

# 花榈木不同萌发阶段下种子际细菌群落动态及其与萌发的关系

葛萌<sup>1</sup>, 韦小丽<sup>1,2\*</sup>

(1. 贵州大学林学林学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学森林与资源环境中心, 贵州 贵阳 550025)

**摘要:** 种子际微生物在种子萌发过程中扮演着重要的角色, 尤其是在驱动自然条件下种子萌发中的作用显著。野外调查发现珍贵用材树种花榈木硬实种子在没有高温和酸蚀处理的条件下能够萌发更新, 这是否与种子际微生物的贡献有关? 为了探究花榈木种子萌发的种子际微生物驱动因素, 必须了解种子际微生物在花榈木种子萌发不同阶段的时间序列变化。本研究中, 我们以三个地方(关岭 GL、晴隆 QL、石阡 SQ)花榈木母树下的土壤作为种子萌发介质, 检测了三种土壤中花榈木种子五个萌发阶段(萌发种子变色阶段、种皮吸胀阶段、胚根突出阶段、胚根伸长阶段、子叶出现阶段)的种子际细菌样本。采用生物信息学策略分析物种多样性及其与土壤养分和发芽率之间的关系、功能预测和不同阶段微生物网络特征。结果表明: 三种土壤之间的花榈木种子各萌发时期的种子际细菌群落结构相对稳定, 相关性较高。种子发芽率同时受到土壤养分和种子际细菌多样性的影响, 其中新鞘氨醇单胞菌(*Novosphingobium*)、中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium*)、伯克氏霍尔德菌(*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*)等菌属与发芽率呈显著正相关。*Minicystis*、*Alkanindiges*、*Telmatospirillum* 对种子萌发阶段的贡献最大。功能预测分析表明, 花榈木种子际细菌在种子萌发过程中, 萌发前期呼吸代谢功能、结瘤功能、多糖降解功能以及能量增强, 萌发后期脂肪降解功能增强。通过网络分析结果表明, 花榈木种子在种皮吸胀破裂阶段的正相关网络最高, 该阶段中, 变形菌门、拟杆菌门、酸杆菌门丰度较高, 而放线菌门等丰度最低。本研究揭示了种子际细菌对花榈木种子发芽率和发芽阶段的贡献, 为种子际细菌促进种子萌发机制提供理论基础。

**关键词:** 种子际; 发芽率; 萌发阶段; 细菌多样性

种子是植物一个独特的器官, 它承载着植物生命的起点和终点(Shade A, et al. 2017)。种子内部和表面存在大量微生物, 这些微生物在种子的储存(Qi Z H, et al. 2022a; b)、种子萌发(Goggin D E, et al. 2015)、幼苗生长(Gao C, et al. 2020; Walsh C M, et al. 2021)以及植物健康(Hu J, et al. 2020a)等方面起着十分重要的作用。种子表面的微生物区域被前人定义为“种子际(Spermosphere)”, 它是萌发种子表面 1-10mm 内受种子萌发而微生物活性增强的区域。种子际微生物是种子周围受种子碳沉积影响的区域并存在相互作用的微生物(Nelson E B. 2004), 该区域发生的相互作用会对植物生长和发育带来重要的影响 (Schiltz S, et al. 2015)。种子际微生物群落主要来源于土壤, 土壤微生物是种子际微生物的“种子库”, 不同的土壤类型会影响种子际微生物群落多样性与组成(Truyens S, et al. 2015)。从种子萌发开始, 种子和幼苗都会分泌不同的化学物质, 从而招募土壤中的微生物类群, 进而影响种子际和根际微生物群落结构(Houlden A, et al. 2008; Pascale A, et al. 2019)。有研究表明, 不同发芽阶段的种子分泌物变化存在较大差异(Kim H, et al. 2020), 种子在进入土壤后会通过种子分泌的养分塑造种子际微生物的多样性与组成(Torres-Cortes et al. 2018)。因此, 研究种子萌发过程中种子际微生物组的变化对种子的储存、萌发、幼苗生长以及植物健康生长至关重要。

发芽的种子在种子际区域内释放渗出物, 从而为微生物生长提供合适的环境(Nelson E B. 2018)。同样, 发芽的种子会根据渗出物的变化招募种子际中合适的微生物。已鉴定出多种种子际细菌在诸多农作物种子萌发中发挥着重要的作用, 如芽孢杆菌属(*Bacillus velezensis*) 在玉米(*Zea mays*)种子际中起到抗真菌和促进种子萌发的作用(Pal G, et al., 2021); 不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas melonis*)在水稻(*Oryza sativa*)种子内和种子际表面附着来促进萌发和抵御抗病性(Shalini D, et al., 2017; Matsumoto H, et al., 2021); 甲基杆菌属(*Methylobacterium oryzae*)在番茄(*Solanum lycopersicum*)种子际中扮演着种子萌发和植物促生长的作用(Chanratana M, et al., 2018)。除此之外, 还有假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)(Chahtane H, et al., 2018)、马赛菌属(*Massilia* sp.)(Xu, Y, et al., 2020)、假节杆菌属(*Pseudarthrobacter* sp.)、

\*韦小丽为通讯作者。E-mail: xlwei@gzu.edu.cn (Xiaoli Wei).

拟杆菌属(*Bacteroidetes* sp)(Dai Y, et al., 2020)、巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)(Omar M N, et al., 2017)等均在各作物种子际中发现并对种子萌发发挥促进作用。因此,种子际细菌在一定程度上驱动着作物种子的萌发。但目前关于驱动自然条件下木本植物种子萌发的微生物种类及作用机制研究较少。

花榈木(*Ormosia henryi*)是中国珍贵用材树种,属于豆科红豆属树种,因其较高的经济价值、观赏价值、生态价值深受欢迎。但花榈木种子中 80%为硬实种子,种子萌发障碍是花榈木自然更新的主要限制因素。在育苗实践中,播种前通常要对花榈木种子进行 90℃以上热水浸种或浓硫酸酸蚀处理,才能使种子破除坚硬致密种子而萌发。我们想知道自然环境中花榈木种子是如何突破坚硬种皮而萌发?种子际微生物是否诱导种子萌发?本研究中,我们收集了来自 3 个花榈木种源地的土壤(关岭、晴隆、石阡),模拟不同土壤条件下的种子萌发实验,并获取 5 个萌发阶段的种子际土壤微生物样品,通过 16SrRNA 基因扩增子测序,探讨 3 个花榈木地理种源土壤微生物的变异及其在 5 个萌发阶段下的种子际细菌群落动态、功能预测和种子际细菌群落网络结构随萌发时间的变化,预测自然土壤下促进花榈木种子萌发的关键细菌种类。本研究的目的:(1)探明影响花榈木种子萌发的主要细菌类群,筛选出对花榈木种子萌发阶段的贡献最大的种子际细菌种类;(2)种子际细菌在促进花榈木种子萌发上扮演着什么功能?我们的结果将会为种子际微生物对花榈木种子萌发的驱动提供新的证据。

## 2 材料与方法

### 2.1 种子和土壤

花榈木种子于 2019 年采自贵州黔南布依族苗族自治州惠水县(105°39'3.69"W, 25°58'24.88"N)的同一株花榈木母株上的成熟种子,种子千粒重 345.01±2.20g。种子萌发介质分别是 2021 年 1 月 1 日采自贵州关岭县(GL)、晴隆县(QL)和石阡县(SQ)的花榈木母树下长有良好更新幼苗的 0-20cm 土壤,去除杂质和石块,将每种土壤过筛后备用。

### 2.2 实验设计

将准备好的三种土壤分别置于培养框(80×35×20cm)中,每种土壤设置 3 个重复,2021 年 1 月 1 日,每个重复均匀播种形态饱满、大小一致的 100 粒健康种子,覆土后用灭菌后的松针覆盖表土,置于室外自然条件下进行萌发试验,定期管理水分保持土壤湿润。在种皮开始变色阶段(I)、种皮吸胀阶段(II)、胚根突出阶段(III)、胚根伸长阶段(IV)、子叶伸长出现(V)五个阶段进行取样。在每个重复中收集这五个状态下的种子际土壤样本各 5g,混匀并分装和标记。各个阶段的样本收集后立即保存在-80 超低温冰箱中,待统一收集完全后进行检测。

### 2.3 土壤理化性质分析

对不同地点采集的土壤养分状况进行测定分析,包括土壤容重(SBD)、土壤 pH(pH)、全氮(TN)、全磷(TP)、全钾(TK)、有效氮(AhN)、速效磷(AP)、速效钾(AK)、有机质(SOM)。土壤理化性质的测定与分析均按照土壤农业化学分析法(Bao, S.D. 2000)进行。

### 2.4 DNA 提取、PCR 扩增和测序

将上述方法收集来自 3 个不同土壤、五个阶段的花榈木种子际土壤样品按照 Bai 等人(Bai J, et al. 2020)的要求使用 FastDNA® Spin Kit for Soil(MP Biomedicals, 美国)的试剂盒抽提 DNA。选择的引物为 338F:(ACTCCTACGGGAGGCAGCAG)和 806R:(GGACTACHVGGGTWTCTAAT)扩增 16SrDNA 的 V3-V4 区域(Liu C, et al. 2016)。扩增之后的 PCR 产物用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 进行纯化,然后采用 NEXTFLEX® Rapid DNA-Seq Kit 进行建库,利用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行测序。使用 fastq 软件对原始测序序列进行质控,使用 FLASH 软件进行拼接,使用 UPARSE 软件,根据 97%的相似度对序列进行 OTU 聚类,在聚类过程中去除嵌合体,得到 OTU 代表序列,去除所有样品中注释到叶绿体和线粒体序列,再进行抽平后的分析。

### 2.5 生物信息学分析

为了建立一个将种子际微生物组成与花榈木种子萌发生命周期相关联的模型,以预测生物标志物,我

们使用随机森林回归模型对花榈木种子五个萌发阶段的种子际细菌相对丰度与种子萌发时间进行回归分析。采用十则交叉验证方法评估细菌群落的重要性，以揭示重要的细菌群与花榈木萌发时间相关的生物标记物。首先对生成的 OTU 序列进行抽平之后，使用 R3.6.1 中的 RandomForest(Breima L, et al.2003)包进行随机森林分析，确定了与萌发时间有关的细菌类别。使用 ggplot2 中的直方图函数对结果进行可视化。生物标志物按贡献从大到小进行分类，并使用十倍交叉验证确定准确性(Zhang J, et al. 2018)。

获得生成的 OTU 表后，在美吉云平台对种子际细菌进行 PICRUSt 功能预测分析(https://cloud.majorbio.com)，并获得 KEEG 中的 module 表。使用 STAMP 中的 G 检验和 Fisher 检验方法(Parks-Donovan H, et al. 2014)来测试不同样品之间功能类别的丰度，并测试比较样品在通路上的显著差异(t 检验)，使用微生物共现性网络分析(CoNet, Co-occurrence network inference)探究种子际土壤微生物之间的互作关系。

### 3 结果与分析

#### 3.1 土壤理化性质和种子发芽率

三种土壤的土壤容重 SBD 和土壤有机质 SOM 无显著差异(表 1、表 2)。采自 GL 的土壤 pH、全氮 TN、全磷 TP、全钾 TK、碱解氮 AhN、速效磷 AP 和速效钾 AK 均显著高于 SQ 和 QL，而 SQ 养分含量均最低。通过土壤发芽率和苗形态指标分析可知(表 3)，GL 的苗高、地上部分干重和地下部分干重均高于其他处理组但差异不显著，GL 处理的种子发芽率高于其他两个处理组并差异显著。各组养分含量大小排序依次是 GL>QL>SQ。各组发芽率和苗形态指标大小排序依次为 GL>SQ>QL(地径指标除外)。这表明土壤养分越高，可能会促进花榈木种子和苗期生长发育。

表 1 三种土壤的理化指标分析  
Table 1 Analysis of physical and chemical indexes of three soils

Soil	SBD (g·cm <sup>-3</sup> )	pH	TN (g·kg <sup>-1</sup> )	TP (g·kg <sup>-1</sup> )	TK (g·kg <sup>-1</sup> )	SOM (g·kg <sup>-1</sup> )	AhN (mg·kg <sup>-1</sup> )	AP (mg·kg <sup>-1</sup> )	AK (mg·kg <sup>-1</sup> )
GL	0.92±0.05a	4.68±0.05a	1.80±0.18a	1.12±0.06a	11.24±0.12a	41.55±5.45a	124.94±2.85a	6.25±0.48a	202.57±25.28a
SQ	0.95±0.09a	4.33±0.03b	1.32±0.08b	0.25±0.03c	2.70±0.19c	31.36±10.20a	89.26±6.67b	2.61±0.40b	40.79±1.68b
QL	0.93±0.03a	4.4±0.11b	1.53±0.20ab	0.43±0.01b	9.17±0.37b	33.81±1.94a	106.29±13.44ab	6.20±0.62a	78.43±10.38b

表 2 三种土壤上花榈木种子发芽和苗形态指标  
Table 2 Seed germination and seedling morphological indexes of Ormosia henryi on three soils

Soil	Initiation of germination (no. of days)	Germination rate(%)	Seedling height(cm)	Ground diameter(cm)	Shoot dry weight(g)	Root dry weight(g)
GL	56.0±0.8b	30.33±1.25a	9.13±0.76a	1.91±0.11ab	0.26±0.01a	0.06±0.00a
SQ	56.3±1.2b	21±3.27b	8.53±0.05a	2.46±0.34a	0.21±0.07a	0.06±0.02a
QL	67.3±0.5a	20.33±0.47b	8.07±0.81a	1.55±0.20b	0.18±0.02a	0.04±0.00a

#### 3.2 不同土壤不同萌发阶段下的种子际细菌多样性分析

为了研究环境中种子际微生物多样性，Alpha 多样性分析可以反映微生物群落的丰富度和多样性，包括一系列统计分析指标来估计环境群落的物种丰度和多样性。Chao 指数能反映群落丰富度，shannon 指数能反映群落多样性。由图 1 可知，各土壤中不同萌发阶段 chao 指数具有极显著差异(p=0.00019)，在同一萌发阶段下，chao 指数均依次排序为 SQ>GL>QL，而种子萌发率大小依次排序为 GL>SQ>QL(表 2)，表明种子发芽率与种子际细菌多样性存在一定的正相关，但过高微生物多样性可能会抑制种子发芽。shannon 指数和 chao 指数随着萌发阶段的变化均呈现先降低后增加的趋势，第 II 阶段种子际细菌丰度和多样性均约低于其他四个阶段，但不同萌发阶段的同一处理组之间没有显著差异。对萌发阶段之间进行皮尔逊相关性热图分析(图 2)，结果表明，三个土壤中花榈木各种子萌发时期的群落结构相对稳定，差异较小，相关性较高，大多在 0.9 以上。

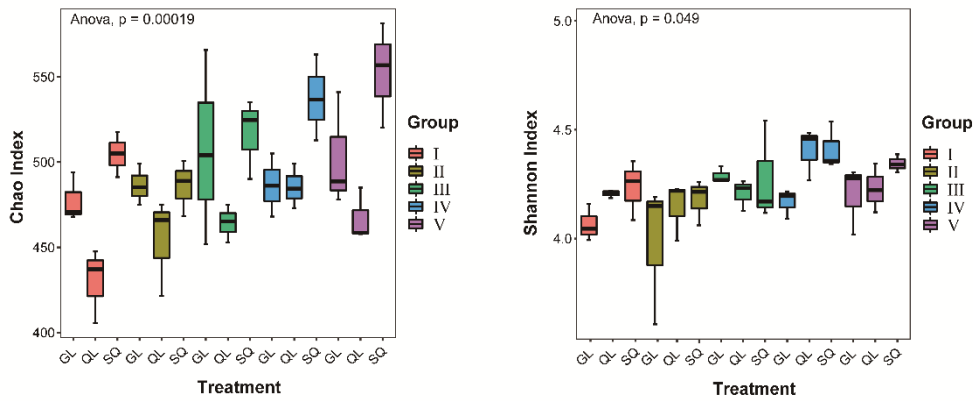


图 1 不同土壤中不同萌发阶段种子际细菌  $\alpha$  多样性  
 Fig.1  $\alpha$  diversity of bacteria in different soil at different germination stages

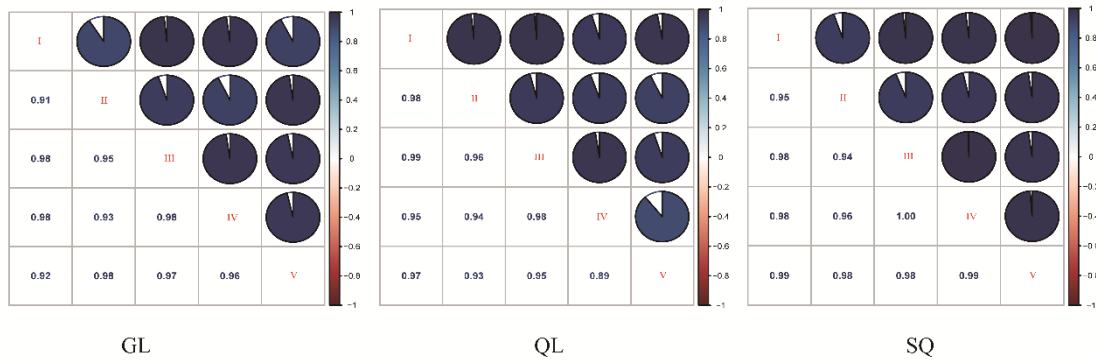


图 2 同一土壤不同萌发阶段下的种子际细菌多样性相关性热图  
 Fig.2 Correlation heat map of bacterial diversity in the same soil at different germination stages

### 3.2 花榈木种子际细菌与发芽和土壤养分指标的关联分析

对丰度前 150 属的细菌与种子发芽率和土壤养分指标进行相关性分析得知，芽单胞菌科属 (*unclassified\_f\_\_Gemmatimonadaceae*)、黄杆菌科属 (*unclassified\_f\_\_Xanthobacteraceae*)、*Massilia*、*Ramlibacter*、*unclassified\_f\_\_Micromonosporaceae*、*unclassified\_f\_\_Methyloligellaceae*、*Pedomicrobium*、硝化螺旋细菌 (*Nitrospira*)、中慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium*)、*norank\_f\_\_norank\_o\_\_Elsterales*、鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas*)、新鞘氨醇单胞菌 (*Novosphingobium*)、伯克氏霍尔德菌 (*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*) 等与发芽率呈显著或极显著正相关。将这些菌与土壤养分进行 RDA (Redundancy Analysis 冗余分析) 分析 (图 3-2) 可知，中慢生根瘤菌与 TN、AK 具有显著的正相关关系，同时鞘氨醇单胞菌、硝化螺旋细菌、芽单胞菌与 AhN、TK、TP 呈显著正相关，而新鞘氨醇单胞菌和伯克氏霍尔德菌则与 AP 呈显著正相关。

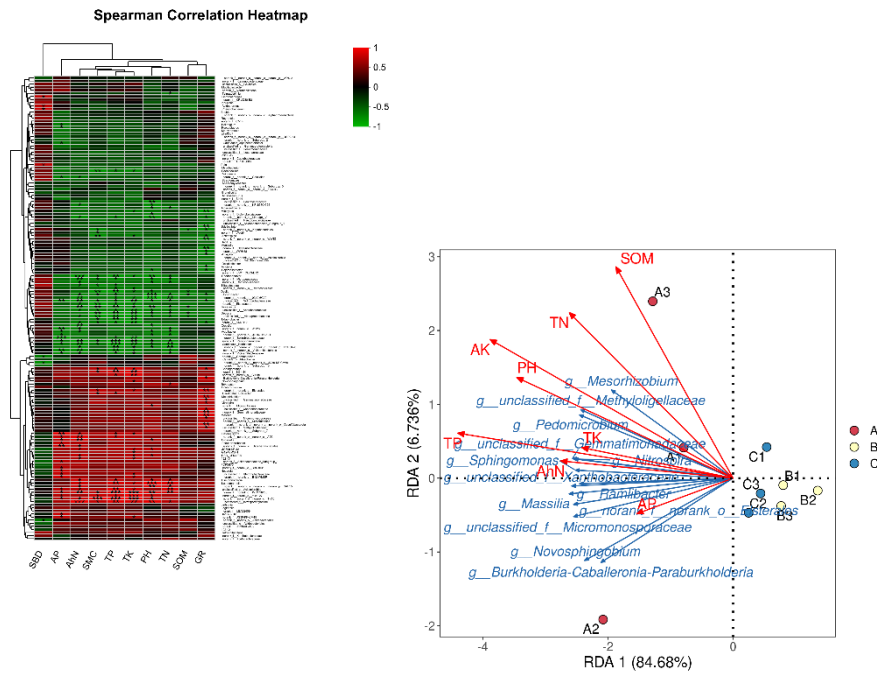


图 3 种子际细菌丰度与土壤养分和发芽率指标的相关性 heatmap 图(图 3-1);  
种子际促萌发细菌与土壤养分的 RDA 分析(图 3-2)。

Fig.3 correlation between bacterial abundance and soil nutrients and germination rate heatmap (Fig.3-1);  
rDA analysis of seed germination promoting bacteria and soil nutrients (Fig.3-2)

### 3.3 花榈木种子际细菌分类生物标志物与种子萌发阶段的相关性

为了减少地理位置或土壤类型的影响，我们使用随机森林机器学习算法回归了三个不同土壤的花榈木种子际细菌在门水平上的相对丰度与种子萌发阶段的关系，以建立一个将种子际微生物群组成与花榈木种子萌发生命周期相关联的模型(Breiman, et al. 2003)。该模型解释了 79.88%与花榈木种子萌发阶段相关的种子际菌群变异。为了揭示重要的细菌类群与花榈木萌发时间相关的生物标志物，采用十则交叉验证方法进行评估，当使用 33 个重要类群时，交叉验证误差最小，且交叉验证误差曲线稳定(如图 4a)，生成了最合适的模型。因此，我们将这 33 个类别定义为模型中的生物标记类群，并确定了 33 个与萌发时间相关的类别。根据特征贡献从大到小，使用随机森林方法识别样本中 33 个萌发时间相关菌属，以获得特征贡献直方图(图 4b)。贡献最大的细菌属为 *Minicystis*(FCPU426)、*Alkanindiges*(变形菌门)、*Telmatospirillum*(变形菌门)。同时将这 33 个菌与不同萌发阶段的花榈木种子际细菌进行了相关性 heatmap 图分析(图 4c)，由图可知，大多数菌与第IV和第V阶段呈正相关关系，说明这 33 个菌属对萌发第IV和第V阶段的贡献较大。

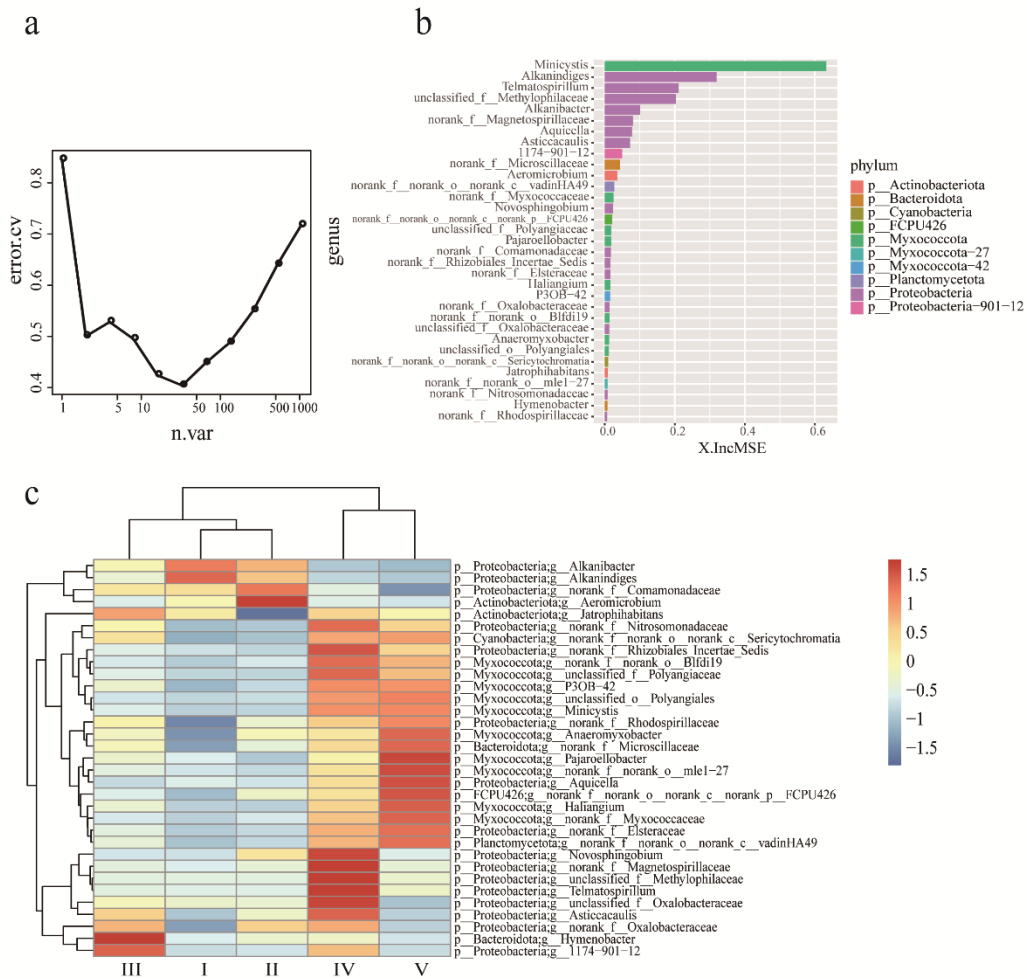


图 4 随机森林分析。a. 十倍交叉验证误差；b. 通过十倍交叉验证和随机森林回归分析，确定了前 33 个生物标志物，生物标志物对模型准确性的重要性由高到低排列；c. 热图显示了前 33 个生物标记细菌属在萌发阶段的相对丰度。

Fig.4 Random forest analysis. A. Ten times cross validation error ; through ten-fold cross-validation and random forest regression analysis, the top 33 biomarkers were determined, and the importance of biomarkers to the accuracy of the model was ranked from high to low ; the heat map shows the relative abundance of the first 33 biomarker bacterial genera at the germination stage.

### 3.5 花榈木种子际细菌在不同萌发阶段的功能预测

从 PICRUS1 函数预测获得的 KEGG 中 module 值进行 PCoA 分析，各土壤的 PC1 和 PC2 轴分别解释了分析结果的 97.31%、92.78%、96.93%，具有较高的可信度。由图 5 可知，关岭的第 V 阶段与其他阶段的点相距较远，而在 QL 和 SQ 的 PCoA 图中均是第 II 阶段与其他阶段的点相距较远，因此，我们推测，第 II 阶段的预测功能与其他阶段有很大不同，并且种子际细菌的某些功能随着萌发阶段而改变。基于此，我们采用 STAMP 差异分析方法对 Kegg 代谢途径的功能预测差异进行两两比较，以反映不同萌发阶段种子际细菌功能的差异。图 6a 所示，第 II 阶段和第 I 阶段相比，“甲烷生成，CO<sub>2</sub>”、“结瘤”等功能差异显著且在第 I 阶段较高，“硝吡咯菌素生物合成，色氨酸”、“蝴蝶霉素生物合成，色氨酸”、“泛醌生物合成”等功能在第 II 阶段增加。第 II 阶段与第 III 和第 IV 阶段相比(图 6b 和 c)，“硫酸盐-硫同化”、“鞘氨醇降解”、“辅酶合成”等均差异显著且均在第 III、第 IV 阶段增加。第 II 阶段和第 V 阶段的比较(图 6d)显示，共有 14 个功能水平显著不同，其中“D-葡萄糖醛酸降解”等差异显著且在第 II 阶段增加，“多重耐药性”、“鞘氨醇降解”等功能差异显著且在第 V 阶段增加。说明花榈木种子际细菌可能对种子萌发扮演着降解多糖和脂肪以及生防等功能特性。

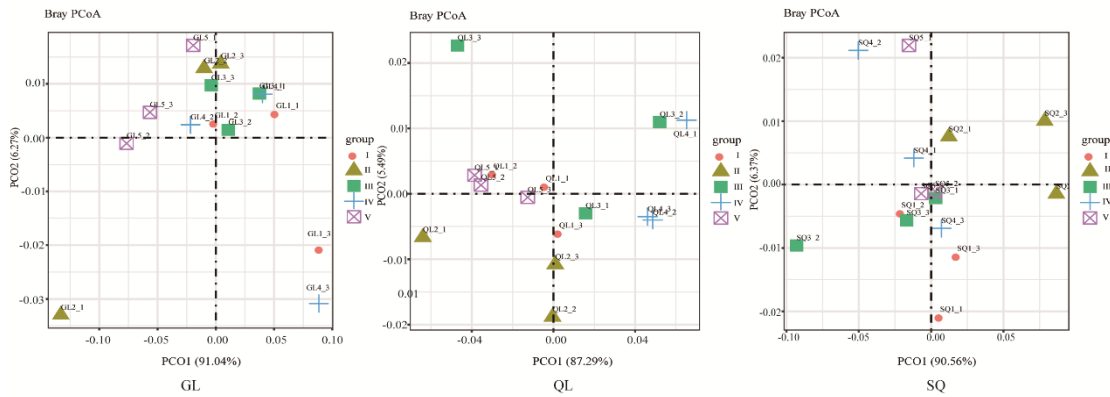


图 5 三种土壤不同阶段下种子际细菌多样性功能预测中 module 值的 PCoA 分析

Fig. 5 PCoA analysis of module values in the functional prediction of seed soil bacterial diversity in three soils at different stages.

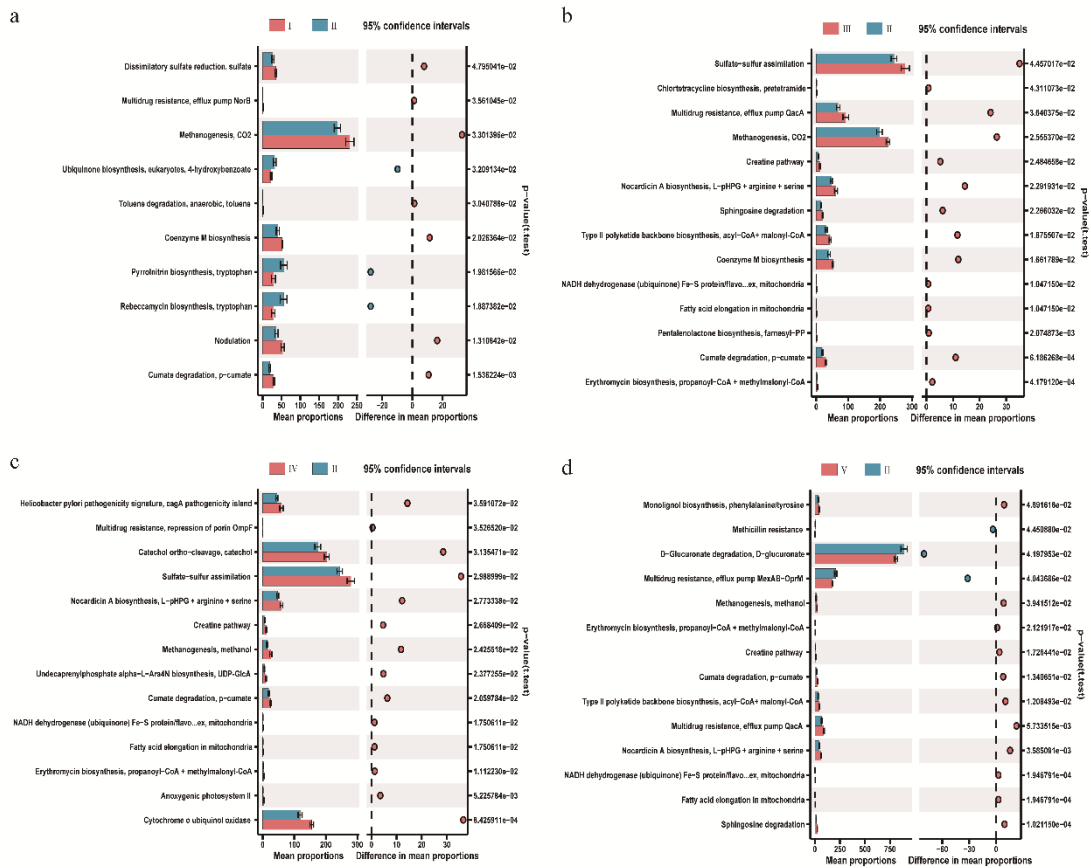


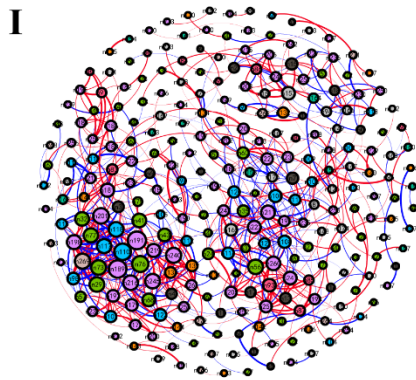
图 6 种子萌发第 II 阶段与其他阶段的 stamp 分析

Fig 6 Stamp analysis of seed germination stage II and other stages

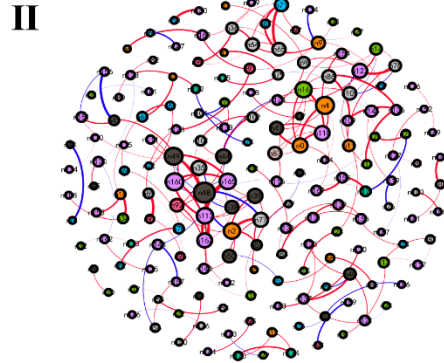
### 3.6 花榈木不同萌发阶段种子际细菌的共线性网络

对三种土壤处理组中每个阶段的相关性共线性网络进行分析, 结果表明(图 7), 每个阶段的平均聚类系数分别是 0.453、0.455、0.449、0.4、0.403, 平均路径长度分别是 5.711、3.852、7.481、9.591、7.849, 而总阶段的平均聚类系数为 0.55, 平均路径长度为 3.285, 说明相较于总阶段的数据共同分析得到的共线性网络(图 7, AII)而言, 单一阶段的共线性网络更具有小世界和模块化的特征。在种子萌发的不同阶段, 种子际细菌网络中的模块和节点的数量不同, 花榈木种子萌发时间对平均聚类系数、路径长度和模块化有显著影响。此外, 花榈木不同萌发阶段的网络图显示了不同阶段种子际细菌之间的相关性程度。在各个阶段的

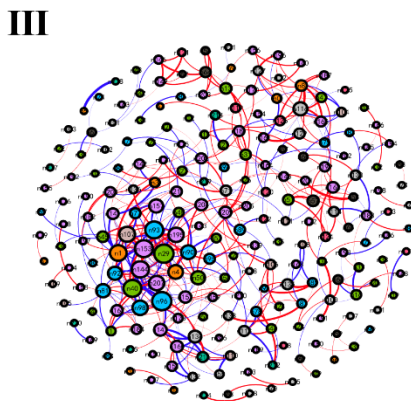
网络中，均是正相关多于负相关。变形菌门是所有阶段最丰富的门，与多种细菌有联系，变形菌门丰度随着种子萌发时间呈现出先升高后下降的趋势。与其他阶段相比，第 II 阶段的种子际细菌群落丰度的正相关性最高，与其他阶段相比，在该阶段中，变形菌门、拟杆菌门丰度最高，而放线菌门等丰度最低。



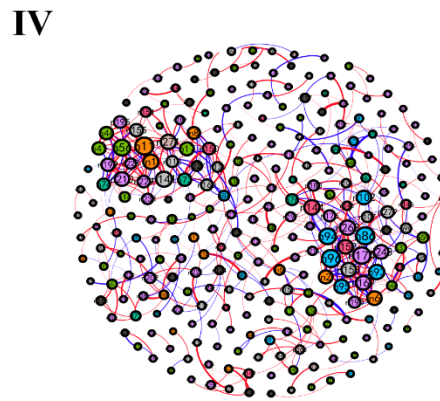
Proteobacteria(31.02%)	Node	274
Actinobacteriota(21.17%)	Side	849
Chloroflexi(10.58%)	Average degree	6.197
Acidobacteriota(7.3%)	Clustering coefficient	0.453
Firmicutes(6.2%)	Positive correlation	61.01%
Bacteroidota(4.38%)	Negative correlation	38.99%
Myxococcota(4.01%)	Average path length	5.711
Verrucomicrobiota(3.65%)	Module	0.708



Proteobacteria(36.16%)	Node	177
Actinobacteriota(12.43%)	Side	217
Chloroflexi(9.6%)	Average degree	2.452
Bacteroidota(9.6%)	Clustering coefficient	0.455
Acidobacteriota(7.34%)	Positive correlation	79.26%
Myxococcota(4.52%)	Negative correlation	20.74%
Verrucomicrobiota(3.39%)	Average path length	3.852
Firmicutes(2.82%)	Module	0.854



Proteobacteria(32.88%)	Node	222
Actinobacteriota(19.37%)	Side	474
Chloroflexi(11.71%)	Average degree	4.27
Bacteroidota(6.31%)	Clustering coefficient	0.449
Acidobacteriota(5.41%)	Positive correlation	58.44%
Myxococcota(4.5%)	Negative correlation	41.56%
Verrucomicrobiota(4.05%)	Average path length	7.481
Firmicutes(3.6%)	Module	0.708



Proteobacteria(36.07%)	Node	280
Actinobacteriota(17.86%)	Side	564
Chloroflexi(8.21%)	Average degree	4.029
Firmicutes(7.5%)	Clustering coefficient	0.4
Acidobacteriota(5%)	Positive correlation	61.17%
Myxococcota(4.64%)	Negative correlation	38.83%
Bacteroidota(3.93%)	Average path length	9.591
Verrucomicrobiota(3.93%)	Module	0.765



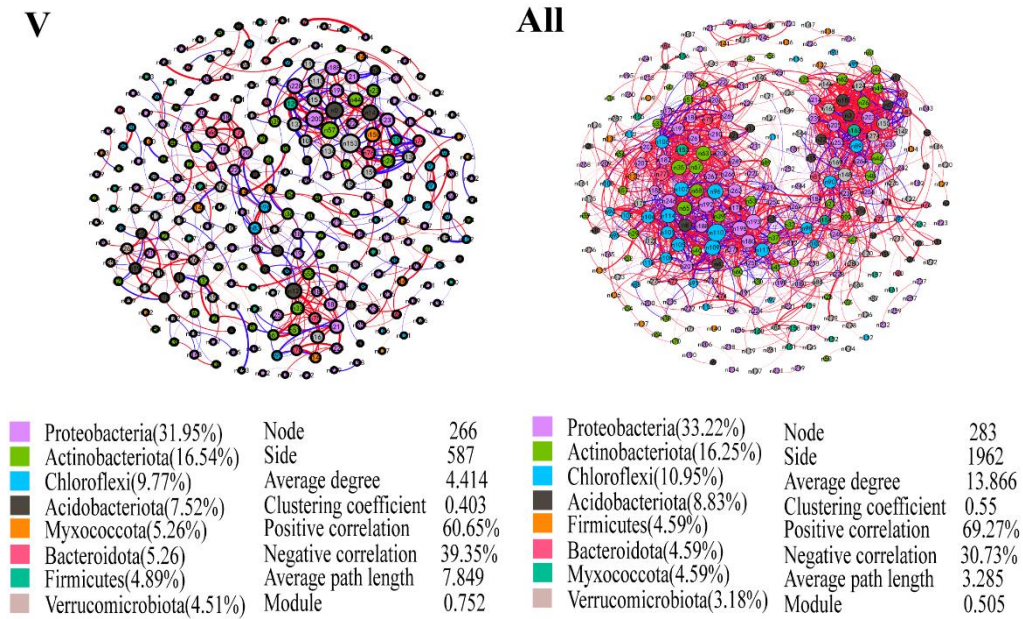


图 7 三种土壤不同萌发阶段的种子际细菌群落网络分析

Fig.7 Analysis of bacterial community network in different germination stages of three soils

#### 4 讨论

种子萌发是植物生命周期中的一个关键阶段，根据定义，萌发是由种子吸胀开始，胚轴(通常是胚根)的出现为止，期间发生一系列有序的生理过程和形态发生过程。(Bewley J D, et al. 2013)。种子相关微生物可以作为种子栖息地的短暂定植者，也可以在不同的植物发育阶段持续存在。种子相关微生物中，除了种子内生菌，微生物与植物的相互作用的持续性在很大程度上是取决于发芽种子周围土壤区域的微生物，即种子际微生物(Verona. 1958)。萌发种子受植物种类、土壤类型、温湿度等生物和非生物因素的影响，会释放不同的种子分泌物到种子际中，从而根据不同的种子分泌物来招募不同的种子际微生物类群(Nelson, 2004; Schiltz, et al. 2015)。

在 3 种不同土壤上的模拟花榈木种子自然萌发试验结果表明，土壤的养分含量不同，种子发芽率和幼苗形态指标也不同。三种土壤理化性质中除土壤容重外，其余各养分指标大小排序均为 GL>QL>SQ，相应地花榈木幼苗形态指标大小(地径除外)均依次排序为 GL>SQ>QL，表明土壤养分含量越高，可能越有利于苗期生长，为苗期提供所需的营养(Shen Y, et al. 2022)。种子萌发率除依赖于土壤温湿度、光照等环境因素外，还与种子相关微生物有关(Wang J J, et al. 2023)。本研究对花榈木种子际细菌 α 多样性研究结果表明，SQ 处理组的 chao 指数与种子发芽率均高于 QL 处理组(但其土壤养分指标相反)，表明花榈木种子际细菌 α 多样性与种子发芽率存在一定程度的正相关，在农业研究中有很多研究验证了这一结果，如间作的土壤微生物多样性高于单作，促进产业稳定发展(Li Y P, et al. 2022)，但是过高的微生物多样性是否有利于植物的持续发展尚不清楚。本研究发现随着萌发时间的推移，种子际细菌 shannon 指数和 chao 指数先降低后缓慢升高，同一土壤不同萌发阶段之间的种子际细菌多样性相关性较高，细菌群落相对稳定。种子际微生物多样性代表了种子萌发期间的健康程度与良好的生态平衡和稳定状态，这与 Sipiwe Prudence Dlamini、Magdalena Frac 等人的研究结果一致(Dlamini S P et al, 2023; Frac M et al. 2020)。

对种子际细菌丰度与发芽率和土壤养分的相关性分析表明芽单胞菌属、黄杆菌属、马赛菌属、微单胞菌属、中慢生根瘤菌属、鞘氨醇单胞菌属、新鞘氨醇单胞菌属、伯克氏霍尔德菌属等有益菌属与发芽率均呈显著正相关，这些细菌在前人的许多研究中被发现。马赛菌属可以缓解花生的盐胁迫并促进种子萌发(Xu, Y, et al., 2020)，马赛菌属成员表现出多种生理活性，可降解农药，修复污染土壤(Wang HZ, et al. 2016)、具

有溶磷(Zheng BX, et al. 2017), 产甲壳素酶(Faramarzi MA, et al. 2009)、纤维素酶等功能; 鞘氨醇单胞菌属在水稻种子内和种子际表面附着来促进萌发和抵御抗病性(Shalini et al., 2017; Matsumoto et al., 2021)。日本慢生根瘤菌可以促进玉米种子发芽、根瘤形成和早期发育(Cassán et al. 2009)。伯克氏霍尔德菌已被发现在大麦和玉米种子萌发初期的种子际定植并发挥促进作用(Normander B et al. 2000; Liu, Y. et al. 2012), 该菌具有溶磷、产激素、解淀粉酶等特性, 对多种病原菌如疫霉具有很好地生防能力, 并具有降解农药残留和生物修复的多种特性(Sandani H B P, et al. 2019)。

采用随机森林分析方法建立了花榈木种子际细菌微生物标记与萌发时间的相关模型, 确定了 33 个与萌发阶段相关的菌属。具有最高特征贡献的细菌是 *Minicystis*(Myxococcota)、*Alkanindiges*(Proteobacteria)、*Telmatospirillum*(Proteobacteria)。其中 *Minicystis* 属于粘菌门, 一些粘菌门可以参与木质素和纤维素的降解, 具有多种生理代谢活性(Gladkov GV, et al. 2022)。*Alkanindiges* 和 *Telmatospirillum*(西伯利亚端马骡菌)均属于变形菌门, *Alkanindiges* 是一种烷烃降解菌, 可以对碳氢化合物进行有效降解和生态修复, 并在多种蔬菜中作为健康指示物种(Erlacher A, et al. 2014)。*Telmatospirillum* 可以进行土壤硫酸盐还原(Hausmann B, et al. 2016), 并能产生化学有机营养和修复氮能力(Sizova MV, et al. 2007)并与阿拉伯糖代谢有关, 在降解植物来源的碳水化合物方面具有活跃性(Verastegui Y, et al. 2014)。与前 3 阶段正相关的几种菌, *Alkanindiges*、*Comamonadaceae*、*Hymenobacter* 等均具有降解特性, *Hymenobacter* 是一种多糖降解细菌, 对于半纤维素和淀粉等多糖类物质具有很强的降解能力(Ghimire N, et al. 2020)。这些特性对种子解除休眠并突破萌发具有积极的影响。

种子萌发过程中, 主要涉及细胞分裂、细胞壁降解和修复、氨基酸代谢、糖代谢、呼吸代谢、氧化应激、DNA 合成以及 ATP 合成等有关酶的变化, 而微生物通过自身功能特性为宿主提供重要的保护和营养供应。Kavamura 等人(Kavamura VN, et al. 2018)通过盆栽实验研究了小麦根际细菌的功能组成, 认为病原体相关功能在早期发育阶段出现率较高, 而后期发育阶段主要表现出与有益微生物相关的抗菌和趋化功能。本研究也得出了与之类似的结果。在本研究中, 随着花榈木种子萌发时间的推移, “甲烷生成, CO<sub>2</sub>”、“结瘤”等功能在第 I 阶段展现出种子际周围能量和呼吸作用的增强(Botha FC, et al. 1992)。随着第 II 阶段种子被吸胀软化, 种子分泌物渗出, “D-葡萄糖醛酸降解”、“硝吡咯菌素生物合成, 色氨酸”、“蝴蝶霉素生物合成, 色氨酸”、“泛醌生物合成”等功能表明, 多糖降解酶增加, 有助于花榈木坚硬致密种皮的分解, 各种抗菌生物活性合成, 为种子提供了良好的萌发环境。在第 III、第 IV 和第 V 阶段中, “硫酸盐-硫同化”、“鞘氨醇降解”以及“辅酶合成”等功能的增强表明种子际周围呼吸代谢活性增加, 辅酶合成以及精氨酸的合成成为种子发育提供丰富的 ATP 能量和外来营养物质。花榈木种子萌发不同阶段促进了种子际细菌群落功能结构的变化。

网络分析往往被广泛用来探索土壤生态学中微生物相互作用和共线模式。微生物组的功能容量不是其单个组分的总和, 而是其微生物物种之间复杂的相互作用形成一个复杂的网络, 这会显著影响生态过程和宿主适应性(Layeghifard M, et al. 2017)。本研究网络分析结果表明不同萌发阶段的土壤种子际细菌共线性网络模式有所差异。与其他萌发阶段相比, 第 II 阶段的正相关作用百分比更高, 这很可能是因为该阶段为种皮萌发吸胀破裂期, 大量种子内部营养物质外渗, 增强了与种子际周围细菌的合作。在该阶段中变形菌门、拟杆菌门以及酸杆菌门丰度均较高, 而放线菌门和厚壁菌门丰度最低。变形菌门是多数类型土壤中丰度最高的门, 也是富含 PGPR(植物根际促生菌)最多的门(姚阳阳, 2022), 在改善土壤、植物抗逆、植物生长等方面发挥重要的作用。拟杆菌门可以分解残骸并为宿主提供营养和能量(Ma, Z, et al. 2021)。酸杆菌门中的一些成员能够降解复杂的生物聚合物以及植物掉落物, 如木聚糖、果胶和几丁质等(Eichorst S A, et al. 2011)。同时发现具有更高的模块化, Krause 等人发现(Krause AE, et al. 2003), 更高的模块化促进交互网络稳定性的提高, 并能帮助微生物群落抵抗环境变化。

本研究发现花榈木种子际细菌在种子萌发过程中的重要作用, 尤其是在发芽率和萌发阶段的影响上发挥重要作用。本研究采用 PICRUST 函数预测分析了不同萌发阶段下花榈木种子际细菌的功能差异, 但是这种方法具有不确定性, 因为不能清楚的了解种子际细菌的促萌机制。种子际细菌如何排除外界变量因素的

干扰促进种子萌发以及促萌的分子机制是什么?如果在灭菌和未灭菌的同一种土壤下(排除土壤及其他变量因素),能否探究花榈木种子际细菌促进种子萌发的代谢机制,进而揭示野生花榈木种子的自然更新方式,这将是接下来继续研究的问题。网络分析可以发现群落中的一些关键物种,也可用于指示环境扰动时的系统稳定性,虽然网络分析在微生物生态学中的应用存在一些问题,但只要使用得当和推测合理,网络分析仍可在相关领域中提供有用信息。

## 5 结论

1)花榈木种子际细菌多样性、丰度和功能影响种子发芽率, *Novosphingobium*、*Mesorhizobium*、*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* 等种子际功能细菌与发芽率呈显著正相关。

2)花榈木种子际细菌丰度和功能影响种子发芽阶段, *Minicystis*、*Alkanindiges*、*Telmatospirillum* 等种子际细菌对种子萌发阶段的贡献最大。

3)功能预测分析结果表明,花榈木种子际细菌在种子萌发过程中,萌发前期“甲烷生成, CO<sub>2</sub>”、“结瘤”、“葡萄糖醛酸降解”、“辅酶合成”等呼吸代谢、结瘤基因以及半纤维素降解功能以及能量增强,并随着萌发阶段的变化,这些功能逐渐减弱,“鞘氨醇降解”等脂肪降解功能逐渐增强。

4)网络分析结果表明,花榈木种子际细菌群落在种皮吸胀破裂阶段的正相关性最高,该阶段中,变形菌门、拟杆菌门、酸杆菌门丰度较高,而放线菌门丰度最低。

## 参 考 文 献

- [1] Shade A, Jacques M A, Barret M. 2017. Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Curr Opin Microbiol*, 37: 15-22.
- [2] Qi Z H, Zhou X, Tian L, Zhang H, Cai L, Tang F. 2022a. Distribution of mycotoxin-producing fungi across major rice production areas of China. *Food Control*, 134: 108572.
- [3] Qi Z H, Zhou X, Tian L, Zhang H Y, Cai L, Tang F. 2022b. Temporal and spatial variation of microbial communities in stored rice grains from two major depots in China. *Food Research International*, 152: 110876.
- [4] Goggin D E, Neil Emery R J, Kurepin L V, Powles S B. 2015. A potential role for endogenous microflora in dormancy release, cytokinin metabolism and the response to fluridone in *Lolium rigidum* seeds. *Ann Bot*, 115(2): 293-301.
- [5] Gao C, Montoya L, Xu L, Madera M, Hollingsworth J, Purdom E, Singan V, Vogel J, Hutmacher R B, Dahlberg J A, Coleman-Derr D, Lemaux P G, Taylor J W. 2020. Fungal community assembly in drought-stressed sorghum shows stochasticity, selection, and universal ecological dynamics. *Nat Commun*, 11(1): 34-49.
- [6] Walsh C M, Becker-Uncapher I, Carlson M, Fierer N. 2021. Variable influences of soil and seed-associated bacterial communities on the assembly of seedling microbiomes. *The ISME Journal*, 15: 2748-2762.
- [7] Hu J, Wei Z, Kowalchuk G A, Xu Y, Shen Q, Jousset A. 2020. Rhizosphere microbiome functional diversity and pathogen invasion resistance build up during plant development. *Environmental Microbiology*, 22(12): 5005-5018.
- [8] Nelson E B. 2004. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1): 271-309.
- [9] Schiltz S, Gaillard I, Pawlicki-Julian N, Thiombiano B, Mesnard F, Gontier E. 2015. A review: what is the spermosphere and how can it be studied?. *Journal of Applied Microbiology*, 119(6): 1467-1481.
- [10] Truyens S, Weyens N, Cuypers A, Vangronsveld J. 2015. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports*, 7(1): 40-50.
- [11] Houlden A, Timms-Wilson T M, Day M J, Bailey M J. 2008. Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(2): 193-201.
- [12] Pascale A, Proietti S, Pantelides I S, Stringlis I A. 2019. Modulation of the root microbiome by plant molecules: the basis for targeted disease suppression and plant growth promotion. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1741-1764.
- [13] Kim H, Kim O W, Ahn J H, Kim B M, Oh J, Kim H J. 2020. Metabolomic Analysis of Germinated Brown Rice at Different Germination Stages. *Foods*, 9(8): 1130-1140.
- [14] Torres-Cortes G, Bonneau S, Bouchez O, Genthon C, Briand M, Jacques M A, Barret M. 2018. Functional microbial features driving community assembly during seed germination and emergence. *Frontiers in Plant Science*, 9: 902.
- [15] Nelson E B. 2018. The seed microbiome: origins, interactions, and impacts. *Plant Soil*, 422 (1): 7-34.
- [16] Pal G, Kumar K, Verma A, Verma S K. 2021. Seed inhabiting bacterial endophytes of maize promote seedling establishment and

- provide protection against fungal disease. *Microbiological Research*, 255: 126926.
- [17] Shalini D, Benson A, Gomathi R., Henry A J, Jerritta S, Joe M M. 2017. Isolation, characterization of glycolipid type biosurfactant from endophytic *Acinetobacter* sp. ACMS25 and evaluation of its biocontrol efficiency against *Xanthomonas oryzae*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 11: 252–258.
- [18] Matsumoto H., Fan X., Wang Y., Kusstatscher P., Duan J., Wu S L., Chen S L., Qiao, K., Wang Y L., Ma, B., Zhu G N., Hashidoko, Y., Berg, G., Cernava, T., and Wang, M. 2021. Bacterial seed endophyte shapes disease resistance in rice. *Nature Plants*. 7: 60–72.
- [19] Chanratana, M., Han, G. H., Melvin Joe, M., Roy Choudhury, A., Sundaram, S., Halim, M. A., Sa, T. 2018. Evaluation of chitosan and alginate immobilized *Methylobacterium oryzae* CBMB20 on tomato plant growth. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 64: 1489–1502
- [20] Chahtane, H., Füller T N, Allard, P. M., Marcourt, L., Queiroz E F, Shanmugabalaji, V., Falquet, J., Wolfender, J. L., and Lopez-Molina, L. 2018. The plant pathogen *Pseudomonas aeruginosa* triggers a DELLA- dependent seed germination arrest in *Arabidopsis*. *Elife* 7: e37082.
- [21] Xu Y, Zhang D, Dai L X, Hong D, Ci D W, Qin F F, *et al.* 2020. Influence of salt stress on growth of spermosphere bacterial communities in different peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6): 2131–2149.
- [22] Dai Y, Li X Y, Wang Y, Li C X, He Y, Lin H H, Wang T, Ma X Y, 2020. The differences and overlaps in the seed-resident microbiome of four Leguminous and three Gramineous forages. *Microbial Biotechnology*, 13(5): 1461–1476.
- [23] Omar, M. N., Osman, M. E., Kasim, W. A., Salama, S. 2017. Characterization of two drought-tolerant PGPB. *Azospirillum brasilense* NO40 and *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal Of Environmental Science*. 46: 121–136.
- [24] Bao, S.D., 2000. *Soil Agricultural Chemistry Analysis*, 3rd ed.; Agriculture Press: Beijing, China, pp. 22–110. (In Chinese). [https://www.researchgate.net/publication/301822463\\_Soil\\_and\\_agricultural\\_chemistry\\_analysis](https://www.researchgate.net/publication/301822463_Soil_and_agricultural_chemistry_analysis).
- [25] Bai J, Xu D M, Xie D M, Wang M S, Li Z Q, Guo X S. 2020. Effects of antibacterial peptide-producing *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability, and microbial community of alfalfa silage. [Bioresource Technology](#), 315:123881.
- [26] Liu C S, Zhao D F, Ma W J, Guo Y D, Wang A J, Wang Q L, Lee D J. 2016. Denitrifying sulfide removal process on high-salinity wastewaters in the presence of *Halomonas* sp[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3): 1421–1426.
- [27] Breiman L, Last M, Rice J. 2003. *Random forests: finding quasars*. (New York: Springer), pp. 243–254.
- [28] Zhang J Y, Zhang N, Liu Y X, Zhang X, Hu B, Qin Y, Xu H, Wang H, Guo X, Qian J, Wang W, Zhang P, Jin T, Chu C, Bai Y, 2018. Root microbiota shift in rice correlates with resident time in the field and developmental stage. *Science China-Life Sciences*, i 61:613–621.
- [29] Parks D H, Tyson G W, Hugenholtz P, Beiko R G, 2014. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, 30(21):3123–3124.
- [30] Bewley J D, Bradford K J, Hilhorst H W M, Nonogaki, H., 2013. *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*, 3rd edition. *Seed Science Research*, 23(4):389–392.
- [31] Verona, O. 1958. La spermosphere. *Annales de l'Institut Pasteur*, 95, 795–798.
- [32] Shen Y , Umaña M N , Li W B , Miao F, Chen Y X, Lu H P, Yu S X, 2022. Linking soil nutrients and traits to seedling growth: A test of the plant economics spectrum. *Forest Ecology and Management*, 505:119941.
- [33] Wang J J, Bonser S P, Liu K, Liu Z Y, Gao H N, Cui H W, Chen J W, *et al.* 2023. Warming affects herbaceous germination, early survival, and growth by shifting plant-soil microbe interactions in an alpine ecosystem. *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-05921-y>
- [34] Li Y P, Lin J Q, Xiao S X, Feng D, Deng Y Y, Xuan W Y, 2022. Effects of sweet potato intercropping in banana orchard on soil microbial population diversity. *Annals of Microbiology*, 72, 46. <https://doi.org/10.1186/s13213-022-01702-7>
- [35] Dlamini S P, Akanmu A O, Fadiji A E, Babalola O O, 2023. Maize rhizosphere modulates the microbiome diversity and community structure to enhance plant health. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 30(1):103499.
- [36] Fraç M, Lipiec J, Usowicz B, Oszust K, Brzezińska M. 2020. Structural and functional microbial diversity of sandy soil under cropland and grassland. *PeerJ*, 8(1): e9501.
- [37] Wang H Z, Lou J, Gu H P, Luo X Y, Wu L S, Liu Y, Wu J J, Xu J M, 2016. Efficient biodegradation of phenanthrene by a novel strain *Massilia* sp. WF1 isolated from a PAH-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(13): 13378–13388.
- [38] Zheng B X, Bi Q F, Hao X L, Zhou G W, Yang X R. 2017. *Massilia phosphatilytica* sp. nov., a phosphate solubilizing bacteria isolated from a long-term fertilized soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8): 2514–2519.
- [39] Faramarzi M A, Fazeli M, Tabatabaei Yazdi M, Adrangi S, Aziz Mohseni, 2009. Optimization of cultural conditions for production

- of chitinase by a soil isolate of *Massilia timonae*. *Biotechnology*, 8(1): 93-99.
- [40] Cassán, F., Perrig, D., Sgroj, V., Masciarelli, O., Penna, C. and Luna, V., 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 28–35.
- [41] Normander B, Prosser J I, 2000. Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and Presowing conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:4327–4377.
- [42] Liu, Y., Zuo, S., Zou, Y Y, Wang J H, Song W, 2012. Investigation on diversity and population succession dynamics of indigenous bacteria of the maize spermosphere. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 28, 391–396.
- [43] Sandani H B P , Ranathunge N P , Lakshman P L N , Weerakoon W M W, 2019. Biocontrol potential of five Burkholderia and Pseudomonas strains against Colletotrichum truncatum infecting chilli pepper. *Biocontrol Science and Technology*, 29(8):727-745.
- [44] Gladkov G V, Kimeklis A K, Afonin A M, Lisina T O, Orlova O V, Aksenova T S, Kichko A A, Pinaev A G, Andronov E E, 2022. The Structure of Stable Cellulolytic Consortia Isolated from Natural Lignocellulosic Substrates. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(18):10779.
- [45] Erlacher A, Cardinale M, Grosch R, Grube M, Berg G, 2014. The impact of the pathogen *Rhizoctonia solani* and its beneficial counterpart *Bacillus amyloliquefaciens* on the indigenous lettuce microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 5: 175-183. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00175>.
- [46] Hausmann B, Knorr K H, Schreck K, Tringe S G, Glavina Del Rio T, Loy A, Pester M, 2016. Consortia of low-abundance bacteria drive sulfate reduction-dependent degradation of fermentation products in peat soil microcosms. *The ISME Journal*, 10(10):2365-2375.
- [47] Sizova M V, Panikov N S, Spiridonova E M, Slobodova N V, Tourova T P, 2007. Novel facultative anaerobic acidotolerant *Telmatospirillum siberiense* gen. nov. sp. nov. isolated from mesotrophic fen. *Systematic and Applied Microbiology*. 30(3):213-220.
- [48] Verastegui Y, Cheng J, Engel K, Kolczynski D, Mortimer S, Lavigne J, Montalibet J, Romantsov T, Hall M, McConkey BJ, Rose DR, Tomashek JJ, Scott BR, Charles TC, Neufeld JD, 2014. Multisubstrate isotope labeling and metagenomic analysis of active soil bacterial communities. *mBio*. 5(4): e01157-14.
- [49] Ghimire N, Han S R, Kim B, Park H, Lee J H, Oh T J, 2020. Comparative Genomic Study of Polar Lichen-Associated *Hymenobacter* sp. PAMC 26554 and *Hymenobacter* sp. PAMC 26628 Reveals the Presence of Polysaccharide-Degrading Ability Based on Habitat. *Current Microbiology*, 77(10): 2940-2952.
- [50] Kavamura V N, Hayat R, Clark I M, Rossmann M, Mendes R, Hirsch P R, Mauchline T H, 2018. Inorganic nitrogen application affects both taxonomical and predicted functional structure of wheat rhizosphere bacterial communities. *Frontiers in Microbiology*, 9:1074-1089.
- [51] Botha F C, Potgieter G P, Botha A M, 1992. Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *Plant Growth Regulation*, 11(3):211-224.
- [52] Layeghifard M, Hwang D M, Guttman D S, 2017. Disentangling interactions in the microbiome: a network perspective. *Trends in Microbiology*, 25:217–228.
- [53] 姚阳阳. 当归根际变形菌门促生菌的分离、筛选及促生抗逆效应研究[D]. 甘肃中医药大学,2022.
- [54] Ma, Z., Yi, Z H., Bayar, K., Fu Y M, Liu H, 2021. Community dynamics in rhizosphere microorganisms at different development stages of wheat growing in confined isolation environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 3843–3857.
- [55] Eichorst S A, Kuske C R, Schmidt T M. 2011, Influence of plant polymers on the distribution and cultivation of bacteria in the phylum Acidobacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 77(2): 586-596.
- [56] Krause A E, Frank K A, Mason D M, Ulanowicz R E, Taylor W W, 2003. Compartments revealed in food-web structure. *Nature* 426: 282–285.