

樟树根际和内生细菌群落结构差异研究

王颜波^{1,2}, 柳俊华¹, 邓梦颖¹, 邓凌帆³, 张建强³, 刘苗苗³, 金志农^{1,2}

(1.南昌工程学院 江西省樟树繁育与开发利用工程研究中心, 江西南昌 330099;

2.国家林业和草原局木本香料[华东]工程技术研究中心, 江西南昌 330099;

3. 江西农业大学 林学院, 江西南昌 330045)

摘要:以芳樟醇型樟树根际土壤、根、茎、叶和果为材料,通过 16S rRNA 扩增子测序评估根际土壤细菌及不同组织器官内生细菌群落的多样性。结果表明,樟树根际土壤细菌群落结构主要由 γ -变形菌纲、 α 形变形菌纲、放线菌纲、嗜热油菌纲、芽孢杆菌纲、酸杆菌纲等组成,而 γ 形变形菌纲是樟树主要的内生细菌。细菌多样性表现出依赖于植物器官的现象,证实了樟树根际土壤及不同组织器官内生细菌群落的生态位分化。确定了樟树根际土壤和不同组织器官的核心细菌。研究结果对园林绿化用樟树的新品种创制、栽培养护和樟树相关微生物的开发利用具有重要意义。

关键词: 樟树; 根际土壤; 内生细菌; 扩增子测序; 生态位变异

Structural variability in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of *Cinnamomum camphora* (Linn.) Presl

Abstract: The rhizosphere soil, root, stem, leaf and fruit of linalool camphor tree were used to evaluate the structural diversity of rhizosphere and endosphere bacterial community by 16sRNA amplification. The results showed that the bacterial community structure in the rhizosphere soil of camphor tree was mainly composed of Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Actinobacteria, Thermoleophilia, Bacilli and Acidobacteriae and so on. Gammaproteobacteria was the main endophytic bacteria of camphor tree. Bacterial diversity depended on plant organs, which confirmed the niche differentiation of endophytic bacterial communities in the rhizosphere soil and different organs of camphor trees. The core bacteria in the rhizosphere soil and different organs of camphor trees were determined. The results are of great significance for the creation, cultivation and conservation of new varieties of camphor trees for landscaping and the development and utilization of microorganisms related to camphor trees.

Key words: *Cinnamomum camphora*; Rhizosphere soil; Endophytic bacteria; Amplicon sequencing; Niche differentiation

樟树(*Cinnamomum camphora* (L.) Presl)是樟科樟属植物,主要分布于热带和亚热带,我国樟树分布大体以长江为界,南至两广及西南,尤以江西、湖南、浙江、福建、台湾等东南沿海省分布最多,垂直分布可达海拔 1 000 m^[1]。樟树各组织富含精油,依据叶片精油主要化学成分不同,可将樟树分为芳樟醇型、柠檬醛型、樟脑型、桉叶油素型、龙脑型等化学类型,因此,樟树不仅可以用于用材、景观等领域,还是医药、化工原料、天然香料的重要经济树种^[2]。

植物内生菌是指全部阶段或部分阶段生活在健康的植物细胞内或细胞间隙的微生物资源^[3],它们对宿主植物的作用又分为有益的、中性的和有害的^[4]。

内生细菌长期寄生在宿主植物体内,与宿主植物共生进化,在这过程中二者可以是互利共生,也可以是无害或者微害的寄生,还可以寄生和共生相互转化。宿主植物可以为细菌的存活提供所需的养分和适宜的内生环境。同时,内生细菌在生长的过程中产生的一些次生代谢产物反过来也可为植物生长提供营养成分,促进宿主植物的生长发育、增强对外界环境的应激性等^[5]。内生细菌和宿主植物的关系并非固定的,共生和寄生可因寄宿环境的改变而转化。因此,本文以芳樟醇型樟树根际土壤、根、茎、片 and 果为材料,通过 16S rRNA 扩增子测序评估根际土壤细菌及不同组织器官内生细菌群落的多样性,旨在为樟树的新品种创制、栽培养护和樟树相关微生物的开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地位于江西省南昌市南昌工程学院樟树繁育与开发利用工程研究中心扦插圃，地理坐标为 116 °1'19.3719, 28 °41'33 为为，属亚热带湿润季风气候区，气候湿润温和，日照充足，降雨量充沛，年平均降水量 1 600~1 700mm，年平均气温 17.1 ~17.8 °C，年日照时间 1 723~1 820 h。

1.2 实验材料及取样方法

实验材料为樟树的根际土壤、根、茎、叶和果实。于 2020 年 10 月上旬选取年龄、长势一致的芳樟醇型樟树无性系，采集其距离表地面 10cm 处，直径 0.5-1.0cm 的根系及根表面抖落的土壤，地上部分采集一年生枝条、成熟叶片和果实，将取下的样本立即放置于保温箱内(内含冰袋)，带回实验室用于微生物 DNA 提取。实验样本采集于樟树扦插圃中的 3 个区组，每个区组采集 3 株同一无性系樟树的材料混合作为一个重复，共 15 个样本。

1.3 样品处理及 DNA 提取

为去除样本表面的杂菌，分别对根、茎、叶、果进行处理。土壤直接取样，使用 Power Soil DNA 试剂盒(MoBio, Carlsbad, CA, USA)提取微生物 DNA。根、茎、叶和果，首先用无菌水冲洗表面土壤和灰尘，用 70%的酒精浸泡 2min，再用 2.5%浓度的次氯酸钠溶液浸泡 5min，最后用无菌水冲洗 5 遍。使用 Power Soil DNA 试剂盒提取微生物 DNA。

1.4 PCR 扩增及 Illumina MiSeq 测序

细菌 16S rRNA 扩增子文库构建采用两步 PCR 法。第 1 轮 PCR 扩增引物序列为 799F /1392R (5-AACMGGATTAGATACCCKG-3, 5-ACGGGCGGTCTCTRC-3)，使用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒(Axygen Biosciences, Union City, CA, USA)从凝胶切片中回收 DNA。第 2 轮 PCR 扩增引物序列为 799F/1193R (5-AACMGGATTAGATACCCKG- 3, 5-ACGTCATCCCCACCTTCC-3) (扩增片段长度=394 bp)。第 2 轮 PCR 产物经过纯化后使用 QuantiFluor-ST (Promega, Madison, WI, USA)进行定量。最后，扩增子文库由上海美吉生物医药科技有限公司使用 Illumina MiSeq 平台双端测序(Illumina, San Diego, CA, USA)。

1.5 测序数据处理及统计分析

下机数据经过质控后，去除引物及低质量序列。用 UPARSE (version 7.1[http:// drive5. com/uparse/](http://drive5.com/uparse/))对可操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTU)进行聚类(97%的序列相似性)。随后采用 Silva 132 数据库(<http://www.arb-silva.de>)进行比对，从数据集中去除非细菌序列。采用 SPSS 26.0 分析植物不同组织器官(微生物不同生态位)对细菌丰度的影响。主坐标分析(Principal co-ordinates analysis, PCoA)在 R3.5.1([http:// www. R-project. org/](http://www.R-project.org/))中进行。

2 结果与分析

2.1 Illumina 测序的质量指标

根据检测我们分别在根际土壤、根、茎、叶和果实的内生细菌扩增子文库获得了 34846、49481、52870、50694 和 54410 个有效 reads，平均读长分别为 376、377、378、378 和 378bp。通过与数据库的对比发现，在优化的 PCR 条件下，所有内生细菌样本中非目标序列(线粒体，叶绿体，质体)分别占总序列的 0.00%、0.40%、1.14%、0.55%和 3.16%。绝大多数的内生细菌扩增子序列可以被注释且分类，只有小部分在门水平无法分类识别，5 种样本中分别占 0.17%、0.02%、0.02%、0.01%和 0.00%(表 1)。为控制测序的影响，在分析之前，我们对每个样品的序列进行标准化，抽平到序列最少的样本序列数目：31246 个，归类为 2648 个 OTU。

表 1 Illumina 测序

质量指标	根际土壤	根	茎	叶	果
------	------	---	---	---	---

平均序列数	34846±2641	49481±3115	52870±3433	50694±2480	54410±2206
平均读长	376	377	378	378	378
非目标序列 (%)	0	0.40±0.06	1.14±0.25	0.55±0.05	3.16±1.35
门水平未分类序列 (%)	0.17±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.01±0.00	0

2.2 樟树根际和内生细菌 α 多样性

多样性的计算主要基于 OTU 丰富度，均匀度和多样性指数。通过对樟树根际和内生细菌 OTU 丰富度分析发现，根际土壤细菌 OTU 丰富度显著高于叶片和果实内生细菌($p<0.05$)，根和茎内生细菌 OTU 丰富度与其他样本无显著差异（图 1）。土壤细菌 OTU 均匀度和多样性均显著高于根、茎、叶、果实内生细菌($p<0.01$) (图 2、3)。由此我们可以得出根际土壤中的细菌丰富度，均匀值和多样性都高于植物组织器官的内生细菌。

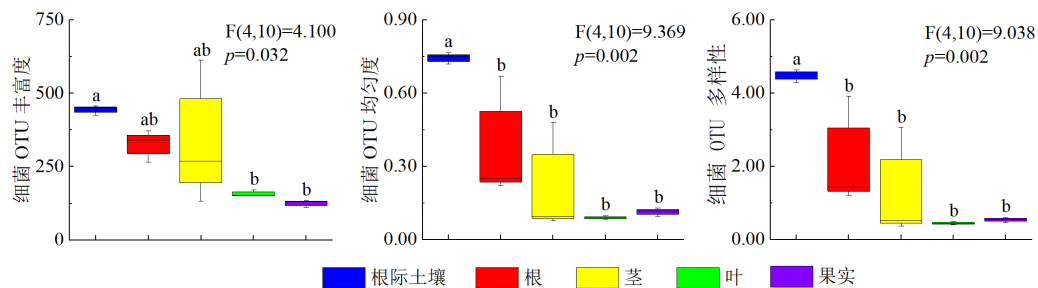


图 1 内生细菌 α 多样性

2.3 樟树根际和内生细菌 β 多样性

为研究樟树根际和不同组织器官内生细菌的差异性和相似性，我们采取主坐标分析(PCoA)对樟树根际和内生细菌 β 多样性进行评估(图 4)。在 OTU 水平上，根际土壤，根，茎，叶，果 5 组样本被分为 3 个区域，其中根际土壤、根明显与地上部分分开。茎、叶、果 3 组样本处于同一区域但能被明显区分。主成分 1 解释了总变异的 78.06%，主成分 2 解释了总变异的 13.14%。

2.4 内生细菌群落结构

在纲水平上，我们统计了樟树根际土壤与内生细菌的丰富度。结果显示樟树根际土壤细菌群落最为丰富，主要由 γ-变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)、α-变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)、放线菌纲(*Actinobacteria*)、嗜热油菌纲(*Thermoleophilia*)、芽孢杆菌纲(*Bacilli*)、酸杆菌纲(*Acidobacteriae*)等组成。而 γ-变形菌纲是樟树主要的内生细菌，在根和茎中丰度均大于 70%，尤其是叶和果中丰度大于 95%，其次是 α-变形菌纲(图 5)。

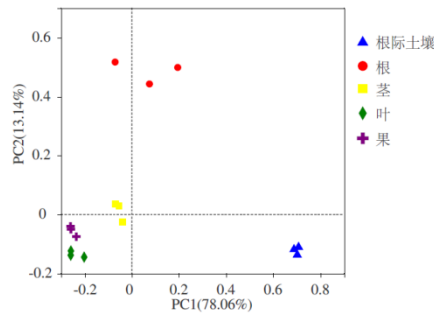


图 2 内生细菌群落的主坐标(PCoA)分析

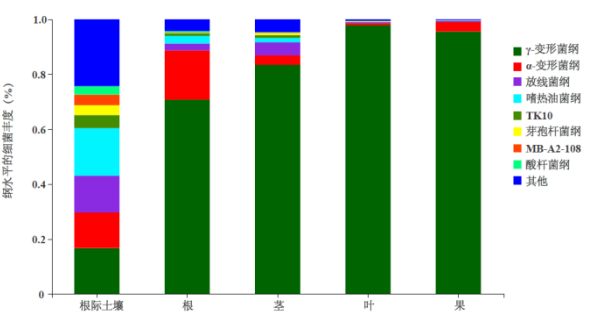


图 3 纲水平上细菌的群落结构

在属水平上，假单胞菌属(*Pseudomonas*)在根(57.07%)、枝条(79.47%)、叶片(92.56%)和果实(89.32%)中的丰度显著高于根际土壤(1.08%)($p<0.05$)。同样地，寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)在根(2.26%)、枝条(2.48%)、叶片(3.32%)和果实(4.43%)中的丰度也显著高于根际土壤(0.12%)($p<0.05$)。相反，根际土壤中

Gaiellales(7.61%)和 TK10(4.81%)丰度显著高于其他组织部位内生细菌丰度($p < 0.05$)。黄色杆菌科(*Xanthoactera*)在根际土壤(3.44%)和根系(3.38%)中丰度显著高于其他样本($p < 0.05$)(图 6)。

2.5 核心微生物分析

将樟树根际土壤及不同组织器官中的内生细菌丰度排名前十的 OTU 定义为核心微生物，以确定根际土壤细菌及根、茎、叶、果样本中的优势内生细菌。共获得 34 个细菌 OTU，归属于 28 个属，23 个科，18 个目，7 个纲，4 个门。核心细菌分别占根际土壤细菌及根、茎、叶、果样本中内生细菌的 25.14%、63.67%、77.90%、85.08%和 91.53%(图 7)。

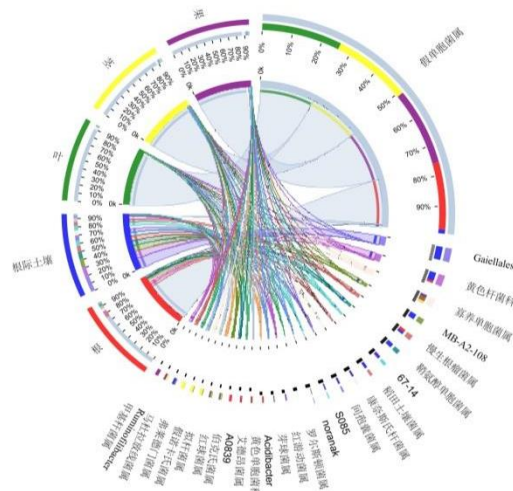
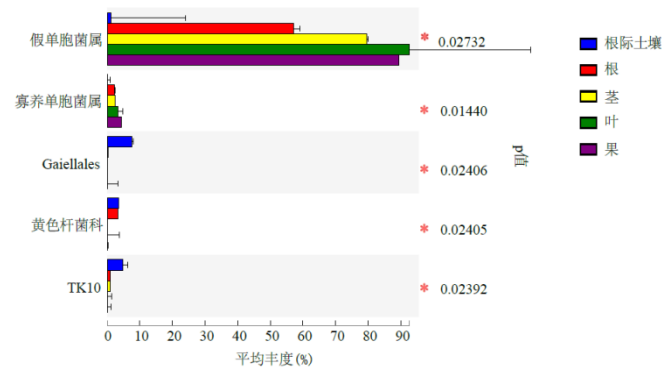


图 4 属水平上细菌的组间差异

图 5 细菌核心微生物

3 讨论

目前，植物内生菌与宿主植物的互作研究已成为微生物研究的热点。目前已发现多种植物不同组织器官内生细菌的多样性，且各有功能。例如巨菌草(*Pennisetum* sp.)植株内生细菌具有丰富的多样性，并从中已分离出具有产 IAA 能力、溶磷能力、潜在的固氮能力和产铁载体能力的内生细菌菌株，表明了巨菌草内生细菌对于其宿主具有促生特性^[6]。大豆(*Glycine max*)组织内存在大量的内生细菌参与磷的同化作用，能够有效的促进植物生长^[7]。另外内生细菌还会对植物病原菌产生一定的拮抗作用。例如小麦(*Triticum aestivum*)叶片的内生细菌对小麦全蚀病菌、纹枯病菌有较强的抑制作用^[8]。本研究通过 16S rRNA 扩增子测序对樟树根际土壤细菌以及根，茎，叶，果内生细菌的多样性进行了评估，发现樟树根际土壤细菌多样性最为丰富，主要由 γ -变形菌纲、 α -变形菌纲、放线菌纲、嗜热油菌纲、芽孢杆菌纲、酸杆菌纲等组成，而 γ -变形菌纲是樟树主要的内生细菌。结果与前人研究结果一致。

本研究还发现，假单胞菌属在根、枝条、叶片和果实中的丰度显著高于根际土壤。研究表明，假单胞菌属能够产生大量的次生代谢产物以适应环境的变化，为假单胞菌在自然生态条件下的生存提供了重要的

竞争手段,同时也是生防假单胞菌防治植物病害的主要机制之一^[9]。假单胞菌属能够产生硝吡咯菌素、吩嗪和假单胞菌酸等抗生素,在农用杀菌剂和医药开发领域发挥着巨大作用^[10, 11, 12, 13]。同时,寡养单胞菌属在根、茎、叶和果实中的丰度显著高于根际土壤。研究表明,寡养单胞菌属的许多菌株能够合成吡啶乙酸,促进根的生长和根毛发育,对植物生长的促进作用,例如嗜麦芽寡养单胞菌、嗜根寡养单胞菌和亚硝酸盐寡养单胞菌等^[14]。部分寡养单胞菌属菌株能够通过分泌抗菌化合物、合成抗致病性的胞外酶等机制抑制病原菌的生长,可用作植物病原菌的拮抗剂。研究发现^[15],寡养单胞菌属的 SB-K88 菌株能够产生具有抗菌活性的化合物黄杆菌素,对土壤中腐霉菌具有抑制作用,从而对甜菜(*Beta vulgaris*)立枯病具有防治作用。嗜麦芽寡养单胞菌 C3 菌株能够产生抑制根腐离蠕孢菌(*Bipolaris sorokiniana*)分生孢子萌发的几丁质酶,从而防止叶斑的发生^[16]。本研究发现根际土壤的细菌多样性明显高于植物组织器官,产生这种原因可能是樟树内部不同组织器官的精油含量对细菌有抑制作用,内生细菌多样性与精油含量的关系还需要后期实验的验证。

4 结论

本研究证明了樟树根际土壤细菌与不同组织器官内生细菌群落结构的生态位分化。确定了樟树根际土壤以及不同组织器官的核心内生细菌。同时发现樟树根际土壤中具有重金属污染土壤修复功能的变形菌门及放线菌门细菌丰度较高;在樟树内生细菌中发现了能够产生抗生素和具有抑制病原菌生长的假单胞菌属和寡养单胞菌属细菌。为园林绿化用樟树的新品种创制、裁培养护和樟树内生细菌的利用提供科学依据。

参考文献

- [1] 陈有民.园林树木学[M].北京:中国林业出版社,2006.
- [2] 金志农,张北红,艾卿,肖等.香料樟树研究的必要性与可行性分析[J].南昌工程学院学报,2020,39(06):1-13.
- [3] BUSBY P E, RIDOUT M, NEWCOMBE G. Fungal endophytes: modifiers of plant disease[J]. Plant Molecular Biology, 2016, 90: 645-655.
- [4] GARY S, BRYN D. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products[J]. Microbiology and molecular biology reviews: 2003, 67(4): 491-502.
- [5] 陈向东.植物内生菌是有待深入开发的资源宝库微生物学通报[J]. 2012, 39(2): 282-282.
- [6] 邓振山,李买平,郝雷,等.巨菌草内生细菌多样性及其促生特性[J].草地学报,2019,27(5):1213-1220.
- [7] Kuklinsky-Sobral J, Araújo W L, Mendes R, et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion [J]. Environmental Microbiology, 2004, 6(12):1244-1251.
- [8] 乔宏萍,黄丽丽,康振生.小麦内生细菌及其对根茎部主要病原真菌的抑制作用[J].应用生态学报,2006,17(4):690-694.
- [9] 张力群,张俊威.假单胞菌产生的抗生素[J].中国生物防治学报,2015, 31(5): 750-756.
- [10] Ligon J M, Hill D S, Hammer P E, et al. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria[J]. Pest Management Science, 2000, 56(8): 688-695.
- [11] 方运玲,孙爽,申阅,等.微生物源农药申嗟霉素的研制与应用[J].农药学学报,2014,16(4):387-393.
- [12] Ge Y X, Huang S, Wang X, et al. Phenazine-1-carboxylic acid is negatively regulated and pyoluteorin positively regulated by *gacA* in *Pseudomonas* sp. M18[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 237(1): 41-47.
- [13] Hurdle J G, O'Neill A J, Chopra I. Prospects for aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as new antimicrobial agents[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(12): 4821-4833.
- [14] Suckstorff I, Berg G. Evidence for dose - dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins [J]. J Appl Microbiol, 2003, 95(4): 656-663.
- [15] Nakayama T, Homma Y, Hashidoko Y, et al. Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping - off disease [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(10): 4334-4339.
- [16] Zhang Z, Yuen G Y. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana* [J]. Phytopathology, 2000, 90(4): 384-389.