

孟磊, 林晗, 丁新兰, 等. 杉木不同器官中内生细菌的多样性分析[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(12):2367-2376.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.12.020

## 杉木不同器官中内生细菌的多样性分析

孟磊<sup>1,2</sup>, 林晗<sup>1,2</sup>, 丁新兰<sup>3</sup>, 谢安强<sup>1,4</sup>, 简灵静<sup>1,2</sup>, 王英姿<sup>5</sup>, 陈灿<sup>1,4</sup>

(1.福建农林大学林学院,福建福州 350002; 2.福建省高校森林生态系统经营与过程重点实验室,福建福州 350002; 3.福建省上杭白砂国有林场,福建龙岩 364200; 4.福建农林大学菌草与生态学院,福建福州 350002; 5.福州市自然保护地规划发展中心,福建福州 350002)

**摘要:** 为探明杉木不同器官中内生细菌的群落组成和特点,挖掘杉木丰富的微生物资源,并为筛选杉木中特色微生物资源提供理论依据,本研究采用 Illumina Miseq 平台的高通量测序技术,对多年生杉木根、茎、叶中的内生细菌 16S rDNA V3~V4 高变区序列进行检测,分析杉木不同器官中内生细菌的多样性及其群落组成差异。扩增子序列变体(ASV)分析结果表明,杉木根、茎、叶中的 ASV 数量分别为7 108个、2 017个和1 911个。对杉木根、茎、叶中内生细菌进行分析,发现变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和酸杆菌门(Acidobacteria)为主要优势菌门,相对丰度分别为 67.930%、13.800%和 6.250%; $\alpha$ -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、 $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)和放线菌纲(Actinobacteria)为主要优势菌纲,相对丰度分别为 41.180%、19.710%和 11.180%;1174-901-12、P30B-42 和甲基杆菌属(*Methylobacterium*)为主要优势菌属,相对丰度分别为 14.430%、5.890%和 5.300%。物种组成热图与主坐标分析(PCoA)结果表明,杉木根中的内生细菌菌群组成与茎、叶中的内生细菌菌群组成存在明显差异,茎与叶中的内生细菌菌群组成相似。功能预测结果表明,多年生杉木根、茎、叶中内生细菌的代谢途径主要为生物合成。多年生杉木根、茎、叶中存在丰富的内生细菌,根中的内生细菌多样性、丰富度高于茎和叶。本研究揭示了杉木内生细菌的群落组成,可以为今后筛选、利用杉木内生细菌资源提供理论依据。

**关键词:** 杉木; 内生细菌; 高通量测序; 多样性; 相对丰度

**中图分类号:** S791.27;Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)12-2367-10

## Diversity analysis of endophytic bacteria in different organs of *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.

MENG Lei<sup>1,2</sup>, LIN Han<sup>1,2</sup>, DING Xinlan<sup>3</sup>, XIE Anqiang<sup>1,4</sup>, JIAN Lingjing<sup>1,2</sup>, WANG Yingzi<sup>5</sup>, CHEN Can<sup>1,4</sup>

(1.Forestry College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2.Key Lab for Forest Ecosystem Processes and Management in Fujian Province, Fuzhou 350002, China; 3.Fujian Shanghang Baisha Forestry Farm, Longyan 364200, China; 4.College of JunCao Science and Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 5.Fuzhou Nature Reserve Planning and Development Center, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** To explore the community composition and characteristics of endophytic bacteria in different organs of *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook., explore the rich microbial resources of *C. lanceolata*, and provide a theoretical basis for screening the characteristic microbial resources in *C. lanceolata*, the sequences of endophytic bacterial 16S rDNA V3-V4 high-variable regions in roots, stems and leaves of the perennial *C. lanceolata* were detected using high-throughput sequencing technology based on the Illumina Miseq platform. Moreover, the diversity and community structure of endophytic bacteria in different

收稿日期:2023-12-26

基金项目:福建省林业局重点项目(KLb21009B);福建农林大学横向科研项目(KH200200A、KH220045A)

作者简介:孟磊(1997-),男,陕西榆林人,硕士研究生,研究方向为森林培育技术。(E-mail)m1941262819@163.com

通讯作者:林晗,(E-mail)fjlinhan@163.com

organs of *C. lanceolata* were analyzed. The results of amplicon sequence variant (ASV) analysis showed that the number of ASV in *C. lanceolata* roots, stems and leaves was 7 108, 2 017 and 1 911, respectively. Proteobacteria, Actinobacteria and Acidobacteria were the dominant bacteria in different organs of *C. lanceolata*, the relative abundances were 67.930%,

13.800% and 6.250%. Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria and Actinobacteria were the main dominant classes, with relative abundances of 41.180%, 19.710% and 11.180%, respectively. 1174-901-12, P30B-42 and *Methylobacterium* were the main dominant genera, with relative abundances of 14.430%, 5.890% and 5.300%, respectively. The results of species composition heat map and principal coordinate analysis (PCoA) indicated that the composition of endophytic bacteria in the roots of *C. lanceolata* was significantly different from that in the stems and leaves, and the composition of endophytic bacteria in the stems and leaves was similar. The functional prediction results showed that the metabolic pathway of endophytic bacteria in roots, stems and leaves of perennial *C. lanceolata* was mainly biosynthesis. Rich endophytic bacteria were present in roots, stems and leaves of perennial *C. lanceolata*, and the diversity and abundance of endophytic bacteria in roots were higher than those in stems and leaves. This study reveals the community composition of endophytic bacteria in *C. lanceolata*, which can provide a theoretical basis for the screening and utilization of endophytic bacteria resources in *C. lanceolata* in the future.

**Key words:** *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.; endophytic bacteria; high-throughput sequencing; diversity; relative abundance

杉木作为亚热带森林中最具优势的经济树种,栽植面积广,具有生长快、品质好、产量高等特点<sup>[1]</sup>。植物内生细菌定殖于植物体内,参与植物生长发育的整个过程,与宿主植物构建长期的共生互利关系,是一种重要的微生物资源<sup>[2]</sup>。植物内生细菌可以促进植物的生长,增强宿主植物对生物胁迫和非生物胁迫的抵抗力,对病原菌有一定的抑制作用,还具有解磷和固氮等作用,在医药、农业和林业等领域也具备十分广泛的应用前景<sup>[3]</sup>。因此,分析杉木不同器官中内生细菌的群落组成差异以及多样性,对筛选和利用促生菌具有重要意义。

植物内生细菌对植物无害,通常寄生在健康植物细胞间隙,但也有一些可以进入细胞<sup>[4-5]</sup>。已经发现有大量的内生细菌可以与植物组织形成一系列的互利共生关系<sup>[6]</sup>。内生细菌的分布与植物的基因型、器官、生长阶段等因素均有关,内生细菌的数量和类型因这些因素而异<sup>[7]</sup>。目前研究植物微生物的方法主要有两类,一类是依靠培养基或者在合适的培养条件下对植物微生物进行培养开发,另一类是不依赖培养的方法,直接对微生物进行 DNA 测序<sup>[8]</sup>。传统培养微生物的方法有很多限制,如不可培养、需要选择性隔离以及培养的微生物数量较少等<sup>[9]</sup>。有研究表明,大约 99% 的微生物是不可以进行培养的<sup>[10]</sup>。Chen 等<sup>[11]</sup>使用传统培养基方法从杉木根、茎、叶中只提取出 14 种溶磷内生细菌。通过高通量测序的方法分析从植物内生细菌中提取出来的 DNA,这种方法可以快速确定复杂微生物群落的组成和多样性,克服了大多数内生细菌不可培养的问题<sup>[12]</sup>。陈美琪等<sup>[13]</sup>基于高通量测序发现虎耳草内生细菌有很高的丰富度,根部内生细菌多样性明显高于茎部和叶部。

吕佩等<sup>[14]</sup>基于高通量测序技术发现刺山柑不同部位的内生细菌多样性不同。近年来,利用高通量测序技术进行细菌分类学和系统发育研究已成为研究微生物群落多样性的主要方法之一<sup>[15]</sup>。

杉木作为中国南方重要的经济树种,关于杉木内生细菌群落结构及多样性的研究较少,对于杉木不同器官中内生细菌群落组成及丰富度也所知甚少,大多数研究使用纯培养的方式对微生物进行分析,对杉木内生细菌的多样性和完整群落组成研究的帮助较少,而且无法准确挑选出具有较好促生作用的内生细菌。本研究拟以采自福建省龙岩市白砂国有林场的多年生大径材杉木根、茎、叶为研究对象,采用扩增子测序技术对杉木根、茎、叶中的内生细菌群落的多样性和结构进行分析,解析多年生杉木不同器官中内生细菌的多样性及潜在功能,以期获得更加全面的杉木内生细菌多样性信息,为今后的杉木内生细菌开发奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区域概况

福建省龙岩市白砂国有林场位于东经 116°36'47.13",北纬 25°8'58.67",此地气候为亚热带海洋性季风气候,平均气温 18.5~20.5 °C,年平均降雨量为 1 029~1 372 mm,年平均日照时数为 1 809~2 064 h。全年气候温和,雨量丰富,全年无霜期 300 d 以上,冬无严寒,夏无酷暑。

### 1.2 样品采集

于 2022 年 7 月选取福建省龙岩市白砂国有林场多年生大径材杉木根、茎和叶作为试验样品,研究杉木不同器官中内生细菌的多样性。选取 10 株杉

木,使用三点取样法对每株杉木的根、茎和叶进行取样,共 30 个样品。将采集的样品收集在无菌采样袋中,放入装有冰袋的泡沫箱中。杉木的根、茎和叶分别用 GA、JB 和 YC 表示。

### 1.3 样品的表面消毒

采集新鲜的样品,用无菌水清洗,将其表面泥土等冲洗干净并晾干,置于 75.0%的乙醇溶液中 30 s,并用蒸馏水冲洗 3~5 次;然后置于 5.2%的次氯酸钠溶液中分别浸泡 1 min、2 min、3 min、4 min、5 min,使用无菌水冲洗 3~5 次。将最后一次冲洗的无菌水取 100  $\mu$ L 涂布在营养琼脂(NA)平板上作为对照组(37  $^{\circ}$ C、72 h),观察培养皿是否有菌落生长,若无,说明样品表面消毒已经彻底,若有,则说明消毒不完全。使用此方法检测灭菌是否完全,以选择最佳的灭菌时间组合。

### 1.4 样品 DNA 提取与 PCR 扩增

使用细菌 DNA 试剂盒(Omega 公司产品)提取样品细菌的总 DNA,并扩增细菌 16S rDNA 基因的 V3~V4 高变区。根据 Dong 等<sup>[16]</sup>描述的方法进行 PCR 扩增,引物为:338F(5'-barcode + ACTCCTACGGGAG-GCAGCA-3')、806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTA-AT-3'),其中 barcode 是用来区分同一文库中的不同样品。PCR 反应体系包括:0.25  $\mu$ L Q5 高保真度 DNA 聚合酶(2 U/ $\mu$ L)、5.00  $\mu$ L 反应缓冲液( $\times$ 5)、5.00  $\mu$ L GC 缓冲液( $\times$ 5)、2.00  $\mu$ L 脱氧核糖核苷三磷酸(10 mmol/L)、2.00  $\mu$ L DNA 模板、8.75  $\mu$ L 双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)以及正向和反向引物各 1.00  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L)。PCR 热循环程序是在 98  $^{\circ}$ C 下初始变性 5 min,然后是 28 个循环,包括在 98  $^{\circ}$ C 下变性 30 s,在 55  $^{\circ}$ C 下退火 30 s,在 72  $^{\circ}$ C 下延伸 30 s,最后在 72  $^{\circ}$ C 下延伸 5 min。PCR 产物经凝胶电泳分离,使用试剂盒对目标片段进行回收,送至上海派森诺生物科技股份有限公司进行序列测定和分析<sup>[17]</sup>。

### 1.5 数据处理与分析

用 Demux 对原始序列数据进行解复用,然后使用 Cutadapt 插件切割引物,用 DADA 2 对序列进行质量过滤、降噪、合并和嵌合体去除<sup>[18]</sup>。使用 QIIME 2 和 R 包(v4.2.1)进行序列数据分析。利用 QIIME 2 中的扩增子序列变体(ASV)表计算  $\alpha$  多样性估计值(Chao 1 指数、Shannon 指数、Simpson 指数、Observed species 指数和 Goods coverage 指数),并以箱形图显示。测序分析中生成的 ASV 文件导

入 PICRUST 2 中,以预测与杉木内生细菌群落相关的生物学功能<sup>[19]</sup>。基于 MetaCyc(<https://metacyc.org/>)数据库鉴定 16S rRNA 功能基因。

## 2 结果与分析

### 2.1 ASV 数量分析

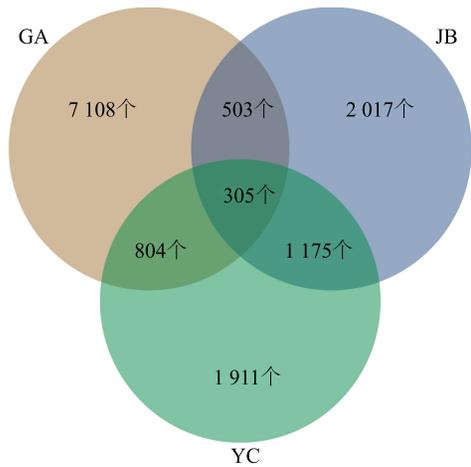
图 1 显示,多年生杉木根中特有的细菌 ASV 数量为 7 108 个,茎中特有的细菌 ASV 数量为 2 017 个,叶中特有的细菌 ASV 数量为 1 911 个,其中根和茎共有的细菌 ASV 数量为 503 个,根和叶共有的细菌 ASV 数量为 804 个,叶和茎共有的细菌 ASV 数量为 1 175 个,根、茎、叶共有的细菌 ASV 的数量为 305 个。根中含有的细菌 ASV 数量最多,叶和茎中较少。

### 2.2 杉木不同器官中内生细菌的 $\alpha$ 多样性分析

计算杉木不同器官中内生细菌的  $\alpha$  多样性,分析多年生杉木内生细菌的丰富度和多样性,采用 Kruskal-Wallis 检验和 Dunn 事后检验对杉木根、茎、叶中内生细菌的多样性进行统计分析,结果(图 2)表明,杉木不同器官中的内生细菌多样性指数存在一定的差异。Goods coverage 指数的最小值为 0.997 8,表明几乎所有的内生细菌都能在杉木不同器官中被检测到。通过观察 Chao1 指数、Observed species 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数,可以发现杉木根、茎、叶中存在丰富的内生细菌,丰富度和多样性总体表现为根>茎>叶,但茎和叶中内生细菌的相对丰度相差不大。

### 2.3 物种丰度及群落结构组成

门水平的分类结果(图 3)表明,杉木根、茎、叶中的内生细菌主要由变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、软壁菌门(Tenericutes)、衣原体门(Chlamydiae)、蓝菌门(Cyanobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、装甲菌门(Armatimonadetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)内生细菌组成,平均相对丰度分别为 67.930%、13.800%、6.250%、4.670%、4.370%、0.840%、0.630%、0.450%、0.450%和 0.270%。在杉木叶中发现大量厚壁菌门内生细菌,相对丰度为 11.050%,但根和茎中厚壁菌门内生细菌较少,相对丰度分别为 0.460%和 2.500%;在杉木根中软壁菌门内生细菌的相对丰度为 13.090%,在茎和叶中软壁菌门内生细菌的相对丰度分别为 0.005%和 0.007%。

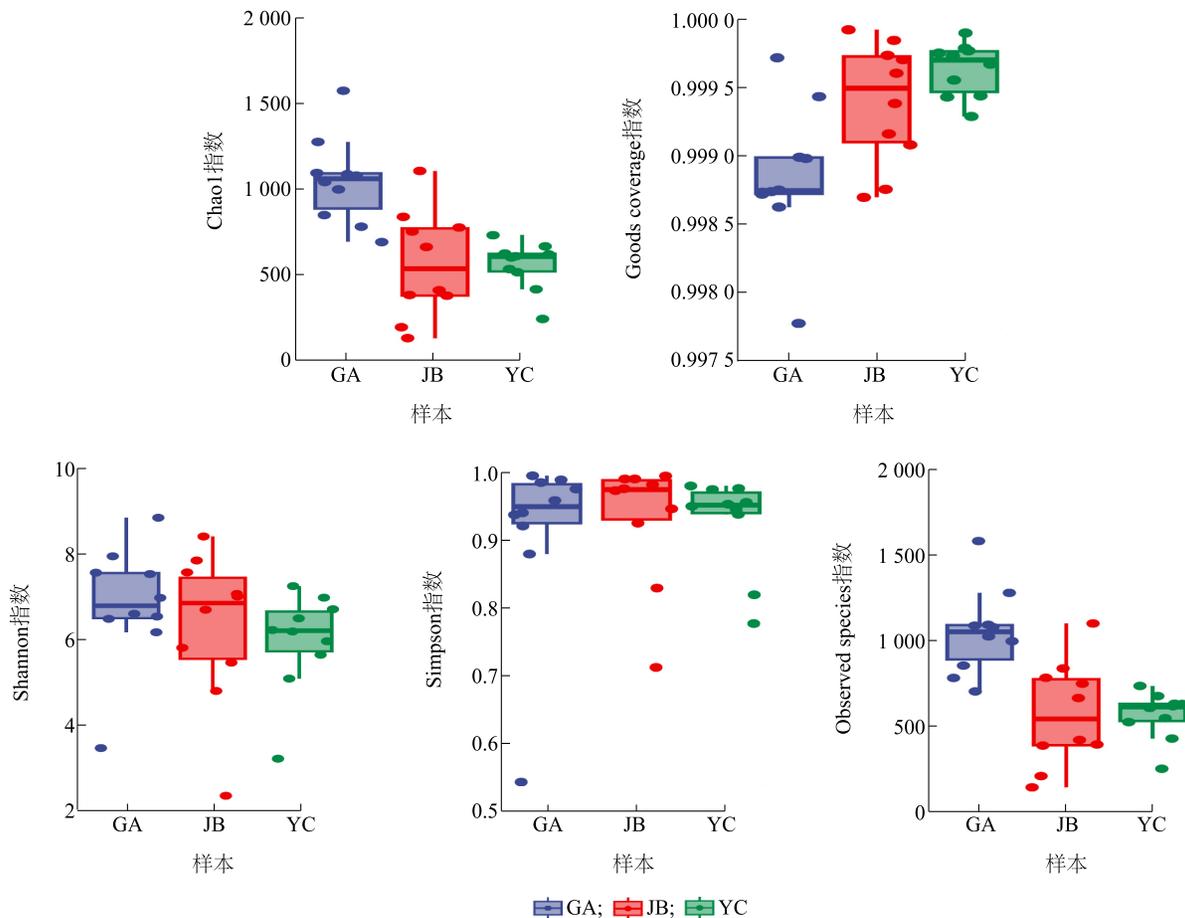


GA、JB 和 YC 分别表示杉木的根、茎和叶中的内生细菌样本。

图 1 杉木不同器官中内生细菌的韦恩图

Fig.1 Venn diagram of endophytic bacteria in different organs of *Cunninghamia lanceolata*

纲水平的分类结果(图 4)表明,杉木不同器官中内生细菌主要由  $\alpha$ -变形菌纲 (Alphaproteobacteria)、 $\gamma$ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria)、放线菌纲 (Actinobacteria)、 $\delta$ -变形菌纲 (Deltaproteobacteria)、酸杆菌纲 (Acidobacteria)、柔膜菌纲 (Mollicutes) 和芽孢杆菌纲 (Bacilli) 内生细菌组成,平均相对丰度分别为 41.180%、19.710%、11.180%、7.000%、6.220%、4.370%和 4.240%。放线菌纲内生细菌在杉木根和茎中占比较高,相对丰度分别为 16.150%和 11.470%,但在叶中相对丰度仅为 5.920%;柔膜菌纲内生细菌在杉木根部的相对丰度为 13.090%,但在茎和叶中的相对丰度极低,都仅为 0.010%;芽孢杆菌纲内生细菌在杉木叶中的相对丰度为 9.960%,在根部和茎部的相对丰度仅为 0.410%和 2.350%。

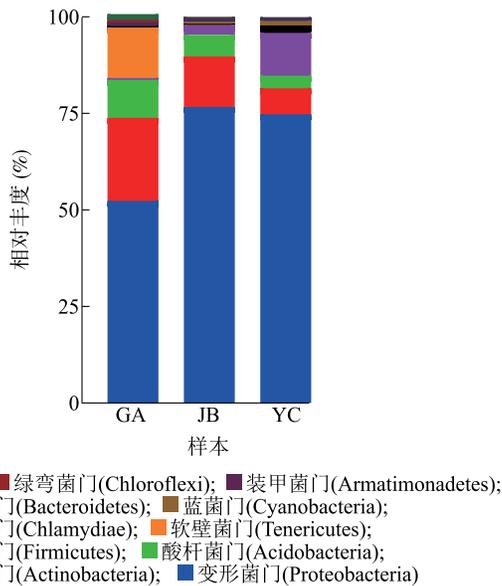


GA、JB 和 YC 分别表示杉木的根、茎和叶中的内生细菌样本。

图 2 杉木不同器官中内生细菌的  $\alpha$  多样性

Fig.2 The  $\alpha$  diversity of endophytic bacteria in different organs of *Cunninghamia lanceolata*

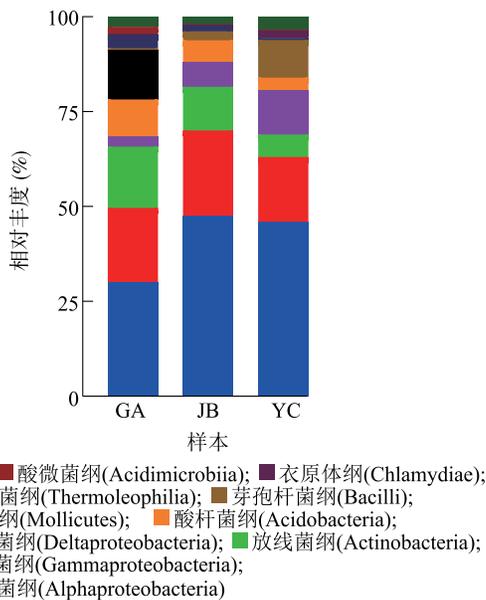
属水平的分类结果(图 5)表明,1174-901-12、P30B-42、甲基杆菌属 (*Methylobacterium*)、植原体暂



GA、JB 和 YC 分别表示杉木的根、茎和叶中的内生细菌样本。

图3 杉木不同器官中内生细菌在门水平的相对丰度

Fig.3 The relative abundance of endophytic bacteria in different organs of *Cunninghamia lanceolata* at the phylum level



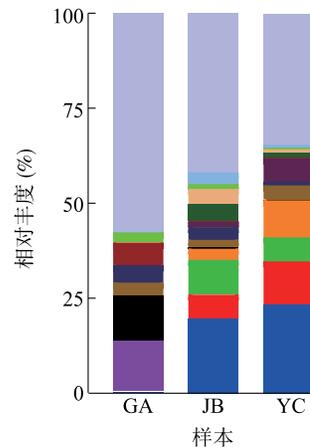
GA、JB 和 YC 分别表示杉木根、茎和叶中的内生细菌样本。

图4 杉木不同器官中内生细菌在纲水平的相对丰度

Fig.4 The relative abundance of endophytic bacteria in different organs of *Cunninghamia lanceolata* at the class level

定属 (*Candidatus\_Phytoplasma*)<sup>[20-21]</sup>、甲基细胞菌属 (*Methylocella*)、热酸菌属 (*Acidothermus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 内生细菌在杉木根、茎、叶中的平均相对丰度分别为 14.430%、5.890%、5.300%、4.370%、4.220%、4.140% 和 3.060%。1174-901-12

为杉木内生细菌的核心菌属,平均相对丰度最高。1174-901-12、P3OB-42、甲基杆菌属、甲基细胞菌属内生细菌在杉木叶和茎中的相对丰度较高,但在根中的相对丰度较低;此外,杉木根中植原体暂定属和热酸菌属内生细菌的相对丰度较高,但在叶和茎中相对丰度较低。



GA、JB 和 YC 分别表示杉木根、茎和叶中的内生细菌样本。

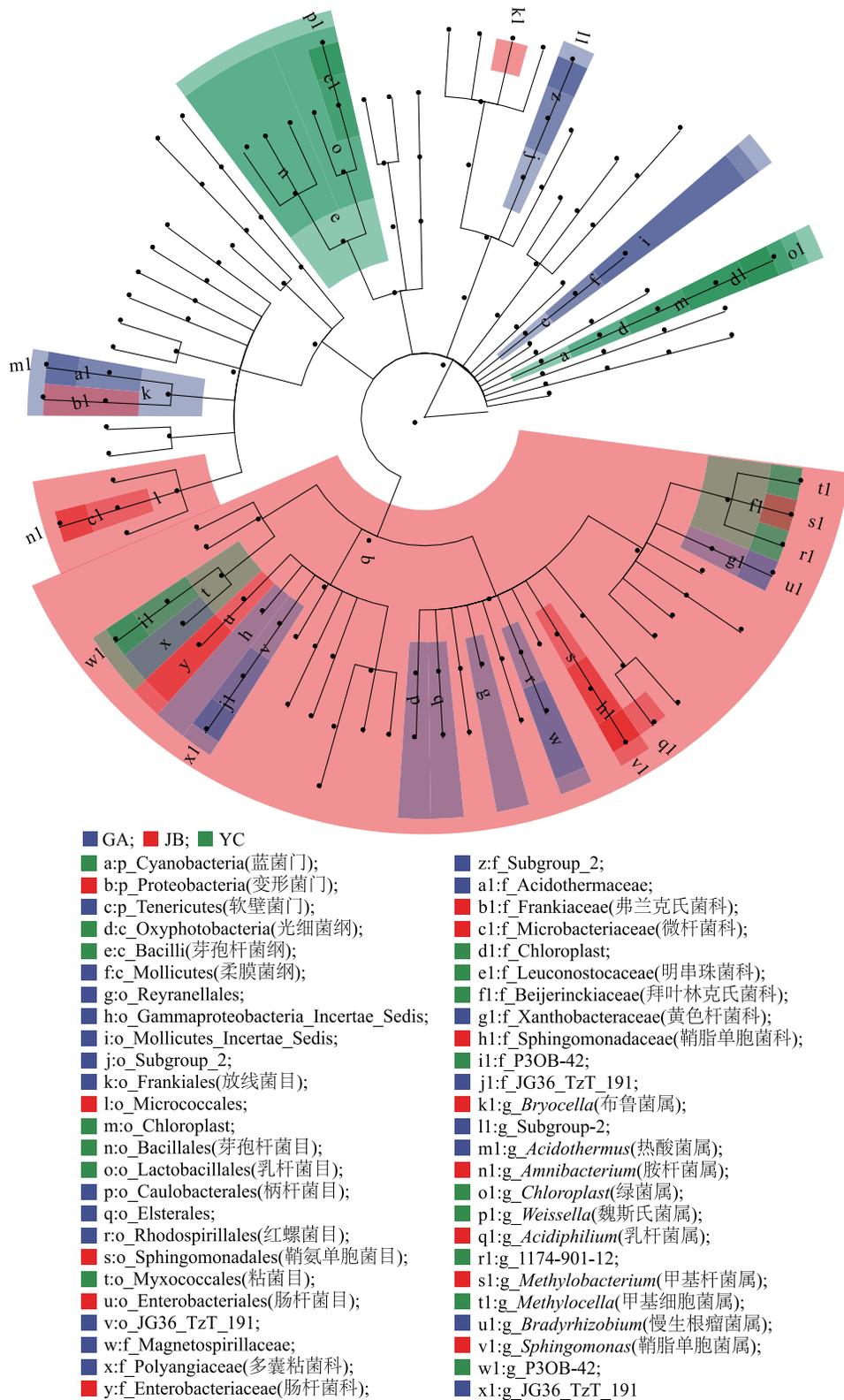
图5 杉木不同器官中内生细菌在属水平的相对丰度

Fig.5 The relative abundance of endophytic bacteria in different organs of *Cunninghamia lanceolata* at the genus level

为了更好地解析多年生杉木不同器官中微生物之间的相互作用,采用线性判别分析 (LEfSe) 对杉木不同器官的生物标志物进行定量分析。图 6 显示,杉木不同器官中内生细菌的生物标志物相对丰度存在显著差异。在根中,软壁菌门和热酸菌属内生细菌的相对丰度较高;在茎中,变形菌门、鞘脂单胞菌属和甲基杆菌属内生细菌的相对丰度较高;在叶中,蓝菌门和 1174-901-12 内生细菌的相对丰度较高。根据 LEfSe 分析的分类学分支图 (线性判别分析阈值 = 3.74),可以看出这些细菌在不同器官中的分布差异。

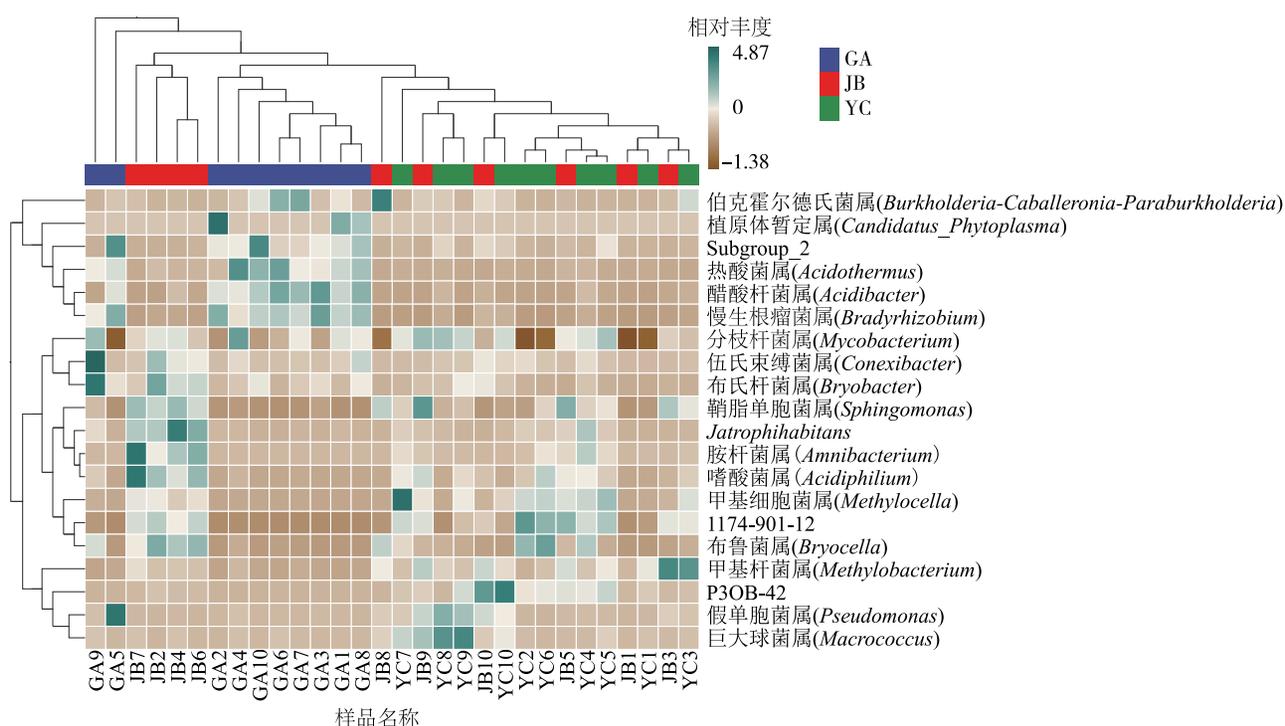
## 2.4 组间相似性分析

通过物种组成热图比较样本间的物种组成差异。图 7 显示,多年生杉木根中的内生细菌属级分布与茎、叶存在明显差异,其中植原体暂定属、热酸菌属、醋酸杆菌属 (*Acidibacter*) 和慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 内生细菌在多年生杉木根中的相



GA、JB 和 YC 分别表示杉木根、茎和叶中的内生细菌样本。p\_:门;c\_:纲;o\_:目;f\_:科;g\_:属。图中的节点从内到外分别代表了不同分类层级,包括门、纲、目、科和属,节点的大小则表示各分类单元的平均相对丰度高低。空心节点表示组间差异不显著,而有颜色填充的节点则表示组间差异显著( $P < 0.05$ )。

图 6 基于分类等级树的组间差异分类单元展示图  
 Fig.6 Cladogram based on classification rank tree



GA、JB 和 YC 分别表示杉木的根、茎和叶中的内生细菌样本。

图 7 杉木不同器官中内生细菌物种组成热图

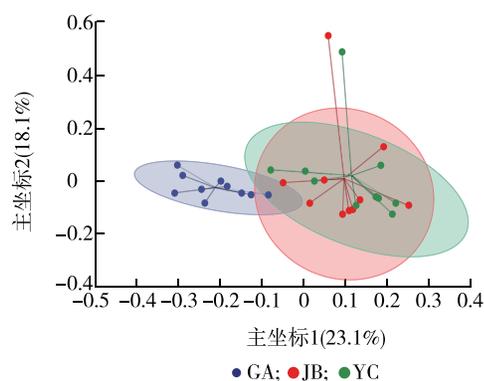
Fig.7 Heat map of the species composition of endophytic bacteria in different organs of *Cunninghamia lanceolata*

对丰度较高;茎和叶中的细菌属级分布差异不明显,但相对丰度有差别,其中鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)、*Jatrophihabitans*、胺杆菌属(*Amnibacterium*)和嗜酸菌属(*Acidiphilium*)内生细菌在多年生杉木茎中的相对丰度较高,1174-901-12、布鲁菌属(*Bryocella*)、P3OB-42、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和巨大球菌属(*Macrococcus*)内生细菌则在多年生杉木叶中的相对丰度较高。由图中的颜色变化可知,多年生杉木根中的内生细菌相对丰度高于茎和叶中的内生细菌相对丰度,表明多年生杉木根中内生细菌的多样性和丰富度都很高。

图 8 显示,通过对杉木不同器官中内生细菌的群落组成结构进行主坐标分析(PCA)可知,主坐标 1 贡献率为 23.1%,主坐标 2 贡献率为 18.1%,总贡献率为 41.2%,能够在一定程度上解释群落组成差异。根中内生细菌的遗传距离相对于茎和叶中内生细菌较远,叶和茎中的内生细菌群落结构相似,这与物种组成热图的分析结果一致。

## 2.5 杉木内生细菌的功能预测分析

将 16S rRNA 的功能预测结果与 MetaCyc 数据库进行对比,图 9 显示,多年生杉木根、茎、叶中内生细菌



GA、JB 和 YC 分别表示杉木根、茎和叶中的内生细菌样本。

图 8 杉木不同器官内生细菌主坐标分析图

Fig.8 Principal coordinate analysis of endophytic bacteria in different organs of *Cunninghamia lanceolata*

菌的代谢途径主要为生物合成,主要涉及氨基酸生物合成,丰度为33 711.14;辅因子、辅基、电子载体和维生素生物合成,丰度为31 681.06;核苷和核苷酸生物合成,丰度为28 701.72;脂肪酸和脂质的生物合成,丰度为22 262.46;碳水化合物生物合成,丰度为11 895.81。降解/利用/同化以及前体代谢物和能量的产生途径中内生细菌丰度也相对较高。

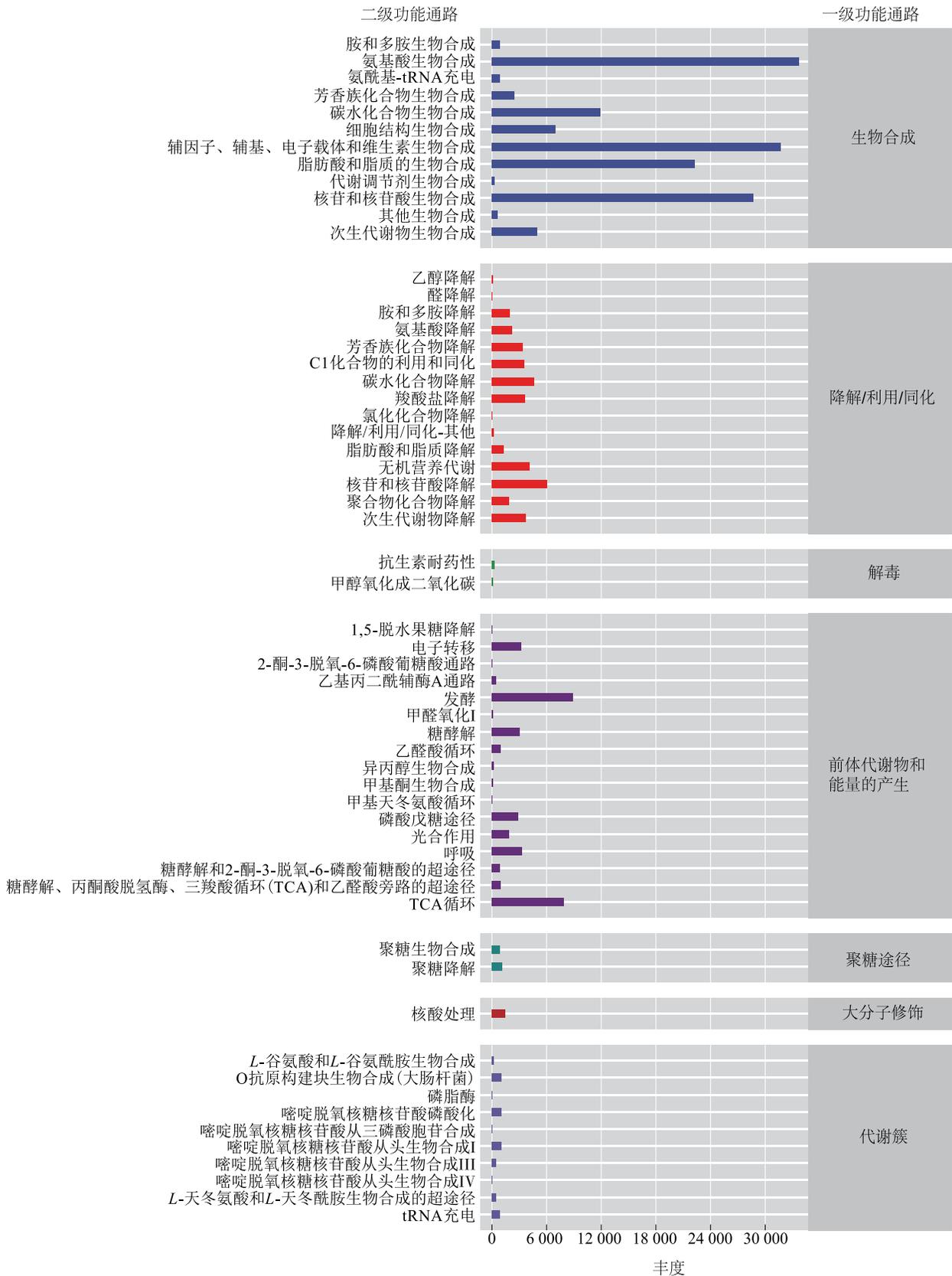


图9 杉木不同器官中内生细菌的代谢通路

Fig.9 Metabolic pathways of endophytic bacteria in different organs of *Cunninghamia lanceolata*

### 3 讨论

植物内生细菌在促进植物生长等方面发挥着重要作用<sup>[22]</sup>,然而关于杉木中内生细菌菌群的研究却少之又少。人工培养的方法不可能将所有的内生细菌从植物体内提取出来并进行鉴定,高通量测序技术使得在不培养细菌的情况下对细菌进行鉴定成为了可能<sup>[23]</sup>。本研究通过扩增子测序技术,对多年生杉木不同器官中内生细菌的多样性及其群落组成差异进行分析,结果表明,杉木根、茎、叶中存在大量的内生细菌。李亮亮等<sup>[24]</sup>发现花生根中内生细菌的多样性最高,其次是茎和叶。本研究中的 $\alpha$ 多样性分析结果表明,多年生杉木根、茎、叶中的内生细菌具有丰富的多样性,但杉木根、茎、叶中的内生细菌组成和丰富度都存在差异,其中杉木叶中的内生细菌丰富度最低,根中含有的内生细菌丰富度和多样性都要高于茎和叶,因为根系是内生细菌进入植物体内的入口,根系中次生根较多,而且机械损伤和病虫害造成的伤口也较多,因此内生菌聚集较多<sup>[25]</sup>。根系的内生细菌主要通过生物固氮、产植物激素、促进植物营养吸收和促进菌根真菌生长的方式促进宿主植物生长<sup>[26-27]</sup>。同时也发现了多年生杉木不同器官中的一些主要门类和核心属类以及一些相对丰度极低的种群,这也是高通量测序的优势之一。对多年生杉木不同器官中内生细菌进行分析发现,变形菌门为优势菌门,平均相对丰度为 67.930%,放线菌门、酸杆菌门、厚壁菌门和软壁菌门的相对丰度也较高。变形菌门的内生细菌对植物的生长发育、光合作用和抗胁迫能力均有一定影响<sup>[28]</sup>,放线菌门是农业抗生素菌群的重要来源<sup>[29]</sup>。在杉木叶中发现大量厚壁菌门内生细菌,相对丰度为 11.050%,但根和茎中厚壁菌门内生细菌较少,相对丰度分别为 0.460%和 2.500%;在杉木根中软壁菌门内生细菌的相对丰度为 13.090%,在茎和叶中软壁菌门内生细菌的相对丰度分别为 0.005%和 0.007%。这一结果表明,杉木不同器官中内生细菌存在一定的特异性。对多年生杉木不同器官中内生细菌进行分析, $\alpha$ -变形菌纲为优势菌纲,平均相对丰度达到了 41.180%, $\gamma$ -变形菌纲、放线菌纲、 $\delta$ -变形菌纲相对丰度也较高,其中 $\alpha$ -变形菌纲、 $\gamma$ -变形菌纲和 $\delta$ -变形菌纲都属于变形菌门。多年生杉木不同器官中内生细菌的优势菌属为 1174-901-12、P30B-42 和甲基杆菌

属,平均相对丰度分别为 14.430%、5.890% 和 5.300%,植原体暂定属、甲基细胞菌属和热酸菌属的平均相对丰度也较高。甲基杆菌属和甲基细胞菌属可以促进植物的氮代谢和硫代谢<sup>[30]</sup>。1174-901-12、P30B-42、甲基杆菌属、甲基细胞菌属内生细菌在杉木茎和叶中相对丰度很高,但在根中相对丰度较低;植原体暂定属和热酸菌属内生细菌在杉木根中相对丰度较高,但在茎和叶中相对丰度较低。这一结果也表明杉木不同器官中内生细菌存在一定的特异性。物种组成热图分析结果表明,多年生杉木根中的细菌群落组成相对于茎、叶中的细菌群落组成存在较大差异,根中内生细菌的丰富度和多样性都较高,茎、叶中的细菌群落组成差异较小,但相对丰度存在明显差异,PCoA 结果与物种组成热图分析结果一致,验证了这一结果的准确性,这也与 Huo 等<sup>[31]</sup>研究濒危中草药北沙参内生细菌的结果相似。功能预测结果显示,多年生杉木根、茎、叶中的内生细菌的代谢通路主要有生物合成、降解/利用/同化及前体代谢物和能量的产生等,但大部分非重复基因序列都聚集在生物合成通路中,由此推断内生细菌通过调控杉木的生物合成,促进杉木的生长发育,为杉木与内生细菌互作奠定了基础。在今后的研究中,可以通过对杉木内生细菌中与氨基酸、辅因子、辅基、电子载体、维生素、核苷、核苷酸和碳水化合物的生物合成相关的基因进行分析,并结合传统的分离培养方法筛选出功能菌,再将筛选出的内生细菌与杉木幼苗互作,从而促进杉木的生长发育。

### 4 结论

杉木中蕴含的内生细菌具有很高的丰富度和多样性,杉木不同器官中内生细菌的群落结构、优势菌门、优势菌属和基因功能都存在差异性,提取目标菌株时可以根据杉木不同器官中内生细菌的菌属差异,以高通量测序的结果为对照,调配相对应的培养基,选取杉木不同器官,更容易培养出需要的杉木内生细菌。

#### 参考文献:

- [1] LIU C, ZHAO R Y. Study on land ecological assessment of villages and towns based on GIS and remote sensing information technology [J]. Arabian Journal of Geosciences, 2021, 14(6): 529.
- [2] YAN K, HE L M, ZHOU W H, et al. 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.
- [3] AFZAL I, SHINWARI Z K, SIKANDAR S, et al. Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants[J]. Microbiological Research, 2019, 221: 36-49.
- [4] FRANK A C, SALDIERNA GUZMÁN J P, SHAY J E. Transmission of bacterial endophytes[J]. Microorganisms, 2017, 5(4): 70.
- [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: 126794.
- [6] HASSANI M A, DURÁN P, HACQUARD S. Microbial interactions within the plant holobiont[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 58.
- [7] HUANG Y H. Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity of four *Allium* species[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 15271.
- [8] OITA S, CAREY J, KLINE I, et al. Methodological approaches frame insights into endophyte richness and community composition [J]. Microbial Ecology, 2021, 82(1): 21-34.
- [9] ERCOLINI D, MOSCHETTI G, BLAIOTTA G, et al. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2001, 24(4): 610-617.
- [10] SCHLOSS P D, HANDELSMAN J. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot[J]. Genome Biology, 2005, 6(8): 229.
- [11] CHEN J Q, ZHAO G Y, WEI Y H, et al. Isolation and screening of multifunctional phosphate solubilizing bacteria and its growth-promoting effect on Chinese fir seedlings[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 9081.
- [12] MANTER D K, DELGADO J A, HOLM D G, et al. Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots[J]. Microbial Ecology, 2010, 60(1): 157-166.
- [13] 陈美琪, 王兴, 黎俊彦, 等. 基于高通量测序和组织分离法的虎耳草内生真菌多样性分析及其抗氧化活性研究[J]. 中草药, 2023, 54(6): 1924-1934.
- [14] 吕佩, 王新绘, 刘晓颖, 等. 药用植物刺山柑不同部位细菌群落结构及其多样性[J]. 微生物学报, 2023, 63(10): 3939-3954.
- [15] AKRAM A, MALEY M, GOSBELL I, et al. Utility of 16S rRNA PCR performed on clinical specimens in patient management[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2017, 57: 144-149.
- [16] DONG W W, XUAN F L, ZHONG F L, et al. Comparative analysis of the rats' gut microbiota composition in animals with different ginsenosides metabolizing activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(2): 327-337.
- [17] 杨敬敬, 韩烁, 王霞, 等. 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.
- [18] CALLAHAN B J, MCMURDIE P J, ROSEN M J, et al. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. Nature Methods, 2016, 13(7): 581-583.
- [19] DOUGLAS G M, LANGILLE M G I. Current and promising approaches to identify horizontal gene transfer events in metagenomes [J]. Genome Biology and Evolution, 2019, 11(10): 2750-2766.
- [20] FIRRAO G, ANDERSEN M, BERTACCINI A, et al. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(4): 1243-1255.
- [21] RAZIN S, YOGEV D, NAOT Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(4): 1094-1156.
- [22] VANDENKOOORNHUYSE P, QUAISER A, DUHAMEL M, et al. The importance of the microbiome of the plant holobiont[J]. New Phytologist, 2015, 206(4): 1196-1206.
- [23] REN F, DONG W, YAN D H. Endophytic bacterial communities of Jingbai pear trees in North China analyzed with Illumina sequencing of 16S rDNA[J]. Archives of Microbiology, 2019, 201(2): 199-208.
- [24] 李亮亮, 雷高, 李磊, 等. 基于高通量测序分析花生不同器官内生细菌群落多样性[J]. 花生学报, 2021, 50(2): 1-7, 20.
- [25] ZHAO B X, YAN J F, CHEN X, et al. The diversity and organ distribution of endophytic bacteria of sweet cherry [J]. Scienceasia, 2022, 48(6): 839-846.
- [26] SPAEPEN S, VANDERLEYDEN J, REMANS R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2007, 31(4): 425-448.
- [27] 罗阳兰. 蕙兰内生真菌多样性及其促生能力的研究[D]. 汉中: 陕西理工大学, 2019.
- [28] 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]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2022.
- [29] 任丽娟, 何聘, 邢鹏, 等. 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.
- [30] 艾佳. 贵州典型湿地中甲烷氧化菌的群落结构及功能研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2022.
- [31] HUO X W, WANG Y, ZHANG D W, et al. Characteristics and diversity of endophytic bacteria in endangered Chinese herb *Glehnia littoralis* based on Illumina sequencing[J]. Polish Journal of Microbiology, 2020, 69(3): 283-291.

(责任编辑: 王妮)