



基于高通量测序分析盐角草根部分内生细菌多样性及动态规律

赵帅, 周娜, 赵振勇, 张科, 田长彦*

中国科学院新疆生态与地理研究所, 荒漠与绿洲生态国家重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011

摘要: 【目的】探讨盐角草根部分内生细菌群落多样性特征, 揭示内生细菌群落结构在宿主关键发育期动态变化规律。【方法】通过罗氏454高通量测序获得内生细菌16S rRNA片段, 然后进行生物信息分析。【结果】共获得20363条16S rRNA基因序列。各样品中可操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs)在552-941之间。根部内生细菌群落主要包括4个门, 其中Proteobacteria门占主导地位, 其余依次是Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes。在Proteobacteria门中, Gammaproteobacteria是第一大纲, 其后是Betaproteobacteria纲。宿主5个发育时期共同拥有7个细菌属, 包括Azomonas, Serratia, Pantoea, Serpens, Pseudomonas, Halomonas, Kushneria。整体上看, Gammaproteobacteria纲在宿主5个发育时期呈现增长趋势。优势菌属在5个发育期存在差异, 分别为Delftia, Kushneria, Serratia, Pantoea, Erwinia。所有文库总共含2108个特异OTUs, 共同拥有5个相同OTUs。花期OTUs数量最多, 结种期内生细菌多样性降低。在宿主的5个发育时期中, 土壤pH、月均温和土壤盐含量这3个环境因子组成的集合对其内生细菌群落变化具有显著影响。【结论】盐角草内生细菌群落多样性丰富, 宿主发育期决定了内生细菌群落结构。

关键词: 盐生植物, 内生细菌, 多样性, 焦磷酸测序

植物内生细菌生活于植物组织中, 常定殖在宿主细胞间隙和木质部导管^[1]。内生细菌通过与植物相互作用, 可对宿主发育产生众多益处, 例如促进植物生长或生物防治植物病害^[2]。因此, 了解内生细菌多样性有助于阐明它们的功能和潜在作用, 进而优化植物生长状态。近年来, 植物

内生细菌的研究主要集中于“甜土植物”或农作物, 现已发现多种植物包括单子叶和双子叶植物, 从木本到草本植物, 体内均存在多样的内生细菌^[3]。然而, 人们对生长在极端条件下的植物内生细菌群落多样性却知之甚少。

盐角草(*Salicornia europaea* L.), 隶属于藜科

基金项目: 国家自然科学基金(31300432); 中国科学院重点部署项目课题(KSZD-EW-Z-022-03); 荒漠与绿洲生态国家重点实验室开放基金(Y371162)

*通信作者。Tel: +86-991-7885301; Fax: +86-991-7885320; E-mail: tianchangyan@hotmail.com

收稿日期: 2015-09-15; 修回日期: 2015-12-01; 网络出版日期: 2015-12-11

(Chenopodiaceae), 是一种强抗盐的盐生植物。在新疆盐碱地区, 盐角草被大量种植以应对土壤盐渍化的威胁, 是修复盐碱地的有效工具^[4]。对其内生细菌多样性的研究将有助于认知盐生植物内生细菌微生态和探索内生细菌与宿主植物抗盐性的关系。到目前为止, 仅有少数关于盐角草根际细菌的研究^[5], 而对盐角草内生细菌的研究鲜见报道。因此, 本研究以盐角草为研究对象, 采用罗氏454高通量测序技术深入分析其内生细菌群落多样性和动态分布规律。

1 材料和方法

1.1 样品采集

2014年5月至10月, 于新疆克拉玛依地区盐碱地(N 45°24'E84°56', 海拔273 m), 选择盐角草苗期, 生长期, 成熟期, 开花期, 结种期这5个时期采样, 每个时期分3个样点, 每个样点随机选取5株, 共采取75株带回实验室。每个采样时期土壤pH, 土壤盐含量, 月平均温度和月降雨量数据如表1所示。

1.2 表面消毒

植株根部冲洗后放入含蒸馏水的螺口瓶, 超声波低频清洗3次, 以去除表面土壤微粒和大部分附着微生物^[6]。将材料浸渍在75%乙醇3.0 min, 之后在活性氯为3.5%的次氯酸钠中浸泡3.5 min, 最后在无菌水中洗涤5次。为确认消毒过程是否合

格, 使用印记法和将最终的洗涤液涂布在R2A琼脂平板培养7 d, 检测是否有细菌生长。此外, 将最终的洗涤液提取总DNA, 以没有检测到扩增的16S rRNA基因为合格标准^[7]。

1.3 基因组DNA扩增

表面消毒后的样品加液氮研磨, 取(1±0.1) g粉末提取总DNA, 其中包括细菌基因组DNA^[8]。PCR所用的引物为799F-1394R (对应细菌V5-V9区) (融合F引物: 5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGNNNNNNNAACAGGATTAGATACCCTG-3', 融合R引物: 5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCC GCTCAGGGTTACCTTGTTACGACTT-3'。斜体并带下划线的为adapter序列, Ns为7个碱基的barcode序列)。50 μL反应体系: 10×PCR buffer 5 μL, dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL, Genomic DNA 10 ng, Bar-PCR primer F (50 μmol/L) 1 μL, Primer R (50 μmol/L) 1 μL, Plantium *Taq* (5 U/μL) 0.5 μL。PCR扩增: 94 °C 30 s, 94 °C 20 s, 45 °C 20 s, 65 °C 60 s, 5个循环; 94 °C 20 s, 60 °C 20 s, 72 °C 20 s, 20个循环; 72 °C 5 min。

PCR结束后, 对PCR产物进行琼脂糖电泳, 采用琼脂糖回收试剂盒(cat:SK8131)回收, 进行5个循环的延伸扩增, 条件: 94 °C 2 min, 94 °C 20 s, 60 °C 20 s, 72 °C 30 s。回收产物用Qubit2.0定量, 上海生工公司罗氏454平台测序。

1.4 数据分析

通过各样品barcode使数据回归样品, 质控筛

表1. 样地信息

Table 1. Information on sampling areas

ID	Stage	Salt concentration / (g/kg)	Soil pH	Average monthly temperature/°C	Monthly rainfall/mm
K1	seeding	13.8	8.49	18.5	9.6
K2	elongating	14.1	8.61	23.8	23.9
K3	mature	14.5	8.60	25.5	3.7
K4	flowering	14.9	8.64	23.8	22.8
K5	fruiting	15.6	8.65	17.9	8.1

选出长度>200 bp, 平均质量分值>25, 无模糊碱基, 并在核糖体数据库(<http://pyro.cme.msu.edu/>)具有至少80%匹配度的序列用于后续分析。校正通过“Pre.cluster”(<http://www.mothur.org/wiki/Pre.cluster>)完成, 最大失配为1/150, 该程序集成于MOTHUR软件(<http://www.mothur.org/>)。基于Silva序列数据库, 使用MOTHUR中uchim程序去除嵌合序列。采用RDP classifier将序列进行物种分类, 在97%的水平计算操作分类单元(OTUs)的数量(http://www.drive5.com/uclust/downloads1_1_579.html)。所有序列已在GenBank SRA (Sequence Read Archive)提交; 接受号为SRX969945。

在97%的阈值确定稀释度, 采用MOTHUR软件计算Alpha多样性指数, 包括丰富度指数(richness)、香农指数(Shannon Index)、ACE指数、Chao1指数、文库覆盖率(Coverage)。样品OTUs的Venn图采用R语言分析绘制。使用

Canoco软件分析环境因子对细菌群落结构的影响, 其中细菌在“属”水平上的相对丰度作为物种数据。采用R语言中的BioEnv程序筛选影响细菌群落结构的最佳环境因子子集。使用Mantel-Carlo检验环境因子及其组合是否对细菌群落结构变化具有显著影响。

2 结果和分析

2.1 测序结果

总共产生32169条原始序列, 质控后得到20363条高质量目标片段。如表2所示, 5个时期OTUs数量分别为711、752、758、941和552, 相应文库覆盖率分别为89.3%、91.8%、90.7%、88.6%和93.0%。稀释度曲线如图1所示, 结合文库覆盖率, 说明本研究中各样品文库包含了大多数细菌类群, 基本能反应样品内生细菌群落结构组成。

表2. 样品OTU丰度和 α 多样性指数

Table 2. OTUs richness and diversity indices obtained from pyrosequencing analysis

ID	Barcode	Sequence	OTUs	Alpha diversity			
				Shannon	ACE	Chao1	Coverage/%
K1	ATGTACG	3480	711	5.5	1800.5	1381.0	89.3
K2	TCTGCGA	4531	752	5.4	1784.6	1325.7	91.8
K3	AGTCGAT	4444	758	5.5	2436.7	1584.0	90.7
K4	AGCGTCT	4273	941	5.7	2131.3	1616.2	88.6
K5	TAGCTGT	3635	552	5.2	1177.7	961.9	93.0

2.2 多样性分析

内生细菌类群如图2所示, 所有细菌主要分为4个门, 优势类群为Proteobacteria (91.8%), 其次是Firmicutes (4.1%), Actinobacteria (3.3%), Bacteroidetes (0.3%)。在Proteobacteria门中, Gammaproteobacteria是第一大纲, 占该门的90.4%, 其后是Betaproteobacteria, 占9.0%。Gammaproteobacteria纲主要包括Enterobacteriaceae

科, Halomonadaceae科, Pseudomonadaceae科, Moraxellaceae科, 分别占该纲的60.6%, 21.7%, 15.2%, 0.7%。从“属”这一分类层次来看, 共有181个细菌属。Enterobacteriaceae科最为丰富, 包含4个大于1%的属, 为*Buttiauxella*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Serratia*。Halomonadaceae科的序列主要分布于*Halomonas*和*Kushneria*两个属。Pseudomonadaceae科的序列主要分布于

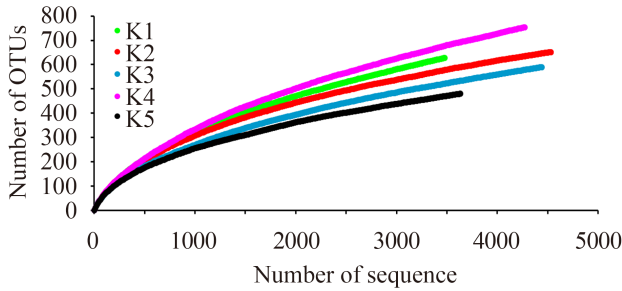


图 1. 丰度稀释度曲线

Figure 1. Rarefaction curves for bacterial OTUs, clustering at 97 % rDNA sequence similarity. K1: seeding stage; K2: elongating stage; K3: mature stage; K4: flowering stage; K5: fruiting stage.

Azomonas, *Pseudomonas*和*Serpens* 3个属。*Moraxellaceae*科的序列主要分布于*Acinetobacter*属。在Betaproteobacteria纲中, 所有序列几乎全归于*Delftia*属。

非Proteobacteria门中, Firmicutes门占主要地位, 其次是Actinobacteria门。Firmicutes门主要包括*Fontibacillus*属, *Paenibacillus*属和*Staphylococcus*属。Actinobacteria门主要包括*Brachyacterium*属和*Arthrobacter*属。

2.3 核心属

有7个菌属始终存在于宿主的5个发育时期, 包括*Azomonas* (102条序列, 占总序列数的0.5%), *Serratia* (1433条序列, 占7.0%), *Pantoea* (5914条序列, 占29.0%), *Serpens* (455条序列, 占2.2%), *Pseudomonas* (2005条序列, 占9.8%), *Halomonas* (1278条序列, 占6.3%), *Kushneria* (2223条序列, 占10.9%)。

2.4 动态分布规律

在宿主不同发育时期, 内生细菌群落结构差异明显。整体上看, Betaproteobacteria纲主要存在于苗期, Gammaproteobacteria纲在5个时期呈现增长的趋势。细菌群落中的主要菌属随宿主发育期发生变化, 5个时期的首要菌属分别为*Delftia* (44.63%), *Kushneria* (40.06%), *Serratia* (34.83%), *Pantoea* (71.94%), *Erwinia* (55.68%),

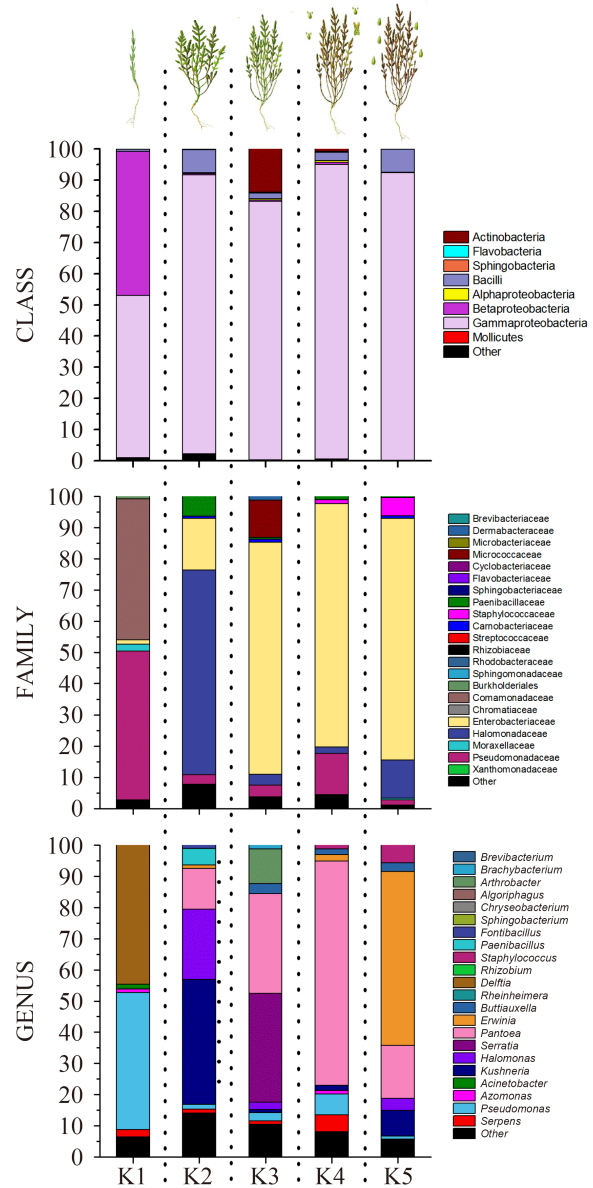


图 2. 细菌类群丰度图

Figure 2. Relative abundances of bacterial taxa recovered from each sample analyzed with 454 sequencing. Taxa included are the ‘class’ with >0.1 % of 16S rRNA sequences in the full 454 data set, ‘family’ with >0.5 % of sequences; and ‘genus’ with >1.0 % of sequences. At each rank, all sequences that did not fit into one of these categories were classified as ‘other’.

第2位菌属分别为*Pseudomonas* (43.97%), *Halomonas* (22.42%), *Pantoea* (31.95%), *Pseudomonas* (6.7%), *Pantoea* (16.89%)。

利用Venn图分析各发育时期内生细菌群落OTUs之间的关系,结果如图3所示,5个细菌文库总共含特异OTUs数量为2108,特有的OTUs分别为503, 264, 224, 312, 142, 共同拥有5个相同OTUs。内生细菌多样性在苗期到花期之间呈现上升趋势,在花期到结种期之间下降。

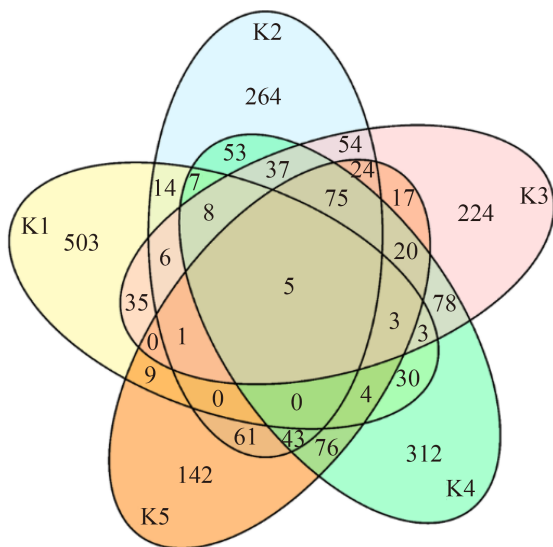


图 3. OTUs分布Venn图

Figure 3. Venn diagram showing the unique and shared OTUs among the different samples.

2.5 环境因子对细菌群落结构的影响

根据CCA分析结果,所有环境变量对细菌菌属变化总共具有64.2%的解释度(图4)。20个主要细菌属的变化与土壤pH相关性最高,其次是月均温,土壤盐含量和月降雨量。环境因子矢量箭头之间夹角较小,可能具有协同效应。其中 *Arthrobacter*, *Brachy bacterium*, *Serratia*, *Sphingobacterium*, *Pantoea*, *Algoriphagus*, *Rheinheimera*, 以及 *Buttiauxella* 的变化主要受月均温的影响; *Staphylococcus*, *Erwinia*, *Halomonas*, *Paenibacillus*, *Kushneria*, 以及 *Fontibacillus* 的变化主要受到月降雨量的影响; *Serpens*, *Brevibacterium*, *Azomonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, 以及 *Delftia* 的变化

与土壤pH和土壤盐含量有关,盐角草的5个生育期中土壤pH和土壤盐含量逐渐增高,说明这些菌属的丰度随着土壤pH和土壤盐含量增高而降低。

通过BioEnv程序评价了不同环境因子及其集合对细菌菌属结构的影响,结果如表3所示,土壤pH、月均温和土壤盐含量的集合对细菌菌属变化影响最为明显,相关系数最高(0.8545)。Mantel-Carlo检验同样表明只有这3个环境因子的集合对细菌菌属变化的影响具有显著性($P < 0.05$)。

3 讨论

盐角草的优势内生细菌类群属于Proteobacteria门,这与多种植物内生细菌群落结构类似,比如 *Arabidopsis thaliana*^[9]、*Solanum lycopersicum*^[7]、*Oryza sativa*^[8]、*Phragmites australis*^[10]。目前发现的“甜土植物”内生细菌组成主要与其生长的土壤或根际细菌相似,这导致了同一种植物在不同环境内生细菌群落也存在变化,虽然在细菌“门”的层面具有相似性,但在“纲”的层面已经出现差异,而在“属”的层面则大相径庭。此外,采用不同方法研究同一种植物内生细菌多样性,其结果也存在差异,比如高通量方法所发现的细菌“属”要多于DGGE法和传统培养法^[11]。然而,培养法分离到的细菌属也可能在高通量中并无显示,这是由于某些细菌属的成员(如 *Bacillus* 属)多以孢子形式存在植物体内,而提取总DNA过程中对其裂解不充分^[12]。因此,目前为止并无某种植物具有某些特有菌属的定论,从“属”的层面对比总结盐角草和其它植物内生细菌的差异可能不准确。我们对盐角草和一些其它植物的内生细菌在菌“纲”的层面做了初步比对,发现不同植物中虽以Proteobacteria门的菌群为主,但是其包含的菌纲存在明显差异。比如对于盐角草,其内生细菌Proteobacteria门以Gammaproteobacteria纲为主,其次是

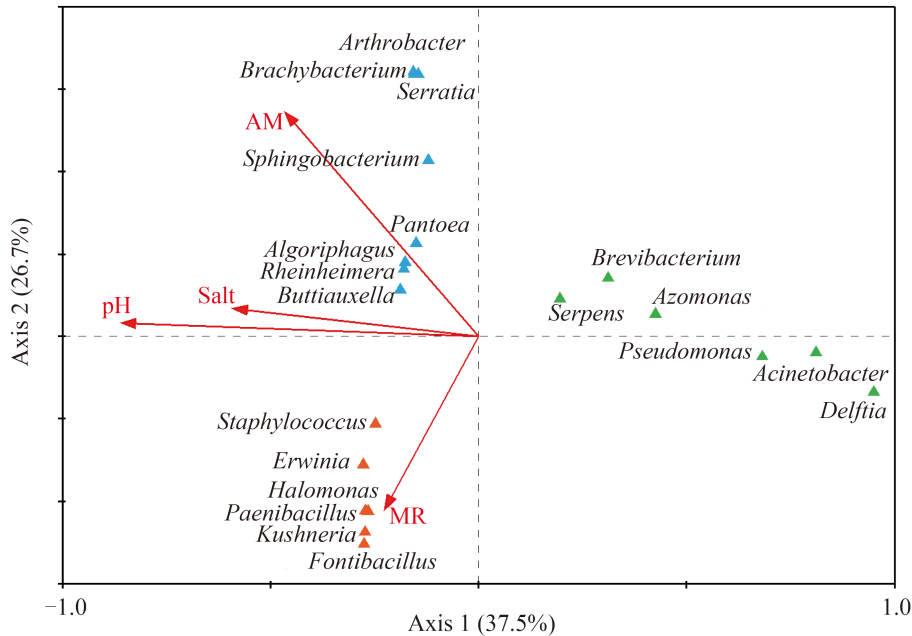


图 4. 细菌群落与环境因子的典型对应分析

Figure 4. CCA showing associations between environmental variables and bacterial genera. Genera are displayed as points and variables as vectors. The arrows point to the direction of the most rapid change in the environmental variable. Salt: salt concentration; pH: soil pH; AM: average monthly temperature; MR: monthly rainfall.

表3. 不同环境因子组合与细菌群落结构的相关关系

Table 3. The relationship between different combination of environmental variables and bacterial community

Different combination of environmental factors	Correlation coefficient
Soil pH	0.8207
Soil pH + average monthly temperature	0.8303
Soil pH + average monthly temperature + salt concentration	0.8545
Salt concentration + soil pH + average monthly temperature + monthly rainfall	0.8424

Betaproteobacteria 纲；对于 *Solanum lycopersicum*，其内生细菌 Proteobacteria 门也以 Gammaproteobacteria 纲为主，但第二位是 Alphaproteobacteria 纲；而对于 *Phragmites australis*，其内生细菌 Proteobacteria 门则以 Alphaproteobacteria 纲为主，其次为 Gammaproteobacteria 纲。

从宿主盐角草苗期至结种期，连续存在 7 个核心属。其中 *Azomonas*、*Pseudomonas* 和 *Serpens* 均属

于 Pseudomonadaceae 科。Shi 等采用 Illumina 高通量测序发现甜菜 (*Beta vulgaris*) 体内同样存在大量 *Pseudomonas* 属细菌，认为 *Pseudomonas* 属细菌主要来自植物根际^[13]。*Azomonas* 属与 *Azotobacters* 属相似，其成员普遍可为植物提供氮源，并且还可分泌植物激素^[14]。*Serpens* 属目前只包括 1 个发表的细菌种 (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)，即 *Serpens flexibilis*。Hespell 认为 *S. flexibilis* 这类可灵活运动的细菌在其生存环境中具有较强的竞争力^[15]。*Serratia* 属和 *Pantoea* 属同归于 Enterobacteriaceae 科。植物中常发现 *Serratia* 属的细菌，目前利用 *Serratia* 属的细菌生物防治植物病害备受关注^[16-17]。*Pantoea* 属的细菌同样常定殖于植物体内，其作为内生菌对植物生长可能具有益处^[18]。此外，*Kushneria* 属和 *Halomonas* 属均归于 Halomonadaceae 科，这 2 个属的大多数成员具有耐盐性，常分离自海洋或高盐环境中 (盐湖，死海，盐渍土等)^[19-20]。盐角草体内含有 NaCl^[26]，这 2 个细

菌属的存在说明盐生植物对内生细菌具有选择作用, 内生细菌也适应盐生植物体内含盐的环境。

多数研究表明植物内生细菌群落结构会随着宿主生长阶段发生改变^[13,21]。我们也发现盐角草内生细菌结构从苗期到结种期存在明显差异, 推测这可能是由于盐角草体内和体外的环境因素所致。在植物生长过程中, 植物体外的土壤因素^[22]和环境温度^[23]会对植物内生细菌的群落结构产生影响。本研究中, 盐角草不同发育时期所处的土壤盐含量、土壤pH和月均温度三者的组合对内生细菌群落变化具有显著影响, 说明其体外环境因素的改变可能是关键原因之一。然而, 盐角草生境中环境因子众多, 比如新疆的盐渍土被称为“世界盐渍土博物馆”, 其成因非常复杂, 单是土壤盐份组成就达数十种, 因此还需进一步扩充和细化。另一方面, 植物体内存在大量无机离子和有机化合物, 这些物质如铁和锌、缩酚酸和酮类物质可能会影响植物内生细菌群落结构^[24-25]。盐角草体内不仅含有大量钠离子, 而且含有多种次级代谢物质, 比如生物碱, 三萜皂苷, 黄酮类化合物如芦丁和槲皮素-3- β -D-葡萄糖甙等, 此外, 还有一些未知物质具有抑菌活性^[26]。能够利用这些物质作为能源的某些内生细菌可能会成为优势种群, 而对其中抑菌物质敏感的某些细菌可能会成为微小的群体。因此, 我们推测在盐角草的发育过程中, 其体内化合物种类和各种物质比例的波动可能在选择特定类型的细菌种群中发挥积极作用。对于盐角草发育期环境因素与内生细菌群落的响应关系还需进一步研究验证。

本研究首次利用高通量测序技术, 针对盐生植物中最抗盐的盐角草, 初步调查了其不同生育期内生细菌群落变化规律。在研究过程中遇到一些特殊问题, 现将这些问题做如下探讨, 希望能为学者们开展盐生植物内生细菌研究提供参考。本研究中我们使用引物799F和1492R对提取的盐角草总DNA扩增, 在PCR产物电泳检测中出现2个

条带。1个条带(900–1000 bp) 为盐生植物线粒体DNA; 另外1个条带(700–800 bp) 是含有内生细菌16S rRNA基因片段的目标带。这与普通作物内生细菌扩增结果不同, 比如在对玉米内生细菌的高通量测序研究中, 玉米的线粒体DNA对应条带在1000–1500 bp之间^[21]。该结果表明盐角草的线粒体基因可能有别于普通作物。本研究提取的是盐角草总DNA, 其中内生细菌DNA含量很少, 加之盐角草线粒体基因序列不清楚, 这为使用qPCR量化所选择细菌集群水平带来困难, 所设计的细菌属的引物具有非常高的非特异性, 而目前对于植物样品中细菌属qPCR所用引物还鲜见报道。如果在知道盐角草线粒体基因的基础上, 或许可以结合锁核酸技术(locked nucleic acid, LNA), 通过“基因封条作用”抑制线粒体或叶绿体基因的表达, 从而量化盐角草内生细菌属。

总之, 盐角草体内存在多样的内生细菌, 本研究只对其根部进行了调查, 而内生细菌在盐角草不同组织器官的分布差异还需进一步研究。此外, 在盐角草的生长过程中, 内生细菌和植物有着密切的关系, 其中一些菌属可能与植物健康有关。对盐角草体内具有促生作用细菌的分离鉴定, 以及评估它们对宿主在盐胁迫下生长的影响, 也是我们下一步要开展的工作。

参考文献

- [1] Schulz B, Boyle C. What are endophytes?//Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN. *Microbial Root Endophytes*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006: 1–13.
- [2] Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 278(1): 1–9.
- [3] Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ERB, Taghavi S, Mezgeay M, Van der Lelie D. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2002, 21(6): 583–606.
- [4] Zhao ZY, Zhang K, Wang P, Wang L, Yin CH, Tian CY. The effects of halophytes on salt balance in an arid irrigation

- district. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 2013, 11(3/4): 2669–2673.
- [5] Ozawa T, Wu JM, Fujii S. Effect of inoculation with a strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* isolated from the endorhizosphere of *Salicornia europaea* on salt tolerance of the glasswort. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2007, 53(1): 12–16.
- [6] Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrekton A, Kunin V, Del Rio TG, Edgar RC, Eickhorst T, Ley RE, Hugenholtz P, Tringe SG, Dangl JL. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 2012, 488(7409): 86–90.
- [7] Romero FM, Marina M, Pieckenstain FL. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 351(2): 187–194.
- [8] Sun L, Qiu FB, Zhang XX, Dai X, Dong XZ, Song W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology*, 2008, 55(3): 415–424.
- [9] Bodenhausen N, Horton MW, Bergelson J. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56329.
- [10] Li YH, Zhu JN, Zhai ZH, Zhang Q. Endophytic bacterial diversity in roots of *Phragmites australis* in constructed Beijing Cuihu Wetland (China). *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 309(1): 84–93.
- [11] Xia WW, Jia ZJ. Comparative analysis of soil microbial communities by pyrosequencing and DGGE. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(12): 1489–1499. (in Chinese) 夏围围, 贾仲君. 高通量测序和DGGE 分析土壤微生物群落的技术评价. *微生物学报*, 2014, 54(12): 1489–1499.
- [12] Reiter B, Pfeifer U, Schwab H, Sessitsch A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(5): 2261–2268.
- [13] Shi YW, Yang HG, Zhang T, Sun J, Lou K. Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of Tianshan mountain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(14): 6375–6385.
- [14] Preininger É, Zatykó J, Szűcs P, Korányi P, Gyurján I. *In vitro* establishment of nitrogen-fixing strawberry (*Fragaria × ananassa*) via artificial symbiosis with *Azomonas insignis*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1997, 33(3): 190–194.
- [15] Hespell RB. *Serpens flexibilis*: an unusually flexible bacterium//Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. *The Prokaryotes*. New York: Springer-Verlag, 2006: 916–919.
- [16] Fűrnkranz M, Lukesch B, Müller H, Huss H, Grube M, Berg G. Microbial diversity inside pumpkins: microhabitat-specific communities display a high antagonistic potential against phytopathogens. *Microbial Ecology*, 2012, 63(2): 418–428.
- [17] Czajkowski R, Van der Wolf JM. Quantitative and specific detection of the biocontrol agent, *Serratia plymuthica*, in plant extracts using a real-time TaqMan[®] assay. *Journal of Applied Genetics*, 2012, 53(4): 457–467.
- [18] Coutinho TA, Venter SN. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 2009, 10(3): 325–335.
- [19] Arahal DR, Ludwig W, Schleifer KH, Ventosa A. Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(1): 241–249.
- [20] Zou ZZ, Wang GJ. *Kushneria sinocarnis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a Chinese traditional cured meat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(8): 1881–1886.
- [21] Liu Y, Zuo S, Zou YY, Wang JH, Song W. Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages. *Annals of Microbiology*, 2013, 63(1): 71–79.
- [22] Mano H, Tanaka F, Nakamura C, Kaga H, Morisaki H. Culturable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. *Microbes and Environments*, 2007, 22(2): 175–185.
- [23] Botella L, Santamaría O, Diez JJ. Fungi associated with the decline of *Pinus halepensis* in Spain. *Fungal Diversity*, 2010, 40(1): 1–11.
- [24] Martín-García J, Espiga E, Pando V, Diez JJ. Factors influencing endophytic communities in poplar plantations. *Silva Fennica*, 2011, 45(2): 169–180.
- [25] Hodkinson BP, Gottel NR, Schadt CW, Lutzoni F. Photoautotrophic symbiont and geography are major factors affecting highly structured and diverse bacterial communities in

the lichen microbiome. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(1): 147–161.

[26] Isca VMS, Seca AML, Pinto DCGA, Silva AMS. An overview

of *Salicornia* genus: the phytochemical and pharmacological profile//Gupta VK. *Natural Products: Research Review*. New Delhi: Daya Publishing House, 2014: 145–164.

Endophytic bacterial diversity and dynamics in root of *Salicornia europaea* estimated via high throughput sequencing

Shuai Zhao, Na Zhou, Zhenyong Zhao, Ke Zhang, Changyan Tian*

State Key Laboratory of Desert and Oasis Ecology, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] This study aimed to describe the composition of the endophytic bacterial communities in *Salicornia europaea* root, and to examine how endophytic bacteria vary across host growth periods. [Methods] PCR-based Roche FLX 454 pyrosequencing was applied to reveal the diversity and succession of endophytic bacteria. [Results] A total of 20363 partial 16S rRNA gene sequences were obtained. These sequences revealed huge amount of operational taxonomic units (OTUs), that is, 552–941 OTUs in a root sample. Endophytes in roots mainly comprised four phyla, among which Proteobacteria was the most represented, followed by Firmicutes, Actinobacteria, and Bacteroidetes. Gammaproteobacteria was the most abundant class of Proteobacteria, followed by Betaproteobacteria of this phylum. Genus *Azomonas*, *Serratia*, *Pantoea*, *Serpens*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, and *Kushneria* were shared by all growth stages. Gammaproteobacteria increased during the five stages. The dominant bacterial genera during five periods were related to *Delftia*, *Kushneria*, *Serratia*, *Pantoea*, *Erwinia*, respectively. Five libraries contained 2108 unique OTUs with 5 OTUs in common. The greatest number of OTUs was detected during flowering stage. Endophytic bacteria diversity was reduced during fruiting stage. A combination of soil pH, average monthly temperature and soil salt concentration has significant effects on the endophytic bacterial community structure during the five stages. [Conclusion] As a whole, the diversity of endophytic bacteria was high inroot of *Salicornia europaea*. The distribution of endophytic bacteria showed obvious dynamic changes, and the host growth stages determined the endophytic bacterial community.

Keywords: halophyte, endophytic bacteria, diversity, pyrosequencing

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31300432), by the Chinese Academy of Sciences (KSZD-EW-Z-022-03) and by the State Key Laboratory of Desert and Oasis Ecology (Y371162)

*Corresponding author. Tel: +86-991-7885301; Fax: +86-991-7885320; E-mail: tianchangyan@hotmail.com

Received: 15 September 2015; Revised: 1 December 2015; Published online: 11 December 2015