

DOI:10.12403/j.1001-1498.20220239

# 杜仲种子内生微生物群落组成及生态功能分析

张青青<sup>1</sup>, 董醇波<sup>1</sup>, 邵秋雨<sup>1</sup>, 陆莹霞<sup>2</sup>, 董旋<sup>2</sup>, 梁宗琦<sup>1</sup>, 韩燕峰<sup>1\*</sup>

(1. 贵州大学生命科学学院生态系真菌资源研究所, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学茶学院, 贵州 贵阳 550025)

**摘要:** [目的] 揭示杜仲种子内的微生物群落组成和多样性, 丰富杜仲相关微生物资源。[方法] 本研究采用传统培养法和高通量测序技术对杜仲种子内生微生物群落组成和多样性进行分析, 同时基于 FAPROTAX 和 FUNGuild 数据库对其进行功能注释。[结果] 从杜仲种子中共分离获得真菌 40 株 (3 门 11 属), 优势属为曲霉属 (*Aspergillus*) (30%); 细菌 142 株 (1 门 6 属), 其中, 土壤芽孢杆菌属 (*Solibacillus*) (47.18%) 为主要优势属。高通量测序获得 141 个真菌 OTUs, 隶属于 6 门 101 属; 442 个细菌 OTUs, 隶属于 24 门 313 属。在属水平, 种子优势真菌属为 *Apiotrichum* (31.28%) 和德巴利氏酵母属 (*Debaryomyces*) (26.07%); 优势细菌属主要为假单胞菌属 (*Pseudomonas*) (16.66%) 和乳杆菌属 (*Lactobacillus*) (9.68%)。功能注释结果显示: 真菌以降解有机物、促进宿主植物生长、促进宿主对土壤养分的吸收、改善土壤环境微生物群落结构以及致病菌群为主; 细菌以化能异氧、有氧化能异养以及具有发酵和固氮作用的菌群为主。[结论] 杜仲种子内携带多种有益功能菌和潜在致病菌, 这些微生物对植物的生长发育具有重要影响。同时本研究还分离到多株有益功能菌, 这将为后续人为调控种子微生物组以增强植物健康提供微生物资源。

**关键词:** 高通量测序; 可培养法; 多样性; 生态功能

中图分类号: Q938.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2023)02-0050-11

植物内生菌 (Endophytes) 是指某一阶段或所有阶段生活在健康植物的组织或器官中, 与植物建立特殊的相互关系, 并不会对宿主引起明显病害的一类微生物<sup>[1]</sup>。据报道, 植物内生菌作为一种新兴微生物资源, 对植物的生长和健康至关重要<sup>[2]</sup>, 且在医学、农业、工业等领域具有潜在的应用前景<sup>[3]</sup>。

种子是植物的重要繁殖器官, 是遗传信息的保存和传递者, 其内携带丰富多样的微生物<sup>[4-5]</sup>。种子内生菌主要包括多种真菌和细菌, 能从不同环境 (如空气、水、昆虫) 通过水平传播获得, 同时也能从母株通过垂直传播获得, 并代代相传<sup>[6-7]</sup>。种子中常见真菌属有链格孢属 (*Alternaria*)、枝孢

霉属 (*Cladosporium*)、青霉属 (*Penicillium*) 等<sup>[8]</sup>; 常见细菌属有芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、泛菌属 (*Pantoea*) 等<sup>[9]</sup>; 而种子内生菌的群落组成和多样性常受多种生物与非生物因素的影响, 如植物品种、基因型、种子成熟过程、地理位置及病原体入侵等<sup>[10-12]</sup>。研究表明, 种子作为微生物的载体因自身及特殊的生存环境在内部形成独特的微生物群落, 这些特殊类群可为宿主植物提供保护功能<sup>[13]</sup>。当种子内生菌作为益生微生物资源, 能通过直接 (如固氮、溶磷和产生植物激素) 或间接作用 (对抗植物病害、提高植物抗逆性和生物与非生物的耐受性) 促进种子的萌

收稿日期: 2022-05-10 修回日期: 2022-06-27

基金项目: 国家自然科学基金 (32260003, 32060011); 贵州省“百层次”创新型人才培养项目 ([2020]6005); 贵州省生物学一流学科建设项目 (GNYL[2017]009)

作者简介: 张青青, 硕士, 主要研究方向: 微生物生态学。E-mail: 2226755843@qq.com

\* 通讯作者: 韩燕峰, 教授, 主要研究方向: 真菌资源系统学及分子生态。E-mail: swallow1128@126.com

发和幼苗的建立<sup>[8,14-16]</sup>。除此之外, 种子相关内生菌可以产生与宿主次级代谢成分相同或者相似的化合物, 它们能调控宿主植物的次级代谢, 促进有效成分的合成与积累。陈海敏等发现, 种子中的草茎点霉 (*Phoma herbarum*) D603 可以有效促进丹参根部丹参酮类成分, 尤其是丹参酮 IIA 的合成与积累<sup>[17]</sup>。然而, 并非所有的微生物都是有益的, 种子携带的一些病原菌会降低种子活力、抑制种子萌发和引起植物病害, 进而对粮食作物和林木安全生产造成威胁。因此, 了解种子相关的微生物群落组成和功能可以帮助我们了解种子健康, 防止有害微生物的影响, 并充分利用与种子相关的有益微生物。

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliver) 是我国特有的药用和经济树种, 作为药材, 具有降压、增强免疫力、降血糖等药理作用; 杜仲果、叶、皮中均含有丰富的杜仲橡胶, 且杜仲果实富含油脂, 是开发保健品、功能食品、高档食用油的优质原料。前期研究发现, 杜仲的不同组织中都伴有丰富的内生微生物, 并且这些微生物与宿主健康、生产力和药用成分的合成和积累有关。杨娟等研究表明, 杜仲树皮中的某些真菌类群与树皮的药理活性成分成正相关<sup>[18]</sup>。Dong 等通过探究杜仲树皮中细菌群落组成和核心微生物群的功能, 发现细菌菌群中的大部分核心菌群与树皮的药理活性成分相关<sup>[19]</sup>。然而, 迄今为止, 大多数相关研究通常集中在根际、茎、叶, 对于杜仲种子相关微生物的组成结构以及生态功能的了解仍然知之甚少。因此, 本研究结合分离培养法和高通量测序技术对杜仲种子内生真菌和细菌群落组成结构和多样性进行探究。同时, 利用 FUNGuild 和 FAPROTAX 平台进行功能注释。高通量测序技术能更加全面的揭示杜仲种子内生菌群落组成和多样性, 可培养法可以分离获得实体菌株, 这 2 种方法的结合能全面认识杜仲种子微生物, 丰富杜仲相关微生物资源, 并为今后杜仲种子内生菌的功能研究以及杜仲的高效栽培提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 种子处理

杜仲果实采自陕西省汉中市宁强县大安镇。样品编号后封存在自封袋中, 放入 4 °C 冰箱保存备用。将杜仲果实剥去果皮, 称取 5 g 种子置于烧杯

中, 依次用无菌蒸馏水对杜仲种子进行冲洗, 75% 的酒精消毒 30 s, 5% 的次氯酸钠进行消毒 3~5 min, 75% 酒精消毒 30 s, 最后使用无菌蒸馏水冲洗 5~6 遍, 在无菌条件下晾干, 以备<sup>[20]</sup>。将最后一次冲洗种子的无菌水涂布到 PDA 培养基和 LB 培养基上作为对照实验, 以保证表面灭菌彻底。

### 1.2 分离培养

1.2.1 内生真菌的分离纯化 真菌的分离培养基分别使用 PDA 培养基<sup>[21]</sup>、MS 培养基。分离方法采用 (1) 组织块分离法: 将一部分表面灭菌好的种子放入研钵中碾碎, 直接放在 PDA 培养基和 MS 培养基中; 另一部分使用无菌刀划开几个小口, 将其接种到 PDA 培养基、MS 培养基, 并保证切口直接接触培养基, 各设置 3 个重复; (2) 稀释涂布平板法: 取表面灭菌后的种子样品 5 g, 放在加有 5 mL 的无菌蒸馏水的无菌研钵中充分研磨, 装入离心管中充分摇匀, 并稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  悬液, 分别吸取 100、200、300  $\mu$ L 稀释液涂布于 PDA 培养基中, 每个处理 3 个重复, 置于 25~28 °C 下培养 5~7 d。待菌丝长出, 用接种针从边缘挑取菌丝移至 PDA 平板, 采用菌丝顶端纯化法对分离出的菌种逐步进行纯化。

1.2.2 内生细菌的分离纯化 细菌的分离培养基使用 LB、NA、牛肉膏蛋白胨培养基<sup>[22-23]</sup>。分离方法采用稀释涂布平板法: 取表面灭菌后的样品 5 g, 放在加有 5 mL 的无菌蒸馏水的无菌研钵中充分研磨, 装入离心管中充分摇匀, 将其稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  悬液, 并分别吸取 100、200、300  $\mu$ L 稀释液涂布于 LB、NA、牛肉膏蛋白胨培养基中, 各设置 3 个重复, 置于 25~28 °C 下培养 4~5 d。根据菌落形态 (大小、形状、颜色、表面光泽度、边缘整齐度、透明度等), 随机挑取具有差异的代表性菌株进行平板划线法逐步纯化。

### 1.3 分子鉴定

1.3.1 DNA 的提取、PCR 扩增反应 参考真菌基因组 DNA 提取试剂盒 (北京白泰克生物技术有限公司) 和细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司) 进行真菌和细菌的 DNA 提取。细菌 16SrDNA 引物: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1 492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), 真菌 ITS 引物: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4

(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR反应体系(25  $\mu\text{L}$ ): 引物 ITS1 和 ITS4 均为 1  $\mu\text{L}$ , 2  $\times$  Taq PCR Master-mix 为 12.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu\text{L}$ , 细菌/真菌 DNA 2  $\mu\text{L}$ 。细菌 PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 92  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 50  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 68  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min, 共 35 个循环, 78  $^{\circ}\text{C}$  延伸 8 min。真菌 PCR 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 1 个循环, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 50  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共 35 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min<sup>[24]</sup>。分别取扩增后的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 送至昆明硕擎生物科技有限公司进行测序。

**1.3.2 序列数据分析** 将获得的待鉴定的 ITS 和 16S rDNA 扩增序列, 经手工校对后登陆 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行 blast 比对, 得到相似度最高的序列, 进行种属鉴定。

## 1.4 高通量测序

**1.4.1 总 DNA 提取、PCR 扩增及 Illumina MiSeq 测序** 选取颗粒大小一致的饱满种子, 经表面灭菌后(同上 1.1), 分别用液氮进行充分研磨, 并装入无菌离心管中, 样本共设置 3 个重复。处理后的所有样本均置于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存, 用于总 DNA 提取和高通量测序。总 DNA 的提取按总 DNA 提取试剂盒 (FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil) 的说明书操作程序进行。完成基因组 DNA 抽提后, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA。PCR 扩增分别选用 ITS1 区真菌引物 (ITS1F, 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' 和 ITS2R, 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') 和细菌引物 (799F, 5'-AACMGGATTAGATACCC KG-3' 和 1193R, 5'-ACGTCATCCCCACCTTCC-3')。采用 20 mL 的 PCR 反应体系: 5  $\times$  Buffer 4  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  dNTPs 2  $\mu\text{L}$ , 每个正向和反向引物 (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 0.8  $\mu\text{L}$ , rTaq 多聚酶 0.4  $\mu\text{L}$ , BSA 0.2  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 10 ng, 而后补 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu\text{L}$ 。真菌 PCR 扩增反应参数: 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 退火温度 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 10  $^{\circ}\text{C}$  直至用户停止。细菌 PCR 扩增反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 退火温度 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 13 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 仪: ABI GeneAmp<sup>®</sup> 9700 型。得到的 PCR 产物经上海美吉生物医药科技有限公司

([www.majorbio.com](http://www.majorbio.com)) Illumina Miseq 平台进行高通量测序。

**1.4.2 原始数据处理** 使用 Qiime2 软件中的 DADA2 插件对所有样品的全部原始序列进行质控、去噪、拼接及去嵌合体处理, 形成 OTU (operational taxonomic unit)。选取 OTU 的代表性序列于 Unite (Release7.0, <http://unite.ut.ee/index.php>) 数据库进行比对, 获得每个 OTU 的物种注释信息。基于物种注释信息, 去除注释为叶绿体、线粒体和不能注释到界 (kingdom) 水平的 OTU 及其包含的序列, 最终形成数据均一化的 OTU 及其他分类水平物种丰度谱。

## 1.5 多样性分析

使用 Qiime2 和 Excel 软件计算各样本 Alpha 多样性指数, 包括香农-维纳指数 (Shannon diversity index)、辛普森指数 (Simpson diversity index)、chao1 指数、ACE 指数等。

## 1.6 生态功能注释

**真菌功能类群分析:** 采用 FUNGuild (<http://funguild.org>) 数据库对真菌群落进行功能注释<sup>[25]</sup>, 置信度选择可能 (probable) 和很可能 (highly probable)。

**细菌功能类群分析:** 采用 FAPROTAX 数据库 (<http://www.ehbio.com/ImageGP/index.php/Home/Index/FAPROTAX.html>) 对细菌群落进行功能注释<sup>[26]</sup>。

# 2 结果与分析

## 2.1 杜仲种子微生物群落组成

传统培养法获得的杜仲种子微生物群落组成 (表 1) 表明: 采用分离培养法共获得真菌 40 株, 初步鉴定为 3 门、5 纲、8 目、10 科、11 属、18 种。在门水平, 杜仲种子中可培养真菌归为 3 个门: 子囊菌门 (Ascomycota) (87.50%)、担子菌门 (Basidiomycota) (10%)、毛霉门 (Mucoromycota) (2.50%), 其中, 子囊菌门 (Ascomycota) 为主要优势菌门, 其次为担子菌门 (Basidiomycota)。在纲水平, 散囊菌纲 (Eurotiomycetes) 为主要优势菌纲, 占比 52.50%; 其次为座囊菌纲 (Dothideomycetes) (22.50%)、粪壳菌纲 (Sordariomycetes) (12.50%)、伞菌纲 (Agaricomycetes) (10%) 以及占比为 2.50% 的毛霉纲 (Mucoromycetes)。

在属水平, 以曲霉属 (*Aspergillus*) (30%)、链格孢属 (*Alternaria*) (12.50%) 为主要优势属, 随后是占比均为 10% 的青霉属 (*Penicillium*)、篮状菌属 (*Talaromyces*)、烟管菌属 (*Bjerkandera*), 枝孢霉属 (*Cladosporium*) (7.50%) 和节菱孢菌属 (*Arthrinium*)

(7.50%) 较为常见。在种水平上, 烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) (12.50%)、交链格孢 (*Alternaria alternata*) (10%)、艾米斯托克蓝状菌 (*Talaromyces amestolkiae*) (10%) 占据一定优势。

表 1 杜仲种子可培养内生真菌和细菌的群落组成

Table 1 Composition of culturable endophytic fungi and bacteria from *Eucommia ulmoides* seeds

分类 Classify	门 Phylum	纲 Class	属 Genus	种 Spices	株数 Number		
真菌 Fungi	子囊菌门 Ascomycota	毛霉纲 Mucoromycetes	小克银汉霉属 <i>Cunninghamella</i>	刺孢小克银汉 <i>C. echinulata</i>	1		
				赭曲霉属 <i>A. westerdijkiae</i>	1		
				黄曲霉 <i>A. flavus</i>	2		
				曲霉属 <i>Aspergillus</i>	烟曲霉 <i>A. fumigatus</i>	5	
					杂色曲霉 <i>A. versicolor</i>	3	
					晶状体曲霉 <i>A. lentulus</i>	1	
					散囊菌纲 Eurotiomycetes	布雷正青霉 <i>P. glaucoroseum</i>	1
				青霉属 <i>Penicillium</i>		产黄青霉 <i>P. chrysogenum</i>	2
						霍迪青霉 <i>P. hordei</i>	1
				篮状菌属 <i>Talaromyces</i>		艾米斯托克蓝状菌 <i>T. amestolkiae</i>	4
		枝孢瓶霉属 <i>Cladophialophora</i>	卡氏枝孢瓶霉 <i>C. carrionii</i>	1			
		座囊菌纲 Dothideomycetes	链格孢属 <i>Alternaria</i>	细极链格孢 <i>A. tenuissima</i>		1	
				交链格孢 <i>A. alternata</i>	4		
			黑团孢属 <i>Periconia</i>	油棕黑团孢 <i>P. elaeidis</i>	1		
			枝孢霉属 <i>Cladosporium</i>	耐盐枝孢霉 <i>C. halotolerans</i>	3		
			粪壳菌纲 Sordariomycetes	节菱孢菌属 <i>Arthrinium</i>	节菱孢 <i>A. arundinis</i>	3	
				木霉属 <i>Trichoderma</i>	滩涂木霉 <i>T. arenarium</i>	2	
		细菌 Bacteria	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌纲 Bacilli	烟管菌属 <i>Bjerkandera</i>	烟管菌 <i>B. adusta</i>	4
						<i>Peribacillus</i>	<i>P. huizhouensis</i>
							<i>P. simplex</i>
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	解蛋白芽孢杆菌 <i>B. proteolyticus</i>				4		
	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp.				1		
<i>Cytobacillus</i>	<i>C. firmus</i>				14		
	哥特氏芽孢杆菌 <i>C. gottheilii</i>				2		
<i>Metabacillus</i>	<i>M. indicus</i>				4		
	<i>M. litoralis</i>				1		
土壤芽孢杆菌属 <i>Solibacillus</i>	森林土壤芽孢杆菌 <i>S. silvestris</i>				53		
	土壤芽孢杆菌 <i>Solibacillus</i> sp.				14		
unclassified Paenibacillaceae	<i>P. bacterium</i>				31		

杜仲种子中分离到内生细菌共 142 株, 隶属于 1 门 (厚壁菌门 (Firmicutes)) 1 纲 (芽孢杆

菌纲 (Bacilli)) 1 目 (芽孢杆菌目 (Bacillales)) 5 科 6 属 (含 1 个未定属) 11 种

(含2个未定种)。6个属中,土壤芽孢杆菌属(*Solibacillus*)以47.18%的相对多度占据优势地位,其次为类芽孢杆菌科(*Paenibacillaceae*)中一未定属(21.83%)、*Peribacillus*(12.67%)和*Cytobacillus*(11.27%)。在种水平,森林土壤芽孢杆菌(*Solibacillus silvestris*)(37.32%)在整个细菌菌群中占有绝对优势,类芽孢杆菌科(*Paenibacillaceae*)中一未定属(21.83%)、坚强芽孢杆菌(*Cytobacillus firmus*)(9.86%)和一种土壤芽孢杆菌(*Solibacillus* sp.)(9.86%)次之。此外,*Peribacillus huizhouensis*(7.04%)和*Peribacillus simplex*(5.63%)也占据较高比例。

高通量测序获得的杜仲种子微生物群落组成:对杜仲种子内生真菌和细菌测序获得平均有效序列分别为64 368条、40 121条,平均长度为234、376 bp。杜仲种子内生真菌归为141个OTUs,包

括6门、15纲、38目、76科、101属。在门水平,内生真菌隶属于子囊菌门(*Ascomycota*)、担子菌门(*Basidiomycota*)、鞭毛菌门(*Mortierellomycota*)、罗兹菌门(*Rozellomycota*)、球囊菌门(*Glomeromycota*)和未分类真菌6大类,其中,子囊菌门(*Ascomycota*)、担子菌门(*Basidiomycota*)为主要优势门,分别占比47.56%和46.91%;在属水平,主要包括*Apiotrichum*、德巴利氏酵母属(*Debaryomyces*)和*Leucosporidium*等15个优势属,其中*Apiotrichum*(31.28%)和德巴利氏酵母属(*Debaryomyces*)(26.07%)占有绝对优势,为主要优势属(图1a)。其余优势属如*Leucosporidium*、*Kernia*、青霉属(*Penicillium*)等总占比为30.04%。常见属如链格孢属(*Alternaria*)(0.87%)也占据较高比例。

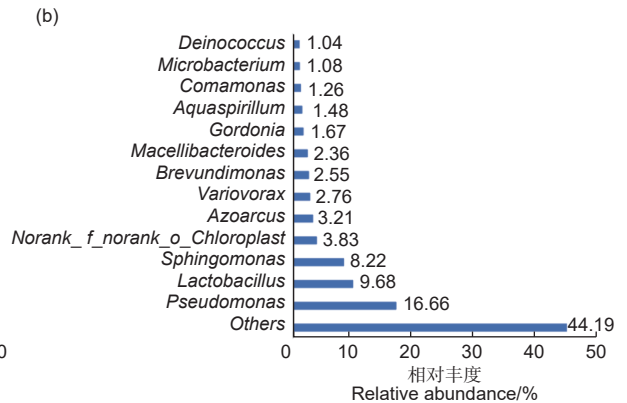
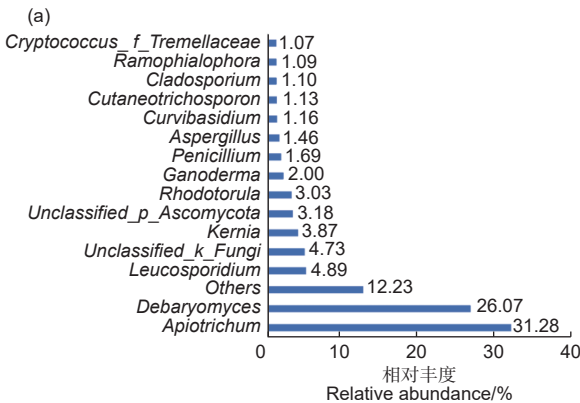


图1 杜仲种子内生真菌(a)和细菌(b)优势属的群落组成及相对丰度

Fig. 1 Community composition and relative abundance of dominant genera of endophytic fungi (a) and bacteria (b) in *E. ulmoides* seeds.

杜仲种子内生细菌归为442个OTUs,包括24门、46纲、117目、193科、313属。在门水平,内生细菌隶属于变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)、放线菌门(*Actinobacteriota*)和蓝细菌(*Cyanobacteria*)等24大类,其中,优势门主要为变形菌门(*Proteobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*),分别占比52.49%和17.22%;随后为拟杆菌门(*Bacteroidota*)(10.72%)、放线菌门(*Actinobacteriota*)(10.55%);在纲水平,以 $\gamma$ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)(33.68%), $\alpha$ -变形杆菌纲(*Alphaproteobacteria*)

(18.81%)为优势纲;在属水平,所有类群主要归为假单胞菌属(*Pseudomonas*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、固氮弧菌属(*Azoarcus*)等13个优势属,主要优势类群为假单胞菌属(*Pseudomonas*)(16.66%),其次为乳杆菌属(*Lactobacillus*)(9.68%)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)(8.22%)(图1b)。

综上所述,与传统培养法相比,高通量测序技术能获得更多种类和数量的杜仲种子内生真菌和细菌。

从门水平上分析,2种方法获得的优势真菌都

主要集中在子囊菌门 (Ascomycota)、担子菌门 (Basidiomycota), 但其占比不同; 高通量测序获得的优势细菌主要集中在变形菌门 (Proteobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes), 而可培养法主要分离到厚壁菌门 (Firmicutes) 的细菌。而从属水平上分析发现, 高通量获得的菌株, 如优势真菌青霉属 (*Penicillium*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、枝孢霉属 (*Cladosporium*) 可通过可培养法获得, 并同样占据优势地位 (表 1 和图 1)。另外, 以上结果还可看出, 高通量测序法获得的大部分菌株都属于未被培养的菌株。因此, 2 种方法的结合能更加全面的揭示杜仲相关内生菌的组成和结构。

表 2 杜仲种子内生真菌和细菌群落的多样性

Table 2 Diversity of endophytic fungi and bacteria in *E. ulmoides* seeds

分类 Classify	可培养 Culture			免培养 Non-Culture			
	Margalef	Shannon	Simpson	ACE	Chao 1	Shannon	Simpson
真菌 Fungi	9.26±1.14	2.94±0.28	0.98±0.01	59.83±15.14	59.67±15.18	2.39±0.2	0.20±0.03
细菌 Bacteria	2.80±0.13	2.66±0.21	0.91±0.04	233.30±85.79	223.01±84.83	3.93±0.2	0.06±0.02

### 2.3 杜仲种子微生物群功能分析

使用 FUNGuilds 平台对杜仲种子内真菌类群的营养型和生态功能类群进行分析, 其中, 110 个 OTUs 被成功注释, 营养型包括腐生型 (Saprotroph) (95 OTUs, 82.97%)、致病-腐生-共生型 (Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph) (18 OTUs, 6.10%)、致病型 (Pathotroph) (12 OTUs, 2.41%)、致病-腐生型 (Pathotroph-Saprotroph) (7 OTUs, 6.60%)、腐生-共生型 (Saprotroph-Symbiotroph) (6 OTUs, 0.63%)、共生型 (Symbiotroph) (4 OTUs, 0.34%)、致病-共生型 (Pathotroph-Symbiotroph) (3 OTUs, 0.83%)、致病-腐生-共生型 (Pathogen-Saprotroph-Symbiotroph) (1 OTU, 0.11%) 8 大类。除未定类群 (unknow), 所有真菌类群主要涉及到未定义腐生菌 (Undefined Saprotroph) (48 OTUs, 33.83%)、植物病原菌 (Plant Pathogen) (5 OTUs, 0.49%)、动物病原菌 (Animal Pathogen) (5 OTUs, 1.28%)、木质腐生菌 (Wood Saprotroph) (4 OTUs, 0.45%)、真菌寄生菌 (Fungal Parasite) (2 OTUs, 0.27%)、

### 2.2 杜仲种子微生物多样性

在  $\alpha$  多样性指数中, Margalef 指数、Chao 1 和 ACE 指数表示微生物群落的丰富度, 值越大, 丰富度越高。Shannon 和 Simpson 指数表示微生物群落的多样性程度, Shannon 指数值越大, 多样性越高, 而 Simpson 指数值越小, 多样性越大。在 97% 相似性下, 分析杜仲种子内生真菌和内生细菌的多样性指数 (表 2)。 $\alpha$  多样性指数分析结果表明, 与传统培养法相比, 高通量测序技术得到的多样性指数 Shannon、高通量测序技术能更完整的展现出杜仲种子中微生物群落的丰富度和多样性。

粪生真菌 (Dung Saprotroph) (2 OTUs, 0.21%)、丛枝菌根 (Arbuscular Mycorrhizal fungi) (2 OTUs, 0.06%)、土壤腐生菌 (Soil Saprotroph) (1 OTU, 31.28%)、地衣 (Lichenized fungi) (1 OTU, 0.16%)、外生菌根 (Ectomycorrhizal fungi) (1 OTU, 0.07%) 10 类生态功能类群。此外, 还包括多种混合功能类群如真菌寄生-未定义腐生菌 (Fungal Parasite-Undefined Saprotroph) (4 OTUs, 1.51%)、内生菌-地衣腐生菌-土壤腐生菌-未定义腐生菌 (Endophyte-Litter Saprotroph-Soil Saprotroph-Undefined Saprotroph) (4 OTUs, 0.48%)、内生菌-植物病原菌 (Endophyte-Plant Pathogen) (2 OTUs, 0.21%) 等 21 类。31 个 OTUs 在 FUNGuilds 数据库中未能注释到对应功能。整体来看, 在 OTU 水平上杜仲种子内的真菌功能群主要集中于未定义腐生菌 (48 OTUs)、植物病原菌 (5 OTUs)、动物病原菌 (5 OTUs) (图 2a)。在属水平, 物种丰度占比最高的 *Apiotrichum* (31.28%)、德巴利氏酵母属 (*Debaryomyces*) (26.07%) 分别属于腐生型中的土壤腐生菌和未定义腐生菌。此

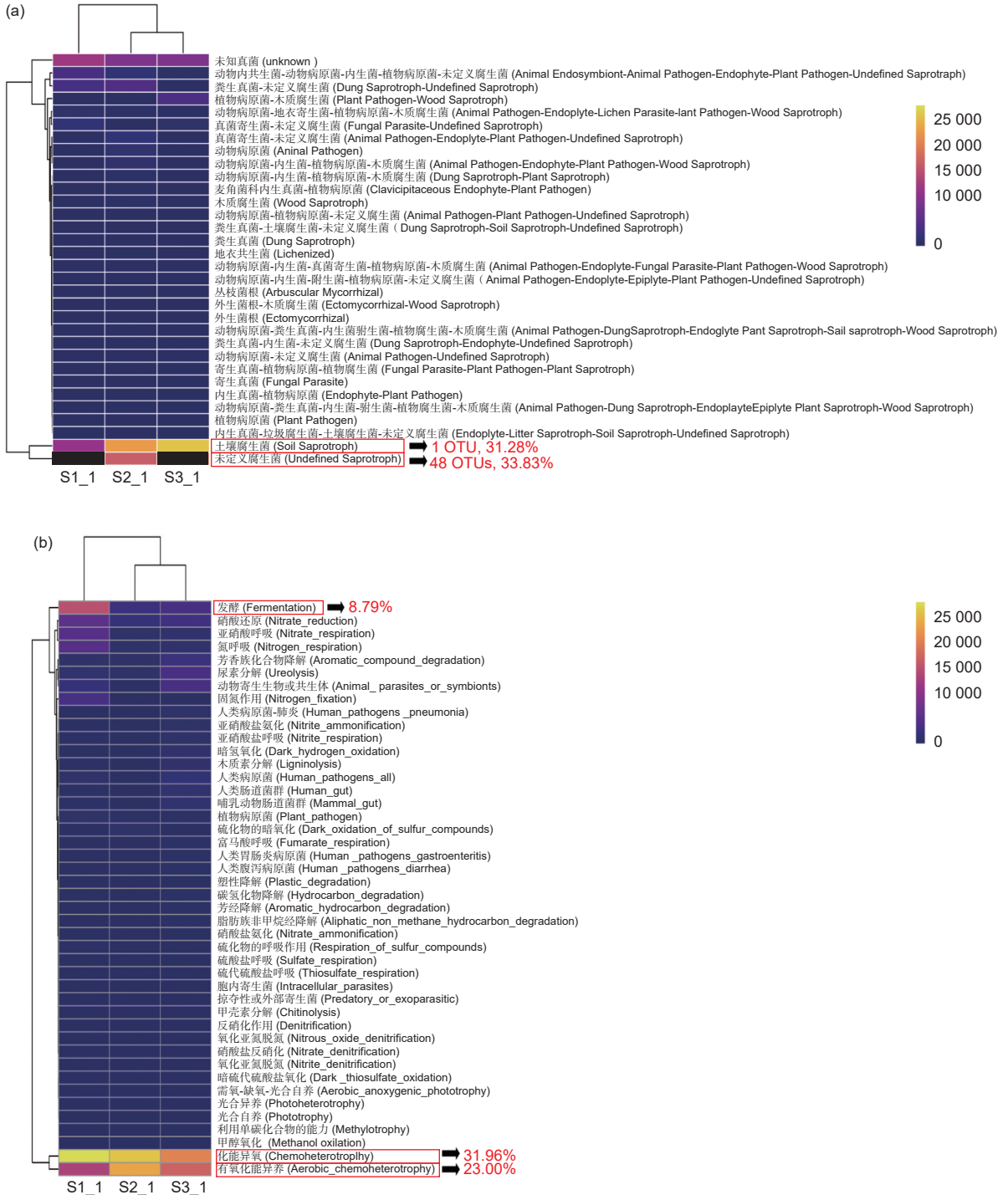


图 2 杜仲种子内生真菌 (a) 和细菌 (b) 的功能注释

Fig. 2 Function notes of endophytic fungi (a) and bacteria (b) in *E. ulmoides* seeds

外, 一些常见属在生态系统中扮演多重角色, 如枝孢霉属 (*Cladosporium*)、链格孢属 (*Alternaria*), 既属于动物病原菌, 又属于内生菌、植物病原菌、腐生菌。

使用 FAPROTAX 平台对细菌功能分类注释 (图 2b), 选取总丰度前 50 的功能, 结果发现,

杜仲种子中的细菌群落生态功能归为化能异氧 (chemoheterotrophy)、有氧化能异养 (aerobic chemoheterotrophy)、发酵 (fermentation)、硝酸还原 (nitrate reduction)、亚硝酸呼吸 (nitrate respiration)、尿素分解 (ureolysis)、动物寄生生物或共生体 (animal parasites or

symbionts)、芳香族化合物降解 (aromatic compound degradation)、固氮作用 (nitrogen fixation)、人类病原菌 (human pathogens)、植物病原菌 (plant pathogen) 等 44 个功能类群, 其中, 细菌功能主要集中于化能异氧 (31.96%)、有氧化能异养 (23%)、发酵 (8.79%)。部分集中于硝酸还原 (4.50%)、亚硝酸呼吸 (3.06%)、氮呼吸 (3.06%)、尿素分解 (2.63%)、动物寄生生物或共生体 (2.51%)、芳香族化合物降解 (1.88%)、固氮作用 (1.61%)、人类病原菌 (1.38%)、植物病原菌 (1.03%) 9 类。少部分属于暗氢氧化 (dark hydrogen oxidation) (0.95%)、亚硝酸盐氨化 (0.92%) 等 32 个功能类群, 总占比为 14.60%。

### 3 讨论

种子微生物是定殖于种子和幼苗的第一个微生物群, 这类微生物的组成和垂直传播对种子质量、植物生长及次生代谢产物的合成至关重要<sup>[13]</sup>。本研究通过对杜仲种子内生真菌和细菌进行分离培养, 最终获得真菌共 40 株, 鉴定为 3 门 11 属, 主要优势属为曲霉属 (30%)、链格孢属 (12.50%); 内生细菌共 142 株, 鉴定为 1 门 6 属, 以土壤芽孢杆菌属 (47.18%) 为主要优势属。该结果与早前报道有相似之处, 如链格孢属被证实是植物种子中最常见的真菌属<sup>[8,27]</sup>。其次, 与本课题组前期在杜仲树皮中分离到的内生菌相比, 种子中的内生菌种类和数量明显降低, 说明内生菌在同种植物不同器官中的分布存在差异。这可能是由于种子是受植物高度保护的封闭性器官, 导致其内生菌的种类和数量比其他器官要少<sup>[28]</sup>。由于自然环境中绝大多数微生物是不能被传统培养方法所培养<sup>[29]</sup>, 常规分离培养方法和较单一培养基分离到的微生物并不能完整地反映杜仲种子中微生物的群落结构, 而高通量测序结果分析能更全面的展现杜仲种子中微生物群落结构和多样性。因此, 本文以高通量测序结果对杜仲种子内生微生物多样性和功能进行补充分析。

功能预测注释到多种有益功能菌群。目前, 报道指出, 植物种子的内生细菌主要集中在变形菌门、厚壁菌门和放线菌门<sup>[9]</sup>; 而本研究也发现, 变形菌门和厚壁菌门为杜仲种子中细菌的主要优势

门。在属水平, 细菌主要包括假单胞菌属、乳杆菌属、鞘氨醇单胞菌属、固氮弧菌属等 13 个优势属, 其中, 假单胞菌属 (16.66%)、乳杆菌属 (9.68%) 和鞘氨醇单胞菌属 (8.22%) 在整个细菌群落中占有绝对优势。相关研究表明, 假单胞菌和鞘氨醇单胞菌作为有益内生菌广泛存在水稻、烟草、丹参等植物种子中, 它们可以通过提高植物的固氮能力或启动植物免疫系统、分泌抗生素以及抑制病原菌 (与病原体竞争资源) 来改善植物生产力和健康<sup>[5,30-31]</sup>。如 Pham 等发现, 固氮菌 (*Pseudomonas stutzeri*) A15 在温室条件下能显著促进水稻幼苗的生长, 且该菌株的固氮效果优于普通化学氮肥<sup>[32]</sup>。绿蚜假单胞菌 (*Pseudomonas chlororaphis*) 和 *Pseudomonas aurantiaca* 可以通过产生次级代谢产物促进植物生长<sup>[8]</sup>。沈兴亮等证实, *Pseudomonas fluorescens* 能显著提高茶树的生长生理水平<sup>[9]</sup>。*Sphingomonas* sp. cra20 也被证明在干旱胁迫下能促进拟南芥根系的发育, 并改变根际微生物群落结构<sup>[33]</sup>。同时, Matsumoto 等研究发现, *Sphingomonas melonis* 能在抗病水稻种子中积累、代代相传, 并通过产生邻氨基苯甲酸 (anthranilic acid) 使高感病品种产生抗病性<sup>[34]</sup>。李晓君等报道, 来自丹参根中的 *Pseudomonas* sp. 具有抗氧化和抗菌活性的作用<sup>[35]</sup>。此外, 生态功能注释结果也显示杜仲种子中的细菌功能大多集于潜在化能异氧、有氧化能异养、硝酸还原、氮呼吸、固氮作用。总之, 杜仲种子中存在的多种潜在有益细菌在调节氮循环和对抗病原体中可能发挥一定的重要性作用。

在真菌中子囊菌门和担子菌门为主要优势门, 其中, *Apiotrichum* (31.28%) 和德巴利氏酵母属 (26.07%) 为主要优势属。近期研究发现, *Apiotrichum* 中的某些物种被认为能产生油脂类的次级代谢物, 这可能与杜仲种子中富含大量的油脂类物质相关。如 *Apiotrichum porosum* DSM 27194 被证实不仅能同化乙酸、丙酸、丁酸及其不同混合物以积累微生物油脂, 还具有将木质纤维素水解产物中的多种碳源转化为微生物油脂的能力<sup>[36]</sup>。而德巴利氏酵母属对灰霉病、炭疽病具有明显的抑制作用<sup>[37]</sup>。此外, 生态功能注释结果表明, 在杜仲种子中多数真菌都属于腐生型真菌 (95 OTUs, 82.97%), 这些真菌被认为具有降解木质素、纤维素的能力, 其可能参与凋落物的分解, 帮助宿主



吸收有机物和矿物质元素<sup>[38]</sup>。凋落物的分解是森林生态系统化学循环的主要环节之一,对群落组成及分布具有重要作用<sup>[39]</sup>。另外,部分真菌还被注释为内生真菌、外生菌根真菌和丛枝菌根真菌,这些类群有较强的适应能力,可促进宿主植物生长、土壤养分吸收与利用、改善土壤环境微生物群落结构。如球囊菌门作为一类的重要的真菌门类,其成员包括一些分布广泛、具有重要生态意义的真菌群—丛枝菌根真菌(AMF)。该类真菌不仅能改善磷营养、促进非生物和生物胁迫的耐受性,还能通过菌丝网络和产生如球囊霉素等土壤颗粒结合物质并维持土壤的物理性质,在土壤聚集中发挥重要作用<sup>[40-41]</sup>。因此,该类微生物可为种子在自然环境中的萌发提供各种有利条件。然而,除了注释到的大量有益功能菌群,还有相当部分 OTU 被检测为植物病原菌。如链格孢属是多种植物病原菌,相关文献报道称这类真菌是引起小麦黑斑病、刺梨叶斑病的重要致病菌<sup>[21,42-43]</sup>。因此,揭示种子相关微生物组成和功能是了解种子健康以及后续人为调整微生物菌群增强植物健康、提高作物产量和质量的先决条件。

## 4 结 论

本研究结果证实了杜仲种子中存在多种内生细菌和真菌,且功能注释表明杜仲种子中携带多种有益功能菌和潜在致病菌。本研究不仅分离到节菱孢菌属(引起大麦立枯病)、链格孢属和黑团孢属(引起刺梨叶斑病)等多种已被报道的植物病原菌,同时还获得多株可能对植物生长及生防具有潜在作用的内生菌(如青霉属、曲霉属、枝孢霉属和芽孢杆菌属)。但这类微生物是否对杜仲植物生长及药理活性成分的合成产生积极影响,还有待进一步研究。此外,高通量测序数据还可以帮助我们通过确定优势目标菌株,然后针对目标菌株的特性选择更为合适的培养基,从而最大限度地获取更多的内生菌。因此,本研究结果将为今后杜仲种子内生菌的功能研究、杜仲的高效栽培以及生物防治提供参考信息。

## 参 考 文 献:

[1] ALY A H, DE B A A, PROKSCH P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(6): 1829-1845.

[2] KUSARI S, HERTWECK C, SPITELLER M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites[J]. Chemistry & Biology, 2012, 19(7): 792-798.

[3] TINA S, GERHARD L M. The biomechanics of seed germination[J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 68(4): 765-783.

[4] ABDELFATTAH A, WISNIEWSKI M, SCHEHA L, et al. Experimental evidence of microbial inheritance in plants and transmission routes from seed to phyllosphere and root[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(4): 2199-2214.

[5] 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(5): 126794.

[6] MIDHA S, BANSAL K, SHARMA S, et al. Genomic resource of rice seed associated bacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1551.

[7] SIMONIN M, BRIAND M, ROCHEFORT A, et al. Seed microbiota revealed by a large-scale meta-analysis including 50 plant species[J]. New Phytologist, 2022, 234(4): 1448-1463.

[8] SHAHZAD R, WAQAS M, KHAN A L, et al. Indoleacetic acid production and plant growth promoting potential of bacterial endophytes isolated from rice (*Oryza sativa* L.) seeds[J]. Acta Biologica Hungarica, 2017, 68(2): 175-186.

[9] 沈兴亮, 焦如珍. 细菌肥料对油茶幼林生长的影响[J]. 林业科学研究, 2014, 27(4): 570-574.

[10] TRUYENS S, WEYENS N, CUYPERS A, et al. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants[J]. Environmental Microbiology Reports, 2015, 7(1): 40-50.

[11] MANO H, TANAKA F, WATANABE A, et al. Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field[J]. Microbes & Environments, 2006, 21(2): 86-100.

[12] LIU S, LI D H, CUI X M, et al. Community analysis of endophytic bacteria from the seeds of the medicinal plant *Panax notoginseng*[J]. Journal of Agricultural Science, 2017, 9(2): 37.

[13] WALITANG D I, KIM C G, KIM K, et al. The influence of host genotype and salt stress on the seed endophytic community of salt-sensitive and salt-tolerant rice cultivars[J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 1-16.

[14] LIU Y, XU P, YANG F, et al. Composition and diversity of endophytic bacterial community in seeds of super hybrid rice 'Shenliangyou 5814' (*Oryza sativa* L.) and its parental lines[J]. Plant Growth Regulation, 2018, 87(2): 257-266.

[15] SHAHZAD, KHAN, A L, BILAL, et al. What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth[J]. Front Plant Sci, 2018, 9: 24.

[16] SAMREEN T, NAVEED M, NAZIR M Z, et al. Seed associated bacterial and fungal endophytes: Diversity, life cycle, transmis-

- sion, and application potential[J]. *Applied Soil Ecology*, 2022, 168: 104191.
- [17] 陈海敏, 吴红霞, 何晓艺, 等. 种子内生真菌草茎点霉D603促进丹参根部丹参酮合成[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(1): 65-71.
- [18] 杨娟, 董醇波, 陈万浩, 等. 不同地区杜仲树皮内生真菌群落组成及生态功能结构的差异分析[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(6): 1126-1134.
- [19] DONG C B, YAO T, ZHANG Z Y, *et al.* Structure and function of bacterial microbiota in *Eucommia ulmoides* bark[J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(11): 3623-3632.
- [20] 张维瑞, 郭秀春, 李钦, 等. 杜仲叶和果实中内生真菌的分离及抑菌活性[J]. *中草药*, 2016, 47(16): 2921-2926.
- [21] 李文芝, 段维军, 周欣, 等. 小麦种子内携真菌多样性研究[J]. *菌物学报*, 2021, 40(3): 487-501.
- [22] 陈泽斌, 夏振远, 雷丽萍, 等. 烟草可培养内生细菌的分离及多样性分析[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(9): 1347-1354.
- [23] DURLIK K, ZARNOWIEC P, PIWOWARCZYK R, *et al.* Culturable endophytic bacteria from *Phelipanche ramosa* (Orobanchaceae) seeds[J]. *Seed Science Research*, 2020, 31(1): 69.
- [24] 张芝元, 郑欢, 韩燕峰, 等. 川、黔、渝几所医院土生角蛋白降解真菌多样性分析[J]. *菌物学报*, 2017, 36(11): 1504-1513.
- [25] NGUYEN N H, SONG Z W, BATES S T, *et al.* FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild[J]. *Fungal Ecology*, 2016, 20(1): 241-248.
- [26] LOUCA S, PARFREY LW, DOEBELI M. Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome[J]. *Science*, 2016, 353(6305): 1272-1277.
- [27] 郭建秀, 王召锋, Saman BOWATTE, 等. 高寒草甸8种植物种子内生细菌和真菌群落的多样性[J]. *草业科学*, 2020, 37(5): 901-915.
- [28] 杨立昌, 吴庆珊, 高阳, 等. 基于高通量测序的金钗石斛种子内生菌群落结构组成分析[J]. *种子*, 2020, 39(8): 94-98.
- [29] ALAIN K, QUERELLOU J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges[J]. *Extremophiles*, 2009, 13(4): 583-594.
- [30] CHEN H M, WU H X, YAN B, *et al.* Core microbiome of medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* seed: a rich reservoir of beneficial microbes for secondary metabolism?[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(3): 672.
- [31] GAO M, XIONG C, GAO C, *et al.* Disease-induced changes in plant microbiome assembly and functional adaptation[J]. *Research Square*, 2020, 9(1): 1496-1507.
- [32] PHAM V T K, REDIERS H, GHEQUIRE M G K, *et al.* The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15[J]. *Archives of Microbiology*, 2017, 199(3): 513-517.
- [33] YANG L. *Sphingomonas* sp. Cra20 increases plant growth rate and alters rhizosphere microbial community structure of *Arabidopsis thaliana* under drought stress[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1221.
- [34] MATSUMOTO H, FAN X, WANG Y, *et al.* Bacterial seed endophyte shapes disease resistance in rice[J]. *Nature Plants*, 2021, 7(1): 60-72.
- [35] 李晓君, 张鞅灵, 薛泉宏, 等. 丹参内生细菌抗氧化及抗菌活性[J]. *西北农业学报*, 2013, 22(6): 158-161.
- [36] QIAN X, ZHOU X, CHEN L, *et al.* Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Apiotrichum porosum* DSM27194[J]. *Fuel*, 2020, 290(1): 119811.
- [37] 黄蓉. 防治草莓灰霉病酵母株筛选及防病机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [38] 贾梅花, 王哲, 刘金福, 等. 格氏栲天然林凋落物对马尾松种子萌发的影响[J]. *林业科学研究*, 2021, 34(1): 128-136.
- [39] 葛伟, 张芝元, 董醇波, 等. 野生鸡油菌子实体可培养微生物多样性及其功能分析[J]. *菌物学报*, 2021, 40(5): 1054-1073.
- [40] GUO J, BOWATTE S, HOU F, *et al.* Diversity of endophytic bacteria and fungi in seeds of *Elymus nutans* growing in four locations of Qinghai Tibet Plateau, China[J]. *Plant and Soil*, 2020, 20(3): 49-63.
- [41] BENNETT A E, GROTEN K. The costs and benefits of plant–arbuscular mycorrhizal fungal interactions[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2022, 73: 649-672.
- [42] 刘宇星, 邵秋雨, 葛伟, 等. 健康与患病刺梨植株可培养叶际真菌菌群差异比较[J]. *菌物学报*, 2021, 40(10): 2620-2460.
- [43] 王科, 刘芳, 蔡磊. 中国农业植物病原菌物常见种属名录[J]. *菌物学报*, 2022, 41(3): 361-386.

# Community Composition and Ecological Functional Analysis of the Endophytic Microorganisms in *Eucommia ulmoides* Seeds

ZHANG Qing-qing<sup>1</sup>, DONG Chun-bo<sup>1</sup>, SHAO Qiu-yu<sup>1</sup>, LU Ying-xia<sup>2</sup>,  
DONG Xuan<sup>2</sup>, LIANG Zong-qi<sup>1</sup>, HAN Yan-feng<sup>1</sup>

(1. Institute of Fungus Resources, Department of Ecology, College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. College of Tea Science, Guizhou University, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

**Abstract:** [Objective] To reveal the microbial community composition and diversity in *Eucommia ulmoides* seeds and enrich the related microbial resources. [Methods] In this study, the diversity of endophytic microorganisms in *E. ulmoides* seeds was analyzed by traditional culture method and high-throughput sequencing technology, and functional annotated by FAPROTAX and FUNGuild database. [Results] A total of 40 fungi strains (3 phyla and 11 genera) were isolated from *E. ulmoides* seeds, and the dominant genus was *Aspergillus* (30%); 142 bacterial strains (1 phylum, 6 genera) were isolated, of which *Solibacillus* was the dominant genus (47.18%). Through high-throughput sequencing, 141 fungal OTUs were obtained belonging to 6 phylum and 101 genera; 442 bacterial OTUs were obtained belonging to 24 phylum and 313 genera. At the genus level, the dominant fungi were *Apiotrichum* (31.28%) and *Debaryomyces* (26.07%); The dominant bacterial genera were *Pseudomonas* (16.66%) and *Lactobacillus* (9.68%). The results of functional annotation showed that fungi mainly degraded organic matter, promoted the growth of host plants and the absorption of soil nutrients by host, improved soil microbial community structure and Pathogen community. The bacteria mainly consisted of chemoheterotrophic, heterotrophic, fermentation. and nitrogen fixation bacteria. [Conclusion] *E. ulmoides* seeds carry a variety of probiotics and potential phytopathogens, which have important effects on plant growth and development. In addition, a number of beneficial functional bacteria were isolated in this study, which will provide microbial resources for the subsequent artificial control of seed microbiome to enhance plant health.

**Keywords:** high-throughput sequencing; culturable method; diversity; ecological function

(责任编辑: 张 研)