不同地点手掌参内生细菌群落多样性分析

尹 秀[1,2,3]，张二豪[1,2,3]，禄亚洲[1,2,3,4]，兰小中[1,2,3,4*]

（1.西藏农牧大学 食品科学学院，西藏 林芝 860000；2.西藏农牧大学 西藏自治区藏药资源保护与利用重点实验室，西藏 林芝 860000；
3.西藏农牧大学 西藏特色农牧资源研发省部共建协同创新中心，西藏 林芝 860000；
4.西藏农牧学院 西藏中（藏）药资源中心，西藏 林芝 860000）

摘 要 以西藏自治区林芝市色季拉山 4 个采样点手掌参（*Gymnadenia conopsea*）为材料，利用高通量测序技术对其 16S rRNA 进行测序，以探索不同环境因子对手掌参内生细菌群落多样性的影响。结果表明，从所有手掌参样品中共获得 715 920 条有效序列，聚类为 2 365 个 OTUs，隶属于 5 门 38 科 62 属。优势菌门为变形菌门（Proteobacteria），优势菌属为假单胞菌属（*Pseudomonas*）、甲基杆菌属（*Methylobacterium*）和鞘脂单胞菌属（*Sphingomonas*）。多样性分析表明所有样品中林海观景台（LH）采样点手掌参茎样品（LHS）内生细菌群落丰富度最高，雷达站（LD）采样点手掌参果荚样品（LDF）内生细菌群落丰富度最低；废弃木材厂（FM）采样点手掌参茎样品（FMS）内生细菌群落多样性最丰富，该采样点手掌参的茎、叶和果荚细菌群落多样性指数均高于其他 3 个采样点。四种组织样品中，茎、叶和根中内生细菌群落丰富度均高于果荚，果荚中内生细菌群落多样性和丰富度均随海拔升高而降低，雷达站（LD）采样点手掌参果荚样品（LDF）中内生细菌群落丰富度和多样性均最低。不同生境下相同组织内生细菌群落多样性具有显著差异性，相同生境下不同组织内生细菌群落多样性也存在一定差异。主坐标分析（Principal Coordinates Analysis，PCoA）表明内生细菌的群落组成受到环境因素和组织类型的影响，同时冗余分析（redundancy analysis，RDA）和相关性热图均表明全磷（TP）、全钾（TK）、pH 和海拔为主要影响因子，与内生细菌群落组成存在显著相关性。PICRSt 功能预测分析表明手掌参内生细菌主要富集在新陈代谢（Metabolism）、环境信息处理（Environmental information processing）、遗传信息处理（Genetic information processing）三个一级代谢通路，大多代谢通路随着海拔高度升高呈下降趋势。本研究采用高通量测序技术分析环境因子和组织差异对手掌参内生细菌的多样性和群落结构的影响，旨在丰富和完善野生手掌参内生细菌资源，为今后有益内生细菌的资源开发及手掌参野生资源保护提供参考。

关键词 手掌参；内生细菌；多样性；细菌群落结构；环境因子

中图分类号 Q939.96 **文献标识码** A **文章编号** 1005-7021（2026）01-0044-12

doi：10.3969/j.issn.1005-7021.2026.01.005

Analysis on the Community Diversity of Endophytic Bacteria in *Gymnadenia conopsea* at Different Locations

YIN Xiu[1,2,3], ZHANG Er-hao[1,2,3], LU Ya-zhou[1,2,3,4], LAN Xiao-zhong[1,2,3,4*]

(1. *Food Science College, Xizang Agriculture and Animal Husbandry University, Nyingchi* 860000;
2. *Key Laboratory of Xizang Medicine Resources Conservation and Utilization of Xizang Autonomous Region, Xizang Agriculture and Animal Husbandry University, Nyingchi* 860000;
3. *The Provincial and Ministerial Co-founded Collaborative Innovation Center for R&D in Xizang Characteristic Agricultural and Animal Husbandry Resources, Xizang Agriculture and Animal Husbandry University, Nyingchi* 860000;
4. *The Center for Xizang Chinese (Tibetan) Medicine Resource, Xizang Agriculture and Animal Husbandry University, Nyingchi* 860000)

Abstract In this study, we performed 16S rRNA high-throughput sequencing to examine the diversity of endophytic

基金项目：第四次全国中药资源普查西藏自治区中（藏）药资源普查项目（20200501-542301）；生物技术一流专业建设项目（2024-007）
作者简介：尹秀 女，讲师，硕士。主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail：624146260@qq.com
* 通讯作者。男，教授，博士，博士生导师。主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail：lanxiaozhong@163.com
收稿日期：2025-11-09

bacterial communities in *Gymnadenia conopsea* growing at four different locations on Mount Sejila. The results revealed that a total of 715 920 effective sequences were obtained from all samples, which were associated with 2 365 operational taxonomic units, classified within five phyla, 38 families, and 62 genera. Proteobacteria was identified as the dominant bacterial phylum and the predominant genera were *Pseudomonas*, *Methylbacterium*, and *Sphingomonas*. Diversity analysis revealed that among the collected samples, the stem samples (LHS) collected at the Linhai Observation Deck were characterized by the highest endophytic bacterial community richness, whereas the richness of fruit samples (LDF) collected from the Radar Station was the lowest. The stem samples (FMS) from the Abandoned Wood Factory site were found to have the highest diversity of endophytic bacterial communities, and the diversity indices of communities in the stems, leaves, and fruits of plants growing at this sampling point (FM) at a lower altitude were higher than those recorded at the other three sampling points. Among the four types of tissue collected, the richness of endophytic bacterial communities in the stems, leaves, and roots was higher than that in the fruits, and we found that the diversity and richness of endophytic bacterial communities in fruits declined with increasing altitude, with the values obtained for the endophytic bacteria in fruit pods (LDF) being the lowest. Furthermore, we detected significant differences in the diversity of endophytic bacterial communities in the same tissue in different habitats, whereas there were differences in the diversity of endophytic bacteria within the different tissues of plants growing in the same habitat. Principal coordinate analysis indicated that the composition of endophytic bacterial communities was influenced by environmental factors and tissue types, and redundancy analysis and correlation heatmaps provided evidence to indicate that total phosphorus, total potassium, pH, and altitude were the main influencing factors, significantly correlated with the composition of these endophytic bacterial communities. Moreover, PICRSt prediction analysis revealed that the endophytic bacteria in *G.* conopsea were mainly enriched in three primary metabolic pathways, namely, metabolism, environmental information processing, and genetic information processing, and the activity of most of the identified metabolic pathways was found to show a declining trend with increasing altitude. This study employed high-throughput sequencing technology to analyze the effects of environmental factors and tissue types on the diversity and community structure of endophytic bacteria in *G. conopsea*. It aims to enrich and improve the resources of endophytic bacteria in wild *G. conopsea*, laying a foundation for the future resource development of beneficial endophytic bacteria and the protection of wild *G. conopsea*.

Keywords *Gymnadenia conopsea*; endophytic bacteria; diversity; bacterial community structure; environmental factors

手掌参(*Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br.)为兰科(Orchidaceae)手参属(*Gymnadenia*)多年陆生草本植物[1],主要分布在海拔 265~4 700 m 的草地、山坡林下、灌木丛和山坡砾石滩草丛中[2-3]。手掌参在西藏地区分布范围狭窄,且种群规模小,主要集中在西藏南部和东南部以及雅鲁藏布江下游流域[4]。手掌参肉质块茎,下部呈掌状分裂[5],具有益肾健脾、止咳平喘、补气养血、活血止痛、抗氧化、抗肿瘤及抗疲劳等功效[6-8]。手掌参可药食两用,在西藏地区常用于泡酒、煲汤和烹煮[1]。手掌参自然繁殖能力低,人为过度开采和生境遭受破坏等因素导致其野生资源急剧下降,已被列为濒危物种[9]。因此,手掌参野生资源保护及可持续开发利用已迫在眉睫。海拔变化会引起气候因子和环境因子的改变,同时也会影响土壤理化性质的变化[10-12]。土壤因子(碳、氮、磷和 pH)随海拔高度的变化会造成土壤微生物的多样性和群落结构的差异[13-15]。曹丽花等[16]研究发现色季拉山3 613~4 367 m 海拔区域的土壤活性有机碳和总有机碳的占比随海拔的升高而升高,土壤微生物群落产生了空间尺度的变异。植物内生细菌通常是由土壤、空气中微生物入侵植物宿主,与宿主协同进化而来[17],内生细菌能促进种子萌发和植物生长[18],增强宿主的抗逆性[19]。庞煜等[20]发现植物内生细菌来源于植物根际细菌,可在植物体内进行转移。张爱梅等[21]认为不同生长环境下同种植物组织中内生细菌种类和数目均具有差异性,相同环境下相同植物的不同组织中内生细菌的种类和数量也不相同。宋庭宁等[22]认为生长环境与植物不同组织部位对植物内生细菌的群落分布可产生一定的影响。Lin 等[23]研究了不同

地理位置(黑龙江大兴安岭和西藏色季拉山)手掌参根部内生细菌的群落组成,但两地距离相距较远,不能有效排除地域差异对内生细菌的影响,也未与土壤理化性质相结合进行深入研究。同时,有研究表明手掌参对生境依赖性很强,其物种分布主要受气候因子和海拔高度的影响,其次是土壤肥力[24]。综上所述,本研究旨在通过分析环境因子和组织差异对手掌参内生细菌多样性和群落结构的影响,以期为今后手掌参内生细菌的分离和内生细菌资源挖掘利用提供依据,为西藏地区野生手掌参的驯化栽培提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样地概况 样地位于西藏自治区林芝市色季拉山(29°5′~29°57′ N,94°25′~94°45′ E),主峰海拔 5 200 m,处于藏东南,为半湿润与湿润气候区的过渡地带,年平均降水量 1 134 mm,年平均气温-0.73 ℃[25]。

1.1.2 样品采集 ①植株样品采集:2019 年 8 月于西藏自治区林芝市色季拉山选取 4 个采样点,分别为废弃木材厂(FM)、林芝观景台(LZ)、林海观景台(LH)和雷达站(LD),采样点的地理位置信息见表 1。每个采样点随机选取 3 块长 2 m、宽 2 m 的样方,每个样方内随机选择生长健康、大小一致的手掌参植株,分别将 4 个采样点的手掌参果荚(F)、根(R)、茎(S)和叶(L)按照组织类别随机混匀,收集于无菌样品袋中标记,-80 ℃保存。所有植物组织样品均用无菌水洗涤 3~4 次,吸去多余水分,切成 1 cm 长的小段,在超净工作台上用 75%乙醇和 10%次氯酸钠分别对样品进行表面消毒 40 s 和 5 min。无菌水反复洗涤 3~5 次,用无菌吸水纸吸去多余水分。为了测试消毒效果,吸取最后 1 次冲洗液涂布于马铃薯葡萄糖培养基,37 ℃培养 3~5 d,观察有无菌落产生,确保手掌参组织表面消毒完全。②土壤样品采集:取每个样方中所采集手掌参植株根系 0~20 cm 范围内的土壤,置于无菌袋中,立即带回实验室。用孔径为 2 mm 的筛子除去杂草根系,随机混样,标记,-80 ℃保存,用于测定土壤理化性质。

表 1 采样点的地理位置信息

Table 1 Geographic information of the sampling sites

采样点	样品(编号)	纬度	经度	海拔/m	植被类型
废弃木材厂(鲁朗镇)(FM)	果荚(FMF)	29°46′04.16″N	94°43′53.13″E	3 244	林地
	叶(FML)	29°46′04.16″N	94°43′53.13″E	3 244	林地
	茎(FMS)	29°46′04.16″N	94°43′53.13″E	3 244	林地
	根(FMR)	29°46′04.16″N	94°43′53.13″E	3 244	林地
林芝观景台(色季拉山)(LZ)	果荚(LZF)	29°33′30.70″N	94°33′36.70″E	3 525	林地
	叶(LZL)	29°33′30.70″N	94°33′36.70″E	3 525	林地
	茎(LZS)	29°33′30.70″N	94°33′36.70″E	3 525	林地
	根(LZR)	29°33′30.70″N	94°33′36.70″E	3 525	林地
林海观景台(色季拉山)(LH)	果荚(LHF)	29°37′ 00.85″N	94°41′51.90″E	4 295	林地
	叶(LHL)	29°37′ 00.85″N	94°41′51.90″E	4 295	林地
	茎(LHS)	29°37′ 00.85″N	94°41′51.90″E	4 295	林地
	根(LHR)	29°37′ 00.85″N	94°41′51.90″E	4 295	林地
雷达站(色季拉山)(LD)	果荚(LDF)	29°37′05.95″N	94°40′57.21″E	4 513	灌木丛
	叶(LDL)	29°37′05.95″N	94°40′57.21″E	4 513	灌木丛
	茎(LDS)	29°37′05.95″N	94°40′57.21″E	4 513	灌木丛
	根(LDR)	29°37′05.95″N	94°40′57.21″E	4 513	灌木丛

1.1.3 培养基 马铃薯葡萄糖培养基(PDA)。

1.1.4 主要试剂与仪器设备 植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP342,北京天根生化科技有限公司);TransStart FastPfu 脱氧核糖核酸聚合酶(2.5 U/μL,北京全式金生物技术股份有限公司)。微量分光光度计(NanoDrop2000,美国 Thermo 公司);琼脂糖水平电泳仪(DY-CP-32C,北京六一仪器厂);紫外可见分光光度计(TGL-16M,上海尤

尼柯仪器有限公司);高速冷冻离心机(Eppendorf 5424R,德国 Eppendorf 公司);聚合酶链式反应仪(Bio-RadT100,美国 Bio-Rad 公司);pH 计(8601 型,上海康仪仪器有限公司);电导率仪(DDS-11A,上海雷磁仪器有限公司);全自动凯氏定氮仪(K9840,山东海能仪器有限公司);火焰光度计(6400A,上海精科仪器有限公司);Illumina Misq 测序平台(美国 Illumina 公司)。

1.2 方法

1.2.1 土壤理化性质测定 使用 pH 计测定土壤 pH 值,使用电导率仪测定土壤电导率(EC),采用重铬酸钾容量法测定土壤有机质(SOM),采用半微量凯氏定氮法测定土壤全氮(TN),采用氢氧化钠熔融-钼锑抗比色法测定土壤全磷(TP),采用氢氧化钠熔融-火焰光度法测定全钾(TK),采用碱解扩散法和碳酸氢钠浸提-紫外分光光度计法[26-27]分别检测土壤速效氮(AN)和有效磷(AP)。

1.2.2 手掌参内生细菌的 DNA 提取、PCR 扩增和测序 参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作说明提取所有样品中 DNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提 DNA。采用引物 799F(5′-AACMGGATTAGATACCCKG-3′)和1193R(5′-ACGTCATCCCCACCTTCC-3′)PCR 扩增 16S rRNA 的 V5~V7 片段。PCR 反应体系和反应程序参考顾美英等[28]方法。PCR 产物混合后用 2%琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收 PCR 产物,送至上海美吉生物医药科技有限公司进行高通量测序。

1.2.3 手掌参内生细菌群落多样性分析 测序后获得原始数据采用 FLASH 1.2.11 拼接和 FASTP 0.19.6 软件质控过滤。UPARSE 7.0.1090 对有效序列进行相似度大于 97%的操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)聚类。采用 RDP CLASSIFIER 2.11 与 SILVA 数据库(https://www.arb-silva.de/)进行比对及物种注释。通过 MOTHUR 1.30.2 分析 Alpha 多样性指数,包括 Shannon 指数、Simpson 指数、Chao 指数和 Sobs 指数,用 R 语言和 Mothur 计算绘制稀释曲线。采用 R 语言(version 3.3.1)进行群落组成、Venn 图和主坐标分析(Principal Coordinates Analysis, PCoA)。采用 Bray-Curtis 距离算法绘制热图。冗余分析方法(redundancy analysis,RDA)和相关性热图分析环境因子和细菌群落结构的相互关系。使用 PICRUSt 1.1.0 进行 KEGG 功能预测。

1.2.4 数据分析 土壤理化性质和 Alpha 多样性指数利用 SPSS 22.0 进行方差分析。采用 Duncan 新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 手掌参内生细菌 OTU 分析

所有手掌参样品中共获得 715 920 条有效序列,平均长度为 376 bp。样品测序的覆盖度均达到 98.69%以上,稀释曲线趋于平缓,表明测序数据达到饱和状态,能够全面覆盖所有内生细菌类群。操作分类单元(OTU)聚类获得2 365 个 OTUs。为分析 4 个采样点手掌参内生细菌 OTU 数量差异绘制韦恩图,由图 1A 可知,4 个采样点的样品中共有 OTU 数 744 个, OTU 数量最多的为 LH 采样点手掌参样品,最少的为 LD 采样点手掌参样品。LH 采样点根部 OTU 数量最多,为 1 006 个,而海拔较高的 LD 采样点手掌参根部和海拔较低的 FM 采样点手掌参根部 OTU 数量较少,分别为 684 个和 640 个,即随海拔升高 OTU 数量呈先增加再减少的趋势,LH 采样点的茎中 OTU 数量最多,为 1 092 个。FM 采样点叶中 OTU 数量最多,为 998 个。果荚中 OTU 数量随海拔的升高呈减少趋势。四种组织中,共有 OTU 数量为 414 个,根部 OTU 数量最多,其次为茎,果荚中最少。

2.2 手掌参内生细菌群落多样性分析

4 个采样点手掌参内生细菌群落多样性指数如表 2 所示,所有样品中 LH 采样点手掌参 LHS 中细菌 Sobs 指数和 Chao 指数均最高,而 LD 采样点手掌参 LDF 最低。FM 采样点手掌参 FMS 中 Shannon 指数最高,其次为 LHS 样品。海拔较低的 FM 采样点手掌参的茎、叶和果荚多样性指数均高于其他采样点。四种组织中,茎、叶和根中内生细菌群落 Sobs 指数、Chao 指数和 Shannon 指数均高于果荚。果荚中内生细菌群落多样性和丰富度均随海拔升高而降低,且 LD 采样点 LDF 中内生细菌丰富度和多样性均最低。不同生境下相同组织内生细菌群落多样性具有显著差异性,相同生境下不同组织内生细菌群落多样性也存在一定差异。

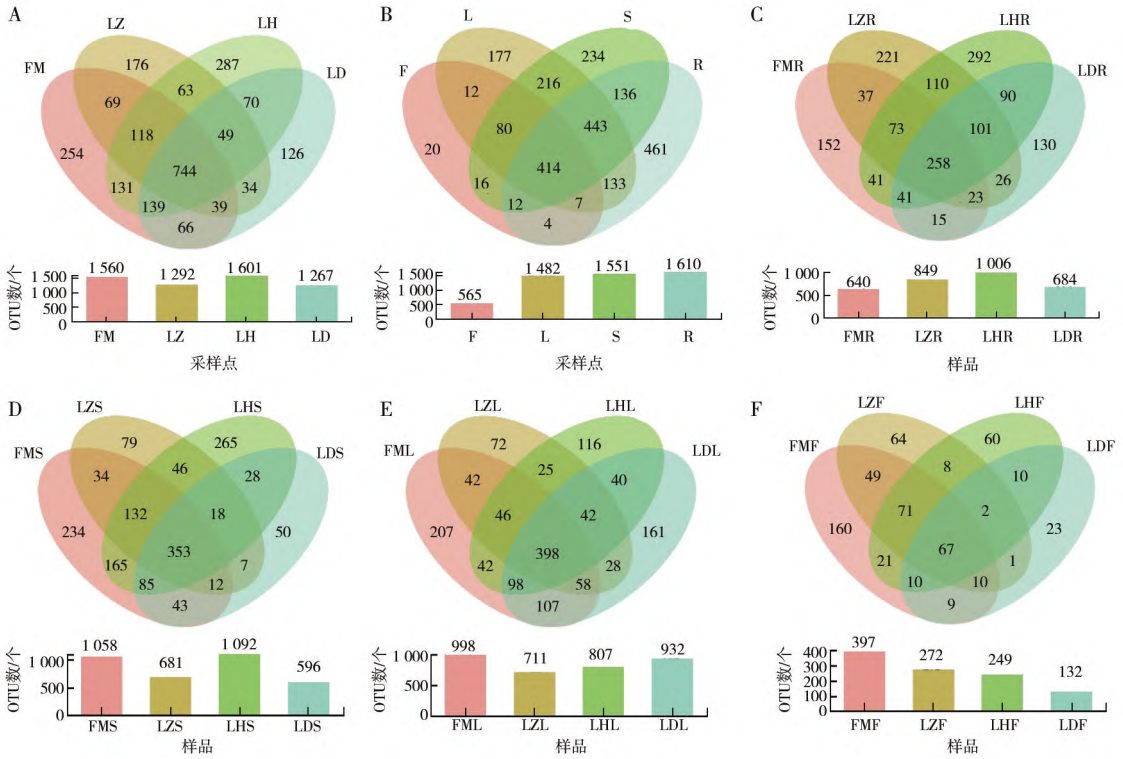


图 1　手掌参内生细菌 OTU 的韦恩图

Fig.1　Venn diagram of OTU from endophytic bacteria of *Gymnadenia conopsea*

A~F 分别表示 4 个采样点、四种组织根、茎、叶和果荚样品的 OTU 数量

A-F represented the number of OTUs for four sample points, four types of tissues, roots, stems, leaves, and fruit pods, respectively

表 2　手掌参内生细菌 Alpha 多样性分析

Table 2　Alpha diversity anasisly of endophytic bacteria from *Gymnadenia conopsea*

样品	Sobs 指数	Chao 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	均匀度指数	有效序列/条	覆盖度/%
FMF	237.00±17.08cd	309.83±54.58c	3.23±0.05bc	0.08±0.00b	0.59±0.00b	42 018	99.56
FML	631.67±119.68ab	823.26±83.71ab	4.43±0.17ab	0.03±0.00b	0.69±0.01ab	41 873	98.69
FMS	690.33±56.15a	841.61±151.69a	4.87±0.17a	0.02±0.00b	0.74±0.02a	31 348	98.86
FMR	329.33±47.43c	350.01±45.13c	4.19±0.46ab	0.06±0.05b	0.72±0.08ab	35 245	99.83
LZF	169.00±24.96cd	229.73±59.29c	2.55±0.44c	0.16±0.09b	0.50±0.08bc	44 020	99.65
LZL	453.67±24.01bc	605.02±37.68b	3.96±0.07ab	0.06±0.00b	0.65±0.01ab	41 505	99.02
LZS	402.33±145.29bc	532.37±138.37bc	2.83±1.22bc	0.28±0.27ab	0.47±0.18bc	33 196	99.16
LZR	435.33±171.96bc	508.50±145.14bc	3.57±1.05b	0.09±0.08b	0.59±0.14b	42 959	99.36
LHF	133.00±42.53d	195.76±34.00c	1.98±0.41cd	0.26±0.07ab	0.40±0.06c	35 975	99.65
LHL	500.67±25.54b	666.24±57.52ab	3.39±0.47bc	0.14±0.08b	0.55±0.07b	32 638	98.88
LHS	705.00±155.71a	855.87±139.77a	4.77±0.42a	0.03±0.02b	0.73±0.04ab	43 251	98.89
LHR	557.33±134.52ab	621.45±151.60b	4.21±0.16ab	0.07±0.03b	0.67±0.01ab	39 936	99.33
LDF	67.33±38.07d	153.03±11.37c	1.49±0.17d	0.34±0.07a	0.37±0.02c	38 224	99.77
LDL	549.00±118.44ab	714.12±179.56ab	3.92±0.50ab	0.06±0.03b	0.62±0.07ab	35 210	98.83
LDS	342.67±92.46bc	493.08±82.02bc	2.98±0.99bc	0.16±0.14b	0.51±0.15bc	26 574	99.17
LDR	349.00±133.41bc	434.14±106.54bc	3.72±0.56b	0.08±0.07b	0.65±0.12ab	38 041	99.45

注：数据为平均数±标准差，不同小写字母表示差异性显著（$P<0.05$），表 3 同

2.3 内生细菌群落组成分析

4 个采样点手掌参内生细菌隶属于 5 个菌门(图 2),包括变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)。其中优势菌门为变形菌门,在海拔较低的 FM 采样点手掌参样品中,其相对丰度为 76.66%,海拔较高的 LD 采样点手掌参样品中,其相对丰度为 90.27%,该菌门在不同海拔下相对丰度存在一定差异,且随着海拔升高相对丰度呈上升趋势。次优势菌门为放线菌门,相对丰度为 6.02%~16.89%,在海拔较低的 FM 和 LZ 采样点手掌参样品中,其相对丰度均高于海拔较高的 LD 采样点样品中的相对丰度。海拔较低的 FM 采样点手掌参样品中拟杆菌门的相对丰度为 2.99%,略高于其他 3 个采样点。所有样品物种组成(图 2B)表明,变形菌门在海拔较高采样点手掌参叶和果荚中相对丰度高于海拔较低的采样点,放线菌门则与之相反。变形菌门在果荚和根中相对丰度较高,放线菌门在茎和叶中相对丰度高于果荚和根。

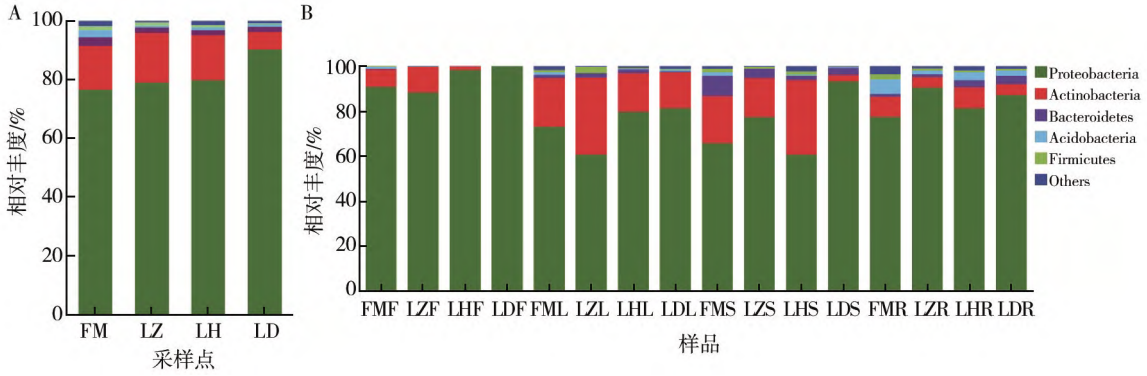


图 2 门水平上手掌参内生细菌的群落组成

Fig.2 Community composition of endophytic bacteria from *Gymnadenia conopsea* at phylum level

A:4 个采样点内生细菌的群落组成; B:所有样品内生细菌的群落组成

A:The community composition of endophytic bacteria in four points; B:The community composition of endophytic bacteria in all samples

所有样品中内生细菌在属水平上隶属于 62 个属,选取相对丰度前 30 个属的物种绘制热图(图 3),不同颜色代表各样品中内生细菌的相对丰度,样品聚类显示茎、叶和果荚聚类为一簇,表明内生细菌的群落结构和组成较为相似;海拔较高的 LH 和 LD 采样点果荚单独为一分支,与海拔较低的 FM 和 LZ 采样点的果荚存在一定的差异性;而根部独聚为一簇,与其他组织内生细菌群落结构差异显著。内生细菌优势菌属主要包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)和鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)。所有样品中,假单胞菌属在海拔较高的样品中相对丰度高于海拔较低采样点,其中果荚中该菌属相对丰度高于其他组织,而 LHF 样品中相对丰度最高。甲基杆菌属在叶片组织中的相对丰度最高,其次是果荚和茎,其中在 LHL 样品中最高。鞘脂单胞菌属在海拔较低果荚中相对丰度最高,根中最低。贪噬菌属(*Variovorax*)在茎、叶和果荚中的相对丰度高于根。根瘤菌属(*Rhizobacter*)在根中的相对丰度较高,而在海拔较高的 LH 和 LD 采样点的根中最高。四种组织中,茎和叶中微生物物种较丰富,根次之,而果荚中最低,存在组织差异性。生长在不同海拔条件下的同种组织的内生细菌群落结构差异也较为显著。

2.4 手掌参内生细菌群落结构的主坐标分析

利用 Bray-Curtis 距离算法对所有样品进行主坐标分析(PCoA),如图 4 所示,主成分 1(PCo1)的解释度为 24.51%,主成分 2(PCo2)的解释度为 19.45%,累积为 43.96%。图 4A 显示海拔较低的 FM 采样点 FMF 和 LZ 采样点 LZF 两个样品距离较近,而与海拔较高的 LH 采样点 LHF 样品和 LD 采样点 LDF 样品距离相对距离较远,表明低海拔果荚中内生细菌群落组成较为相似,而与高海拔果荚内生细菌存在差异性。FML、LZL 和 LHL 距离较近,均与 LDL 距离较远,即与 LDL 内生细菌物种组成存在一定差异。

4 个采样点根样品的距离较近,根部内生细菌物种组成受环境的影响较小。图 4B 显示叶、茎和果荚样品的距离较近,均与根样品的距离较远,且根较为集中,表明叶、茎和果荚样品中内生细菌群落组成较为相似,而与根的差异较大,不同组织内生细菌群落组成存在差异性,表明内生细菌的群落组成受到环境因素和组织类型的影响。

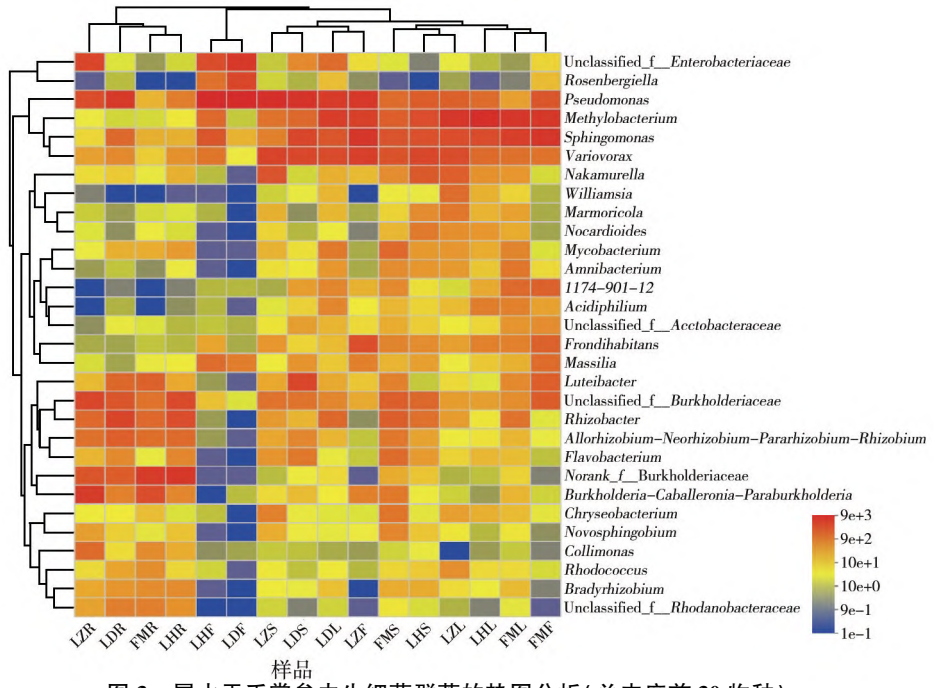


图 3 属水平手掌参内生细菌群落的热图分析(总丰度前 30 物种)

Fig.3 Heatmap analysis of endophytic bacteria community from *Gymnadenia conopsea* at genus levels (the top 30 species of total abundance)

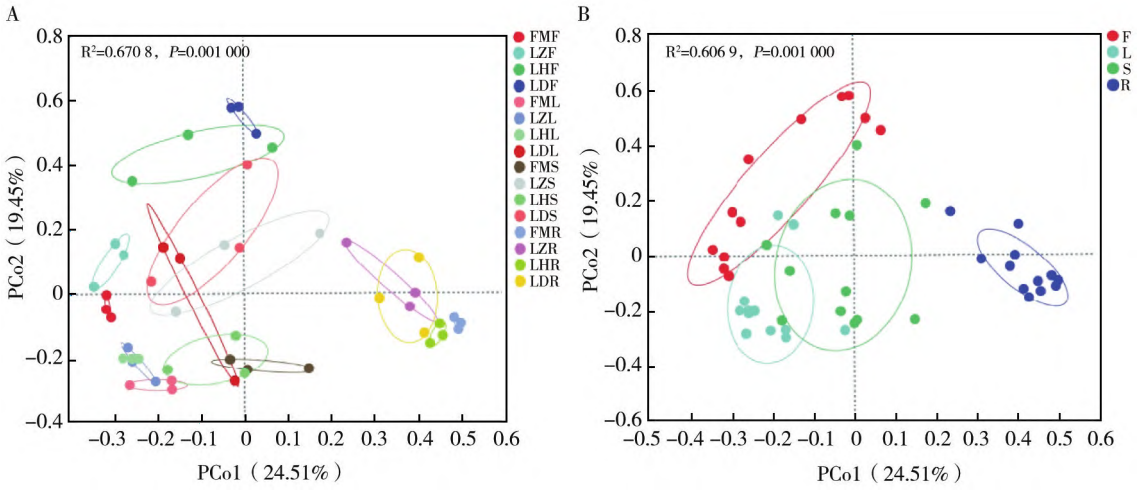


图 4 手掌参内生细菌群落组成的主坐标分析(OTU 水平)

Fig.4 Principal coordinates analysis (PCoA) of endophytic bacteria community from *Gymnadenia conopsea* (at the OTU level)

A:所有样品内生细菌群落组成的主坐标分析;B:四种组织内生细菌群落组成的主坐标分析

A:Principal coordinate analysis of the composition of endophytic bacterial communities in all samples; B:Principal coordinate analysis of the composition of endophytic bacterial communities in four different tissues

2.5 环境因子对手掌参内生细菌群落结构的影响

2.5.1 土壤理化性质 4 个采样点土壤理化性质检测结果如表 3 所示,土壤 pH 值 5.6~6.2,偏酸性,海拔较低的 FM 采样点 pH 值最小为5.6。海拔

较高的 LD 采样点有效磷(AP)显著高于其他采样点,达到 12.60 mg/kg。LZ 采样点土壤中总钾(TK)和有机质(SOM)均最高,分别为 9.03 g/kg 和 90.0 g/kg。FM 采样点中总磷(TP)最高,而 TK、SOM、AP 和电导率(EC)均低于其他采样点。4 个采样点的土壤中总氮(TN)和速效氮(AN)的含量均无显著性差异。

2.5.2　环境因子与手掌参内生细菌群落组成的相关性分析　基于 Bray-Curtis 距离算法的 db-RDA分析(distance-based redundancy analysis)探索样品、环境因子和微生物(优势菌属的相对丰度)三者之间的相互关系,分析影响样品微生物菌属分布的重要环境驱动因子。由图 5 可知,TP(r^2 = 0.216 5, P = 0.002)、TK(r^2 = 0.346 1, P=0.001)、pH(r^2 = 0.215 9, P = 0.003)和海拔(r^2=0.293 8, P=0.001)为主要影响环境因子,与鞘脂单胞菌属、贪噬菌属、假单胞菌属、甲基杆菌属和 unclassified_f_*Burkholderiaceae* 存在相关性。鞘脂单胞菌属和甲基杆菌属与 TP 呈正相关,而与 TK、pH 和海拔呈负相关。贪噬菌属和假单胞菌属均与 TK、pH 和海拔呈正相关,而与 TP 呈负相关。

表 3　4 个采样点的土壤特性

Table 3　The soil properties at the four sampling sites

采样点	TP/(g·kg^{-1})	TK/(g·kg^{-1})	TN/(g·kg^{-1})	AN/(g·kg^{-1})	pH	EC/(us·cm^{-1})	AP/(mg·kg^{-1})	SOM/(g·kg^{-1})
LD	0.62±0.04ab	8.32±0.61a	2.69±0.94a	0.20±0.00a	6.20±0.03a	32.60±1.80b	12.60±3.14a	74.30±2.79b
LH	0.68±0.09ab	6.88±0.35b	2.63±1.27a	0.21±0.01a	6.20±0.18a	52.00±1.60a	9.88±2.17b	78.10±2.74b
LZ	0.52±0.01b	9.03±0.21a	2.83±0.05a	0.21±0.01a	6.10±0.05a	48.60±2.26a	9.56±0.54b	90.00±1.83a
FM	0.71±0.01a	4.68±0.15c	2.31±0.03a	0.20±0.01a	5.60±0.06b	24.00±1.18c	9.26±0.90b	58.40±1.79c

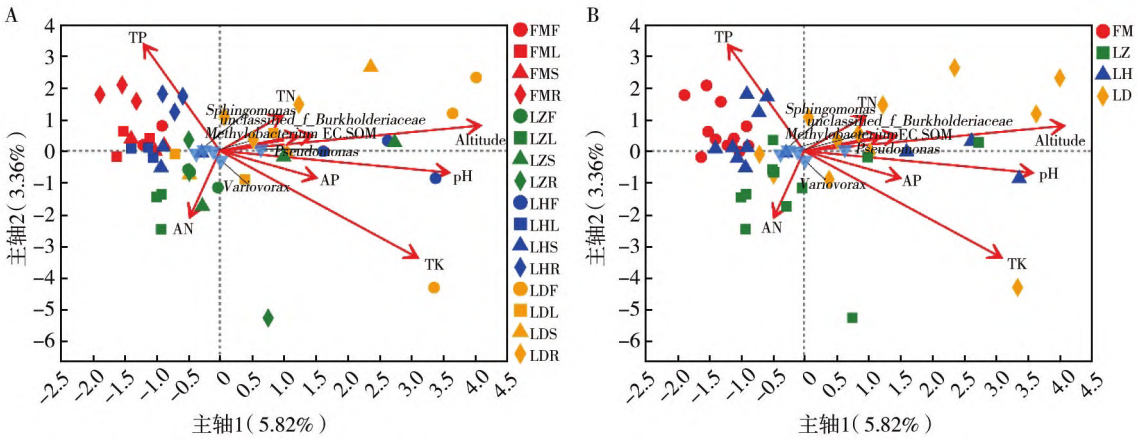


图 5　内生细菌与环境因子的冗余分析(OTU 水平)

Fig.5　Redundancy analysis of endophytic bacteria and environmental factors (the OTU level)

A:表示所有样品中内生细菌与环境因子的冗余分析;B:表示 4 个采样点的样品中内生细菌与环境因子的冗余分析

A:Redundancy analysis of endophytic bacteria and environmental factors in all samples; B:Redundancy analysis of environmental factors and endophytic bacteria from four sampling sites

采用 Spearman 相关系数在属水平进行相关性热图分析,由图 6 可知,海拔高度、TK、TP 和 pH 对内生细菌群落结构具有显著影响。优势菌属假单胞菌属与 TK、pH 和海拔高度呈极显著正相关(P<0.01),而与 TP 呈显著负相关(P<0.05)。Unclassified_f_*Enterobacteriaceae* 和 *Rosenbergiella* 均与 TK 呈极显著正相关(P<0.01),与海拔高度呈显著正相关(P<0.05)。pH 和海拔高度与金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)呈极显著负相关(P<0.01),与叶居菌属(*Frondihabitans*)和红球菌属(*Rhodococcus*)均呈显著负相关(P<0.05)。马赛菌属(*Massilia*)与 TP 呈显著正相关(P<0.05)。诺卡氏菌属(*Nocardioides*)与海拔高度呈显著负相关(P<0.05)。

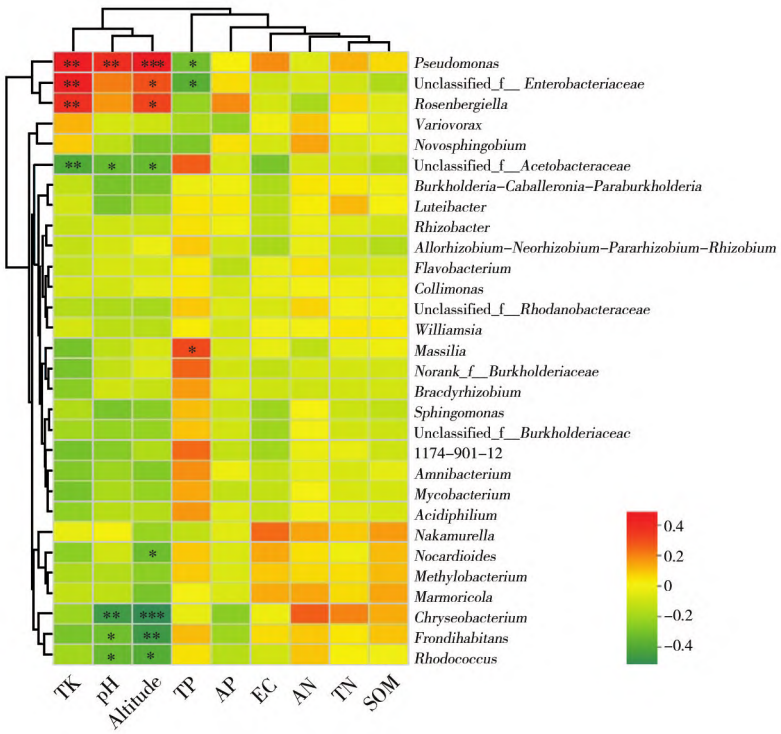


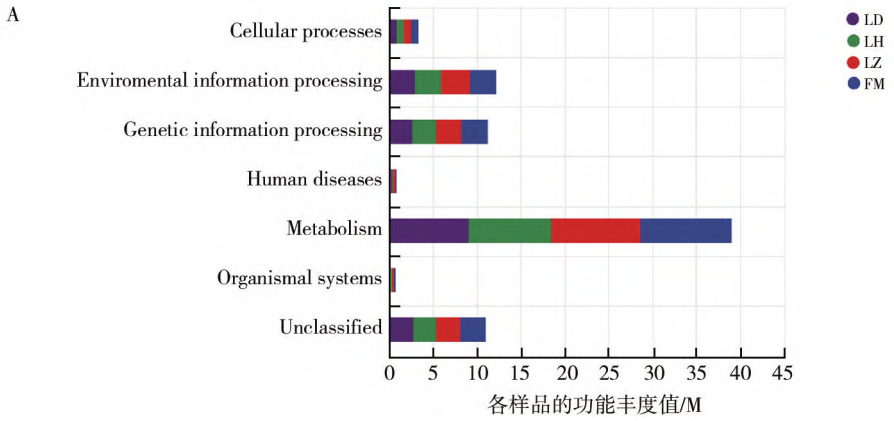
图 6 手掌参内生细菌群落结构与环境因子的相关性热图(总丰度前 30 物种)

Fig.6 Correlation heatmap of endophytic bacteria community structures from *Gymnadenia conopsea* and the environment factors (the top 30 species of total abundance)

* $0.01<P\leqslant0.05$, ** $0.001<P\leqslant0.01$, *** $P\leqslant0.001$

2.6 手掌参内生细菌功能预测

采用 KEGG 数据库比对,对不同海拔手掌参内生细菌进行 PICRUSt 功能预测。手掌参内生细菌主要富集的一级代谢通路为新陈代谢(Metabolism)、环境信息处理(Environmental information processing)、遗传信息处理(Genetic information processing)3 个代谢通路,其中新陈代谢通路的相对丰度最高(图 7A)。二级功能通路共有 41 个。新陈代谢通路主要包括氨基酸代谢、碳水化合物代谢、能量代谢、核苷酸代谢、聚糖生物合成与代谢、生物降解与代谢、辅助因子和维生素代谢、萜类和多酮类化合物代谢以及其他次生代谢物的生物合成等,其相对丰度均随着海拔升高而降低,但聚糖生物合成与代谢却呈先降低再升高的趋势。遗传信息处理通路主要包括复制与修复、转录、翻译及遗传信息处理等。环境信息处理通路主要为膜运输、信号转导、信号分子及其相互作用等。遗传信息处理、细胞运动和循环系统相对丰度均随着海拔升高呈先降低再升高的趋势,而其他功能通路均随海拔升高而降低(图 7B)。



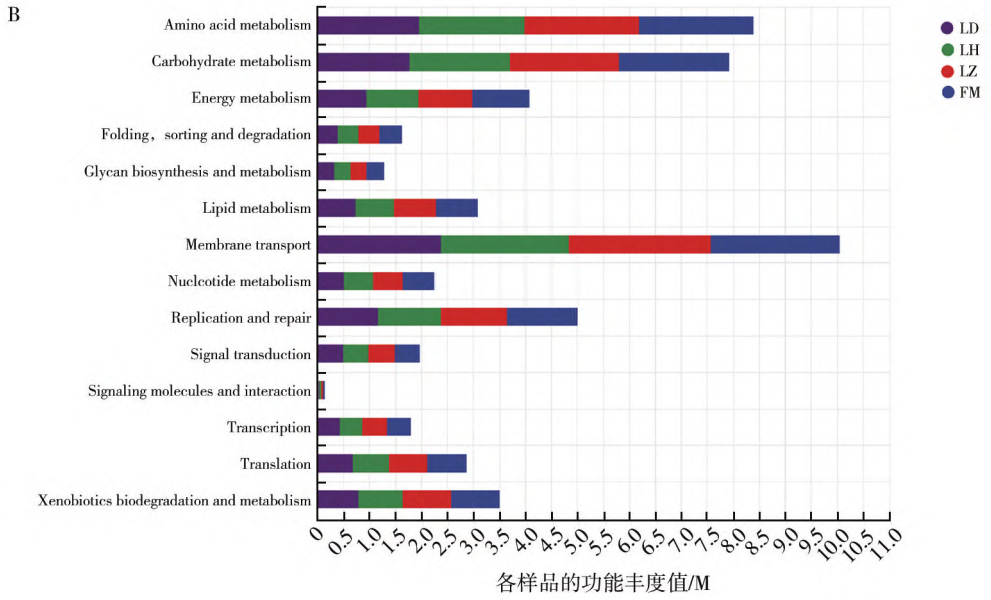


图 7　手掌参内生细菌 PICRUSt 功能预测

Fig.7　PICRUSt function prediction of endophytic bacteria of *Gymnadenia conopsea*

A 和 B 分别表示手掌参内生细菌的一级和二级 PICRUSt 功能预测

A and B represented the primary and secondary PICRUSt functional predictions of endophytic bacteria in *Gymnadenia conopsea*, respectively

3　讨　论

植物内生细菌是由环境中微生物入侵宿主，经过长期协同进化，广泛存在于植物组织和器官中的一类微生物，其影响着植物的生长发育[29]。植物内生细菌所处的生长环境一旦发生变化，会促使内生细菌群落演替更新，即内生细菌的群落结构变化受到环境和气候的影响[30-33]。本研究采用高通量测序技术分析不同生境下手掌参内生细菌的多样性。根据多样性分析，海拔较低的 FM 采样点手掌参的根、茎和叶中内生细菌的多样性指数均较高，果荚中内生细菌的多样性随海拔高度升高而降低。FM 采样点叶片中内生细菌的丰度高于其他采样点，而 LH 采样点的茎和根中内生细菌的丰度均较高。不同生境下手掌参不同组织的内生细菌多样性具有差异性，该现象也表明了由于植物各种器官所处的环境不同而导致植物内生细菌在不同器官中的分布存在一定的差异性[34]。

4 个采样点手掌参的内生细菌共隶属于 5 门 38 科 62 属。优势菌门为变形菌门，其次为放线菌门，该结果与王珊珊等[35]的研究结果较为一致。变形菌门普遍存在于植物体内，不仅有助于提高宿主（药用植物）有效物质的含量[36]，还有利于植物的生物固氮[37]和病虫害防治[38]。变形菌门的相对丰度随着海拔升高呈上升趋势，且在不同组织中其相对丰度均有差异，果荚和根中相对丰度较高。放线菌门可产生大量天然抗生素和生物活性化合物，有利于宿主植物的生长，能够提高宿主植物抵御逆境和抗病虫的能力，是重要的生防微生物[39-40]。放线菌门在海拔较低的 LZ 采样点样品中相对丰度最高，而在海拔较高的 LD 采样点样品中相对丰度最低。据报道，兰科植物的优势菌群为假单胞菌属[35,41]，与本研究结果一致。次优势菌群为甲基杆菌属、鞘脂单胞菌属和贪噬菌属。假单胞菌属不仅能分泌吲哚乙酸促进植物生长，还能生成抗生素显著提高植物的抗病性，且能产生对宿主兰科植物有益的相似代谢物[35]。高阳[42]研究表明金钗石斛中假单胞菌属与石斛碱含量呈正相关，本研究中低海拔 FM 采样点样品的内生细菌假单胞菌属相对丰度为 3.38%，而在海拔较高 LD 采样点样品为33.08%。此外，本研究中内生细菌与环境因子的冗余分析表明假单胞菌属与 TK、pH 和海拔高度呈极显著

正相关,而 4 个采样点中低海拔采样点(FM)样品的土壤 pH 值和 TK 含量最低且海拔也最低,LD 采样点样品的土壤 pH 值和 TK 含量最高且海拔也最高。因此,假单胞菌属相对丰度在低海拔 FM 样品中最低,在海拔较高 LD 采样点样品中最高。甲基杆菌属为次优势菌群,能够参与代谢合成、生物修复及促进植物生长等[43]。鞘脂单胞菌属在低海拔手掌参中的相对丰度高于高海拔,其在果荚样品中高于其他组织,该菌属不仅有利于宿主药用植物有效物质含量的提高,还能促进种子萌发、植物生长和病害防治[43-44]。本研究还检测到根瘤菌属(*Rhizobacter*),据报道,根瘤菌属具有固氮功能,有利于兰科植物种子共生萌发时获得更多的营养[41]。大量研究表明,植物内生细菌通过产生代谢产物不仅能促进宿主植物的生长发育、抵御不良环境,而且可以影响药用活性成分的形成和积累[45-47]。因此,深入探索手掌参内生细菌的群落组成对筛选有益菌群和内生细菌次生代谢产物资源开发和利用具有重要作用。

植物生长的生态环境不同,内生细菌种群结构和分布也会存在一定差异[48],导致这种差异性的原因可能是由于不同海拔地区的气温及降水等环境因素差异造成了土壤微生物种群结构的不同,而植物内生细菌主要来源于土壤,内生细菌的群落结构与土壤微生物和植物根际微生物的群落结构有关[49]。有研究表明海拔和土壤理化性质如 pH、TN、TP 和有机碳等对土壤细菌群落结构有显著影响[50]。如海拔差异对西藏沙棘根瘤内生细菌有显著影响[21]。茉莉花植物内生细菌群落结构受土壤 TK、TP、TN 和 SOM 含量的影响[51]。本研究采用冗余分析和相关性热图均显示海拔、TK、TP 和 pH 对不同海拔下手掌参内生细菌的群落结构有显著影响,为主要影响环境因子,与优势菌群假单胞菌属、鞘脂单胞菌属、甲基杆菌属、贪噬菌属和 unclassified_f_*Burkholderiaceae* 存在显著相关性,这也可能是不同海拔下同种植物的优势菌群与宿主植物长期协同进化中逐渐形成的适应性特征[52]。

PICRUSt 功能预测分析发现不同海拔下手掌参内生细菌功能通路的相对丰度存在差异。新陈代谢通路中氨基酸代谢和碳水化合物代谢的相对丰度较高,该代谢通路能为植物提供营养物质,有利于植物的生长[53],氨基酸代谢也能提高植物的抗逆性[54]。此外,还发现生物降解与代谢、萜类、多酮类化合物的代谢和其他次生代谢物的生物合成等代谢通路,表明手掌参内生细菌可能参与了活性成分的合成,李莹等[54]也发现内生细菌具有参与植物次生代谢产物合成的能力。

参考文献:

[1] 李凤伟,彭梦黎,朱袁平,等.提取方法对手掌参多糖理化性质及抗氧化活性的影响[J].食品与发酵工业,2021,47(24):150-155.

[2] 阿拉坦存布尔,曹乌吉斯古楞,包金花,等.手参内生真菌及根际土壤真菌多样性研究进展[J].现代农业科技,2023,18(21):76-83.

[3] 尹秀,禄亚洲,张二豪,等.手掌参内生真菌及根际土壤真菌的群落组成[J].植物保护学报,2022,49(4):1102-1110.

[4] 杨爽,杨春蕾,李永霞,等.林芝地区野生手掌参生境土壤养分状况研究[J].西藏科技,2020,27(5):9-14.

[5] 薛诗意.基于秀丽隐杆线虫和 UPLC-QTOF-MS 研究手掌参抗衰老作用及成分[D].扬州:扬州大学,2023.

[6] 刘玉仙,王敏,张金魁,等.手参属藏药材研究进展及质量标记物预测分析[J].中国药物化学杂志,2024,34(2):139-156.

[7] 刘散丹,春香,马秀艳,等.手掌参延缓衰老及临床应用研究进展[J].中国美容医学,2022,31(2):178-181.

[8] 包金花,白永峰,曹乌吉斯古楞,等.手掌参的研究进展[J].华西药学杂志,2024,39(2):223-230.

[9] Shang XF,Guo X,Liu Y,et al.*Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br.: A systemic review of the ethnobotany, phytochemistry, and pharmacology of an important Asian folk medicine[J]. Frontiers in Pharmacology,2017,8:24.

[10] 殊秋丽,徐海燕,吴晓东,等.海拔和生长季节对高山嵩草叶、根生理特性的影响[J].兰州大学学报(自然科学版),2024,60(2):195-204.

[11] 朱平,陈仁升,宋耀选,等.祁连山中部 4 种典型植被类型土壤细菌群落结构差异[J].生态学报,2017,37(10):3505-3514.

[12] 李玉倩,马俊伟,高超,等.青藏高原高寒湿地春夏两季根际与非根际土壤反硝化速率及 nirS 型反硝化细菌群落特征分析[J].环境科学,2021,42(10):4959-4967.

[13] 厉桂香,马克明.土壤微生物多样性海拔格局研究进展[J].生态学报,2018,38(5):1521-1529.

[14] 何中声,谷新光,江蓝,等.戴云山南坡不同海拔森林土壤优势细菌群落特征及影响因素[J].北京林业大学学报,2022,44(7):107-116.

[15] 林惠瑛,周嘉聪,曾泉鑫,等.武夷山黄山松林土壤细菌群落特征沿海拔梯度的分布模式[J].生态学杂志,2022,41(8):1482-1492.

[16] 曹丽花,刘合满,杨红,等.色季拉山不同海拔土壤微生物及真菌群落组成特征[J].水土保持学报,2022,36(6):321-328.

[17] 赵柏霞,闫建芳.高通量技术分析“砂蜜豆”甜樱桃不同组织内生细菌多样性[J].中国农业科技导报,2023,25(3):66-77.
[18] Hernández-Soberano C, Ruíz-Herrera LF, Valencia-Cantero E. Endophytic bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 and *Bacillus methylotrop hicus* M4-96 stimulate achene germination, *in vitro* growth, and greenhouse yield of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) [J].Scientia Horticulturae,2020,26:109005.
[19] 杨凯元,韩玲娟,梁银萍,等.达乌里胡枝子产铁载体根瘤内生细菌的鉴定及其促生抗逆效应[J].微生物学通报,2023,50(10):4413-4432.
[20] 庞煜,马达,王波,等.高通量测序技术在植物内生菌领域研究中的应用[J].生物工程学报,2024,40(10):3395-3406.
[21] 张爱梅,韩雪英,张世虎,等.甘南高寒地区不同海拔西藏沙棘根瘤内生菌多样性[J].生物资源,2018,40(2):114-119.
[22] 宋庭宁,洪宗国,曹夕,等.6 种药用植物的 2 个组织的内生细菌多样性初步分析[J].绿色科技,2019(1): 1-4.
[23] Lin M, Xiong H,Xiang XC,et al.The effect of plant geographical location and developmental stage on root-associated microbiomes of *Gymnadenia conopsea*[J].Frontiers in Microbiology, 2020,11:1257.
[24] 杨爽,杨春蕾.环境因子对手掌参种群分布及生长的影响[J].贵州农业科学,2020,48(3):117-121.
[25] 孙媛媛,徐梦,李月芬,等.色季拉山不同深度土壤真菌多样性的海拔分布格局及其影响机制[J]. 土壤学报,2023,60(4):1169-1182.
[26] 付莉娇,李雪琴,范继辉,等.藏北高寒草原典型植物根际土壤细菌群落结构多样性及根系特征分析[J].草地学报,2022,30(5):1131-1140.
[27] 姜哲浩,周恒,张德罡,等.青藏高原不同海拔梯度黄花棘豆内生真菌多样性研究[J].草地学报,2019,27(6):1526-1536.
[28] 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.
[29] 王雁南,张珣.北京红地球葡萄内生菌的种群多样性分析[J].安徽农业科学,2016,44(3):13-15.
[30] 程龙媛,张国卉,孙燕,等.药用植物-内生菌-根际微生物互作研究进展[J].中草药,2024,55(15):5264-5273.
[31] 耿红,苗莉云,甘喆.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. .
[32] 朱伟垚,林梦婷,吴仲义,等.不同竹龄毛竹茎干内生细菌多样性与功能预测[J].四川农业大学学报,2022,40(5):766-774.
[33] 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.
[34] 吴庆珊,雷珣,雷友梅,等.金钗石斛内生细菌的组成及多样性分析[J].植物资源与环境学报,2018,27 (1):79-90.
[35] 王珊珊,刘佳萌,孙晶,等.不同栽培方式的铁皮石斛根、茎中内生细菌多样性及其抑菌活性研究[J].微生物学报,2021,61(12):4006-4025.
[36] 朱锦峰.天麻不同发育阶段的有效成分累积作用机制研究[D].北京:中央民族大学,2023.
[37] 顾嘉诚,王文敏,王振,等.玉米/大豆间作对根际土壤磷素生物有效性和微生物群落结构的影响[J].应用生态学报,2023,34(11):3030-3038.
[38] 熊悯梓,钞亚鹏,赵盼,等.不同生境马铃薯根际土壤细菌多样性分析[J].微生物学报,2020,60(11):2434-2449.
[39] Sharma M, Dangi P, Choudhary M. Actinomycetes: Source, identification, and their applications[J]. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2014, 3(2): 801-832.
[40] Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, et al. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria[J].Microbiology and Molecular Biology Reviews,2016,80(1):1-43.
[41] 张镇梁,王美娜,李健,等.管叶槽舌兰新鲜及硅胶干燥根样内生菌多样性研究[J].广西植物,2023,43(6):991-1005.
[42] 高阳.金钗石斛内生菌多样性与石斛碱含量的相关性研究[D].贵阳:贵州师范大学,2017.
[43] 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.
[44] Matsumoto H,Fan XY,Wang Y,et al.Bacterial seed endophyte shapes disease resistance in rice[J].Nature Plants, 2021, 7(1):60-72.
[45] 张礼,童文君,薛庆云,等.细茎石斛内生和根围细菌多样性及促生能力分析[J].植物资源与环境学报,2015,24(3):32-40.
[46] Tsavkelova EA, Egorova MA, Leontieva MR, et al. *Dendrobium nobile* Lindl. seed germination in cocultures with diverse associated bacteria[J].Plant Growth Regulation,2016,80(1):1-13.
[47] 郭顺星.药用植物内生真菌研究现状和发展趋势[J].菌物学报,2018,37(1):1-13.
[48] 江曙,钱大玮,段金廒,等.植物内生菌与道地药材的相关性研究[J].中草药,2008,39(8):1268-1272.
[49] 刘学周,赵智灵,李绍宾,等.西洋参内生菌群落结构与多样性[J].微生物学报,2015,55(3):330-340.
[50] 李伊凡,王俊伟,陈永豪,等.西藏岗巴拉山土壤细菌多样性海拔分布格局及其驱动因子[J].生态学报,2024,44(2):712-722.
[51] 陈梅春,朱育菁,刘波,等.基于宏基因组的茉莉花内生细菌多样性分析[J].热带亚热带植物学报,2018,26(6):633-643.
[52] 许国琪,刘怡萱,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.
[53] 卜宣尹,杨卫丽.黎药胆木内生细菌群落结构多样性研究及其基因功能预测分析[J].热带农业科学,2023,43(9):58-65.
[54] 李莹,钟海蓉,李奕松,等.基于高通量测序研究甘松根际细菌及药用部位内生细菌群落结构及多样性[J].中草药,2022,53(3):835-847.