用于 DNA 的提取。称取 0.1 g 植物样品放入预冷的研钵中,小心注入液氮,充分研磨,待液氮挥发后,迅速收集植物细粉于 1.5 mL 离心管中,严格按照植物 DNA 提取试剂盒中的说明步骤分别提取东南景天叶、茎的总 DNA。DNA 样品置于−20 °C 保存,送广州基迪奥生物科技有限公司利用 MiSeq 平台对 16S rRNA 基因的 V3+V4 可变区的 PCR 产物进行测序并拼接成 Tag,根据 Tag 进行物种分类、OTU 分析、多样性分析、多样品的比较分析等。PCR 扩增的引物为 Primer-F (5'-CCTACGGGNG GCWGCAG-3')和 Primer-R (5'-GGACTACHVGGG TATCTAAT-3'),每 25 μL 反应体系包括 0.5 U/ μL *Taq* 酶 1.25 μL , 10×PCR buffer (500 mmol/L KCl,

100 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 15 mmol/L MgCl₂, 1% Triton-100) 2.5 μL, 200 μmol/L dNTPs 2 μL, 10 μmol/L Primer-F 1 μL, 10 μmol/L Primer-R 1 μL, 25 mg/L 模板 DNA 2 μL, 无菌 ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 1 min。

1.4 数据处理与分析

为了获得更准确的序列, 使用 Mothur (v.1.11.0) 对原始的测序数据进行过滤处理: 首先去除平均质量低于 20 的 Reads、接头污染的 Reads、含 N 的 Reads 和低复杂度的 Reads; 样品通过 Barcode 合并建库, 得到 Clean data 后, 根据 Barcode 序列, 采用公司内部撰写的程序对样品进行拆分。序列拼接使用软件 FLASH (Fast Length Adjustment of SHort reads, v1.2.11), 利用重叠关系将双末端测序得到的成对 Reads 组装成一条序列, 得到高变区的 Tags。将经过上述处理的 Clean tags 进行 OTU 聚类, 然后通过 OTU 注释完成 OTU 的物种分类。利用软件 USEARCH (v.7.0.1090) 将拼接好的 Tags 聚类为 OTU (利用 UPARSE 在 97% 相似度下进行聚类)。利用 Mothur (v.1.11.0) 绘制稀释性曲线。为获得每个 OTU 的分类学信息, 在 97% 相似度下进行聚类, 对聚类后的序列进行嵌合体过滤后, 得到用于物种分类的 OTU。利用软件 SLP、Mothur 将 OTU 综合分类表中的信息按门、纲、目、科、属 5 个水平分类, 分别统计各样品在不同分类水平上的菌群组成及丰度。软件及算法: Qiime 平台, RDP Classifier (版本 2.2), 置信度阈值为 0.7。

样品复杂度分析包括: 单样品的多样性分析 [Alpha 多样性, Mothur (v.1.11.0)] 可以反映微生物群落的丰度和多样性 (用于指数评估的 OTU 相似水平 97%); Beta 多样性分析 [Mothur (v.1.11.0)], 反映不同样品间在物种多样性方面存在的差异大小; 利用 PCA 分析法 (CANOCO for Windows 4.5) 分析两种生态型东南景天叶、茎内生菌群落结构相似水平; 根据在科水平对各样品中物种丰度的统计结果, 计算

样品间距离, 并对样品进行聚类分析 [R (v.2.9.1)], 以判断在“科”水平上各样品物种组成的相似性。

2 结果与分析

2.1 两种生态型东南景天根际土壤性质的差异

超积累生态型东南景天的根际土壤偏酸 (pH 5.9), 土壤 Cd、Pb、Zn 全量及有效态含量非常高 (表 1); 非超积累生态型东南景天根际土壤呈极酸性 (pH 3.9), 土壤中 Cd、Pb、Zn 全量和有效态含量远远低于超积累生态型东南景天根际土壤。两种生态型东南景天根际土壤的营养水平相近, N、P、K 全量及有机质含量水平均相差不大, 但非超积累生态型东南景天根际土壤中的碱解 N 和有效 P 含量均显著高于超积累生态型, 前者分别是后者的 2.5 倍和 5.1 倍。

2.2 两种生态型东南景天叶、茎内生细菌的多样性

通过对 V3+V4 区测序, 4 个样品的原始序列为 547 819 条, 利用 RDP Classifier 过滤掉低质量的序列后, 有效序列的总数为 366 783 条 (表 2)。为了比较这些样品的细菌种类的丰度, 在 97% 相似度下将其聚类为用于物种分类的 OTU, 统计得到各个样品在不同 OTU 中的丰度信息, 4 个样品共产生 39 948 个 OTU。非超积累东南景天叶片 (NHL) 和茎 (NHS) 有效序列分别比超积累东南景天叶片 (HL) 高 32.21% 和 12.82%; 两种生态型东南景天叶片 OTU 数目均显著高于茎, 前者是后者的 2.04–3.77 倍。

Shannon 指数综合考虑了 OTU 丰度和均匀度, Shannon 和 npShannon 指数越大, Simpson 指数越接近于 0, 则表示该样品中的物种越丰富。超积累生态型东南景天叶片组织 (HL) 中内生菌的多样性最大, 其 Shannon 指数比非超积累生态型东南景天叶片 (NHL) 高 13%, 但非超积累生态型东南景天茎组织 (NHS) 中内生菌多样性大于超积累生态型东南景天组织 (HS), 其 Shannon 指数比超积累生态型东南景天茎组织 (HS) 高 35% (表 3)。

表 1 两种生态型东南景天的根际土壤理化性质

Table 1 Physicochemical properties of the rhizosphere soils of two ecotypes of *S. alfredii*

理化性质 Physicochemical properties	超积累 Hyper accumulator	非超积累 Non-hyper accumulator
有机质 Organic matter (g/kg)	35.52±2.39	42.14±1.15
全氮 Total N (g/kg)	2.00±0.08	2.18±0.02
碱解氮 Alkali-hydrolyzable N (mg/kg)	58.50±2.93	148.23±8.97
全钾 Total K (g/kg)	19.03±1.77	11.28±0.32
有效钾 Available K (mg/kg)	121.7±1.97	123.99±4.15
全磷 Total P (g/kg)	1.02±0.00	0.69±0.05
有效磷 Available P (g/kg)	11.75±0.80	60.18±3.38
pH	5.90±0.06	3.90±0.09
全镉 Total Cd (mg/kg)	31.33±0.32	0.06±0.01
有效镉 Available Cd (mg/kg)	0.59±0.01	0.01±0.00
全铅 Total Pb (mg/kg)	5 756.73±162.77	25.47±0.49
有效铅 Available Pb (mg/kg)	0.26±0.01	0.39±0.02
全锌 Total Zn (mg/kg)	2 363.02±17.16	70.93±0.61
有效锌 Available Zn (mg/kg)	8.55±0.07	1.64±0.10

注：数据为平均值±标准差($n=3$)，下同。

Note: Values are mean ± standard deviation ($n=3$), the same below.

表 2 样品的高通量测序结果和 OTUs 数量

Table 2 Summary of high-throughput sequencing data and number OTUs

样品名称 Sample name	原始序列数量 Original sequence number	有效序列数量 Available sequence number	有效序列比例 Valid serial ratio (%)	OTU 数量 Numbers of OTU
NHL	204 252	143 567	70.29	18 724
HL	156 546	108 590	69.37	10 904
NHS	95 478	60 765	63.64	4 964
HS	91 543	53 861	58.84	5 356

注：NHL：非超积累生态型东南景天的叶片组织；HL：超积累生态型东南景天的叶片组织；NHS：非超积累生态型东南景天的茎组织；HS：超积累生态型东南景天的茎组织。

Note: NHL: The leaves of non-hyperaccumulator ecotype of *S. alfredii*; HL: The leaves of hyperaccumulator ecotype of *S. alfredii*; NHS: The stems of non-hyperaccumulator ecotype of *S. alfredii*; HS: The stems of hyperaccumulator ecotype of *S. alfredii*.

表 3 两种生态型东南景天叶、茎组织中内生菌的 α 多样性指数Table 3 Alpha diversity of endophytic bacteria in the leaves and stems samples of two ecotypes *S. alfredii*

多样性指数 Alpha diversity	Chao1	ACE	Shannon	npShannon	Simpson
NHL	115 647	273 963	4.47	4.81	0.16
HL	70 511	196 906	5.03	5.23	0.04
NHS	31 219	76 451	4.47	4.63	0.06
HS	30 852	76 671	3.31	3.54	0.18

2.3 两种生态型东南景天叶、茎内生菌的群落结构组成

非超积累和超积累生态型东南景天叶片、非超积累东南景天茎和超积累东南景天茎中的内生细菌分别属于 43、26、22 和 21 门,这说明在门分类水平上,非超积累东南景天叶的内生菌多样性最高,超积累东南景天茎的内生菌多样性最低。其中变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、蓝藻细菌门(Cyanobacteria)在 4 种样品中均占有较高的比例(图 1)。对于超积累生态型东南景天茎的内生菌,超过 51.03%的序列属于拟杆菌门(Bacteroidetes);而在其他 3 个样品中,变形菌门(Proteobacteria)为第一优势菌属,在非超积累东南景天叶片、超积累东南景天叶片和非超积累东南景天茎样品中所占的比例分别为 67.70%、33.91%和 52.57%(图 1)。

非超积累和超积累生态型东南景天叶片、非超积累和超积累生态型东南景天茎中的内生细菌分别属于 103、58、44 和 46 个纲。非超积累生态型东南景天叶片和茎的第一优势菌群均为 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria) (47.93%和 33.97%),为变性菌门(Proteobacteria);超积累生态型东南景天叶片和茎

的第一优势菌群分别为芽孢杆菌纲(Bacilli) (20.84%)和拟杆菌纲(Bacteroidia) (50.83%),二者分别属于厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes) (图 2)。

非超积累和超积累东南景天叶片中的内生菌分别属于 175 和 123 个科,茎中的内生菌分别属于 83 个科和 117 个科。在科分类水平上(图 3),4 种样品的第一优势菌群各不相同。非超积累东南景天叶片和茎组织中第一优势内生菌分别为假单胞菌科(Pseudomonas)和气单胞菌科(Aeromonadaceae),所占比例分别为 40.00%和 22.08%,二者均属于变形菌门(Proteobacteria)中的 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria);第二优势菌群分别属于(ACK-MI)和拟杆菌科(Bacteroidaceae),相对丰度分别为 5.80%和 9.11%。超积累东南景天叶片和茎组织中的内生菌的优势菌群分别属于芽孢杆菌科(Bacillaceae)和拟杆菌科(Bacteroidaceae),相对丰度分别为 18.54%和 50.24%,分别属于厚壁菌门(Firmicutes)的芽孢杆菌纲(Bacilli)和拟杆菌门(Bacteroidetes)的拟杆菌纲(Bacteroidia);第二优势菌群分别属于疣微菌科(Verrucomicrobiaceae)和气单胞菌科(Aeromonadaceae),其相对丰度分别为 9.43%和 10.66%。

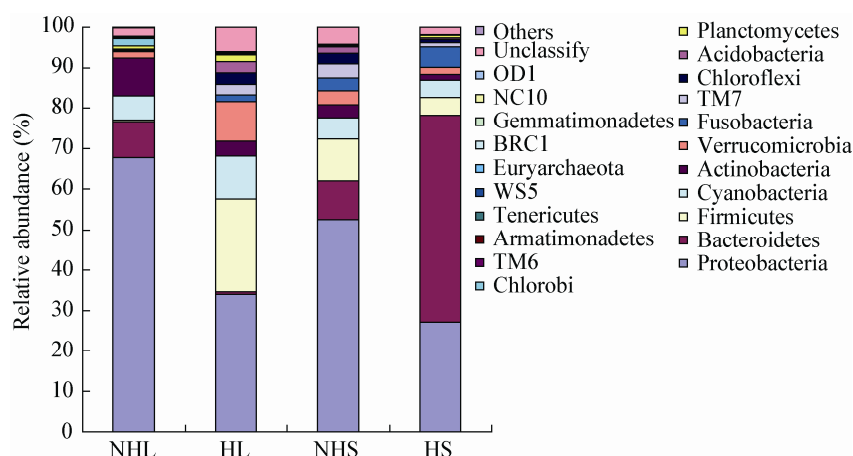


图 1 两种生态型东南景天叶、茎组织内生菌在门水平的相对丰度

Figure 1 The relative abundance of endophytic bacteria communities at phylum levels in the leaves and stems samples of two ecotypes *S. alfredii*

注: NHL: 非超积累生态型东南景天叶片; HL: 超积累生态型东南景天叶片; NHS: 非超积累生态型东南景天茎; HS: 超积累生态型东南景天茎。

Note: NHL: The leaf of non-hyperaccumulator ecotype of *S. alfredii*; HL: The leaf of hyperaccumulator ecotype of *S. alfredii*; NHS: The stem of non-hyperaccumulator ecotype of *S. alfredii*; HS: The stem of hyperaccumulator ecotype of *S. alfredii*.

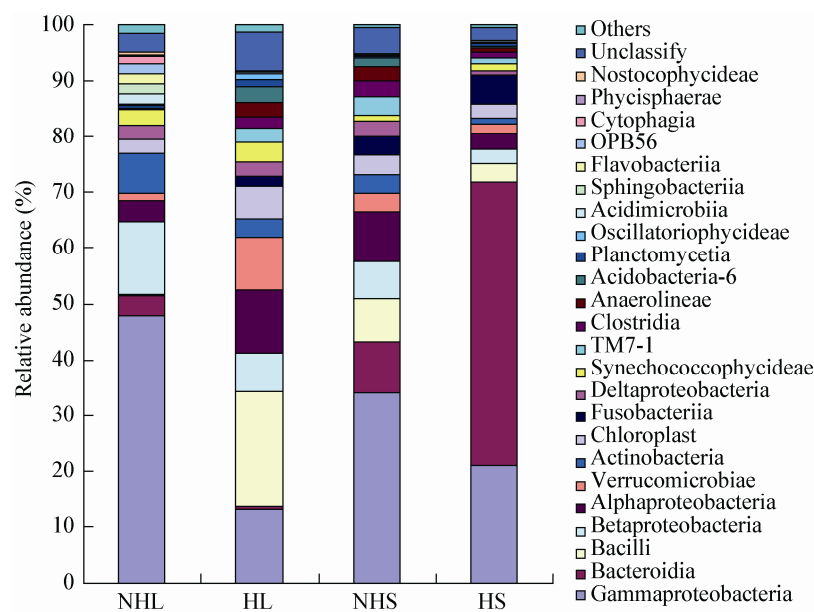


图 2 两种生态型东南景天叶、茎组织中内生菌在纲水平的相对丰度

Figure 2 The relative abundance of endophytic bacteria communities at class levels in the leaves and stems samples of two ecotypes *S. alfredii*

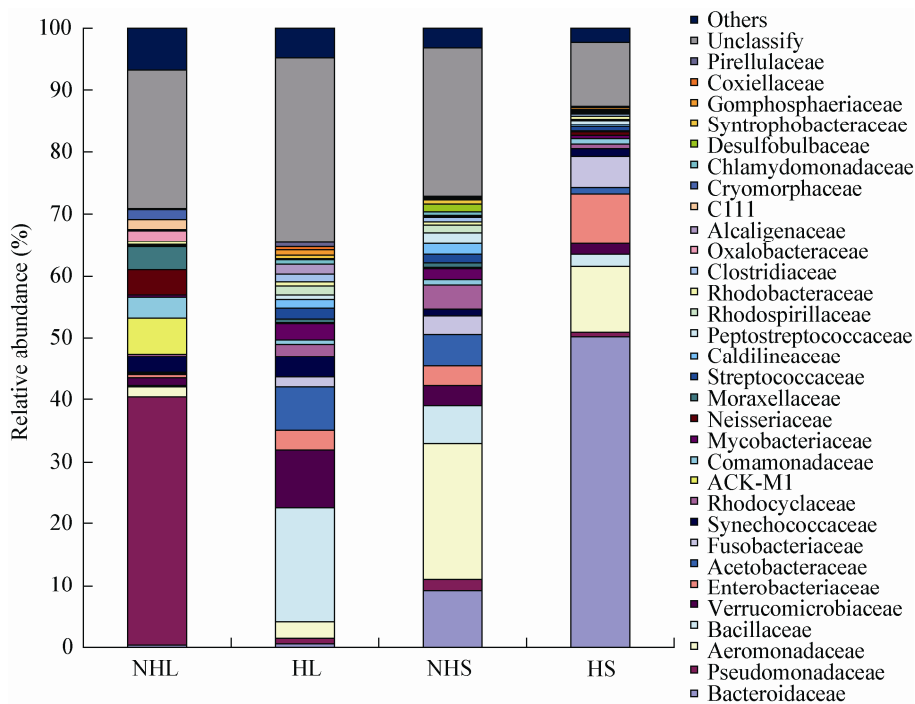


图 3 两种生态型东南景天叶、茎组织中内生菌在科水平的相对丰度

Figure 3 The relative abundance of endophytic bacteria communities at family levels in the leaves and stems samples of two ecotypes *S. alfredii*

非超积累和超积累生态型东南景天叶片、非超积累和超积累生态型东南景天茎的内生细菌分别属于 221、142、90、121 个属。非超积累生态型东南景天叶片和茎的第一优势菌群分别为假单胞菌属 (*Pseudomonas*) (40.00%) 和 固氮弓菌属 (*Dechloromonas*) (3.56%)，分别属于变形菌门 (Proteobacteria)的 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)的假单胞菌科 (*Pseudomonas*) 和 变形菌门 (Proteobacteria)的 β -变形菌纲(Betaproteobacteria)的红环菌科(Rhodocyclales)；超积累生态型东南景天叶片和茎的第一优势菌群分别为聚球藻属(*Synechococcus*) (3.26%)和邻单胞菌属(*Plesiomonas*) (6.59%)，分别属

于蓝藻门(Cyanobacteria)的蓝藻纲(Cyanobacteria)的色球藻目 (Chroococcales) 的第一科和变形菌门 (Proteobacteria)的 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)的肠杆菌科(Enterobacteriaceae) (图 4)。

2.4 两种生态型东南景天叶、茎内生菌群落结构的差异性

β -多样性反映不同样品间在物种多样性方面存在的差异， β -多样性值越接近 0，表示这两个样品之间的差异越小。如表 4 所示，非超积累东南景天叶片和茎组织内生菌的群落结构差异最大， β -多样性指数为 0.42，其余样品之间内生菌多样性的差异相差不大， β -多样性指数在 0.24–0.29 之间。

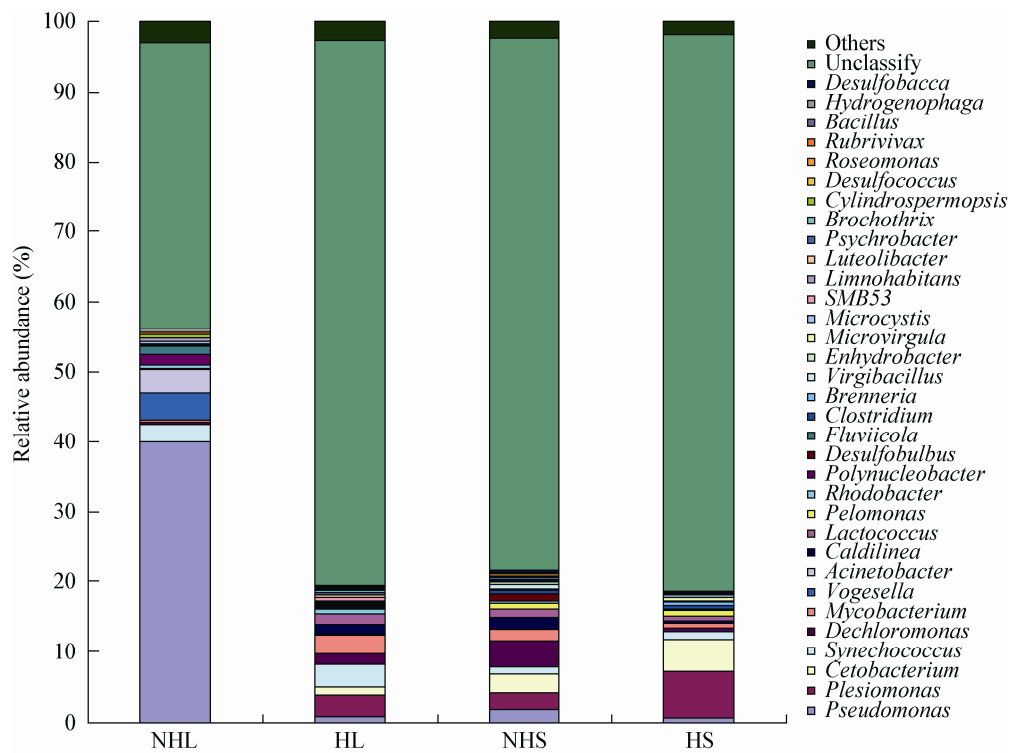


图 4 两种生态型东南景天叶、茎组织内生菌在属水平的相对丰度
Figure 4 The relative abundance of endophytic bacteria communities at genus levels in the leaves and stems samples of two ecotypes *S. alfredii*

表 4 两种生态型东南景天叶、茎内生菌多样性的相关系数				
Table 4 Spearman correlations between the leaf and stem tissue in two ecotypes <i>Sedum alfredii</i>				
	NHL	HL	NHS	HS
NHL	0.00	0.29	0.42	0.29
HL		0.00	0.27	0.24
NHS			0.00	0.28
HS				0.00

在科分类水平, 以内生菌的相对丰度大于 1% 为阈值, NHL、HL、NHS、HS 样品中分别包含 11、14、16、8 个科内生菌。从图 5 可知, 单独存在于非超积累生态型东南景天叶片组织的内生菌中有 7 个科, 分别为 C111、ACK-M1、Cryomorphaceae、丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)、草酸杆菌科(Oxalobacteraceae)、奈瑟氏菌科(Neisseriaceae)、莫拉氏菌科(Moraxellaceae), 它们的相对丰度分别为 1.60%、5.80%、1.59%、3.29%、1.82%、4.18%和 3.78%。单独在超积累生态型东南景天叶片组织发现的内生菌有 2 个科, 分别为梭菌科(Clostridiaceae)和产碱菌科(Alcaligenaceae), 它们的相对丰度分别为 1.18%和 1.46%。单独在非超积累生态型东南景天茎组织的内生菌有 2 个科, 分别为消化链球菌科(Peptostreptococcaceae)和(Desulfobulbaceae), 相对丰度分别为 1.78%和 1.16%。超积累型东南景天茎组织中并没有发现有特殊的内生菌。

热图通过颜色深浅反应不同物种内生菌所占比例, 颜色越红表示物种在该样品中所占比例越高。如图 6 所示, 绝大部分内生菌在超积累型东南

景天叶片组织所占比例较高, 而在超积累东南景天茎组织中所占比例较低, 表明超积累型东南景天叶片组织的物种多样性最为丰富。特别是, 超积累生态型东南景天叶内生细菌的群落结构特异性最高, 如分枝杆菌科(Mycobacteriaceae)、芽孢杆菌科(Bacillaceae)、链球菌科(Streptococcaceae)在超积累生态型叶片中所占比例较高, 而在非超积累生态型东南景天地上部比例都较低。此外, 依据内生菌分布丰度特征(科的水平上)进行聚类, 两种生态型东南景天的茎组织内生菌聚在同一支, 表明它们具有更为相似的内生菌群落结构。

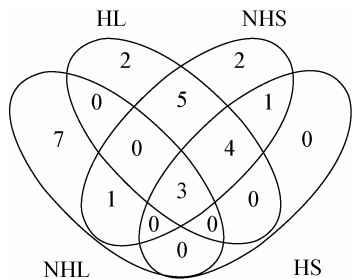


图 5 4 个样品的内生细菌在科水平的维恩图
Figure 5 Four-way Venn diagram of unique endophytic bacteria at the family level detected in 4 samples

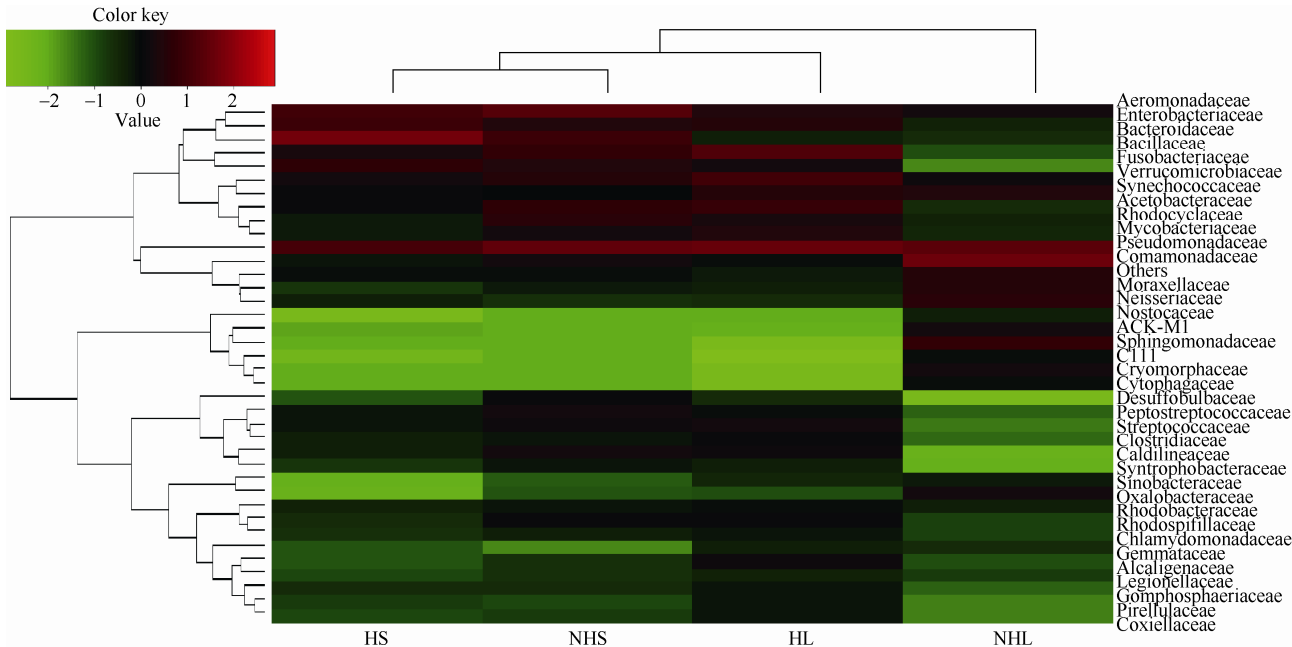


图 6 4 个样品的内生细菌在科水平相对丰度热图

Figure 6 The heatmap plot depicts the relative percentage of each bacterial family within 4 samples

注: 垂直方向为内生细菌的聚类; 水平方向为样品聚类; 左上角颜色的梯度变化表示不同的内生细菌相对丰度。

Note: The percentage of each endophytic bacteria clustering on the vertical axis; The 4 samples clustering on the horizon-axis; The relative values for bacterial family are indicated by color intensity with the legend indicated at the top left corner.

3 讨论

本研究采用 Illumina 公司最新推出的 MiSeq 平台,对两种生态型东南景天叶片和茎组织内生菌的 16S rRNA 基因的 V3+V4 区进行测序,获得的有效序列在 5–14 万条之间,OTU 数量在 0.5–1.8 万之间(表 2),这说明东南景天的叶片和茎内生菌具有丰富的多样性。与他人的研究相比较,本研究所获的信息量略低^[16],这可能与不同研究选择的测序区域不同、以及植物种类不同有一定的关系^[17]。例如, Bodenhausen 等(2013)对拟南芥叶和根内生菌 16S rRNA 基因的 V6–V7 区测序,共获得有效序列 126 841 条,3 160 条 OTU 数^[18];Ren 等(2015)对水稻叶片进行 16S rRNA 基因的 V4–V5 测序,获得 338 711 条有效序列和 1 387 条 OTU^[19]。16S rRNA 基因的序列包含 9 个可变区(Variable region)和 11 个恒定区(Constant region),V3 和 V4 高变区的遗传信息可提供丰富的细菌群落结构信息,因此被广泛应用于微生物研究领域^[20]。例如,Shi 等(2014)对甜菜进行 16S rRNA 基因的 V3 区测序,获得 60.84 万条有效序列^[21]。但两种生态型东南景天内生细菌的种类较其他植物内生细菌更为丰富,非超积累东南景天叶片、超积累东南景天叶片、非超积累东南景天茎和超积累东南景天茎的门总数分别为 43、26、22 和 21。如采用高通量测序对细菌 16S rRNA 基因的 V4 区测序,发现番茄叶片组织内生菌也仅由变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、酸杆菌门(Acidobacteria) 5 个门类组成^[22]。研究者指出^[23–26],原核微生物的 16S rRNA 基因常具有多个和不同的基因拷贝数量,即存在基因组内的异质性,因此,基于 16S rRNA 基因的方法测定环境样品中原核微生物的多样性的结果往往偏高。Sun 等^[23]的研究进一步发现,基因组内的异质性倾向于特定位点,其中细菌的 V1 和 V6 区的异质性最高,V4 和 V5 区的异质性最小;而且,厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)常有多个 16S rRNA 基因拷贝数,其 OTU 多样性被高估的程

度比低拷贝数的菌群高。本研究对 V3+V4 区进行扩增,在相似度为 97%水平对 OTU 所有序列进行一致性分析,因此,得到的两种生态型东南景天叶片和茎内生细菌的多样性结果可能也偏高,但总体上受基因组内异质性影响较小。Sun 等指出,V4–V5 区的基因异质性现象最少,尤其适合含有大量厚壁菌门和变形菌门的环境样品的研究^[23]。因此,在今后的研究中测定 V4–V5 区遗传信息,可能更能真实地体现东南景天叶片和茎内生细菌的多样性。

两种生态型东南景天叶片和茎组织中的优势内生菌均为变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和蓝藻细菌门(Cyanobacteria),尤其变形菌门占绝对优势,其在非超积累生态型东南景天的叶片和茎、超积累生态型东南景天叶片中的相对丰度分别为 67.70%、33.91%和 52.57%,这与众多研究者对植物内生菌群落结构组成的报道相似。例如,利用 454 焦磷酸测序,Bodenhausen 等发现在拟南芥叶片和根组织中以变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)为主要优势细菌^[18]。

两种生态型东南景天地上部内生菌群落结构组分虽较为相似,但各个类群细菌所占比例却相差很大。从图 6 可知,分枝杆菌科、芽孢杆菌科和链霉菌科在超积累生态型东南景天叶片组织中占较高比例,而在非超积累生态型东南景天叶、茎中所占比例较低。分枝杆菌科所属细菌也常被报道具有降解氯代有机物的作用^[27]。黄杆菌属被报道具有 Zn/Cd 抗性^[14]。Shin 等研究发现重金属超积累植物桉木(*Alnus firma*)根内生菌芽孢杆菌 MN3-4 能够通过胞外沉淀和胞内富集的复合机制吸附重金属 Pb^[4]。陈雯等研究发现胡杨根际菌链霉菌 C90 具有 Cu²⁺、Ni²⁺、Pb²⁺ 抗性,链霉菌 N22 具有 Cu²⁺、Ni²⁺、Pb²⁺、Zn²⁺ 抗性^[28]。Wang 等^[29]研究发现,芽孢杆菌 USTB-O 可提高小麦对 Cu 的积累,且能分泌 IAA 促进植物生长。以往的研究表明耐重金属内生菌提高植物重金属抗性的机理主要包括在与植物协同

进化过程中, 内生菌可以耐受多种重金属污染, 并通过固氮作用、溶磷作用, 产吲哚乙酸(IAA)、高铁载体和 1-氨基环丙烷-1-羧酸乙酯脱氨酶(ACC 脱氨酶)等机制改善植物营养, 降低重金属对植物的毒害效应, 提高植物重金属抗性^[2]。我们从超积累生态型东南景天中分离出 14 株重金属抗性菌, 发现这些菌株具有产 IAA、铁载体、溶磷、提高东南景天 Zn、Cd 抗性的作用^[13]。

在属分类水平上, 两种生态型东南景天叶片和茎段第一优势菌属各不相同。*Pseudomonas* 为非超积累生态型东南景天叶片第一优势菌, *Synechococcus* 为超积累生态型东南景天叶片第一优势菌属, *Dechloromonas* 为非超积累生态型东南景天茎第一优势菌属, *Plesiomonas* 为超积累生态型东南景天茎第一优势菌属。İnceoğlu 等在 6 个品种的马铃薯根际土及土著土壤中共研究发现 450 个属, 主要菌属有 33 个, 包括 8 个放线菌属(*Actinobacteria*), 6 个酸杆菌属(*Acidobacteria*), 5 个 α -变形菌属(*Alphaproteobacteria*), 4 个 γ -变形菌属(*Gammaproteobacteria*), 3 个拟杆菌属(*Bacteroidetes*), 2 个氯降解菌(*Chloroflexi*), 蓝藻(*Cyanobacteria*)、疣微菌(*Verrucomicrobia*)、厚壁菌属(*Firmicutes*)、芽单胞菌属(*Gemmatimonadetes*)各 1 个^[30]。

基于 α 多样性指数, 超积累生态型东南景天叶片组织(HL)的内生菌物种多样性最高, 其次为非超积累生态型东南景天叶片组织(NHL)和非超积累生态型东南景天茎组织(NHS), 超积累生态型东南景天茎组织(HS)的内生菌物种多样性最低(表 3)。在 β -多样性指数方面, 非超积累东南景天叶片和茎组织内生菌的群落结构差异最大, 其他样品之间群落结构相差不大(表 4)。造成两种生态型东南景天内生细菌差异的原因可能有以下几个方面: (1) 土壤是植物内生菌的主要来源, 两种生态型东南景天生长的土壤成分差异显著(pH、有机质、碱解氮、有效磷等)(表 1)为细菌提供不同的定殖环境^[31], 非超积累东南景天根际土的营养水平比超积累东南景天高,

从而导致两种生态型东南景天内生菌群落结构之间存在差异; (2) 不同植物根系分泌物的差异导致根际环境微生物的动态变化, 影响侵染定殖植物体内的内生菌^[32]; (3) 超积累生态型东南景天地上部重金属含量远大于非超积累生态型东南景天(表 1), 不同组织器官的重金属浓度不同会导致其体内定殖的内生菌对重金属的敏感性和耐受性不同^[33]; (4) 植物内生菌的多样性受植物品种和组织的影响, 不同品种的哈密瓜内生菌群落结构有显著差异^[34], Jin 等研究发现植物组织和生育期对中国西北地区瑞香狼毒叶、茎和根内生真菌群落结构有显著影响^[35], İnceoğlu 等大田实验的 6 个品种的马铃薯在幼苗期、开花期和衰老期根际土和土著土壤细菌群落结构的多样性, 结果发现幼苗期品种对马铃薯根际菌多样性有显著影响, 季节对根际菌和土壤土著微生物均有显著影响^[30]。

参 考 文 献

- [1] Bacon CW, Hinton DM. Bacterial Endophytes: the Endophytic Niche, Its Occupants, and Its Utility[M]. Netherlands: Springer, 2006: 155-194
- [2] Ma Y, Luo YM, Teng Y, et al. Effects of endophytic bacteria enhancing phytoremediation of heavy metal contaminated soils[J]. Acta Pedologica Sinica, 2013, 50(1): 195-202 (in Chinese)
马莹, 骆永明, 滕应, 等. 内生细菌强化重金属污染土壤植物修复研究进展[J]. 土壤学报, 2013, 50(1): 195-202
- [3] Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, et al. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(5): 2667-2677
- [4] Shin MN, Shim J, You Y, et al. Characterization of lead resistant endophytic *Bacillus* sp. MN3-4 and its potential for promoting lead accumulation in metal hyperaccumulator *Ahimsa firma*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 199-200: 314-320
- [5] Li HY, Wei DQ, Shen M, et al. Endophytes and their role in phytoremediation[J]. Fungal Diversity, 2012, 54(1): 11-18
- [6] Weyens N, Croes S, Dupae J, et al. Endophytic bacteria improve phytoremediation of Ni and TCE co-contamination[J]. Environmental Pollution, 2010, 158(7): 2422-2427
- [7] Bouchet V, Huot H, Goldstein R. Molecular genetic basis of ribotyping[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2008, 21(2): 262-273
- [8] Feng J, Zhao XW. Next-generation sequencing technologies and the application in plant[J]. Journal of Liaoning Forestry Science & Technology, 2012(4): 29-33, 37 (in Chinese)
冯健, 赵雪巍. 高通量测序技术及其在植物研究中的应用[J]. 辽宁林业科技, 2012(4): 29-33, 37
- [9] Chen L, Luo SL, Chen JL, et al. Diversity of endophytic bacterial populations associated with Cd-hyperaccumulator plant *Solanum nigrum* L. grown in mine tailings[J]. Applied Soil Ecology, 2012, 62: 24-30
- [10] Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, et al. Defining the core

- Arabidopsis thaliana* root microbiome[J]. Nature, 2012, 488(7409): 86-90
- [11] Liu Y, Yao S, Xu PP, et al. Composition and diversity of endophytic bacterial communities in Noni (*Morinda citrifolia* L.) seeds[J]. International Journal of Agricultural Policy and Research, 2014, 2(3): 98-104
- [12] Zhou JL, Shao L, Zhu HR, et al. Phytoremediation of inter-cropping with chemical enhancement of heavy-metal-contaminated acid soil: a long-term field experiment[J]. Acta Pedologica Sinica, 2014, 51(5): 1056-1065 (in Chinese)
周建利, 邵乐, 朱凰榕, 等. 间套种及化学强化修复重金属污染酸性土壤——长期田间试验[J]. 土壤学报, 2014, 51(5): 1056-1065
- [13] Long XX, Chen XM, Chen YG, et al. Isolation and characterization endophytic bacteria from hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance and their potential to promote phytoextraction of zinc polluted soil[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(5): 1197-1207
- [14] Zhang XC. Isolation and Identification of endophytes from *Sedum alfredii* and the mechanisms of their enhancement on heavy metal hyperaccumulation[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2012 (in Chinese)
张新成. 东南景天内生菌分离鉴定及其强化重金属超积累效应与机制[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2012
- [15] Bao SD. Soil and Agricultural Chemistry Analysis[M]. 3rd Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 132-135, 279-281 (in Chinese)
鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 132-135, 279-281
- [16] Lundberg DS, Yourstone S, Mieczkowski P, et al. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 999-1002
- [17] Fadrosch DW, Ma B, Gajer P, et al. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform[J]. Microbiome, 2014, 2: 6
- [18] Bodenhausen N, Horton MW, Bergelson J. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56329
- [19] Ren GD, Zhu CW, Alam MS, et al. Response of soil, leaf endosphere and phyllosphere bacterial communities to elevated CO₂ and soil temperature in a rice paddy[J]. Plant and Soil, 2015, 392(1/2): 27-44
- [20] Gevers D, Knight R, Petrosino JF, et al. The human microbiome project: a community resource for the healthy human microbiome[J]. PLoS Biology, 2012, 10(8): e1001377
- [21] Shi YW, Yang HM, Zhang T, et al. 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
- [22] Romero FM, Marina M, Pieckenstein FL. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing[J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 351(2): 187-194
- [23] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intra-genomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969
- [24] Pei AY, Oberdorf WE, Nossa CW, et al. Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(12): 3886-3897
- [25] Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, et al. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(1): 278-288
- [26] Crosby LD, Criddle CS. Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity[J]. Biotechniques, 2003, 34(4): 790-794, 796, 798
- [27] Kranziosch I, Stoll C, Holbach A, et al. Dechlorination and organohalide-respiring bacteria dynamics in sediment samples of the Yangtze Three Gorges Reservoir[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2013, 20(10): 7046-7056
- [28] Chen W, Ouyang LM, Kong PJ, et al. Rhizospheric bacteria of *Populus euphratica* improve resistance of wood plants to heavy metals[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2015, 26(9): 2811-2816 (in Chinese)
陈雯, 欧阳立明, 孔沛筠, 等. 胡杨根际细菌提高木本植物对重金属胁迫的耐受性[J]. 应用生态学报, 2015, 26(9): 2811-2816
- [29] Wang HO, Xu R, You LM, et al. Characterization of Cu-tolerant bacteria and definition of their role in promotion of growth, Cu accumulation and reduction of Cu toxicity in *Triticum aestivum* L.[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2013, 94: 1-7
- [30] Inceoglu Ö, Al-Soud WA, Salles JF, et al. Comparative analysis of bacterial communities in a potato field as determined by pyrosequencing[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23321
- [31] Garbeva P, van Veen JA, van Elsas JD. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness[J]. Annual Review of Phytopathology, 2004, 42: 243-270
- [32] Weinert N, Meincke R, Gottwald C, et al. Rhizosphere communities of genetically modified zeaxanthin-accumulating potato plants and their parent cultivar differ less than those of different potato cultivars[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(12): 3859-3865
- [33] Li L, Sinkko H, Montonen L, et al. Biogeography of symbiotic and other endophytic bacteria isolated from medicinal *Glycyrrhiza* species in China[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 79(1): 46-68
- [34] Luo M, Lu Y, Chen JH, et al. Study on the dynamic change of population density and distribution of endophytic bacteria in hami melon plants in Xinjiang[J]. Arid Zone Research, 2007, 24(1): 28-33 (in Chinese)
罗明, 卢云, 陈金焕, 等. 哈密瓜内生细菌菌群密度及分布动态[J]. 干旱区研究, 2007, 24(1): 28-33
- [35] Jin H, Yan ZQ, Liu Q, et al. Diversity and dynamics of fungal endophytes in leaves, stems and roots of *Stellera chamaejasme* L. in northwestern China[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2013, 104(6): 949-963