



## 华北落叶松树皮表面细菌群落多样性及其分布格局

暴家兵<sup>1</sup>, 齐果萍<sup>2</sup>, 刘晋仙<sup>1</sup>, 罗正明<sup>3</sup>, 赵鹏宇<sup>1</sup>, 王雪<sup>1</sup>, 柴宝峰<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 山西大学黄土高原研究所, 黄土高原生态恢复山西省重点实验室, 山西 太原 030006

<sup>2</sup> 忻州市林木种苗站, 山西 忻州 034000

<sup>3</sup> 忻州师范学院, 山西 忻州 034000

**摘要:** 附生在树皮表面的微生物, 对于宿主植物的健康和环境适应性发挥重要作用, 树皮微生境中微生物群落结构和多样性及其维持机制有待关注。【目的】本文对庞泉沟自然保护区不同海拔梯度的华北落叶松树干的背阴面与向阳面的树皮表面细菌群落的分布特征和适应机制进行了研究。【方法】通过PCR-DGGE 和高通量测序技术研究细菌群落特征, 对树皮表面细菌群落的空间分布特征进行了非度量多维尺度(NMDS)排序分析, 通过冗余分析(RDA)研究细菌群落与树皮表面理化性质的关系, 单因素方差分析(One-way ANOVA)比较树皮背阴面与向阳面细菌群落组成, 基于零偏差分析研究背阴面与向阳面细菌群落构建的驱动因素。【结果】不同海拔梯度间的细菌群落结构有显著性差异(ANOSIM;  $P < 0.05$ ), 树皮表面的微环境因子 pH 和总碳(TC)与群落结构显著相关( $P < 0.05$ ); 向阳面树皮表面的光合自养型细菌(隶属于蓝细菌门的未命名的目)的相对丰度显著高于背阴面, 而根瘤菌目的相对丰度呈相反的趋势, 光照可能是引起细菌群落结构发生变化的驱动因子; 零偏差分析结果表明, 华北落叶松树皮背阴面、向阳面细菌群落的多样性格局主要受环境过滤的影响。【结论】环境因子主导的确定性过程是驱动该地区华北落叶松树皮表面细菌群落结构和多样性的主导因素。

**关键词:** 群落构建, 树皮表面, 细菌群落, 确定过程

陆地植物与各种各样的微生物相联系<sup>[1]</sup>, 无论是植物的内部还是表面, 都附着了数量众多的细菌、真菌以及病毒等微生物, 它们被统称为植物-微生物群落<sup>[2]</sup>。据估计, 地球上现有的树木达到

3.04 万亿棵<sup>[3]</sup>, 它们可能是微生物群落重要的聚集地, 同时由于树木的生命周期长, 为微生物的定植提供了稳定的基质和生境<sup>[4]</sup>。附着在植物表面的微生物群落种类丰富, 具有重要的生态学意义<sup>[5]</sup>。

基金项目: 国家自然科学基金(31772450, 31801962); 忻州师范学院专题研究(ZT201506)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-351-7010700; E-mail: bfchai@sxu.edu.cn

收稿日期: 2019-03-18; 修回日期: 2019-05-14; 网络出版日期: 2019-10-17

细菌可以提高宿主植物的解毒、抗应激及固氮等能力<sup>[4]</sup>;蓝细菌可以通过光合作用对森林生态系统作出贡献<sup>[6]</sup>。微生物群落对宿主植物的作用在环境微生物和生物技术领域受到了广泛的关注<sup>[7-8]</sup>。目前大部分研究主要针对一些重要经济作物上的微生物,相比之下,对森林植物-微生物群落的研究较少<sup>[4]</sup>。

山地生态系统海拔梯度差异较大,可以在较短的地理距离内出现气候和生物特征的显著变化<sup>[9]</sup>。微生物群落组成、结构以及多样性会随着环境梯度发生变化<sup>[10]</sup>。树皮向阳面光照相对强烈,强烈的光照伴随着高温,这两种生态因子已经被证明是影响群落结构的关键因子<sup>[11]</sup>。土壤中的总碳(TC)和总氮(TN)是造成群落多样性差异的重要驱动因素<sup>[12]</sup>,pH 通过影响营养物质的可利用性来影响微生物群落<sup>[13]</sup>。光照强度通过影响生物的代谢活性和生活习性影响其分布<sup>[14]</sup>。但是,对于树皮表面微生物群落的分布格局及多样性的驱动机制还有待研究。

近来有研究表明,植物表面作为一个“开放”的生境,与其附近空气之间存在着丰富的微生物群落“交换”,对周围空气中的微生物群落组成有很大影响<sup>[15]</sup>。微生物群落可以选择性地富集在树皮表面,进而形成特定的微生物群落结构<sup>[4]</sup>。然而,对于驱动其群落构建因素的认识仍然比较缺乏。另一方面,由于树木的生长受许多环境因素的影响<sup>[16]</sup>,而对于定植在树皮表面的微生物是如何与宿主植物相互作用的研究还较少。本研究以山西省庞泉沟自然保护区的华北落叶松树皮表面的细菌群落为研究对象,利用 PCR-DGGE 和高通量测序技术,探讨树皮微生物群落对微生境因子、海拔和光照的响应机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究区自然概况

庞泉沟自然保护区位于山西吕梁山脉中段(111°22′–11°33′ E, 37°45′–37°55′ N),最低海拔 1500 m,主峰云顶山最高海拔 2831 m。该区为中温带至暖温带的过渡地带,年平均气温 4.3 °C,相对湿度为 70%,年平均降水为 820 mm 左右。主要保护对象为世界珍禽褐马鸡(*Crossoptilon mantchuricum*)及其栖息生境华北落叶松(*Larix principis-rupprechtii*)、云杉(*Picea*)等组成的混交林<sup>[17]</sup>。华北落叶松在该地区主要分布于海拔 1650 m 以上的地带。

### 1.2 样本采集与处理

所有样品均采集于 2016 年 7 月。分别在 4 个海拔(2400、2200、2100、2000 m)梯度的 20 m×30 m 的 4 个样地中,确定华北落叶松的径级范围(利用空间替代时间,用径级结构代替树龄结构<sup>[18]</sup>)及株数,选取株数最多的径级作为该海拔华北落叶松种群的年龄结构,并选取 3 棵作为重复。根据树皮表面光照强度的不同,将树皮表面的生境分为背阴面和向阳面。用无菌镊子采集附有苔藓的树皮样品,共采集了 24 个样品,放入无菌塑料袋内,将采集的样品放入冰盒保存,尽快带回实验室,于–20 °C 保存。用灭菌小刀去除树皮表面肉眼可见的苔藓植物,采集的每个样品分为两份,一份用于理化性质的测定,另一部分–80 °C 保存,或直接提取树皮表面微生物群落基因组 DNA,用于 PCR-DGGE 和高通量测序分析。

### 1.3 样品分析

**1.3.1 理化因子的测定:**将采集的部分样品烘干,用于理化因子的测定。树皮表面的 pH 参考 Watson

等的方法进行测量<sup>[19]</sup>, 树皮表面微生物的总碳(TC)、总氮(TN)含量的测定参照张慧东的研究方法<sup>[20]</sup>。测定前, 将树皮放入 85 °C 的恒温箱中烘至恒重, 然后将其粉碎, 使用元素分析仪(vario MACRO cube, Germany)进行测定。

**1.3.2 不同海拔梯度华北落叶松树皮表面微生物基因组 DNA 提取与 PCR 扩增:** 将同一海拔同棵树的阴阳面样品混合, 每个海拔 3 个重复, 4 个海拔共 12 个样品。样品的前期预处理: 称取 0.5 g 树皮, 将其浸泡于 50 mL 无菌 PBS 溶液中, 180 r/min 振荡 20 min, 取出树皮, 再次加入无菌 PBS 溶液, 180 r/min 振荡 20 min, 再次取出树皮, 加入无菌 PBS 溶液, 超声波洗涤 10 min, 最后取出树皮, 将 3 次洗涤液汇总, 过 0.2  $\mu$ m 滤膜。将滤膜用无菌镊子剪碎, 加入 5 mL 提取液<sup>[21]</sup>, 参照逄卫国<sup>[21]</sup>的方法提取微生物群落总 DNA, 然后扩增 16S rDNA 基因 V3 高变区片段, 采用含 GC 夹的正向引物 341F (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和反向引物 534R (5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3')进行 PCR 扩增。PCR 采用 25  $\mu$ L 反应体系: 2.5  $\mu$ L 10 $\times$ EasyTaq 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 100 mmol/L KCl, 50%甘油); 2  $\mu$ L 2.5 mmol/L dNTPs; 引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L; 1  $\mu$ L DNA (2 ng 左右); 0.25 U Taq 酶(500 U); 灭菌双蒸水补足至 25  $\mu$ L。PCR 条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 65.5 °C 20 s, 72 °C 20 s, 30 循环; 72 °C 7 min, 10 °C 保存。

**1.3.3 变性梯度凝胶电泳:** 采用质量分数为 10% 的聚丙烯酰胺凝胶作为变性剂, 变性胶的梯度范围为 47%–62%, 实验条件: 60 °C, 60 V, 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液中, 电泳 12 h, 然后对变性胶进行染色, 照相保存 DGGE 条带图谱, 用 Quantity One

软件对 DGGE 条带图谱进行分析<sup>[22]</sup>。DGGE 条带代表物种, 得出每条条带的相对光密度值, 作为每个物种的相对丰度, 进而分析微生物群落的结构特征。

**1.3.4 华北落叶松树皮背阴面与向阳面细菌群落的高通量测序分析:** 将同一海拔阴面的 3 个重复样品混合为一个样品, 阳面的 3 个重复样品混合为一个样品, 作为每个海拔的阴面和阳面样品, 将 4 个海拔高度的样品看作重复, 对这 8 个样品进行高通量测序。前期预处理方法同上, 将滤膜送往上海美吉生物医药科技有限公司进行高通量测序。通过 Illumina Hiseq 测序平台, 利用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对 16S rDNA V3–V4 区进行测序。

## 1.4 数据分析

不同树皮表面的理化因子的差异性分析, 用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差(One-way ANOVA)分析, 对理化数据进行了  $\log_{10}(x)$  转化, 然后进行方差同质性检验( $P$  值大于 0.05, 表明方差齐性)。因此, 选择 LSD 进行事后的多重比较。高通量测序结果中的物种数据, 首先根据最小样本序列数进行抽平, 在分析过程中, 对其进行了 Hellinger 转化。用 R 软件(V3.4.2)对群落结构进行非度量多维尺度(NMDS)分析以及 UPGMA 聚类分析, 两者均是基于 vegan 程序包中 vegdist 函数计算出不同细菌群落之间 Bray-Curtis 距离。

通过 R 软件(V3.4.2)中 glm 函数分析群落相异性与地理距离之间的关系。群落相异性作为响应变量, 地理距离作为解释变量。由于响应变量服从正态分布。因此, 采用“identity”连接函数来对地理距离和群落相异性的关系进行估算。在 R 软

件中对所有理化因子进行了膨胀因子筛选(vegan 程序包), 消除了共线性高的理化因子, 然后通过前选择筛选出对群落结构有显著影响的理化因子, 与物种丰度进行冗余分析(RDA); 背阴面、向阳面细菌群落结构与环境因子的相关性使用 Mantel 检验, 通过 R 软件(V3.4.2)中程序包 vegan 进行分析; 零模型分析采用 Chase 和 Myers 的方法<sup>[23]</sup>, 通过基于 Bray-Curtis 距离( $\beta$  多样性)的零模型值定量分析群落构建的驱动因素, 零偏差值越接近零, 表明随机过程在群落构建中占主导作用越大, 而较大的正或负零偏差值, 表明确定过程的作用更大<sup>[24]</sup>。为了将细菌群落与其可能的功能联系起来, 利用 PICRUST 基于 KEGG 数据库预测细菌在多样地的潜在功能<sup>[25]</sup>, 进而比较不同样地间 KEGG 通路 3 水平代谢功能的相对丰度, 在 SPSS 25.0 中进行单因素方差分析比较(置信区间为  $P<0.05$ ), 进而通过 Sigmaplot14.0 将其结果可视化。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同海拔梯度华北落叶松树皮表面细菌群落的结构及其驱动因子

#### 2.1.1 不同海拔树皮表面的理化因子: 对沿海拔

梯度华北落叶松的胸径(DBH)及其树皮表面的理化性质分析结果显示(表 1), 树皮表面 pH 和 DBH 沿海拔梯度均有显著差异( $P<0.05$ )。高海拔样地(E2400)的 pH 值最高(5.350), 低海拔(E2000)样地的 pH 值最低(4.245)。说明树皮表面的理化性质沿海拔梯度形成了一定的生态梯度。

**2.1.2 不同海拔梯度下华北落叶松树皮表面的细菌群落结构:** 为了实验的重复性, 每个海拔在相同的电泳条件下重复了 3 次, 对沿海拔梯度各样地树皮表面细菌进行 DGGE 分析, 结果如图 1-A 所示, 不同条带代表不同细菌类群, 各个样品经过变性梯度凝胶电泳都可以分离出数目不等的电泳条带。

利用 DGGE 条带图谱分析各样地的细菌群落组成(图 1-B), 结果显示, 不同海拔树皮表面的细菌群落中共有 25 个优势类群(相对丰富度 $>0.01$ ), 其中, 低海拔优势类群有 18 个, 高海拔(E2400)的优势类群有 20 个。各样地细菌群落优势类群的组成差异明显, B16 和 B3 在 E2000 具有较高的相对丰度(0.129、0.117), B15 在 E2100 具有较高的相对丰度(0.197), B15 和 B11 在 E2200 具有较高的相对丰度(0.190、0.157), B15 和 B20 在 E2400 具有较高的相对丰度(0.139、0.108)。

表 1. 胸径和树皮表面的环境因子

Table 1. DBH and environmental factors of bark surface

Environmental factors	E2400	E2200	E2100	E2000
TN/%	0.015 $\pm$ 0.002a	0.014 $\pm$ 0.003a	0.014 $\pm$ 0.003a	0.022 $\pm$ 0.014a
TC/%	1.077 $\pm$ 0.144a	1.189 $\pm$ 0.031a	1.179 $\pm$ 0.063a	1.183 $\pm$ 0.036a
C/N	75.794 $\pm$ 17.351a	83.685 $\pm$ 14.263a	85.844 $\pm$ 18.205a	65.940 $\pm$ 29.893a
pH	5.350 $\pm$ 0.198a	4.927 $\pm$ 0.026b	4.918 $\pm$ 0.279b	4.245 $\pm$ 0.139c
DBH/cm	26.348 $\pm$ 0.358a	24.735 $\pm$ 3.093ab	21.529 $\pm$ 0.844bc	20.860 $\pm$ 2.817c

Data in the table are mean $\pm$ standard deviation. Different lowercase letters within rows indicate significant difference at  $P<0.05$  level. The same as below.

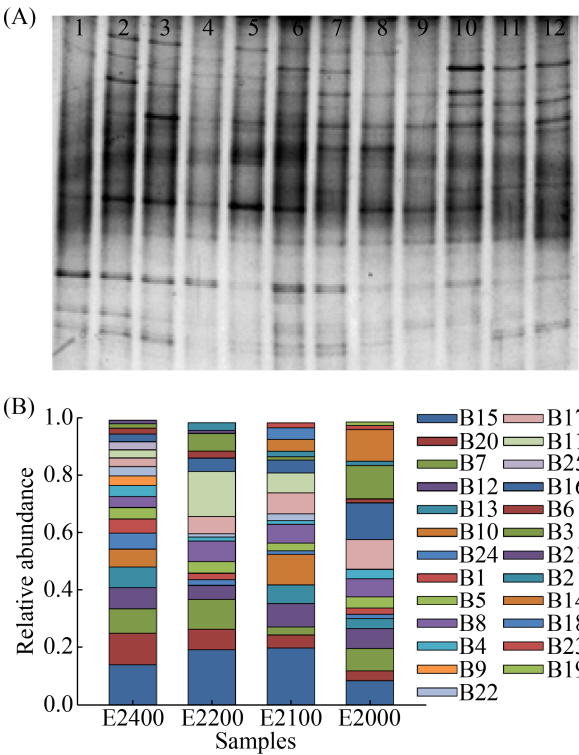


图 1. 各样地 DGGE 电泳图谱与细菌群落组成  
Figure 1. DGGE electrophoregram and composition of the bacterial community in each sample site. A: From left to right, samples are added in the order; lanes 1–3 are sample E2000, lanes 4–6 are sample E2100, lanes 7–9 are sample E2200, and lanes 10–12 are sample E2400. B: The letter B is short for band, and the following number represented the different bacterial groups. Relative abundance>0.01.

通过 NMDS 分析各样地群落结构的相异性(图 2-A), 结果表明细菌群落结构沿海拔梯度具有显著性差异(ANOSIM;  $P<0.05$ ); 基于 Bray-Curtis 距离进行聚类分析(图 2-B), 结果显示 E2000 与 E2400、E2200 和 E2100 三个海拔高度间的细菌群落结构差异较大, 而 E2200 与 E2100 之间群落结构差异较小。由此可见, 海拔高度对树皮表面细菌群落结构产生了一定的影响。

2.1.3 不同海拔树皮表面细菌群落结构的驱动因子: 利用广义线性模型分析细菌群落相异性与地

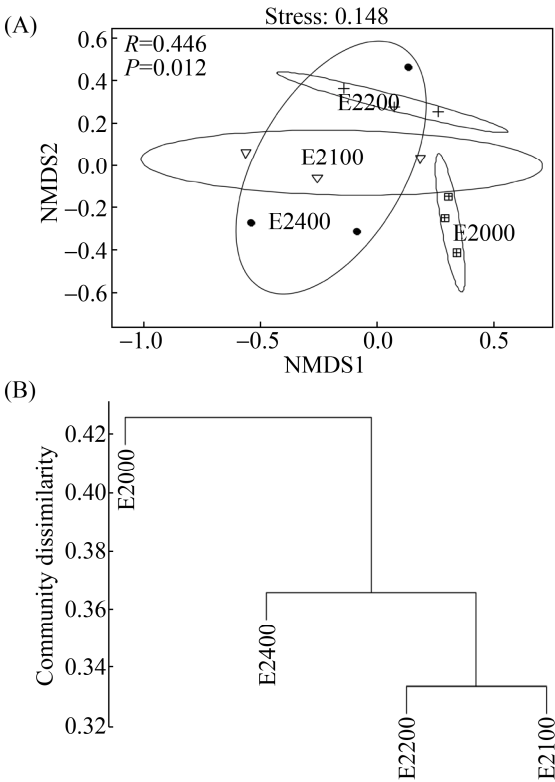


图 2. 不同海拔树皮表面细菌群落结构比较  
Figure 2. Comparison of the bacterial community structure on bark surface at different altitudes. A: Analysis of nonmetric multidimensional scaling (NMDS); B: Analysis of UPGMA clustering based on Bray-Curtis.

理距离的关系(表 2 和图 3), 结果显示地理距离并没有对细菌群落结构产生显著的影响。说明扩散限制对该条件下的细菌群落结构几乎没有产生影响。

通过冗余分析方法分析不同海拔高度的环境因子对树皮表面细菌群落结构的影响(图 4), 结果表明 RDA 前两轴的累积贡献率为 29.0%, 其中第

表 2. 广义线性模型中参数统计  
Table 2. Parameter statistics in the generalized linear model

Intercept	<i>P</i>	Slope	<i>P</i>
0.518	0.43	-1.000	0.217

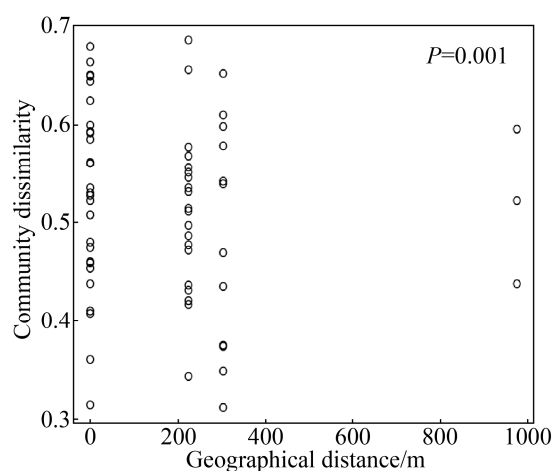


图 3. 细菌群落相异性与地理距离的关系图

Figure 3. Relationship between the community dissimilarity and geographical distance.

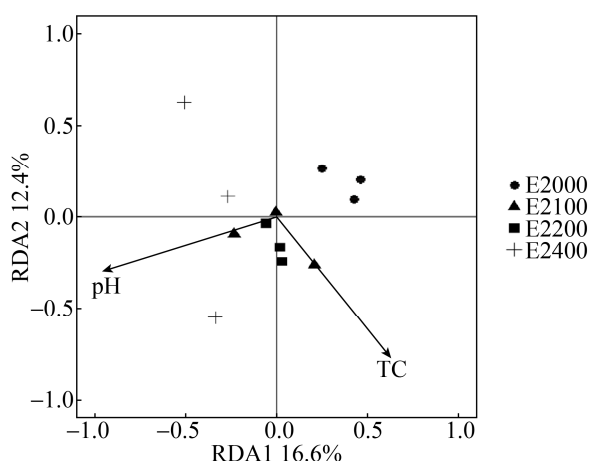


图 4. 细菌群落与环境因子的冗余分析

Figure 4. Redundancy analysis of the bacterial community and environmental factors.

一主轴的解释率为 16.6%，第二主轴解释率为 12.4%。第一轴主要反映的是 pH 对群落结构的影响，第二轴主要反映了 TC 对群落结构的影响。因此，TC 和 pH 可能是不同海拔华北落叶松树皮表面细菌群落构建的主要驱动因子( $P < 0.05$ )。

## 2.2 华北落叶松树皮背阴面与向阳面细菌群落结构及其驱动因子

### 2.2.1 背阴面与向阳面树皮表面的理化性质：背

阴、向阳面的树皮表面理化性质分析结果表明，TN、TC 和 C/N 含量均表现出向阳面高于背阴面的趋势。研究区的华北落叶松树皮表面微生物呈酸性，且向阳面酸性强于背阴面(表 3)。

### 2.2.2 背阴面、向阳面树皮表面细菌群落的组成：

利用 Illumina 高通量测序方法分析树皮表面背阴面与向阳面细菌群落的结构和多样性，测得各样地 16S 序列数共 317763 条，总碱基数为 137142065 bp，平均长度为 432 bp。稀释曲线(图 5)显示，随着测序量的不断增加，曲线趋于平缓，说明本次实验的测序量达到饱和，同时也表明该测序能够反映本次实验中阴面与阳面树皮表面细菌群落的真实情况。

表 3. 树皮表面背阴面与向阳面环境因子

Table 3. Environmental factors on sunny and shady of the bark

Environmental factors	Sunny	Shady
TN/%	0.016±0.005a	0.014±0.003a
TC/%	1.238±0.099a	1.174±0.084a
C/N	84.10±22.12a	83.90±16.98a
pH	4.598±0.306a	5.185±0.718a

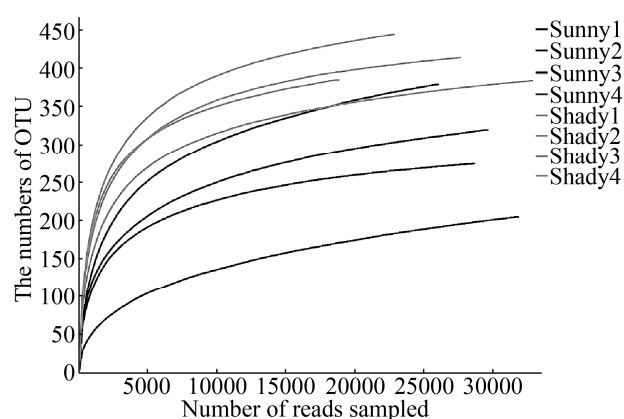


图 5. 树皮背阴面与向阳面细菌群落 OTU 稀释曲线

Figure 5. Rarefaction curves for the OTU numbers of bacterial community on shady and sunny surface of bark. 1–4 represent repetition.

高通量分析结果(图 6-A)显示,华北落叶松树皮的背阴面与向阳面共有的优势细菌目(相对丰度>0.01)为 11 个,包括假单胞菌目(*Pseudomonadales*)、隶属于蓝细菌门的未命名的目(*norank\_Cyanobacteria*)、鞘脂杆菌目(*Sphingobacteriales*)、红螺菌目(*Rhodospirillales*)、鞘脂单胞菌目(*Sphingomonadales*)、根瘤菌目(*Rhizobiales*)、伯克氏菌目(*Burkholderiales*)、酸杆菌目(*Acidobacteriales*)、微球菌目(*Micrococcales*)、柄杆菌目(*Caulobacteriales*)和弗兰克氏菌目(*Frankiales*)。单因素方差分析

(One-way ANOVA)结果表明,向阳面树皮表面隶属于蓝细菌门的未命名的目显著性高于背阴面,而根瘤菌目的变化趋势相反。树皮向阳面与背阴面共有优势细菌属为 12 个,单因素方差分析(One-way ANOVA)结果表明,向阳面隶属于蓝细菌门的未命名的属(*norank\_Cyanobacteria*)显著性高于背阴面,其余均没有显著性差异。综上所述,背阴面和向阳面的微生物群落组成存在一定的差异,光照可能是驱动树皮表面细菌群落结构的主要因子之一。

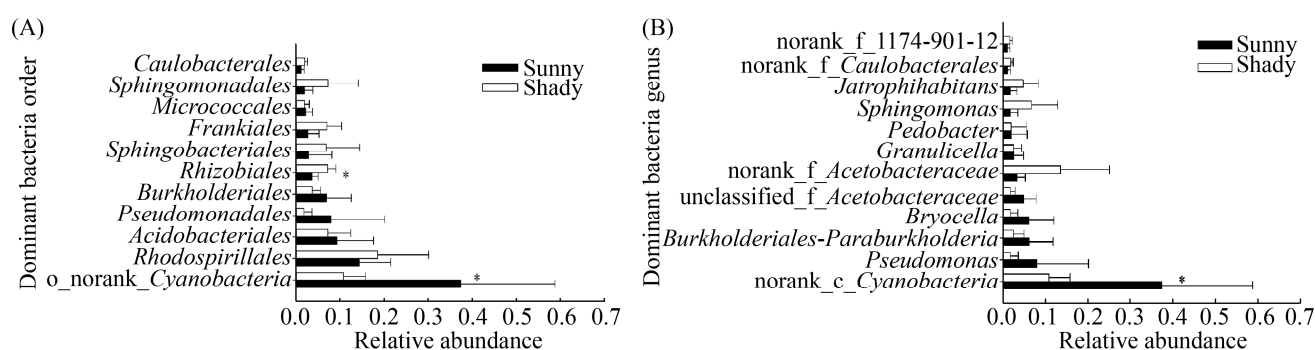


图 6. 背阴面与向阳面细菌群落组成

Figure 6. Composition of the bacterial community on the sunny and shady surface of bark. A: dominant order; B: dominant genus.

**2.2.3 背阴面、向阳面树皮表面细菌群落结构的驱动因子:** ANOSIM 分析结果显示,华北落叶松树皮背阴面与向阳面的细菌群落结构有显著性差异( $P<0.05$ )(图 7)。Mantel 检验方法分析树皮微生境因子 TC、TN、pH 和 C/N 对细菌群落结构的影响,结果显示,细菌群落结构与树皮微生境中的 TC、TN、pH 以及 C/N 均没有显著相关性( $P>0.05$ )(表 4)。因此,造成阴阳面细菌群落结构差异的主要原因很可能是光照强度。

基于 Bray-Curtis 距离的零模型分析结果表明,背阴面和向阳面零偏差值均为负值,且偏离零较远(图 8),说明环境过滤是导致背阴面与向阳面细菌群落结构差异的主要原因。

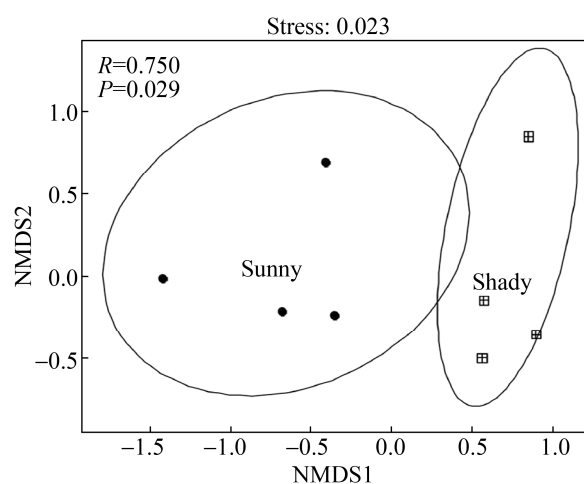


图 7. 树皮背阴面和向阳面的细菌群落结构格局

Figure 7. The patterns of bacterial community structure on the sunny and shady surface of bark.



表 4. 背阴面与向阳面细菌群落结构与环境因子的 Mantel 检验

Table 4. Mantel test of the bacterial community structure and environmental factors on the sunny and shady

Factors	Mantel test	
	<i>R</i>	<i>P</i> -value
Environmental factors	0.007	0.45

*R* indicated the correlation coefficient between the structure of the bacterial community and environmental factors.

**2.2.4 背阴面、向阳面细菌群落的功能预测：用 PICRUST 对不同组细菌群落的代谢潜力进行了分析(图 9), 计算不同组间 KEGG 通路相对丰度的平均值。背阴面(Shady)与向阳面(Sunny)之间的代谢**

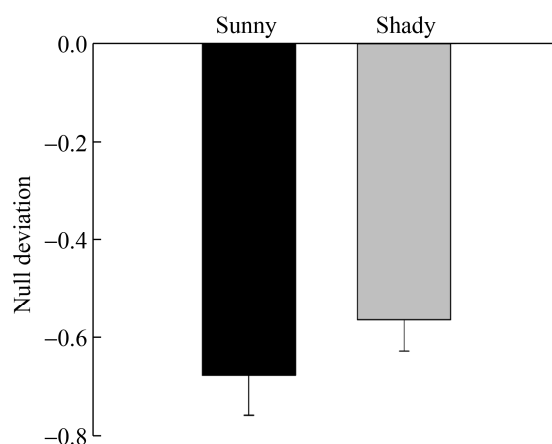


图 8. 不同光照强度下细菌群落的零偏差分析  
Figure 8. Null-deviation analysis of the bacterial community under different light intensity.

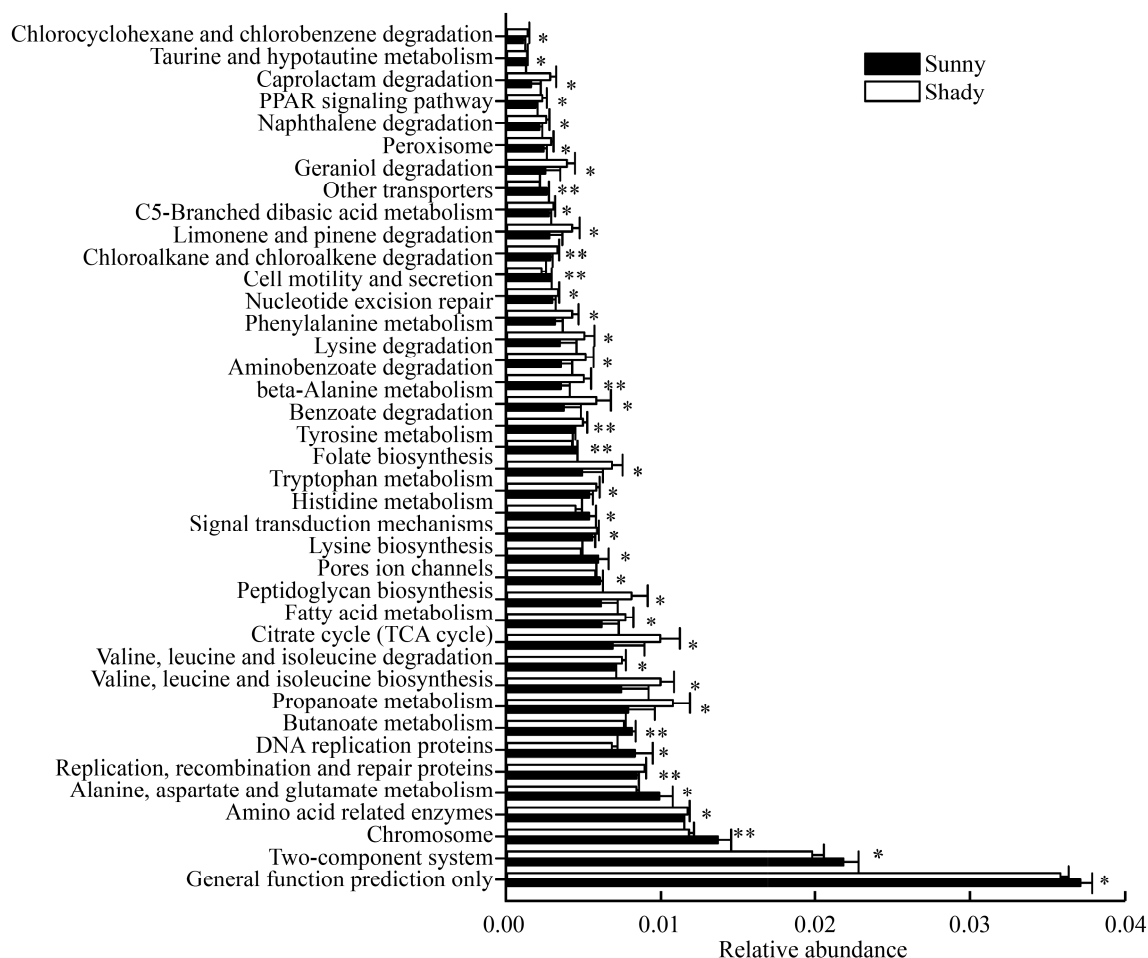


图 9. 不同分组细菌群落的功能预测

Figure 9. The predictive function of bacteria associated with different sample groups. The predicted functional analysis of the bacteria associated with groups of the sunny and shady by PICRUST based on the level 3 analysis of KEGG pathway. Relative abundance>0.001. The significant between groups were used One-way ANOVA. \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ .



途径的差异大多不显著,在检测到的 280 条 KEGG 3 级通路中,只有 61 条具有显著性差异( $P<0.05$ ),其中相对丰度 $>0.001$  的功能类群如图 9 所示。总体而言,阴面细菌群落代谢潜力的活性高于阳面,如氨基酸代谢等;而肽聚糖的生物合成等则呈相反的趋势。

### 3 讨论

#### 3.1 不同海拔梯度下树皮表面的细菌群落构建机制

环境筛选和扩散限制对群落结构和多样性维持的相对重要性一直是生态学的研究热点<sup>[26]</sup>。目前对不同植物和动物类群的研究较多,对影响微生物群落构建及其分布的研究相对不足。有研究表明,云杉树皮表面的基质质量会随着树龄的变化而变化,进而影响其附生植物的多样性组成<sup>[27]</sup>。本研究结果显示,不同海拔梯度下华北落叶松树皮表面微环境因子差异较大(表 1)。低海拔华北落叶松树龄较低,这可能与人类砍伐等活动有关。理化因子的变化对微生物群落的构建影响显著<sup>[11]</sup>。虽然各海拔之间的 TC 含量在统计学上没有显著性差异,但是 TC 含量在各海拔之间仍然具有一定的差异,对微生物群落结构的影响也是不同的。许多文章中都有类似结果,如 Ren 等<sup>[28]</sup>研究退耕还林后土壤碳氮磷化学计量比与细菌群落多样性的关系。RDA 结果显示,土壤理化因子中 pH 和粘土含量是土壤微生物群落结构的影响因子,但是在不同土地利用类型中 pH 和粘土含量均没有显著性差异。

pH 在之前的研究中被认为是造成微生物群落结构和功能差异的决定因子<sup>[29-30]</sup>。TC 作为微生物的碳源和主要能量来源,对微生物群落结构具有重要影响<sup>[31]</sup>。本研究结果表明,在树皮这一特殊微生

境中,理化因子同样是驱动细菌群落构建的主导因素。一些研究发现地理距离只有达到数百公里以上,细菌群落才会有显著的距离衰减的分布格局<sup>[32-33]</sup>,对于树洞生态系统也是如此<sup>[34]</sup>。在本研究中树皮表面的微生物群落没有随地理距离的增加呈现显著的衰减模式,说明扩散限制对其影响较小,但是距离的变化最终引起了环境因子的改变(表 1),因此地理距离对细菌群落结构的影响是间接的。造成不同海拔梯度树皮表面细菌群落多样性格局的主导因素是环境因子。

#### 3.2 华北落叶松背阴面、向阳面树皮表面的细菌群落构建机制

之前的研究发现,光照强度可以引起土壤中养分和微生物群落组成和结构的改变<sup>[35]</sup>。由于向阳面树皮表面有较高的温度和光强,因此一些光能自养型微生物会显著增加(隶属于蓝细菌门的未命名的目和隶属于蓝细菌门的未命名的属),说明光照对树皮表面的细菌群落有一定的影响<sup>[34]</sup>。树皮背阴面和向阳面细菌群落的  $\beta$ -多样性有显著性差异(图 7),已测的理化因子与细菌群落结构多样性之间没有显著的相关性(表 4;  $P>0.05$ ),因此我们推测,这种差异性可能是光照强度的不同导致的。零模型分析结果也表明环境选择驱动了背阴面和向阳面细菌群落结构的差异性变化(图 8)。

#### 3.3 背阴面、向阳面树皮表面细菌群落的代谢潜力

PICRUSt 的预测结果显示,背阴面与向阳面细菌群落的代谢潜力有明显差异,特别是氨基酸代谢,以及一些物质如苯甲酸等的降解。隶属于变形菌门的  $\alpha$ -变形菌纲和  $\beta$ -变形菌纲是主要的细菌类群,其目水平组成包括根瘤菌目、鞘脂单胞菌目和伯克氏菌目(图 6-A)。鞘脂单胞菌目可

能会通过产生促生长激素来促进宿主植物的生长,其潜在的功能包括氮同化、磷酸盐增溶和氧化应激反应<sup>[4]</sup>;根瘤菌目对于潜在的共生宿主的生长发育发挥一定的作用,除了众所周知的与植物的固氮共生<sup>[36]</sup>外,还可为宿主提供特定的次生代谢产物和促进营养循环<sup>[37–38]</sup>。蓝藻细菌是地球上广泛存在的一种微生物,能够进行产氧的光合作用,这一特征使其成为了主要的自养微生物<sup>[39]</sup>;同时,与树皮共生的蓝藻细菌,可以通过光合作用释放特异的蛋白质信号分子来调控植物的生长和发育<sup>[40]</sup>。伯克氏菌目的细菌类群具有固氮和降解芳香族化合物的功能<sup>[41]</sup>,近年来被认定是有益的微生物群落,但也是潜在的致病性微生物<sup>[42]</sup>;伯克氏菌目和假单胞菌目已经被证明对某些细菌和真菌病原体具有高效的拮抗作用<sup>[43–44]</sup>,因此,该细菌在病原菌的防御以及维持细菌群落稳定方面具有重要作用<sup>[4]</sup>。但是,对于它们是否增强了宿主植物的抗病力还有待进一步研究。综上所述,树皮表面的微生物群落可能与植物生长以及抵抗力的强弱有关<sup>[45]</sup>,因此研究树皮表面的微生物群落多样性和适应机制具有重要的生态学意义。

## 4 结论

TC 和 pH 是不同海拔高度华北落叶松树皮表面细菌群落结构的主要驱动因子;树皮背阴面与向阳面的细菌群落结构与树皮微生境中的 TC、TN、pH 以及 C/N 均没有显著相关性,造成背阴面与向阳面细菌群落结构差异的主要原因很可能是光照强度。总之,环境筛选是华北落叶松树皮表面微生物群落结构和多样性的主要驱动力。

## 参考文献

- [1] Kovalchuk A, Mukrimin M, Zeng Z, Raffaello T, Liu MX, Kasanen R, Sun H, Asiegbu FO. Mycobiome analysis of asymptomatic and symptomatic Norway spruce trees naturally infected by the conifer pathogens *Heterobasidion* spp.. *Environmental Microbiology Reports*, 2018, 10(5): 532–541.
- [2] Turner TR, James EK, Poole PS. The plant microbiome. *Genome Biology*, 2013, 14(6): 209.
- [3] Crowther TW, Glick HB, Covey KR, Bettigole C, Maynard DS, Thomas SM, Smith JR, Hintler G, Duguid MC, Amatulli G, Tuanmu MN, Jetz W, Salas C, Stam C, Piotta D, Tavani R, Green S, Bruce G, Williams SJ, Wiser SK, Huber MO, Hengeveld GM, Nabuurs GJ, Tikhonova E, Borchardt P, Li CF, Powrie LW, Fischer M, Hemp A, Homeier J, Cho P, Vibrans AC, Umunay PM, Piao SL, Rowe CW, Ashton MS, Crane PR, Bradford MA. Mapping tree density at a global scale. *Nature*, 2015, 525(7568): 201–205.
- [4] Aschenbrenner IA, Cernava T, Erlacher A, Berg G, Grube M. Differential sharing and distinct co-occurrence networks among spatially close bacterial microbiota of bark, mosses and lichens. *Molecular Ecology*, 2017, 26(10): 2826–2838.
- [5] Maignien L, DeForce EA, Chafee ME, Eren AM, Simmons SL. Ecological succession and stochastic variation in the assembly of *Arabidopsis thaliana* phyllosphere communities. *mBio*, 2014, 5(1): e00682-13.
- [6] Lindo Z, Whiteley JA. Old trees contribute bio-available nitrogen through canopy bryophytes. *Plant and Soil*, 2011, 342(1/2): 141–148.
- [7] Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, 2007, 176(1): 22–36.
- [8] Berg G, Grube M, Schloter M, Smalla K. Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 148.
- [9] Siles JA, Margesin R. Abundance and diversity of bacterial, archaeal, and fungal communities along an altitudinal gradient in alpine forest soils: what are the driving factors? *Microbial Ecology*, 2016, 72(1): 207–220.
- [10] Bier RL, Voss KA, Bernhardt ES. Bacterial community responses to a gradient of alkaline mountaintop mine drainage in Central Appalachian streams. *The ISME Journal*, 2015, 9(6): 1378–1390.
- [11] Cao R, Wu FZ, Yang WQ, Xu ZF, Tan B, Wang B, Li J, Chang CH. Effects of altitudes on soil microbial biomass and

- enzyme activity in alpine-gorge regions. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2016, 27(4): 1257–1264. (in Chinese)
- 曹瑞, 吴福忠, 杨万勤, 徐振锋, 谭波, 王滨, 李俊, 常晨晖. 海拔对高山峡谷区土壤微生物生物量和酶活性的影响. *应用生态学报*, 2016, 27(4): 1257–1264.
- [12] Shanmugam SG, Magbanua ZV, Williams MA, Jangid K, Whitman WB, Peterson DG, Kingery WL. Bacterial diversity patterns differ in soils developing in sub-tropical and cool-temperate ecosystems. *Microbial Ecology*, 2017, 73(3): 556–569.
- [13] Lozupone CA, Knight R. Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(27): 11436–11440.
- [14] Wei ZZ, Zhao W. Effect of light intensity on the growth and digestive enzyme activity of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* under two kinds of culture methods. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(1): 237–242. (in Chinese)
- 魏子仲, 赵文. 光照强度对不同养殖方式下刺参幼参生长和消化酶活性的影响. *应用生态学报*, 2014, 25(1): 237–242.
- [15] Lymperopoulou DS, Adams RI, Lindow SE. Contribution of vegetation to the microbial composition of nearby outdoor air. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(13): 3822–3833.
- [16] Altman J, Fibich P, Santruckova H, Dolezal J, Stepanek P, Kopacek J, Hunova I, Oulehle F, Tumajer J, Cienciala E. Environmental factors exert strong control over the climate-growth relationships of *Picea abies* in Central Europe. *Science of the Total Environment*, 2017, 609: 506–516.
- [17] Xu Q, Bi RC, Zhang QD, Miao YM, Qin J, Liu XN. Dynamic patterns of species diversity in gaps of *Larix principis-rupprechtii* plantation in Pangquangou in Shanxi Province, China. *Chinese Journal of Ecology*, 2014, 33(11): 2913–2920. (in Chinese)
- 许强, 毕润成, 张钦弟, 苗艳明, 秦晋, 刘晓宁. 山西庞泉沟华北落叶松林林窗物种多样性动态变化. *生态学杂志*, 2014, 33(11): 2913–2920.
- [18] Zhang QD, Zhang JT, Suriguga, Zhang B, Cheng JJ. Life table and spectral analysis of *Larix principis-rupprechtii* populations in the Pangquangou Nature Reserve. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2010, 16(1): 1–6. (in Chinese)
- 张钦弟, 张金屯, 苏日古嘎, 张斌, 程佳佳. 庞泉沟自然保护区华北落叶松种群生命表与谱分析. *应用与环境生物学*, 2010, 16(1): 1–6.
- [19] Watson MF, Hawksworth DL, Rose F. Lichens on elms in the British Isles and the effect of Dutch Elm Disease on their status. *The Lichenologist*, 1988, 20(4): 327–352.
- [20] 张慧东. 兴安落叶松林生态系统关键生态过程碳氮分配及其耦合特征研究. 内蒙古农业大学博士学位论文, 2017.
- [21] Ti WG. Research on method of extracting DNA from different parts of grape. *Journal of Shanxi Teacher's University (Natural Science Edition)*, 2002, 16(1): 63–65. (in Chinese)
- 逄卫国. 葡萄不同部位提取DNA的方法研究. *山西师范大学学报(自然科学版)*, 2002, 16(1): 63–65.
- [22] Ma ZZ, Qiao SS, Cao MW, Zhou YN, Liu JX, Jia T, Li C, Chai BF. Environmental selection and dispersal limitation drive the assemblage of bacterial community in temperate forest soils. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, 29(4): 1179–1189. (in Chinese)
- 马转转, 乔沙沙, 曹苗文, 周永娜, 刘晋仙, 贾彤, 李鑫, 柴宝峰. 环境选择和扩散限制驱动温带森林土壤细菌群落的构建. *应用生态学报*, 2018, 29(4): 1179–1189.
- [23] Chase JM, Myers JA. Disentangling the importance of ecological niches from stochastic processes across scales. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2011, 366(1576): 2351–2363.
- [24] Zhao PY, Li C, Chai BF. Environmental filters drive the assembly of the soil fungal community in the *Larix principis-rupprechtii* forests of the Guandi Mountains. *Environmental Science*, 2018, 39(8): 3876–3884. (in Chinese)
- 赵鹏宇, 李鑫, 柴宝峰. 生境过滤驱动庞泉沟华北落叶松林土壤真菌群落的构建过程. *环境科学*, 2018, 39(8): 3876–3884.
- [25] Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepille DE, Vega Thurber RL, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 814–821.
- [26] Bissett A, Richardson AE, Baker G, Wakelin S, Thrall PH. Life history determines biogeographical patterns of soil bacterial communities over multiple spatial scales. *Molecular Ecology*, 2010, 19(19): 4315–4327.
- [27] Marmor L, Tõrra T, Saag L, Randlane T. Effects of forest continuity and tree age on epiphytic lichen biota in coniferous forests in Estonia. *Ecological Indicators*, 2011, 11(5): 1270–1276.

- [28] Ren CJ, Zhao FZ, Kang D, Yang GH, Han XH, Tong XG, Feng YZ, Ren GX. Linkages of C:N:P stoichiometry and bacterial community in soil following afforestation of former farmland. *Forest Ecology and Management*, 2016, 376: 59–66.
- [29] Fierer N, Jackson RB. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(3): 626–631.
- [30] Wakelin SA, Macdonald LM, Rogers SL, Gregg AL, Bolger TP, Baldock JA. Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(3): 803–813.
- [31] Tian J, McCormack L, Wang JY, Guo DL, Wang QF, Zhang XY, Yu GR, Blagodatskaya E, Kuzyakov Y. Linkages between the soil organic matter fractions and the microbial metabolic functional diversity within a broad-leaved Korean pine forest. *European Journal of Soil Biology*, 2015, 66: 57–64.
- [32] Whitaker RJ, Grogan DW, Taylor JW. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science*, 2003, 301(5635): 976–978.
- [33] Green JL, Holmes AJ, Westoby M, Oliver I, Briscoe D, Dangerfield M, Gillings M, Beattie AJ. Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. *Nature*, 2004, 432(7018): 747–750.
- [34] Bell T. Experimental tests of the bacterial distance-decay relationship. *The ISME Journal*, 2010, 4(11): 1357–1365.
- [35] Cao CY, Chen JM, Shao JF, Cui ZB. Seasonal dynamics of soil microbial biomass and enzyme activities in four sand-fixation plantations on Horqin sandy land. *Chinese Journal of Ecology*, 2011, 30(2): 227–233. (in Chinese)  
曹成有, 陈家模, 邵建飞, 崔振波. 科尔沁沙地四种固沙植物群落土壤微生物生物量及酶活性的季节动态. *生态学杂志*, 2011, 30(2): 227–233.
- [36] Long SR. Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. *Cell*, 1989, 56(2): 203–214.
- [37] Erlacher A, Cernava T, Cardinale M, Soh J, Sensen CW, Grube M, Berg G. *Rhizobiales* as functional and endosymbiotic members in the lichen symbiosis of *Lobaria pulmonaria* L. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 53.
- [38] Grube M, Cernava T, Soh J, Fuchs S, Aschenbrenner I, Lassek C, Wegner U, Becher D, Riedel K, Sensen CW, Berg G. Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. *The ISME Journal*, 2015, 9(2): 412–424.
- [39] Sciuto K, Moro I. Cyanobacteria: the bright and dark sides of a charming group. *Biodiversity and Conservation*, 2015, 24(4): 711–738.
- [40] Singh S. A review on possible elicitor molecules of cyanobacteria: their role in improving plant growth and providing tolerance against biotic or abiotic stress. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 117(5): 1221–1244.
- [41] Suárez-Moreno ZR, Caballero-Mellado J, Coutinho BG, Mendonça-Previato L, James EK, Venturi V. Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. *Microbial Ecology*, 2012, 63(2): 249–266.
- [42] Bragina A, Cardinale M, Berg C, Berg G. Vertical transmission explains the specific *Burkholderia* pattern in *Sphagnum* mosses at multi-geographic scale. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 394.
- [43] Cernava T, Aschenbrenner IA, Grube M, Liebinger S, Berg G. A novel assay for the detection of bioactive volatiles evaluated by screening of lichen-associated bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 398.
- [44] Cernava T, Müller H, Aschenbrenner IA, Grube M, Berg G. Analyzing the antagonistic potential of the lichen microbiome against pathogens by bridging metagenomic with culture studies. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 620.
- [45] Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M, Sessitsch A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2015, 79(3): 293–320.

# Diversity and distribution pattern of bacterial community on bark surface of *Larix principis-rupprechtii*

Jiabing Bao<sup>1</sup>, Guoping Qi<sup>2</sup>, Jinxian Liu<sup>1</sup>, Zhengming Luo<sup>3</sup>, Pengyu Zhao<sup>1</sup>, Xue Wang<sup>1</sup>, Baofeng Chai<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Ecological Restoration of Loess Plateau, Institute of Loess Plateau, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi Province, China

<sup>2</sup> Forest Seedling Station, Xinzhou 034000, Shanxi Province, China

<sup>3</sup> Xinzhou Teachers University, Xinzhou 034000, Shanxi Province, China

**Abstract:** Epiphytic microorganisms on the bark surface play an important role in host plants' health and adaptability. The maintenance mechanism of microbial community structure and diversity in bark microhabitats need attention. **[Objective]** We studied the distribution characteristics and fitness mechanisms of the bacterial community on the bark surface of *Larix principis-rupprechtii* along elevation gradients and light in Pangquangou Natural Reserve. **[Methods]** By using PCR-DGGE and high-throughput sequencing technology, we studied the structure of bacterial community. By using nonmetric multidimensional scaling (NMDS) ordination, we analyzed the spatial distribution characteristic of bacterial community. By using redundancy analysis, we analyzed the relationship between bacterial community and environmental factors and by using One-way ANOVA, we compared bacterial community composition between sunny and shady surface. Based on zero-deviation analysis, the driving factors of bacterial community assembly on the shady and sunny surface were studied. **[Results]** Bacterial community structure was significantly different among elevation gradients (ANOSIM;  $P < 0.05$ ). The redundancy analysis showed that pH and total carbon (TC) on bark surface were significantly correlated with the community structure ( $P < 0.05$ ). The relative abundances of photosynthetic autotrophic bacteria (norank\_Cyanobacteria) on the sunny surface were significantly higher than those on shady one, while the relative abundance of Rhizobiales showed an opposite trend. We suggested that light might be a driving factor in determining the structure of bark bacterial community. The results of zero-deviation analysis showed that the diversity pattern of the bacterial community on the bark surface was mainly affected by environmental filtration. **[Conclusion]** The determination processes were dominant factors in shaping the structure and diversity pattern of bacterial community on the bark surface of *Larix principis-rupprechtii* in this area.

**Keywords:** community assembly, the bark surface, bacteria community, deterministic process

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31772450, 31801962) and by the Special Fund for Mount Wutai Research of Xinzhou Teachers University (ZT201506)

\*Corresponding author. Tel: +86-351-7010700; E-mail: bfchai@sxu.edu.cn

Received: 18 March 2019; Revised: 14 May 2019; Published online: 17 October 2019