

三倍体毛白杨不同组织内生细菌多样性分析

杨敬敬¹, 韩烁¹, 王霞¹, 赵国柱^{1,2}, 何湘伟^{*1,2}

1 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083

2 林木育种国家工程实验室, 北京 100083

杨敬敬, 韩烁, 王霞, 赵国柱, 何湘伟. 三倍体毛白杨不同组织内生细菌多样性分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3021-3036

Yang Jingjing, Han Shuo, Wang Xia, Zhao Guozhu, He Xiangwei. Diversity of endophytic bacteria in different tissues of triploid *Populus tomentosa*[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3021-3036

摘要:【背景】三倍体毛白杨非常适合黄河区域生态经济发展, 是我国林业推广项目的重要树种。内生细菌在三倍体毛白杨不同组织中广泛存在, 对三倍体毛白杨具有防病、促生、固氮和生物修复等生物学作用。【目的】通过分析三倍体毛白杨不同组织内生细菌多样性, 可以充分挖掘其蕴含的丰富微生物资源。【方法】以北京林业大学山东冠县毛白杨基地的三倍体毛白杨为材料, 应用 16S rRNA 基因高通量测序技术对其根、茎、叶中内生细菌多样性进行了分析, 阐述三倍体毛白杨不同组织内生细菌多样性的变化趋势和规律, 为其内生细菌的进一步应用奠定理论基础。【结果】三倍体毛白杨根部内生细菌群落丰富度及多样性最高, 叶片中最低。高通量测序结果显示, 在全部样本中, 假单胞菌门和放线菌门为优势门, 伯克氏菌属(*Burkholderia*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)和食酸菌属(*Acidovorax*)为优势属, 不同组织的内生细菌群落结构组成差异显著; 16S rRNA 基因功能预测结果显示, 三倍体毛白杨内生细菌的功能主要涉及氨基酸代谢、维生素代谢、芳香族化合物降解和糖酵解等。通过分离培养共获得 217 株内生细菌, 分属于 23 个属 44 个种, 其中有 4 株 16S rRNA 基因序列相似性低于 97.5% 的菌株, 有可能为潜在的新种分类单元。【结论】三倍体毛白杨根茎叶内生细菌具有丰富的多样性, 组间差异显著, 内生细菌多样性和丰富度均是根>茎>叶。通过传统的分离培养方法获得了一些内生细菌资源, 其中包含 4 株 16S rRNA 基因序列相似性低于 97.5% 的菌株。然而高通量测序结果显示, 还有大量的内生细菌在此次实验中并未培养出来, 需要进一步开发新的高通量分离培养和鉴定方法以充分挖掘更多未培养、难培养的内生细菌菌株。

关键词: 三倍体毛白杨; 根; 茎; 叶; 内生细菌; 细菌多样性

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2021ZY61); 国家自然科学基金(31770110, 32171869)

Supported by: Fundamental Research Funds for the Central Universities (2021ZY61); National Natural Science Foundation of China (31770110, 32171869)

*Corresponding author: E-mail: hexiangwei@bjfu.edu.cn

Received: 2021-12-13; Accepted: 2022-01-19; Published online: 2022-03-11

Diversity of endophytic bacteria in different tissues of triploid *Populus tomentosa*

YANG Jingjing¹, HAN Shuo¹, WANG Xia¹, ZHAO Guozhu^{1,2}, HE Xiangwei^{*1,2}

¹ College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

² National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: [Background] Triploid *Populus tomentosa* is suitable for the ecological and economic development of the Yellow River and serves as an important tree species for forestry extension projects in China. Endophytic bacteria of triploid *P. tomentosa* play a role in the disease prevention, growth promotion, nitrogen fixation, and biological repair. [Objective] The objective was to analyze the diversity of endophytic bacteria and fully explore the microbial resources in triploid *P. tomentosa*. [Methods] In this study, the diversity of endophytic bacterial community in the roots, stems and leaves of *P. tomentosa* from the research base of Beijing Forestry University in Guanxian county, Shandong province was analyzed via 16S rRNA gene high-throughput sequencing and plate streaking. The variation trends and rules of endophytic bacterial diversity in different tissues of triploid *P. tomentosa* were clarified to lay a theoretical foundation for the further application of endophytic bacteria. [Results] The endophytic bacteria of triploid *P. tomentosa* had the highest richness and diversity in the roots while the lowest in the leaves. *Pseudomonas* and *Actinobacteria* were the dominant phyla, and *Burkholderia*, *Pseudonocardia*, and *Acidovorax* were the dominant genera. The structure of endophytic bacterial community varied among different tissues. The functions of the endophytic bacteria mainly involved amino acid metabolism, vitamin metabolism, degradation of aromatic compounds, and glycolysis. A total of 217 endophytic bacterial strains were isolated, belonging to 44 species of 23 genera. Among them, four strains shared the 16S rRNA gene sequence similarity below 97.5%, which might be new taxa. [Conclusion] In conclusion, the diversity of endophytic bacteria in the roots, stems and leaves of triploid *P. tomentosa* was significant. The diversity and richness of endophytic bacteria were higher in the roots than in the stems than in the leaves. Some endophytic bacterial resources were obtained by traditional isolation and culture methods, including 4 strains with 16S rRNA gene sequence similarity less than 97.5%. However, the results of high-throughput sequencing showed that a large number of endophytic bacterial strains had not been cultured in this experiment. It was necessary to further develop new high-throughput isolation, culture and identification methods to fully explore more uncultured and difficult endophytic bacterial strains.

Keywords: triploid *Populus tomentosa*; root; stem; leaf; endophytic bacteria; bacteria diversity

内生细菌指的是定殖在健康的植物组织或细胞中却不会引起寄主植物明显的病害症状, 在植物的微生态系统和长期的协同进化过程中发挥着重要作用, 并且可能与植物形成互利关系的一类微生物^[1], 在不同健康植物的根、茎、

叶及果实中均广泛分布、种类繁多, 具有促进植物生长、提高植物抗逆性和降低植物病虫害发生等生理生态功能, 对调节宿主体内微生态平衡及促进宿主植物健康生长均发挥重要作用^[2-5]。

植物内生细菌作为了解植物病害机制和生

物防治的一个重要途径,科学工作者对杨树内生细菌的研究也逐渐深入。Beckers 等^[6]以欧洲山杨×银白杨(*Populus tremula*×*Populus alba*)为材料,应用 16S rRNA 基因扩增焦磷酸测序技术对不同植物生境下的细菌群落进行分析,结果表明,田间生长的白杨根际微生物群的结构多样性明显低于内生微生物群。Schmidt 等^[7]以黑杨(*Populus nigra*×*P. maximowiczii* clone Max-4)作为杨树内生菌的分离来源,分别在未污染和风险元素污染的地区分离获得杨树内生菌,结果发现内生菌的物种多样性在未受污染的地点较高。Firincieli 等^[8]应用 16S rRNA 基因高通量测序分析不同气候的野生毛果杨叶际内生细菌群落,其结果表明取样地点是变化的主要驱动因素。Wang 等^[9]以田间种植的转基因和非转基因杨树的根和茎为实验材料,应用 16S rRNA 基因和内部转录间隔扩增子 Illumina MiSeq 测序来确定与植物相关的细菌群落结构,发现微生物群落在不同的植物组织中具有独特的生态位。孙岩^[10]采用纯培养的方法探究杨属植物根内生菌及根际细菌多样性,但未能充分展示样本中内生细菌结构组成的全貌。综上可知,杨属植物内生细菌的种群组成因植物生境、污染程度、气候环境和组织部位的不同而异,寄主根据其自身发育和功能性状对内生菌产生影响。

通常认为,内生细菌可以控制宿主病害的发生。研究发现,杨树内生细菌能产生活性较高的抑菌物质,从而能够直接减小病害发生程度^[11-12],具有一定的应用前景。分离自杨树根、茎和叶片的多种内生细菌可有效降解苯系物(benzene toluene ethylbenzene & xylene, BTEX)、三氯乙烯(trichloroethylene, TCE)和 2,4,6-三硝基甲苯等多种污染物^[13-15],并且在内生细菌中也检测到了与硝基芳香化合物降解相关的基因^[16]。因此,了解杨树不同组织的内

生细菌群落组成差异有助于增强对树木生长发育的理解和菌种资源的应用,为杨属植物的病害防治提供理论基础。

我国幅员辽阔、地大物博,内生细菌种类繁多,生物多样性丰富,组成及群落结构因植物组织的不同而差异较大^[17-19],是影响植物生长发育状态的重要因素。随着我国杨属植物微生物的研究逐渐深入,其应用将深入到越来越多的领域,给人们的生产生活带来更大的益处,因此,对杨属植物根、茎和叶中的内生细菌的研究具有十分广阔的应用前景。三倍体毛白杨(triploid *Populus tomentosa*)是朱之悌采用染色体部分替换和染色体加倍技术,将传统 38 条染色体的二倍体毛白杨改造为有 57 条染色体的三倍体新品种,具有苗期短、速生、栽培周期短等一系列优点^[20],非常适合黄河区域生态经济发展,为用材速生林奠定基础,带动区域经济持续发展。然而,国内对三倍体毛白杨中内生细菌多样性的研究尚有不足,纯培养的方法无法获知其微生物类群的组成。因此,本研究以北京林业大学科研基地山东省冠县的三倍体毛白杨为实验材料,选取 5-6 年生三倍体毛白杨的根、茎和叶等 3 种不同组织为研究对象,利用 Illumina NovaSeq 高通量测序技术和组织分离培养的方法,全面分析不同组织的内生细菌多样性,探究内生细菌在三倍体毛白杨不同组织内的潜在功能,以期丰富和完善杨树内生细菌种质资源,为进一步阐明内生细菌与三倍体毛白杨的相互作用机制奠定基础,为揭示不同组织内生细菌功能菌株的挖掘和利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

由于木本植物生长中期的内生细菌种类和

数量容易达到一个相对稳定的状态, 本实验样品选择了 5-6 年生的三倍体毛白杨, 挑取微环境差异较大的根、茎和叶 3 个不同组织, 以此发现三倍体毛白杨内生细菌多样性差异及变化规律。采样地点为北京林业大学科研基地山东省聊城市冠县 309 国道, 使用刨刀、无菌采样袋、高枝剪等工具完成对植物样本的采集。每个样本 3 个重复, 共 27 个样品。选用三点取样法, 在树高 1.5 m 处, 用无菌刀从树干表皮往内取约长 50 mm 宽 50 mm 厚 10 mm 的杨树茎干组织块、1.5 m 深处的树根及 7-8 m 高空中的植物叶片, 快速装于无菌采样袋, 短期存放于 4 °C。MBY56R、MBY56S 和 MBY56L 分别代表的是 5-6 年生三倍体毛白杨的根、茎和叶。

1.1.2 主要试剂和仪器

8% NaClO、MgCl₂·6H₂O, 北京索莱宝科技有限公司; Omega Soil DNA Kit, Omega Bio-Tek 公司; Q5[®]High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs 公司; Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit, Invitrogen 公司; Marker, TaKaRa 公司。酶标仪, Omega Bio-Tek 公司; PCR 扩增仪, Applied Biosystems 公司; 电泳仪, 北京六一生物技术有限公司; 凝胶成像系统, 北京百晶生物技术有限公司; Illumina NovaSeq 高通量测序技术平台, 上海派森诺生物科技股份有限公司。

1.1.3 培养基

R₂A 琼脂培养基和营养琼脂培养基 (nutrient agar, NA) 参照文献[10]配制。

1.2 方法

1.2.1 样品的表面消毒

采集的新鲜样品用无菌水对植物茎干组织块表面进行冲洗、晾干, 切成长度为 10 mm、宽度为 10 mm、厚度不变的组织块, 称重后开始表面灭菌。使用 75% 的乙醇冲洗约 30 s, 放

置于 8% 的次氯酸钠浸泡 3 min, 最终使用无菌水进行 5 次漂洗。取最后一次冲洗的无菌水 20 μL 滴入培养皿, 另外将用无菌水冲洗完毕后的植物样品在 LB 培养基上滚动几下, 两组均作为实验对照, 在 37 °C 条件下培养 72 h 后检验表面消毒效果。每个处理进行 3 组平行实验, 检测无菌后的消毒组织用于后续实验^[21]。依据三点取样法实际采集 27 个样品, 同一个点的 3 个重复样品进行混合, 最终混合成 3 个处理组的 9 个样本, 对样本进行表面除菌处理后平均分成两份, 一份采用传统的方法分离培养, 另一份样品用作高通量测序。

1.2.2 分离纯化获得可培养菌株

表面灭菌完毕后用消毒后的剪刀和镊子将植物组织剪碎, 放入研钵内, 加入灭菌后的石英砂将其研碎, 置于已经灭菌并加入 9 mL 蒸馏水的离心管, 配成浓度为 10⁻¹ 的植物组织溶液。在 30 °C、175 r/min 的条件下振荡培养大约 30 min, 静置 30 s, 即形成的植物样品悬液稀释度为 10⁻¹。依次将样品稀释成 10⁻¹-10⁻⁶ 这 6 个不同的梯度, 选用 NA 培养基和 R₂A 培养基进行涂布, 每个梯度涂 2-3 个重复。观察样品在 2 种培养基上涂布后的生长情况, 挑取单菌落采用三线法纯化 3-4 次以获得纯菌, 提取 DNA 在 Sanger 测序平台测序。

1.2.3 样品 DNA 提取与检测

使用 Omega Soil DNA Kit 提取 DNA, 采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行分子大小判断, 利用紫外分光光度计对 DNA 进行定量, 将提取的 DNA 送至上海派森诺公司完成高通量测序。

1.2.4 样本细菌 16S rRNA 基因 V5-V7 可变区的 PCR 扩增和高通量测序

核糖体 RNA 含有多个保守区和高度可变区, 利用保守区域设计引物来扩增 16S rRNA 基因的单个或多个可变区, 测序分析微生物多

样性。处理后的样本在 Illumina NovaSeq 平台进行测序, 由于样本属于植物材料, 选用 16S rRNA 基因 V3-V4 区测植物内生细菌时很可能会带入很多的植物宿主基因, 而 V5-V7 区则可以在很大程度上规避宿主基因的影响, 于是本研究 PCR 扩增选用细菌 16S rRNA 基因 V5-V7 区特异性引物 799F (5'-barcode+AACMGGATTAGATACCKG-3')和 1193R (5'-ACGTCATCCCACCTTCC-3')^[9]。引物 799F 中的 barcode 是一个 7 个碱基的寡核苷酸序列, 用来区分同一文库中的不同样品。PCR 反应体系(25 μ L): Q5 高保真度 DNA 聚合酶(2 U/ μ L) 0.25 μ L, 5 \times 反应缓冲液 5 μ L, 5 \times GC 缓冲液 5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 2 μ L, DNA 模板 2 μ L, 正向引物 (10 μ mol/L) 1 μ L, 反向引物(10 μ mol/L) 1 μ L, ddH₂O 8.75 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 30 s; 98 $^{\circ}$ C 15 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 25-27 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。采用 2%琼脂糖凝胶对 PCR 扩增结果进行电泳检测, 切取目的片段, 用 Axygen 凝胶回收试剂盒回收目的片段, 送至上海派森诺生物科技股份有限公司使用 Illumina NovaSeq 高通量测序平台进行序列测定和分析。

1.2.5 测序结果的数据处理和分析

采用 Illumina 平台对样本的 DNA 片段进行双端(paired-end)测序, 测序原始数据以 FASTQ 格式保存(R1.fastq 和 R2.fastq, Read 1 和 Read 2 序列一一配对)。按照 QIIME2 dada2 分析流程进行去噪(denoise)、去引物、质量过滤、拼接和去嵌合体。其不再以相似度聚类, 只进行去重(dereplication)或相当于以 100%相似度聚类。使用 dada2 质控后产生的每个去重的序列称为扩增序列变异(amplicon sequence variant, ASV), 或称为特征序列。将得到的序列与参考序列数据库(Silva 数据库)进行比对、物种注释, 对各样本(组)在不同物种分类学水平的具体组成进

行展示, 了解整体概况。根据 ASV 在不同样本中的分布, 评估每个样本的 α 多样性水平, 并通过稀疏曲线反映测序深度是否合适。在 ASV 层面计算各样本的距离矩阵, 并通过多种非监督的排序、聚类手段, 结合相应统计学检验方法, 衡量不同样本(组)间的 β 多样性差异及差异显著性。在物种分类学组成层面, 通过各种非监督、监督的排序、聚类和建模手段, 结合相应统计学检验方法, 进一步衡量不同样本(组)间的物种丰度组成差异, 并尝试寻找标志物种。根据 16S rRNA 基因测序结果, 还可预测样本的菌群代谢功能, 寻找差异通路, 并获得特定通路的物种组成。在以上结果的基础上绘制相关图表, 并进行统计检验分析。

2 结果与分析

2.1 ASV 质量及其多样性分析

将所有样本产生的原始序列使用 dada2 质控后获得 V5-V7 区有效序列总数为 83 401-127 050 条 ASV。根据 ASV 表统计, 共注释到 3 967 条 ASV。从图 1 可以看出, 根、茎和叶中特有的 ASV 数目分别是 1 834、1 158 和 682 个, 三者共有的 ASV 的数目为 82 个。全部样本中内生细菌注释到门、纲、目、科和属的数目分别为 18、35、75、148 和 255 个, 根、茎和叶 3 个部位均注释到 16 个门, 注释到属的数目分别是 167、165 和 142 个。基于 ASV 数目及相对丰度, 对三倍体毛白杨不同组织的内生细菌进行了多样性分析, 结果表明不同组织的三倍体毛白杨内生细菌多样性指数存在一定的差异。Goods_coverage 指数(表 1)在全部样本中的最小值为 97.97%, 即对所有样本的检测覆盖率至少为 97.97%, 这意味着三倍体毛白杨不同组织中所有的内生细菌几乎都能被检测到。以 Chao1 和 observed species 指数表征丰富度, 以 Shannon

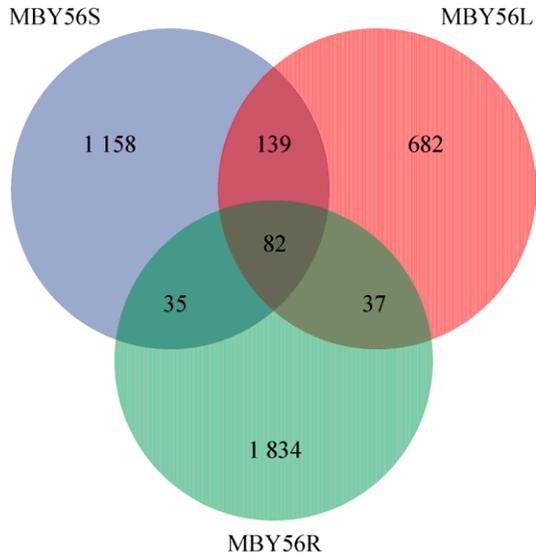


图 1 三倍体毛白杨不同组织样本韦恩图 图中，每个色块代表一个组，色块之间的重叠区域表示对应组之间的共同 ASV，每个色块中的数字表示对应分组中单独的 ASV 个数

Figure 1 Venn diagram of different tissue samples of triploid *Populus tomentosa*. In the figure, each color block represents a group, the overlapping area between the color blocks indicates the common ASV between the corresponding groups, and the number of each block indicates the number of ASVs contained in the block.

和 Simpson 指数表征多样性^[22]。由表 1 可知，在 9 个样本中，菌群细菌多样性指数 Chao1、observed species、Shannon 和 Simpson 分别在 298.6–1 231.4、284.3–918.1、3.953 22–6.615 04

和 0.863 708–0.962 319 之间，大小为 MBY56R>MBY56S>MBY56L (根>茎>叶)，表明在三倍体毛白杨中，内生细菌多样性和丰富度均是根>茎>叶。

2.2 物种丰度及群落结构组成

根据 2021 年 42 个原核生物门级别拉丁名称的重要修订^[23]，从门的分类水平看(图 2)，三倍体毛白杨根茎叶中的内生细菌主要由假单胞菌门(*Pseudomonas*)、放线菌门(*Actinomycetes*)、芽孢杆菌门(*Bacillus*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、硝化螺旋菌门(*Nitrospira*)及装甲菌门(*Armatimonadetes*)等组成，其平均相对丰度(表 2)分别为 59.51%、35.09%、3.34%、1.27%、0.17%、0.04%和 0.03%。尤其是假单胞菌门(*Pseudomonas*)，在三倍体毛白杨叶片中的相对丰度达到了 90.82% (表 2)，几乎覆盖了叶片中的全部门水平的分类单元组成。在三倍体毛白杨根、茎和叶 3 个不同组织中，根部出现了大量放线菌门(*Actinomycetes*)，菌群丰度达到 65.88%，但同时期茎部的丰度较低(36.95%)，叶片中的丰度仅为 2.45%；根和茎发现少量的螺旋体门(*Spirochaetes*) (丰度为 0.002%–0.020%)，在叶中并未发现；根中还发现了微量疣微菌门(*Verrucomicrobia*) (丰度为 0.020%)，但在茎和叶中均未发现。

表 1 三倍体毛白杨不同组织样本的 α 多样性指数表

Table 1 Alpha diversity index of different tissue samples of triploid *Populus tomentosa*

Samples	Chao1 index	Goods_coverage	Observed_species	Shannon index	Simpson index
MBY56S1	723.4	0.989 243	606.5	6.036 45	0.959 293
MBY56S2	453.5	0.996 277	431.1	4.366 50	0.870 943
MBY56S3	831.5	0.986 865	673.2	5.752 64	0.945 001
MBY56L1	298.6	0.997 835	284.3	3.953 22	0.863 708
MBY56L2	425.6	0.995 944	392.3	4.277 06	0.870 173
MBY56L3	489.9	0.994 944	448.0	4.551 47	0.889 371
MBY56R1	1 231.4	0.979 664	918.1	6.615 04	0.961 519
MBY56R2	991.3	0.983 967	774.8	6.258 09	0.962 319
MBY56R3	889.1	0.985 912	710.0	5.292 11	0.892 361

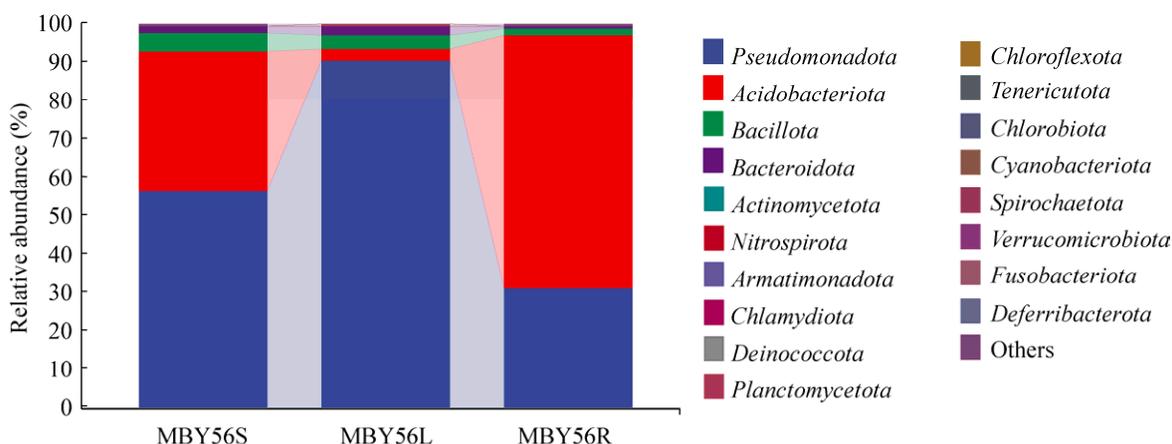


图 2 三倍体毛白杨不同组织样本门水平相对丰度图 MBY56R、MBY56S 和 MBY56L 分别代表 5–6 年生三倍体毛白杨的根、茎和叶，图中展示相对丰度排名前 20 位的门类群，横坐标为各类群的名称，纵坐标为各类群在门水平上的相对丰度

Figure 2 Relative abundance diagram at phylum level of different tissue samples of triploid *Populus tomentosa*. MBY56R, MBY56S and MBY56L respectively represent the roots, stems and leaves of 5–6 year old triploid *Populus tomentosa*. The map was drawn according to the top 20 phylum with average abundance. The abscissa is the name of each group, and the ordinate is the relative abundance of each taxon at the phylum level.

表 2 三倍体毛白杨不同组织样本门水平相对丰度(相对丰度值>0.03%)

Table 2 Relative abundance of different tissue samples of triploid *Populus tomentosa* at phylum level (relative abundance>0.03%)

Phylum	MBY56S (%)	MBY56R (%)	MBY56L (%)	Mean relative abundance (%)
<i>Pseudomonas</i>	56.28	31.44	90.82	59.51
<i>Actinomycetes</i>	36.95	65.88	2.45	35.09
<i>Bacillus</i>	4.66	1.43	3.93	3.34
<i>Bacteroidetes</i>	1.39	0.42	2.01	1.27
<i>Acidobacteria</i>	0.07	0.07	0.36	0.17
<i>Nitrospira</i>	0.01	0.01	0.10	0.04
<i>Armatimonadetes</i>	0.08	0.04	0.03	0.03

从属水平上看，所有样本共有 10 个属的平均相对丰度大于 1.0%，分别是伯克氏菌属 (*Burkholderia*)、假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*)、食酸菌属 (*Acidovorax*)、类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*)、芽殖球菌属 (*Blastococcus*)、柄杆菌属 (*Caulobacter*)、弗兰克氏菌属 (*Frankia*)、磁螺菌属 (*Magnetospirillum*)、罗尔斯通氏菌属 (*Ralstonia*)和链霉菌属 (*Streptomyces*)，其中平均相对丰度最高的属为假单胞菌门伯克氏菌科

(*Burkholderiaceae*)的 *Burkholderia* (18.56%)，其次是放线菌门假诺卡氏科 (*Pseudonocardiaceae*) 的 *Pseudonocardia* (6.42%)、假单胞菌门丛毛单胞菌科 (*Comamonadaceae*) 的 *Acidovorax* (5.42%) 和放线菌门类诺卡氏科 (*Nocardioideaceae*) 的 *Nocardioides* (4.04%) (表 3)。其中伯克氏菌属 (*Burkholderia*)和假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*) 为核心属，始终存在于各个样本中，平均相对丰度比例分别为 18.56%和 6.42%。由图 3 可知，

表 3 三倍体毛白杨根茎叶内生细菌优势属(相对丰度大于 1.0%)

Table 3 Dominant genera of endophytic bacteria in root, stem and leaf of triploid *Populus tomentosa* (relative abundance>1.0%)

Phylum/Class	Family	Genus	Mean relative abundance (%)
<i>Pseudomonas</i>	<i>Burkholderaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	18.56
<i>Actinomycetes</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Pseudonocardia</i>	6.42
<i>Pseudomonas</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Acidovorax</i>	5.42
<i>Actinomycetes</i>	<i>Nocardioidaceae</i>	<i>Nocardioides</i>	4.04
<i>Actinomycetes</i>	<i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Blastococcus</i>	2.65
<i>Pseudomonas</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Caulobacter</i>	2.18
<i>Actinomycetes</i>	<i>Frankiaceae</i>	<i>Frankia</i>	1.40
<i>Pseudomonas</i>	<i>Rhodospirillaceae</i>	<i>Magnetospirillum</i>	1.18
<i>Pseudomonas</i>	<i>Burkholderaceae</i>	<i>Ralstonia</i>	1.11
<i>Actinomycetes</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	1.08

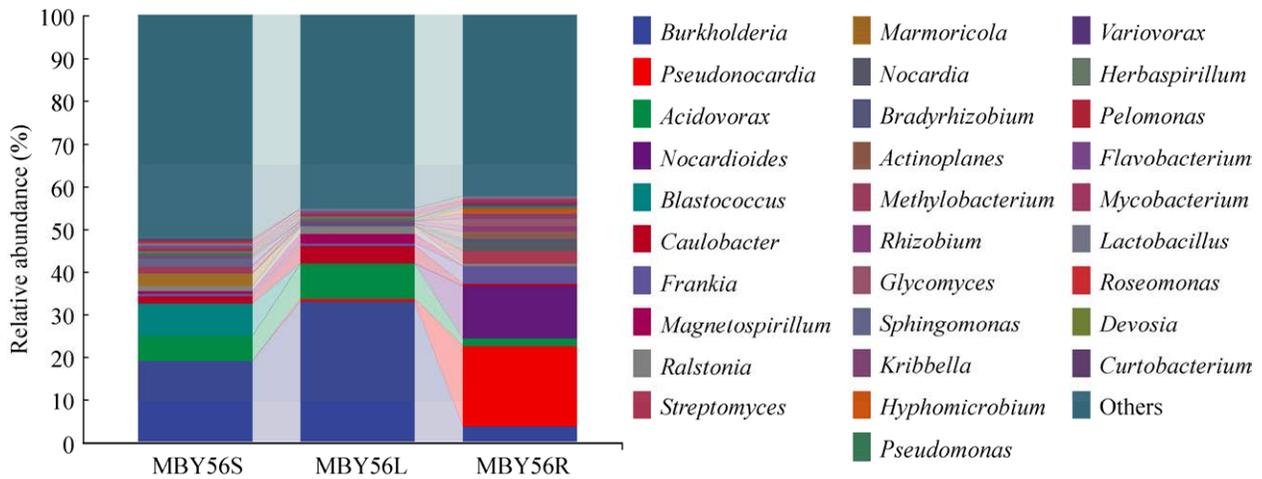


图 3 三倍体毛白杨根茎叶内生细菌属水平相对丰度 MBY56R、MBY56S 和 MBY56L 分别代表 5-6 年生的三倍体毛白杨的根、茎和叶。根据相对丰度排名前 30 的属进行绘图，横坐标为各类群的名称，纵坐标为各类群在属水平上的相对丰度

Figure 3 Relative abundance diagram in root, stem and leaf of triploid *Populus tomentosa* at phylum level. MBY56R, MBY56S and MBY56L respectively represent the roots, stems and leaves of 5-6 year old triploid *Populus tomentosa*. The graph was drawn according to the top 30 taxa at the genus level with average abundance. The abscissa is the name of each group, and the ordinate is the relative abundance of each taxa at the genus level.

菌群种类数目在根茎叶中的大小顺序为根>茎>叶，即根部菌群的种类及丰度明显高于茎部和叶部。如三倍体毛白杨的根部出现了 12.00% 的类诺卡氏属(*Nocardioides*)、4.06% 的弗兰克氏菌属(*Frankia*)和 3.20% 的链霉菌属(*Streptomyces*)，但茎和叶中丰度极低；此外，根部还出现了

2.25% 的诺卡氏菌属(*Nocardia*)和 1.60% 的糖霉菌属(*Glycomyces*)，而在茎和叶中并未发现。

基于 LEfSe 分析的样本总体分类绘制分类学分支图(图 4)，结果表明，门水平上丰度较高的是假单胞菌门(*Pseudomonas*)和硝化螺旋菌门(*Nitrospira*)；属水平上丰度较高的是芽殖球

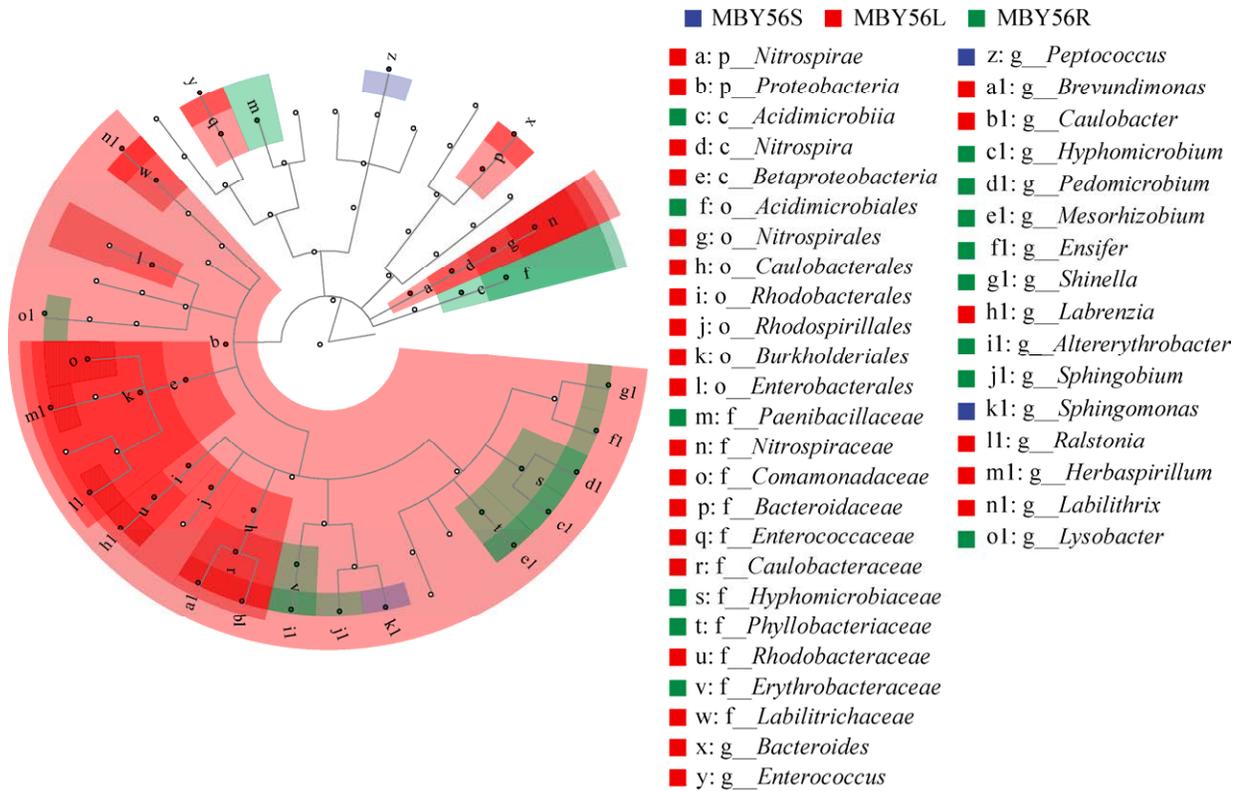


图 4 基于分类等级树的组间差异分类单元展示图(LDA>2) 分类学分支图展示了样本群落中从门到属(从内圈到外圈)主要分类单元的分类等级关系。节点大小对应于该分类单元的平均相对丰度;空心节点代表组间差异不显著的分类单元,而其他颜色(如绿色和红色)的节点则表明这些分类单元体现出显著的组间差异,且在该色所代表分组样本中丰度较高。字母则标识了组间存在显著差异的分类单元的名称

Figure 4 Cladogram based on classification rank tree (LDA>2). The cladogram based on classification rank tree shows the rank relationships of major taxa from phylum to genus (from inner circle to outer circle) in the sample community. The node size corresponds to the average relative abundance of the taxa. Hollow nodes represent taxa with no significant difference between groups, while nodes in other colors (e.g., green and red) indicate that these taxa show significant difference between groups, and letters with higher abundance in the grouping samples represented by this color indicate the names of taxa with significant difference between groups.

菌属(*Blastococcus*)、柄杆菌属(*Caulobacter*)和罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia*)。红色节点对应的分类单元在所有样本的 3 个分组间存在显著差异,并且在 MBY56L (5-6 年生,三倍体毛白杨叶片)的分组中丰度最高,即柄杆菌属(*Caulobacter*)和罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia*)在所有的分组中存在并有显著差异,并且在三倍体毛白杨的叶片组织丰度最高;酸杆菌目(*Acidimicrobiales*)也属

于存在显著组间差异的标志物种,在 5-6 年生三倍体毛白杨的根部丰度最高。

2.3 组间相似性分析

通过聚类热图(heatmap)进一步比较样本间的物种组成差异。如图 5 所示,5-6 年生三倍体毛白杨根茎叶中的属级分类单元分布具有比较明显的差异,在所有样本排名前十位的属级分类单元中,其中伯克氏菌属(*Burkholderia*)、柄杆菌

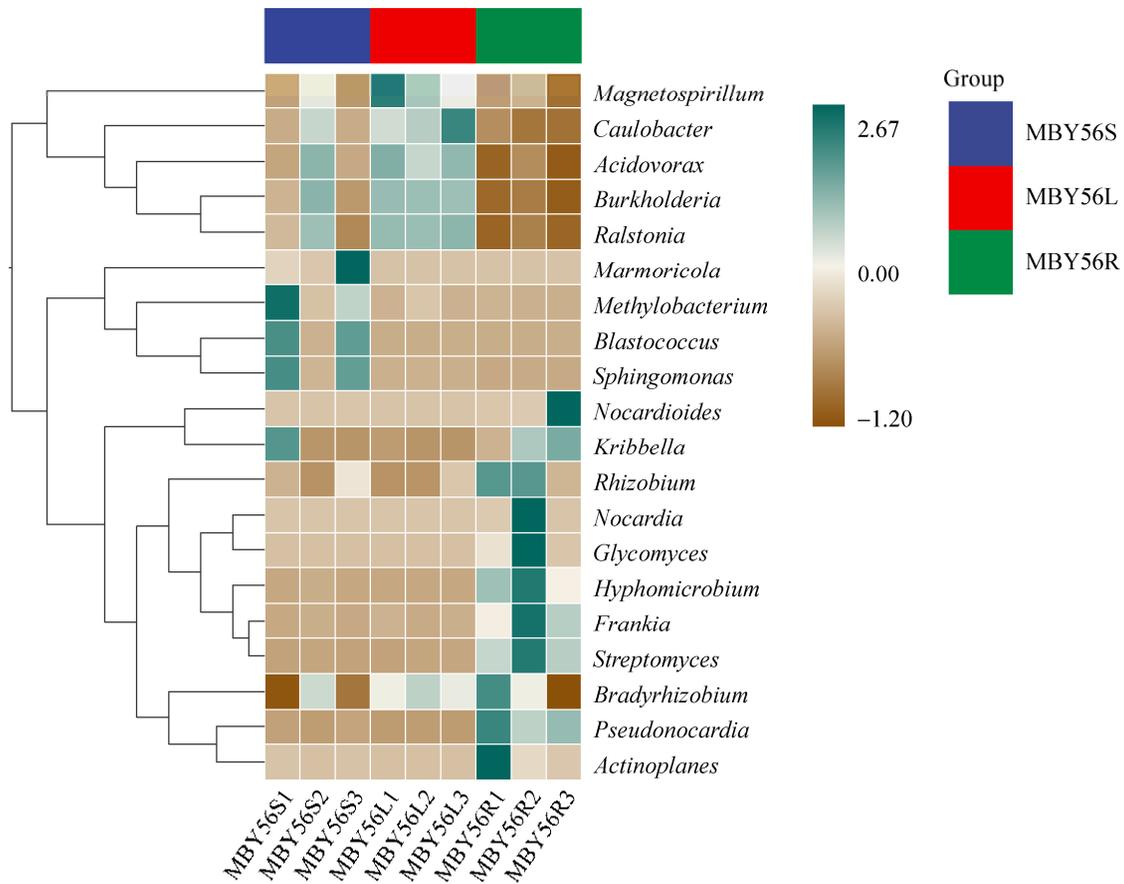


图 5 三倍体毛白杨不同组织样本属水平细菌菌群 heatmap 分析 通过物种聚类, 使用平均丰度前 20 的属进行绘图, 展示差异物种所属的属级分类单元以及在各样本、各分组的分布情况。通过颜色深浅反映物种的丰度变化, 从而直观地展示物种在每个样本或分组中的变化趋势。7 个分组用 7 个不同的颜色展示

Figure 5 Heatmap analysis of microbial community under genus level in different tissue samples of triploid *Populus tomentosa*. Clustering by species, using the average abundance of top 20 genera in drawing, showing different species of a genus taxon and in the distribution of each sample group. By reflecting the abundance of species change color shades, shown visually and change trend of species in each sample or grouping. Seven group with seven different color display.

属(*Caulobacter*)、磁螺菌属(*Magnetospirillum*)、食酸菌属(*Acidovorax*)和罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia*)在叶片中的丰度较高; 芽殖球菌属(*Blastococcus*)和类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)在茎干中的丰度比较高; 而在根部较其他 2 种组织而言丰度比较高的是弗兰克氏菌属(*Frankia*)和链霉菌属(*Streptomyces*)。根据图中颜色梯度的变化可知, 大部分细菌菌群在根部样本中的

相对丰度高于茎部和叶部, 表明在不同组织条件下, 根部样本展示出了更好的丰富度和多样性, 菌群结构变化较复杂。

通过 R 软件对属水平的群落组成结构进行距离矩阵与主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)。由图 6 可知, 其第一主成分和第二主成分的贡献率分别为 47.2%和 25.2%, 总计贡献率为 72.4%, 解释了群落组成的差异。

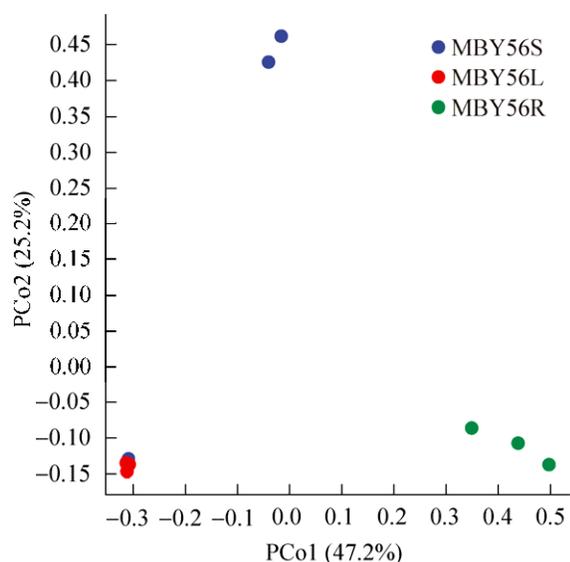


图 6 三倍体毛白杨不同组织样本主坐标分析图中展示不同样本和分组间群落组成差异。投影距离越远, 差异越大。横坐标和纵坐标分别表示主成分 1 和 2 对样本分布的贡献率。图中的每个点代表一个样本, 相同颜色的点来自同一组

Figure 6 Principal coordinate analysis (PCoA) of different tissue samples of triploid *Populus tomentosa*. Differences in community composition between different samples and groups. The farther the projected distance, the greater the difference. The abscissa and ordinate represent the contribution rate of the principal components 1 and 2 to the distribution of the samples. Each point in the figure represents a sample, and the points of the same color come from the same group.

MBY56S (茎干)中的一个样品未能很好地聚合, 原因可能是受到采样位置和环境因素的影响, 又或在表面除菌处理的时候使用次氯酸钠和酒精浸泡清洗过度, 群落结构更接近于菌量较少的 MBY56L (叶片)。其余 2 个处理组的 3 个样本几乎都很好地聚合在一起, 重复性较好。整体上看, 三倍体毛白杨的根、茎和叶 3 个处理组之间在 PCoA 图上遗传距离较远, 组间差异显著, 所得结果基本与 heatmap 结果吻合。

2.4 功能预测分析

利用 MetaCyc 数据库比对三倍体毛白杨根茎叶内生细菌 ASV 进行基因预测。结果如图 7 所示, 三倍体毛白杨根、茎、叶内生细菌功能主要涉及生物合成(biosynthesis)、降解/利用/同化(degradation/utilization/assimilation)、解毒作用(detoxification)、前体代谢物和能量的产生(generation of precursor metabolite and energy)、聚糖通路(glycan pathways)、高分子修饰(macromolecule modification)和代谢集群(metabolic clusters) 7 个方面。其中, 生物合成过程相关的基因数最多, 占总基因数的 62.77%, 主要包括氨基酸生物合成(amino acid biosynthesis)、辅因子、辅基、电子载体和维生素生物合成(cofactor、prosthetic group、electron carrier 和 vitamin biosynthesis)、核苷和核苷酸的生物合成(nucleoside and nucleotide biosynthesis)及脂肪酸和脂质的生物合成(fatty acid and lipid biosynthesis)等生物合成过程; 其次是降解/利用/同化过程, 占总基因数的 17.10%, 主要涉及核苷和核苷酸降解(nucleoside and nucleotide degradation)、芳香族化合物降解(aromatic compound degradation)、碳水化合物降解(carbohydrate degradation)、氨基酸降解(amino acid degradation)和次生代谢物降解(secondary metabolite degradation)等降解过程; 另外还有前体代谢物和能量的产生过程, 占总基因数的 16.06%, 主要有 TCA 循环、发酵(fermentation)、呼吸作用(respiration)、电子传递(electron transfer)和糖酵解(glycolysis)等过程。

2.5 可培养内生细菌多样性

从三倍体毛白杨的根、茎和叶中一共分离得到 217 株内生细菌, 分属于 23 个属 44 个种。根、茎和叶中各自分离得到的菌株数分别是 80、103 和 34 株, 其中属分别有 13、9 和 11 个,



图7 三倍体毛白杨根茎叶内生细菌功能基因分类 横坐标为功能通路的丰度，纵坐标为MetaCyc第二级分类的功能通路，最右边为该通路所属的一级通路

Figure 7 Functional genes of endophytic bacteria in roots, stems and leaves of triploid *Populus tomentosa*. The abscissa is the abundance of functional pathway, the ordinate is the functional pathway of MetaCyc second classification level, and the most right is the first-level pathway to which this pathway belongs.

种分别有 19、17 和 18 个, 根中内生细菌属和种的数目最高。由于纯培养方法具有一定的限制性, 受到多种因素影响, 在茎干中分离到的属的数目低于叶片, 与高通量测序中的结果不完全一致。如图 8 所示, 只在茎干中分离得到的属有不动杆菌属(*Acinetobacter*)、纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)和甲基杆菌属(*Methylobacterium*); 只在根中分离得到的属有土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、*Inquilius*、中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)和 *Pseudaminobacter*; 只在叶片中分离得到的属有金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)、*Frigoribacterium*、赖氨酸

芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)、泛菌属(*Pantoea*)和葡萄球菌属(*Staphylococcus*)。假单胞菌属(*Pseudomonas*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)在根、茎干和叶片中含量均为最高, 为 3 个部位的共同优势属。此外, 在根和茎干中分离得到 16S rRNA 基因序列相似性低于 97.5% 的 4 株菌, 菌株编号为 AR43、GN2、GN19 和 GN29, 最相似菌株和相似性分别是 *Microbacterium testaceum* (97.35%)、*Ensifer mexicanus* (97.16%)、*Chryseobacterium gwangjuense* (97.49%) 和 *Cohnella formosensis* (96.96%), 有可能是潜在的新种分类单元, 有待后续进行实验进一步探究。

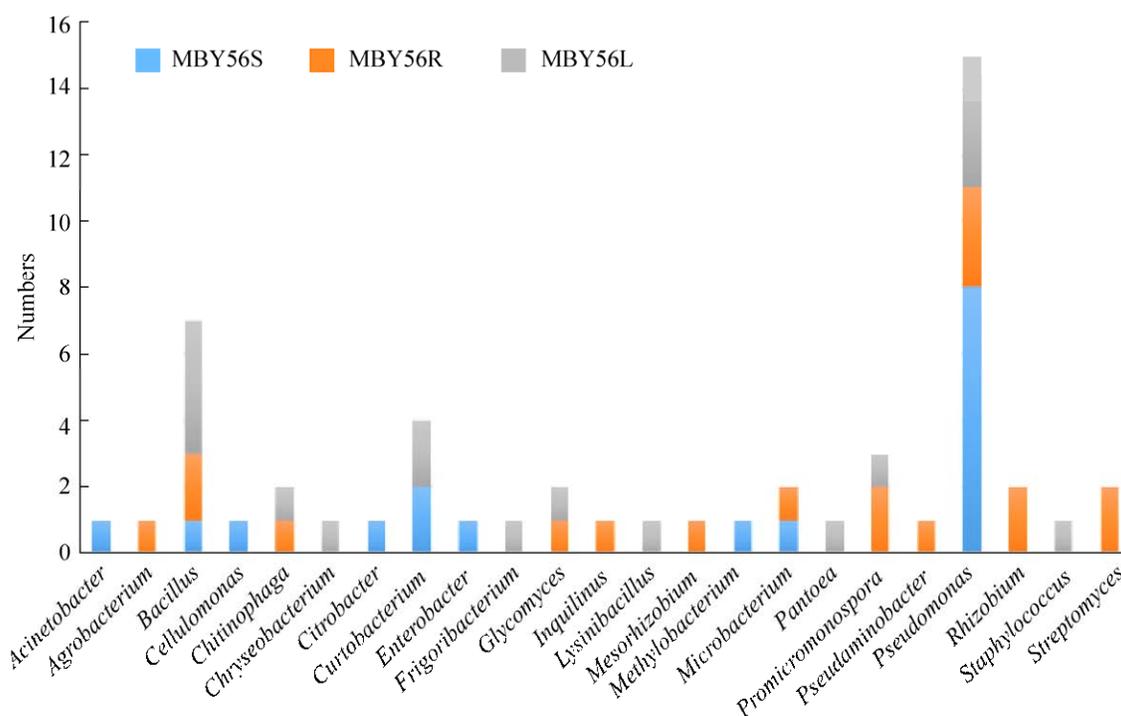


图 8 三倍体毛白杨不同组织中内生细菌属类堆积柱形图 图中展示的是获得的可培养属类群在根茎叶中的分布情况, 横坐标为培养得到的属类群名称, 纵坐标为每个属包含种的数目, 不同的颜色代表不同的分组

Figure 8 Column diagram of endophytic bacterial genus accumulation in different tissues of triploid *Populus tomentosa*. The figure shows the distribution of culturable genus groups in roots, stems and leaves. The abscissa is the name of culturable genus groups, the ordinate is the number of species contained in each genus, and different colors represent different groups.

3 讨论与结论

本研究基于高通量测序技术,对三倍体毛白杨根、茎和叶 3 种不同组织中内生细菌的多样性进行了研究。研究表明,3 种不同组织中均定殖着丰富的内生细菌,但内生细菌的分布存在一定的组织差异性,根中含有的内生细菌种类最多,叶片中内生细菌群落丰富度和多样性最低,并发现了三倍体毛白杨不同组织中的主要门类、核心属类和一些低丰度的微生物种群。从内生细菌群落组成来看,三倍体毛白杨根茎叶中共有的主要优势门为假单胞菌门和放线菌门,各样本中丰度较高的还有芽孢杆菌门和拟杆菌门,而拟杆菌门和放线菌门是探讨生物进化、挖掘农用抗生素菌群的重要种质资源来源^[24];在属水平上,三倍体毛白杨根部样本中均含有较高丰度的假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、类诺卡氏属(*Nocardioides*)、弗兰克氏菌属(*Frankia*),这几种菌属在氮肥开发与利用、农业生物基因工程方面具有广泛的用途^[25],是具有重要农业应用价值的固氮细菌种质资源。高通量测序结果显示,食酸菌属(*Acidovorax*)相对丰度较高,为排名第三的优势属,但前人研究发现其他杨属植物中并未注释得到 *Acidovorax* 或丰度极小,原因可能是三倍体毛白杨内生微环境中的 pH 条件较为特殊,相对其他杨属植物来说较适合 *Acidovorax* 的定殖^[6-9]。因此,本实验中所获得的 9 个杨树样本中内生细菌的菌群丰度变化可为挖掘杨属植物中具有特定应用价值的菌群资源指明方向。本实验中,heatmap 聚类分析和主坐标分析表明,根茎叶中细菌菌群组成差异较大,根部的分组样本显示出更好的丰富度和多样性,菌群结构变化较复杂。功能预测结果显示,在三倍体毛白杨根

茎叶样本的内生细菌群落中,蛋白及代谢通路中大多与生物合成、降解/利用/同化、解毒作用、前体代谢物和能量的产生、聚糖通路、高分子修饰和代谢途径相关,这为杨树与内生细菌之间的互作研究奠定了基础。通过传统分离培养得到的一些菌株提供了大量微生物资源,为进一步开发利用奠定了基础。其中 16S rRNA 基因序列相似性低于 97.5% 的 4 株菌为潜在的新种分类单元,有待后续实验进一步探究。然而,通过与高通量测序结果比较分析,传统方法得到的菌株在高通量测序结果中只占据一小部分,说明三倍体毛白杨中还有大量的内生细菌在此次实验中并未培养出来,分析原因可能是本研究所用的分离培养方法过于单一,在内生细菌分离的过程中,内生细菌分离数量受到组织表面消毒方法、培养基种类、培养条件等因素的影响。此外,纯培养方法从茎干中分离得到的微生物类群少于叶片,与高通量测序结果中展现的高低趋势不完全一致。由此可见,传统的分离培养方法具有一定的限制性,工作量较大却仍不能很好地展示微生物群落组成结构的全貌,需要进一步开发新的高通量分离培养和鉴定方法进行充分挖掘。在后续的研究中,将对纯培养方法获得的菌株进行功能检测,以探究三倍体毛白杨内生细菌的功能机制;对 4 株潜在新种进行全基因组测序,计算平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)值,同时设计相应的多相分类实验,测定呼吸醌、脂肪酸和极性脂质等指标,探索其最适 pH、温度和盐浓度等,为微生物新类群的功能机制研究奠定基础。

致谢:感谢宋跃朋、刘磊、郝旭日及山东冠县北京林业大学育种基地在采样工作中提供的帮助。

REFERENCES

- [1] Yan K, He LM, Zhou WH, Feng RZ, Meng LN, Wei Q, Liu Y. Determination of the community structure and diversity of endophytic bacteria from *Alpinia zerumbet* seeds[J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2020, 24(3): 420-428
- [2] Emami S, Alikhani HA, Pourbabaei AA, Etesami H, Sarmadian F, Motessharezadeh B. Effect of rhizospheric and endophytic bacteria with multiple plant growth promoting traits on wheat growth[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2019, 26(19): 19804-19813
- [3] Hazarika DJ, Goswami G, Gautom T, Parveen A, Das P, Barooah M, Boro RC. Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic *Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens[J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 71
- [4] Zhu YL. Isolation and identification of *Ammodendron bifolium* endophytic bacteria and the action mechanism of selected isolates-induced seed germination and their effects on host osmotic-stress tolerance[J]. Archives of Microbiology, 2019, 201(4): 431-442
- [5] Pandey PK, Samanta R, Yadav RNS. Inside the plant: addressing bacterial endophytes in biotic stress alleviation[J]. Archives of Microbiology, 2019, 201(4): 415-429
- [6] Beckers B, Op De Beeck M, Weyens N, Boerjan W, Vangronsveld J. Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees[J]. Microbiome, 2017, 5(1): 25
- [7] Schmidt CS, Lovecká P, Mrnka L, Vychodilová A, Strejček M, Fenclová M, Demnerová K. Distinct communities of poplar endophytes on an unpolluted and a risk element-polluted site and their plant growth-promoting potential *in vitro*[J]. Microbial Ecology, 2018, 75(4): 955-969
- [8] Firrincieli A, Khorasani M, Frank AC, Doty SL. Influences of climate on phyllosphere endophytic bacterial communities of wild poplar[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 203
- [9] Wang YB, Zhang WX, Ding CJ, Zhang BY, Huang QJ, Huang RF, Su XH. Endophytic communities of transgenic poplar were determined by the environment and niche rather than by transgenic events[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 588
- [10] 孙岩. 杨属植物根内生菌及根际细菌多样性研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院硕士学位论文, 2015
- Sun Y. Study on the endophytic diversity in *Populus* roots and bacteria diversity in rhizosphere[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Forestry, 2015 (in Chinese)
- [11] 胥丽娜, 徐亮, 李磊, 邹玉峰, 赵春青, 张卫光, 刘振宇. 枯草芽孢杆菌对杨树水泡溃疡病菌菌丝生长的抑制作用[J]. 菌物研究, 2007, 5(3): 165-168
- Xu LN, Xu L, Li L, Zou YF, Zhao CQ, Zhang WG, Liu ZY. Inhibition effect of *Bacillus subtilis* on the growth of *Botryosphaeria dothidea*[J]. Journal of Fungal Research, 2007, 5(3): 165-168 (in Chinese)
- [12] 陈越渠, 李立梅, 毛赫, 张立民, 王牧原, 李殿锋, 张晓军. 杨树烂皮病内生拮抗菌的筛选及鉴定[J]. 植物保护, 2015, 41(6): 126-131
- Chen YQ, Li LM, Mao H, Zhang LM, Wang MY, Li DF, Zhang XJ. Screening of antagonistic bacteria of *Valsa sordida* and identification of the strain NS₃[J]. Plant Protection, 2015, 41(6): 126-131 (in Chinese)
- [13] Moore FP, Barac T, Borremans B, Oeyen L, Vangronsveld J, Van Der Lelie D, Campbell CD, Moore ERB. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2006, 29(7): 539-556
- [14] Van Der Lelie D, Taghavi S, Monchy S, Schwender J, Miller L, Ferrieri R, Rogers A, Wu X, Zhu W, Weyens N, et al. Poplar and its bacterial endophytes: coexistence and harmony[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2009, 28(5): 346-358
- [15] Kang JW, Khan Z, Doty SL. Biodegradation of trichloroethylene by an endophyte of hybrid poplar[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(9): 3504-3507
- [16] Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. Bacterial endophytes: recent developments and applications[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 278(1): 1-9
- [17] 杨文琦, 龙宣杞, 崔卫东. 玉米青贮中细菌多样性分析[J]. 新疆农业科学, 2013, 50(8): 1424-1433
- Yang WQ, Long XQ, Cui WD. Bacteria diversity analysis in corn silage[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2013, 50(8): 1424-1433 (in Chinese)
- [18] 邹媛媛, 刘洋, 赵亮, 刘琳, 宋未. 两种抗病性不同的水稻种子固有细菌群落的多样性研究[J]. 中国农业科技导报, 2016, 18(4): 9-16
- Zou YY, Liu Y, Zhao L, Liu L, Song W. Research on the diversity of indigenous bacterial community in the seeds of two rice varieties with different disease-resistance[J].

- Journal of Agricultural Science and Technology, 2016, 18(4): 9-16 (in Chinese)
- [19] 符鲜, 杨树青, 刘德平, 张华, 刘敏, 杨水源, 孙云岭. 套作小麦/玉米不同施氮水平对土壤养分与微生物数量的影响[J]. 干旱区研究, 2017, 34(1): 43-50
Fu X, Yang SQ, Liu DP, Zhang H, Liu M, Yang SY, Sun YL. Effects of different nitrogen application levels on soil nutrient content and soil edaphon population in wheat/corn intercropping field[J]. Arid Zone Research, 2017, 34(1): 43-50 (in Chinese)
- [20] 朱之梯. 三倍体毛白杨新品种简介[J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(S1): 60-62
Zhu ZT. A brief introduction of new triploid *Populus tomentosa* species[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2002, 24(S1): 60-62 (in Chinese)
- [21] 张爱梅, 殷一然, 孙坤. 沙棘属植物弗兰克氏菌研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(11): 3933-3944
Zhang AM, Yin YR, Sun K. Research progress in *Frankia* spp. associated with *Hippophae* L.[J]. Microbiology China, 2020, 47(11): 3933-3944 (in Chinese)
- [22] Ren GM, Xu XH, Qu JJ, Zhu LP, Wang TT. Evaluation of microbial population dynamics in the co-composting of cow manure and rice straw using high throughput sequencing analysis[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2016, 32(6): 101
- [23] Oren A, Garrity GM. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2021, 71(10): 005056
- [24] 任丽娟, 何聃, 邢鹏, 王毓菁, 吴庆龙. 湖泊水体细菌多样性及其生态功能研究进展[J]. 生物多样性, 2013, 21(4): 422-433
Ren LJ, He D, Xing P, Wang YJ, Wu QL. Bacterial diversity and ecological function in lake water bodies[J]. Biodiversity Science, 2013, 21(4): 422-433 (in Chinese)
- [25] 蒲强, 谭志远, 彭桂香, 李永涛, 刘丽辉, 张海春, 曹禹. 根瘤菌分类的新进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(3): 619-633
Pu Q, Tan ZY, Peng GX, Li YT, Liu LH, Zhang HC, Cao Y. Advances in rhizobia taxonomy[J]. Microbiology China, 2016, 43(3): 619-633 (in Chinese)