

羌活种子不同休眠状态内生菌群落结构组成和差异性分析

马瑞丽^{1,2}, 胥生荣^{1,2*}, 张金晶¹

¹青海大学医学部;²青海省糖脂代谢疾病防控中医药重点实验室, 西宁 810008

摘要:为了探寻羌活种子不同休眠阶段内生菌的群落结构组成和差异性,利用 Illumina Miseq 平台分别对羌活种子不同休眠状态(形态生理双重休眠状态(GSA)、形态休眠解除状态(GSB)、生理休眠解除状态(GSC))细菌微生物 16S V5 + V7 区域和真菌微生物 ITS1-IF 区域的扩增片段进行高通量测序,结合生物信息学进行分析。内生细菌的多样性较内生真菌丰富。内生菌群落种类在门水平上类似;在属水平上,从 GSA 到 GSB 阶段,内生菌群落组成发生变化,从 GSB 到 GSC 阶段,内生菌群落种类相似。通过 Alpha 多样性分析发现,从 GSA 到 GSB 再到 GSC 阶段,内生细菌群落多样性显著增大后直到种子生理休眠解除变化不变,而内生真菌群落多样性在种子整个休眠解除过程中变化不大。内生细菌群落结构从 GSA 到 GSB 再到 GSC 阶段均发生了显著性变化,而内生真菌群落结构从 GSA 到 GSB 发生显著变化后直到种子生理休眠解除,群落结构变化不大。LEfSe 分析发现内生细菌共有 37 个差异丰富的分类学分支($\alpha = 0.01$, $LDA \geq 2.0$),内生真菌则无。本研究明确了羌活种子不同休眠状态内生菌群落结构组成和差异性,丰富了羌活种子内生菌资源信息,对进一步研究利用微生物方法促进羌活种子休眠解除技术具有一定的指导意义。

关键词:羌活;种子休眠;内生菌;群落结构

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)5-0805-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.5.010

Community composition and differential analysis of endophytic in different dormancy states of *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang seeds

MA Rui-li^{1,2}, XU Sheng-rong^{1,2*}, ZHANG Jin-jing¹

¹Medical College, Qinghai University; ²Qinghai Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Research for Glucolipid Metabolic Diseases, Xining 810008, China

Abstract: To seek the community composition and differential of endophytic bacteria and fungi in different dormancy states of *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang. seeds, the amplified fragments of 16S V5 + V7 region and ITS1-IF region in *N. incisum* seeds from different dormancy states [morphological and physiological dormancy state (GSA), morphological dormancy release state (GSB), physiological dormancy release state (GSC)] were sequenced by Illumina Miseq high-throughput sequencing technique, associating with bioinformatics assay to analyze. The results showed that the diversity of endophytic bacteria was higher than the fungi. The types of endophyte community composition were similar at the phylum level, but abundance exhibited significant difference in different dormancy states. The types of endophyte community composition were changed from GSA to GSB at the genus level, were similar from GSB to GSC and abundance exhibited significant difference. The community diversity of endophytic bacteria increased significantly from GSA to GSB, and then no significant difference to GSC by Alpha diversity analysis, the community diversity of endophytic fungi have no significant difference during the entire dormancy release process. The community structure of endophytic bacteria exhibited significant difference among GSA, GSB and GSC, the community structure of endophytic fungi changed significantly from GSA to GSB, and then no significant difference to GSC. LEfSe analysis showed that there are 37 differential taxonomic branches of endophytic bacteria ($\alpha = 0.01$, $LDA \geq 2.0$), but none for endophytic fungi. This study identified the community composition and differential of endophytic in different dormancy stages of *N. incisum* seeds, and enriched the resources of endophytic bacterial and fungi, have instructional significance

收稿日期:2023-09-22

接受日期:2024-03-13

基金项目:青海大学医学部中青年科研基金(2020-kyy-6);青海省科技厅青年基金(2024-ZJ-951)

* 通信作者 E-mail: xushengrong888@163.com

for further study using microbial methods to promote dormancy release of *N. incisum* seeds.

Key words: *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang; seed dormancy; endophytic; community structure

羌活 (*Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang) 为伞形科羌活属植物, 以其干燥的根茎入药, 是传统中藏药常用药材, 俗称黑药, 市场需求较大。目前羌活主要来源于野生资源, 其主要分布于四川、甘肃、青海等地海拔 3 000 ~ 4 500 m 的灌丛草甸区。近年来由于过度采挖, 对生态环境造成了极大的破坏, 并且野生羌活资源趋近于枯竭, 因此人工驯化栽培迫在眉睫。

羌活种子成熟落地时, 胚发育不完全, 常出现无胚或原形胚现象^[1], 具有形态和生理双重休眠特性, 属于深度休眠种子, 自然环境下羌活种子发芽率极低 (0.52%)^[2]。目前解除羌活种子休眠的有效方法是 GA + 变温沙藏法^[1], 首先用暖温沙藏法解除其形态休眠后, 须再经过低温沙藏处理解除其生理休眠后才种子才具备发芽能力, 种子处理时间长达 8 个月以上, 采用此方法处理羌活种子, 最高发芽率为 21.2%^[3]。加之羌活药材生长周期在 4 年以上, 因投资周期长、见效慢, 导致人工种植发展十分缓慢, 目前只有零星种植, 不能满足羌活市场的可持续发展需求。人工解除羌活种子休眠技术十余年来未得到突破性进展, 这是制约羌活大规模栽培的主要问题之一。

植物内生菌是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部的真菌或细菌, 与宿主植物在长期共处中形成了一种复杂、特殊的互利共生关系, 通过提高植物体内生长素和分裂素等代谢, 发挥其促进植物的细胞分裂、根系发育、幼苗生长的功能^[4]。种子的休眠受控于赤霉素类生长促进物和脱落酸类生长抑制物质间的平衡^[5]。研究发现内生菌能够通过调节或诱导合成植物内源激素调控种子的休眠, 这为研究种子中具促生功能内生菌资源挖掘提供了理论依据。普风雅等研究发现薏苡内生菌能提高薏苡、水稻、小麦种子的发芽率, 并通过诱导根系生长促进幼苗生长^[6]。雷瑞峰发现银砂槐种子内生菌通过调控种子代谢, 促进其种子萌发进程^[7]。向益青等研究发现黄连种子内生菌可显著提高黄连种子的发芽率^[8]。川椒 (*Capsicum annuum*)^[9]、水稻 (*Oryza sativa* L.)^[10]、铁皮石斛 (*Dendrobium catenatum*)^[11] 的内生菌均通过分泌 auxin、abscisic acid、cytokinin、gibber-

ellic acid 等植物内源激素类物质直接促进宿主植物的生长发育。分离自醉马草 (*Achnatherum inebrians*)^[12]、金钗石斛 (*Dendrobium nobile*)^[13]、黑麦草 (*Lolium rigidum*)^[14] 种子的内生菌和分离自多花黄精 (*Polygonatum multiflorum* L.) 根部的内生菌^[15] 均以分泌 cytokinin 等植物内源激素的方式调控种子的休眠, 显著提高其种子的发芽率和存活率。然而, 羌活种子内生菌是否能够通过促进其种胚的生长而发挥促休眠解除的作用? 基于此, 本实验以羌活种子为研究对象, 利用 Illumina MiSeq 免培养高通量测序技术研究羌活种子不同休眠状态内生菌群落结构组成和差异性, 为进一步研究利用微生物解除羌活种子休眠提供理论基础, 也为种子具有相似休眠特性植物的栽培提供重要理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料采集

供试材料于 2021 年 8 月采集于青海省互助县 (102°16'17''E, 36°80'06''N, 海拔 3 200 m)。经青海大学医学部杨仕兵老师鉴定为羌活 (*Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang) 种子。羌活种子成熟落地时处于形态生理双重休眠状态 (GSA), 需依次经过暖温沙藏处理达到形态休眠解除状态 (GSB), 再经过低温沙藏处理达到生理休眠解除状态 (GSC) 后才具备发芽能力。

1.1.1 暖温沙藏

本研究采用处于 GSA 状态的新鲜成熟种子, 人工气候箱 15 °C 进行暖温沙藏处理, 所用河沙高温灭菌, 整个过程河沙含水量控制在 10%。暖温沙藏阶段定期在显微镜下切片观察胚发育动态, 待胚率达到 80% 以上, 说明达到 GSB 状态。

1.1.2 低温沙藏

将 GSB 状态种子转入低温沙藏处理阶段, 整个过程放置在冰箱 4 °C (±1 °C), 每 20 d 取样置于 20 °C 环境下做发芽试验, 直到种子露白, 说明达到 GSC 状态。

1.1.3 样品采集

分别取 GSA、GSB、GSC 状态的种子共三份样品, 100 粒为 1 个重复, 每个休眠状态各取 6 个重复, 混匀后除去沙子, 用自来水洗涤, 无菌滤纸把表面水分吸干, 接着用 75% 乙醇 1 min, 2.5% 次氯酸

钠 3 min, 75% 乙醇 1 min 依次进行消毒处理。消毒后, 用无菌水冲洗 5 次, 接着用无菌滤纸将种子表面水分吸干, 放入 -80 °C 超低温冰箱中保存用于羌活种子内生菌高通量测序。

1.2 仪器与试剂

荧光定量 PCR 仪 (IQ5, Bio-Rad), 超低温冰箱 (ULTS1368, Thermo)。Fast DNA SPIN Kit for Soil DNA 提取试剂盒 (MP Biomedicals), 乙醇、次氯酸钠等其他化学试剂均为分析纯。

1.3 PCR 的提取和 DNA 的扩增

将准备好的种子分别用液氮研磨处理, 按照 DNA 提取试剂盒的指导说明书提取内生菌总 DNA。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的纯度和浓度, 以上述 DNA 目标序列为模板, 根据 16S V5 + V7 可变区和 ITS1-1F 的区域设计相应引物, 添加样本特异性 Barcode 序列对 rDNA 基因可变区或特定基因片段放大扩增的过程为 PCR 扩增, PCR 扩增中核糖体基因可变区可反应内生菌菌落组成和多样性。其中分别对细菌 16S V5 + V7 区引物 799F (5'-AACMGGATTAGATACCKG-3') 和 1193R (5'-ACGTCATCCCCACCTTCC-3'), 真菌 ITS1-1F 引物 ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS2 (5'-GCTGCGTTCATCGATGC-3') 进行 PCR 扩增^[15]。根据 PCR 产物浓度进行等量混样后使用 1 × TAE 2% 浓度的琼脂糖凝胶电泳纯化产物, 对目的条带使用 Universal DNA (TianGen, China) 纯化回收试剂盒进行回收。最后对每个纯化后的 PCR 扩增样品分别做三个重复, 分三份 GSA、GSB、GSC 等量送至深圳微科盟科技集团有限公司进行测序。使用 NEB Next[®] Ultra DNA Library Prep Kit 建库, 使用安捷伦 5400 进行检测和 Q-PCR 定量; 构建好的文库经过定量和文库检测合格后, 使用 NovaSeq 6000 进行上机测序。

1.4 数据处理与分析

用 Qiime tools import 将原始序列文件导入为可进行 Qiime2 后续处理的文件格式。运用 Qiime2 软件中的 Dada2 插件进行质控、修剪、去噪、拼接, 以及去除嵌合体后, 得到了最终的操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs) 特征序列表格。再使用 Qiime2 feature-classifier 插件将 ASV 的代表序列 (修剪至 16S rDNA 的 V5 ~ V7 区域或者 ITS1 可变区) 比对到预先训练好的具有 99% 相似度的 Greengenes 数据库得到羌活种子内生细菌和内生真菌物种

Venn 图和稀释曲线, 使用 Qiime2 diversity 插件计算特征序列 Alpha 多样性指数、Beta 多样性指数和主成分分析 (principal component analysis, PCoA)。基于绝对丰度表 (所有值加 1), 运用 Qiime2 composition ancom 命令, 用 Ancom 法分析组间微生物丰度的差异性。基于丰度表, 使用 LEfSe 分析羌活种子不同休眠阶段的特征内生菌。

2 结果分析

2.1 Illumina Miseq 测序数据分析

通过高通量测序, 羌活种子不同休眠状态 GSA、GSB、GSC 内生细菌分别测到 81 669、8 5 489、86 526 条原始序列, 再通过去除引物接头序列、质控、修剪、去噪、拼接、去嵌合体后, 分别测到内生细菌 71 655、73 743、76 387 条有效的高质量序列用于后续构建 OTUs 并获得注释信息; GSA、GSB、GSC 3 个样品内生真菌分别测到 81 719、62 921、61 455 条原始序列, 再通过去除引物接头序列、质控、修剪、去噪、拼接、去嵌合体后, 分别测到内生真菌 31 478、39 735、38 950 条有效的高质量序列用于后续构建 OTUs 并获得注释信息。为了保证实验结果的均一性, 对这些有效序列按最少序列数目进行抽平处理。

稀释曲线能够反映样品的取样深度, 用来评价测序量是否足以覆盖所有类群。基于 OTUs 的羌活种子不同休眠状态 GSA、GSB、GSC 3 个样品内生菌的稀释曲线如图 1 所示, 随着测序数量的增加, 稀释曲线趋于平坦, 且 3 个样品均已进入平台期, 说明测序数据量合理, 内生菌群落结构的置信度高, 能够客观反映羌活种子 3 个不同休眠状态中内生菌群落结构信息。

2.2 物种组成分析

在 97% 的相似性水平下, 以 OTUs 水平构建 Venn 图, 能够直观展示样本中共有和独有 OTUs 的数目, 从而反映样本间 OTUs 组成差异性和亲缘关系的差异。从图 2 可知, 羌活种子在不同休眠状态内生细菌的 OTUs 数目在 258 ~ 970 之间, 内生真菌的 OTUs 数目在 163 ~ 284 之间, 可见内生细菌的 OTUs 数目远大于内生真菌, 说明羌活种子内生细菌多样性较内生真菌丰富。

三个样本共有内生细菌 OTUs 61 个, 占比较低, GSA、GSB、GSC 特有内生细菌 OTUs 分别为 149、532、648 个, 占比为 57.75%、59.24%、66.80%, 说明 GSB 和 GSC 内生细菌的多样性与丰富度较 GSA 相比较; GSA 和 GSB 共有的 OTUs 数为 107, GSB

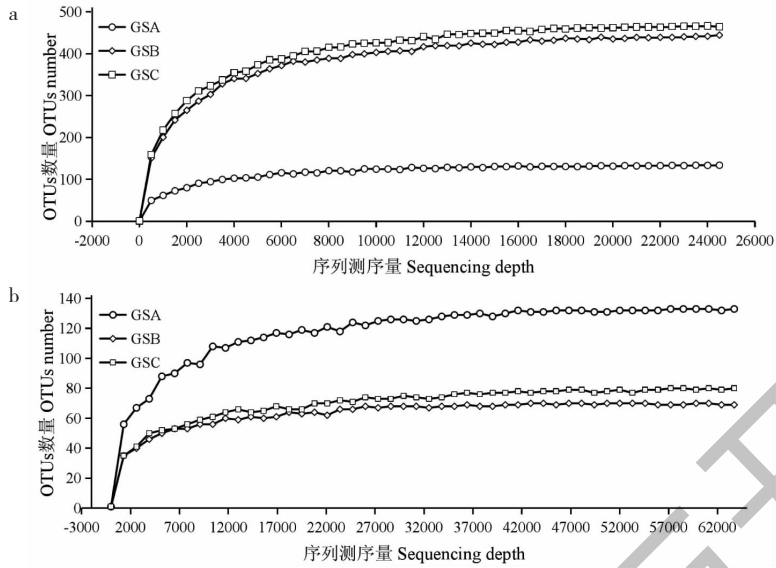


图1 基于 OTUs 水平羌活种子内生细菌 (a) 和真菌 (b) 稀释性曲线图

Fig. 1 Dilutability curve of bacterial (a) and fungi (b) endophyte in *N. incisum* seeds based on OTUs level

和 GSC 共有的 OTUs 数为 320, GSA 和 GSC 共有的 OTUs 数为 63 (见图 2a), 说明 GSB 和 GSC 内生细菌的亲缘关系较 GSA 相比相对较近。

三个样本共有内生真菌 OTUs 24 个, 占比较低, GSA、GSB、GSC 特有内生真菌 OTUs 分别为 218、88、115 个, 占比为 76.76%、53.99%、63.19%, 说明 GSA 内生真菌的多样性与丰富度较 GSB、GSC 相比

较高; GSA 和 GSB 共有的 OTUs 数为 49, GSB 和 GSC 共有的 OTUs 数为 50, GSA 和 GSC 共有的 OTUs 数为 41 (见图 2b), 说明 GSA、GSB、GSC 内生真菌的亲缘关系相对较近。

结果表明羌活种子在不同休眠阶段, 内生菌群体组成差异明显。这可能是羌活种子长期在不同温度沙藏处理下所形成了微生物特有的偏好性所致。

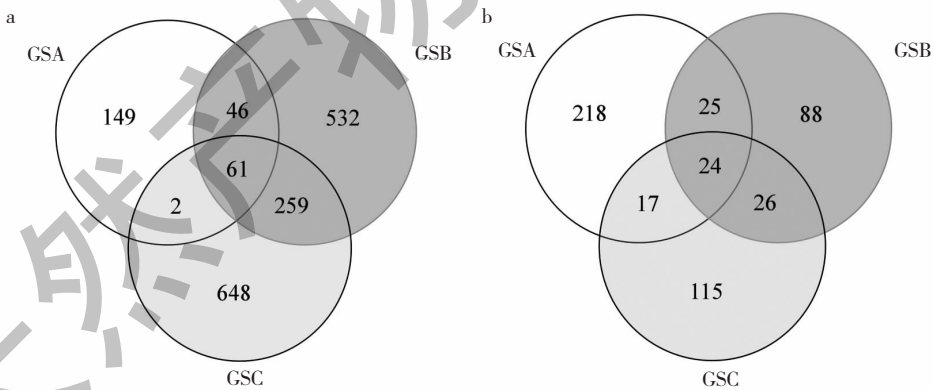


图2 羌活种子内生细菌 (a) 和真菌 (b) 群落 OTUs 分布 Venn 图

Fig. 2 Venn diagram of OTUs distribution of bacterial (a) and fungi (b) endophytes communities in *N. incisum* seeds

2.3 内生菌群落结构组成分析

将样本的 OTUs 代表序列与 SILVA 数据库进行比对, 绘制出样本在各分类水平上的柱状丰度图, 能够比较直观地分析出样本间物种构成及比例。为明确不同休眠状态羌活种子内生细菌和内生真菌的群落结构, 对其门和属水平进行分析。

在门水平 (见图 3a、4a), GSA 内生细菌主要由变形菌门 Proteobacteria (97.08%) 组成, 其次是有少量的放线菌门 Actinobacteria (1.80%)、厚壁菌门 Firmicutes (1.08%) 等。GSB 内生细菌主要由变形菌门 Proteobacteria (59.74%)、放线菌门 Actinobacteria (37.13%) 组成, 其次是有少量的厚壁菌门 Fir-

micutes(1.53%)等。GSC 状态内生细菌主要由变形菌门 Proteobacteria (68.24%) 和放线菌门 Ac-

tinobacteria(26.73%)组成,其次是有少量的厚壁菌门 Firmicutes(0.90%)和类杆菌门 Bacteroidetes(2.01%)。

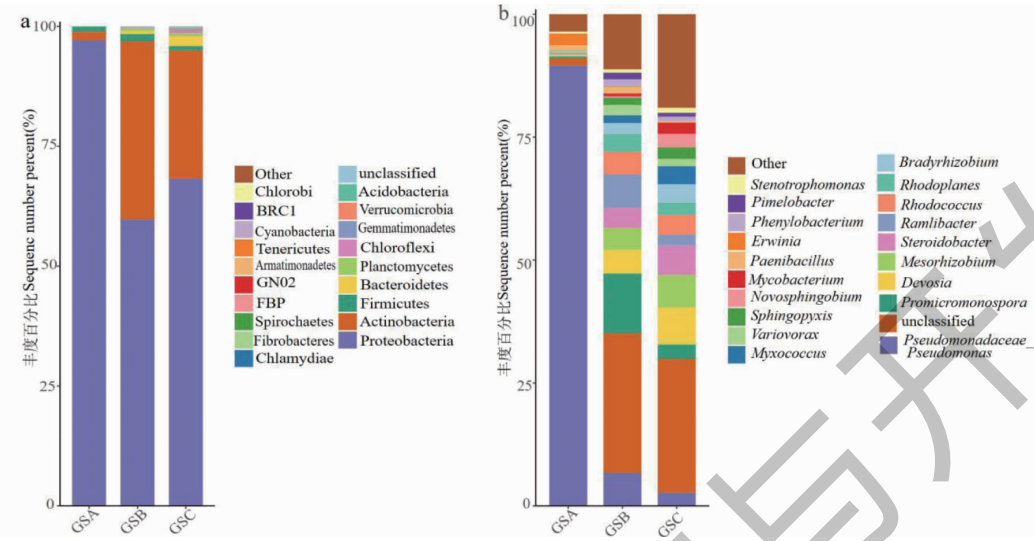


图3 羌活种子内生细菌门水平(a)和属水平(b)相对丰度分布

Fig. 3 Relative abundance of endophytes bacterial in *N. incisum* seeds at phylum (a) and genus level (b)

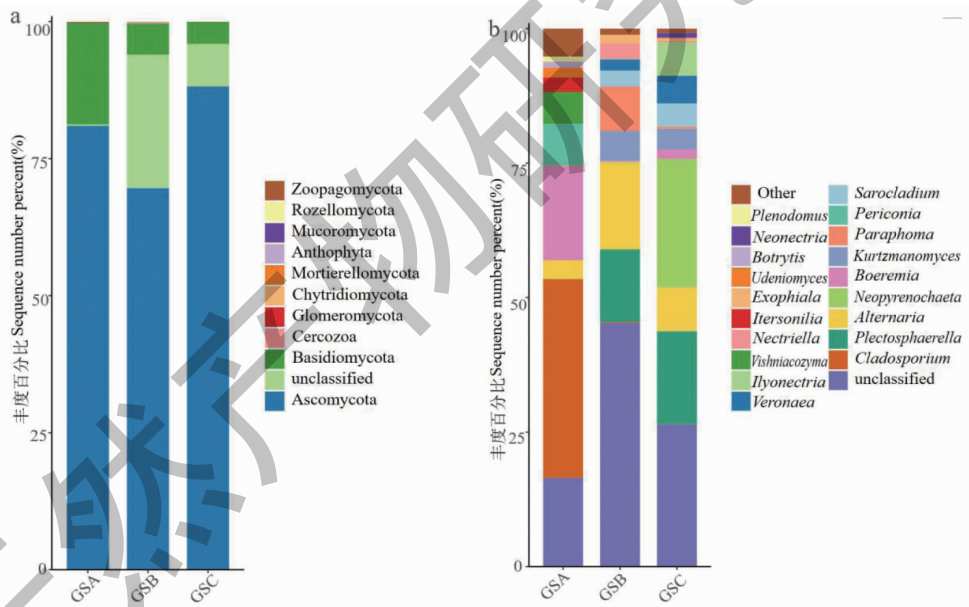


图4 羌活种子内生真菌门水平(a)和属水平(b)相对丰度分布

Fig. 4 Relative abundance of endophytes fungi in *N. incisum* seeds at phylum (a) and genus level (b)

GSA 内生真菌主要由子囊菌门 Ascomycota (80.98%) 和担子菌门 Basidiomycota (18.58%) 组成。GSB 内生真菌主要由子囊菌门 Ascomycota (69.63%)、未知菌(24.33%)和少量的担子菌门 Basidiomycota (5.71%) 组成。GSC 内生真菌主要由子囊菌门 Ascomycota (88.19%) 组成,其次是有少量的未知菌(7.74%)和担子菌门 Basidiomycota

(4.02%)。说明在门水平,羌活种子不同休眠状态的内生菌群落种类相似,但丰度存在差异。

在属水平(见图3 b、4 b),检测到 GSA 优势内生细菌属主要为科假单胞菌属 *Pseudomonadaceae-Pseudomonas* (89.56%) 和少量的未知菌(1.49%) 组成。GSB 内生细菌属主要由未知菌(28.39%)、原小单胞菌属 *Promicromonospora* (12.11%)、*Ramli-*

bacter (6.83%)、科假单胞菌属 *Pseudomonadaceae-Pseudomonas* (6.75%)、的沃斯菌属 *Devosia* (4.84%)、红球菌属 *Rhodococcus* (4.59%)、中慢生根瘤菌属 *Mesorhizobium* (4.41%)、*Steroidobacter* (4.08%)、红游动菌属 *Rhodoplanes* (3.64%)、慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium* (2.21%)、贪食菌属 *Variovorax* (2.09%) 和少量的粘球菌属 *Myxococcus* (1.59%)、鞘脂单胞菌属 *Sphingopyxis* (1.45%)、类芽孢杆菌属 *Paenibacillus* (1.28%)、苯基杆菌属 *Phenylbacterium* (1.47%)、脂肪杆菌属 *Pimelobacter* (1.34%) 等组成。GSC 内生细菌菌属主要由未知菌 (27.26%)、的沃斯菌属 *Devosia* (7.54%)、中慢生根瘤菌属 *Mesorhizobium* (6.63%)、*Steroidobacter* (5.99%)、红球菌属 *Rhodococcus* (4.00%)、慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium* (3.70%)、粘球菌属 *Myxococcus* (3.69%)、原小单胞菌属 *Promicromonospora* (2.87%)、新鞘脂菌属 *Novosphingobium* (2.77%)、科假单胞菌属 *Pseudomonadaceae - Pseudomonas* (2.67%)、分枝杆菌属 *Mycobacterium* (2.26%)、红游动菌属 *Rhodoplanes* (2.55%)、鞘脂单胞菌属 *Sphingopyxis* (2.33%) *Ramlibacter* (2.19%) 和少量的贪食菌属 *Variovorax* (1.49%)、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas* (1.04%) 等组成。

GSA 内生真菌主要由未知菌属 (16.49%)、*Boeremia* (17.46%)、枝孢属 *Cladosporium* (36.95%)、链格孢菌 *Alternaria* (3.49%)、黑团孢霉属 *Periconia* (7.73%)、*Vishniacozyma* (5.94%)、锁霉

属 *Itersonilia* (2.71%) 和少量的 *Udeniomyces* (1.80%)、葡萄孢属 *Botrytis* (1.16%) 等组成。GSB 内生真菌主要由未知菌属 (45.35%)、*Plectosphaerella* (13.44%)、链格孢菌 *Alternaria* (16.15%)、克氏担孢酵母属 *Kurtzmanomyces* (5.50%)、*Paraphoma* (8.22%)、帚枝霉属 *Sarocladium* (2.97%)、维朗那霉属 *Veronaea* (2.08%)、小赤壳属 *Nectriella* (2.89%) 和少量的外瓶霉属 *Exophiala* (1.56%) 等组成。GSC 内生真菌主要由未知菌属 (26.48%)、*Plectosphaerella* (17.21%)、链格孢菌 *Alternaria* (8.13%)、*Neopyrenochaeta* (23.88%)、*Boeremia* (1.79%)、克氏担孢酵母属 *Kurtzmanomyces* (3.87%)、帚枝霉属 *Sarocladium* (4.31%)、维朗那霉属 *Veronaea* (5.15%)、*Ilyonectria* (6.23%) 等组成。说明在属水平, GSA 与 GSB 和 GSC 内生细菌和真菌群落种类均存在差异, 而 GSB 与 GSC 之间内生菌群落种类相似, 丰度存在差异。

2.4 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性分析用于评估样本之间物种多样性和丰富度。基于 OTUs 丰度, 用 Shannon 多样性指数分析羌活种子不同休眠状态的微生物多样性 (见图 5), 发现三组样本多样性存在一定差异。GSB 和 GSC 的内生细菌多样性指数显著高于 GSA ($P \leq 0.05$) (见图 5a), 而 3 组样品的内生真菌无显著差异 ($P > 0.05$) (见图 5b)。由此推测出 GSB 和 GSC 的内生细菌多样性较高且与 GSA 相比具有明显的差异性, 而三组样本内生真菌的多样性无显著性差异。

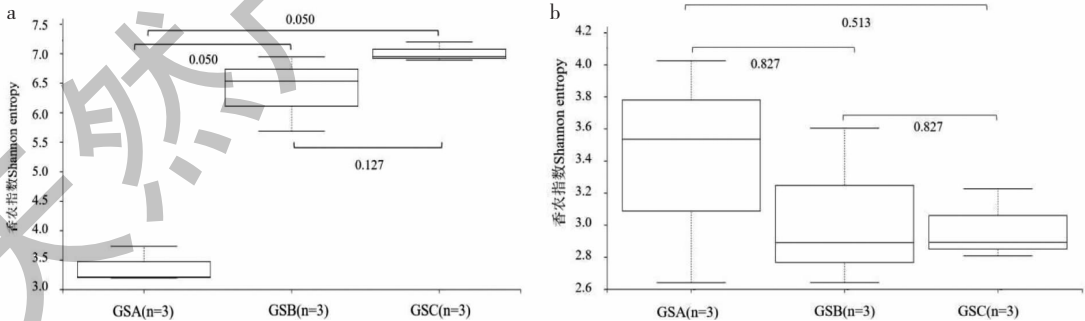


图 5 羌活种子内生细菌 (a) 和真菌 (b) 群落 Alpha 多样性评价

Fig. 5 Alpha diversity estimates of bacterial (a) and fungi (b) endophytes communities in *N. incisum* seeds

2.5 Beta 多样性 PCoA 分析

Beta 多样性基于 Bray Curtis 距离、Weighted Unifrac 距离和 Unweighted Unifrac 距离来进行 PCoA 分析, 被用于评估样本之间的微生物群落结构差异

性。选取贡献率最大的主坐标组合进行作图展示, 图中样本的距离越接近, 表示样品的物种组成结构越相似。通过 Bray-Curtis 法计算样本间的差异性, 对不同休眠状态的羌活种子内生菌群落组成进行基

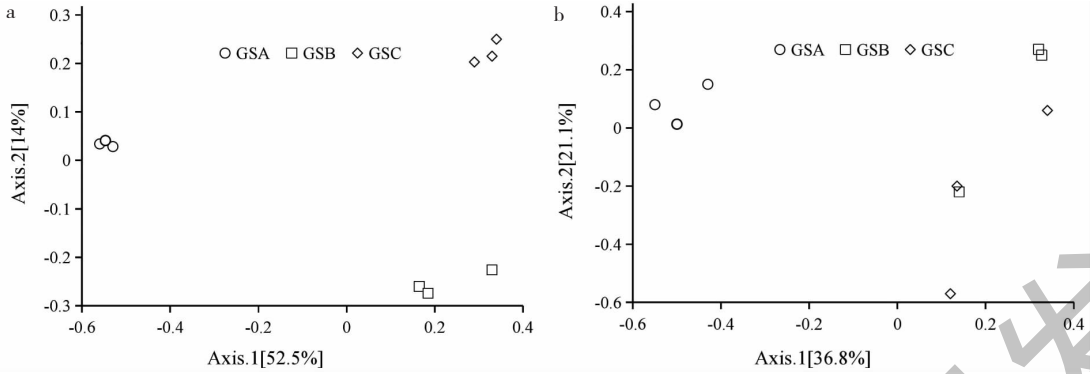


图6 羌活种子内生细菌(a)和真菌(b)群落PCoA分析

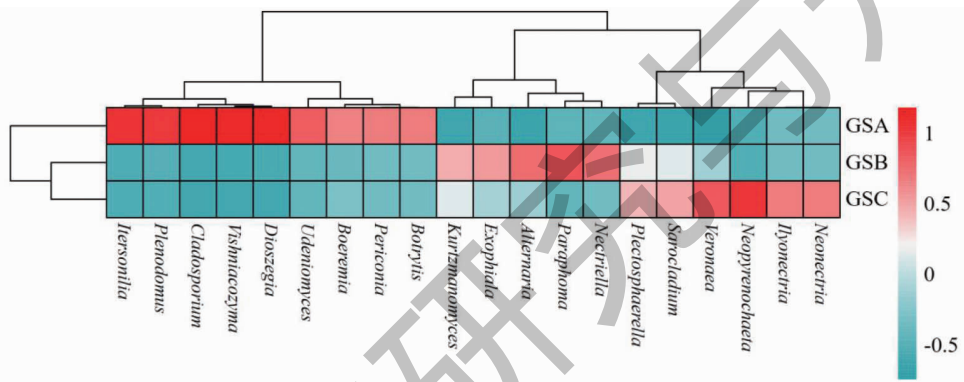
Fig. 6 PCoA analysis of bacterial (a) and fungi (b) endophytes communities in *N. incisum* seeds

图7 羌活种子内生真菌聚类分析

Fig. 7 Cluster analysis of endophytes fungi in *N. incisum* seeds

于 OTUs 水平的 PCoA 分析(见图 6)。由图 6-a 可知,第 1 主成分 Axis1 和第 2 主成分 Axis2 对样品的贡献率分别为 52.5% 和 21.4%,三个样品间分散程度高,表明羌活种子在不同休眠状态内生细菌群落结构具有显著性差异。由图 6b 可知,第 1 主成分 Axis1 和第 2 主成分 Axis2 对样品的贡献率分别为 36.8% 和 21.1%,GSA 与 GSB 和 GSC 分散程度较高,GSB 与 GSC 较集中,说明内生真菌群落结构 GSA 与 GSB 和 GSC 之间具有显著性差异,GSB 与 GSC 之间差异不显著。在 R 的 vegan package 的分析下基于 OTUs 的样本所做的聚类树图显示同样的结果,如图 7 所示,将羌活种子不同休眠状态 GSA、GSB、GSC 的内生真菌序列进行比对分析,结果发现 GSB 和 GSC 聚为一枝,相对距离较近,GSA 单独为一枝,说明 GSB 与 GSC 的内生真菌亲缘关系相对较近且与 GSA 的亲缘关系相对较远,进一步验证了 GSA 与 GSB 和 GSC 之间的内生真菌群落结构具有显著性差异,GSB 与 GSC 之间差异不显著。

2.6 内生菌群落 LEfSe 分析

LEfSe 方法基于相对丰度表,是非参数检验和线性判别分析的结合,适合菌群丰度差异检验,LEfSe 寻找每一个分组的特征微生物(LDA > 阈值的微生物),也就是相对于其他分组,在这个组中丰度较高的微生物。由图可以推断在分组间有显著差异的微生物的进化关系。每一横向柱形体代表一个物种,柱形体的长度对应 LDA 值,LDA 值越高则差异越大。图 8 为不同休眠阶段羌活种子内生菌在属水平上的 LEfSe 分析,内生细菌共有 37 个差异丰富的分类学分支($\alpha = 0.01, LDA \geq 2.0$),内生真菌则无。如图所示,GSA 显著高于其他时期的内生细菌菌属有 2 个,分别为欧文氏菌属 *Erwinia*、假单胞菌属 *Pseudomonas*。GSB 显著高于其他时期的内生细菌菌属有 2 个,分别为红游动菌属 *Rhodoplanes*、*Cattellatospora* 属。GSC 显著高于其他时期的内生细菌菌属有 11 个,分别为的沃斯菌属 *Devosia*、*Steroidobacter* 属、慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium*、粘球菌属

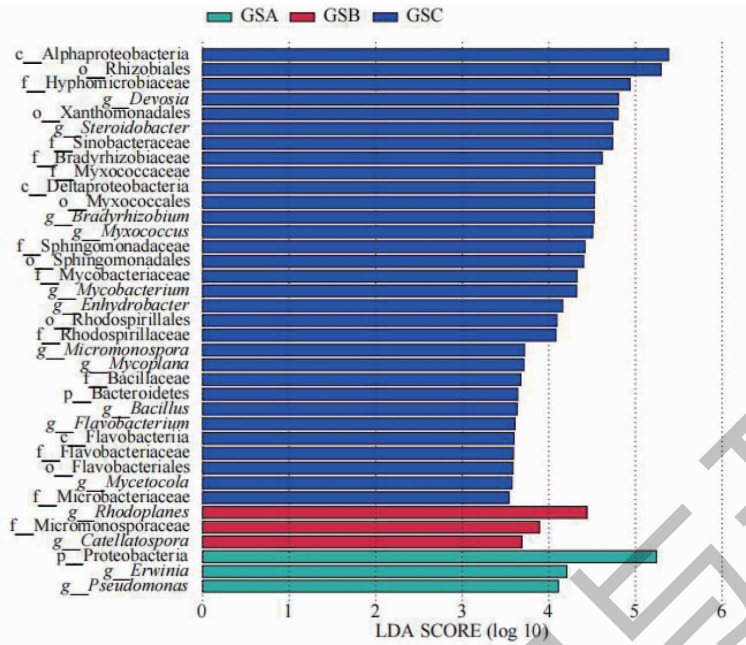


图8 羌活种子内生细菌 LEfSe 分析图

Fig. 8 LEfSe analysis of endophytes bacterial in *N. incisum* seeds

Myxococcus、分枝杆菌属 *Mycobacterium*、水栖菌属 *Enhydrobacter*、小单孢菌属 *Micromonospora*、支动菌属 *Mycoplana*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、黄杆菌属 *Flavobacterium*、*Mycetocola* 属。

3 讨论与结论

种子作为植物重要的繁殖器官,能够作为微生物从母本植物到下一代植物的传播介质,通过垂直传播的方式将有益微生物代代相传,进而发挥促种子萌发和幼苗生长的作用^[15,16]。水稻和玉米等禾本科植物种子内生菌对其种子萌发、幼苗生长发育及宿主植物的生长具有重要作用^[17]。金钗石斛 (*Dendrobium nobile* Lindl.) 种子存在后熟现象,且缺乏胚乳组织,需与微生物共生才能萌发,其优势内生细菌主要为变形菌门和蓝细菌门^[18]。本研究发现,羌活种子在三个不同休眠状态,内生菌群落种类在门水平上类似,其中内生细菌主要由变形菌门、放线菌门、厚壁菌门组成,这与其他植物种子的优势内生细菌门一致^[19],而与金钗石斛种子相比,其优势内生细菌门具有差异性。植物分泌物类型以及微生物在植物组织中定殖、存活并传播给种子的能力不同,不同植物种子内生菌存在差异。因为种子内生菌来自不同植物器官或分生组织,通过微管连接或配子,转移、定殖于种子胚和胚乳,并垂直传播^[20]。药用植物羌活和金钗石斛种子均因具有休眠特性而发芽困难,但研究发现两者优势内生细菌门具有差异性,

这可能是由于其内生菌来源不同所致,因为羌活种子是因为胚未发育完全而导致的休眠,其内生菌主要来源于胚乳,而金钗石斛种子是因为无胚乳而导致的休眠,其内生菌主要来源于胚,因此两者的内生菌种类在门水平存在差异,推测羌活种子也需与微生物共生才能萌发。羌活种子在 GSC 状态出现了少量的内生细菌门类杆菌门(2.01%),在 GSB、GSC 状态分别出现了内生真菌门的未知菌 24.33%、7.74%,这些内生菌对促进种子胚生长而发挥解除种子休眠的作用可能具有重要贡献,是今后研究的重点。内生真菌在许多植物的种子中都有较高的丰度和多样性^[21]。羌活种子内生真菌主要由子囊菌门和担子菌门组成,这与菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 种子^[22]、金钗石斛种子^[18] 中优势内生真菌保持一致。

在属水平上,从 GSA 到 GSB 状态,内生菌群落组成发生变化,从 GSB 到 GSC,内生菌群落种类相似。通过 Alpha 多样性分析发现,GSA 内生细菌多样性显著低于 GSB 和 GSC,而 GSB 于 GSC 内生细菌多样性差异不显著,主要原因可能是由于在 GSA 状态,变形菌门占绝对优势,比例达 97.08%,从而抑制其他细菌生长,而 GSB 和 GSC 状态种子长期处于相对缺氧环境,进而导致微生物竞争相对较小,微生物之间不存在明显的抑制作用,进而多样性指数高于 GSA 状态。内生真菌群落多样性在种子整个休眠解除过程中无显著性差异。通过 Beta 多样性

PCoA 分析发现,内生细菌群落结构从 GSA 到 GSB 再到 GSC 状态发生了显著性变化,而内生真菌群落结构从 GSA 到 GSB 发生显著变化后直到种子生理休眠解除,群落结构变化不大。羌活种子成熟落地,经过长时间的暖温层积和低温层积处理后才具备发芽能力,期间其种子内生菌群落结构发生改变,说明这是羌活种子具备发芽能力的主要影响因素之一,其作用机制有待进一步研究。

植物种子内生菌的作用尚未阐明,但已有大量研究表明种子内生菌对宿主植物及种子具有调控作用。黑麦草内生菌可产生细胞分裂素,并与植物产生的植物激素相互作用,从而调控种子的休眠^[23]。种子内生菌还能通过产生植物激素或促进植物营养吸收,特别是氮、磷等的获得而促进植物生长^[24]。本研究进一步分析了 GSA、GSB、GSC 在属水平的特征微生物,内生细菌共 15 种,内生真菌无特征微生物,这些微生物在各自的休眠阶段相对于其他休眠阶段,丰度是较高的微生物,可能对羌活种子形态休眠的解除和生理休眠的解除具有重要作用,是今后研究的重点微生物群体。其中 GSA 状态优势菌属为欧文氏菌属、假单胞菌属,假单胞菌属参与许多果蔬的腐败过程,约有 50%~90% 的腐败菌为假单胞菌属细菌,欧文氏菌属分泌的果胶酸裂解酶和果胶甲基半乳糖醛酸酶在协同作用下具有软化植物组织的作用,可降解植物细胞壁上的果胶,从而发生软化腐败^[25],本研究结果说明新鲜收货的羌活种子必须要及时进行沙藏处理以防发生腐败现象而影响种子发芽。黄志远等^[26]研究发现,石竹(*Phyllostachys nuda*)笋在贮存过程中,欧文氏菌属相对丰度随贮存温度升高而降低,本研究发现新鲜收货的羌活种子经过暖温处理(15℃)后其丰度显著降低,这与前人研究结果一致,可能与种子经过暖温沙藏处理,胚乳被出现的优势菌属大量分解后产生能量供种胚发育从而间接地抑制了其生长有关。羌活种子成熟落地时种胚未发育,需经过长达 8 个月的暖温沙藏而解除其形态休眠,这与胚乳中存在难以生物降解的发芽抑制物有关。红游动菌属具有脱氮作用,是具有降解有机物及一些难以生物降解的含氮化合物的功能菌^[27]。本研究发现在 GSB 状态,优势内生细菌为红游动菌属和 *Catellatospora* 属,其可能发挥对发芽抑制物的降解作用而促进种胚生长有关,是今后研究的重点菌群。GSC 状态优势菌属为德沃斯菌属、*Steroidobacter* 属、慢生根瘤菌属、粘球菌属、分枝杆菌属、水栖菌属、小单孢菌属、支动菌属、芽孢杆菌

属、黄杆菌属和 *Mycetocola* 属。研究发现德沃斯菌属为固氮菌^[28];慢生根瘤菌属有溶无机磷酸盐的能力,可提高植物光合作用色素含量^[29]; *Mycetocola* 属菌株最初发现地为米堆冰川,为耐寒微生物^[30]。羌活种子经过暖温沙藏解除形态休眠后不具备发芽能力,必须经过低温沙藏处理后才具备发芽能力,推测其形态休眠解除后,胚乳消耗殆尽无法满足胚芽和胚根的进一步生长所需的能量,形态休眠解除阶段积累的红游动菌属微生物降解含氮发芽抑制物的氮素产物无法被种胚直接吸收,必须通过固氮微生物转换为植物可吸收的氮素后才能促进胚芽生长和胚根突破种皮,推测固氮微生物需与 *Mycetocola* 属微生物协同才能正常生长,而 *Mycetocola* 属微生物只能在低温环境下正常生长,因此羌活种子形态休眠解除后必须经过一段时间的低温处理后胚根才能突破种皮,种子具备发芽能力。推测 GSC 状态种胚中的特征微生物慢生根瘤菌属细菌能够增加胚芽中的光合色素含量,为胚芽的光合作用作准备。

由于羌活种子成熟落地时为原型胚或无胚,人工栽培中育苗时种胚生长十分缓慢,导致羌活种子萌发时间长,萌发过程困难,自然状态下长达 11 个月才能萌发,亟需从微生物的角度出发寻找到促进其种胚生长以解除其形态生理休眠的微生物,为羌活的人工栽培发展提供有力保障。本实验通过免培养高通量测序方法,对羌活种子不同休眠状态内生细菌和内生真菌的群落结构组成和差异性进行了深入研究,分析出了各休眠状态的特征微生物,本论文为利用微生物方法解除羌活种子休眠提供了新思路,填补了微生物促种子休眠解除研究领域的空白,为进一步利用这些潜在具有促休眠解除作用的内生菌资源提高羌活种子萌发率,促进其人工栽培规范化发展奠定了基础,且有望为采用微生物方法如工程菌株或微生物制剂等快速解除种子休眠的技术提供理论指导。

参考文献

- 1 Zhang EH, Chen XL, Fang ZS, et al. Studies on seed dormancy mechanism and breaking technique of wild *Notopterygium incisum* [J]. Acta Agr Sin (草地学报), 2007, 15: 509-514.
- 2 Gyanesh C, Briani M. Revised Landsat-5 TM radiometric calibration procedures and postcalibration dynamic ranges [J]. IEEE T Geosci Remote, 2003, 41: 2674-2677.
- 3 Ju X, Li ZR. Seed Characteristics and Germination Rate of Incised *Notopterygium* [J]. Ningxia J Agr Forestry Sci Technol (宁夏农林科技), 2013, 54: 21-22.

- 4 Zou WX, Tan RX. Recent advances on endophyte research [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2001, 43:881-892.
- 5 Stone JK, Bacon CW, White JF. Microbial endophytes: an overview of endophytic microbes: endophytism defined [M]. New York: Marcel Dekker, 2000:3-29.
- 6 Pu FY, Gu SJ, He YH, et al. Growth-promoting characteristics of two coix endophytes and their effects on seed germination [J]. *Jiangsu Agrl Sci* (江苏农业科学), 2022, 50:115-122.
- 7 Lei RF. Effects of AER314-4 strain inoculation on endophytic diversity during seed germination of *Ammodendron bifolium* [D]. Urumqi: Xinjiang Normal University (新疆师范大学), 2022.
- 8 Xiang YQ, Liao HL, Li N, et al. Isolation, identification and functional verification of bacteria from seeds of *Coptis chinensis* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2023, 35:191-199.
- 9 Khan AL, Waqas M, Lee IJ. Resilience of *Penicillium resedanum* LK6 and exogenous gibberellin in improving *Capsicum annuum* growth under abiotic stresses [J]. *J Plant Res*, 2015, 128:259-268.
- 10 Krishnamoorthy A, Agarwal T, Kotamreddy JNR, et al. Impact of seed-transmitted endophytic bacteria on intra-and inter-cultivar plant growth promotion modulated by certain sets of metabolites in rice crop [J]. *Microbiol Res*, 2020, 241:126582.
- 11 Wang XM, Yam TW, Meng QW, et al. The dual inoculation of endophytic fungi and bacteria promotes seedlings growth in *Dendrobium catenatum* (Orchidaceae) under *in vitro* culture conditions [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2016, 126:523-531.
- 12 Ahwad RZ, Khalid R, Aqeel M, et al. Fungal endophytes trigger *Achnatherum inebrians* germination ability against environmental stresses [J]. *S Afr J Bot*, 2020, 134:230-236.
- 13 Yang LC, Wu QS, Gao Y, et al. Analysis of composition of endophytic community of *Dendrobium nobile* Lindl. seeds based on high-throughput sequencing [J]. *Seed* (种子), 2020, 39:94-98.
- 14 Goggin DE, Emery RJN, Kurepin LV, et al. A potential role for endogenous microflora in dormancy release, cytokin metabolism and the response to fluridone in *Lolium rigidum* seeds [J]. *Ann Bot-London*, 2015, 115:293-301.
- 15 Gong WF, Sun Y, Wang RQ, et al. Isolation of endophytes from rape seeds in Tibet and screening of antagonistic bacteria with multiple plant growth promoting traits [J]. *J Plant Prot* (植物保护学报), 2022, 49:1053-1062.
- 16 Chen ST, Dai J, Jiang XP, et al. Diversity and difference of endophytes in *Dendrobium huoshanense* with different growth years [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2019, 44:1145-1150.
- 17 Verma SK, Kingsley K, Irizarryl, et al. Seed-vectored endophytic bacteria modulate development of rice seedlings [J]. *J Appl Microbiol*, 2017, 122:1680-1691.
- 18 Yang LC, Wu QS, Gao Y, et al. Analysis of composition of endophytic community of *Dendrobium nobile* Lindl. seeds based on high-throughput sequencing [J]. *Seed* (种子), 2020, 39:94-98.
- 19 Xia AN, Liu J, Kang DC, et al. Assessment of endophytic bacterial diversity in rose by high throughput sequencing analysis [J]. *PLoS One*, 2020, 15:e0230924.
- 20 Truyens S, Weyens N, Cuypers A, et al. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants [J]. *Env Microbiol Rep*, 2015, 7:40-50.
- 21 Pradhan J, Tayung K. Seeds endophytic fungi of some plant species and their potential for producing indole acetic acid (IAA) [J]. *Res J Life Sci Bio Pharm Chem Sci*, 2019, 5:505-513.
- 22 Parsa S, Garcia-Lemos AM, Castillo K, et al. Fungal endophytes in germinated seeds of the common bean, *Phaseolus vulgaris* [J]. *Fungal Biol-UK*, 2016, 120:783-790.
- 23 Goggin DE, Emery RJN, Kurepin LV, et al. A potential role for endogenous microflora in dormancy release, cytokinin metabolism and the response to fluridone in *Lolium rigidum* seeds [J]. *Ann Bot-London*, 2015, 115:293-301.
- 24 Pal G, Kumar K, Verma A, et al. Seed inhabiting bacterial endophytes of maize promote seedling establishment and provide protection against fungal disease [J]. *Microbiol Res*, 2022, 255:126926.
- 25 Pinto L, Ippolito A, Baruzzi F. Control of spoiler *Pseudomonas* spp. on fresh cut vegetables by neutral electrolyzed water [J]. *Food Microbiol*, 2015, 50:102-108.
- 26 Huang Z, Mao C, Wang Z, et al. Effect of storage temperature on the diversity of endophytic bacteria in *Phyllostachys nuda* shoots [J]. *J Bamboo Res* (竹子学报), 2023, 42:48-55.
- 27 Chen C, Zhang H, Wang Y, et al. Characteristics of microbial community in each compartment of ABR ANAMMOX reactor based on high-throughput sequencing [J]. *Environ Sci* (环境科学), 2016, 37:2652-2658.
- 28 Oh Y, Ron D. *Phenylobacterium muchangponense* sp. nov., isolated from beach soil, and emended description of the genus *Phenylobacterium* [J]. *Int J Syst Evol Micr*, 2012, 62:977-983.
- 29 Effect of Cd-tolerant plant growth-promoting rhizobium on plant growth and Cd uptake by *Lolium multiflorum* Lam. and *Glycine max* (L.) Merr. in Cd-contaminated soil [J]. *Plant Soil*, 2014, 375:205-214.
- 30 Zhang B, Liu X, Wu Q, et al. Research of the soil bacteria community characteristics at different depths in Kunlun Mountains Pass, Tibetan Plateau [J]. *J Glaciol Geocryol* (冰川冻土), 2016, 38:767-784.