



研究报告

高通量测序分析甘肃高寒草原瑞香狼毒根内生菌群落结构特征研究

程济南^{1,2} 金辉^{*1} 许忠祥³ 张金林² 杨晓燕¹ 柳皓月¹ 许欣欣¹ 闵灯¹ 秦波^{*1}

1 中国科学院兰州化学物理研究所 中国科学院西北特色植物资源化学重点实验室 甘肃省天然药物重点实验室 甘肃 兰州 730000

2 兰州大学草地农业生态系统国家重点实验室草地微生物研究中心 甘肃 兰州 730020

3 南京海关动植物与食品检测中心 江苏 南京 210001

摘要:【背景】瑞香狼毒是我国天然草地退化的标志性植物之一，在入侵的过程中其根内微生物发挥着重要的作用，探究瑞香狼毒根内微生物群落对有益微生物资源的利用及生物防控瑞香狼毒具有重要意义。【目的】探究甘肃省祁连山东麓不同高寒草原毒性杂草瑞香狼毒根部内生真菌和细菌的组成、多样性等群落结构特征。【方法】通过 Illumina MiSeq 高通量测序技术对甘肃祁连山东麓不同高寒草原的瑞香狼毒根部内生菌组成及多样性进行分析。【结果】不同高寒草原瑞香狼毒根内子囊菌门(*Ascomycota*) 在真菌中占优势地位；蓝细菌(*Cyanobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*) 在根内生细菌中属于优势类群。G4 样点的真菌和细菌 OTU (Operational Taxonomic Unit) 数量和 Shannon 多样性指数均高于其他 4 个采样点。主坐标分析(Principal Coordinate Analysis, PCoA)表明，不同高寒草原瑞香狼毒根内生菌群落之间存在一定的差异。One-Way ANOVA 分析结合 Pearson 相关性分析显示，不同样地瑞香狼毒真菌群落结构在属水平上相关性较小，而细菌在属水平存在一定的相关性。【结论】本研究为进一步开发利用瑞香狼毒内生真菌和细菌资源、阐明瑞香狼毒内生菌群的群落结构和生态功能提供理论参考。

关键词：内生微生物，瑞香狼毒，高通量测序技术

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31772668); Collaborative Project of Lanzhou Institute of Chinese Academy of Sciences; Science and Technology Innovation Project of Yantai Zhongke Advanced Materials and Green Chemical Industry Technology Research Institute (AMGCE013)

***Corresponding authors:** Tel: 86-931-4968371

E-mail: JIN Hui: comefine@licp.cas.cn; QIN Bo: bqin@licp.cas.cn

Received: 03-01-2021; **Accepted:** 07-02-2021; **Published online:** 17-03-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31772668); 中国科学院兰州院地合作项目; 烟台中科先进材料与绿色化工产业技术研究院科技创新项目(AMGCE013)

***通信作者:** Tel: 0931-4968371

E-mail: 金辉: comefine@licp.cas.cn; 秦波: bqin@licp.cas.cn

收稿日期: 2021-01-03; **接受日期:** 2021-02-07; **网络首发日期:** 2021-03-17

High throughput sequencing analysis of *Stellera chamaejasme* L. root endophytic microorganisms in Gansu alpine grassland

CHENG Jinan^{1,2} JIN Hui^{*1} XU Zhongxiang³ ZHANG Jinlin² YANG Xiaoyan¹
LIU Haoyue¹ XU Xinxin¹ MIN Deng¹ QIN Bo^{*1}

1 Key Laboratory of Chemistry of Northwestern Plant Resources of Chinese Academy of Sciences, Key Laboratory for Natural Medicines of Gansu Province, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730000, China

2 Center of Grassland Microbiome, State Key Laboratory of Grassland Agro-Ecosystems, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730020, China

3 Animal, Plant & Food Inspection Center of Nanjing Customs, Nanjing, Jiangsu 210001, China

Abstract: [Background] *Stellera chamaejasme* L. is one of the landmark plants of natural grassland degradation in China. The root endophytic microorganisms play an important role in the process of invasion. It is of great significance to explore the root endophytic microbial community to the utilization beneficial microbial resources, and to prevention and control of the *Stellera chamaejasme* L.. [Objective] The purpose of this study was to explore the endophytic fungi and bacteria composition and diversity in the roots of *Stellera chamaejasme* L., a poisonous weed in different alpine grasslands at the eastern foot of Qilian Mountains in Gansu province. [Methods] The composition and diversity of endophytic fungi and bacteria in the roots of *Stellera chamaejasme* L. in different alpine grasslands at the eastern foot of Qilian Mountains in Gansu province were analyzed by Illumina MiSeq high-throughput sequencing technique. [Results] The results showed that *Ascomycota* in different alpine steppe was dominant in fungi in the roots of *Stellera chamaejasme* L. from different alpine grasslands. *Cyanobacteria*, *Proteobacteria* and *Actinobacteria* belong to the dominant groups in root endophytic bacteria. The operational taxonomic unit (OTU) number and Shannon diversity index of fungi and bacteria in G4 sampling site were higher than those in the other four sampling sites. Principal coordinate analysis (PCoA) showed that there were some differences among endophytic fungi and bacteria communities in the roots of *Stellera chamaejasme* L. in different alpine grasslands. One-Way ANOVA analysis and Pearson correlation analysis showed that the community structure of *Stellera chamaejasme* L. fungi had little correlation at the genus level, while the bacteria had a certain correlation at the genus level. [Conclusion] The purpose of this study is to further develop and utilize the endophytic fungi and bacterial resources and provide theoretical reference for elucidating the community structure and ecological function of endophytic flora of *Stellera chamaejasme* L..

Keywords: endophytic microorganisms, *Stellera chamaejasme* L., high-throughput sequencing technology

植物内生菌为生活在植物体内共生或寄生的真菌、细菌等微生物^[1-2], 其存在不会引起植物组织产生明显危害症状^[3], 可从严格表面消毒的植物组织中分离得到。大量研究表明, 植物内生菌的组成往往与植物生长环境有着紧密的联系^[4-5]; 另一方面, 内生菌参与植物的生长发育, 对于植物特异性响应产生一定的影响^[6]。因此, 对植物内生菌的研究, 在探究植物与外界环境因子的相互作用、自身的生理生长方面发挥着重要的作用。植物内生菌

可通过产生各类激素或成为矿质营养元素的转运体, 从而对植物的生长发育产生影响^[7-9], 也能分泌特定的化合物抑制植物体内的有毒物质^[10-11]。有研究表明, 在不同的盐度、pH、光照、光周期和温度条件下, 内生真菌能显著提高醉马草种子的发芽率和存活率, 也能增强环境胁迫的抵抗能力^[12]。此外, 醉马草的几株内生细菌不仅对马铃薯枯萎病菌有较好的拮抗作用, 还有固氮以及产生吲哚乙酸的能力^[13]。Yang 等对青藏高原紫花针茅内生真菌的

研究显示,紫花针茅具有丰富的可产生活性次生代谢产物潜力的内生真菌资源^[14];而在对于紫花针茅内生细菌的研究中,发现了内生细菌枯草芽孢杆菌 265ZY4 可以帮助植株维持逆境胁迫下生化指标的的稳定,提高自身对于抵抗逆境的能力^[15]。Jin 等对于青藏高原不同海拔瑞香狼毒根际土壤及根内细菌研究中发现,根部及土壤中存在可产生赤霉素、生长素等激素的鞘氨醇单胞菌^[16]。Jin 等采用构建克隆文库的方法分别对甘肃萃英山、岷县的高原狼毒植株内真菌或细菌群落进行了分析,结果显示瑞香狼毒根内真菌主要为子囊菌门、担子菌门,细菌主要为变形菌门以及放线菌门^[17-19]。因此,对瑞香狼毒根内真菌及细菌的研究可为进一步开发利用瑞香狼毒内生微生物资源提供理论参考。

瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme* L.)为多年生草本植物,整株有毒^[20],具有粗大有毒的肉质根,广泛分布于我国西北地区^[21-22]。近年来,瑞香狼毒在我国北方退化草地的发生面积不断扩大,逐渐取代草地原有的优势草本植物,加速了我国北方天然草地的退化,严重制约了当地畜牧业的发展,已成为北方草地退化的标志性植物之一。目前,对于瑞香狼毒的研究多集中在形态学^[23]、生态学^[24]、化学物质^[25-26]及生物防治上^[27-28]。对于瑞香狼毒根际微生态系统,尤其是根际微生物、内生菌等方面的研究仅有少量的报道^[29]。随着生物技术的飞速发展,传统的微生物鉴定方法无法满足数量众多、习性复杂的微生物菌群。高通量测序作为第二代测序技术,实现了对大规模基因序列的直接测序,目前已广泛应用于土壤微生物多样性研究^[30-32]。本文采用微生物多样性高通量测序法,对甘肃省祁连山东麓不同高寒草原 5 个样地的瑞香狼毒根内真菌和细菌群落组成及多样性进行研究,分析不同地区瑞香狼毒根内生菌的变化规律,揭示高寒草原毒性杂草根内生菌的群落结构特征,以期对西北高寒草原生态恢复和有益微生物资源开发利用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验选取甘肃祁连山东麓天然高寒草原 5 个样地进行样品采集,分别命名编号为 G1 (37°59'47"N, 101°56'42"E)、G2 (38°50'31"N, 99°53'40"E)、G3 (38°27'58"N, 100°24'27"E)、G4 (37°07'19"N, 102°50'08"E)、G5 (37°07'18"N, 102°46'40"E),每个样地用干净的铁铲随机选取 10 株完整健康的瑞香狼毒植株,轻轻抖落黏附在根表的土壤,将植株装于无菌的密封袋中,作为根的样本。所有样品在 24 h 内带回实验室,放入 4 °C 冰箱冷藏备用。

1.2 样品表面消毒

将采集得到的植株根部冲洗干净,切成 1 cm 左右的根段,放入装有蒸馏水的螺口瓶中,超声波低频(240 W)清洗 4 次,每次 10 min,除去表面残留的土壤和附着微生物;然后将样品材料放入 75% 乙醇溶液中浸泡 1 min;之后再放入含有 2% 活性氯的次氯酸钠溶液中浸泡 8 min,最后用无菌水反复洗涤 3 次。将最后的洗涤液涂布在琼脂培养基上 26 °C 静置 7 d,检测是否消毒完全,消毒效果检验参考文献^[33]。

1.3 主要试剂和仪器

植物 DNA 提取试剂盒、PCR 聚合酶,天根生化科技(上海)有限公司;ZR-96 Bacterial DNA Kit, Zymo Research 公司。分光光度计, Thermo Fisher 公司;PCR 仪, Applied Biosystems 公司。

1.4 基因组扩增

将表面消毒后的样品经液氮冷冻后使用研钵进行粉碎。使用植物 DNA 提取试剂盒将所得匀浆的等分试样(200 mg)用于真菌基因组 DNA 提取。提取和纯化的 DNA 浓度用分光光度计定量, DNA 浓度调整为 10 ng/μL。真菌 DNA 扩增引物为 ITS1F/ITS4 (ITS1F: 5'-CTTGGTCATTTAG AGGAAGTAA-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR 反应体系(50 μL): DNA 模板 5 μL,

2×*Es Taq* Master Mix 25 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, 加 ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。另一份等分试样(200 mg)用于细菌基因组 DNA 提取, 采用 ZR-96 Bacterial DNA Kit 提取细菌的基因组 DNA, 利用 16S rRNA 基因通用引物 799F/1193R (799F: 5'-AACMGGATT AGATACCCCKG-3'; 1193R: 5'-ACGTCATCCCCAC CTTCC-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL): 5×*FastPfu* 缓冲液 5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, *FastPfu* 聚合酶 (5 U/μL) 0.25 μL, DNA 模板(0.2 ng/μL) 1 μL, 加 ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 27 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。使用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。将样本 DNA 送至北京诺禾致源科技股份有限公司, 利用 Illumina HiSeq 2500 平台进行测序。

1.5 数据分析

采用 UPARSE 软件对高通量测序获得的有效序列进行聚类, 根据 97% 相似性将序列聚类成为 OTU; 用 QIIME 软件计算多样性的主要指数, 利用软件 R 进行稀释度曲线绘制, 用 Mothur 软件进行单个样品的 α 多样性分析。基于 OTU 的结果,

对 Shannon 指数、Chao1 指数进行计算, 用以进行生物多样性分析。利用 QIIME (V1.7.0) 进行样品的 β 多样性分析, 构建 PCoA 分析图, 以此来挖掘样品之间的差异。使用 QIIME 中的 BLAST 方法与 Unite INSDC 数据库进行物种注释分析, 各组样品在不同水平上的分类比较柱形图、单个样品的群落分布柱形图使用 QIIME 软件绘制。应用 SigmaPlot 12.0 软件对数据进行 One-Way ANOVA 差异显著性检验及 Pearson 相关性分析检验。

2 结果与分析

2.1 根内真菌及细菌高通量测序结果

采集得到的 5 个样地样品中, 在真菌水平上测序共产生 221 525 条原始序列, 质控后得到 219 878 条高质量目标片段。5 个采样地获得的 OTU 数量分别为 48、22、50、49 和 42。在细菌水平上共测序得到 225 115 条原始序列, 去掉不合格序列后得到 205 702 条高质量目标片段。5 个采样地获得的 OTU 数量分别为 251、241、274、624 和 668。真菌、细菌的稀释度曲线如图 1 所示, 结合文库覆盖率, 说明本研究中各样品文库包含了大多数真菌、细菌类群, 能反映样品内生菌群落结构组成。

2.2 物种组成分析

在 5 个地区的瑞香狼毒根中检测到 3 个门真菌, 分别为子囊菌门(*Ascomycota*)、接合菌门

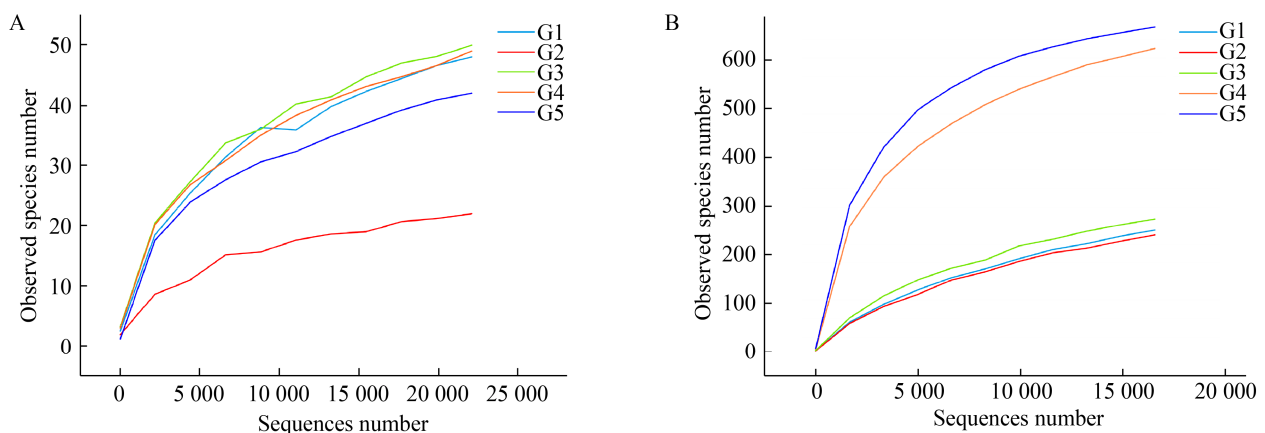


图 1 样品微生物真菌(A)与细菌(B)丰度稀释度曲线

Figure 1 Dilution curve of microbial fungi (A) and bacteria (B) in the sample

(*Zygomycota*)和担子菌门(*Basidiomycota*), 分别占总序列数的 97.8%、0.1%、0.3%, 子囊菌门为最主要优势真菌群(图 2A)。在纲水平上共注释得到 11 类真菌, 其中散囊菌纲(*Eurotiomycetes*)和粪壳菌纲(*Sordariomycetes*)相对丰度分别为 51.7%和 45.3%, 在 G1、G2 及 G4 地区, 散囊菌纲(*Eurotiomycetes*)为优势菌群, 分别占 91.63%、97.23%和 51.34%, 而在 G3 及 G5 地区, 粪壳菌纲优势明显, 分别占 79.18%和 97.85% (图 2B)。

在根部 5 个样品中共检测到 25 门的细菌, 其中蓝细菌(*Cyanobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)为主要优势细菌门, 分别占样品序列总数的 56.4%、22.9%和 6.4%, 其中蓝细菌门(*Cyanobacteria*)为主要细菌菌群(图 3A)。在纲水平上共注释得到 64 类细菌群, 其中

α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)、 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)、放线菌纲(*Actinobacteria*)、嗜热油菌纲(*Thermoleophila*)和芽孢杆菌纲(*Bacilli*)为主要优势细菌群, α -变形菌纲是 5 个样地中丰度最高的细菌纲, 分别占各自样品总序列数目的 16.4% (G1)、22.6% (G2)、19.1% (G3)、19.0% (G4) 和 10.8% (G5) (图 3B)。

2.3 样品多样性分析

对于 5 个采样地获得的瑞香狼毒根部样品进行 α 多样性分析, 包括 Chao1 指数和 Shannon 指数。分析结果见表 1。在真菌方面, Chao1 指数对于样品的丰富度分析结果显示 G4>G3>G1>G5>G2; Shannon 指数对于样品的多样性分析结果显示 G4>G3>G1>G2>G5。在细菌方面, Chao1 指数对于样品的丰富度分析结果显示 G4>G5>G1>G3>G2;

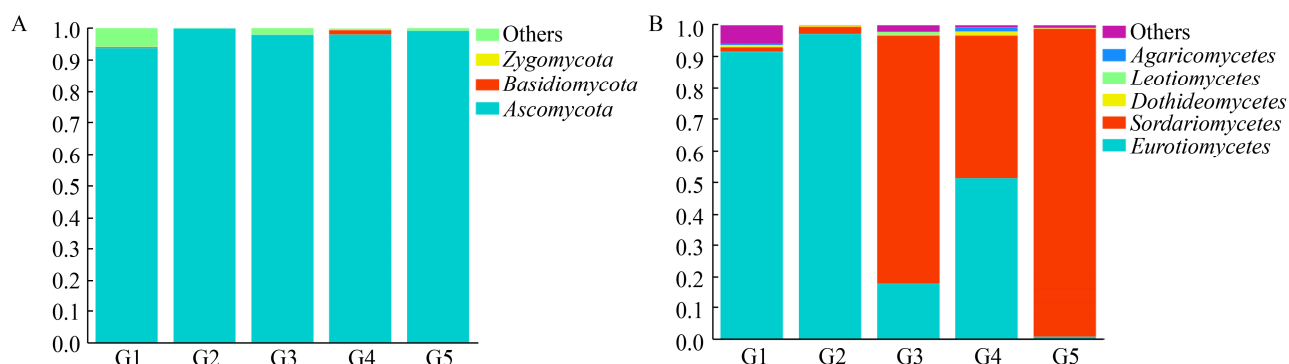


图 2 根内真菌门水平(A)和纲水平(B)分类

Figure 2 Classification of fungal phyla level (A) and class level (B) within roots

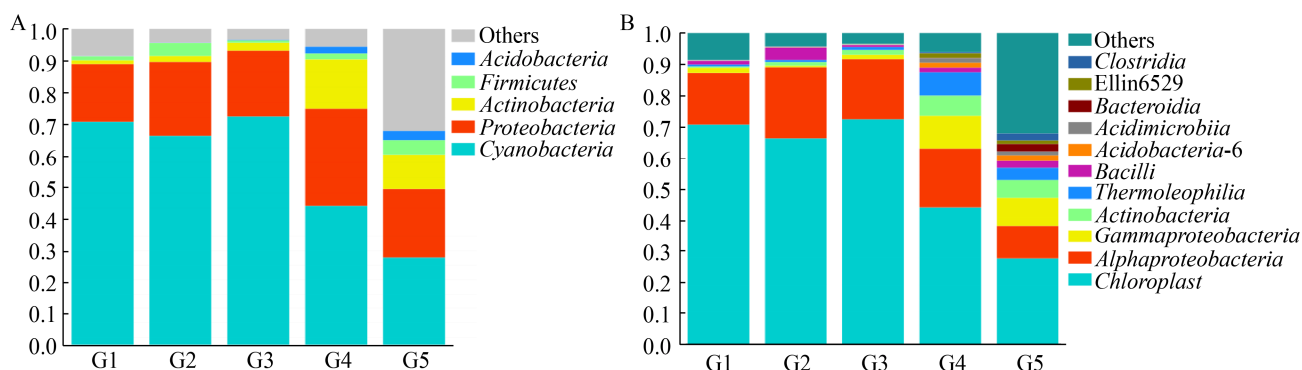


图 3 根内细菌门水平(A)和纲(B)水平分类

Figure 3 Classification of bacteria phyla level (A) and class level (B) within roots

表 1 根际土壤微生物 Alpha 多样性分析表
Table 1 Analysis table of microbial Alpha diversity in rhizosphere soil

Sample name		Effective tags	OTU (97%)	Shannon index (97%)	Chao1 index (97%)	Coverage rate (%)
Fungi	G1	54 342	48	1.24	63.00	99.65
	G2	55 359	22	0.72	24.50	99.75
	G3	34 995	50	1.43	63.13	99.71
	G4	22 189	49	1.69	125.50	99.66
	G5	52 993	42	0.42	51.75	99.83
Bacterial	G1	49 769	251	1.77	402.44	96.73
	G2	29 717	241	1.77	367.06	96.76
	G3	72 304	274	1.69	367.35	97.04
	G4	34 045	624	4.81	747.37	86.78
	G5	19 867	668	5.69	721.31	81.95

Shannon 指数对于样品的多样性分析结果显示 G5>G4>G1=G2>G3, G4 和 G5 两地采样点的物种多样性及丰富度均远高于另外 3 个样地。因此,就单个样品的多样性分析而言, G4 样地的物种多样性及丰富度最高。

对瑞香狼毒根内生菌的 β 多样性指数进行分析,并对各样品数据 Bray-Curtis 距离进行统计,用于对不同样品的内生菌群落构成进行比较分析,结果如表 2 所示。在真菌水平上, G3 与 G5 采样地距离值最小,表明两地物种组成多样性较为一致,两地瑞香狼毒根部真菌菌群组成相似性较高;此外, G1、G2 样品与 G5 样地样品距离值最高,说明两地根内生真菌物种组成与 G5 样地差异最大。在细菌水平上, G4 与 G5 两地距离值最小,说明两地瑞香狼毒根部细菌菌群组成相似性较高,而 G1

与 G5 采样点距离相差最大,说明两地根部内生细菌物种组成差异最大。

2.4 不同地区瑞香狼毒植株根内微生物群落结构聚类分析

根据根部 5 个采样点样品在属水平的物种注释及丰度信息,选取丰度排名前 21 的真菌属及其在每个样品中的丰度信息绘制热图,并从分类信息和样品间差异 2 个层面进行聚类,找出研究样品中聚集较多的物种或样品(图 4A)。结果显示, G1 采样点瑞香狼毒根部内生真菌中,座革菌属(*Thelephora*)相对富集; G2 样地链格孢属(*Alternaria*)相对富集;瓶霉属(*Cadophora*)、茎点霉属(*Phoma*)、漆斑菌属(*Myrothecium*)、镰刀霉属(*Fusarium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、瓶霉菌属(*Phialophora*)、柱孢属(*Cylindrocarpon*)在 G3 样地相对富集;新丛赤壳属(*Neonectria*)、截盘多毛孢属(*Truncatella*)、枝孢属(*Cladosporium*)在 G4 样地相对富集;小鼻枝霉属(*Rhinoctadiella*)、鬼伞属(*Copronia*)、卡普龙属(*Capronia*)在 G5 样地相对富集。G1 样地样品和 G2 样地样品聚类到了一起,表明两地根际土壤真菌群落和根部内生真菌群落相似性极高。

选取丰度最高的 35 个细菌属及其在每个样品中的丰度信息绘制热图(图 4B),分析发现不同采样地的瑞香狼毒根内的细菌群落存在差异。在 G1

表 2 不同样品间微生物复杂度比较分析表
Table 2 Comparative analysis of microbial complexity among different samples

Sample name		G1	G2	G3	G4	G5
Fungi	G1	0.00				
	G2	0.69	0.00			
	G3	0.80	0.84	0.00		
	G4	0.78	0.46	0.88	0.00	
	G5	0.97	0.97	0.23	0.94	0.00
Bacterial	G1	0.00				
	G2	0.56	0.00			
	G3	0.48	0.47	0.00		
	G4	0.61	0.60	0.55	0.00	
	G5	0.64	0.62	0.56	0.30	0.00

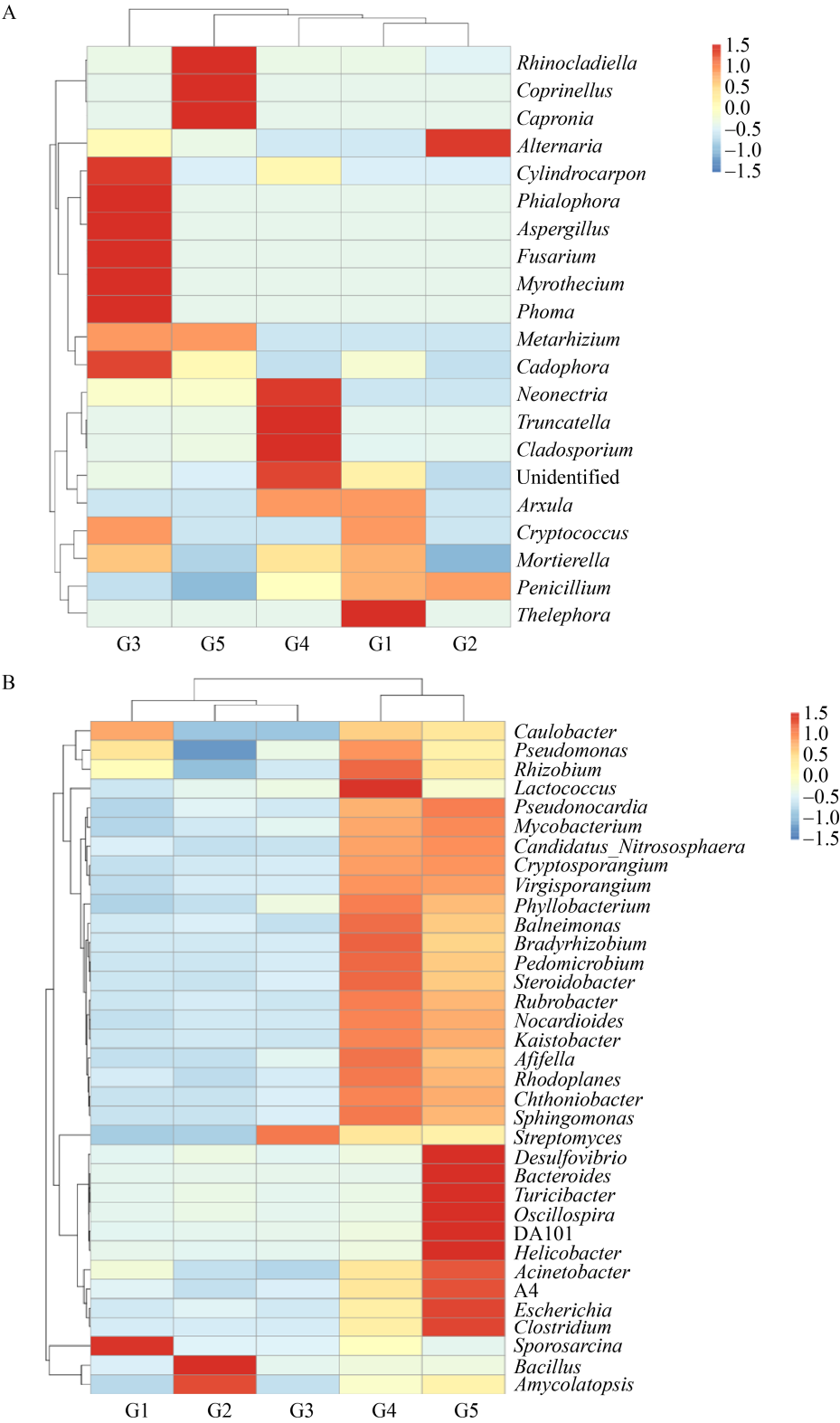


图 4 根内真菌(A)及细菌(B)物种丰度聚类图
Figure 4 Clustering map of fungi (A) and bacterial (B) species abundance in roots

采样点八叠球菌属(*Sporosarcina*)相对富集; G2 采样点芽孢杆菌属(*Bacillus*)、*Amycolatops* 较为富集; G3 采样点链霉菌属(*Streptomyces*)相对富集; 在 G4 根样品中乳球菌属(*Lactococcus*)相对富集; 在 G5 根样品中, 脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、*Turicibacter*、颤螺菌属(*Oscillospira*)、DA101、螺杆菌属(*Helicobacter*)相对富集。G5 采样点的瑞香狼毒根内细菌多样性以及丰度均较高。此外, G2 和 G3 两地物种聚类相似度较高, 说明两地瑞香狼毒根内细菌菌群结构相似。

2.5 土壤微生物群落结构 PCoA 分析

以 Bray-Curtis 距离进行 PCoA 图绘制, 结果显示 5 个样品分布相对分散。在真菌方面, PC1 的解释率达到 64.18%, PC2 的解释率达到 27.02%, 累计解释率达到 91.20%, 可以较准确地反映样品间的差异性(图 5A)。由图 5A 可知, G1 明显与其他样品相距较远, 表明 G1 样地样品与其他 4 个样地样品的内生真菌群落结构差异较大, G3 与 G5 样地样品相距较近, 与另外距离值较近的 G2 和 G4 采样点相比距 PC1 轴更近, 因此二者代表的真菌群落相似度更高。在细菌方面(图 5B), PC1 的解释率达到 50.57%, PC2 的解释率达到 22.70%, 累

计解释率达到 73.27%, 其中 G1、G2 和 G3 这 3 个样地样品分别与其他 4 个样地距离较远, 因此与其余样地样品细菌群落结构差异性较大, 而 G4 与 G5 两地在图 5B 中距离相近, 说明 2 个样地细菌菌群结构相似性较高。

2.6 根内微生物群落相关性分析

为了确定甘肃省不同地点瑞香狼毒根内生菌群落组成的差异性, 我们选择根内生菌在属水平上的分类进行单因素方差分析(One-Way Anova)。对比 5 个地点的瑞香狼毒根内生真菌群落, 在真菌水平上差异不显著($P>0.05$) (表 3), 具有一定相似性。在细菌水平上, 则表现为 G1、G2 和 G3 三地之间的差异性不显著, G4 与 G5 之间差异性不显著($P>0.05$), 而 G1、G2 和 G3 三地分别与 G4 和 G5 之间差异极显著($P<0.001$) (表 3)。此外, 使用 Pearson 相关性分析来评估各样地根内生微生物群落之间的相关性(表 4), 结果显示: 各样地瑞香狼毒根内生真菌群落相关性各异, G1、G2 与 G4 之间有显著相关性($P<0.05$), 而与 G3、G5 没有相关性($P>0.05$), G3 与 G5 两地之间瑞香狼毒根内真菌群落相关性较显著($P<0.001$); 在细菌水平上, 各样地之间有较强的相关性($P<0.001$)。

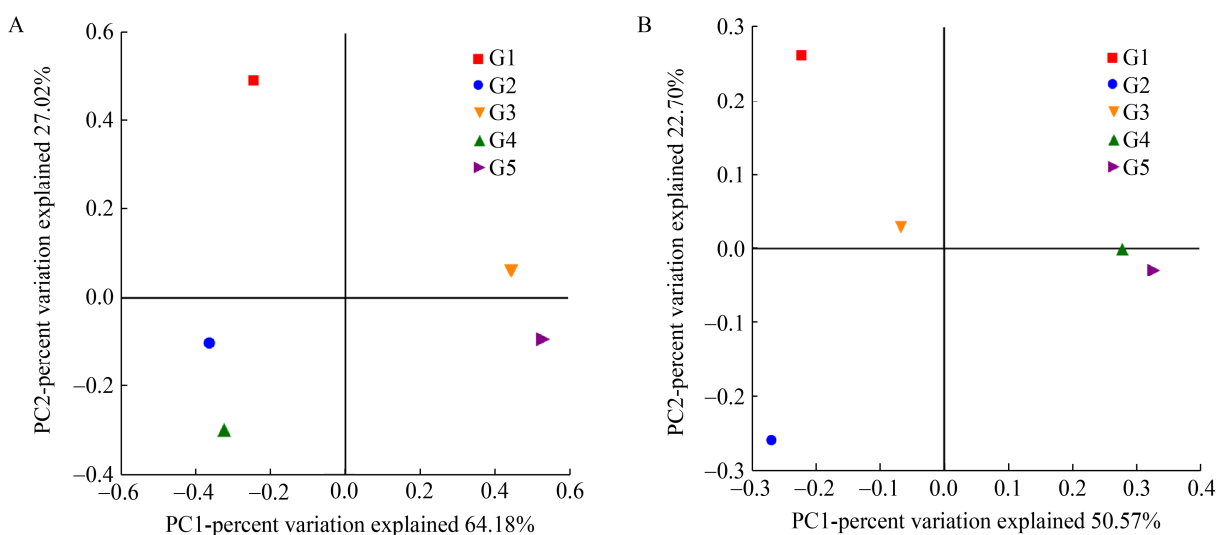


图 5 瑞香狼毒根内真菌(A)及细菌(B)群落 PCoA 分析
Figure 5 PCoA analysis of fungi (A) and bacteria (B) in the root of *Stellera chamaejasme* L.

表 3 各样品 One-way ANOVA 分析
Table 3 One-way ANOVA analysis of each sample

Sample name		G1		G2		G3		G4	
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Fungi	G2	2.430	0.119						
	G3	0.222	0.638	3.820	0.051				
	G4	0.525	0.469	3.488	0.062	0.001	0.981		
	G5	0.002	0.962	2.427	0.119	0.245	0.621	0.264	0.607
Bacterial	G2	0.004	0.952						
	G3	1.030	0.310	1.241	0.265				
	G4	74.654	<0.001	79.795	<0.001	66.032	<0.001		
	G5	87.921	<0.001	94.383	<0.001	78.745	<0.001	0.193	0.660

表 4 各样品 Pearson 相关性分析
Table 4 Pearson correlation analysis of each sample

Sample name		G1		G2		G3		G4	
		Correlation coefficient	<i>P</i>	Correlation coefficient	<i>P</i>	Correlation coefficient	<i>P</i>	Correlation coefficient	<i>P</i>
Fungi	G2	0.998	<0.001						
	G3	0.161	0.583	0.174	0.552				
	G4	0.775	<0.001	0.780	<0.001	0.165	0.573		
	G5	−0.066	0.824	−0.052	0.861	0.973	<0.001	−0.006	0.983
Bacterial	G2	0.997	<0.001						
	G3	0.999	<0.001	0.998	<0.001				
	G4	0.977	<0.001	0.980	<0.001	0.976	<0.001		
	G5	0.925	<0.001	0.923	<0.001	0.912	<0.001	0.962	<0.001

3 讨论与结论

本研究通过高通量测序分析了瑞香狼毒根部内生菌的组成、多样性等群落结构特征。结果表明,各地内生真菌 OTU 数量在 22–50 之间,子囊菌门为优势门,而且 G4 样地内生真菌香浓指数和 Chao1 指数最高。各地内生细菌 OTU 数量在 241–668 之间,G4 样地内生细菌香浓指数和 Chao1 指数最高。因此,G4 点样地的根内生菌多样性及丰富度最高。主坐标分析结果显示,G1 样地真菌群落结构与其他 4 地之间差异较大;各样地细菌群落之间的差异性较大,但 G4 与 G5 样地的细菌群落结构较为相似(G4 与 G5 样地地理位置接近),即瑞香狼毒根内生菌在不同地点显示不同的结构组成及多样性。这与 Jin 等对西藏根内生菌的研究较为一致^[34]。One-Way ANOVA 分析与 Pearson 相关性分

析结果表明,瑞香狼毒根内生真菌无明显相关性,细菌则存在一定的相关性。此外,卢许波等^[35]对拉萨扎叶巴沟瑞香狼毒根际土壤细菌的分离与鉴定结果显示,不同地点瑞香狼毒根际土壤细菌的群落结构差异较大,而且微生物群落组成与自身生境有一定相关性;姚祥^[36]研究醉马草内生真菌共生体对草地植物组成及土壤微生物群落多样性的影响表明,土壤微生物对植被内生微生物具有一定的影响;王欢等^[37]对不同地区瑞香狼毒茎、叶、花内生真菌进行了分离与鉴定,结果表明瑞香狼毒内生真菌的种属分布有区域特异性。因此,瑞香狼毒的根内生菌可能更多地受到其生长地点环境因子的影响,真菌群落受到的影响较大。此研究为今后对瑞香狼毒的生态防治具有一定的借鉴意义。

本研究对甘肃省 5 个地区的瑞香狼毒根内生

菌进行测定, 由高通量测序结果显示, 根内真菌主要以子囊菌门为主, 根内检测到的 25 个细菌门主要以蓝细菌、变形菌门、放线菌门为主。这与 Jin 等^[16]对西藏不同海拔梯度下瑞香狼毒根内细菌群落结构测定结果及对兰州榆中县萃英山的瑞香狼毒根内真菌测定结果^[17]较为一致, 均显示真菌以子囊菌门为主, 细菌以放线菌门和变形菌门为主要菌门。将瑞香狼毒与其他有毒杂草如醉马草的根内微生物进行比较, 黄玺等^[38]对桑科、甘加和榆中 3 个地区醉马草的内生真菌研究结果显示, 丰度较高的真菌属为曲霉属(*Aspergillus*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、根霉属(*Rhizopus*)和链格孢属(*Alternaria*), 它们均属于子囊菌门, 表明醉马草中优势度最高的真菌门也是子囊菌门。张雪兵等^[39]对乌鲁木齐南山的醉马草内生细菌进行分析鉴定, 也发现了优势细菌属如芽孢杆菌属(*Bacillus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)等, 并将其鉴定出的细菌属归纳到门水平, 结果显示内生细菌主要为变形菌门与放线菌门, 这与本文研究较为一致。此外, 本研究发现, 各样地瑞香狼毒根内真菌与细菌的主要组成菌属不同, 可能是各地土壤环境因子的影响, 导致狼毒根内生菌的组成不同, Edwards 等也证实了植物内生微生物受到植物生长环境、土壤类型等的影响^[40]。本研究对甘肃 5 个地点瑞香狼毒根内生菌群落进行分析研究, 为今后瑞香狼毒根内有益微生物的分离与鉴定提供了有力支撑, 也为瑞香狼毒入侵导致的草原退化以及草地生态系统恢复提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] Hao XJ. Plant Endophyte[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2010: 38-52 (in Chinese)
郝晓娟. 植物内生菌[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010: 38-52
- [2] Turner TR, James EK, Poole PS. The plant microbiome[J]. Genome Biology, 2013, 14(6): 1-10
- [3] Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 4951-4959
- [4] Laforest-Lapointe I, Messier C, Kembel SW. Host species identity, site and time drive temperate tree phyllosphere bacterial community structure[J]. Microbiome, 2016, 4(1): 27
- [5] Oliveira ALM, Canuto EL, Silva EE, Reis VM, Baldani JI. Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture levels[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2004, 35(4): 295-299
- [6] Nissinen RM, Männistö MK, Van Elsas JD. Endophytic bacterial communities in three arctic plants from low arctic fell tundra are cold-adapted and host-plant specific[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 82(2): 510-522
- [7] Smith SE, Smith FA, Jakobsen I. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses[J]. Plant Physiology, 2003, 133(1): 16-20
- [8] Yang H, Hou YX, Zhang S, Kong QL, Fan ZJ, Li SR, Meng M, Li HX, Zhang Y, Xiao JL. Endophytic fungi from wild soybean promotes crop growth[J]. Journal of Agriculture, 2020, 10(7): 31-34 (in Chinese)
杨赫, 侯宇轩, 张姝, 孔庆林, 范芷君, 李双润, 蒙蒙, 李恒星, 张月, 肖佳雷. 野生大豆内生真菌对作物促生作用的研究[J]. 农学学报, 2020, 10(7): 31-34
- [9] Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 2009, 63: 541-556
- [10] Wu ZX, Hao ZP, Zeng Y, Guo LP, Huang LQ, Wang Y, Chen BD. Molecular quantification of *Cylindrocarpum destructans* in the rhizosphere of *Panax notoginseng* for predicting plant growth response[J]. Microbiology China, 2015, 42(3): 598-607 (in Chinese)
吴照祥, 郝志鹏, 曾燕, 郭兰萍, 黄璐琦, 王勇, 陈保冬. 三七根腐病原菌毁灭柱孢霉分子定量检测方法及其应用[J]. 微生物学通报, 2015, 42(3): 598-607
- [11] Monteiro RA, Balsanelli E, Wassem R, Marin AM, Brusamarello-Santos LCC, Schmidt MA, Tadra-Sfeir MZ, Pankiewicz VCS, Cruz LM, Chubatsu LS, et al. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects[J]. Plant and Soil, 2012, 356(1/2): 175-196
- [12] Ahmad RZ, Khalid R, Aqeel M, Ameen F, Li CJ. Fungal endophytes trigger *Achnatherum inebrians* germination ability against environmental stresses[J]. South African Journal of Botany, 2020, 134: 230-236
- [13] Yang CD, Wang Y, Wang YQ, Yao YL, Xue L, Xu CL, Chen XR. Identification and determination of biological functions of endophytic bacteria from *Achnatherum inebrians* in Alpine grassland of East Qilian Mountains[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2014, 23(5): 249-255 (in Chinese)
杨成德, 王颖, 王玉琴, 姚玉玲, 薛莉, 徐长林, 陈秀蓉. 东祁连山高寒草地几株醉马草内生细菌的生物功能评价

- 及鉴定[J]. 草业学报, 2014, 23(5): 249-255
- [14] Yang XY, Jin H, Xu LH, Cui HY, Xin AY, Liu HY, Qin B. Diversity and functions of endophytic fungi associated with roots and leaves of *Stipa purpurea* in an alpine steppe at Qinghai-Tibet Plateau[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 30(7): 1027-1036
- [15] Yang CD, Cui YZ, Feng ZH, Xue L, Jin MJ. Effects of endophytic *Bacillus subtilis* 265ZY4 on physiological and biochemical characteristics of *Stipa purpurea* under abiotic stress[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2019, 28(6): 101-108 (in Chinese)
杨成德, 崔月贞, 冯中红, 薛莉, 金梦军. 内生枯草芽孢杆菌 265ZY4 对温度和紫外光胁迫下紫花针茅生化特征的影响[J]. 草业学报, 2019, 28(6): 101-108
- [16] Jin H, Yang XY, Liu RT, Yan ZQ, Li XD, Li XZ, Su AX, Zhao YH, Qin B. Bacterial community structure associated with the rhizosphere soils and roots of *Stellera chamaejasme* L. along a Tibetan elevation gradient[J]. Annals of Microbiology, 2018, 68(5): 273-286
- [17] Jin H, Yan ZQ, Liu Q, Yang XY, Chen JX, Qin B. 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
- [18] Jin H, Yang XY, Lu DX, Li CJ, Yan ZQ, Li XZ, Zeng LM, Qin B. Phylogenetic diversity and tissue specificity of fungal endophytes associated with the pharmaceutical plant, *Stellera chamaejasme* L. revealed by a cultivation-independent approach[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2015, 108(4): 835-850
- [19] Jin H, Yang XY, Yan ZQ, Liu Q, Li XZ, Chen JX, Zhang DH, Zeng LM, Qin B. Characterization of rhizosphere and endophytic bacterial communities from leaves, stems and roots of medicinal *Stellera chamaejasme* L[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2014, 37(5): 376-385
- [20] Feng WX, Lu X, Xu KT, Yu ZX, Tang C, Feng BM. Advance in medicinal constituents and allelopathy of *Stellera chamaejasmin* in natural grassland[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2019, 40(12): 84-88 (in Chinese)
冯伟星, 卢轩, 许可桐, 于宗霞, 唐川, 冯宝民. 天然草地瑞香狼毒的药用成分及化感作用研究进展[J]. 动物医学进展, 2019, 40(12): 84-88
- [21] Liu Y, Lu NH, Feng TT, Li YM, Zhang YP, Zhang HX, Wang Y. Optimization of *Daphne* content extraction in *Stellera chamaejasme* by HPLC combined with response surface methodology[J]. Journal of Hebei Traditional Chinese Medicine and Pharmacology, 2019, 34(5): 48-52 (in Chinese)
刘阳, 卢年华, 冯亭亭, 李永民, 张永鹏, 张海霞, 王岩. HPLC 结合响应面分析法优化提取瑞香狼毒中西瑞香素的含量研究[J]. 河北中医药学报, 2019, 34(5): 48-52
- [22] Liu X, Guan HR, Song M, Fu YP, Han XM, Lei M, Ren JY, Guo B, He W, Wei YH. Reference gene selection for qRT-PCR assays in *Stellera chamaejasme* subjected to abiotic stresses and hormone treatments based on transcriptome datasets[J]. PeerJ, 2018, 6: e4535
- [23] Wang H, Ma QC, Geng PS, Feng K, Wu CC, Wang JG, Zhao BY. Progress on *Stellera chamaejasme* in natural grasslands[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(12): 154-160 (in Chinese)
王欢, 马青成, 耿朋帅, 冯柯, 吴晨晨, 王建国, 赵宝玉. 天然草地瑞香狼毒研究进展[J]. 动物医学进展, 2015, 36(12): 154-160
- [24] Wang ZX, Qu Y, Wang L, Zhang XZ, Xiao HB. Ultra-high performance liquid chromatography with linear ion trap-Orbitrap hybrid mass spectrometry combined with a systematic strategy based on fragment ions for the rapid separation and characterization of components in *Stellera chamaejasme* extracts[J]. Journal of Separation Science, 2016, 39(7): 1379-1388
- [25] Guo LZ, Wang K. Research progress on biology and ecology of *Stellera chamaejasme* L.[J]. Acta Agrestia Sinica, 2018, 26(3): 525-532 (in Chinese)
郭丽珠, 王堃. 瑞香狼毒生物学生态学研究进展[J]. 草地学报, 2018, 26(3): 525-532
- [26] Bao GS, Wang HS, Zeng H. Effects of adding organosilicon adjuvants to Langdujing on enhancing control effect and plant diversity of grassland communities[J]. Pratacultural Science, 2015, 32(2): 263-268 (in Chinese)
鲍根生, 王宏生, 曾辉. 有机硅助剂对“狼毒净”防除狼毒效果及草地植物群落多样性的影响[J]. 草业科学, 2015, 32(2): 263-268
- [27] Shen JY. Research Progress on pharmacological activity of *Stellera chamaejasme* L.[J]. Nei Mongol Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 36(8): 151-152 (in Chinese)
沈佳钰. 瑞香狼毒药理活性研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(8): 151-152
- [28] Liu WC. The biological study of *Stellera chamaejasme* (*Thymelaeaceae*)[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Normal University, 2010 (in Chinese)
刘文程. 瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme*)的生物学研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学硕士学位论文, 2010
- [29] Li XH, Xiang X, Tang XP, Jiang HC, Duan G, Chang H. Progress on *Stellera chamaejasme*[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2019, 40(4): 96-99 (in Chinese)
李晓惠, 项勋, 唐晓萍, 江华超, 段纲, 常华. 瑞香狼毒研究进展[J]. 动物医学进展, 2019, 40(4): 96-99
- [30] Sun MK, Sun XW, Tian J, Dong YD, Guo LC, Wang CL, Zhang M. A review of the application of high-throughput transcriptome sequencing technology in biology[J]. China Southern Agricultural Machinery, 2018, 49(19): 16-17 (in

- Chinese)
孙墨可, 孙晓文, 田娟, 董玉迪, 郭来春, 王春龙, 张曼. 综述高通量转录组测序技术在生物中的应用[J]. 南方农机, 2018, 49(19): 16-17
- [31] Xu PP, Li S, Jin DC, Wan YY. Mutation sites of SRAR-CoV-2 spike glycoprotein based on next-generation sequencing[J]. Journal of Microbiology, 2021, 41(1): 52-57 (in Chinese)
徐朋朋, 李爽, 金德才, 万云洋. 基于二代高通量测序技术的新型冠状病毒肺炎病毒 S 抗原突变点分析[J]. 微生物学杂志, 2021, 41(1): 52-57
- [32] Zhang Q, Guo SW, Su J, Yong YP, Yuan XL, Guo R. Bacterial diversity in sour porridge from Bayannur based on high-throughput sequencing[J]. China Brewing, 2020, 39(9): 101-105 (in Chinese)
张青, 郭淑文, 苏靖, 雍雅萍, 袁晓黎, 郭瑞. 基于高通量测序技术巴彦淖尔市酸粥中细菌多样性分析[J]. 中国酿造, 2020, 39(9): 101-105
- [33] Chen ZB, Dai FP, Cun LJ, Li Q, Chen YF, Xu SJ, Fang F, Huang Y. Research on separation optimization of endophytic bacteria in tobacco[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2014, 20(1): 90-95, 102 (in Chinese)
陈泽斌, 代方平, 寸林江, 李啟, 陈艳芳, 许石剑, 方飞, 黄杨. 烟草内生细菌分离方法的优化研究[J]. 中国烟草学报, 2014, 20(1): 90-95, 102
- [34] Jin H, Guo HR, Yang XY, Xin AY, Liu HY, Qin B. Effect of allelochemicals, soil enzyme activity and environmental factors from *Stellera chamaejasme* L. on rhizosphere bacterial communities in the northern Tibetan Plateau[J]. Archives of Agronomy and Soil Science, 2020: 1-14
- [35] Lu XB, Zhao Y, De J, Ge S, De J. Isolation and identification of bacteria from the rhizosphere soil of *Stellera chamaejasme* L. in Zhayeba Valley, Lhasa[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2016, 43(10): 95-99 (in Chinese)
卢许波, 赵阳, 德吉央金, 格桑卓玛, 德吉. 拉萨扎叶巴沟瑞香狼毒根际土壤细菌的分离与鉴定[J]. 广东农业科学, 2016, 43(10): 95-99
- [36] Yao X. Effects of *Achnatherum inebrians*-*Epichloë gansuensis* symbiont on plant composition and soil microbial community diversity in rangelands[D]. Lanzhou: Doctoral Dissertation of Lanzhou University, 2019 (in Chinese)
姚祥. 醉马草内生真菌共生体对草地植物组成及土壤微生物群落多样性的影响[D]. 兰州: 兰州大学博士学位论文, 2019
- [37] Wang H, Lu H, Guo YZ, Feng K, Geng PS, Zhao BY. Isolation and identification of endophytic fungi from *Stellera chamaejasme*[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2016, 47(8): 1696-1703 (in Chinese)
王欢, 路浩, 郭亚洲, 冯柯, 耿朋帅, 赵宝玉. 瑞香狼毒内生真菌的分离与鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(8): 1696-1703
- [38] Huang X, Li XZ, Chai Q, Li CJ. Effects of *Achnatherum inebrians*/*Neotyphodium* endophyte symbiont on microflora and nutrient of soil[J]. Pratacultural Science, 2013, 30(3): 352-356 (in Chinese)
黄玺, 李秀璋, 柴青, 李春杰. 醉马草内生真菌共生体对土壤微生物和养分的影响[J]. 草业科学, 2013, 30(3): 352-356
- [39] Zhang XB, Shi YW, Wang XX, Zhang W, Lou K. Isolation, identification and insecticidal activity of endophyte from *Achnatherum inebrians*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(4): 530-536 (in Chinese)
张雪兵, 史应武, 王晓霞, 张伟, 娄恺. 醉马草内生菌的分离、鉴定及杀虫效果[J]. 微生物学报, 2010, 50(4): 530-536
- [40] 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]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(8): E911-E920