



## 镉对超积累和非超积累生态型东南景天内生细菌多样性的影响

邹淑华, 邓平香, 龙新宪\*

华南农业大学资源环境学院, 广东 广州 510642

**摘要:** 重金属胁迫对植物内生细菌群落结构的影响在很大程度上是未知的, 目前也很少有研究超积累植物内生细菌的群落结构与多样性对根际土壤中重金属的响应。【目的】探索在不同镉污染水平下, 超积累(HE)和非超积累生态型(NHE)东南景天的根系、茎和叶片中内生细菌的群落结构与多样性的变化及其差异性, 试图从植物-内生菌之间的相互关系的角度补充解释 2 种生态型东南景天对有效态镉忍耐和积累能力的差异。【方法】采用 Illumina 新一代测序方法分析了在不同 Cd<sup>2+</sup>浓度土壤上生长的 2 种生态型东南景天根、茎和叶中的内生细菌群落结构。【结果】高浓度 Cd<sup>2+</sup>抑制 NHE 东南景天的生长, 内生细菌的丰富度和多样性也降低; 然而, 高浓度 Cd<sup>2+</sup>促进 HE 东南景天的生长, 茎和根系内生细菌的丰富度增加。在 3 种土壤上, 2 种生态型东南景天叶片、茎和根系内生细菌均以变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和放线菌门(*Actinobacteria*)占优势。随着土壤中 Cd<sup>2+</sup>浓度的增加, HE 东南景天叶片中 *Gammaproteobacteria* 纲、*Negativicutes* 纲和 *Clostridia* 纲的相对丰度显著增加, 茎中 *Alphaproteobacteria* 纲的相对丰度显著增加, *Clostridia* 纲的相对丰度显著减少; NHE 东南景天叶片中 *Alphaproteobacteria* 纲、*Gammaproteobacteria* 纲和 *Clostridia* 纲的相对丰度没有显著变化, 茎中 *Negativicutes* 纲的相对丰度显著减少, 根系中 *Betaproteobacteria* 纲和 *Clostridia* 纲的相对丰度显著减少, *Negativicutes* 纲却显著增加。在高 Cd<sup>2+</sup>污染土壤(50 mg/kg)上, HE 东南景天叶片中 *Sphingomonas* 属和茎中 *Veillonella* 属的相对丰度均大于 NHE, 且 HE 东南景天根系内生细菌的第一、第二、第三优势菌 *Veillonella*、*Sphingomonas*、*Prevotella* 属细菌均没有出现在 NHE 东南景天根系。【结论】土壤 Cd<sup>2+</sup>污染水平对 2 种生态型东南景天叶、茎、根中的内生菌群落结构有显著影响。

**关键词:** 东南景天, 内生细菌, 有效态镉

基金项目: 国家自然科学基金(41471264)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-20-85280296; E-mail: longxx@scau.edu.cn

收稿日期: 2019-01-22; 修回日期: 2019-05-20; 网络出版日期: 2019-07-12

东南景天(*Sedum alfredii*)是一种多年生草本植物,广泛分布于中国长江中下游地区。在水培条件下,浙江省衢州市古老铅锌矿区的东南景天地上部的镉(Cd)和锌(Zn)含量高达 9000  $\mu\text{g/g}$  和 29000  $\mu\text{g/g}$ ,且植物生长旺盛,没有出现任何金属毒性症状,也被称为超积累生态型东南景天<sup>[1-2]</sup>。研究证明,超积累生态型东南景天对 Zn、Cd 的抗性和积累能力显著大于来自浙江杭州茶园的东南景天(非超积累生态型)<sup>[3-4]</sup>。目前,超积累生态型东南景天已被我国学者广泛应用于锌、镉污染农田土壤的修复<sup>[5-7]</sup>。重金属常以阳离子和络合离子形态存在于土壤溶液中,这两种形态的重金属易于植物吸收利用,同时也是重金属对植物产生毒害作用的主要形态,即重金属的有效态。为了提高东南景天吸收重金属的效率,研究者尝试采用各种方法来促进东南景天的生长和(或)提高根际土壤重金属活性,主要包括施加氮肥和磷肥<sup>[8-10]</sup>、添加有机酸或螯合剂<sup>[5-6]</sup>和猪粪堆肥<sup>[11]</sup>,接种根际或内生细菌<sup>[12-14]</sup>等。

内生细菌是一类生长在植物组织内部的细菌,在植物生长、发育、适应生物与非生物胁迫等方面发挥着重要作用<sup>[15-16]</sup>。近 20 年来,超积累植物的内生细菌受到了研究者的高度关注<sup>[13,17-25]</sup>。内生细菌可通过以下几种方式促进植物生长和吸收积累金属:(1) 改善植物氮、磷、铁营养(如固氮作用、溶磷作用、分泌铁载体);(2) 分泌植物激素(植物生长素、细胞分裂素、赤霉素等)或 1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶(ACCase)减少植物中乙烯的产生,调节植物体内激素水平;(3) 通过胞外沉淀、胞内积累和隔离,将毒性金属离子生物转化成较少或无毒形式等方式来减轻金属对植物的毒害;(4) 通过分泌  $\text{H}^+$ 、有机酸、铁载体和生物表面活性剂等增加土壤金属中有效性<sup>[26-28]</sup>。但是,

目前这方面的研究还局限于实验室研究。因此,深入了解土壤环境对超积累植物内生细菌的群落结构和多样性的影响,是利用内生细菌强化植物修复的前提条件。

内生细菌的群落结构和多样性主要取决于各种生物(如细菌种类、宿主植物基因型、生态型和发育阶段等)和非生物(温度、湿度、土壤营养水平和污染状况)因素<sup>[16,29]</sup>。Ding 等(2013)报道,宿主植物的种类、采样日期和地点对叶片内生细菌的群落结构均有影响,其中宿主植物种类的影响最大,其次是采样日期和采样地点<sup>[30]</sup>。Bodenhausen 等(2013)发现,虽然拟南芥叶片和根系内生细菌的丰富度、多样性和均匀度没有差异,但是二者的内生细菌群落组成差异显著( $P=0.001$ )<sup>[31]</sup>。Chen 等(2014)分析了某铅锌矿土壤上生长的超积累植物龙葵(*Solanum nigrum* L.)和商路(*Radix phytolaccae*)的茎中内生细菌群落结构和多样性,发现内生细菌的群落结构受土壤重金属污染水平和植物种类的影响<sup>[32]</sup>。

目前,基于 16S rRNA 的高通量测序方法可以更快速、更准确地分析环境微生物的群落结构和多样性<sup>[33-34]</sup>。这种技术也被研究者应用于拟南芥<sup>[35]</sup>、马铃薯<sup>[36]</sup>、莴苣<sup>[37]</sup>、水稻<sup>[38]</sup>、番茄<sup>[39]</sup>和甜菜<sup>[40]</sup>等植物的内生细菌的研究。然而,很少有高通量测序方法研究超积累植物的内生细菌群落结构的文献报道。我们推测,当超积累和非超积累生态型东南景天生长在  $\text{Cd}^{2+}$  污染土壤上时,由于二者对  $\text{Cd}^{2+}$  的耐受性和积累能力差异显著,势必影响植物体内的生理代谢过程,从而使其内生细菌的群落结构也发生改变。反过来,内生细菌将与宿主植物协同作用,可能参与东南景天对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸收、积累和解毒等代谢过程。因此,本研究高通量测序技术评估土壤  $\text{Cd}^{2+}$  污染水平对超积累和非超积累生态型东南景天的叶片、茎和根的细菌群落结

构和多样性的影响,为今后开发内生细菌强化东南景天修复 Cd<sup>2+</sup>污染土壤提供技术参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试植物和土壤

超积累和非超积累生态型东南景天的幼苗分别采集于浙江衢州的古老铅锌矿(118°01′–119°20′E, 28°14′–29°30′N)和浙江杭州九溪公园的茶园地(120°09′42″E, 30°15′12″N)。供试土壤采自华南农业大学试验站,土壤理化性质如下: pH 5.18(土:水=1:2.5),有机质 44.92 g/kg,全氮 3.06 g/kg,全磷 3.09 g/kg,全钾 15.45 g/kg,土壤全 Cd 含量 0.68 mg/kg,有效 Cd 含量 0.14 mg/kg。土壤自然风干,过 5 mm 筛,外源添加 CdCl<sub>2</sub>,使土壤 Cd<sup>2+</sup>添加水平为 0、5、50 mg/kg(分别标记为 Cd<sub>0</sub>、Cd<sub>5</sub>、Cd<sub>50</sub>),加入去离子水至最大田间持水量的 60%,室温条件下平衡 2 周后开始盆栽实验。

### 1.2 盆栽实验

土壤平衡 2 周后,再次风干,105 °C 高压灭菌 1 h,连续 3 次。每盆装 300 g 灭菌土壤,每个处理装 3 盆,每盆移栽 4 株长势均匀的超积累或非超积累生态型东南景天幼苗。植物在华南农业大学温室培养 2 个月(2017 年 2–4 月)。植物生长期,根据植物的生长需要补充灭菌的去离子水。

植物生长 60 d 后收获,记录株高。植物样品先用自来水洗涤,然后用去离子水漂洗 3 次,将根、茎和叶分开,记录鲜重。然后将每一盆的叶片、茎和根系样品分为 2 份。其中一份样品立刻进行表面消毒处理,即分别称量 1.0 g 叶、1.0 g 茎和 0.5 g 根,依次浸入 95%乙醇 1 min、30%过氧化氢 30 min 和 3%次氯酸钠 30 min,95%乙醇 1 min,最后用灭菌的去离子水洗涤 3 次。为了确

保表面消毒过程是成功的,将消毒后的根、茎和叶样品以及最后 1 次冲洗的去离子水分别涂布在 Luria-Bertani's (LB)琼脂平板上培养 7 d,均没有出现细菌的生长。表面消毒处理后的植物样品迅速用液氮冷冻、研磨,保存在–80 °C 冰箱,用于后续 DNA 提取。将剩余的叶、茎和根样品装入干净的信封,105 °C 下杀青 30 min,65 °C 下烘干至恒重,记录每个样品的干重。

### 1.3 植物和土壤样品的化学分析

将烘干植物样品研磨过 0.4 mm 筛,保存在干燥器中,用于 Cd<sup>2+</sup>含量的测定。即准确称取烘干后的植物粉末 0.1000 g 于 50 mL 的三角瓶中,加入混合酸(硝酸+高氯酸,比例 4:1) 10 mL,加盖过夜,第二天电热板加热,加上漏斗,调温至 320 °C,煮至三角瓶内剩余不到 1 mL 溶液(呈澄清或者淡黄色),冷却。用双蒸水冲洗至 25 mL 比色管中,定容,原子吸收光谱(Z-2000)测定 Cd<sup>2+</sup>含量。

收获植物后,从每盆采集约 100 g 土壤,自然风干,过 2 mm 筛,测定土壤 pH 和有效 Cd 含量。土壤 pH 测定采用玻璃电极法,即称取 10.00 g 土壤样品于 50 mL 三角瓶中,按水土比例 2.5:1 加入 25.0 mL 上述去离子水,用磁力搅拌器搅拌 1 min,静置 30 min,用校正过的 pH 计测定悬液的 pH。土壤有效态 Cd 含量的测定采用 CaCl<sub>2</sub>浸提-原子吸收分光光度法,即称取过 20 目筛的风干土 5.00 g 放入 100 mL 离心管中,加入 25 mL 0.1 mol/L CaCl<sub>2</sub>浸提液,在 200 r/min 恒温 52 °C 振荡 24 h 后,4000 r/min 离心 5 min,过滤,原子吸收光谱测定上清液中 Cd<sup>2+</sup>浓度。

### 1.4 DNA 提取和测序分析

采用十六烷基三甲基溴化铵法(CTAB 法)提取 2 种生态型东南景天叶片、茎、根系 DNA,提

取后将同一个处理的 3 个平行样品的 DNA 混匀。具体操作方法如下: 将 0.10 g 样品放于液氮预冷的研钵中, 加液氮, 快速研磨植物样品成粉末状, 将粉末收集于 2 mL 的离心管中, 加入 0.9 mL CTAB 提取液[100 mmol/L Tris-HCl、20 mmol/L EDTA、1.4 mol/L NaCl、2% (W/V) CTAB], 漩涡振荡均匀, 65 °C 水浴 20–30 min。然后, 加入 0.9 mL 氯仿异戊醇, 上下翻转均匀, 12000 r/min 离心 8 min, 将 510  $\mu$ L 上清液转至 1.5 mL 离心管中, 加入 340  $\mu$ L 异丙醇, 上下翻转均匀(直到出现白色沉淀), 12000 r/min 离心 8 min, 弃掉上清液。接着用 0.7 mL 70% 的乙醇清洗沉淀 2 次, 12000 r/min 离心 2 min, 小心地弃掉上清液, 于通风橱中使乙醇挥发干净, 加入 50  $\mu$ L TE 缓冲, 将 DNA 样品保存于 -20 °C 冰箱中<sup>[41]</sup>。

采用引物 341F (5'-GACGACGSRGGGCATCC-3') 和 806R (5'-GGACTACVVGGGTATCTAATC-3') 扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3+V4 区域, 扩增的 DNA 片段约 610 bp。40  $\mu$ L 的 PCR 反应体系包括: 2 $\times$ KAPA HiFi Hotstart ReadyMix 20  $\mu$ L, Forward Primer (5  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, Reverse Primer (5  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, Template DNA 10 ng, 补充灭菌的去离子水至 40  $\mu$ L。热循环条件为: 95 °C 3 min; 98 °C 15 s, 72 °C 10 s, 72 °C 10 s, 94 °C 20 s, 65 °C 10 s, 72 °C 10 s, 共 24 个循环, 然后 94 °C 20 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 16 个循环, 最后在 72 °C 延伸 150 s。在 2% 琼脂糖凝胶中分离 PCR 产物来分离细菌产物, 并使用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒切割并提取合适大小的条带(约 610 bp), 测序工作由上海锐翌生物科技有限公司完成。

## 1.5 数据处理与分析

通过 Pandaseq 软件利用重叠关系将双末端测序得到的成对 Reads 拼接成 1 条序列, 得到高变

区的长 Reads。然后使用内部撰写的程序对拼接后的 Reads 进行如下处理, 获取 Clean Reads: (1) 去除平均质量低于 20 的 Reads; (2) 去除 Reads 含 N 的碱基数超过 3 个的 Reads; (3) Reads 的长度范围为 220–500 nt, 统计 Clean Reads 的长度分布和数量。使用 Qiime 软件对序列进行随机抽样, 以抽到的有效序列数进行 OTU 的分析。将拼接的长的 Reads 中的 Singletons (对应的 Reads 只有 1 条的序列) 过滤掉, 利用 Usearch 在 0.97 的相似度下进行聚类, 对聚类后的序列进行嵌合体过滤后, 得到用于物种分析的 OTU, 并分别计算 ACE、Chao1、Shannon 多样性、Simpson 多样性。利用 PDP 方法将代表序列与已知物种的数据库进行比对, 对每个 OTU 进行物种归类。在门、纲、目、科、属水平, 将 OTU 综合分类表中的信息进行分类, 分别统计各样品在不同分类水平上的菌群组成及丰度。

使用 CANODRAW for windows 4.5 分析土壤 Cd<sup>2+</sup> 浓度和植物生态型对内生细菌群落结构的影响, 采用冗余分析(RDA)方法分析土壤有效态 Cd<sup>2+</sup> 浓度、植物生物量以及叶片、茎和根系 Cd<sup>2+</sup> 含量与内生细菌群落之间的关系。

## 2 结果和分析

### 2.1 东南景天根系、茎和叶片的生物量和 Cd<sup>2+</sup> 含量

Cd 离子对超积累生态型(HE)东南景天地上部分的生长有明显的促进作用。例如, 其生长在 Cd<sub>5</sub> 土壤上时, 叶片和茎的干物质量分别比 Cd<sub>0</sub> 处理增加了 1.5 倍和 1.8 倍; 生长在 Cd<sub>50</sub> 土壤时, 叶片和茎的干物质量分别比 Cd<sub>0</sub> 处理增加了 1.4 倍和 2.0 倍(图 1-A)。生长在 Cd<sub>5</sub> 土壤上的非超积累生态型(NHE)东南景天的叶片和茎的干物质量分别也比 Cd<sub>0</sub> 处理增加了 49% 和 65%, 但当生长在 Cd<sub>50</sub>

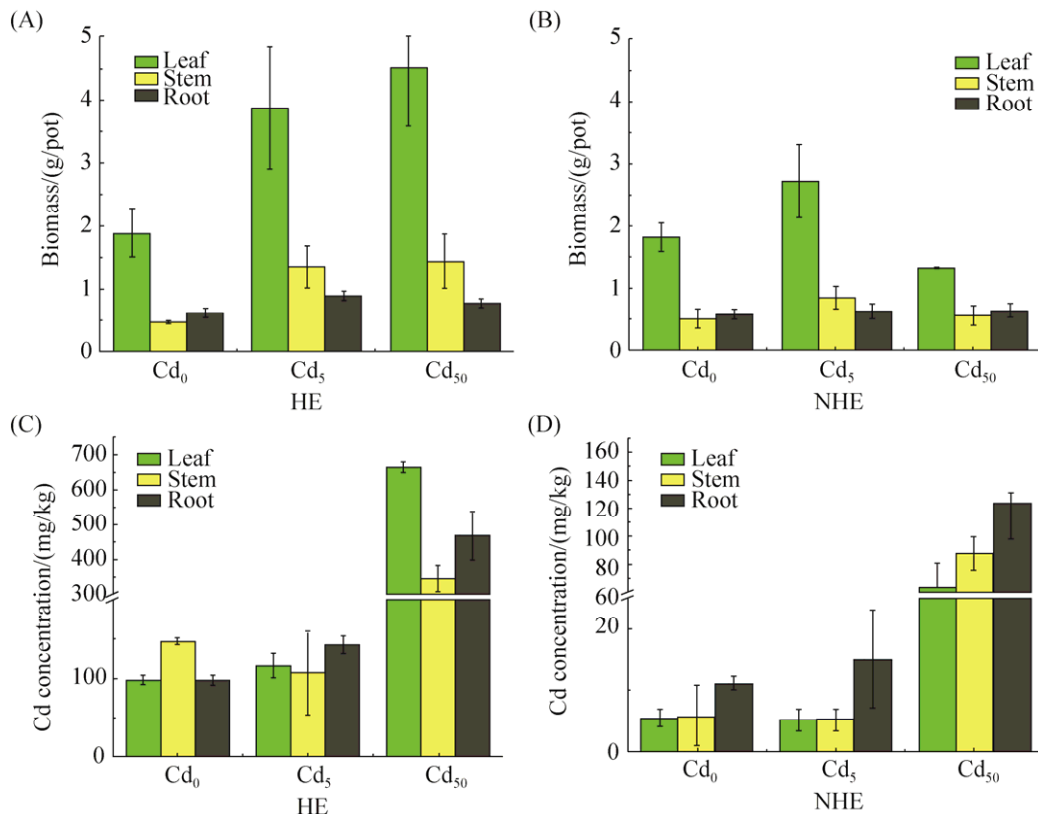


图 1. 2 种生态型东南景天根系、茎和叶片的生物量与  $\text{Cd}^{2+}$  含量

Figure 1. The dry biomass and  $\text{Cd}^{2+}$  concentration in roots, stems and leaves of two ecotypes of *S. alfredii*.

土壤上, 其叶片干物质质量比  $\text{Cd}_0$  处理减少 27%, 茎和根系的生物量也低于  $\text{Cd}_5$  处理, 但与  $\text{Cd}_0$  处理之间没有显著差异(图 1-B)。

在  $\text{Cd}_0$  土壤上, 2 种生态型东南景天的叶、茎、根的生物量之间没有显著差异; 但在  $\text{Cd}_5$  土壤上, NHE 东南景天的叶片、茎、根系的生物量分别比 HE 东南景天低 30%、37%、23%; 在  $\text{Cd}_{50}$  土壤上, NHE 东南景天的叶片、茎、根系的生物量分别比 HE 东南景天低 71%、61% 和 18% (图 1-A, 1-B)。

与  $\text{Cd}_0$  处理相比, 生长在  $\text{Cd}_5$  土壤上的 HE 东南景天的叶片和茎  $\text{Cd}^{2+}$  含量没有显著增加, 但当生长在  $\text{Cd}^{2+}$  土壤上时, 其叶、茎和根  $\text{Cd}^{2+}$  含量均急剧增加, 分别是  $\text{Cd}_0$  处理的 6.7、2.3 和 4.8 倍(图 1-C)。随着土壤  $\text{Cd}^{2+}$  浓度增加, NHE 东南景天根、茎和叶片  $\text{Cd}^{2+}$  含量也不断增加, 但其根系、茎和

叶片  $\text{Cd}^{2+}$  含量均远远低于 HE 东南景天(图 1-D)。例如, 生长在  $\text{Cd}_{50}$  土壤上的 NHE 东南景天叶、茎、根  $\text{Cd}^{2+}$  含量分别比 HE 东南景天低了 90%、75% 和 74% (图 1-C, 1-D)。

## 2.2 东南景天叶片、茎、根系内生细菌的 $\alpha$ 多样性

利用 RDP Classifier 过滤掉低质量的序列后, 18 个样品一共得到 822821 条有效序列, 在 97% 相似度下共得到 1324 个 OTUs, 其中分别从 HE 和 NHE 东南景天得到 712 个和 612 个 OTUs。Chao1 指数和 Shannon 指数分别反映样品中内生细菌的丰富度和多样性。在 3 种土壤上, HE 东南景天叶片中内生细菌的丰富度和多样性均远大于 NHE 东南景天(表 1)。对于 HE 东南景天, 叶片内生细菌的丰富度在  $\text{Cd}_0$  土壤上最大, 而内生细菌的多样性在  $\text{Cd}_{50}$  土壤上最高, 茎和根系内生细菌

表 1. 2 种生态型东南景天叶片、茎、根系中内生菌的  $\alpha$  多样性指数Table 1. Alpha diversity of endophytic bacteria in the leaves, stems and roots samples of two ecotypes *S. alfredii*

Ecotypes	Organ	Soil Cd <sup>2+</sup> /(mg/kg)	Sample number	Read	OTUs	Chao 1	Shannon	Simpson
HE	Leaf	0	HE-L-0	44682	214	249.69	5.27	0.96
		5	HE-L-5	51366	45	56.00	3.80	0.86
		50	HE-L-50	43105	111	118.86	5.81	0.97
	Steam	0	HE-S-0	41761	41	43.80	3.60	0.88
		5	HE-S-5	42919	48	72.43	2.98	0.77
		50	HE-S-50	44799	49	53.50	3.88	0.90
	Root	0	HE-R-0	53342	66	87.86	3.81	0.88
		5	HE-R-5	46556	91	120.06	3.41	0.84
		50	HE-R-50	46556	47	58.67	3.57	0.87
NHE	Leaf	0	NHE-L-0	49789	43	68.50	2.98	0.79
		5	NHE-L-5	46472	17	22.25	2.52	0.75
		50	NHE-L-50	50430	20	22.50	2.97	0.86
	Steam	0	NHE-S-0	40563	72	94.75	4.89	0.94
		5	NHE-S-5	43460	36	43.50	3.09	0.85
		50	NHE-S-50	40748	208	223.33	5.51	0.96
	Root	0	NHE-R-0	42403	93	113.33	4.73	0.92
		5	NHE-R-5	53627	61	68.80	3.72	0.89
		50	NHE-R-50	40243	62	94.50	2.97	0.78

的丰富度在 Cd<sub>5</sub> 土壤上最大(表 1)。对于 NHE 东南景天, 叶片和根系内生细菌的丰富度和多样性均随着土壤 Cd<sup>2+</sup>浓度的增加有所降低, 但茎中内生细菌的丰富度和多样性在 Cd<sub>50</sub> 土壤上最大(表 1)。

### 2.3 土壤镉离子浓度对 2 种生态型东南景天叶片内生细菌群落结构的影响

HE 东南景天叶片内生细菌群落结构: HE 东南景天叶片内生细菌归属于 10 个门, 优势菌为变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和放线菌门(*Actinobacteria*) (图 2-A)。变形菌门的相对丰度在 Cd<sub>5</sub> 土壤上最大, 分别是 Cd<sub>0</sub> 和 Cd<sub>50</sub> 处理的 1.62 倍和 1.72 倍(图 2-A), 这主要是由于 *Alphaproteobacteria* 纲的相对丰度显著增加(图 2-B); 然而, *Gammaproteobacteria* 纲的相对丰度随着土壤 Cd<sup>2+</sup>浓度的增加而增加(图 2-B)。厚壁菌门的相对丰度(32.40%)在 Cd<sub>50</sub> 土壤上最大, 另外 2 个处理之间无显著差异(图 2-A); 在

纲水平上, Cd<sub>0</sub>、Cd<sub>5</sub> 和 Cd<sub>50</sub> 土壤上分别以 *Bacilli* 纲、*Negativicutes* 纲和 *Clostridia* 纲的相对丰度最大(图 2-C)。拟杆菌门的相对丰度在 Cd<sub>5</sub> 土壤上最大(图 2-C), 在 3 种土壤上均以 *Bacteroidia* 纲占优势(图 2-D)。放线菌门的相对丰度在 3 种土壤上的差异不显著(图 2-A), 且相对丰度最大的均为 *Actinobacteria* 纲(图 2-E)。

RDA 分析发现(图 3-A), 第一轴和第二轴分别可以解释 67.4% 和 32.6% HE 东南景天的叶片内生细菌群落结构在纲水平的变化, 其中以叶片 Cd<sup>2+</sup>含量和土壤 Cd<sup>2+</sup>浓度的影响最大, 分别可以解释 HE 东南景天叶片内生细菌群落结构 65.0% 和 64.7% 的变化。同时, *Gammaproteobacteria* 纲、*Clostridia* 纲和 *Negativicutes* 纲均与叶片 Cd<sup>2+</sup>含量、土壤 Cd<sup>2+</sup>浓度成显著正相关关系( $P < 0.05$ )。拟杆菌门中的 *Bacteroidia* 纲与叶片 Cd<sup>2+</sup>浓度、土壤 Cd<sup>2+</sup>浓度、生物量、株高为负相关关系, 但没有达到显著水平。

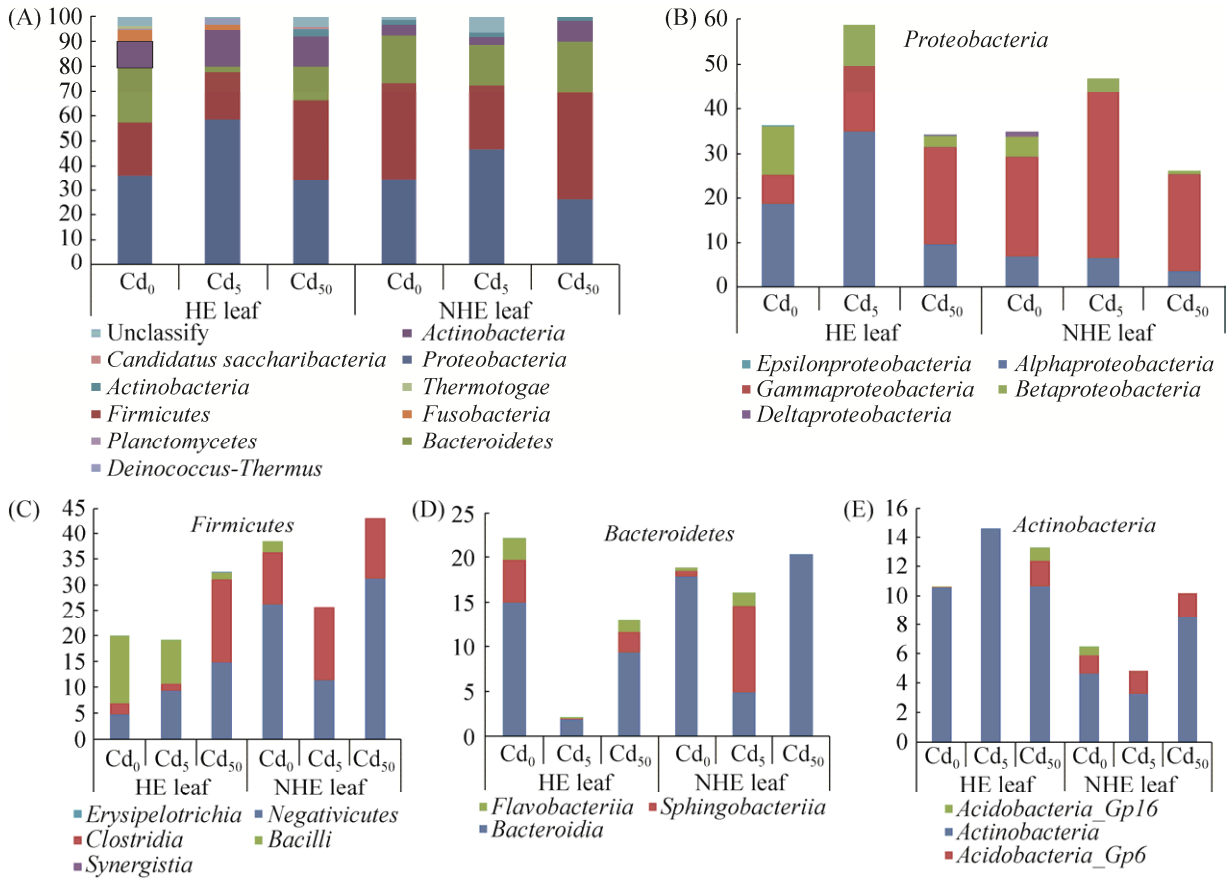


图 2. 2 种生态型东南景天叶片内生细菌在门和纲水平的物种 Profiling 柱状图

Figure 2. Profiling histogram of endophytic bacteria in leaves of two ecotypes of *S. alfredii* at phylum and class levels. A is profiling histogram of species at phylum level, B, C, D and E are the profiling histogram of *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Actinobacteria* at class level, respectively.

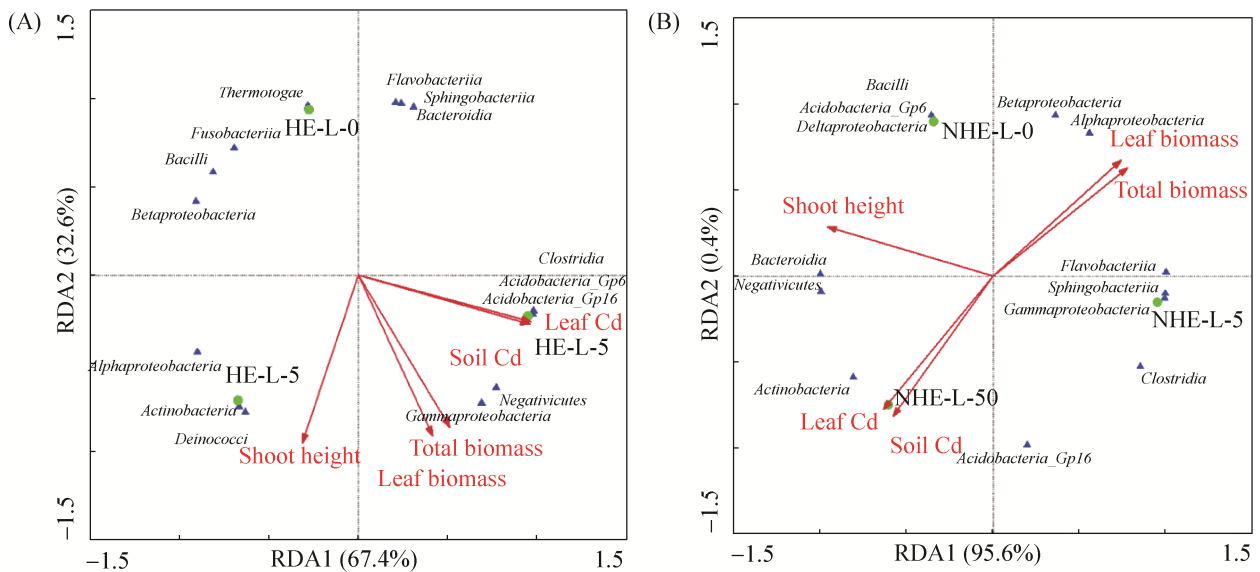


图 3. 超积累(A)和非超积累(B)生态型东南景天叶片内生细菌的 RDA 分析

Figure 3. RDA analysis of endophytic bacteria in leaves of HE (A) and NHE (B) ecotypes of *S. alfredii*.

NHE 东南景天叶片内生细菌群落结构: NHE 东南景天叶片内生细菌归属于 5 个门, 即变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门和酸杆菌门 (*Acidobacteria*) (图 2-A)。变形菌门的相对丰度在  $Cd_5$  土壤上最高 (46.77%), 但 3 种土壤上均以 *Gammaproteobacteria* 纲的相对丰度最大, 其相对丰度在  $Cd_5$  土壤上最高,  $Cd_0$  和  $Cd_{50}$  土壤上没有明显的差别 (图 2-B)。厚壁菌门的相对丰度在  $Cd_{50}$  土壤最大 (图 2-A), 主要为 *Negativicutes* 纲和 *Clostridia* 纲 (图 2-C); 在  $Cd_0$  和  $Cd_{50}$  土壤上, *Negativicutes* 纲的相对丰度最高, 而  $Cd_5$  土壤上以 *Clostridia* 纲的相对丰度最高 (图 2-C)。土壤  $Cd^{2+}$  浓度对拟杆菌门的相对丰度没有显著影响, 但在  $Cd_0$  和  $Cd_{50}$  土壤上均以 *Bacteroidia* 纲的相对丰度最大, 而在  $Cd_5$  土壤上以 *Sphingobacteriia* 纲的相对丰度最大 (图 2-D)。在 3 种不同  $Cd^{2+}$  浓度土壤上, 放线菌门的相对丰度没有显著差异 (图 2-A), 且主要为 *Actinobacteria* 纲 (图 2-E)。

RDA 分析发现 (图 3-B), 第一轴和第二轴分别可以解释 NHE 东南景天叶片中内生细菌群落结构 95.6% 和 0.4% 的变化, 其中株高和植株总生物量分别可以解释 88.1% 和 59.5% 的变化; *Gammaproteobacteria* 纲与叶片  $Cd^{2+}$  含量、土壤  $Cd^{2+}$  浓度均成负相关关系, 而其与叶片生物量、总生物量成正相关关系, *Clostridia* 纲与株高成显著负相关关系 ( $P < 0.05$ )。 *Actinobacteria* 纲与叶片  $Cd^{2+}$  含量、土壤  $Cd^{2+}$  浓度成正相关关系, 与生物量成负相关关系, *Bacteroidia* 纲与株高成正相关关系。

#### 2.4 土壤镉离子浓度对 2 种生态型东南景天茎内生细菌群落结构的影响

HE 东南景天茎中内生细菌群落结构: HE 东南景天茎内生细菌归属于 9 个门, 优势菌门仍为

变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌门 (图 4-A)。变形菌门的相对丰度在  $Cd_0$  土壤上显著高于  $Cd_5$  和  $Cd_{50}$  处理, 分别是  $Cd_5$  和  $Cd_{50}$  处理的 2.67 倍和 2.32 倍 (图 4-B); *Alphaproteobacteria* 纲的相对丰度在  $Cd_5$  和  $Cd_{50}$  土壤上显著减少, 而 *Gammaproteobacteria* 纲的相对丰度随着土壤  $Cd^{2+}$  浓度的增加而增加 (图 4-B)。厚壁菌门的相对丰度随着土壤  $Cd^{2+}$  浓度的增加而增加 (图 4-A), 其在  $Cd_{50}$  土壤上的相对丰度分别是  $Cd_0$  和  $Cd_5$  处理的 2.56 倍和 1.25 倍, 这主要是因 *Clostridia* 纲和 *Negativicutes* 纲的相对丰度显著增加 (图 4-C)。同样, 拟杆菌门的相对丰度随着土壤  $Cd^{2+}$  浓度的增加而增加 (图 4-A), 尤其是 *Bacteroidia* 纲的相对丰度增加显著 (图 4-D)。放线菌门的相对丰度在  $Cd_5$  土壤显著高于其他 2 个处理 (图 4-A), 但在 3 种镉离子土壤上, 均以 *Actinobacteria* 占优势 (图 4-E)。

RDA 分析的第一轴和第二轴分别可以解释 HE 东南景天茎中内生细菌群落结构的 84.6% 和 15.4% 变化, 其中茎生物量和植物总生物量分别解释了 83.6% 和 83.7% 的内生细菌群落结构的变化 (图 5-A)。对 HE 东南景天茎组织群落结构产生显著影响的物种主要包括厚壁菌门中的 *Negativicutes* 纲、拟杆菌门中的 *Bacteroidia* 纲和放线菌门中的 *Actinobacteria* 纲, 它们均与株高、茎生物量、植株总生物量以及土壤  $Cd^{2+}$  浓度、茎  $Cd^{2+}$  含量成正相关关系, 但 *Alphaproteobacteria* 纲和 *Bacilli* 纲与所有环境因子成显著负相关关系 ( $P < 0.05$ ) (图 5-A)。

NHE 东南景天茎中内生细菌群落结构: NHE 东南景天茎内生细菌归属 11 个门, 优势菌仍为变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌门。变形菌门的相对丰度随着土壤  $Cd^{2+}$  浓度的增加先增加后减少 (图 4-A), 在纲水平, 3 种处理之间的差异显著, 其中  $Cd_0$  和  $Cd_{50}$  处理以 *Gammaproteobacteria*



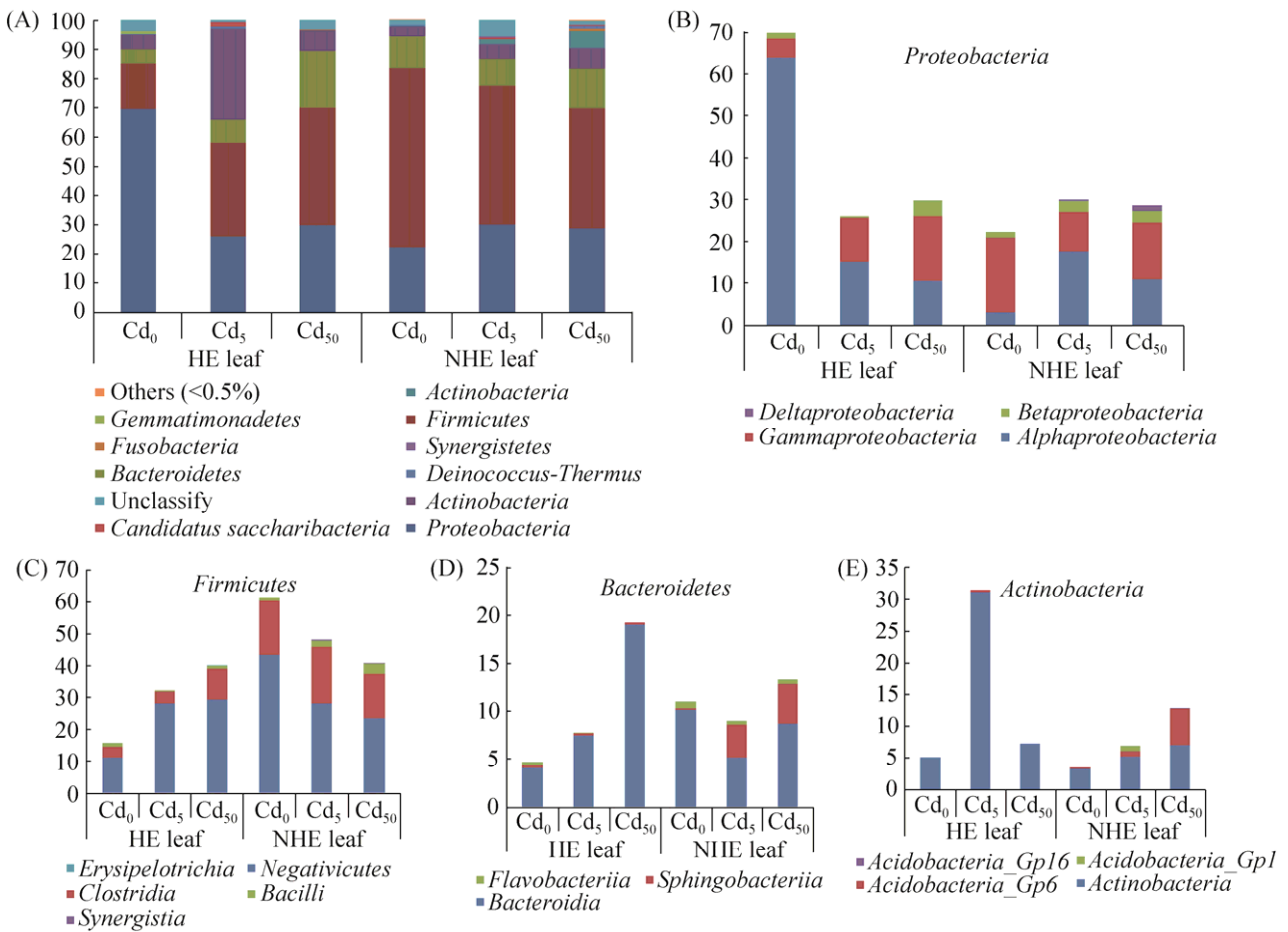


图 4. 2 种生态型东南景天茎内生细菌在纲水平物种 Profiling 柱状图

Figure 4. Profiling histogram of endophytic bacteria in stems of two ecotypes of *S. alfredii* at phylum and class levels. A is profiling histogram of species at phylum level B, C, D and E are profiling histogram of *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Actinobacteria* at phylum level, respectively.

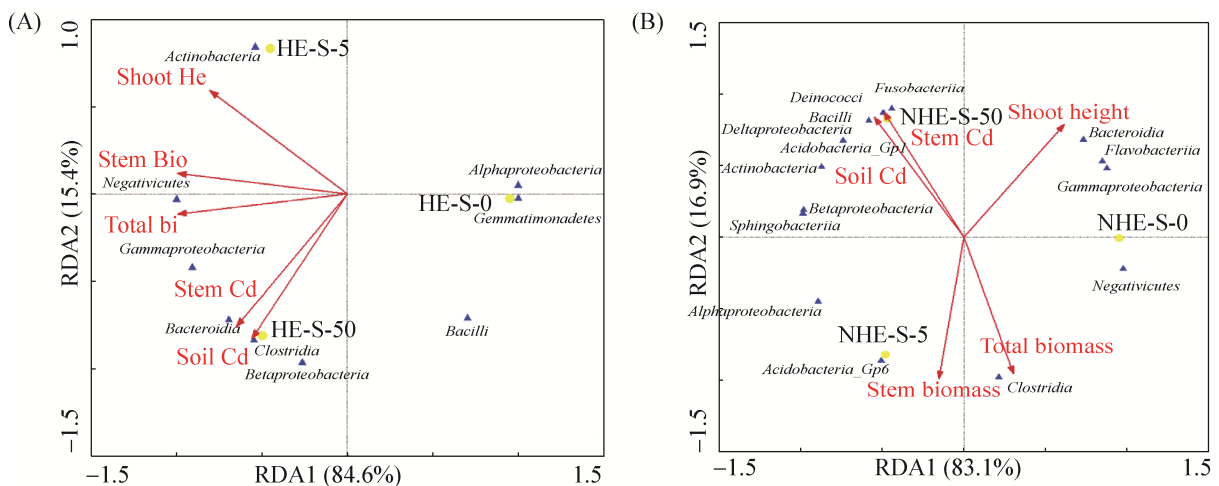


图 5. 2 种生态型东南景天茎组织内生菌 RDA 分析

Figure 5. RDA analysis of endophytic bacteria in stems of two ecotypes of *Sedum alfredii*. RDA analysis of endophytic bacteria in stems of HE (A) and NHE (B) ecotypes of *S. alfredii*.

纲相对丰度最高(分别为 17.86%、13.54%), *Cd<sub>5</sub>* 处理以 *Alphaproteobacteria* 纲(17.60%)的相对丰度最高(图 4-B)。厚壁菌门的相对丰度随着土壤 *Cd<sup>2+</sup>* 浓度的增加而减少(图 4-A), 其在 *Cd<sub>0</sub>* 土壤的相对丰度高达 43.34%, 分别是 *Cd<sub>0</sub>* 和 *Cd<sub>50</sub>* 处理的 1.28 倍和 1.65 倍; 在 3 种土壤上, 均以 *Negativicutes* 纲和 *Clostridia* 纲的相对丰度最大(图 4-C)。拟杆菌门的相对丰度随着土壤 *Cd<sup>2+</sup>* 浓度的增加没有显著性变化(图 4-A), 而放线菌门的相对丰度随着土壤 *Cd<sup>2+</sup>* 浓度的增加而增加(图 4-A)。RDA 分析的第一轴和第二轴分别可以解释 NHE 东南景天茎内生细菌群落结构(纲水平) 83.1% 和 16.9% 的变化, 其中株高可以解释 42.0% 的茎内生细菌的群落结构变化(图 5-B)。其 *Gammaproteobacteria* 纲和 *Bacteroidia* 纲分别与株高成正相关关系, 但与茎的生物量成负相关关系, *Actinobacteria* 纲与土壤 *Cd<sup>2+</sup>* 浓度、茎 *Cd<sup>2+</sup>* 含量成正相关关系, 但与茎生物量、总生物量成负相关关系。

## 2.5 土壤镉离子浓度对 2 种生态型东南景天根系内生细菌群落结构的影响

HE 东南景天根系内生细菌群落结构: HE 东南景天根系内生细菌主要归属于变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌。变形菌门的相对丰度随着土壤 *Cd<sup>2+</sup>* 浓度的增加而降低(图 6-A), 其中 *Alphaproteobacteria* 纲的相对丰度在 *Cd<sub>5</sub>* 土壤上最高, *Betaproteobacteria* 纲的相对丰度随着土壤 *Cd<sup>2+</sup>* 浓度的增加而降低, 而 *Gammaproteobacteria* 纲的相对丰度在 3 个处理之间没有显著差异(图 6-B)。厚壁菌门的相对丰度随着土壤 *Cd<sup>2+</sup>* 浓度的增加而增加(图 6-A); 在 *Cd<sub>0</sub>*、*Cd<sub>5</sub>* 和 *Cd<sub>50</sub>* 土壤上分别以 *Negativicutes* 纲、*Clostridia* 纲和 *Negativicutes* 纲的相对丰度最高(图 6-C)。拟杆菌门的相对丰度

也随着土壤 *Cd<sup>2+</sup>* 浓度的增加而增加(图 6-A), 3 种处理均以 *Bacteroidia* 纲的相对丰度最高(图 6-D)。放线菌门的相对丰度随着土壤 *Cd<sup>2+</sup>* 浓度的增加而减少(图 6-A), 3 种 *Cd<sup>2+</sup>* 土壤上均以 *Actinobacteria* 纲占优势(图 6-E), 但其在 *Cd<sub>0</sub>* 土壤上的相对丰度显著高于其他 2 个处理。RDA 分析发现, 第一轴和第二轴分别可以解释 HE 东南景天根系内生细菌群落结构 71.2% 和 28.8% 的变化, 其中土壤 *Cd<sup>2+</sup>* 浓度可以解释根系内生细菌 67.4% 的变化(图 7-A)。*Alphaproteobacteria* 纲和 *Clostridia* 纲均与根系生物量、株高成正相关关系, *Bacteroidia* 纲与土壤 *Cd<sup>2+</sup>* 浓度、根系 *Cd<sup>2+</sup>* 浓度成显著正相关( $P < 0.05$ ), *Actinobacteria* 纲与株高、根生物量、总生物量、土壤 *Cd<sup>2+</sup>* 浓度、根系 *Cd<sup>2+</sup>* 含量成负相关(图 7-A)。

NHE 东南景天根系内生细菌群落结构: NHE 东南景天根系内生细菌主要包括变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门。变形菌门的相对丰度在 *Cd<sub>5</sub>* 土壤上最大, 分别是 *Cd<sub>0</sub>* 和 *Cd<sub>50</sub>* 处理的 3.56 倍和 2.03 倍(图 6-A), 尤其是 *Alphaproteobacteria* 纲的相对丰度高达 59.35% (图 6-B)。随着土壤 *Cd<sup>2+</sup>* 浓度的增加, 厚壁菌门的相对丰度减少(图 6-A); 在 *Cd<sub>0</sub>* 土壤上以 *Negativicutes* 纲的相对丰度最大; 在 *Cd<sub>5</sub>* 和 *Cd<sub>50</sub>* 土壤上, 第一优势菌为 *Clostridia* 纲(图 6-C)。拟杆菌门的相对丰度随着土壤 *Cd<sup>2+</sup>* 浓度增加没有显著性变化, 第一优势菌纲均为 *Bacteroidia* 纲(图 6-D)。在 3 种土壤上, 放线菌门中均以 *Actinobacteria* 纲占绝对优势(图 6-E), 在 *Cd<sub>0</sub>* 和 *Cd<sub>5</sub>* 土壤上相对丰度没有显著差异, 而在 *Cd<sub>50</sub>* 土壤上, 相对丰度骤增。

RDA 分析发现, 第一轴和第二轴分别可以解释根系内生细菌 78.2% 和 21.8% 的变化, 主要受株高的影响, 其可以解释 65.8% 的变化(图 7-B)。

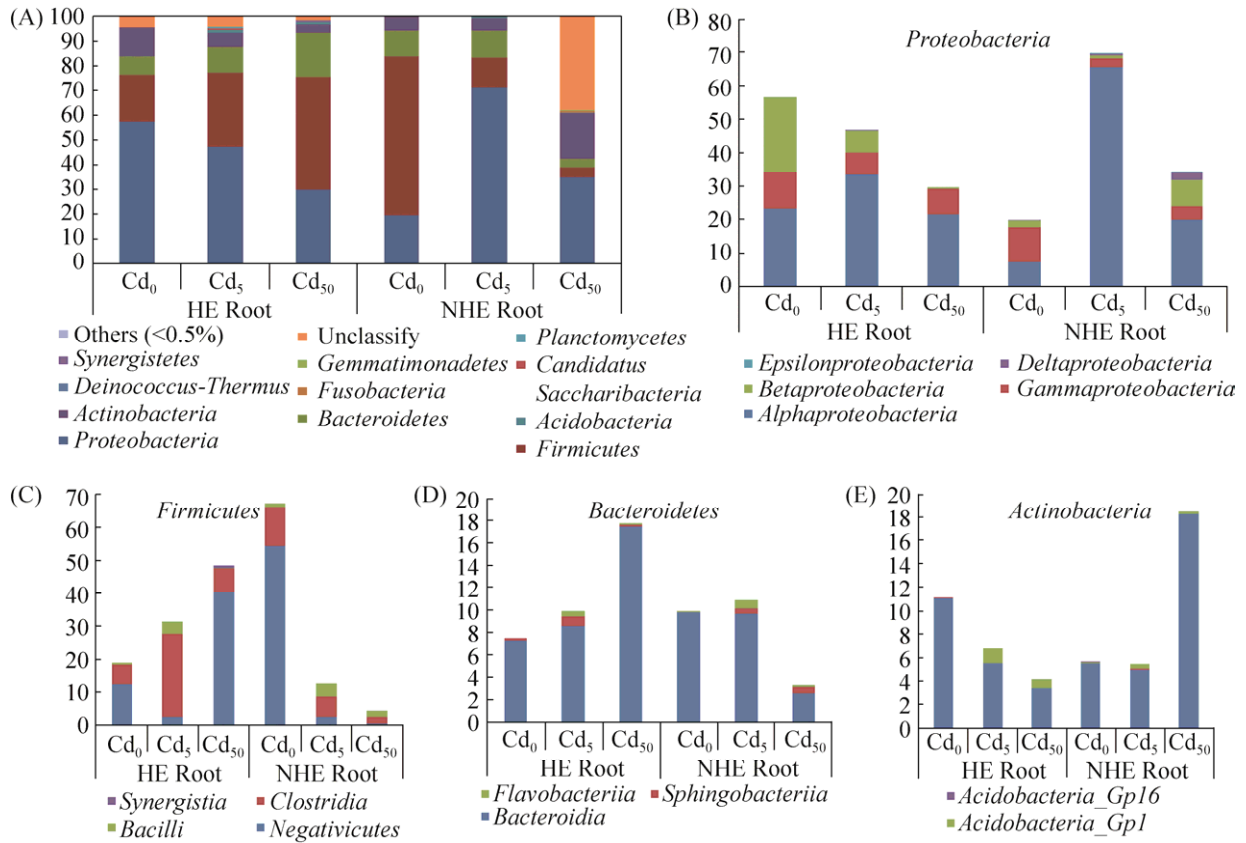


图 6. 2 种生态型东南景天根内生细菌在纲水平物种 Profiling 柱状图

Figure 6. Profiling histogram of endophytic bacteria in roots of two ecotypes of *S. alfredii* at phylum and class levels. A is profiling histogram of species at phylum level of HE and NHE, B, C, D and E are profiling histogram of *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* at class level respectively.

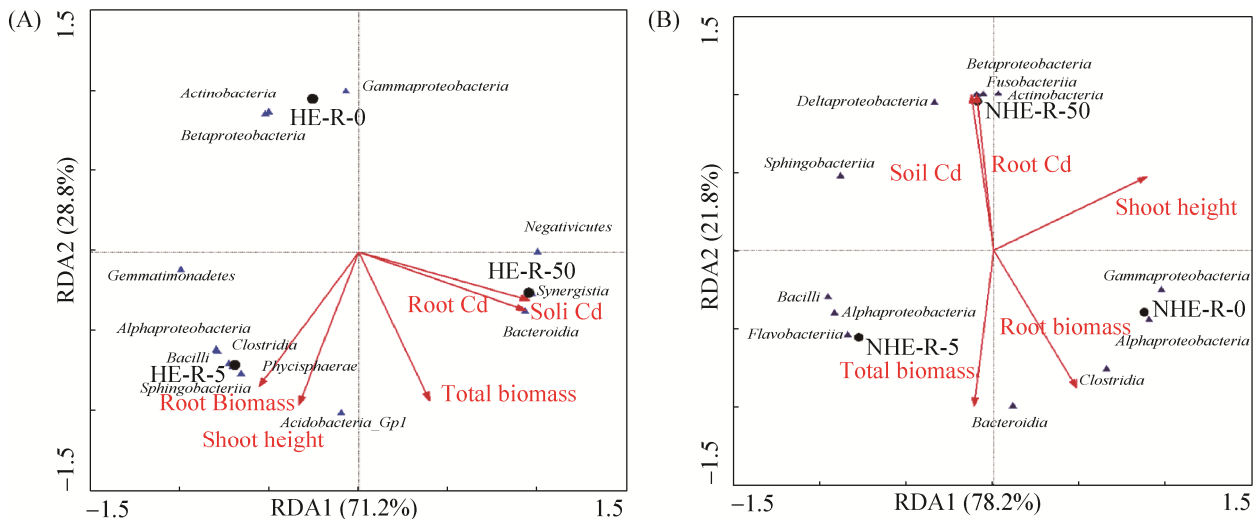


图 7. 2 种生态型根系内生菌 RDA 分析

Figure 7. RDA analysis of endophytic bacteria in roots of HE (A) and NHE (B) ecotypes of *S. alfredii*. RDA analysis of endophytic bacteria in roots of HE (A) and NHE (B) ecotypes of *S. alfredii*.

*Alphaproteobacteria* 纲与土壤 Cd<sup>2+</sup>浓度、根系 Cd<sup>2+</sup>含量成负相关关系, *Clostridia* 纲与根生物量成正相关关系, 但与土壤 Cd<sup>2+</sup>浓度、根系 Cd<sup>2+</sup>含量成负相关关系。*Actinobacteria* 纲与土壤 Cd<sup>2+</sup>浓度、根系 Cd<sup>2+</sup>含量成显著正相关关系( $P<0.05$ )。

## 2.6 高镉环境下 2 种生态型东南景天内生细菌群落结构的比较

在 Cd<sub>50</sub> 土壤上, HE 东南景天生长旺盛, NHE 东南景天也能正常生长, 但其生长受到一定的抑制, 其生物量有所降低; 同时, HE 东南景天的根系、茎和叶片组织中 Cd<sup>2+</sup>含量显著高于 NHE 东南

景天。为了探究是否某些功能菌与 HE 东南景天吸收和积累 Cd<sup>2+</sup>有关, 我们选取 Cd<sub>50</sub> 处理来比较 2 种生态型东南景天内生细菌在属水平的差异(表 2)。

*Escherichia/Shigella* 属、*Veillonella* 属和 *Bacteroides* 属细菌在 HE 东南景天叶片中相对丰度显著低于 NHE, 但 HE 东南景天叶片中 *Sphingomonas* 属细菌的相对丰度大于 NHE; 此外, 有 6 个属(*Sphingobacterium*、*Haemophilus*、*Aquabacterium*、*Lachnospiracea*、*Brevundimonas* 和 *Streptococcus*)细菌仅出现 HE 东南景天叶片中(表 2)。

表 2. 2 种生态型东南景天在 Cd<sup>2+</sup><sub>50</sub> 土壤上不同组织中相对丰度大于 1% 的菌属

Table 2. Genus with relative abundance greater than 1% in different tissues of two ecotypes of *Sedum alfredii* in Cd<sup>2+</sup><sub>50</sub> soil

Leaves		Stems		Roots	
HE/%	NHE/%	HE/%	NHE/%	HE/%	NHE/%
<i>Escherichia/Shigella</i> (16.81)	<i>Veillonella</i> (28.81)	<i>Veillonella</i> (27.71)	<i>Veillonella</i> (22.43)	<i>Veillonella</i> (36.8)	<i>Bradyrhizobium</i> (8.20)
<i>Veillonella</i> (13.60)	<i>Escherichia/Shigella</i> (21.19)	<i>Bacteroides</i> (18.21)	<i>Faecalibacterium</i> (6.74)	<i>Sphingomonas</i> (14.88)	<i>Methylobacterium</i> (5.10)
<i>Faecalibacterium</i> (9.95)	<i>Bacteroides</i> (10.17)	<i>Escherichia/Shigella</i> (11.40)	<i>Escherichia/Shigella</i> (6.31)	<i>Prevotella</i> (8.8)	<i>Ralstonia</i> (4.37)
<i>Bifidobacterium</i> (7.25)	<i>Faecalibacterium</i> (9.32)	<i>Sphingomonas</i> (9.05)	<i>Sphingomonas</i> (5.82)	<i>Bacteroides</i> (7.36)	<i>Rhodococcus</i> (3.28)
<i>Sphingomonas</i> (6.93)	<i>Bifidobacterium</i> (8.47)	<i>Faecalibacterium</i> (6.82)	Gp6 (5.76)	<i>Escherichia/Shigella</i> (3.68)	<i>Streptomyces</i> (3.10)
<i>Bacteroides</i> (6.04)	<i>Porphyromonas</i> (5.08)	<i>Bifidobacterium</i> (6.82)	<i>Bacteroides</i> (4.65)	<i>Methylobacterium</i> (3.52)	<i>Escherichia/Shigella</i> (2.19)
<i>Sphingobacterium</i> (2.28)	<i>Prevotella</i> (4.24)	<i>Neisseria</i> (2.79)	<i>Clostridium sensu stricto</i> (3.05)	<i>Bifidobacterium</i> (2.88)	<i>Bacteroides</i> (2.19)
Gp6 (1.68)	<i>Sphingomonas</i> (3.39)	<i>Klebsiella</i> (2.46)	<i>Bifidobacterium</i> (2.86)	<i>Faecalibacterium</i> (2.56)	<i>Mycobacterium</i> (2.19)
<i>Haemophilus</i> (1.55)	<i>Megasphaera</i> (2.54)	<i>Methylobacterium</i> (1.34)	<i>Bacillus</i> (2.12)	<i>Clostridium sensu stricto</i> (2.56)	<i>Delftia</i> (2.19)
<i>Aquabacterium</i> (1.45)	<i>Clostridium</i> (1.69)		<i>Prevotella</i> (1.98)	<i>Bradyrhizobium</i> (2.4)	<i>Faecalibacterium</i> (2.00)
<i>Lachnospiracea</i> (1.30)	Gp6 (1.69)		<i>Truepera</i> (1.20)	<i>Klebsiella</i> (1.44)	<i>Rhizobium</i> (1.82)
<i>Clostridium</i> (1.25)				<i>Megasphaera</i> (1.28)	
<i>Brevundimonas</i> (1.23)					
<i>Streptococcus</i> (1.08)					

2种生态型东南景天茎中均以 *Veillonella* 属细菌的相对丰度最大, 但其在 HE 东南景天茎中的相对丰度高于 NHE, 3 个属(*Neisseria*、*Klebsiella*、*Methylobacterium*)细菌仅出现在 HE 东南景天茎中; 同时, *Bacteroides*、*Escherichia/Shigella*、*Sphingomonas*、*Faecalibacterium* 和 *Bifidobacterium* 属细菌在 HE 东南景天茎中的相对丰度均高于 NHE (表 2)。

HE 和 NHE 东南景天根系中分别有 12 个和 11 个属的相对丰度高于 1%, 单独出现在 HE 东南景天根中有 7 个属的细菌 (*Veillonella*、*Sphingomonas*、*Prevotella*、*Bifidobacterium*、*Clostridium sensu stricto*、*Klebsiella*、*Megasphaera*), 其中 *Veillonella*、*Sphingomonas* 和 *Prevotella* 属细菌的相对丰度分别高达 36.8%、14.88%、8.8%。此外, HE 东南景天根系中 *Bacteroides*、*Escherichia/Shigella*、*Faecalibacterium* 属细菌的相对丰度均大于 NHE, 而 *Bradyrhizobium* 和 *Methylobacterium* 属细菌的相对丰度则小于 NHE (表 2)。

### 3 讨论

植物内生菌的群落结构和多样性受宿主植物(基因型、生态型、发育阶段、营养状况、器官等)和生长环境(温度、湿度、土壤营养水平和污染状况等)的影响<sup>[42]</sup>。一些研究者还指出, 内生菌的多样性越高, 宿主植物对环境胁迫的适应性越强<sup>[43]</sup>。HE 和 NHE 东南景天对重金属  $Cd^{2+}$  的耐性、吸收和积累能力差异显著, 且 HE 东南景天的根系、茎和叶片中均有丰富的内生细菌<sup>[13]</sup>, 一些内生细菌还能促进东南景天生长和吸收积累 Zn 和 Cd<sup>[44]</sup>。然而, 目前我们对 2 种生态型东南景天内生菌的群

落结构的了解还比较少, 因此, 本研究采用 Illumina MiSeq 高通量测序研究土壤  $Cd^{2+}$  污染水平对 2 种生态型东南根系、茎和叶片的内生菌群落结构的影响。

随着土壤  $Cd^{2+}$  浓度的增加, NHE 东南景天的生长受到一定的抑制, 根系、茎和叶组织中  $Cd^{2+}$  含量显著增加(图 1), 其内生菌的丰富度和多样性显著降低(表 1)。然而, 当 HE 东南景天生长在  $Cd_5$  和  $Cd_{50}$  土壤上时, 其茎和根系中的内生菌的丰富度反而高于  $Cd_0$  处理, 虽然叶片内生菌的丰富度低于  $Cd_0$  处理, 但生长在  $Cd_{50}$  土壤上的 HE 东南景天的叶内生菌的丰富度是  $Cd_5$  处理的 2 倍, 内生细菌的多样性也显著高于  $Cd_0$  和  $Cd_5$  处理(表 1)。其原因可能在于 NHE 东南景天没有忍耐高  $Cd^{2+}$  胁迫的能力, 一方面, 随着植物组织中  $Cd^{2+}$  的积累, 其生理代谢功能发生改变, 从而间接地影响其内生细菌的增殖; 另一方面, 叶片和茎积累的高浓度  $Cd^{2+}$  对其原有内生细菌产生了选择性压力, 一些不能适应  $Cd^{2+}$  胁迫的菌群的数量减少或消失, 从而导致内生细菌的丰富度降低。Wei 等(2014)也发现, 随着土壤 Mn 浓度增加, 商陆内生菌多样性指数显著降低<sup>[45]</sup>。然而, HE 东南景天对  $Cd^{2+}$  有超强的吸收、积累和解毒能力<sup>[2]</sup>, 且在适当高  $Cd^{2+}$  环境下, 其生长和代谢更旺盛, 从而可以给内生细菌提供更为丰度的营养(图 1); 同时, 扦插苗的叶片和茎中  $Cd^{2+}$  本底含量高, 其原有的内生细菌已经适应  $Cd^{2+}$  胁迫, 从而在高  $Cd^{2+}$  环境下更具有竞争优势。因此, 当生长在高  $Cd^{2+}$  土壤上, HE 东南景天的内生细菌丰富度反而增加。研究也发现, 从东南景天不同组织中分离纯化的大部分内生菌中表现出较高的锌和镉抗性, 其中 14 个菌株可分泌 IAA, 6 种菌株可溶解磷酸钙, 3 种菌株能产生铁载体, 土壤接种这些内生菌能促进东南

景天生长和提高土壤中锌的生物有效性<sup>[13]</sup>。接种内生细菌 *SAMR12* 后, 东南景天体内重金属  $\text{Cd}^{2+}$  浓度增加, 并且植物生物量、根长、根尖数以及根表面积亦增加, 同时检测到接种后有机酸(草酸、柠檬酸和琥珀酸)含量增加, 说明 *SAMR12* 可通过产生有机酸、铁载体和酶等促进东南景天的生长和对镉的吸收<sup>[44]</sup>。反之, 植物组织中重金属的积累对植物内生细菌的群落结构亦有较大的影响。RDA 分析也发现, 东南景天叶、茎、根内生细菌的群落结构受植物生长量和体内  $\text{Cd}^{2+}$  的含量影响(图 3、图 5、图 7)。例如, 随着土壤  $\text{Cd}^{2+}$  浓度的增加, HE 东南景天叶片的生物量和  $\text{Cd}^{2+}$  含量增加(图 1), *Gammaproteobacteria* 纲和 *Negativicutes* 纲的相对丰度叶增加(图 2-B), *Clostridia* 纲在  $\text{Cd}^{2+}_{50}$  土壤上的相对丰度远远大于  $\text{Cd}_0$  和  $\text{Cd}_5$  土壤。RDA 分析也发现 HE 东南景天叶片中的 *Gammaproteobacteria* 纲、*Negativicutes* 纲和 *Clostridia* 纲均与叶片  $\text{Cd}^{2+}$  含量、土壤  $\text{Cd}^{2+}$  浓度成显著正相关关系 ( $P < 0.05$ ); *Negativicutes* 纲、*Bacteroidia* 与土壤  $\text{Cd}^{2+}$  浓度和茎  $\text{Cd}^{2+}$  含量成正相关(图 3)。

在 3 种不同  $\text{Cd}^{2+}$  污染水平土壤上, HE 和 NHE 东南景天的叶、茎、根系内生菌中, 变形菌门占绝对优势, 其次是厚壁菌门和拟杆菌门(图 2)。研究者也发现 Ni 超积累植物 *Thlaspi goesingense*<sup>[18]</sup>、As 超积累植物 *Pteris vittata* 和 *Pteris multifida*<sup>[24]</sup> 以及普通植物如杨树 (*Populus deltoides*)<sup>[46]</sup>、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)<sup>[31]</sup>、*Halimione portulacoides*<sup>[47]</sup> 的内生菌中均以变形菌门为主导。在  $\text{Cd}_0$  土壤上, HE 东南景天的叶片、茎和根中均以 *Alphaproteobacteria* 纲相对丰度最高; NHE 东南景天的叶片、茎和根系中均以厚壁菌门中的 *Negativicutes* 纲的相对丰度最高。在  $\text{Cd}_{50}$  土壤上, HE 东南景天的叶片以

*Gammaproteobacteria* 纲的相对丰度最高, 茎和根系中则以 *Negativicutes* 纲的相对丰度最高; NHE 东南景天的叶片和茎中第一优势菌均为 *Negativicutes* 纲, 且根系中 42.81% 的序列在科的水平不能鉴定。这也再次证明内生细菌的群落组成受宿主植物和土壤环境的影响。RDA 分析发现, HE 东南景天叶片中的 *Gammaproteobacteria* 纲与叶片  $\text{Cd}^{2+}$  含量、土壤  $\text{Cd}^{2+}$  浓度成显著正相关关系 ( $P < 0.05$ ), 而 NHE 东南景天叶片中的 *Gammaproteobacteria* 纲与叶片  $\text{Cd}^{2+}$  含量、土壤  $\text{Cd}^{2+}$  浓度均成负相关关系(图 3); HE 东南景天茎中的 *Negativicutes* 纲与茎的  $\text{Cd}^{2+}$  含量、土壤  $\text{Cd}^{2+}$  浓度均成正相关关系, 而 NHE 东南景天茎中的 *Negativicutes* 纲与茎的  $\text{Cd}^{2+}$  含量、土壤  $\text{Cd}^{2+}$  浓度均成负相关关系(图 4)。研究还发现, 在高镉( $\text{Cd}_{50}$ )环境下, *Escherichia/Shigella* 属 (*Gammaproteobacteria* 纲)、*Veillonella* 属 (*Negativicutes* 纲)、*Sphingomonas* 属 (*Alphaproteobacteria* 纲) 和 *Bifidobacterium* 属 (*Actinobacteria* 纲) 等在 HE 东南景天叶、茎、根均占绝对优势(表 2), 这些菌属可能影响东南景天的生长和发育, 参与  $\text{Cd}^{2+}$  的吸收、积累和解毒的生理代谢过程。研究发现, 内生细菌 *Sphingomonas SaMR12* 可以促进东南景天生长和对镉的积累<sup>[32]</sup>。但是遗憾的是, 目前还没有从东南景天体内分离和纯化 *Escherichia/Shigella*、*Veillonella* 和 *Bifidobacterium* 属的细菌。

## 参 考 文 献

- [1] Yang XE, Long XX, Ni WZ, Fu CX. *Sedum alfredii* H: a new Zn hyperaccumulating plant first found in China. *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47(19): 1634–1637.
- [2] Yang XE, Long XX, Ye HB, He ZL, Calvert DV, Stoffella PJ. Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance). *Plant and Soil*, 2004, 259(1/2): 181–189.
- [3] Yang XE, Li TQ, Long XX, Xiong YH, He ZL, Stoffella PJ.

- Dynamics of zinc uptake and accumulation in the hyperaccumulating and non-hyperaccumulating ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. *Plant and Soil*, 2006, 284(1/2): 109–119.
- [4] Xiong YH, Yang XE, Ye ZQ, He ZL. Characteristics of cadmium uptake and accumulation by two contrasting ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 2004, 39(11/12): 2925–2940.
- [5] Wu QT, Wei ZB, Ouyang Y. Phytoextraction of Metal-contaminated soil by *Sedum alfredii* H: effects of chelator and co-planting. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2007, 180(1/4): 131–139.
- [6] Wei ZB, Guo XF, Wu QT, Long XX, Penn CJ. Phytoextraction of heavy metals from contaminated soil by co-cropping with chelator application and assessment of associated leaching risk. *International Journal of Phytoremediation*, 2011, 13(7): 717–729.
- [7] Xiao WD, Wang H, Li TQ, Zhu ZQ, Zhang J, He ZL, Yang XE. Bioremediation of Cd and carbendazim co-contaminated soil by Cd-hyperaccumulator *Sedum alfredii* associated with carbendazim-degrading bacterial strains. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(1): 380–389.
- [8] Ni WZ, Sun Q, Yang X. Growth and zinc accumulation of *Sedum alfredii* Hance—a Zn hyperaccumulator as affected by phosphorus application. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2004, 72(4): 756–762.
- [9] Zhu E, Liu D, Li JG, Li TQ, Yang XE, He ZL, Stoffella PJ. Effect of nitrogen fertilizer on growth and cadmium accumulation in *Sedum alfredii* Hance. *Journal of Plant Nutrition*, 2010, 34(1): 115–126.
- [10] Huang HG, Wang K, Zhu ZQ, Li TQ, He ZL, Yang XE, Gupta DK. Moderate phosphorus application enhances Zn mobility and uptake in hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(5): 2844–2853.
- [11] Wang K, Zhang J, Zhu ZQ, Huang HG, Li TQ, He ZL, Yang XE, Alva A. Pig manure vermicompost (PMVC) can improve phytoremediation of Cd and PAHs co-contaminated soil by *Sedum alfredii*. *Journal of Soils and Sediments*, 2012, 12(7): 1089–1099.
- [12] Li WC, Ye ZH, Wong MH. Metal mobilization and production of short-chain organic acids by rhizosphere bacteria associated with a Cd/Zn hyperaccumulating plant, *Sedum alfredii*. *Plant and Soil*, 2010, 326(1/2): 453–467.
- [13] Long XX, Chen XM, Chen YG, Wong-Chung WJ, Wei ZB, Wu QT. Isolation and characterization endophytic bacteria from hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance and their potential to promote phytoextraction of zinc polluted soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27(5): 1197–1207.
- [14] Chen B, Shen JG, Zhang XC, Pan FS, Yang XE, Feng Y. The endophytic bacterium, *Sphingomonas SaMR12*, improves the potential for zinc phytoremediation by its host, *Sedum alfredii*. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106826.
- [15] Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 278(1): 1–9.
- [16] Wani ZA, Ashraf N, Mohiuddin T, Riyaz-Ul-Hassan S. Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(7): 2955–2965.
- [17] Lodewyckx C, Taghavi S, Mergeay M, Vangronsveld J, Clijsters H, van der Lelie D. The effect of recombinant heavy metal-resistant endophytic bacteria on heavy metal uptake by their host plant. *International Journal of Phytoremediation*, 2001, 3(2): 173–187.
- [18] Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel WW, Sessitsch A. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 2667–2677.
- [19] Barzanti R, Ozino F, Bazzicalupo M, Gabbriellini R, Galardi F, Gonnelli C, Mengoni A. Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microbial Ecology*, 2007, 53(2): 306–316.
- [20] Mastretta C, Taghavi S, van der Lelie D, Mengoni A, Galardi F, Gonnelli C, Barac T, Boulet J, Weyens N, Vangronsveld G. Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. *International Journal of Phytoremediation*, 2009, 11(3): 251–267.
- [21] Sun LN, Zhang YF, He LY, Chen ZJ, Wang QY, Qian M, Sheng XF. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresource Technology*, 2010, 101(2): 501–509.
- [22] Luo SL, Chen L, Chen JL, Xiao X, Xu TY, Wan Y, Rao C, Liu CB, Liu YT, Lai C, Zeng GM. Analysis and characterization of cultivable heavy metal-resistant bacterial endophytes isolated from Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their potential use for phytoremediation. *Chemosphere*, 2011, 85(7): 1130–1138.
- [23] Pan FS, Chen B, Ma XX, Yang XE, Feng Y. Isolation and characterization of a specific endophytic bacterium from the Cd hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2014, 34(2): 449–456. (in Chinese)  
潘凤山, 陈宝, 马晓晓, 杨肖娥, 冯英. 一株镉超积累植物东南景天特异内生细菌的筛选及鉴定. *环境科学学报*, 2014, 34(2): 449–456.
- [24] Zhu LJ, Guan DX, Luo J, Rathinasabapathi B, Ma LQ. Characterization of arsenic-resistant endophytic bacteria from hyperaccumulators *Pteris vittata* and *Pteris multifida*.

- Chemosphere*, 2014, 113: 9–16.
- [25] Zhang WH, Chen W, He LY, Wang Q, Sheng XF. Characterization of Mn-resistant endophytic bacteria from Mn-hyperaccumulator *Phytolacca americana* and their impact on Mn accumulation of hybrid penisetum. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 120: 369–376.
- [26] Weyens N, van der Lelie D, Taghavi S, Vangronsveld J. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, 20(2): 248–254.
- [27] Rajkumar M, Sandhya S, Prasad MNV, Freitas H. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(6): 1562–1574.
- [28] Ma Y, Rajkumar M, Zhang C, Freitas H. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of Environmental Management*, 2016, 174: 14–25.
- [29] Rosenblueth M, Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(8): 827–837.
- [30] Ding T, Palmer MW, Melcher U. Community terminal restriction fragment length polymorphisms reveal insights into the diversity and dynamics of leaf endophytic bacteria. *BMC Microbiology*, 2013, 13: 1.
- [31] Bodenhausen N, Horton MW, Bergelson J. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56329.
- [32] Chen B, Shen JG, Zhang XC, Pan FS, Yang XE, Feng Y. The endophytic bacterium, *Sphingomonas SaMR12*, improves the potential for zinc phytoremediation by its host, *Sedum alfredii*. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106826.
- [33] Qin N, Li DF, Yang RF. Next-generation sequencing technologies and the application in microbiology—A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(4): 445–457. (in Chinese) 秦楠, 栗东芳, 杨瑞馥. 高通量测序技术及其在微生物学研究中的应用. *微生物学报*, 2011, 51(4): 445–457.
- [34] Cai YA, Li D, Bi XJ, Zeng HP, Zhang J. Analysis of microbial community structure and functional bacteria in a biofilter with different sequencing technologies. *China Environmental Science*, 2016, 36(6): 1830–1834. (in Chinese) 蔡言安, 李冬, 毕学军, 曾辉平, 张杰. 基于不同测序技术的生物群落结构及功能菌分析. *中国环境科学*, 2016, 36(6): 1830–1834.
- [35] Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrektson 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.
- [36] Manter DK, Delgado JA, Holm DG, Stong RA. Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. *Microbial Ecology*, 2010, 60(1): 157–166.
- [37] Williams TR, Moyne AL, Harris LJ, Marco ML. Season, irrigation, leaf age, and *Escherichia coli* inoculation influence the bacterial diversity in the lettuce phyllosphere. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68642.
- [38] Ren GD, Zhang HY, Lin XG, Zhu JG, Jia ZJ. Response of phyllosphere bacterial communities to elevated CO<sub>2</sub> during rice growing season. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(22): 9459–9471.
- [39] Romero FM, Marina M, Pieckenstein 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.
- [40] Shi YW, Yang HM, 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.
- [41] 郭荣荣. 两种生态型东南景天不可培养内生细菌的多样性差异及其侵染特征. 华南农业大学硕士论文, 2015.
- [42] Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64: 807–838.
- [43] Sánchez-López AS, Thijs S, Beckers B, González-Chávez MC, Weyens N, Carrillo-González R, Vangronsveld J. Community structure and diversity of endophytic bacteria in seeds of three consecutive generations of *Crotalaria pumila* growing on metal mine residues. *Plant and Soil*, 2018, 422(1/2): 51–66.
- [44] Chen B, Zhang YB, Rafiq MT, Khan KY, Pan FS, Yang XE, Feng Y. Improvement of cadmium uptake and accumulation in *Sedum alfredii* by endophytic bacteria *Sphingomonas SaMR12*: effects on plant growth and root exudates. *Chemosphere*, 2014, 117: 367–373.
- [45] Wei Y, Hou H, Shangguan YX, Li JN, Li FS. Genetic diversity of endophytic bacteria of the manganese-hyperaccumulating plant *Phytolacca americana* growing at a manganese mine. *European Journal of Soil Biology*, 2014, 62: 15–21.
- [46] Gottel NR, Castro HF, Kerley M, Yang ZM, Pelletier DA, Podar M, Karpinetz T, Uberbacher E, Tuskan GA, Vilgalys R, Doktycz MJ, Schadt CW. Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(17): 5934–5944.
- [47] Fidalgo C, Henriques I, Rocha J, Tacão M, Alves A. Culturable endophytic bacteria from the salt marsh plant *Halimione portulacoides*: phylogenetic diversity, functional characterization, and influence of metal(loid) contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(10): 10200–10214.



# Impacts of cadmium on the diversity of endophytic bacteria associated with hyperaccumulating and non-hyperaccumulating ecotypes of *Sedum alfredii*

Shuhua Zou, Pingxiang Deng, Xinxian Long\*

College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

**Abstract:** The effects of heavy metal stress on the community structure of endophytic bacteria in plants are not well understood. To date, few studies have investigated the response of community structure and diversity of endophytic bacteria in hyperaccumulating plants to heavy metals present in soil rhizosphere. **[Objective]** The objectives of this study were to explore the changes and differences in community structure and diversity of endophytic bacteria in roots, stems, and leaves of hyperaccumulating (HE) and non-hyperaccumulating (NHE) ecotypes of *Sedum alfredii* under different levels of Cd<sup>2+</sup> contamination; as well as to explain their differences in ability to tolerate and accumulate the available cadmium by the two ecotypes of *Sedum alfredii*, based on the mutual relationship between plant and endophyte. **[Methods]** The community structures of endophytic bacteria in the roots, stems, and leaves of the two ecotypes of *Sedum alfredii* grown on soils with different Cd<sup>2+</sup> concentrations were analyzed by Illumina high-throughput sequencing technique. **[Results]** High concentrations of Cd<sup>2+</sup> inhibited the growth of NHE *Sedum alfredii* and decreased the richness and diversity of endophytic bacteria, whereas it promoted the growth of HE *Sedum alfredii* and increased the richness of endophytic bacteria in stems and roots. Among the three tested soils, the endophytic bacteria in leaves, stems, and roots of two ecotypes of *Sedum alfredii* were all dominated by *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, and *Actinobacteria*. For HE *Sedum alfredii*, the relative abundances of *Gammaproteobacteria*, *Negativicutes*, and *Clostridia* in leaves as well as *Alphaproteobacteria* in stems increased significantly with the soil Cd<sup>2+</sup> concentration, whereas the relative abundances of *Clostridia* decreased significantly. For NHE *Sedum alfredii*, with the increase in soil Cd<sup>2+</sup> concentration, the relative abundances for *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, and *Clostridia* in leaves did not show significant change, while those for *Negativicutes* in stems as well as *Betaproteobacteria* and *Clostridia* in roots decreased significantly, and those for *Negativicutes* in roots increased significantly. In highly Cd<sup>2+</sup>-contaminated soils (50 mg/kg), the relative abundances of *Sphingomonas* in leaves and *Veillonella* in stems of HE *Sedum alfredii* were higher than those for NHE *Sedum alfredii*. Meanwhile, the first, second, and third predominant endophytic bacteria (i.e., *Veillonella*, *Sphingomonas*, and *Prevotella*) that were present in the roots of HE *Sedum alfredii* did not appear in roots of NHE *Sedum alfredii*. **[Conclusion]** The Cd<sup>2+</sup>-contamination level in soils had significant impacts on the community structure of endophytic bacteria in leaves, stems, and roots of the two ecotypes of *Sedum alfredii*.

**Keywords:** *Sedum alfredii*, endophytic bacteria, available cadmium

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41471264)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-85280296; E-mail: Longxx@scau.edu.cn

Received: 22 January 2019; Revised: 20 May 2019; Published online: 12 July 2019