

基于 Illumina 高通量测序的蛇莓不同组织内生细菌多样性分析与功能预测

张 慧¹, 李贵文^{1,2}, 杨胜利², 朱李娜¹, 王靖宇¹, 肖功年¹

1. 浙江科技大学生物与化学工程学院, 浙江 杭州 310023

2. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014

摘要: 目的 剖析蛇莓 *Duchesnea indica* 不同组织内生细菌群落的多样性及其功能, 揭示内生细菌与蛇莓药用活性间的潜在联系。方法 以蛇莓组织根、茎、叶、果中内生细菌为研究对象, 运用 Illumina 高通量技术对群落 DNA 片段进行双端测序, 借助 DADA2 和 Vsearch 方法处理序列, 进行生物信息学分析及功能潜能预测。结果 蛇莓内生细菌基因组高通量测序, 共获取 1 914 360 条原始序列, 在“门”水平上, 以变形菌门 (Proteobacteria) 为优势菌群。不同组织中内生细菌以茎内丰富度最高, 根内多样性最高。鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas* 是区分组间差异的关键标志物种, 与假单胞菌属 *Pseudomonas* 呈显著正相关, 且二者是 *N*₁₀-甲酰基四氢叶酸生物合成代谢通路的主要构成菌属。结论 蛇莓内生细菌群落在叶、果实与茎中相似性较高, 与根差异明显; 假单胞菌属与鞘氨醇单胞菌可能在次生代谢产物合成或宿主抗逆性增强中发挥协同作用。

关键词: 蛇莓; 内生细菌; 高通量测序; 多样性; 群落结构

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)16-6510-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.16.023

Diversity analysis and functional prediction of endophytic bacteria in different tissues of *Duchesnea indica* based on Illumina high-throughput sequencing

ZHANG Hui¹, LI Guiwen^{1,2}, YANG Shengli², ZHU Lina¹, WANG Jingyu¹, XIAO Gongnian¹

1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China

2. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

Abstract: Objective To analyze the diversity and functional potential of endophytic bacterial communities in different tissues of *Duchesnea indica* and explore their potential relationship with the medicinal activity of the host plant. **Methods** Endophytic bacteria from the root, stem, leaf and fruit tissues of *D. indica* were studied. DNA fragments of the microbial communities were subjected to paired-end sequencing using Illumina high-throughput technology. Sequences were processed using DADA2 and Vsearch, followed by bioinformatics analysis and functional potential prediction. **Results** High-throughput sequencing of the endophytic bacterial genomes yielded a total of 1 914 360 raw sequences. At the phylum level, Proteobacteria was the dominant group. Among different tissues, the stem exhibited the highest richness of endophytic bacteria, while the root showed the highest diversity. *Sphingomonas* was identified as a key biomarker distinguishing intergroup differences and showed a significant positive correlation with *Pseudomonas*. Both bacterial genera were major contributors to the *N*₁₀-formyltetrahydrofolate biosynthesis pathway. **Conclusion** The endophytic bacterial communities in the leaf, fruit and stem tissues of *D. indica* exhibited high similarity but were significantly distinct from those in the root. *Pseudomonas* and *Sphingomonas* may play synergistic roles in the synthesis of secondary metabolites or in enhancing host stress resistance.

Keywords: *Duchesnea indica* (Andr.) Focke; endophytic bacteria; high-throughput sequencing; diversity; community structure

蛇莓 *Duchesnea indica* (Andr.) Focke 是一种传统的中药材, 广泛分布于亚洲地区, 尤其是中国和印度, 具有悠久的药用历史^[1]。其全草入药, 常用于消肿、解毒和抗炎, 民间常称之为地莓、鸡冠果或假草莓。现代研究表明, 蛇莓富含多种活性成分, 包括三萜类、黄酮类、甾醇、维生素 E 和酚酸^[2-4]

等, 具有显著的药理活性, 如抑菌^[5]、中枢神经抑制^[6]、免疫促进^[7]等作用。近年来, 蛇莓的抗肿瘤活性成为研究热点。Xiang 等^[8]分离的中性多糖 DIP-1 对人卵巢癌 SKOV-3 和人肝癌 HepG2 细胞也显示出较强的抗肿瘤活性, 其 IC₅₀ 值分别为 1.42 mg/mL 和 1.23 mg/mL。此外, 蛇莓的酚类组分可通过线粒

收稿日期: 2026-02-02

基金项目: 浙江省尖兵领雁研发攻关计划项目 (2023C02042)

作者简介: 张 慧 (1972—), 女, 教授级高级工程师, 硕士生导师, 主要从事功能食品研究。E-mail: zhanghui0461@zust.edu.cn

体途径诱导 SKOV-3 细胞凋亡,并在 S 期阻滞细胞周期进程,展现出显著的细胞毒性^[9]。Yang 等^[10]进一步发现,蛇莓提取物通过下调丝裂原活化蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MEK)/细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路抑制基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)活性,从而减弱口腔癌细胞的转移能力。因此,蛇莓近年来逐渐在医药领域焕发新的生机,其丰富的活性成分和多样的药理活性为其在抗肿瘤、免疫调节及抗炎等领域的应用提供了广阔前景。然而,尽管蛇莓的药理活性已被广泛研究,但其药用价值的开发仍存在一些局限性。首先,蛇莓的活性成分复杂,其作用机制尚未完全阐明;其次,传统的研究多集中于植物本身的化学成分,而忽略了与其共生的微生物群落可能发挥的重要作用。

内生菌是指与植物建立长期共生关系的微生物,主要包括内生细菌、内生真菌和内生放线菌。这些微生物在宿主植物体内生存,通常不会引起明显的病理变化^[11]。内生菌的研究始于 1866 年 De Barry 对植物内部致病微生物的描述^[12],而 1993 年 Stierle 从短叶红豆杉中分离出一种能够产生紫杉醇的内生真菌 *Taxomyces andreanae*,标志着内生菌研究进入了一个新阶段^[13]。后续研究进一步拓展到内生细菌领域,如 Liu 等^[14]从半夏 *Pinellia ternata* 中分离出了多株产生物碱的内生细菌。植物内生细菌通过与宿主的长期共生关系,逐渐成为宿主不可或缺的一部分,并表现出明显的组织特异性。然而,目前实验室培养技术仅能获得环境中微生物总量的 0.1%~1.0%,绝大多数微生物仍未被成功培养和研究,这限制了对植物内生细菌多样性及其功能的深入理解。

植物内生细菌作为植物体内的重要组成部分,不仅能够增强宿主的抗逆性,还可能通过代谢产物的合成直接或间接影响宿主的药用活性。目前,关于蛇莓内生细菌的研究尚未见报道,这限制了对蛇莓药用价值的全面理解。因此,本研究利用 Illumina 平台的高通量测序深入研究蛇莓不同组织根、茎、叶、果的内生细菌多样性及其功能,探索内生细菌在蛇莓体内的分布规律及其与宿主药用活性之间的潜在关联,为开发基于内生菌的新型药物提供新的思路和理论依据。

1 材料和试剂

1.1 材料

2023 年 4 月,本研究在杭州小和山地区(北纬 30°13', 东经 120°1')采集了 20 株生长健壮的蛇莓

植株,经浙江科技大学张慧教授鉴定确认为蔷薇科植物蛇莓 *D. indica* (Andr.) Focke。采集过程中保持植株完整,每株单独包装后立即置于冰盒中运输至实验室。为保障实验可靠性,样本随机分为 5 组(每组 4 株)作为生物学重复,并在 4℃ 条件下保存,确保所有后续实验均在采集后 24 h 内完成。实验全程在超净工作台中进行,以维持无菌操作环境。

1.2 试剂与仪器

次氯酸钠溶液(分析纯,国药集团化学试剂);无水乙醇(分析纯,上海凌峰化学试剂);SW-CJ-1FD 型超净工作台(上海博迅实业有限公司);YXQ-LS-50SII 型立式压力蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司);TD5Z 型常温板式离心机(卢湘仪有限公司);Pico17 型常温板式离心机(Thermo 有限公司);Tissuelyser-48 型组织研磨仪(上海净信生物科技有限公司);PRACTUM313-1CN 型分析天平(Practum 有限公司);H-SWX-600BS 型电热恒温水浴箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);IMAG-96P 型超强磁力板(Axygen 有限公司);DYY-6C 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);BG-gdsAUTO (130)型凝胶成像系统(北京百晶科技有限公司);2720 型 PCR 扩增仪(ABI 有限公司);FLX800T 型酶标仪(BioTek 有限公司);NanoMagBio S-96 型 96 通量核酸提取仪(Thermo 有限公司);NC2000 型 Nanodrop(Thermo 有限公司)。

2 方法

2.1 样品前处理

首先,采集健康且无明显病害的蛇莓全株,用去离子水彻底冲洗并浸泡,以去除表面污垢和杂质。随后,将植物转移至经过灭菌处理的无菌超净工作台,依次进行表面消毒:先用 75%乙醇处理 1 min 以灭活表面微生物,再用 2.5%次氯酸钠溶液处理 5 min 以确保彻底消毒。消毒完成后,用无菌蒸馏水清洗植物表面 3 次,并取最后 1 次清洗的无菌水涂布于 LB 固体培养基上,培养 2~3 d 以验证消毒效果。若无菌落生长,则表明表面消毒处理有效。最后,用无菌滤纸轻轻擦干植物表面,并使用无菌手术刀将植物按不同组织切割。将切好的植物组织用液氮快速冷冻,封装于无菌管中,并储存于-80℃ 冰箱以备后续实验使用^[15-17]。

2.2 总 DNA 提取

待 2~3 d 培养后,发现 LB 固体培养基中无任何菌落长出,则将保存的样品按照 OMEGA Soil

DNA Kit 试剂盒的说明书进行蛇莓内生细菌总 DNA 提取,并在进一步分析之前储存于 -20°C 。提取 DNA 的数量和质量分别使用 NanoDrop NC2000 型分光光度计和琼脂糖凝胶电泳进行测定。

2.3 PCR 扩增

以提取的总 DNA 为模版,使用正向引物(5'-AACMGATTAGATACCCCKG-3')和反向引物(5'-ACGTCATCCCCACCTTCC-3')扩增内生细菌的 16S_V5V7 区域。PCR 反应混合物包括 5 μL 的 5 $\times$ 缓冲液、0.25 μL 的 Fast pfu DNA 聚合酶(5 U/ μL)、2 μL 的 2.5 mmol/L dNTPs、1 μL 的正向和反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)、1 μL 的 DNA 模板(50 ng)以及 14.75 μL 的 ddH₂O。PCR 反应条件:98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 25 个循环;最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 5 min。PCR 扩增产物随后提交至上海派森诺生物公司进行高通量测序,使用 Illumina Novaseq-PE 250 平台进行测序和分析。

2.4 数据处理与分析

采用 Illumina 平台对群落 DNA 片段进行双端测序,通过 DADA2 和 Vsearch 方法进行序列处理,包括去引物、质量过滤、去噪、拼接和去嵌合体等步骤^[18-19],生成 ASV/OTU 并去除 singletons。基于物种分类学注释结果,使用 QIIME2 统计样本在门、

纲、目、科、属、种水平的物种组成,并通过柱状图可视化。Alpha 多样性分析通过 Chao1、Shannon、Simpson 等指数评估样本的丰富度、多样性和均匀度^[20],使用 R 脚本绘制箱线图并通过 Kruskal-Wallis 检验验证差异显著性,同时利用 QIIME2 绘制稀疏曲线评估测序深度^[21]。Beta 多样性分析采用 PCoA 和 NMDS 方法,揭示样本间物种组成的相异性^[22]。通过韦恩图分析样本或组间物种的共有与独有情况,并利用随机森林算法挖掘分类单元的丰度特征^[23]。微生物关联网络分析通过 SparCC 方法构建相关性矩阵,揭示微生物群落的共现或互斥模式。功能潜能预测采用 PICRUSt2 工具,基于 16S rRNA 基因序列推断菌群的代谢潜力,并通过归一化处理和可视化展示功能分布特征^[24]。

3 结果与分析

3.1 内生细菌序列分析

本研究通过对蛇莓内生细菌的高通量测序,共获得 1 914 360 条原始序列。经过滤(Filtered)后保留 1 607 674 条高质量序列,进一步通过去噪(Denoised)处理得到 1 572 965 条序列。经过合并(Merged)、去除嵌合体(Non-chimeric)以及去除单例序列(Non-singleton)处理后,最后获得 933 086 条高质量非单例序列。具体数据如表 1 所示。

表 1 内生细菌序列分析

Table 1 Sequence analysis of endophytic bacteria

样品 ID	序列数					
	原始	过滤	去噪	合并	去嵌合体	非单例
F1	80 184	64 728	63 336	53 181	46 339	46 319
F2	76 312	62 818	61 348	51 469	40 604	40 585
F3	82 008	69 077	67 883	58 846	47 924	47 910
F4	96 185	79 901	78 879	70 347	53 674	53 648
F5	93 667	82 169	81 496	77 771	51 141	51 124
R1	118 980	103 360	97 378	61 408	39 339	38 623
R2	114 342	99 064	96 282	75 564	43 492	43 313
R3	77 792	66 907	66 303	59 080	57 342	57 330
R4	98 994	88 951	87 261	77 769	58 975	58 918
R5	91 467	78 824	77 990	71 652	64 856	64 836
L1	91 004	70 799	69 829	61 369	35 948	35 924
L2	95 480	79 031	78 183	73 165	39 698	39 679
L3	99 269	77 605	76 402	68 257	43 588	43 580
L4	88 464	67 894	67 285	60 644	44 607	44 598
L5	123 918	112 029	110 174	98 730	56 711	56 646
S1	98 599	80 248	77 809	60 232	37 965	37 820
S2	90 161	72 436	70 690	57 300	35 643	35 610
S3	103 870	89 839	89 319	86 358	65 721	65 718
S4	101 475	85 437	82 998	67 502	41 776	41 618
S5	92 189	76 557	72 120	44 733	29 803	29 287
总计	1 914 360	1 607 674	1 572 965	1 335 377	935 146	933 086

3.2 物种组成分析

通过对蛇莓不同组织部位（根、茎、叶、果实）内生细菌的分类单元数统计（图 1）发现，茎在“属”和“种”水平上的多样性最为丰富，其次是根，而果实和叶的多样性相对较低。

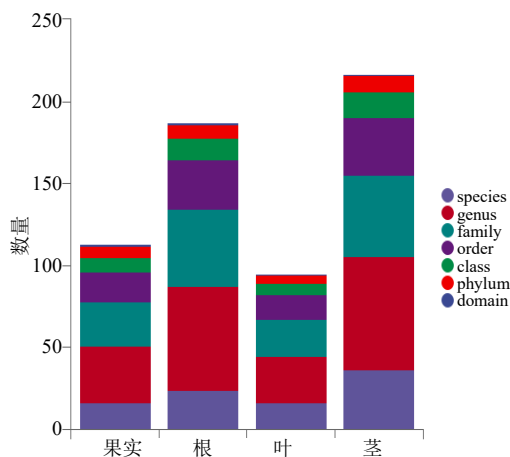


图 1 分类单元数统计

Fig. 1 Taxon number statistics

在“门”水平上（图 2-A），蛇莓内生细菌以变形菌门（Proteobacteria）为主，占据绝对优势，其次是放线菌门（Actinobacteriota），这一结果与 Cheng 等^[25]及 Yuan 等^[26]的研究一致。

在“纲”水平上（图 2-B），果实的内生细菌主要由 γ -变形菌纲（Gammaproteobacteria，74.72%）主导；根的内生细菌则以 γ -变形菌纲（Gammaproteobacteria，55.46%）和 α -变形菌纲（Alphaproteobacteria，36.69%）为主；而叶和茎的内生细菌主要由 γ -变形菌纲、 α -变形菌纲和放线菌纲（Actinobacteria）共同组成。

在“目”水平上（图 2-C），果实的内生细菌以假单胞菌目（Pseudomonadales，32.53%）和肠杆菌目（Enterobacterales，31.73%）为主；根的内生细菌主要由假单胞菌目（Pseudomonadales，32.53%）、根瘤菌目（Rhizobiales，14.62%）和伯克霍尔德菌目（Burkholderiales，27.12%）组成；叶和茎的内生细菌则主要由假单胞菌目（Pseudomonadales）、根瘤菌目（Rhizobiales）、伯克霍尔德菌目（Burkholderiales）和鞘脂单胞菌目（Sphingomonadales）组成。

在“科”水平上（图 2-D），果实的内生细菌以假单胞菌科（Pseudomonadaceae，32.45%）、欧文氏菌科（Erwiniaceae，10.40%）和肠杆菌科（Enterobacteriaceae，16.39%）为主；根的内生细菌

主要由假单胞菌科（Pseudomonadaceae，27.05%）和草酸杆菌科（Oxalobacteraceae，19.95%）组成；叶的内生细菌以假单胞菌科（Pseudomonadaceae，20.95%）和鞘脂单胞菌科（Sphingomonadaceae，19.86%）为主；茎的内生细菌则主要由假单胞菌科（Pseudomonadaceae，10.88%）、鞘脂单胞菌科（Sphingomonadaceae，17.73%）和欧文氏菌科（Erwiniaceae，10.63%）组成。

在“属”水平上（图 2-E），果实和根中假单胞菌属 *Pseudomonas* 占据显著优势，相对丰度分别为 32.44%和 26.99%；叶中的主要菌属为假单胞菌属 *Pseudomonas*（20.95%）、鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*（19.41%）和甲基杆菌属 *Methylobacterium-Methylobacterium*（9.78%）；茎中的优势菌属包括假单胞菌属 *Pseudomonas*（10.86%）、甲基杆菌属 *Methylobacterium-Methylobacterium*（8.57%）、泛菌属 *Pantoea*（9.13%）、根瘤菌属及相关属 *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*（8.47%）和新鞘脂菌属 *Novosphingobium*（9.89%）。在“种”水平上（图 2-F），蛇莓的根、茎、叶、果实内未发现明显的优势菌株。

3.3 Alpha 多样性分析

本研究采用 Alpha 多样性指数表征蛇莓不同组织部位（果实、根、茎、叶）内生细菌的丰富度和均匀度，主要分析指标包括 Chao1、Observed_species、Shannon、Simpson、Pielou_e 和 Goods_coverage 指数（图 3）。分析结果显示，Goods_coverage 的中位值均大于 0.995，表明测序覆盖度非常高，几乎接近完全覆盖。Chao1、Observed species、Shannon、Simpson、Faith's PD、Pielou's evenness、Good's coverage 等 Alpha 多样性指数的 *P* 值均大于 0.05，表明在统计学上，蛇莓不同组织内生细菌的 Alpha 多样性并没有显著性差异。具体来看，Chao1 指数和 Observed species 指数的中位值均表现为茎最高，根其次，果实和叶相对较低，表明蛇莓内生细菌的丰富度在茎内最高，根其次，果实和叶相对较低。Shannon 指数和 Simpson 指数的中位值均表现为茎最高，表明蛇莓内生细菌的多样性在茎内最高。Faith's PD 指数中位值表现为茎最高，根其次，果实和叶相对较低，表明蛇莓内生细菌的进化多样性在茎内最高，根其次，果实和叶相对较低。Pielou's evenness 指数表征均匀度，结果显示茎最高，其次是果实、叶、根。然

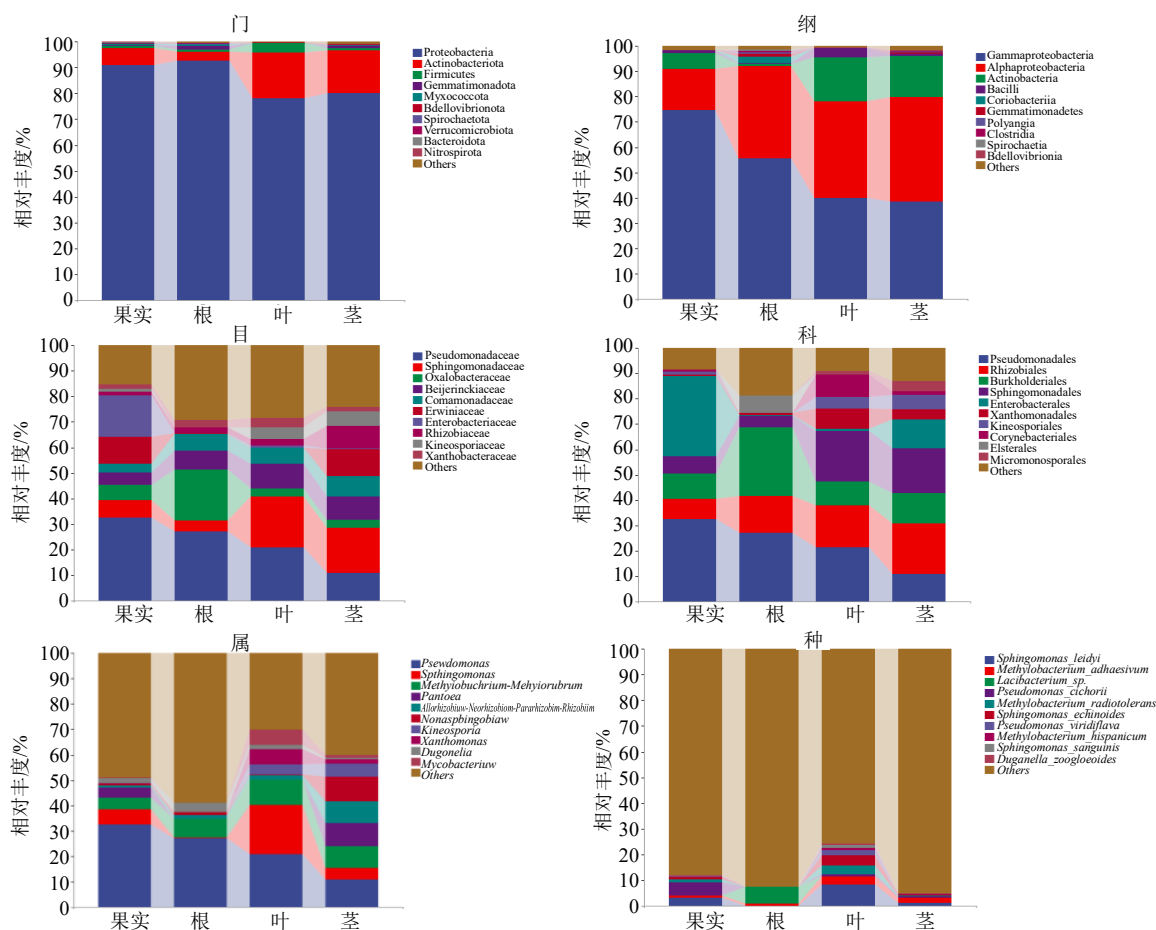


图 2 分类学组成分析

Fig. 2 Taxonomic composition analysis

而, 稀疏曲线 (图 4) 的结果显示, 根的内生细菌多样性最高, 其次是茎、叶和果实。这一结果与 Shannon 指数和 Simpson 指数的中位值表现 (茎最高) 存在一定矛盾。这种差异可能是由于根的内生细菌群落可能包含更多低丰度物种或者根的内生细菌群落可能在不同样本间存在较大差异所导致的。

结合稀疏曲线的平缓趋势, 可以认为本次研究的样本量及测序深度均已足够, 能够较好地反映蛇莓内生细菌的多样性特征。Alpha 多样性指数的箱线图显示, 果实和叶的误差较小, 表明组内样本差异较小; 而根的误差较大, 表明组内样本差异较大。稀疏曲线的平缓趋势进一步支持了测序深度的充分性。根的曲线变异性较大, 与箱线图中根的误差较大一致, 表明根内生细菌多样性在不同样本间存在显著差异; 茎的曲线表现出较高的多样性, 与 Chao1、Shannon 等指数的结果一致; 果实和叶的曲

线较为平稳, 误差较小, 表明这些组织部位的样本内生细菌多样性较为一致。综上所述, 研究结果充分揭示了蛇莓不同组织部位内生细菌的多样性特征。

3.4 Beta 多样性分析

本研究采用 Beta 多样性分析蛇莓不同组织部位 (根、茎、叶、果) 内生细菌群落的差异程度。基于主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA) 的结果 (图 5-A) 显示, 在 PCo2 (9.7%) 维度上, 根、茎、叶的内生细菌群落表现出较高的相似性; 而在 PCo1 (13.4%) 维度上, 根、茎、果实的内生细菌群落表现出较高的相似性, 而叶和根的内生细菌群落则表现出较高的差异性。为进一步验证群落结构的差异, 采用非量度多维尺度分析 (NMDS) ($\text{Stress} = 0.184 < 0.2$) 对蛇莓内生细菌群落进行分析 (图 5-B)。结果显示, 叶的样本间距离最小, 表明不同叶样本间的差异性较小, 组织特异性较高, 这一结果与前述关于蛇莓内生细菌的 Alpha

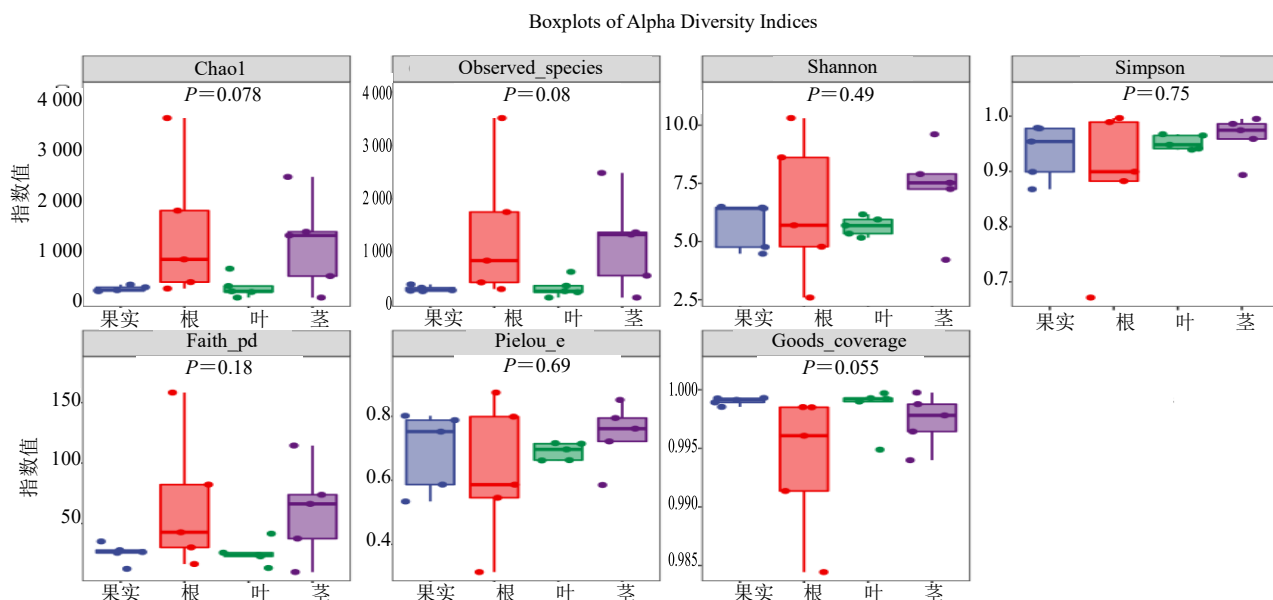


图 3 Alpha 多样性指数箱线图

Fig. 3 Alpha diversity index boxplots

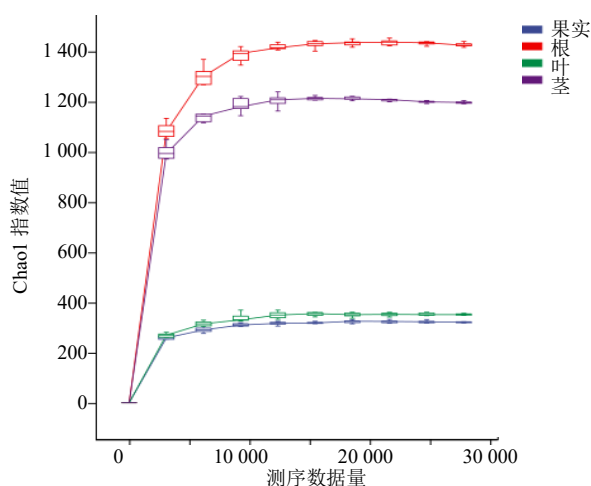


图 4 稀疏曲线

Fig. 4 Rarefaction curve

多样性分析结果一致；而根的样本间距离最大，表明不同根样本间的差异性较大，组织特异性较低，这一结果也与前述分析结果一致。此外，叶的样本分别与果实和茎的样本存在较高的重叠性，说明叶的内生细菌群落与果实和茎的群落结构相似性较高，这一结果与 PCoA 结果略有差异，可能反映了不同分析方法对群落结构差异的敏感性不同。

3.5 物种差异与标志物种分析

在探究内生细菌群落的 Beta 多样性差异后，本研究进一步分析了这些差异的驱动因素，重点关注不同物种的分布特征。如图 6 所示，蛇莓不同组织

部位（根、茎、叶、果）间共有的 ASV/OTU 种类数为 58 种。为了更精准地识别标志物种，本研究采用随机森林分析对“属”和“种”水平的物种进行筛选。图 7 展示了标志物种在各样本或分组中的丰度分布热图，物种按其对模型的重要性从高到低排列，重要性较高的物种被认为是组间差异的关键驱动因素。分析结果显示：在“属”水平上，鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas* 是区分组间差异的关键标志物种（图 7-A）；在“种”水平上，*Sphingomonas echinoides* 是区分组间差异的关键标志物种（图 7-B）。这些标志物种的分布特征为揭示蛇莓不同组织部位内生细菌群落的差异提供了重要线索。

3.6 关联网络分析

通过对蛇莓内生细菌群落的关联网络分析（图 8），发现其在环境因素的影响下呈现出复杂的正相关和负相关关系。具体而言，放线菌门（Actinobacteriota）内部成员之间在一定程度上存在正相关，而与变形菌门（Proteobacteria）之间则表现出较强的负相关。在“属”水平上，鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas* 以及假单胞菌属 *Pseudomonas* 呈现出明显的正相关关系，而杜辮氏菌属 *Duganella* 与红假单胞菌属 *Rhodopseudomonas* 之间则表现出明显的负相关。此外，叶内生细菌的关联网络以正相关为主。在模块分析中，模块 8 内部及其与其他模块之间主要呈现正相关关系。这些结果表明，蛇莓内生细菌群落的相互作用在环境因素的调控下形成了复杂的正、负

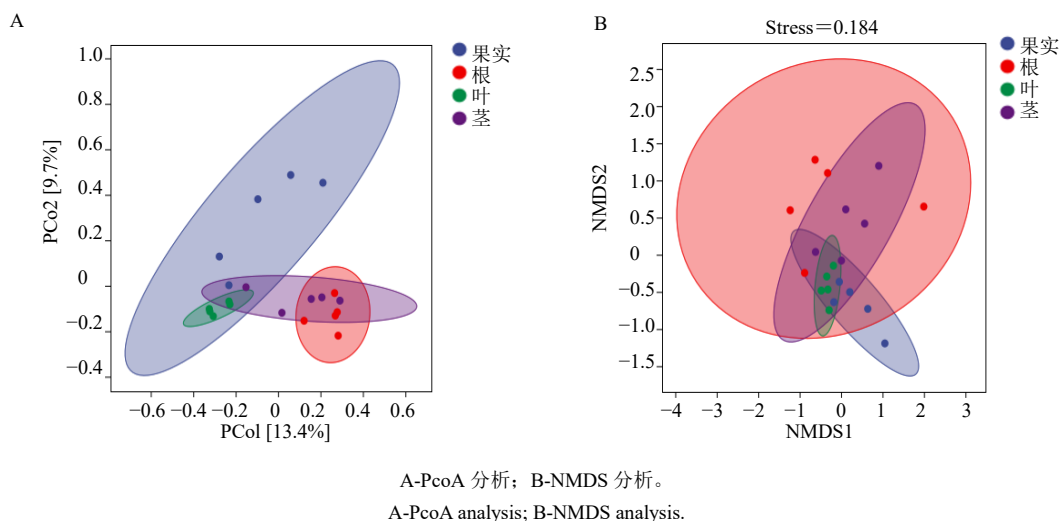


图5 Beta 多样性分析图

Fig. 5 Beta diversity analysis chart

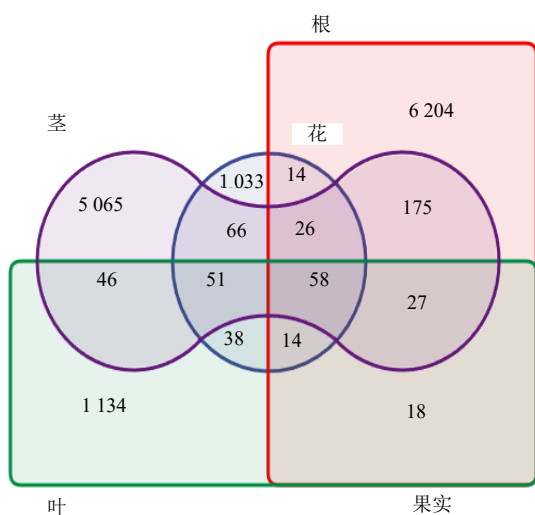


图6 ASV/OTU 韦恩图

Fig. 6 ASV/OTU Venn diagram

相关网络,反映了其在生态功能上的多样性与协同性。

3.7 功能潜能预测

采用 PICRUS2 软件对蛇莓内生细菌的功能基因丰度进行预测。结果显示,与生物合成相关的代谢通路丰度显著高于其他功能类别,其中辅因子、辅基、电子载体与维生素生物合成以及氨基酸生物合成的占比最高(图9)。此外,与降解相关的代谢通路也表现出较高的丰度,尤其是芳香族化合物降解、碳水化合物降解以及核苷和核苷酸降解相关途径占比较高。值得注意的是, N_{10} -甲酰基四氢叶酸生物合成代谢通路在叶内占比较高(图10),主要由假单胞菌属 *Pseudomonas* 和鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas* 组成。这些结果表明,蛇莓内生细菌在生物合成和降解代谢方面具有重要的功能潜力,可能与其在宿主植物中的生态角色和代谢调控密切相关。

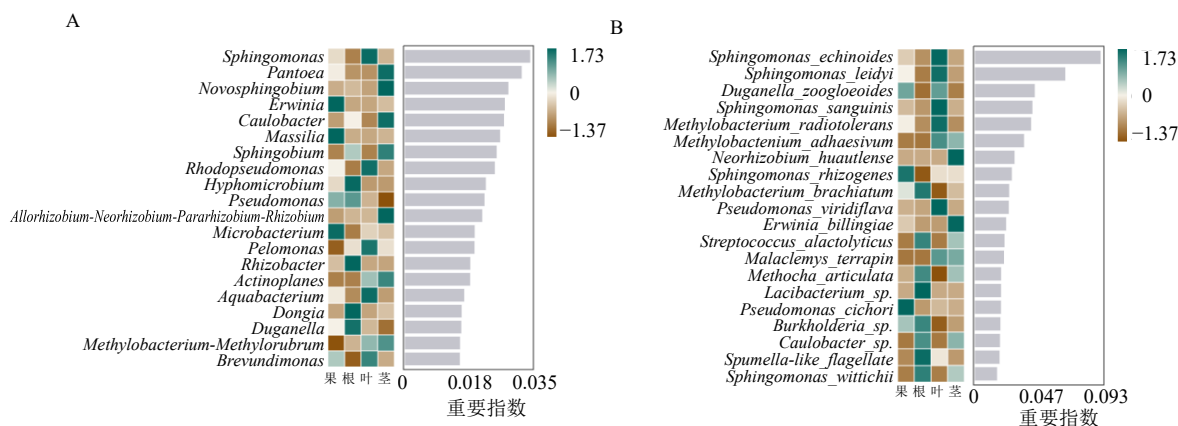


图7 属(A)和种(B)水平上的随机森林分析图

Fig. 7 Random forest analysis chart at genus (A) and species (B) levels

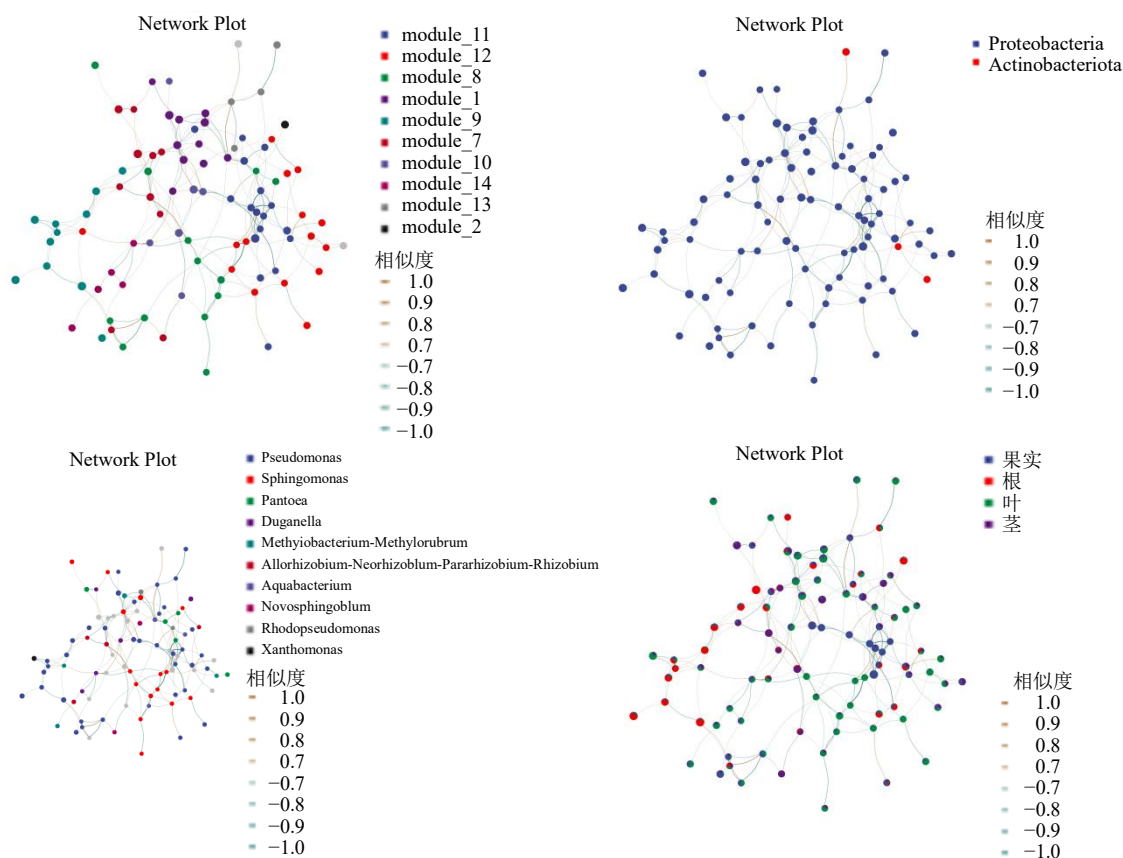


图 8 微生物网络图

Fig. 8 Microbial network diagram

4 讨论

蛇莓是一种传统的中药材，现代研究表明其具有多种药理活性。内生细菌作为植物体内不可或缺的重要角色，在植物次级代谢产物的合成、抵抗生物及非生物胁迫等方面发挥着重要作用。此外，在长期的共同进化过程中，内生细菌通过与宿主的基因交流，可能产生与宿主相同或相似的化合物，因此药用植物的内生细菌被认为是药物开发的潜在来源。内生菌的多样性受到多种因素的影响，包括宿主植物的种类、生长环境和气候条件等。研究表明，内生菌的种类和数量因植物的不同组织（如根、茎、叶）以及生长阶段而异^[27]。例如，Liu 等^[28]发现随着毛竹 *Phyllostachys edulis* 的生长，内生细菌的群落结构日趋复杂。此外，土壤类型、气候条件和地理位置等环境因素也对内生菌的多样性产生重要影响，热带地区的植物往往拥有更丰富的内生菌多样性。

本研究以蛇莓的内生细菌为研究对象，探讨了其在不同组织间的多样性及分布特征。结果表明，蛇莓内生细菌群落以变形菌门（Proteobacteria）为

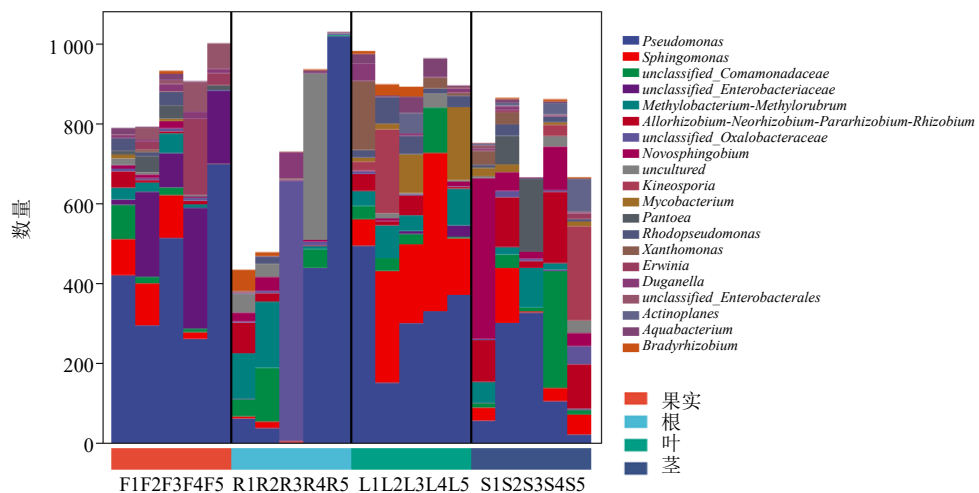
主，其中果实和根中假单胞菌属 *Pseudomonas* 占据显著优势。变形菌门（Proteobacteria）在农业、工业、医药和环保等领域具有广泛的应用价值。其主要应用包括固氮作用、土壤修复、病虫害防治和污染物降解等。作为潜在的生物防治剂，假单胞菌属 *Pseudomonas* 能够防治植物病虫害并促进植物生长，是一种重要的生防菌^[29]。此外，假单胞菌属还以其广泛的代谢能力和环境适应性而闻名，可能在蛇莓的次生代谢产物合成中发挥重要作用。

Alpha 多样性分析显示，蛇莓内生细菌的丰富度在茎内最高，根次之，果实和叶相对较低；尽管根的多样性最高，但其组内样本差异较大，这可能与根际环境的异质性（如土壤类型、水分和养分分布）有关。Beta 多样性分析进一步表明不同组织部位间的群落结构存在显著差异：叶的群落结构最为稳定，样本间差异较小，这可能与叶片环境的相对一致性有关。此外，叶与果实、茎的群落结构相似性较高，而根与其他组织的群落结构差异较为明显。这些结果揭示了蛇莓内生细菌群落不同组织部位间的分布特征及其潜在的生态功能分化。值得注意的



图 9 代谢通路统计图

Fig. 9 Metabolic pathway statistics chart

图 10 N_{10} -甲酰基四氢叶酸生物合成代谢通路的物种构成Fig. 10 Species composition of N_{10} -formyl-tetrahydrofolate biosynthesis metabolic pathway

是,鞘氨醇单胞菌 *Spingomonas* 被鉴定为区分组间差异的关键标志物种,且其与假单胞菌属

Pseudomonas 呈现出显著的正相关关系,这可能与其在宿主植物中的生态功能密切相关,这 2 类菌属

可能在蛇莓的生态功能中具有协同作用,如共同参与次生代谢产物的合成或增强宿主的抗逆性。 N_{10} -甲酰基四氢叶酸生物合成代谢通路的高丰度表明内生细菌可能通过提供一碳单位,支持宿主的核酸合成和甲基化反应,从而增强植物的生长和抗逆性。假单胞菌属与鞘氨醇单胞菌的协同作用进一步支持了它们在蛇莓生态功能中的主导地位,表明这两类菌属可能在次生代谢产物的合成或宿主抗逆性的增强中发挥协同作用。

探究蛇莓内生细菌多样性的意义不仅在于了解其群落结构,还在于揭示其与宿主植物的互作机制及其在药物开发中的潜力。蛇莓内生细菌的功能多样性及其在不同组织中的分布特征为其在药物开发和农业应用中的潜力提供了重要线索。例如,假单胞菌属和鞘氨醇单胞菌属可能参与蛇莓中具有药理活性的次生代谢产物的合成,如黄酮类、三萜类和多酚类化合物。这些化合物在抗氧化、抗炎和抗肿瘤等方面具有显著活性,为蛇莓作为中草药的药理作用提供了潜在的微生物学基础。未来的研究可以进一步探讨环境因素对蛇莓内生细菌群落结构的影响,以揭示其在不同生态环境中的适应机制。通过功能基因组学和代谢组学技术,深入研究内生细菌的代谢功能及其与宿主植物的互作机制,将为开发基于内生细菌的新型药物和生物防治剂提供理论依据。特别是,结合中草药的传统应用,研究内生细菌如何影响蛇莓中活性成分的合成与积累,将有助于揭示中草药的作用机制,并为中草药的现代化开发提供新的思路。例如,通过调控内生细菌群落,可能提高蛇莓中特定活性成分的含量,从而增强其药用价值。此外,内生细菌的次生代谢产物也可能成为新型中草药成分的来源,为中草药资源的可持续利用开辟新途径。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chen T, Chen M, Zhu R, *et al.* Study on antioxidant properties of *Duchesnea indica* Focke [J]. *Strait Pharmaceut J*, 2021, 33(3): 53-6.
- [2] 段轲伟. 蛇莓中化学成分的分离与结构鉴定 [D]. 郑州: 郑州大学, 2012.
- [3] 许文东. 蛇莓的化学成分研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [4] 赵萍. 蔷薇科植物蛇莓活性成分的化学研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2011.
- [5] 乔芊芊. 蛇莓提取物体外抑菌、抗氧化、抗炎活性的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- [6] 马越鸣, 程能能. 蛇莓提取物对小鼠中枢神经系统的抑制作用 [J]. *中草药*, 1996, 37(9): 138-139.
- [7] 彭博, 胡秦, 王立为, 等. 蛇莓总酚的抗肿瘤作用及免疫学机制的初步探讨 [J]. *中国药理学通报*, 2007, 23(8): 1007-1010.
- [8] Xiang B L, Yu X D, Li B, *et al.* Characterization, antioxidant, and anticancer activities of a neutral polysaccharide from *Duchesnea indica* (Andr.) Focke [J]. *J Food Biochem*, 2019, 43(7): e12899.
- [9] Peng B, Chang Q, Wang L W, *et al.* Suppression of human ovarian SKOV-3 cancer cell growth by *Duchesnea* phenolic fraction is associated with cell cycle arrest and apoptosis [J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 108(1): 173-181.
- [10] Yang W E, Ho Y C, Tang C M, *et al.* *Duchesnea indica* extract attenuates oral cancer cells metastatic potential through the inhibition of the matrix metalloproteinase-2 activity by down-regulating the MEK/ERK pathway [J]. *Phytomedicine*, 2019, 63: 152960.
- [11] Aleynova O A, Nityagovsky N N, Suprun A R, *et al.* The diversity of fungal endophytes from wild grape *Vitis amurensis* Rupr [J]. *Plants*, 2022, 11(21): 2897.
- [12] Wilson D. Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition [J]. *Oikos*, 1995, 73(2): 274.
- [13] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew [J]. *Science*, 1993, 260(5105): 214-216.
- [14] Liu Y H, Liu W T, Liang Z S. Endophytic bacteria from *Pinellia ternata*, a new source of purine alkaloids and bacterial manure [J]. *Pharm Biol*, 2015, 53(10): 1545-1548.
- [15] Ding X W, Liu K H, Deng B W, *et al.* Isolation and characterization of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013, 29(10): 1831-1838.
- [16] Xu W F, Wang F, Zhang M, *et al.* Diversity of cultivable endophytic bacteria in mulberry and their potential for antimicrobial and plant growth-promoting activities [J]. *Microbiol Res*, 2019, 229: 126328.
- [17] Jia. Z, Zhang. X, Guo. G, *et al.* Isolation of endophytic fungi from wild licorice and their secondary metabolites activity [J]. *J Chin Institute Food Sci Technol*, 2022, 22(5): 320-31.
- [18] Callahan B J, McMurdie P J, Rosen M J, *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data [J]. *Nat Methods*, 2016, 13(7): 581-583.

- [19] Fitzpatrick A H, Rupnik A, O'Shea H, *et al.* Benchmarking bioinformatic tools for amplicon-based sequencing of norovirus [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2023, 89(1): e01522-e01522.
- [20] Rimet F, Vasselon V, A Keszte B, *et al.* Do we similarly assess diversity with microscopy and high-throughput sequencing? Case of microalgae in lakes [J]. *Org Divers Evol*, 2018, 18(1): 51-62.
- [21] Bacaro G, Rocchini D, Ghisla A, *et al.* The spatial domain matters: Spatially constrained species rarefaction in a free and open source environment [J]. *Ecol Complex*, 2012, 12: 63-69.
- [22] Wang S M, Schneider D, Hartke T R, *et al.* Optimising high-throughput sequencing data analysis, from gene database selection to the analysis of compositional data: A case study on tropical soil nematodes [J]. *Front Ecol Evol*, 2024, 12: 1168288.
- [23] Rudar J, Porter T M, Wright M, *et al.* LANDMark: An ensemble approach to the supervised selection of biomarkers in high-throughput sequencing data [J]. *BMC Bioinform*, 2022, 23(1): 110.
- [24] Pérez-Losada M, Narayanan D B, Kolbe A R, *et al.* Comparative analysis of metagenomics and metataxonomics for the characterization of vermicompost microbiomes [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 854423.
- [25] Cheng Y L, Zhao J, Liu Y Y, *et al.* Response of the endophytic microbiome in *Cotinus coggygria* roots to *Verticillium* wilt infection [J]. *J Fungi*, 2024, 10(11): 792.
- [26] Yuan Z S, Liu F, Yuan Y, *et al.* Structural composition and diversity of bacterial communities in high- and low-yielding moso bamboo forests [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2023, 28(11): 290.
- [27] Liu X, Cui J L, Zhou Z Y, *et al.* "Mini-community" simulation revealed the differences of endophytic fungal communities between the above- and below-ground tissues of *Ephedra sinica* Stapf [J]. *Fungal Biol*, 2023, 127(9): 1276-1283.
- [28] Liu F, Yuan Z S, Zhang X T, *et al.* Characteristics and diversity of endophytic bacteria in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) based on 16S rDNA sequencing [J]. *Arch Microbiol*, 2017, 199(9): 1259-1266.
- [29] 胡连清, 陈露, 刘雯雯, 等. 酿酒专用糯红高粱内生细菌多样性分析及功能菌株筛选 [J]. *作物杂志*, 2024, 36(4): 194-202.

[责任编辑 时圣明]