宁夏枸杞叶不同生长时期内生细菌群落动态及其影响因素

苟 琪 吕 燕 张 涛 李靖宇 赵会君 刘建利*

(北方民族大学生物科学与工程学院, 国家民委生态系统建模和应用重点实验室, 银川 750021)

摘 要 为探究宁夏枸杞叶内生细菌群落随生长变化动态及其影响因素,利用高通量测序技术分析宁夏枸杞幼叶、成熟叶和老叶3个典型生长时期叶内生细菌群落,并通过典范对应分析和方差分解分析探究气候因子代表的宿主植物生活环境、叶光合参数代表的宿主器官生理状态、叶内微生物生长可利用营养物质代表的植物体内内生菌生存微环境等三类环境因子对叶内生菌群落动态变化的影响。结果表明:3个宁夏枸杞叶生长时期内生细菌共28个门、52个纲、118个目、249个科、503个属、738个种、978个OTUs,α多样性及丰富度以幼叶中最多,随着叶片生长而减少,至叶片成熟老化,保持在较低的水平;变形菌门γ-变形菌纲是3个生长时期枸杞叶片中的优势类群,但幼叶内生细菌中优势科属为黄单胞菌科食单胞菌属,成熟叶内生细菌优势科属为假单胞菌科假单胞菌属,老叶内生细菌优势科属为肠杆菌科泛菌属;成熟叶和老叶内生细菌OTU以继承前一个生长时期内生细菌OTU为主;叶内生细菌功能随叶片生长时期改变发生细微变化;不同生长时期影响叶内生细菌群落组成的环境因子不同,以叶内微生物生长可利用营养物质对宁夏枸杞叶内生细菌群落组成影响最大;宁夏枸杞叶内生细菌从各群落特征对不同叶生长时期内外环境变化做出响应,植物体内内生菌生存微环境是影响宁夏枸杞内生菌群落动态变化主要因素。

关键词 内生细菌; 群落特征; 环境因子

Dynamics and influencing factors of endophytic bacterial community in leaves of *Lycium barbarum* during different growth periods. GOU Qi, LYU Yan, ZHANG Tao, LI Jing-yu, ZHAO Hui-jun, LIU Jian-li* (*College of Biological Sciences and Engineering*, *North Minzu University*, *Key Laboratory of Ecosystem Modelling and Application*, *State Ethnic Affairs Commission*, *Yinchuan* 750021, *China*).

Abstract: To explore dynamics and influencing factors of endophytic bacterial community in leaves of *Lycium barbarum* at different growth stages, endophytic bacterial community in young, mature and old leaves of *Lycium barbarum* were examined using the high-throughput sequencing. Canonical correspondence analysis and variance partitioning canonical correspondence analysis were used to analyze the effects of three environmental factors on the dynamics of endophytic bacteria community, including the living conditions of host plants represented by climatic factors, the physiological status of host plant's organs represented by photosynthesis parameters, and the endophytic bacteria living micro-environmental condition in host plants represented by nutrients that can be utilized by microorganisms. The results showed that 28 phyla, 52 classes, 118 orders, 249 families, 503 genera, 738 species and 978 OTUs of endophytic bacteria were found during three growth periods. The alpha diversity and richness of OTU were the highest in the young leaves, decreased with the ages of leaves, and being at a relatively low level in mature and old leaves. The class γ-Proteobacteria of phylum Proteobacteria dominated the endophytic bacteria in the leaves. In addition, genus *Stenotrophomonas* in family Xanthomonas, genus *Pseudomonas*

北方民族大学研究生创新项目(YCX19107)、中国科学院西部之光人才培养项目(XAB2015A13)和国家自然科学基金项目(31460212)资助。
收稿日期: 2020-01-16 接受日期: 2020-05-22
*通讯作者 E-mail: LJL7523@126.com

in family Pseudomonadaceae, and genus *Pantoea in* family Enterobacter were dominant in young, mature, and old leaves, respectively. The endophytic bacteria OTUs in mature and old leaves were mainly inherited from the preceding growth period. The function of endophytic bacteria changed slightly with the growth stage of leaves. The environmental factors affecting the composition of endophytic bacterial community differed across growth stages, with foliar nutrients having the greatest impact. The endophytic bacteria in leaves of *Lycium barbarum* responded to the changes of *in vivo* and *in vitro* environment during different growth stages based on each characteristic of endophytic bacterial community. The living micro-environmental condition of endophytic bacteria in host plants was the main factor affecting the dynamics of endophytic bacterial community in leaves of *Lycium barbarum*.

Key words: endophytic bacteria; community characteristics; environmental factor.

植物内生细菌是指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的细胞间隙或细胞内的细菌(王志伟等,2015)。植物内生细菌作为植物微生物家族的重要成员,与宿主植物关系密切,部分植物内生细菌可以促进宿主植物生长(Latif *et al.*,2016;Santoyo *et al.*,2019)、防控植物病虫害(Pieterse *et al.*, 2014; Conrath *et al.*, 2015; Carrion *et al.*,2019)、提高植物抗逆性(Ullah *et al.*, 2019)、甚至可以作为植物生长的氮源(Beltrangarcia *et al.*,2014)。由于根是植物吸收水分、无机离子和营养物质的重要器官,目前内生菌的研究主要集中于根部。叶片作为光合作用的重要器官,其内生菌与叶表附生菌一起组成叶际微生物,响应植物叶片光合作用、蒸腾作用、叶部病虫害入侵等,而叶内生菌研究非常少(Hongwei *et al.*, 2017; White *et al.*, 2019)。

宁夏枸杞(*Lycium barbarum*)为茄科多年生木本植物,其果实(枸杞子)富含枸杞多糖、黄酮、甜菜碱等有效物质,具有良好药用价值,与林木模式生物杨树(Populus)类似,采用扦插繁殖,理论上更便于内生菌水平传播,在道地产区长达600多年种植历史中,理论上内生菌与宁夏枸杞应已形成高度专性的共生机制,但目前对于宁夏枸杞内生菌的研究仅仅停留在分离培养和功能菌株筛选方面(刘建利等,2011;徐海燕等,2013;杜晓宁等,2015a;杜晓宁等,2015b;祁鹤兴等,2015;代金霞等,2017;徐全智等,2017;胡丽杰等,2019;胡丽杰等,2020)。本研究对不同生长时期宁夏枸杞叶片为材料,采用高通量测序技术分析叶内生细菌群落动态变化对不同叶生长时期的响应,并探讨了气候因子代表的宿主植物生活环境、叶光合参数代表的宿主器官生理状态、叶内微生物生长可利用营养物质代表的植物体内内生菌生存微环境等三类环境因子对叶内生菌群落影响,阐明影响宁夏枸杞叶片内生细菌群落构建的因素,为将内生菌应用于宁夏枸杞栽培提供支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

宁夏枸杞品种"宁杞一号",5年树龄,取自银川产区(宁夏枸杞道地产区之一)地矿局枸杞种植园(38°29′47″N、106°06′31″W),胸径相差不超过2 cm,冠幅相差不超过10 cm;每株取幼叶(2018年6月5号采样,叶面积2~3 cm^2,叶片颜色浅绿)、成熟叶(2018年8月份10号采样,叶面积5~6 cm^2,叶片颜色深绿)、老叶(2018年10月20号采样,叶面积5~6 cm^2,叶片颜色发黄)无病虫害的叶片10 g,均匀混合;每3棵树样品混样后四分法作为一个重复,一部分表面消毒处理后-80 ℃超低温保存用于测序,一部分表面冲洗处理自然干燥后测定营养物质含量,共3个生物学重复。

1.2 研究方法

1.2.1 气候因子的记录 从中国气象网上收集获得采样地每天的天气因子包括温度、湿度。

1.2.2 光合参数测定 选晴天从10:00到16:00采集样品,取植株顶端长势一致无遮挡叶片,采样同时用便携式光合作用测量仪(美国LI-COR, LI-6400P)测定不同采样时的净光合速率、蒸腾速率,每株树测量10个叶片,取平均值。

1.2.3 叶片中微生物可利营养物质含量的测定 采用茚三酮比色法进行叶片铵态氮的测定,采用水杨酸比色法(吕伟仙等,2004;马寰菲等,2020)进行叶片硝态氮的测定,采用蒽酮硫酸法(李超,2018)进行可溶性糖含量的测定。

1.2.4 叶内生细菌的高通量测序 在超净台中将

样品混匀,先用蒸馏水洗去表面灰尘等物质,然后分别放入试管中,加入 70%酒精 10 mL,浸泡 3 min,取出用无菌蒸馏水清洗样品 3 遍。再用 5%次氯酸钠浸泡 5 min,取出用无菌蒸馏水清洗样品 3 遍,无菌滤纸吸干,铝箔纸包裹,-80 ℃超低温冰箱保存用于高通量测序。

测序第一轮引物为 799f/1392r,第二轮引物为 799f/1193 (Bulgarelli *et al.*, 2012; Lundberg *et al.*, 2012; Bulgarelli *et al.*, 2015),由上海美吉生物医药科技有限公司在 Miseq PE300 平台完成;数据分析在在交互式微生物多样性云分析平台(www.major-bio.com,上海美吉生物科技有限公司)完成。

2　结果与分析

2.1　宁夏枸杞叶不同生长时期内生细菌多样性比较

宁夏枸杞叶生长的 3 个典型时期共获得 453039 条内生细菌 16S rDNA V_5-V_7区序列,每条序列平均长度 370.72 bp。α 多样性指数随叶片生长时期发生变化(表 1),幼叶内生细菌的多样性指数 Shannon 及丰富度指数 Sobs、Chao、ACE 显著高于成熟叶内生细菌和老叶内生细菌,而成熟叶内生细菌和老叶细菌这些指数无显著差异。因此,宁夏枸杞叶不同生长时期内生细菌以幼叶期的多样性及丰富度最多,随着叶片生长,多样性及丰富度在减少,成熟期以后内生细菌 OTU 保持在较低而稳定的水平。

2.2　宁夏枸杞叶不同生长时期内生细菌群落的物种组成比较

宁夏枸杞叶 3 个典型生长时期内生细菌共发现 28 个门,图 1 表示丰度高于 0.1%的门,变形菌门(Proteobacteria)是宁夏枸杞叶 3 个典型生长时期内生细菌的优势类群,但在不同生长时期叶中丰度不同,在幼叶内生细菌中为 62.09%、成熟叶内生细菌中为 88.82%、老叶内生细菌中为 76.79%。在幼叶内生细菌中,还有拟杆菌门(Bacteroidetes)(14.07%)、蓝菌门(Cyanobacteria)(8.24%)、厚壁菌门(Firmicutes)(7.42%)、放线菌门(Actinobacteria)(7.12%)丰度高于 3%;而成熟叶内生细菌中只有厚壁菌门(6.38%)和放线菌门(3.43%)丰度高于 3%;老叶内生细菌中只有放线菌门(22.82%)丰度高于 3%。从门物种组成可以看出,宁夏枸杞叶不同生长时期中以幼叶内生细菌门最丰富,成熟期和老化期内生细菌高丰度物种数目明显减少。物种差异分析表明丰度前15的门中只有异常球菌-栖热菌门

表 1　宁夏枸杞叶不同生长时期内生细菌多样性指数

Table 1　Alpha diversity index of endophytic bacteria in different growth stages of *Lycium barbarum*

样品(Samples)	Sobs	Shannon	Simpson	Chao	ACE
幼叶(Young leaves)	503.67±11.59 a	3.97±1.03 a	0.10±0.10 b	562.31±32.01 a	535.02±30.30 a
成熟叶(Mature leaves)	121.67±14.47 b	0.98±0.46 b	0.63±0.25 a	183.86±25.79 b	205.57±35.55 b
老叶(Old leaves)	126.67±6.11 b	1.60±0.34 b	0.39±0.16 ab	186.84±7.70 b	213.6±22.20 b

注:不同字母表示存在显著性差异(P<0.05)。

Note: Different letters indicate significant differences (P<0.05).

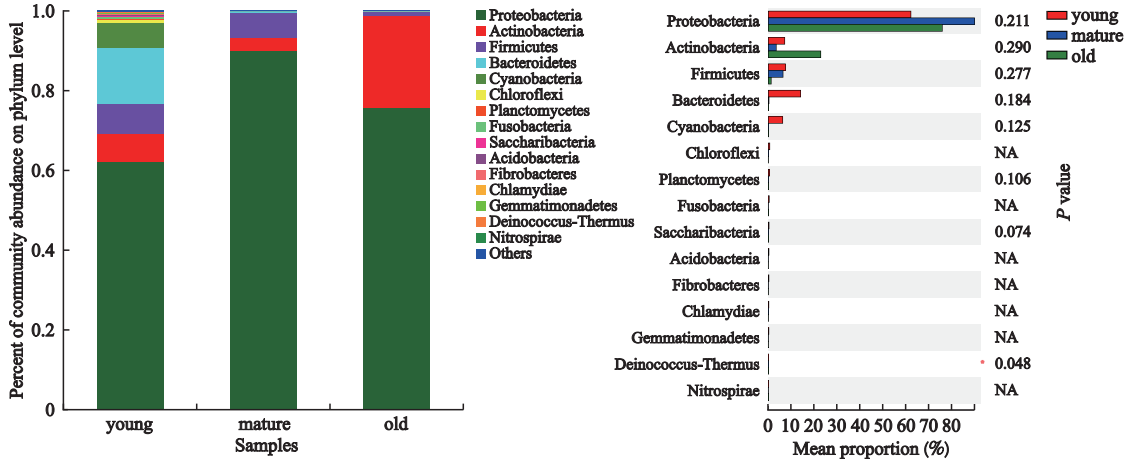

图 1　宁夏枸杞叶 3 个典型生长时期内生细菌门水平物种组成

Fig.1　Abundance of endophytic bacteria at phylum level in three typical growth stages of *Lycium barbarum*

(Deinococcus-Thermus)在 3 个叶生长时期样品中有显著差异($P=0.048$)。

在纲水平,宁夏枸杞叶 3 个典型生长时期内生细菌共发现 52 个纲,γ-变形菌(Gammaproteobacteria)是每个宁夏枸杞叶典型生长时期内生细菌的优势类群,但在不同叶生长时期内生细菌中丰度不同,在成熟叶内生细菌中最高(86.26%),老叶内生细菌中次之(74.82%),在幼叶内生细菌最低(37.88%)(图 2)。在幼叶内生细菌中 α-变形菌(Alphaproteobacteria)(12.41%)、β-变形菌(Betaproteobacteria)(10.21%)、拟杆菌纲(Bacteroidia)(8.89%)、放线菌纲(Actinobacteria)(7.13%)、蓝细菌(Cynobacteria)(6.25%)、芽孢杆菌纲(Bacilli)(4.46%)丰度也较高;而成熟叶内生细菌中芽孢杆菌纲(6.35%)和放线菌纲(3.43%)变成丰度第 2 和第 3 高的纲,与优势纲 γ-变形菌占成熟叶内生细菌的 96.06%;老叶中放线菌纲丰度更高,高达 22.82%,和优势纲 γ-变形菌一起占老叶内生细菌的 97.64%。与门水平类似,纲水平物种组成依然表明幼叶内生细菌最丰富,叶片成熟期和老化期高丰度物种数目依次减少。物种差异分析表明丰度前 15 的纲中 β-变形菌(Betaproteobacteria)($P=0.023$)、鞘脂杆菌纲(Sphingobacteriia)($P=0.045$)、Phycisphaerae 纲($P=0.023$)在 3 个叶生长时期样品中有显著差异。

在科水平,宁夏枸杞叶 3 个典型生长时期内生细菌共 249 个科,3 个宁夏枸杞叶典型生长时期内生细菌优势类群不同(图 3),黄单胞菌科(Xanthomonadaceae)为幼叶内生细菌中优势类群(32.77%),其余的科丰度均低于 10%;成熟叶内生细菌优势类群为假单胞菌科(Pseudomonadaceae),

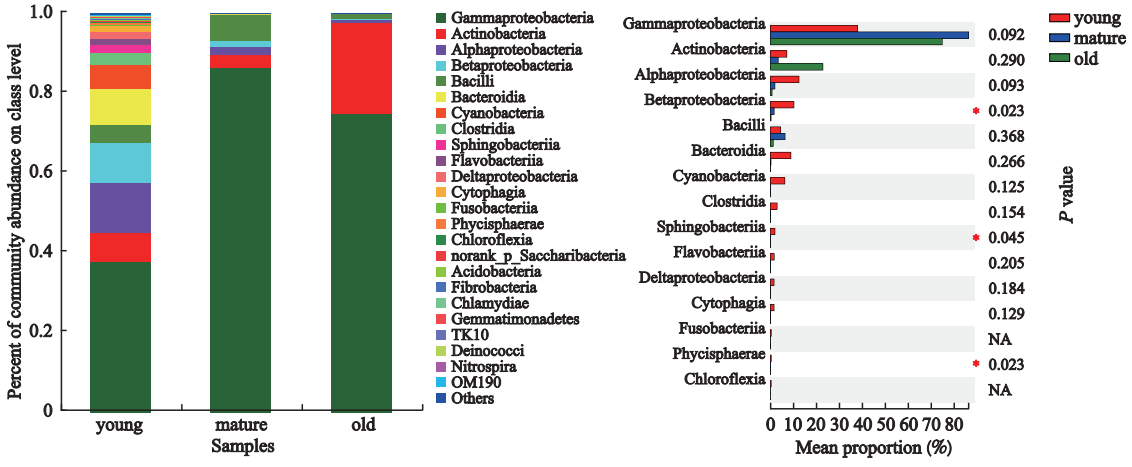

图 2 宁夏枸杞叶 3 个典型生长时期内生细菌纲水平物种组成

Fig.2 Abundance of endophytic bacteria at class level in three typical growth stages of *Lycium barbarum*

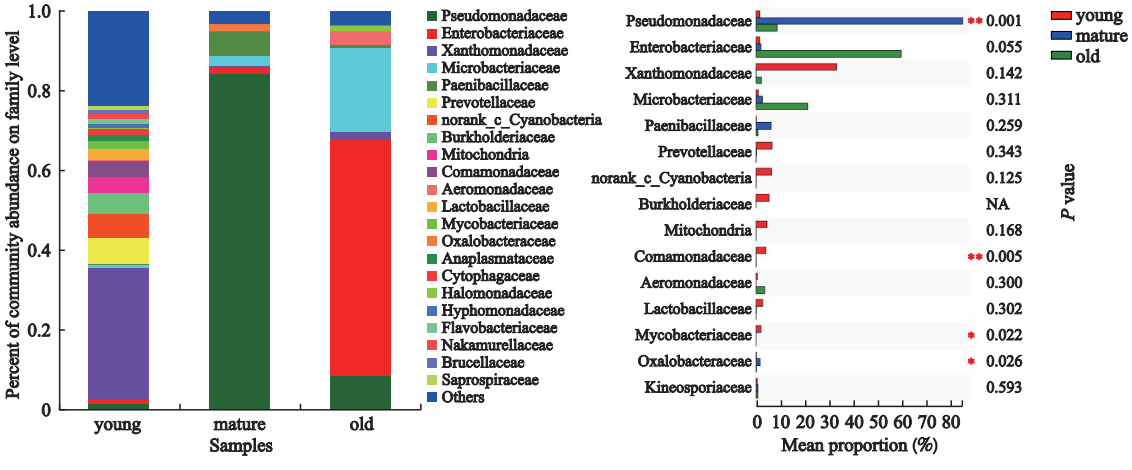

图 3 宁夏枸杞叶 3 个典型生长时期内生细菌科水平物种组成

Fig.3 Abundance of endophytic bacteria at family level in three typical growth stages of *Lycium barbarum*

丰度高达 84.35%,其余的科丰度也均低于 10%;老叶内生细菌中肠杆菌科(Enterobacteriaceae)(59.30%)为优势类群,微杆菌科(Microbacteriaceae)次之,丰度高达 21%,而成熟叶内生细菌的优势类群——假单胞菌科(Pseudomonadaceae)在老叶内生细菌中丰度下降到 8.46%。物种差异分析表明,丰度前 15 的科中假单胞菌科(Pseudomonadaceae)($P=0.001$)、丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)($P=0.005$)、分枝杆菌科(Mycobacteriaceae)($P=0.022$)、草酸杆菌科(Oxalobacteraceae)($P=0.026$)在 3 个叶生长时期样品中有显著差异。

在属水平,宁夏枸杞叶 3 个典型生长时期内生细菌共 503 个属,不同叶生长时期内生细菌优势属不同(图 4),食单胞菌属(*Stenotrophomonas*)为幼叶内生细菌中优势属(25.39%),藤黄色杆菌属(*Luteibacter*)、蓝细菌(norank_c__Cyanobacteria)、普雷沃菌属(*Prevotella*)紧随其后,丰度在 5%~10%;而假单胞菌属(*Pseudomonas*)为成熟叶内生细菌优势属(84.35%),泛菌属(*Pantoea*)则是老叶内生细菌优势属(58.04%),假单胞菌属位于泛菌属和短小杆菌属(*Curtobacterium*)(17.92%)之后,成为老叶内生细菌中丰度第三的属(8.46%)。物种差异分析表明,丰度前 20 的属中假单胞菌属(*Pseudomonas*)($P=0.001$)、冰冻小杆菌属(*Frigoribacterium*)($P=0.002$)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)($P=0.022$)、马赛菌属(*Massilia*)($P=0.026$)在 3 个叶生长时期样品中有显著差异。

在 OTU 水平,宁夏枸杞叶 3 个典型生长时期内生细菌共 978 个 OTUs(图 5)。共有 OTU 分别占 3 个宁夏枸杞叶典型生长时期内生细菌 OTU 总数的 10.22%、44.55%和 47.24%;在成熟叶内生细菌和老叶内生细菌中,共有 OTU 占绝大部分,特有 OTU 分别只占 10.00%和 5.53%;OTU 总数、特有 OTU 数目、特有 OTU 占总百分比,都以幼叶内生细菌最高。17.74%幼叶内生细菌 OTU 继续出现在成熟叶内生细菌 OTU 中,占成熟叶内生细菌 OTU 的 77.25%,57.35%成熟叶内生细菌 OTU 出现在老叶内生细菌 OTU 中,占老叶内生细菌总 OTU 的 60.80%,且有 80.90%老叶内生细菌 OTU 与幼叶内生细菌 OTU 相同。因此,宁夏枸杞叶内生细菌群落组成处于一个动态变化中,成熟叶内生细菌和老叶内生细菌 OTU 一部分继承自前一个生长时期内生细菌 OTU,一部分从外部环境中侵入,本实验结果显示以继承前一个生长时期内生细菌 OTU 为主,外部来源所占比例较低,而这两部分的绝对比值,取决于叶本身的生理状态和其他环境因子影响。

物种共现性网络表面,OTU24、OTU57、OTU64、OTU977 是网络中最重要的节点(图 6),与 3 个生长时期样品密切相关,OTU24 是短小杆菌属(*Curtobacterium*),OTU57 和 OTU977 是假单胞菌(*Pseudomonas*)、OTU64 是冰冻小杆菌属(*Frigoribacterium*),它们构成宁夏枸杞叶内生细菌的核心微生物组。

2.3　宁夏枸杞叶不同生长时期内生细菌样本聚类

将所有样本根据内生细菌采用 Bray-Curtis 距离

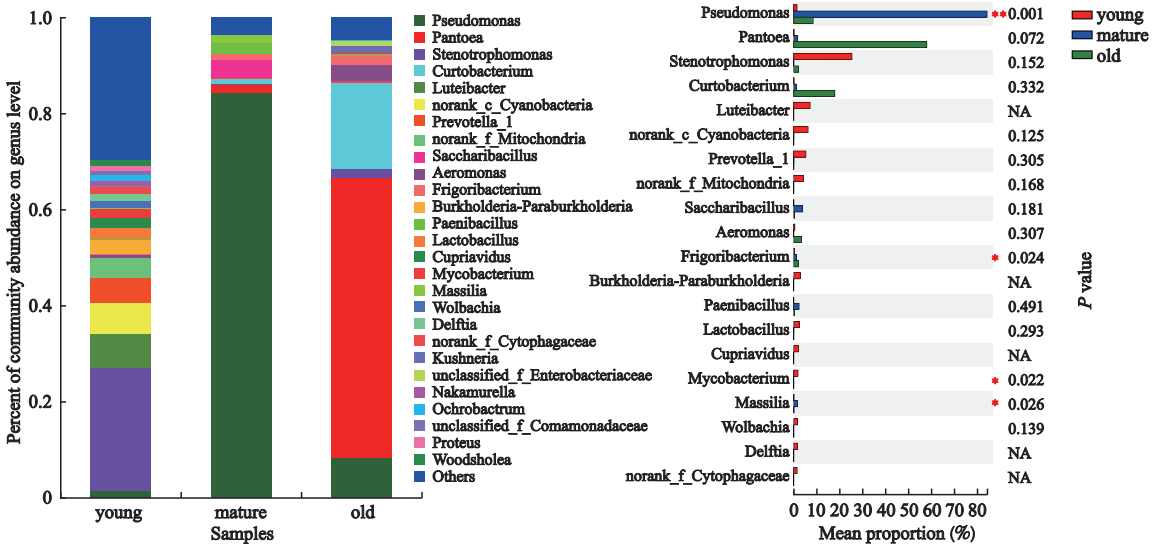

图 4　宁夏枸杞叶 3 个典型生长时期内生细菌属水平物种组成

Fig.4　Abundance of endophytic bacteria at genus level in three typical growth stages of *Lycium barbarum*

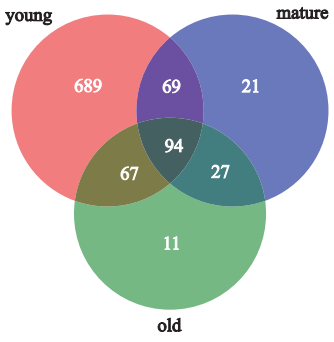

图 5 宁夏枸杞叶 3 个典型生长时期内生细菌 OTU 水平韦恩图

Fig.5 Venn of endophytic bacteria at OTU level in three typical growth stages of *Lycium barbarum*

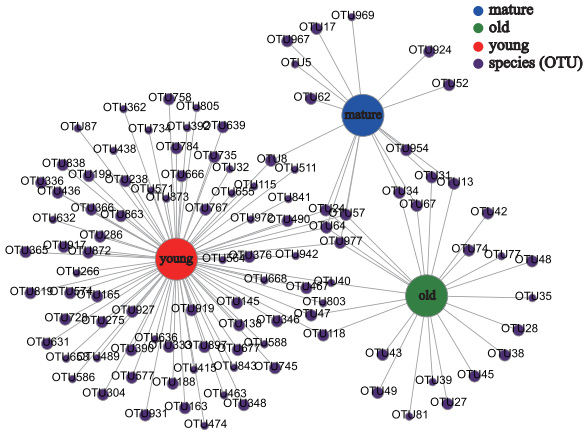

图 6 宁夏枸杞叶内生细菌 OTU 和样品共现性网络

Fig.6 Co-occurrence patterns of endophytic bacteria at OTU level in different growth stages of *Lycium barbarum*

聚类,结果如图 7,3 个叶生长时期内生细菌样品明显区分,同一时期的样品聚为一个分支,但成熟叶内生细菌和老叶内生细菌之间的关系要近于成熟叶内生细菌和幼叶内生细菌之间的关系。ANOSIM分析表明,组间差异较显著($P = 0.001$);PERMANOVA也显示组间差异较显著($R^2 = 0.76$, $P = 0.003$)。

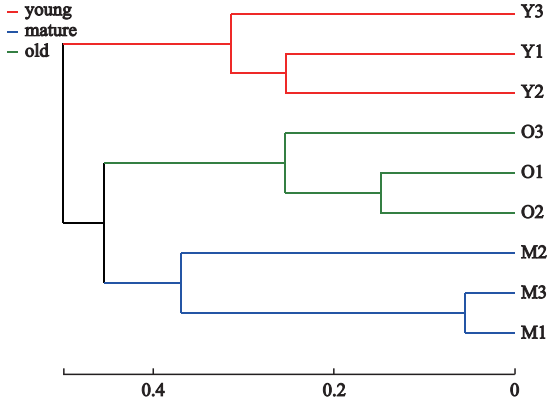

图 7 基于 OTU Bray-Curtis 距离的样本聚类图

Fig.7 Cluster of samples based on endophytic bacteria OTU level

2.4 环境因子对宁夏枸杞叶内生细菌群落动态变化的影响

用 CCA/RDA 分析环境因子、样本、菌群(丰度前 5 的属)三者间的关系或者两两之间的关系(图 8)。幼叶内生细菌群落组成及其优势属——嗜单胞菌属(*Stenotrophomonas*)和丰度第二属——藤黄色杆菌属(*Luteibacter*)与平均湿度、叶片中可溶性糖含量显著负相关,老叶内生细菌及其优势属——泛菌属(*Pantoea*)和丰度第二属——短小杆菌属(*Curtobacterium*)与铵态氮、硝态氮密切正相关,成熟叶内生细菌及其优势属——假单胞菌属(*Pseudomonas*)则与平均温度、平均湿度、叶片中可溶性糖含量、光合速率、蒸腾速率等大多数环境因子正相关。表明不同生长时期影响叶内生细菌群落组成的环境因子不同。

在门水平方差分解分析(VPA)分析平均温度和湿度代表的气候因子,净光合速率和蒸腾速率代表的叶片光合参数,叶片内铵态氮含量、硝态氮含量、可溶性糖含量代表的叶内微生物生长可利用营养物质对宁夏枸杞叶内生细菌群落组成的影响大小,总解释度为 93.36%,其中叶片内微生物生长可利用营养物质单独解释度最高(54.78%,图9)。因

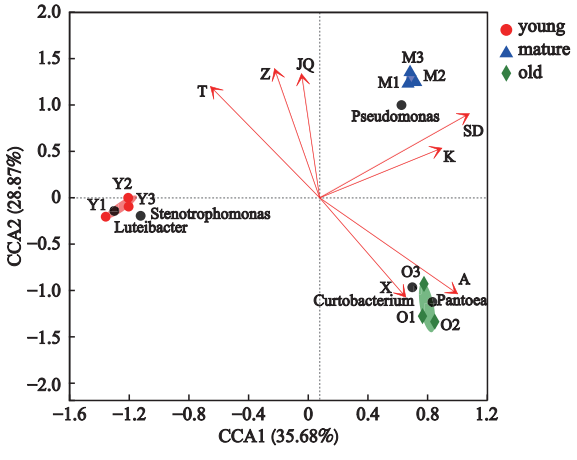

图 8 宁夏枸杞叶 3 个典型内生细菌与不同环境因子的相关性

Fig. 8 Correlation between endophytic bacteria in three typical growth stages of *Lycium barbarum* and different environmental factors

注:T.平均温度,SD.平均湿度,JQ.光合速率,Z.蒸腾速率,A.铵态氮,X.硝态氮,K.可溶性糖。

Note: T. average temperature; SD. average humidity; JQ. photosynthetic rate; Z. transpiration rate; A. ammonium nitrogen; X. nitrate nitrogen; K. soluble sugar.

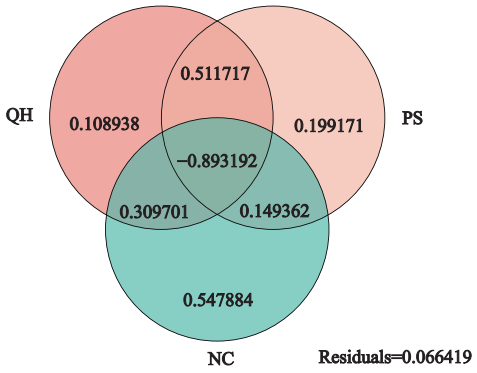

图 9　不同环境因子对宁夏枸杞叶不同生长时期内生细菌群落组成的解释度

Fig.9　Correlation between endophytic bacteria in different growth stages of *Lycium barbarum* and different meteorological factors

注：QH.气候因子，PS.光合参数，NC.叶片内微生物可利用营养物质含量。

Note: QH, climatic factors; PS, photosynthetic parameters; NC, nutrient content available for microorganisms in leaves.

此，本实验所涉及的 3 种影响内生细菌组成的因素（气候因子代表的体外环境、光合参数代表的宿主生理状态及叶内微生物生长可利用营养物质代表的植物体内内生菌生存的微环境）之中，以植物体内内生菌生存的微环境对宁夏枸杞叶内生细菌群落组成影响最大。

3　讨　论

相比传统的分离培养法，基于宏基因组 DNA 的高通量测序技术能更好地揭示样品中微生物多样性，已被广泛应用于微生物生态学研究领域（耿显胜等，2018；Fadiji *et al.*，2020）。Ding 等（2016）利用高通量测序技术，发现变形菌门（Proteobacteria）是多年生豚草（*Ambrosia psilostachaya* DC.）、马利藻华（*Asclepias viridis*）、柳枝稷（*Panicum virgatum* L.）、蓝刚草（*Sorghastrum nutans*）和芸香（*Ruellia humilis*）等 5 种植物叶中的优势门，拟杆菌门（Bacteroidetes）和放线菌门（Actinobacteria）丰度也较高，α-变形菌纲（Alphaproteobacteria）为优势纲。Ren 等（2015b）发现，变形菌门（Proteobacteria）肠杆菌科（Enterobacteriaceae）和黄单胞菌科（Xanthomonadaceae）是水稻叶中的优势科。Yu 等（2015）发现，变形菌门（Proteobacteria）、放线菌门（Actinobacteria）、拟杆菌门（Bacteroidetes）和厚壁菌门（Firmicutes）是各个生长阶段甜叶菊（*Stevia rebaudiana*）叶中丰度较高的门。本实验也利用高通量测序技术，发现变形菌门 γ-变形菌是叶、成熟叶和老叶宁夏枸杞叶片中的优势门纲，在门水平叶内生细菌优势物种与前人研究相似，而纲水平依据不同宿主植物有所不同。

关于植物内生细菌的来源，许多学者认为，一种途径是经过垂直传播，母本植物部分内生细菌可以通过维管束系统进入种子，或通过禾谷类花粉通道、成熟种子的种脐、种皮的裂缝开口、种皮背部索状细胞和种脊进入种子，成为种生内生细菌，它们往往是下一代植物新植株内生细菌的重要来源（冯永君等，2001；路国兵等，2007）；另一种途径是土壤和空气、植物表面的细菌通过叶上气孔、水孔以及茎上的皮孔、蜜腺、胚根和次生根发生处等自然孔口，根在土壤中伸展时造成的持续不断的擦伤口、以及雨水或冰雹和收割多年生植物等造成的机械损伤等伤口进入植物体内，利用某些酶类或物理作用通过皮层间隙向纵深进入，侵入中柱，随后进入导管，借着蒸腾作用向植物的其他部位扩展（路国兵等，2007），有些内生细菌可以再回到空气中，通过空气运动重新分布到植物叶茎等处，再通过气孔、水孔、皮孔等回到植物体内（冯永君等，2001）。本研究也发现，有部分宁夏枸杞内生细菌来自外部环境，但在成熟叶和老叶内生细菌中只占小部分，其大部分内生细菌主要来自前一个生长时期。

研究发现，植物内生细菌群落变化动态受到宿主体内外环境的影响（Edwards *et al.*，2015），包括宿主植物种类（Shen *et al.*，2015；Ding *et al.*，2016）、宿主植物基因型（Marques *et al.*，2015；Rodriguezblanco *et al.*，2015）、宿主植物组织器官（Hameed *et al.*，2015）、宿主植物生长发育阶段（Costa *et al.*，2012；Ren *et al.*，2015a；Yu *et al.*，2015）、生长季节（Shen *et al.*，2015；Ding *et al.*，2016）、地理位置（Edwards *et al.*，2015）、土壤类型（Edwards *et al.*，2015）、宿主植物营养状态（Hameed *et al.*，2015）、分离培养方法（Edwards *et al.*，2015）、施肥措施（Rodriguezblanco *et al.*，2015）等。本研究通过 CCA/RDA 和 VPA 分析探究气候因子代表的体外环境、光合参数代表的宿主器官组织生理状态、叶内微生物生长可利用营养物质代表的植物体内内生菌生存微环境等三类内外环境因子对叶内生菌群落动态变化影响大小，发现不同生长时期影响叶内生细菌群落组成的环境因子不同，以叶内微生物生长可利用营养物质对宁夏枸杞叶内生细菌群落组成影响最大，这是其他研究未涉及的。

由于内生菌所处环境比较特殊,涉及的环境因子应该主要是宿主植物细胞间或细胞内的微环境,而这些微环境因子由于原位检测技术落后,目前这方面的研究基本空白。本实验从微生物可利用的营养物质角度对植物体内内生菌生存的微环境与内生菌群落构建之间的关系进行了研究,但植物细胞细胞质被各种细胞器区室化,细胞膜和细胞壁的选择性通透性也造成细胞内外差异化,因此,本实验破碎叶片组织和细胞后测得的叶片微生物可利用的营养物质并不能完全代替内生菌所处部位的营养物质。由于内生菌与植物细胞物质、能量、信息的交换只会在特定区域进行,相对与宿主状态和宿主体外环境,内生菌在宿主植物体内微环境应该是研究内生菌群落构建机制的重点方向,各种环境因子原位检测技术的发展才能促进内生菌在宿主植物体内微环境的研究。

4 结 论

宁夏枸杞叶内生细菌OTU外部来源比例较低,多样性及丰富度在随叶片成熟、老化减少,其群落动态变化主要受植物体内内生菌生存微环境的影响。

参考文献

代金霞, 杜晓宁. 2017. 宁夏枸杞内生菌的抗菌和抗肿瘤活性研究. 中国中药杂志, **42**(11): 2072-2077. [Dai JX, Du XN. 2017. Antimicrobial and anti-tumor activities of endophytes from *Lycium barbarum* of Ningxia. *China Journal of Chinese Materia Medica*, **42**(11): 2072-2077.]

杜晓宁, 代金霞. 2015a. 宁夏枸杞内生菌抗氧化活性菌株的筛选与鉴定. 中国中药杂志, **40**(20): 3941-3944. [Du XN, Dai JX. 2015a. Screening and identification of antioxidant endophytes from *Lycium barbarum* of Ningxia. *China Journal of Chinese Materia Medica*, **40**(20): 3941-3944.]

杜晓宁, 徐惠娟, 黄盼盼, 等. 2015b. 宁夏枸杞内生细菌的多样性及其抑菌活性研究. 微生物学通报, **42**(9): 1779-1787. [Du XN, Xu HJ, Hang PP, *et al*. 2015b. Diversity and antimicrobial activity of endophytic bacteria isolated from *Lycium barbarum* of Ningxia. *Microbiology China*, **42**(9): 1779-1787.]

冯永君, 宋 未. 2001. 植物内生细菌. 自然杂志, **23**(5): 249-252. [Feng YJ, Song W. 2001. Endophytic Bacteria. *Chinese Journal of Nature*, **2**3(5): 5-8.]

耿显胜, 舒金平, 彭 瀚, 等. 2018. 基于高通量测序的3种竹子小枝真菌群落. 生态学杂志, **37**(11): 3493-3498. [Geng XS, Shu JP, Peng H, *et al*. 2018. Fungal communities in twigs of three bamboo species based on high-throughput sequencing technology. *Chinese Journal of Ecology*, **37**(11): 3493-3498.]

胡丽杰, 闫思远, 孙牧笛, 等. 2019. 宁夏枸杞深色有隔内生真菌的侵染特征及多样性. 微生物学通报, **46**(11): 2973-2984. [Hu LJ, Yan SY, Sun MD, *et al*. 2019. Infection characteristics and diversity of dark septate endophytic fungi isolated from *Lycium barbarum* in Ningxia. *Microbiology China*, **46**(11): 2973-2984.]

胡丽杰, 闫思远, 李嘉泓, 等. 2020. 枸杞内生真菌对胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 的拮抗作用及生防潜力. 植物保护, **46**(1): 125-133. [Hu LJ, Yan SY, Li JH, *et al*. 2020. Antagonism and control potential of endophytic fungi from *Lycium barbarum* against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Protection*, **46**(1): 125-133.]

李 超, 邵晓莉, 王 旭, 等. 2018. 海南岛热带云雾林植物枝条和叶片氮、磷、可溶性糖分配规律. 生态学杂志, **37**(5): 53-60. [Li C, Shao XL, Wang X, *et al*. 2018. Allocation of nitrogen, phosphorus and soluble sugar in twigs and leaves of tropical cloud forests in Hainan Island. *Chinese Journal of Ecology*, **37**(5): 53-60.]

刘建利. 2011. 宁夏枸杞内生真菌的分离及抗氧化活性的测定. 时珍国医国药, **22**(4): 857-860. [Liu JL. 2011. Isolation and determination of antioxidant activity of endophytic fungi from *Lycium barbarum*. *Lishizhen Medicine and Material Medica Research*, **22**(4): 857-860.]

路国兵, 张 瑶, 冀宪领, 等. 2007. 植物内生细菌的侵染定殖规律研究进展. 生物技术通报, (3): 88-92. [Lu GB, Zhang Y, Ji XL, *et al*. 2007. Recent advance on the approaching and colonization of endophytic bacteria. *Biotechnology Bulletin*, (3): 88-92.]

吕伟仙, 葛 滢, 吴建之, 等. 2004. 植物中硝态氮、铵态氮、总氮测定方法的比较研究. 光谱学与光谱分析, **24**(2): 204-206. [Lv WX, Ge Y, Wu JZ, *et al*. 2004. Study on the method for the determination of nitric nitrogen, ammoniacal nitrogen and total nitrogen in plant. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, **24**(2): 204-206.]

马寰菲, 解梦怡, 胡 汗, 等. 2020. 秦岭不同海拔森林土壤-植物-凋落物化学计量特征对土壤氮组分的影响. 生态学杂志, **39**(3): 749-757. [Ma HF, Xie MY, Hu H, *et al*. 2020. Effects of stoichiometric characteristics of soil, plant, litter on soil nitrogen components in different forests along an elevational gradient of Qinling Mountains. *Chinese Journal of Ecology*, **39**(3): 749-757.]

祁鹤兴, 贾 倩, 高 媛, 等. 2015. 宁夏枸杞果内生真菌多样性及其分布. 北方园艺, (13): 153-157. [Qi HX, Jia Q, Gao Y, *et al*. 2015. Diversity and distribution of endophytic fungi in *Lycium barbarum* fruit in Ningxia. *Northern Horticulture*, (13): 153-157.]

王志伟, 纪燕玲, 陈永敢. 2015. 植物内生菌研究及其科学意义. 微生物学通报, **42**(2): 349-363. [Wang ZW, Ji YL, Chen YG. 2015. Studies and biological significances of plant endophytes. *Microbiology China*, **42**(2): 349-363.]

徐海燕, 辛国芹, 陈梅楠, 等. 2013. 一株产纤维素酶枸杞内生菌的分离鉴定. 江西农业学报, **5**(4): 38-42. [Xu HY, Xin GQ, Chen MN, *et al*. 2013. Isolation and identification of an endogenetic strain producing cellulase from

wolfberry. *Acta Agriculturae Jiangxi*, **5**(4): 38-42.]
徐全智, 孙牧笛, 李　帆, 等. 2017. 宁夏枸杞内生真菌的分离及多样性分析. 北方园艺, (10): 103-109. [Xu QZ, Sun MD, Li F, *et al*. 2017. Separation and diversity analysis of endophytic fungi from *Lycium barbarum* L. in Ningxia. *Northern Horticulture*, (10): 103-109.]
Beltrangarcia MJ, White JF, Prado FM, *et al*. 2014. Nitrogen acquisition in *Agave tequilana* from degradation of endophytic bacteria. *Scientific Reports*, **4**: 6938.
Bulgarelli D, Garridooter R, Munch PC, *et al*. 2015. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host & Microbe*, **17**: 392-403.
Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, *et al*. 2012. Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, **488**: 91-95.
Carrion VJ, Perezjaramillo J, Cordovez V, *et al*. 2019. Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. *Science*, **366**: 606-612.
Conrath U, Beckers GJ, Langenbach CJ, *et al*. 2015. Priming for enhanced defense. *Annual Review of Phytopathology*, **53**: 97-119.
Costa LE, De Queiroz MV, Borges AC, *et al*. 2012. Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Brazilian Journal of Microbiology*, **43**: 1562-1575.
Ding T, Melcher U. 2016. Influences of Plant species, season and location on leaf endophytic bacterial communities of non-cultivated plants. *PLoS ONE*, **11**: e015089.
Edwards J, Johnson C, Santosmedellin C, *et al*. 2015. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**: E911-E920.
Fadiji AE, Babalola OO. 2020. Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: A review. *Journal of Microbiological Methods*, **170**: 105860.
Hameed A, Yeh M, Hsieh Y, *et al*. 2015. Diversity and functional characterization of bacterial endophytes dwelling in various rice (*Oryza sativa* L.) tissues, and their seed-borne dissemination into rhizosphere under gnotobiotic P-stress. *Plant and Soil*, **394**: 177-197.
Hongwei L, Carvalhais LC, Mark C, *et al*. 2017. Inner plant values: Diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, **8**: 2552.
Latif KA, Ahmed HB, Elyassi A, *et al*. 2016. Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solarium lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, **21**: 58-64.
Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, *et al*. 2012. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, **488**: 86-90.
Marques JM, da Silva TF, Vollu RE, *et al*. 2015. Bacterial endophytes of sweet potato tuberous roots affected by the plant genotype and growth stage. *Applied Soil Ecology*, **96**: 273-281.
Pieterse CM, Zamioudis C, Berendsen RL, *et al*. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, **52**: 347-375.
Ren G, Zhang H, Lin X, *et al*. 2015a. Response of leaf endophytic bacterial community to elevated CO_2 at different growth stages of rice plant. *Frontiers in Microbiology*, **6**: 855.
Ren G, Zhu C, Alam MS, *et al*. 2015b. Response of soil, leaf endosphere and phyllosphere bacterial communities to elevated CO_2 and soil temperature in a rice paddy. *Plant and Soil*, **392**: 27-44.
Rodriguezblanco A, Sicardi M, Frioni L. 2015. Plant genotype and nitrogen fertilization effects on abundance and diversity of diazotrophic bacteria associated with maize (*Zea mays* L.). *Biology and Fertility of Soils*, **51**: 391-402.
Santoyo G, Morenohagelsieb G, Orozcomosqueda MD, *et al*. 2015. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, **183**: 92-99.
Shen SY, Fulthorpe R. 2015. Seasonal variation of bacterial endophytes in urban trees. *Frontiers in Microbiology*, **6**: 427.
Ullah A, Nisar M, Ali H, *et al*. 2019. Drought tolerance improvement in plants: An endophytic bacterial approach. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103**: 7385-7397.
White JF, Kingsley KL, Zhang Q, *et al*. 2019. Review: endophytic microbes and their potential applications in crop management. *Pest Management Science*, **75**: 2558-2565.
Yu X, Yang J, Wang E, *et al*. 2015. Effects of growth stage and fulvic acid on the diversity and dynamics of endophytic bacterial community in *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Frontiers in Microbiology*, **6**: 867.

作者简介　苟　琪,女,1993 年生,硕士研究生,研究方向为微生物生态学。E-mail: gouqi660963@ foxmail.com
责任编辑　李凤芹