

基于高通量测序技术分析3种黄精内生细菌多样性*

邓利娟¹, 苏晓宇², 杨双琳¹, 贾李智¹, 吴程¹, 尹敏², 任祺^{1**}

(1. 昆明学院 农学与生命科学学院, 云南 昆明 650214; 2. 云南大学 医学院, 云南 昆明 650091)

[摘要] 采用高通量测序技术, 对3种黄精(滇黄精、多花黄精、鸡头黄精)根茎内生细菌16S rRNA基因进行测定, 以探究不同种黄精内生细菌多样性及群落结构。在3种黄精根茎中, 共获得179个OTUs, 其中滇黄精、多花黄精和鸡头黄精分别获得74, 178, 18个OTUs。3种黄精共有的OTUs为16个, 占比8.93%。排除不可归类, 获得的OTUs可归属于11门、14纲、38目、52科、87属、79种。在门水平上, 变形菌门(Proteobacteria)为多花黄精和鸡头黄精的优势菌门, 蓝藻门(Cyanobacteria)为滇黄精的优势菌门。在属水平上, 多花黄精、滇黄精和鸡头黄精的优势菌属完全不同, 依次为克雷伯氏菌属(*Klebsiella*, 27.74%), 代尔夫特菌属(*Delftia*, 80.28%)和假单胞菌属(*Pseudomonas*, 48.99%)。功能预测分析表明, 3种黄精根茎内生细菌功能略有不同, 丰度较高的菌群功能主要与新陈代谢相关。总体来看, 3种黄精根茎内生细菌资源丰富, 且种间差异明显, 研究结果可为不同种黄精内生细菌的进一步挖掘和后续功能菌株的开发应用奠定基础。

[关键词] 黄精; 高通量测序; 内生细菌; 多样性; 群落结构

[中图分类号] S567.23 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5639(2024)03-0108-08

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2024.03.015

黄精(*Polygonatum* Mill.)为百合科(Liliaceae)多年生草本植物, 广泛分布于我国东北、华北、西北、华东、西南等地, 常以根茎入药, 具有多种生物活性物质, 在降血压、提高免疫力、抗氧化等方面具有显著的功效^[1,2]。中国药典中记载的黄精药材为鸡头黄精(*Polygonatum sibiricum* Red.)、滇黄精(*Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.)或多花黄精(*Polygonatum cyrtoneura* Hua)的干燥根茎^[3]。黄精作为药食同源类中药, 在临床配方、中成药生产、药膳原料使用等方面, 具有广阔的开发应用前景^[4-6]。

植物内生细菌广泛存在于药用植物组织当中, 在长期的共同进化过程中, 能与植物形成互惠共生关系, 且不同药用植物内生细菌的种类及功能有所不同^[7,8]。杨瑞先等^[9]采用离体培养的方式, 从药用牡丹根部共分离得到124株内生细菌, 证实其中的16株菌对牡丹灰霉病菌具有明显抑制作用。张鹏等^[10]研究表明, 七叶一枝花根部内生的优势属为假单胞菌属(*Pseudomonas*), 且该菌属能促进植物生长。Zhao等^[11]通过高通量测序技术发现金钗石斛不同器官的优势菌属并不相同, 且内生细菌的主要功能是参与营养代谢。可见, 药用植物内生细菌资源丰富, 具有广阔的开发应用潜力^[12]。

大量研究^[13,14]证实, 植物内生细菌可以通过固氮、溶磷、分泌生长素等作用促进宿主植物的生长及药用成分积累, 并在植物抗逆性方面发挥着重要作用。目前, 关于黄精内生细菌的研究主要集中在活性菌株分离、鉴定及筛选等方面。蔡文斌等^[15]从鸡头黄精中共分离到4株细菌, 其中1株环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)有明显抑菌作用。吴依婷等^[16]从鸡头黄精中分离得到40株内生细菌, 其中10株对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的抗菌活性较高, 具有提高植物根腐病抗性的潜力。此外, 黄精内生细菌对其药用物质的形成和积累亦有影响。蔡媛等^[17]发现, 在

* [收稿日期] 2023-12-19

[作者简介] 邓利娟, 女, 云南绥江人, 昆明学院在读硕士研究生, 研究方向为农业资源利用。

** [通信作者] 任祺, 女, 陕西澄城人, 昆明学院教授, 博士, 研究方向为农业微生物与植物共生关系, E-mail: 10067994@qq.com.

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金项目(2023Y0857); 云南省万人计划青年拔尖人才专项项目(YNWR-QNBJ-2020-096); 云南省地方高校联合专项项目(202101BA07 0001-035, 202101BA07 0001-057)。

多花黄精丰度前 10 的细菌属中, 共有 5 个菌属与黄精有效物质含量呈显著正相关, 2 个呈显著负相关。可见, 黄精内生细菌资源丰富, 并具有一定的潜在功能。然而, 目前关于黄精内生细菌多样性的研究多采用离体培养的方式, 且研究对象主要集中在多花黄精和鸡头黄精, 对滇黄精的研究较少, 导致目前业界对黄精内生细菌的种类和潜在功能知之甚少。在植物内生细菌研究工作中, 与纯培养方法相比, 高通量测序技术具有信息量大、可靠性高等优点, 更能真实地反映植物内生微生物的种类组成和真实比例^[18,19]。基于此, 本研究利用高通量测序技术, 对 3 种黄精内生细菌群落结构特征及差异性进行分析, 并对其种群功能进行预测, 可为进一步挖掘和利用黄精内生功能菌株奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

1.1.1 样地概况

3 种黄精样品均采自云南省文山壮族苗族自治州薄竹镇本期黑黄精种植基地 (102°49'25.068"E, 24°50'15.612"N), 该基地年均气温 17.1 °C, 年均降水量 1 268.1 mm, 土壤类型为红壤, 适宜黄精种植。在该基地, 3 种黄精的种植生态环境较为一致, 且栽培管理措施相同。

1.1.2 样品采集及处理

在每种黄精种植区域内, 随机选取 3 株健康植株进行取样。采集时去除表层土及杂物, 用消毒后的铲子将黄精样品连同地下部根茎及根际土壤一同挖出, 放入无菌密封袋内带回实验室。多花黄精、鸡头黄精、滇黄精样品编号分别为: DHHJ、JTHJ、DHJ。将 3 种黄精根茎剪下后, 用自来水冲洗干净表面泥土。依次用 75% 的乙醇中浸泡 2 min、3% 的次氯酸钠浸泡 3 min, 无菌水冲洗 3 次^[20]。最后, 将表面无菌的黄精根茎置于 -80 °C 冰箱, 用于后续 DNA 提取。

1.2 试验方法

1.2.1 根茎 DNA 的提取

将各种黄精的 3 个重复样品混合, 在无菌条件下加液氮研磨成粉, 称取 2 g 样品, 使用 E. Z. N. ATM Mag - Bind Soil DNA Kit 试剂盒 (OMEGA) 提取基因组 DNA, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的长度和完整性, 使用 NanoDrop 检测 DNA 的浓度和纯度。

1.2.2 PCR 扩增及高通量测序

对细菌 16S rDNA 可变区全长 (V1-V10 区) 进行 PCR 扩增, 通用引物为 27F (AGRGTTYGATYMTG-GCTCAG) 和 1492R (RGYTACCTTGTTACGACTT)。PCR 扩增反应体系为 20 μ L, 反应条件为: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 25 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen 公司) 进行切胶回收, 并采用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统 (Promega 公司) 对回收产物进行定量检测。纯化合格后送至上海美吉生物医药科技有限公司, 使用 Illumina MiSeq™ 平台进行测序。

1.3 数据分析

使用 FLASH (v1.2.11)、Fastp (v0.19.6) 软件对原始序列进行数据去杂和质量过滤。使用 Usearch (v7.0) 软件平台得到高质量序列, 按照 97% 相似度进行可操作分类单元 (Operational taxonomic units, OTU) 聚类, 生成 OTU 表格。采用 RDP classifier 贝叶斯算法对每个 OTU 代表序列进行分类学分析, 统计各样本的群落物种组成。使用 Mothur (v1.30.2) 软件计算 Alpha (α) 多样性指数。使用 Microsoft Excel 2016 软件进行数据统计整理。使用 PICRUST (v2.2.0) 软件包进行功能预测。

2 结果与分析

2.1 3 种黄精根茎内生细菌 Alpha 多样性分析

根据测序结果, 从多花黄精、滇黄精和鸡头黄精分别获得 22 024, 13 059, 17 322 条有效序列。按照相似度为 97% 标准进行操作分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU) 聚类, 在 3 种黄精样品中共发现 179 个 OTUs。从维恩 (Venn) 图结果可以看出 (图 1), 3 种黄精共有的 OTUs 为 16 个, 占比 8.93%。在滇黄精、多花黄精和鸡头黄精样品中分别获得了 74, 178, 18 个 OTUs, 且在前两种黄精中分别发现了

17个和124个独有的OTUs。整体来看,不同黄精内生细菌的OTUs组成存在差异,其中多花黄精根茎中的总OTUs和独有的OTUs均最多,说明该种黄精中的内生细菌最为丰富。

Alpha多样性指数(表1)结果表明,3种黄精的覆盖率均达到99.5%以上,说明本次检测结果能真实反映样品中内生细菌物种多样性。从群落多样性Shannon和Simpson指数可以看出,在3种黄精中,多花黄精内生细菌的Shannon指数最高,Simpson指数最低,说明该种群落的多样性最为丰富。此外,多花黄精的Chao和Ace指数亦高于其他两种。可见,与滇黄精、鸡头黄精相比,多花黄精根茎内生细菌的物种种类最多,多样性最为丰富。

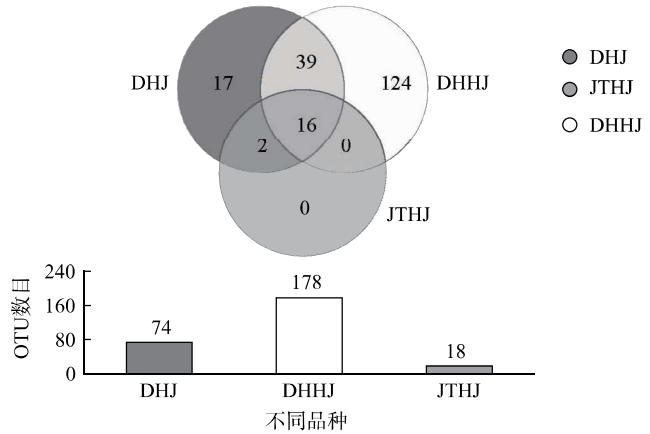


图1 3种黄精内生细菌 OTU 分布的 Venn 图

表1 3种黄精内生细菌多样性指数

样品	Shannon 指数	Simpson 指数	Ace 指数	Chao 指数	覆盖率/%
DHHJ	4.00	0.04	186.57	189.11	99.89
DHJ	1.45	0.34	138.13	132.50	99.78
JTHJ	1.68	0.21	20.33	18.75	99.98

黄精样品的等级聚类曲线和 Shannon 稀释曲线如图2所示。从等级聚类曲线(图2(a))来看,多花黄精曲线下降较缓,而鸡头黄精和滇黄精下降较快,说明多花黄精根茎内生细菌丰富度较高,这与多样性指数结果一致。此外,从 Shannon 稀释曲线可以看出(图2(b)),随着测序深度的增加,3种黄精的 Shannon 指数曲线均逐渐趋于平缓,说明群落种类的多样性不再增加。综合上述结果来看,3种黄精样品取样合理,样本测序数量足够,可真实反映内生细菌的群落组成。

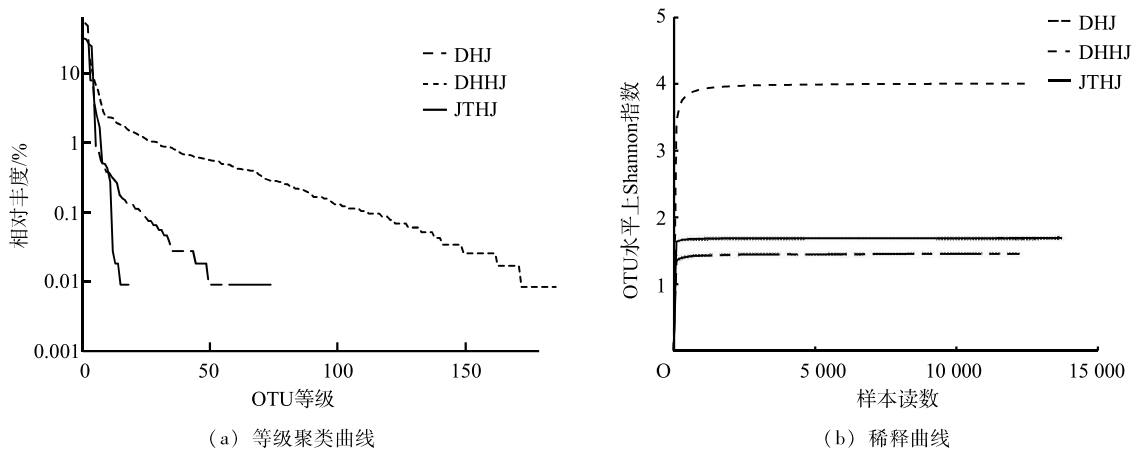


图2 3种黄精内生细菌的等级聚类曲线和稀释曲线

2.2 3种黄精根茎内生细菌群落组成分析

种群归类结果显示,3种黄精内生细菌的OTUs序列可分属于11个门及14个可归类纲。在目及以下分类阶段,OTUs总计依次分布于38目、52科、87属、79种。从表2也可以看出,3种黄精根茎内生细菌在门、纲、目、科和属等分类单元上的数量明显不同,整体表现为多花黄精>滇黄精>鸡头黄精,这与3种黄精细菌的OTUs结果指向一致。

表 2 3 种黄精内生细菌的分类单元统计

样品	门	纲	目	科	属	种
DHHJ	11	14	38	49	79	69
DHJ	6	7	16	23	37	35
JTHJ	3	4	4	9	10	13

从图 3 可以看出, 3 种黄精根茎的内生细菌可划分为 11 个门, 分别为: 变形菌门 (Proteobacteria)、蓝藻门 (Cyanobacteria)、放线菌门 (Actinobacteriota)、拟杆菌门 (Bacteroidota)、疣微菌门 (Verrucomicrobiota)、厚壁菌门 (Firmicutes)、浮霉菌门 (Planctomycetota)、髌骨细菌门 (Patescibacteria)、粘球菌门 (Myxococcota)、Dependentiae 和酸杆菌门 (Acidobacteriota)。在多花黄精、滇黄精和鸡头黄精根茎内分别获得 11, 6, 3 个门的细菌种类, 且 3 种黄精的优势菌门略有不同。其中, 变形菌门 (Proteobacteria) 为多花黄精、鸡头黄精内生细菌优势菌门, 相对丰度分别为 72.95% 和 99.98%; 而蓝藻门 (Cyanobacteria) 为滇黄精内生细菌的优势菌门, 相对丰度为 83.04%。由此可见, 在门水平上, 3 种黄精内生细菌的所属门种类差异明显, 但多花黄精和鸡头黄精的优势菌门相同。

在属水平上 (图 4), 排除不可归类, 在 3 种黄精中占比前 10 的属依次为: 假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、代尔夫特菌属 (*Delftia*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、异根瘤菌属 (*Allorhizobium*)、泛菌属 (*Pantoea*)、中慢生根瘤菌属 (*Mesorhizobium*)、类节杆菌属 (*Paenarthrobacter*) 和微杆菌属 (*Microbacterium*)。不同黄精根茎内生细菌的属种类差异较大, 在多花黄精、滇黄精和鸡头黄精根茎内分别获得了 79, 37, 10 个细菌属种类。此外, 3 种黄精最优势属种类明显不同。其中, 克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 为多花黄精内生细菌的最优势细菌属, 相对丰度为 19.68%; 代尔夫特菌属 (*Delftia*) 为滇黄精的最优势细菌属, 相对丰度高达 83.83%; 假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 为鸡头黄精的最优势菌属, 相对丰度为 48.97%。可见, 3 种黄精的细菌属种类差异明显, 且优势属种类明显不同。

2.3 3 种黄精内生细菌群落的功能预测分析

使用 KEGG 数据库对多花黄精、滇黄精和鸡头黄精根茎内生细菌基因功能进行注释, 共获得 370 个代谢通路, 主要代谢通路类型见表 3。通过 KEGG 数据库对比可发现, 3 种黄精基因功能分属于 6 个主要通路类型, 分别为新陈代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程、人类疾病、生物体系统。在 3 种黄精中, 与新陈代谢通路相关的基因数量均最多, 且相对丰度最低为 74.25%, 最高为 77.09%。此外, 对比 3 种黄精, 滇黄精在新陈代谢、遗传信息处理、生物体系统通路上的相对丰度最高, 鸡头黄精在环境信息处理、细胞过程和人类疾病通路上的相对丰度最高, 而多花黄精在 6 个通路上的相对丰度均介于二者之间。可见,

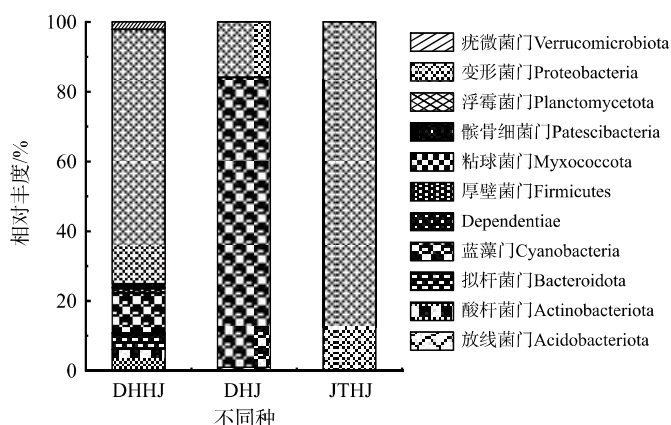


图 3 3 种黄精内生细菌在门水平上的相对丰度

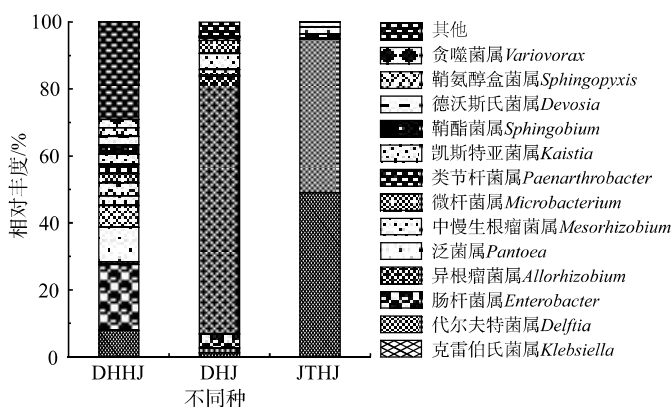


图 4 3 种黄精内生细菌在属水平上的相对丰度

不同黄精根茎内生细菌的基因功能类型具有一致性,但各主要代谢通路的相对丰度存在一定差异.

表3 3种黄精根茎内生细菌KEGG代谢通路的相对丰度

通路类型	相对丰度		
	DHHJ	JTHJ	DHJ
新陈代谢	76.58	74.25	77.09
遗传信息处理	6.29	5.76	9.41
环境信息处理	6.61	8.81	4.82
细胞过程	5.03	5.73	3.04
人类疾病	3.75	3.82	3.58
生物体系统	1.74	1.63	2.05

采用COG数据库对3种黄精根茎的内生细菌进行功能预测(图5),共获得了22个功能分组,相对丰度随种的不同而略有差异.在3种黄精根茎内生细菌中,排除未知功能的细菌种类,占比前5的细菌功能分别为“氨基酸的运输和代谢”“能量的产生和转换”“翻译,核糖体结构和生物合成”“碳水化合物转运和代谢”“无机离子转运和代谢”.其中,具有“氨基酸的运输和代谢”功能的细菌在3种黄精中占比均最高,相对丰度最高在9.89%~11.27%之间.除该功能外,不同种黄精占比其次的细菌功能明显不同,多花黄精为“能量的产生和转换”功能,鸡头黄精为“碳水化合物转运和代谢”功能,滇黄精为“翻译,核糖体结构和生物合成”功能.可见,3种黄精根茎内生细菌的功能主要与新陈代谢相关,与KEGG功能注释结果相符.

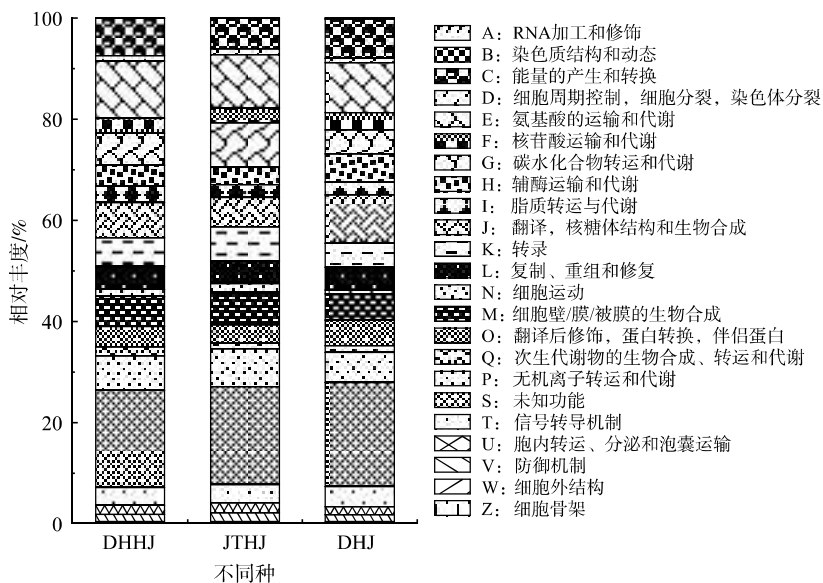


图5 3种黄精根茎内生细菌的COG功能分类统计

3 讨论

3.1 3种黄精内生细菌Alpha多样性特性

药用植物的代谢产物积累、药用品质与其组织内微生物的多样性和群落结构密切相关.相关研究^[21]证实,药用植物内生细菌群落结构组成受植物种类及其基因型、组织部位及生长环境等多方面的影响.目前,尚未有关于不同种黄精间内生细菌多样性及其功能差异的研究.本研究利用高通量测序技术对3种药用黄精根茎内生细菌进行测定,共得到52405条有效序列,179个OTUs.其中,多花黄精根茎内生细菌中所鉴定出的OTUs及独有OTUs均最多,远高于滇黄精和鸡头黄精.同时,多花黄精内生细菌的Shannon指数、Chao和ACE指数均最高,Simpson指数最低.对比其他两种黄精,多花黄精表现出了更为丰富的内生细菌多样性.王珊珊等^[22]对6种药用石斛的内生细菌进行比较分析,发现铁皮石斛内生细菌群落

丰富度及多样性最高, 铜皮石斛其次, 而米斛石斛内生细菌菌群丰富度最低. 刘永红等^[23]也发现 2 种阿魏内生细菌的物种多样性在种间存在差异, 其中新疆阿魏的内生细菌群落多样性及丰富度指数更高. 可见, 植物内生细菌在同属不同种间存在明显差异. 本研究证实黄精内存在丰富的内生细菌资源, 尤其是多花黄精, 研究结果为进一步探究药用植物内生细菌多样性及功能菌株的开发利用奠定基础.

3.2 3 种黄精内生细菌群落组成分析

内生细菌和宿主植物经过长期相互选择和适应, 较为稳定地存在于植物体内, 表现出明显的宿主特异性^[24]. 李巧玲等^[25]研究发现, 同一生长环境下的 3 种淫羊藿叶片内生细菌的群落组成存在明显差异, 优势细菌类型在门和属水平上均不同. 此外, 魏玉倩等^[26]对 5 种苏铁根系内生细菌的群落结构进行了研究, 证实攀枝花苏铁、篦齿苏铁、华南苏铁和贵州苏铁的优势菌门均为蓝藻门 (Cyanobacteria), 而宽叶苏铁为放线菌门 (Actinobacteria), 且宽叶苏铁的优势菌属与其他种亦不相同. 可见, 内生细菌定殖于特定宿主体内, 其群落组成与物种的基因型关系密切. 本研究发现不同种黄精的优势细菌类型并不完全一致. 在门水平上, 多花黄精和鸡头黄精的最优势菌门均为变形菌门 (Proteobacteria), 而滇黄精为蓝藻门 (Cyanobacteria). 同时, 不同种黄精的优势菌属亦不相同, 多花黄精、滇黄精、鸡头黄精根茎内生细菌优势属依次为克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、代尔夫特菌属 (*Delftia*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*). 内生细菌广泛存在于植物体当中, 不同种类植物内部的生理过程及新陈代谢是影响细菌组成的重要因素^[27]. 前人研究^[28]表明, 3 种黄精中黄酮类、酚酸类和氨基酸类等有效物质的成分和积累程度并不相同, 其中多花黄精的药用品质最佳^[29]. 由于生理结构以及分泌代谢产物的差异性, 在不同黄精体内形成了特定的内生环境, 而不同的内生环境又会招募适应其环境的细菌种群, 从而表现出内生细菌对不同种黄精的选择偏好性.

不同植物内生细菌群落组成的差异是进化过程中长期选择与适应的结果. 而这些内生细菌在植物体内具有一定的功能, 对维持植物健康和保持宿主较高生产力具有重要作用^[30]. 本研究发现, 虽然不同种的黄精内生细菌的主要菌属并不一致, 但这些细菌属在上述各种黄精中均具有一定的功能作用. 有研究^[31]报道, 克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 细菌能提高植物吲哚乙酸 (IAA) 分泌量, 从而促进植物生长. 代尔夫特菌属 (*Delftia*) 细菌可以存在植物整个生命周期中, 诱导所需的生理变化, 从而提高植物对病原体的抵抗力^[32]. 假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 在提高植物的抗逆性方面效果突出, 不仅在土壤盐渍化^[33]、重金属胁迫^[34]等环境条件下均可促进植物生长, 还可提高植物抗病性^[35]. 可见, 3 种黄精根茎优势细菌类型的功能各异, 但在促进黄精生长、提高宿主抗逆性方面具有广阔的应用前景.

3.3 3 种黄精内生细菌功能分析

对药用植物而言, 内生细菌对宿主生长发育、药效物质的形成和积累等都具有重要影响^[25]. 本研究中, KEGG 代谢通路和 COG 的功能分析均表明, 多花黄精、滇黄精、鸡头黄精根茎内生细菌功能主要与新陈代谢相关. 前人研究表明, 在药用植物粉防己^[36]、三七^[37]、竹根七^[38]根系中, 与新陈代谢相关内生细菌的丰度较高, 与本研究结果一致. 相关研究^[39]表明, 植物内生细菌会在一定程度上受到宿主的调控, 表现出与宿主相同或类似的代谢途径和功能. 顾美英等^[40]研究证实, 黑果枸杞的内生细菌基因中, 包含与该植物相同的氨基酸类、萜类和酮类等活性物质的合成通路, 且能形成与之相似的其他次生代谢产物, 在其生长过程中发挥着重要作用. 有学者发现多花黄精根茎内生细菌参与了其药材品质的变化, 且同一菌群可与不同种类的有效物质相关联^[17]. 本研究发现在 3 种黄精中, 具有新陈代谢相关功能内生细菌的基因丰度均较高, 这些菌群可能通过参与新陈代谢调控黄精的生长及药理活性物质的积累, 有待后续进一步证实.

4 结论

不同黄精根茎内生细菌的多样性和群落组成存在明显差异, 多样性及丰富度由高到低表现为多花黄精 > 鸡头黄精 > 滇黄精. 在群落组成上, 多花黄精和鸡头黄精优势菌门为变形菌门 (Proteobacteria), 滇黄精为蓝藻门 (Cyanobacteria), 而优势菌属则完全不同. 功能预测发现, 3 种黄精内生细菌的功能略有差异, 但均表现为具有新陈代谢功能的细菌相对丰度较高, 说明内生细菌可能会影响黄精生理代谢. 不同种黄精内生细菌组成及功能的差异, 为后续分离、筛选功能菌株奠定了理论基础, 但相关细菌类型对黄精或其他药用植物生长和活性物质积累方面的作用还有待进一步证实.

[参考文献]

- [1] 刘爽, 胡舒婷, 贾巧君, 等. 黄精的化学组成及药理作用的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33 (10): 1783-1796.
- [2] 李彦力, 苏艺, 袁晚晴, 等. 黄精主要活性成分、功能及其作用机制研究进展 [J]. 现代食品科技, 2023, 39 (12): 354-363.
- [3] 马永强, 张一鹏, 王鑫, 等. 九蒸九制对黄精中 AGEs 含量、多糖结构及体外活性的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45 (3): 226-234.
- [4] 任蓁, 刘思莹, 穆琢莹, 等. 具有降脂作用的药食同源物质中补阴药的研究进展 [J]. 中医学报, 2021, 49 (4): 88-92.
- [5] 范佐旺, 柯晓燕, 陈靛雯, 等. 多花黄精的化学成分及药理研究进展 [J]. 中医药信息, 2020, 37 (5): 119-126.
- [6] 田丰铭, 余瑞宁, 陈博威, 等. 林下中药材种植与应用研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2022, 41 (6): 64-71.
- [7] 王开凤. 鱼腥草内生细菌对宿主植物的促生长作用 [D]. 贵阳: 贵州师范大学硕士学位论文, 2023.
- [8] SRIWATI R, MAULIDIA V, INTAN N, et al. Endophytic bacteria as biological agents to control fusarium wilt disease and promote tomato plant growth [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2023, 125: 101994.
- [9] 杨瑞先, 刘萍, 彭彪彪, 等. 药用牡丹根部内生细菌的抑菌活性研究 [J]. 北方园艺, 2018 (23): 44-52.
- [10] 张鹏, 赵伟琼, 苗莉云, 等. 七叶一枝花根内生细菌多样性分析及促生菌的筛选 [J]. 中南民族大学学报 (自然科学版), 2020, 39 (6): 596-600.
- [11] ZHAO R X, ZHENG S, HU Y D, et al. Endophytic bacterial diversity of the medicinal orchid *Dendrobium nobile* [J]. *South African Journal of Botany*, 2023, 158: 90-97.
- [12] 黄静. 丛枝病对白花泡桐内生菌群落结构的影响 [D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2023.
- [13] 宋瑞琦, 南铁贵, 杨健, 等. 内生细菌资源及其次级代谢产物研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (19): 1-9.
- [14] 何冬梅, 赖长江生, 严铸云, 等. 中药微生态研究与展望 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43 (17): 3417-3430.
- [15] 蔡文斌, 刘秀丽, 黄娟, 等. 黄精内生细菌的分离及鉴定 [J]. 湖北农业科学, 2022, 61 (11): 80-83.
- [16] 吴依婷, 姚传威, 邓波侠, 等. 黄精根腐病分离菌及其拮抗内生细菌的鉴定 [J]. 浙江农业学报, 2018, 30 (12): 2087-2093.
- [17] 蔡媛, 刘浩, 孔文平, 等. 多花黄精内生菌群落结构多样性及其与有效成分含量相关性研究 [J]. 中草药, 2021, 52 (13): 4023-4030.
- [18] 鲍永毅, 陈晓, 牛明福, 等. 茵陈内生细菌的分离鉴定与抑菌活性成分分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31 (11): 1919-1927.
- [19] 李冬娟. 基于免培养的微生物群落多样性研究方法概述 [J]. 长沙大学学报, 2019, 33 (5): 73-76.
- [20] WANG S S, LIU J M, SUN J, et al. Diversity of culture-independent bacteria and antimicrobial activity of culturable endophytic bacteria isolated from different *Dendrobium* stems [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9 (1): 10389.
- [21] 索朗桑姆, 何萍, 简阅, 等. 甘青青兰根际及内生细菌群落结构组成分析 [J]. 西南农业学报, 2023, 36 (4): 750-758.
- [22] 王珊珊, 刘佳萌, 孙晶, 等. 药用石斛内生菌的研究进展 [J]. 中国食物与营养, 2020, 26 (7): 35-40.
- [23] 刘永红, 郭建伟, 张永光, 等. 2种药用阿魏植物内生细菌及促生属性比较 [J]. 微生物学杂志, 2018, 38 (5): 51-59.
- [24] 耿红, 裴婷, 苗莉云, 等. 滇重楼根可培养内生细菌多样性分析及促生菌筛选 [J]. 中南民族大学学报 (自然科学版), 2020, 39 (1): 41-45.
- [25] 李巧玲, 任明波, 曹然, 等. 基于高通量测序的3种淫羊藿叶片内生细菌群落结构研究 [J]. 微生物学杂志, 2022, 42 (1): 43-53.
- [26] 魏玉倩, 陈健鑫, 郑艳玲, 等. 不同种苏铁珊瑚状根内生微生物多样性及适应性研究 [J]. 微生物学报, 2022, 62 (7): 2835-2849.
- [27] 许国琪, 刘怡莹, 曹鹏熙, 等. 青藏高原不同生态环境下冰川棘豆 (*Oxytropis glacialis*) 内生细菌多样性研究 [J]. 高原科学研究, 2020, 4 (1): 20-29.

- [28] 李安琳, 李文竞, 吴望, 等. 不同黄精根茎中黄酮、氨基酸和酚酸类物质成分的系统比较 [EB/OL]. (2023-07-20) [2023-12-06]. <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/51.1482.Q.20230720.1034.003.html>.
- [29] 王坤, 岳永德, 汤锋, 等. 多花黄精多糖的分级提取及结构初步分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26 (3): 364-369.
- [30] CHAPELLE E, MENDES R, BAKKER P A H M, et al. Fungal invasion of the rhizosphere microbiome [J]. The ISME Journal, 2016, 10 (1): 265-268.
- [31] 孙秀娟, 徐伟慧, 王志刚. 大豆根瘤内生细菌的分离鉴定及其对大豆植株的促生效应 [J]. 浙江农业学报, 2023, 35 (7): 1532-1541.
- [32] KHALIFA A Y Z, ALMALKI M. Polyphasic characterization of *Delftia acidovorans* ESM-1, a facultative methylotrophic bacterium isolated from rhizosphere of *Eruca sativa* [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2019, 26 (6): 1262-1267.
- [33] SHANG X C, ZHANG M, ZHANG Y, et al. Waste seaweed compost and rhizosphere bacteria *Pseudomonas koreensis* promote tomato seedlings growth by benefiting properties, enzyme activities and rhizosphere bacterial community in coastal saline soil of Yellow River Delta, China [J]. Waste Management, 2023, 172: 33-42.
- [34] 丁嘉仪, 邓宇慧, 李国豪, 等. 毛竹耐铅内生细菌分离及其 16S rDNA 鉴定 [J]. 寒旱农业科学, 2023, 2 (8): 740-744.
- [35] 吕娜娜, 沈宗专, 陶成圆, 等. 蕉园土壤及香蕉植株不同组织可培养细菌的群落特征 [J]. 南京农业大学学报, 2019, 42 (6): 1088-1097.
- [36] 杨立军, 徐源, 高涵, 等. 基于高通量技术分析粉防己不同组织内生细菌多样性及功能预测 [J]. 江苏农业科学, 2023, 51 (17): 19-28.
- [37] 李秋桦, 夏体渊, 任祺, 等. 基于高通量测序技术分析三七不同部位内生细菌多样性 [J]. 西南农业学报, 2021, 34 (10): 2182-2190.
- [38] 安超, 马赛箭, 薛文娇, 等. 基于高通量测序的野生竹根七根际及内生细菌群落结构特征分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40 (增刊1): 2076-2082.
- [39] 刘雯雯, 张旭, 黄奇, 等. 基于高通量测序的明日叶不同组织内生菌群落结构分析 [J]. 南方农业学报, 2023, 54 (6): 1622-1632.
- [40] 顾美英, 古丽尼沙·沙依木, 张志东, 等. 黑果枸杞不同组织内生细菌群落多样性 [J]. 微生物学报, 2021, 61 (1): 152-166.

Analysis of Endophytic Bacterial Diversity of Three *Polygonatum* Species Based on High-throughput Sequencing Technology

DENG Lijuan¹, SU Xiaoyu², YANG Shuanglin¹, JIA Lizhi¹, WU Cheng¹, YIN Min², REN Zhen¹

(1. School of Agronomy and Life Sciences, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214;

2. School of Medicine, Yunnan University, Kunming, Yunnan, China 650091)

Abstract: The 16S rRNA genes of rhizome endophytic bacteria from three *Polygonatum* species (*P. kingianum* Coll. et Hemsl, *P. cyrtoneuma* Hua, and *P. sibiricum* Delar. ex Redoute) were determined by high-throughput sequencing, aiming to investigate the diversity and community structure among different *Polygonatum* species. A total of 179 operational taxonomic units (OTUs) were identified in the rhizomes of the three *Polygonatum* species, with 74 OTUs obtained from *P. kingianum* Coll. et Hemsl, 178 OTUs from *P. cyrtoneuma* Hua, and 18 OTUs from *P. sibiricum* Delar. ex Redoute, respectively. The total common number of OTUs in the three species was 16, accounting for 8.93% of the total. OTUs can be classified into 11 phyla, 14 classes, 38 orders, 52 families, 87 genera, and 79 species, excluding the unclassified taxa. At the phylum level, Proteobacteria emerged as the dominant phylum in *P. cyrtoneuma* Hua, and *P. sibiricum* Delar. ex Redoute, whereas Cyanobacteria dominated in *P. kingianum* Coll. et Hemsl. In terms of genus composition, the dominant bacteria genera of *P. cyrtoneuma* Hua, *P. kingianum* Coll. et Hemsl and *P. sibiricum* Delar. ex Redoute were completely different, *Klebsiella* (27.74%), *Delftia* (80.28%), and *Pseudomonas* (48.99%) were identified as the dominant bacterial genera, respectively. Functional prediction analysis revealed that the endophytic bacteria derived from the rhizomes of the three *Polygonatum* species exhibit slight variations in their functions, with the higher abundance bacteria having mainly metabolism-related functions. Overall, the rhizomes of the three *Polygonatum* species harbor a large array of endophytic bacteria, with distinct dissimilarities among them. The results may lay a foundation for further exploitation of endophytic bacteria and subsequent development and application of functional strains with *Polygonatum* species.

Key words: *Polygonatum*; high-throughput sequencing; endophytic bacteria; diversity; community structure

(责任编辑: 陈伟超)