

不同生长时期青稞种子内生细菌群落动态研究

王兰 周迪 薛莹 王东旭 郭小芳 德吉*

(西藏大学, 青藏高原生物多样性与生态环境保护教育部重点实验室, 拉萨 840000)

摘要 青稞(*Hordeum vulgare* var. *coeleste*)是一种适应高寒环境的粮食作物,在农业可持续发展和生态系统稳定中发挥重要作用。为揭示不同生长时期青稞种子内生细菌群落动态变化规律,选取4个青稞品种,在不同生长阶段采集种子样品,并通过16S rRNA高通量测序技术解析种子内生细菌群落结构。采用Shannon指数、Simpson指数、Chao1指数和ACE指数评估青稞种子内生细菌群落 α 多样性,并分析群落组成及其随生长阶段的演替特征。结果表明:青稞种子内生细菌群落多样性在不同品种间相对稳定,但在灌浆期种子内生细菌群落 α 多样性显著低于其他生长阶段。变形菌门(Proteobacteria)在所有生长阶段均占主导地位,其他主要菌门包括拟杆菌门(Bacteroidota)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteriota),其相对丰度随生长阶段变化。种子期的优势菌属为不动杆菌属(*Acinetobacter*),灌浆期的优势菌属为芽孢杆菌属(*Bacillus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*),成熟期则以黄杆菌属(*Flavobacterium*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*)为主。基因型对青稞种子内生细菌群落结构具有显著影响,不同品种间群落组成存在差异。综上,该研究证实青稞种子内生细菌群落组成和多样性随生长阶段变化,并受基因型影响。不同阶段的群落组成和多样性特征表明,内生细菌可能通过促进养分吸收、合成植物生长激素、增强环境胁迫耐受性及抑制病原微生物等机制,在青稞生长发育过程中发挥重要的促进与保护作用。该研究可以为进一步解析其生态功能及分子调控机制提供科学依据。

关键词 青稞;种子;内生细菌;多样性;高通量测序

中图分类号: S181.4 文献标志码: A doi: 10.7525/j.issn.1673-5102.2025.06.013

Dynamics of Endophytic Bacterial Communities in Highland Barley Seeds at Different Growth Stages

WANG Lan ZHOU Di XUE Zhao WANG Dongxu GUO Xiaofang DE Ji*

(Key Laboratory of Biodiversity and Environment on the Qinghai-Xizang Plateau, Ministry of Education, Xizang University, Lhasa 840000)

Abstract Highland barley is a grain crop adapted to alpine environments and plays a crucial role in agricultural sustainability and ecosystem stability. To elucidate the dynamic changes in endophytic bacterial communities in highland barley seeds across growth stages, seed samples from four varieties were collected and analyzed using 16S rRNA high-throughput sequencing. Alpha diversity was assessed using Shannon, Simpson, Chao1 and ACE indices, and community composition and its succession across growth stages were analyzed. The results showed that the diversity of endophytic bacterial communities in highland barley seeds remained relatively stable among varieties but significantly decreased during the grain-filling stage. Proteobacteria was the dominant phylum at all growth stages, with other dominant phyla including Bacteroidota, Firmicutes, and Actinobacteriota. The relative abundance of these phyla varied significantly with growth stages and exhibited variety-specific characteristics. *Acinetobacter* was the dominant genus at the seed stage, *Bacillus* and *Pseudomonas* prevailed during the grain-filling stage, and *Flavobacterium* and *Lactobacillus* were most abundant at maturation. The results also indicated that genotype significantly influenced the structure of endophytic bacterial communities, resulting in compositional differences among varieties. The community composition and diversity characteristics at different developmental stages suggest that endophytic bacteria may play crucial

基金项目:国家重点研发计划政府间国际科技创新合作项目(2021YFE0113700)。

第一作者简介:王兰(1997—),女,博士研究生,主要从事微生物生态学研究。

* 通信作者: E-mail: dg971103@163.com。

收稿日期: 2024年9月29日。

promotive and protective roles in the growth and development of hulless barley by facilitating nutrient acquisition, synthesizing plant growth hormones, enhancing tolerance to environmental stresses, and suppressing pathogenic microorganisms, thereby providing a scientific basis for further elucidation of their ecological functions and molecular regulatory mechanisms.

Key words highland barley; seeds; endophytic bacteria; diversity; high-throughput sequencing

小麦 (*Triticum aestivum*)、水稻 (*Oryza sativa*)、玉米 (*Zea mays*) 和大麦 (*Hordeum vulgare*) 等植物的种子是人类直接或间接获得热量的重要来源^[1]。青稞 (*Hordeum vulgare* var. *coeleste*) 属于禾本科 (Poaceae) 大麦属 (*Hordeum*) 一年生草本植物^[2], 因颖果成熟时易脱出外壳又被称为裸大麦^[3]。青稞具有较强的耐寒性和对贫瘠环境的适应性, 是我国西北和西南地区, 特别是西藏的重要粮食作物, 在当地农业生产和生态系统中发挥关键作用^[4]。在全球气候变化加剧和土地资源日益紧张背景下, 挖掘粮食作物内生细菌微生物组的潜力和功能被认为是缓解全球粮食短缺的有效策略^[5]。然而, 根据 Michl 等^[6]的研究, 目前粮食作物微生物组学研究主要集中于小麦、水稻, 对于大麦的研究则相对匮乏。作为大麦的一个变种, 青稞内生细菌研究同样较为有限, 这制约了对其微生物群落特征及功能的深入认识。

植物内生细菌是指在某一阶段或整个生命周期内, 与植物共生并生活在植物内部的非致病细菌类群^[7]。它们在植物生长过程中发挥着多种关键作用, 包括营养获取、生长促进、增强环境胁迫耐受性及病虫害抗性等。例如, 根瘤菌 (*Rhizobium*) 和蓝细菌 (*Cyanobacteria*) 等内生细菌可与豆科 (Fabaceae) 植物形成共生结构, 将大气中的氮气转化为植物可利用的氮源^[8-10]。此外, 内生细菌能够产生磷酸酶, 分解有机磷化合物, 提高土壤中可溶性磷酸盐含量, 促进植物对磷的吸收^[11-12]。内生细菌还可合成生长素、细胞分裂素和赤霉素等植物激素, 促进植物生长发育^[13-14]。在环境胁迫条件下, 部分内生细菌展现出显著的耐盐性和耐旱性。例如, 慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium* spp.) 和 *Pantoea alhagi* 可分别提高植物的耐盐性和抗旱性^[15-16]。此外, 内生细菌还能通过优化植物微生物群落组成, 增强植物抗病性。研究^[17]表明, 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 通过重塑植物微生物群落组成, 有效防治柑橘黄龙病。此外, 越来越多的研究^[18-19]表明, 植物相关微生物, 特别是内生细菌, 在植物适应高原环境过程中也发挥着重要作用。因此,

研究青稞种子内生细菌群落特征, 不仅有助于理解植物内生细菌群落与宿主植物的相互作用机制, 还为提高青稞生产力和抗逆性提供新的途径。

研究^[20]表明, 植物内生细菌的组成及丰度受多种因素影响, 其中, 植物的基因型和发育阶段是影响内生细菌群落特征的主要生物因素。青稞微生物组研究主要集中于根际微生物群落及其在不同分布区域的品种差异性。巩文峰等^[21]通过扩增子测序分析了 45 个典型青稞种植区的根际土壤样本, 发现青稞根际细菌的优势门主要为放线菌门 (Actinobacteriota) 和变形菌门 (Proteobacteria), 并指出土壤中全钾含量是影响根际土壤细菌群落结构的最重要因子。Hao 等^[22]收集西藏 5 个主要农业区的 174 个青稞种子样本, 研究发现青稞种子的核心内生细菌群落优势类群以肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 等为主, 且这些优势类群在多个青稞品种中保持稳定。王艳梅^[23]在阿里地区 4 个农业县收集的 45 个青稞样本中也发现, 青稞种子内生细菌的优势门类包括变形菌门、放线菌门、厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidota) 和绿弯菌门 (Chloroflexi)。尽管现有研究揭示了青稞内生细菌的多样性和区域差异性, 但关于不同生长时期青稞内生细菌群落动态变化的研究仍较为匮乏, 亟需进一步探索。

本研究采用高通量测序技术, 系统分析不同生长时期不同品种青稞种子内生细菌群落特征, 探讨青稞生长时期与其种子内生细菌群落之间耦合关系, 旨在为青稞有益内生细菌的筛选、开发与应用提供理论依据与科学指导, 为提升青稞生产力、抗逆性提供新的策略与支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

青稞品种为“藏青 2000”“藏青 320”“喜马拉雅 22 号”“藏青 13-5171-7”, 试验材料均采自西藏自治区拉萨市林周县强噶乡的青稞试验田 (海拔 3 860 m, 29°57'19"N, 91°9'4"E)。2022 年 4 月, 收集播种前的青稞种子样本, 作为种子期样品; 7 月,

收集无明显病虫害的青稞穗部样本,作为灌浆期样品;9月,再次收集无明显病虫害的青稞穗部样本,作为成熟期样品。所有样本均密封于无菌样本袋中,带回实验室,随后送至广东美格基因科技有限公司,使用 Illumina NovaSeq 平台进行 16S rRNA 基因高通量测序。

1.2 DNA 提取及 PCR 扩增

将采集到的青稞种子表面依次用 75% 乙醇处理 1 min, 2% 次氯酸钠溶液处理 5 min, 再用无菌水冲洗 3 次。随后,将种子用液氮快速冷冻,以利于细胞破碎并防止 DNA 降解,然后使用无菌研钵研磨。利用 Plant DNA Extraction Mini Kit B (Mabio Co., 中国) 提取样本 DNA, 并使用 Thermo NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific Inc., 美国) 检测 DNA 的纯度和浓度。以基因组 DNA 为模板,使用带 barcode 的引物 515F (5'GTGYCAGCMGCCGCG-GTAA) 和 806R (5'GGACTACHVGGTTWTAA), 以及 TaKaRa Premix Taq[®] Version 2.0 (TaKaRa Biotechnology Co., Ltd., 中国) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系总容积为 50 μ L, 包括 23 μ L 超纯水、25 μ L Premix Taq [2 \times]、1 μ L 各引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 和 50 ng DNA 模板。PCR 循环程序为 94 $^{\circ}$ C 初始变性 5 min; 然后进行 30 个循环: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s; 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。每个样本进行 3 次重复,并将同一样本的 PCR 产物混合。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的片段长度和浓度。然后,使用 E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit (Omega, 美国) 回收 PCR 混合产物,并用 TE 缓冲液洗脱目标 DNA 片段。最后,将 PCR 产物发送至 Magigene Co., Ltd. (中国), 并使用 Illumina NovaSeq 6000 平台对构建的扩增子文库进行 PE250 测序。

1.3 测序数据分析

截去 barcode 和引物序列后的样本数据,使用 fastq (an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor, v0.14.1, <https://github.com/OpenGene/fastp>) 进行质量控制。然后,使用 USEARCH (v10, <http://www.drive5.com/usearch>) 的 'fastq_mergepairs' 命令对两端序列进行拼接,得到原始 Tags 数据 (Raw Tags)。拼接后的序列数据通过 UPARSE 方法进行 OTU 聚类,得到 OTU 代表序列和 OTU 表。随后,使用 QIIME2 (v2020.11.0) 中的 feature-classifier 插件,结合 SILVA 数据库^[24]对 OTU 代表序列进行物种注释,置信度阈值设为 0.8。在去除污染的 OTU (包括来

自叶绿体、线粒体及无法注释到界水平的 OTU) 后,按照最小样本序列数对数据进行均一化处理。测序原始数据已上传 NCBI 数据库 (登录号为 PRJNA1061645)。

1.4 数据处理

采用 R4.3.1 软件对试验数据进行统计分析。通过 "vegan" 包计算样本的 α 多样性指数 (Shannon 指数、Chao1 指数等), 并采用 Kruskal-Wallis 检验对不同生长时期的样本 α 多样性指数、优势门丰度进行统计学比较。使用 "venn" 包绘制 Venn 图以显示各生长时期的共有和特有种。采用 "ggplot2" 和 GraphPad Prism 9.0 进行数据可视化。

Shannon 指数 (H') 计算公式为

$$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i \quad (1)$$

式中: P_i 表示第 i 物种的相对丰度; S 为总物种数量。

Simpson 指数 (D) 计算公式为

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2 \quad (2)$$

该指数衡量群落均匀度和优势种的比例,数值越接近 1, 表示多样性越高。

Chao1 指数 (公式中记为 C) 计算公式为

$$C = S_{\text{obs}} + \frac{F_1(F_1 - 1)}{2(F_2 + 1)} \quad (3)$$

式中: S_{obs} 为观测到的物种数量; F_1 为只被检测到 1 次的物种数量; F_2 为被检测到 2 次的物种数量。

ACE 指数 (公式中记为 $\sigma(\text{ACE})$) 计算公式为

$$\sigma(\text{ACE}) = S_{\text{abund}} + \frac{S_{\text{rare}}}{C_{\text{ace}}} + \frac{F_1}{C_{\text{ace}}} \gamma_{\text{ace}}^2 \quad (4)$$

式中: S_{abund} 为相对丰度较高的物种数量; S_{rare} 为相对丰度较低 (丰度 ≤ 10) 的物种数量; C_{ace} 为稀有物种的覆盖度; γ_{ace}^2 为稀有物种的变异系数。

2 结果与分析

2.1 不同生长时期青稞种子内生细菌群落多样性比较

青稞种子内生细菌群落 α 多样性指数在不同生长时期表现出一定的波动 (表 1)。从各品种来看, Shannon 指数、Simpson 指数、Chao1 指数及 ACE 指数在不同阶段均存在一定差异,但总体趋势并不一致。采用 Kruskal-Wallis 检验进行统计分析后发现,这些差异均未达到显著水平 ($P > 0.05$)。这表明,尽管在数值上存在一定波动,但是青稞种子内生细菌群落多样性在整个生长过程中总体保持相对稳定。

表 1 不同生长时期青稞种子内生细菌群落多样性比较

Table 1 Comparison of endophytic bacterial communities diversity in highland barley seeds at different growth stages

品种 Variety	生长时期 Growth stage	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	Chao1 指数 Chao1 index	ACE 指数 ACE index
藏青 2000 Zangqing 2000	种子期 Seed stage	5.40±0.30 ^a	1.00±0.01 ^a	170.00±68.90 ^a	187.00±77.40 ^a
	灌浆期 Grain-filling stage	2.30±0.50 ^a	0.70±0.20 ^a	20.80±8.30 ^a	26.70±15.10 ^a
	成熟期 Maturity stage	2.80±2.10 ^a	0.60±0.50 ^a	37.90±30.10 ^a	—
藏青 320 Zangqing 320	种子期 Seed stage	4.10±1.10 ^a	0.90±0.10 ^a	62.90±39.60 ^a	70.30±42.50 ^a
	灌浆期 Grain-filling stage	2.50±1.20 ^a	0.70±0.30 ^a	15.10±5.20 ^a	16.90±6.52 ^a
	成熟期 Maturity stage	4.90±0.30 ^a	0.90±0.01 ^a	102.00±10.50 ^a	124.00±19.90 ^a
喜马拉雅 22 号 Himalayan 22	种子期 Seed stage	3.58±1.40 ^a	0.79±0.16 ^a	56.10±33.60 ^a	58.70±41.90 ^a
	灌浆期 Grain-filling stage	0.82±0.56 ^a	0.28±0.25 ^a	17.10±5.38 ^a	22.70±7.84 ^a
	成熟期 Maturity stage	4.62±0.56 ^a	0.94±0.03 ^a	68.70±24.50 ^a	96.80±31.60 ^a
藏青 13-5171-7 Zangqing 13-5171-7	种子期 Seed stage	3.59±0.79 ^a	0.85±0.05 ^a	46.70±16.00 ^a	48.90±19.50 ^a
	灌浆期 Grain-filling stage	1.08±0.59 ^a	0.41±0.26 ^a	4.50±0.87 ^a	6.47±1.63 ^a
	成熟期 Maturity stage	4.16±1.02 ^a	0.88±0.10 ^a	56.10±32.80 ^a	71.30±46.70 ^a

注:表中数据为“平均值±标准差”;同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: The data in the table were “mean±standard deviation”; different lowercase letters in the same column indicated significant differences ($P<0.05$).

2.2 不同生长时期青稞种子内生细菌门水平群落组成

4 个品种青稞种子内共鉴定到 39 门、471 属和 241 种细菌。其中,变形菌门是藏青 2000 在不同生长时期的优势门,但其相对丰度在各生长期有所不同:种子期为 38.5%,灌浆期为 62.7%,成熟期为 64.8%(图 1A)。此外,藏青 2000 种子期的内生细菌中,拟杆菌门(20.5%)和厚壁菌门(12.8%)的相对丰度均高于 10%;在灌浆期,厚壁菌门(33.9%)相对丰度高于 10%;在成熟期,厚壁菌门的相对丰度为 21.4%。变形菌门是藏青 320 在不同生长时期的优势门,但其相对丰度变化呈现相反的趋势:在种子期最高(76.9%),灌浆期次之(72.8%),成熟期最低(37.7%)。在种子期,藏青 320 种子内生细菌中相对丰度大于 10%的仅有变形菌门;在灌浆期,厚壁菌门的相对丰度为 25.8%;在成熟期,拟杆菌门(27.0%)、厚壁菌门(11.3%)和放线菌门(13.2%)的相对丰度均高于 10%(图 1B)。喜马拉雅 22 号在种子期、灌浆期和成熟期的优势门都是变形菌门,相对丰度分别为 69.2%、98.0%和 31.4%(图 1C)。此外,在种子期,喜马拉雅 22 号种子内生细菌中厚壁菌门(10.2%)相对丰度高于 10%;在成熟期,拟杆菌门(19.5%)、厚壁菌门(27.0%)和放线菌门(10.1%)的相对丰度也高于 10%。藏青 13-5171-7 种子内生细菌优势门同样是变形菌门,其相对丰度变化趋势与藏青 320 相似

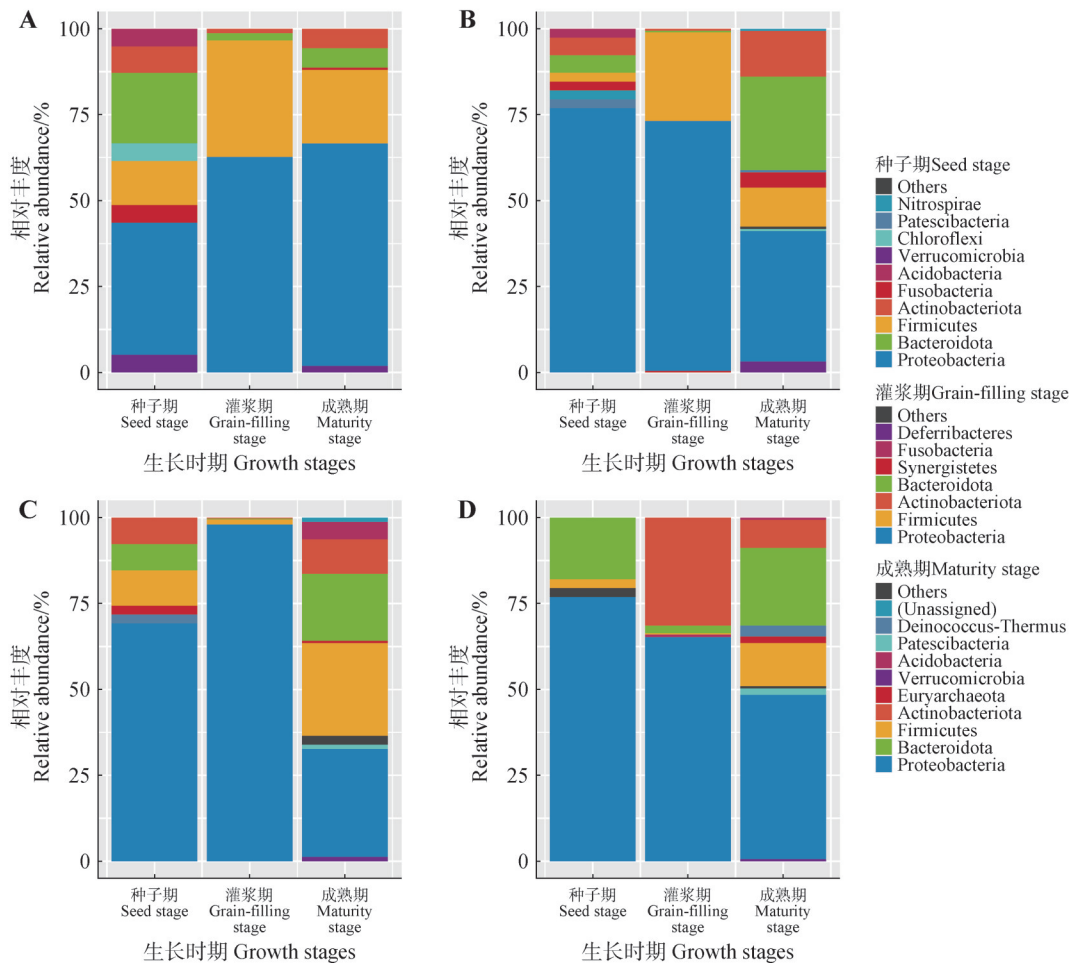
(图 1D):种子期最高(76.9%),灌浆期次之(65.3%),成熟期最低(47.9%)。与藏青 320 不同,藏青 13-5171-7 在种子期相对丰度大于 10%的还有拟杆菌门(17.9%);在灌浆期,放线菌门的相对丰度为 31.4%;在成熟期,拟杆菌门(22.6%)和厚壁菌门(12.6%)相对丰度高于 10%。

总体而言,不同生长时期青稞种子内生细菌的绝对优势门为变形菌门,其余优势门为拟杆菌门、厚壁菌门和放线菌门。

不同生长时期青稞种子内生细菌优势门比较(图 2)可知,变形菌门相对丰度在藏青 320 青稞的种子期和成熟期之间存在显著差异($P<0.05$);在喜马拉雅 22 号青稞的灌浆期和成熟期之间也存在显著差异($P<0.05$)。拟杆菌门相对丰度仅在藏青 320 青稞的种子期和成熟期之间存在显著差异($P<0.05$);厚壁菌门相对丰度仅在藏青 320 青稞的种子期和灌浆期之间存在显著差异($P<0.05$)。而放线菌门相对丰度在 4 个品种的青稞不同生长时期种子之间均无显著差异。这些结果表明,青稞种子内生细菌群落可能与青稞生长发育过程存在密切联系。

2.3 青稞种子内生细菌属水平群落组成

为了直观展示青稞种子内生细菌在属水平的群落组成,选取了相对丰度大于 0.01% 且排名前 10 的属,绘制堆积柱形图(图 3)。藏青 2000 青稞种子内生细菌在种子期未检测到相对丰度超过



A. 藏青 2000; B. 藏青 320; C. 喜马拉雅 22 号; D. 藏青 13-5171-7。

A.Zangqing 2000; B.Zangqing 320; C.Himalayan 22; D.Zangqing 13-5171-7.

图 1 不同生长时期青稞种子内生细菌门水平的群落组成

Fig.1 Community composition of endophytic bacteria in highland barley seeds at the phylum level during different growth stages

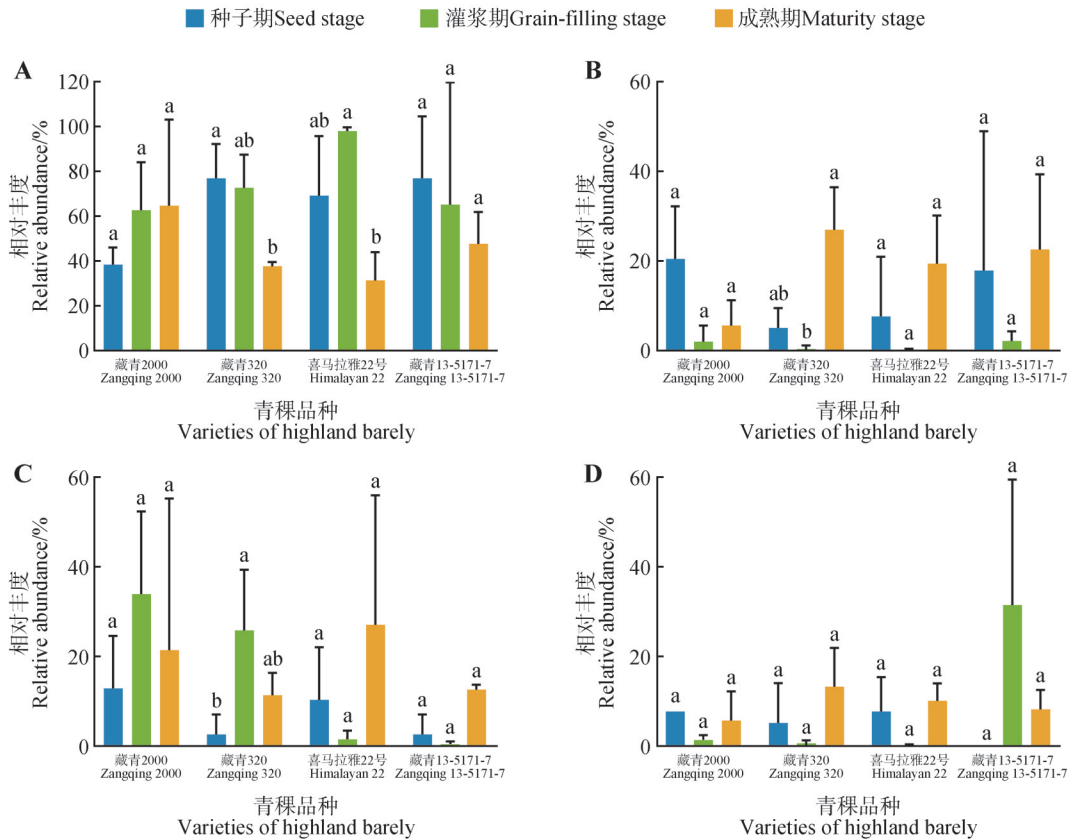
10% 的单一优势属;在灌浆期,芽孢杆菌属(*Bacillus*, 27.9%)和嗜热菌属(*Tepidiphilus*, 11.1%)呈现出较高的相对丰度;在成熟期,希瓦氏菌属(*Shewanella*, 32.0%)和乳杆菌属(*Lactobacillus*, 11.9%)相对丰度较高(图 3A)。藏青 320 青稞种子内生细菌在种子期的优势属为假单胞菌属(*Pseudomonas*, 25.6%)和不动杆菌属(*Acinetobacter*, 10.3%);在灌浆期,优势属为芽孢杆菌属(11.7%)和嗜热菌属(15.2%);在成熟期,黄杆菌属(*Flavobacterium*, 13.2%)成为主要优势属(图 3B)。喜马拉雅 22 号青稞在种子期的优势属为不动杆菌属(38.5%);在灌浆期,假单胞菌属的相对丰度高达 79.9%,成为绝对优势属;在成熟期,黄杆菌属(10.7%)和乳杆菌属(17.6%)相对丰度较高(图 3C)。藏青 13-

5171-7 青稞在种子期的优势属为不动杆菌属(35.9%)和拟普雷沃菌属(*Alloprevotella*, 12.8%);在灌浆期,优势属为假单胞菌属(33.8%)和短小杆菌属(*Curtobacterium*, 32.4%);在成熟期,未有相对丰度超过 10% 的单一优势属(图 3D)。

整体来看,在种子期,不动杆菌属在所有品种中均呈现较高相对丰度;在灌浆期,芽孢杆菌属和假单胞菌属是主要的优势菌属;在成熟期,黄杆菌属和乳杆菌属常呈现较高相对丰度。不同品种种子内生细菌在青稞发育过程中群落组成的变化存在一定共性,但也受品种差异的影响而有所不同。

2.4 青稞种子内生细菌种水平群落组成

藏青 2000 青稞在种子期、灌浆期、成熟期内生细菌共有种数量为 1 个,各生长时期特有种数量分



A. 变形菌门; B. 拟杆菌门; C. 厚壁菌门; D. 放线菌门。不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。

A. Proteobacteria; B. Bacteroidota; C. Firmicutes; D. Actinobacteriota. Different lowercase letters indicated significant difference between treatments at $P < 0.05$.

图2 不同生长时期青稞种子内生菌优势门相对丰度

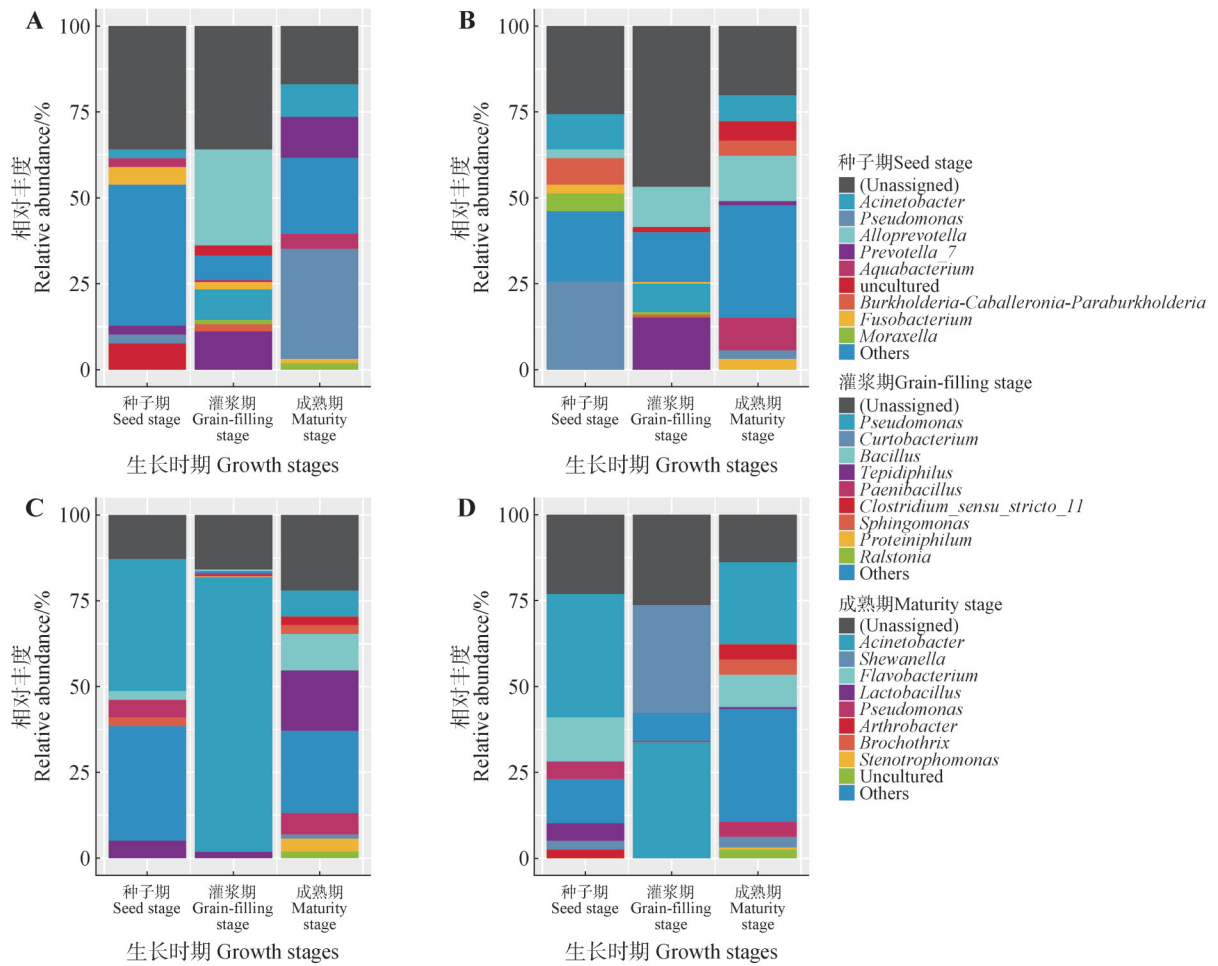
Fig.2 Relative abundance of dominant phylum in endophytic bacteria of highland barley seeds at different growth stages

别为49、6、7个(图4A);藏青320青稞在种子期、灌浆期、成熟期内生细菌共有种数量为1个,各生长时期特有种数量分别为30、5、13个(图4B);喜马拉雅22号青稞在种子期、灌浆期、成熟期内生细菌无共有种,各生长时期特有种数量分别为20、0、12个(图4C);藏青3-5171-7青稞在种子期、灌浆期、成熟期内生细菌无共有种,各生长时期特有种数量分别为20、1、14个(图4D)。上述结果表明,不同生长时期青稞种子内生细菌之间存在的共有种较少。此外,各品种青稞在种子期与成熟期之间均存在1~2个共有种,注释结果显示,藏青2000在种子期和成熟期间的共有种为 *Acinetobacter* sp. KR4.3、*Prevotella intermedia*;藏青320在种子期和成熟期间的共有种为 *Acinetobacter* sp. KR4.3;喜马拉雅22号在种子期和成熟期间的共有种为 *Acinetobacter* sp. KR4.3、uncultured bacterium;藏青3-5171-7种子期

和成熟期间的共有种为 *Enhydrobacter aerosaccus*。

3 讨论

植物内生细菌群落多样性受多种因素共同影响,尤其是宿主植物的基因型、发育阶段和外部环境等因素^[25]。例如,古丽尼沙·沙依木等^[26]研究发现,苹果(*Malus pumila*)叶片内生真菌多样性在不同苹果品种间存在差异。Li等^[27]研究发现,西洋参(*Panax quinquefolius*)主根与须根的内生真菌群落多样性相似,而茎和叶的真菌群落差异较大,且内生菌多样性随植物发育从叶片到根部逐渐增加。此外,Yang等^[28]研究发现,随着海拔的升高,岳桦(*Betula ermanii*)叶片内生真菌 α 多样性增加,显示出环境因素对内生真菌群落的影响。在其他粮食作物(如玉米)的研究中,发现宿主植物生长阶段是影响其内生细菌群落的一个重要因素^[29]。



A.藏青2000; B.藏青320; C.喜马拉雅22号; D.藏青13-5171-7。
A.Zangqing 2000; B.Zangqing 320; C.Himalayan 22; D.Zangqing 13-5171-7.

图3 不同生长时期青稞种子内生菌属水平的群落组成

Fig.3 Community composition of endophytic bacteria in highland barley seeds at the genus level during different growth stages

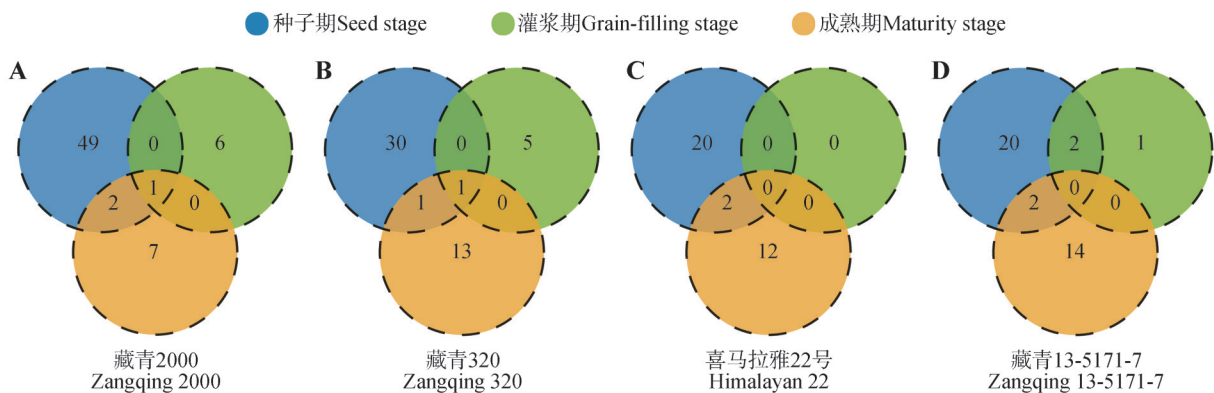


图4 不同生长时期青稞种子内生细菌群落种水平韦恩图

Fig.4 Venn diagram of endophytic bacterial communities at the species level in highland barley seeds at different growth stages

本研究通过对4个品种青稞种子在3个生长时期(种子期、灌浆期、成熟期)的内生细菌群落进行分

析,发现各品种青稞种子的内生细菌 α 多样性在灌浆期显著低于种子期和成熟期。这一发现与

李南南等^[30]对水稻种子内生细菌群落研究的结果相似,提示内生细菌群落结构与植物发育状态密切相关。这种差异可能与青稞在不同生长阶段的生理变化相关,特别是淀粉积累、营养物质转移及水分变化。未来研究可进一步探讨在不同生长阶段青稞种子内生细菌与其生理成分的关系,揭示内生细菌在植物生长和抗逆中的潜在作用。

高通量测序技术的应用提供了更多有关植物内生细菌群落的精准数据,揭示不同作物、不同生长阶段的内生细菌群落特征^[31]。例如,Aswini等^[32]研究表明,小麦种子内生细菌的优势门为变形菌门、厚壁菌门和放线菌门,这与本研究发现的青稞种子内生细菌群落优势门非常相似。类似的结果也出现在水稻种子内生细菌研究中,赵霞^[33]指出,水稻种子内生细菌的优势门为变形菌门、厚壁菌门和放线菌门。此外,Wang等^[34]研究4个耐盐碱水稻品种种子内生细菌的优势门,发现同样是变形菌门、厚壁菌门和放线菌门。刘璐等^[35]研究发现,2个蚕豆(*Vicia faba*)品种的种子内生细菌的优势门为拟杆菌门、变形菌门、厚壁菌门和放线菌门。上述结果表明,许多重要农作物种子内生细菌群落具有相似的结构,尤其是在优势门的分布上,反映出一些细菌门类在植物种子中扮演着相似的生态角色。这一发现为理解不同作物内生细菌群落的相似性提供了依据,并显示内生细菌的种类和分布可能具有跨物种共性。进一步分析发现,青稞在不同生长时期内生细菌群落相对丰度呈现出品种特异性,这表明青稞基因型是影响其种子内生细菌群落结构的重要因素。未来研究可以通过探讨不同品种青稞内生细菌群落结构与植物基因型之间的关系,深入揭示基因型在微生物群落形成中的作用。

本研究还分析了青稞种子内生细菌的属水平组成,发现种子期的优势属为不动杆菌属,灌浆期为芽孢杆菌属和假单胞菌属,而成熟期则以黄杆菌属和乳杆菌属为主。已有研究表明,不动杆菌属细菌能够显著促进植物的早期生长。例如,Raweekul等^[36]研究发现,接种不动杆菌菌株的水稻幼苗鲜质量为对照组的2.30~3.18倍,表明不动杆菌属可能有助于促进青稞的萌发和早期生长。在灌浆期,青稞种子内生细菌的优势属为芽孢杆菌属和假单胞菌属,这2个属细菌被广泛研究并显示出提高植物抗逆性的能力。相关研究^[36-38]表明,

芽孢杆菌属和假单胞菌属能够增强植物对干旱、高温、盐碱等不良环境的耐受性。因此,灌浆期青稞种子内生细菌的优势属可能对青稞的抗逆性和籽粒质量的提高起到积极作用。在成熟期,黄杆菌属和乳杆菌属为优势属。已有研究^[39-42]表明,这些细菌属在植物的抗病性和防腐作用中扮演着重要角色。因此,成熟期青稞种子内生细菌的优势属可能有助于提高植物的抗病性,并延长种子保存期。通过内生细菌的作用,青稞能够更好地适应不良环境,提高生产力,并增强抗逆性。上述发现为青稞内生细菌的筛选和应用提供了重要理论依据和实践指导。

4 结 论

本研究通过高通量测序技术分析4个青稞品种在不同生长阶段种子内生细菌群落组成与结构的动态变化。结果表明,青稞种子内生细菌群落多样性在不同品种间较为稳定,但灌浆期的 α 多样性显著低于种子期和成熟期,这可能与青稞在灌浆期的生理变化(如淀粉积累和水分变化)有关。这一发现不仅揭示了不同生长阶段青稞种子内生细菌群落的动态变化规律,还进一步凸显了内生细菌群落对植物生长和发育的潜在调控作用。青稞内生细菌的优势菌门主要为变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门和放线菌门,且在不同生长阶段表现出不同的相对丰度。变形菌门在所有生长阶段均为优势菌门,而特定属的变化与青稞的生长需求密切相关:种子期以不动杆菌属为主,灌浆期则以芽孢杆菌属和假单胞菌属为主,成熟期以黄杆菌属和乳杆菌属为主。研究还表明,青稞品种的基因型对内生细菌群落结构有显著影响,不同品种间种子内生细菌群落组成存在差异。这些发现揭示了内生细菌在提高青稞生产力、增强抗逆性和环境适应性中的重要作用,为进一步研究青稞内生细菌生态功能及其在作物改良中的应用提供了理论基础。

参 考 文 献

- [1] AWIKA J M, PHIRONEN V, BEAN S. Advances in cereal science: implications to food processing and health promotion[M]. New York: ACS Division of Agricultural and Food Chemistry, 2011.
- [2] ZENG X Q, LONG H, WANG Z, *et al.* The draft genome of Tibetan hulless barley reveals adaptive patterns to the

- high stressful Tibetan Plateau[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(4): 1095-1100.
- [3] LUKINA K A, KOVALEVA O N, LOSKUTOV I G. Naked barley: taxonomy, breeding, and prospects of utilization[J]. Vavilov Journal of Genetics and Breeding, 2022, 26(6): 524-536.
- [4] ZHANG Z M, LU C H. Assessing influences of climate change on highland barley productivity in the Qinghai-Tibet Plateau during 1978—2017 [J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 7625.
- [5] GODFRAY H C J, BEDDINGTON J R, CRUTE I R, et al. Food security: the challenge of feeding 9 billion people[J]. Science, 2010, 327(5967): 812-818.
- [6] MICHL K, BERG G, CERNAVA T. The microbiome of cereal plants: the current state of knowledge and the potential for future applications[J]. Environmental Microbiome, 2023, 18(1): 28.
- [7] TRIVEDI P, LEACH J E, TRINGE S G, et al. Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(11): 607-621.
- [8] BODDEY R M, URQUIAGA S, ALVES B J R, et al. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications[J]. Plant and Soil, 2003, 252(1): 139-149.
- [9] SUZAKI T, YORO E, KAWAGUCHI M. Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria[J]. International Review of Cell and Molecular Biology, 2015, 316: 111-158.
- [10] CLÚA J, RODA C, ZANETTI M E, et al. Compatibility between legumes and rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis [J]. Genes, 2018, 9(3): 125.
- [11] WALIA A, GULERIA S, CHAUHAN A, et al. Endophytic bacteria: role in phosphate solubilization [J]. Endophytes: Crop Productivity and Protection, 2017, 2: 61-93.
- [12] EIDA A A, ZIEGLER M, LAFI F F, et al. Desert plant bacteria reveal host influence and beneficial plant growth properties [J]. PLoS One, 2018, 13(12): e0208223.
- [13] SYAHRI, GIYANTO, MUTAQIN K H. Screening of plant growth-promoting endophytic bacteria from the maize roots for biocontrol of Stewart wilt disease[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2023, 1133(1): 012037.
- [14] GROBKINSKY D K, TAFNER R, MORENO M V, et al. Cytokinin production by *Pseudomonas fluorescens* G20-18 determines biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 23310.
- [15] DONG R S, ZHANG J, HUAN H F, et al. High salt tolerance of a *Bradyrhizobium* strain and its promotion of the growth of *Stylosanthes guianensis* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(8): 1625.
- [16] CHEN C Q, XIN K Y, LIU H, et al. *Pantoea alhagi*, a novel endophytic bacterium with ability to improve growth and drought tolerance in wheat[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 41564.
- [17] MUNIR S, LI Y M, HE P B, et al. Defeating Huanglongbing pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* with indigenous citrus endophyte *Bacillus subtilis* L1-21 [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 12: 789065.
- [18] LAU J A, LENNON J T. Rapid responses of soil microorganisms improve plant fitness in novel environments [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(35): 14058-14062.
- [19] XU Y T, SUN R, YAN W M, et al. Divergent response of soil microbes to environmental stress change under different plant communities in the Loess Plateau [J]. Cateina, 2023, 230: 107240.
- [20] PAPIK J, FOLKMANOVA M, POLIVKOVA-MAJOROVA M, et al. The invisible life inside plants: deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity [J]. Biotechnology Advances, 2020, 44: 107614.
- [21] 巩文峰, 魏丽萍, 杜娟, 等. 西藏青稞根际细菌群落结构及多样性 [J]. 微生物学报, 2023, 63(10): 4034-4050.
- GONG W F, WEI L P, DU J, et al. Structure and diversity of the bacterial community in the rhizosphere of highland barley in Xizang [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(10): 4034-4050.
- [22] HAO Z, WANG Y H, GUO X F, et al. Deciphering the core seed endo-bacteriome of the highland barley in Tibet plateau [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1041504.
- [23] 王艳梅. 阿里地区主要农作物青稞营养品质鉴定与内生菌多样性研究 [D]. 拉萨: 西藏大学, 2024.
- WANG Y M. Nutritional quality identification and endophyte diversity of barley, a major crop in Ali region [D]. Lhasa: Xizang University, 2014.
- [24] QUAIST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(D1): D590-D596.
- [25] EDWARDS J, JOHNSON C, SANTOS-MEDELLÍN C, et

- al.* 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.
- [26] 古丽尼沙·沙依木, 张志东, 杨波, 等. 干旱区不同品种苹果树叶片内生真菌群落组成和功能特征 [J]. 干旱地区农业研究, 2023, 41(2): 211-220.
- GULINISHA SHAYIMU, ZHANG Z D, YANG B, *et al.* Community composition and functional characteristics of endophytic fungi in leaves of different apple varieties in arid area of Xinjiang [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2023, 41(2): 211-220.
- [27] LI R, DUAN W Y, RAN Z F, *et al.* Diversity and correlation analysis of endophytes and metabolites of *Panax quinquefolius* L. in various tissues [J]. BMC Plant Biology, 2023, 23(1): 275.
- [28] YANG T, WEISENHORN P, GILBERT J A, *et al.* Carbon constrains fungal endophyte assemblages along the timberline [J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(8): 2455-2469.
- [29] XIONG C, SINGH B K, HE J Z, *et al.* Plant developmental stage drives the differentiation in ecological role of the maize microbiome [J]. Microbiome, 2021, 9(1): 171.
- [30] 李南南, 黎妮, 曹艳花, 等. 3个杂交水稻亲本成熟期种子内生细菌多样性研究 [J]. 食品科学技术学报, 2017, 35(4): 56-64.
- LI N N, LI N, CAO Y H, *et al.* Diversity of endophytic bacterial communities in three parental seeds of hybrid rice (*Oryza sativa* L.) at maturity stage [J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 35(4): 56-64.
- [31] YANG M, GAO P H, GUO J W, *et al.* The endophytic fungal community plays a crucial role in the resistance of host plants to necrotic bacterial pathogens [J]. Physiologia Plantarum, 2024, 176(2): e14284.
- [32] ASWINI K, SUMAN A, SHARMA P, *et al.* Seed endophytic bacterial profiling from wheat varieties of contrasting heat sensitivity [J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1101818.
- [33] 赵霞. 水稻种子内生细菌多样性分析及核心微生物组的界定 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
- ZHAO X. Analysis of endophytic bacteria diversity in rice seeds and definition of core microbiome [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019.
- [34] WANG Z S, ZHU Y Q, LI N, *et al.* High-throughput sequencing-based analysis of the composition and diversity of endophytic bacterial community in seeds of saline-alkali tolerant rice [J]. Microbiological Research, 2021, 250: 126794.
- [35] 刘璐, 名晓东, 张晓艳, 等. 高通量测序分析蚕豆种子内生细菌的多样性 [J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(2): 73-80.
- LIU L, MING X D, ZHANG X Y, *et al.* Diversity of endophytic bacteria in faba bean seeds by high-throughput sequencing [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2021, 23(2): 73-80.
- [36] RAWEEKUL W, WUTTITUMMAPORN S, SODCHUEN W, *et al.* Plant growth promotion by endophytic bacteria isolated from rice (*Oryza sativa*) [J]. Science & Technology Asia, 2016, 21(1): 6-17.
- [37] 宋雪, 付楚涵, 李家红, 等. 内生菌提高植物抗旱性和耐盐性分子机制研究进展 [J]. 草地学报, 2024, 32(1): 13-24.
- SONG X, FU C H, LI J H, *et al.* Research progress on molecular mechanism of endophytes improving the drought resistance and salt tolerance of plant [J]. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(1): 13-24.
- [38] RANA K L, KOUR D, KAUR T, *et al.* Endophytic microbes from diverse wheat genotypes and their potential biotechnological applications in plant growth promotion and nutrient uptake [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 2020, 90(5): 969-979.
- [39] KHALIL A M A, HASSAN S E D, ALSHARIF S M, *et al.* Isolation and characterization of fungal endophytes isolated from medicinal plant *Ephedra pachyclada* as plant growth-promoting [J]. Biomolecules, 2021, 11(2): 140.
- [40] VIGNOLO G, SAAVEDRA L, SESMA F, *et al.* Food bio-protection: lactic acid bacteria as natural preservatives [J]. Progress in Food Preservation, 2012: 451-483.
- [41] CHEN C, CAO Z, LI J, *et al.* A novel endophytic strain of *Lactobacillus plantarum* CM-3 with antagonistic activity against *Botrytis cinerea* on strawberry fruit [J]. Biological Control, 2020, 148: 104306.
- [42] YIN C T, CASA VARGAS J M, SCHLATTER D C, *et al.* Rhizosphere community selection reveals bacteria associated with reduced root disease [J]. Microbiome, 2021, 9(1): 86.