

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2021.02.013

赤松混交林枯梢病不同病级针叶 内部细菌多样性研究

谢 宪¹, 梁 军^{1,2*}, 朱彦鹏³, 时 良², 高 燕²,
张 铭¹, 程 元¹, 张星耀^{1,2}

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所 国家林业和草原局森林保护学重点实验室, 北京 100091; 2. 崑崙山森林生态系统国家定位观测研究站, 山东 烟台 264100; 3. 中国环境科学研究院, 北京 100012)

摘要: [目的] 揭示赤松枯梢病不同病级针叶的内部细菌多样性及群落结构。[方法] 利用高通量测序技术和生物信息学技术, 对针阔混交林(赤松 *Pinus densiflora*—麻栎 *Quercus acutissima*) 和针叶混交林(赤松—黑松 *Pinus thunbergii*) 两种林型中赤松无病斑和不同染病程度针叶内的细菌 16s rRNA 基因的 v3-v4 区进行测序和分析。[结果] 针阔混交林的针叶中细菌有效序列 388 587 条, 共计 679 个 OTU, 分属 28 个门、69 个纲、205 个属; 在针叶混交林的赤松针叶中的细菌有效序列 336 600 条, 共计 656 个 OTU, 分属 29 个门、65 个纲、190 个属; 在针阔混交林和针叶混交林中, 赤松无病斑针叶内生细菌的多样性显著高于染病针叶; 无病斑针叶中相对丰度较高的内生细菌菌属为 *Massilia*、*Endobacter*、*Bryocella*、*Sphingomonas*, 染病针叶中乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、*Bryocella*、*Endobacter*、甲基杆菌属 (*Methylobacterium*)、*Singulisphaera* 相对丰度升高, *Massilia* 和 *Sphingomonas* 占比下降; 主成分分析结果显示, 枯梢病感染较严重的针叶细菌聚在一起, 与无病斑针叶以及染病程度较轻的针叶细菌相区分。[结论] 枯梢病菌的侵染影响了内生细菌的群落结构和多样性, 不同混交林中赤松针叶内生细菌受枯梢病菌影响变化趋势一致, 细菌多样性及相对丰度随枯梢病的加重而降低。

关键词: 赤松混交林; 枯梢病; 细菌多样性; 群落结构

中图分类号: S763.13

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2021)02-0122-09

松枯梢病是世界范围内针叶树上最常见和分布最广的重要病害之一。枯梢病病原菌为松球壳孢菌 (*Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & B. Sutton.), 病菌侵染主要从寄主伤口处侵入, 1997 年 Stanosz 对 *Pinus resinosa* Loisel. 和北美短叶松 (*Pinus banksiana* Lambert.) 的研究中首次发现无病斑的嫩梢上存在潜伏侵染^[1]。刘艳在多个松属树种套袋隔离的实验中, 发现冬季表面无病斑的梢上存在松枯梢病菌定殖的情况, 来年可造成春梢发病^[2]。松枯梢病已在我国 10 余个省份的松林中发生, 对松树人工林造成了严重的危害, 损失巨大, 已列入我国重要的森

林病害进行研究。

植物内生细菌在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于植物的各种组织和器官内部, 并与植物建立和谐联合关系。随着对植物内生细菌在促进植物生长、生物控制和缓解胁迫等方面的深入研究^[3], 寄主植物内生细菌与病害的研究也越来越受到关注。内生细菌通过多种机制共同作用从而减轻或防止有害致病微生物对寄主的影响^[4], 机制包括抗生(代谢物质生产)、生长促进、诱导宿主防御(诱导系统抗性)、寄生、竞争和信号干扰(群体感应)^[5]。内生细菌通过生物固氮、加速消化、增磷

收稿日期: 2020-03-17 修回日期: 2020-04-24

基金项目: 国家重点研发计划课题(2018YFC1200400), 国家自然科学基金面上项目(31270682), 山东崑崙山森林生态系统国家定位观测研究站运行补助(2019132127)

* 通讯作者: 梁军, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 森林保护学; E-mail: liangjun@caf.ac.cn

和产生植物激素直接作用于植物的生长发育, 从而产生对生物因子的抗性^[6]。松枯梢病作为真菌病害, 在其拮抗细菌方面已有相关研究, 如通过对健康及染病针叶的内生细菌进行分离培养, 获得具有生防潜力的内生细菌^[7], 但关于枯梢病菌对松树内生细菌多样性及群落结构的影响方面未见相关研究。

昆崙山是赤松 (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) 的原生地 and 天然分布中心, 与黑松 (*Pinus thunbergii* Parl.)、麻栎 (*Quercus acutissima* Carruth.) 等共组成地带性天然次生林植被。为探究混交林中枯梢病对寄主内生细菌的影响, 选取典型混交林型针阔混交林 (赤松-麻栎) 和针叶混交林 (赤松-黑松), 测定两种混交林中赤松针叶内生细菌的变化, 探明不同枯梢病发病状态下赤松针叶的内生细菌多样性及群落结构, 分析内生细菌的多样性及群落结构差异, 为松枯梢病的细菌群落结构调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况及样地设置

昆崙山 (121°41'34"~121°48'04" N, 37°11'50"~37°17'49" E) 地处山东半岛东部, 属暖温带季风气候, 林区土壤属森林棕壤, 以沙质壤土为主。昆崙山是我国和东北亚赤松原生地和天然分布中心, 赤松在该区域与黑松、麻栎等共同组成地带性天然次生林植被。

共选取 6 块 30 m × 30 m 样地, 其中 3 块样地林分结构为针阔混交林, 由赤松以及麻栎构成, 其中赤松占比 52%~59%, 海拔为 210 ± 70 m, 地理坐标为 121°43'35.0" E, 37°17'30.9" N; 121°45'08.4" E, 37°17'37.8" N; 121°43'19" E, 37°17'30.2" N。另 3 块为针叶混交林, 由赤松以及黑松构成, 其中赤松占比 46%~49%, 海拔为 360 ± 30 m, 地理坐标为 121°45'32.60" E, 37°16'3.06" N; 121°45'33.16" E, 37°15'57.94" N; 121°45'37.55" E, 37°15'52.17" N。样地立地条件均为中坡位, 坡度为 23° ± 3°, 坡向为东南半阳坡。

1.2 样品采集

于 2018 年 9 月在 3 块针阔混交林样地内分别采集 ZK1 (全株无病斑赤松的针叶)、ZK2 (染病赤松上无病斑针叶)、ZK3 (染病较轻针叶, 病斑长度为针叶长度二分之一以下)、ZK4 (染病较重针叶, 病斑长度为针叶长度二分之一以上); 在 3 块针叶混交林样地内分别采样 CZ1 (全株无病斑

赤松的针叶)、CZ2 (染病赤松上无病斑针叶)、CZ3 (病斑长度为针叶长度二分之一以下)、CZ4 (病斑长度为针叶长度二分之一以上)。采用五点取样法 (在样地内四角及对角线中心处选树, 每个样点选取一株染病赤松和一株全株无病斑赤松) 采集样本, 针叶取自赤松上冠层, 每个样点各采集二年生针叶 8 束, 各类针叶分别采集针叶 40 束, 并进行表面消毒处理。无菌水冲洗并晾干后, 用 75% 乙醇浸泡 1 min, 无菌水冲洗 3 次, 0.5% 次氯酸钠溶液浸泡 2 min 后, 再用无菌水冲洗 3 次, 将最后一次冲洗后的无菌水稀释至 LB 培养基上进行培养, 3 d 后观察结果, 针叶外表无细菌残留, 证实针叶表面已灭菌。

1.3 内生细菌多样性测定

使用高通量测序技术对针叶内生细菌多样性进行测定。首先利用 CTAB 法对样本 DNA 进行抽提, 完成后将 DNA 样品在冰上融化后, 离心并充分混匀, Nanodrop 检测质量合格后, 取 30 ng 进行 PCR 扩增^[8]。PCR 扩增体系: DNA 样品, 1.0 μL; Forward Primer (5.0 μmol·L⁻¹), 1.0 μL; Reverse Primer (5.0 μmol·L⁻¹), 1.0 μL; BSA (2.0 ng·μL⁻¹), 3.0 μL; 2 × Taq Plus Master Mix, 12.5 μL; ddH₂O, 6.5 μL。进行 16S V3-V4 区基因扩增, 16S V3-V4 区扩增引物序列为 (5'-GTACTCCTACGGGAGG CAGCA-3') 和 (5'-GTGGACTACHVGGGTWTCT AAT-3')。

PCR 采用 TransGen AP221-02: TransStart Fastpfu DNA Polymerase, 将 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN 公司) 切胶回收 PCR 产物, Tris-HCl 洗脱, 2% 琼脂糖电泳检测。扩增产物采用 Illumina Miseq PE300 平台, 并构建 Miseq 文库以及 Miseq 上机测序。

1.4 测序数据处理与分析

OTU (operational taxonomic units) 是在系统发生学或群体遗传学研究中, 为了便于进行分析, 为某一个分类单元 (品系、属、种、分组等) 设置的同一标志。用 uclust (Version 1.2.22) 按照 97% 相似性将全部序列聚类, 去除 singleton 的 OTU, 同时去除注释为叶绿体、线粒体的序列, 并得到代表序列和 OTU 表。用 usearch 按照 97% 相似性序列进行 OTU 聚类, 得到代表序列再将其全部序列按照 97% 相似度比对到 OTU 上形成 OTU 列表, 使用 Mothur 软件计算丰富度指数 Chao1 和多样性

指数 Shannon^[9]。使用 R 软件 (v2.15.3) 绘制主成分分析图。测序数据已上传 NCBI, 编号为 SUB 5584140。

2 结果与分析

2.1 操作分类单元 (OTU) 及其多样性分析

测序结果显示, 在针阔混交林 ZK 的 12 个样品中共获得细菌有效序列 388 587 条, 共计 679 个 OTU; 在针叶混交林 CZ 的 12 个样品共获得细菌有效序列 336 600 条, 共计 656 个 OTU。各样品 Coverage 测序深度指数统计分析结果见表 1, 结果显示采集针叶样本中覆盖率均接近于 99%, 且图 1 稀释曲线趋势平缓, 说明各样本中的细菌物种信息被充分检测, 结果能够代表各类针叶中细菌的真实水平。

根据内生细菌 OTU 数目, 对样品中 OTU 组成进行分析, 构建 Venn 图 (图 2) 和群落结构柱状图 (图 3, 4, 5)。根据图 2a, 在针阔混交林 ZK 中不同染病程度的针叶中共有相同的 OTU 83 个, 占 OTU 总数的 12.22%, 4 类针叶中特有的 OTU 数目分别为 90、69、59、25 个, 以 ZK1 中特有 OTU 数目最多。根据图 2b, 在针叶混交林 CZ 中不同染病程度的针叶中共有相同的 OTU 69 个, 占 OTU 总数的 10.51%, 4 类针叶中特有的 OTU 数目分别为 120、79、66、45 个, 同样以 CZ1 中特有 OTU 数目最多。

样本内细菌的 Chao1 指数和 Shannon 指数统计分析结果见表 1, 针阔混交林与针叶混交林中的内生细菌多样性及丰度呈现相同的变化趋势。无病斑赤松针叶内生细菌的 Chao1 和 Shannon 指数最

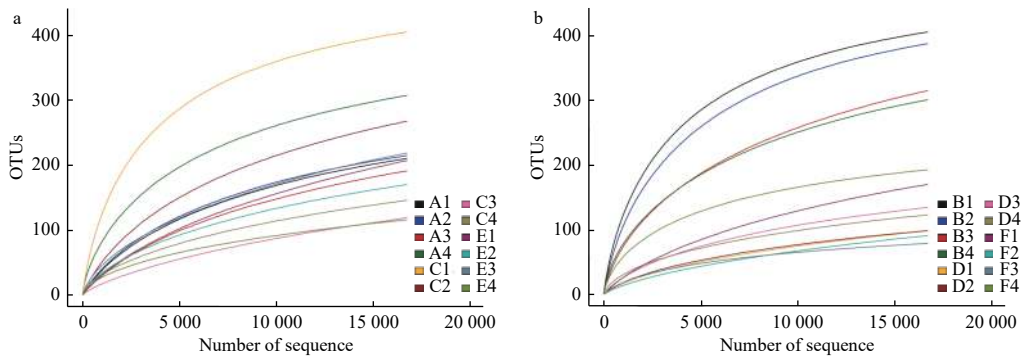
表 1 不同染病情况的赤松针叶内生细菌丰富度与多样性指数

Table 1 Abundance and diversity of endosphere bacteria in different level of disease in the needles of *P. densiflora*

| 处理 Treatment | 丰富度 Chao1 | 多样性指数 Shannon | 覆盖率 Coverage | 处理 Treatment | 丰富度 Chao1 | 多样性指数 Shannon | 覆盖率 Coverage |
|-----------------|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------------|------------------|-----------------|
| ZK1 | 389.69 ± 43.34 a | 6.85 ± 0.30 a | 99.0% | CZ1 | 419.02 ± 49.29 a | 6.48 ± 0.85 a | 99.0% |
| ZK2 | 339.33 ± 59.58 ab | 6.16 ± 0.78 a | 99.1% | CZ2 | 328.10 ± 37.21 ab | 5.75 ± 0.47 a | 98.8% |
| ZK3 | 337.10 ± 47.61 ab | 5.70 ± 0.84 ab | 99.1% | CZ3 | 225.56 ± 27.03 b | 5.27 ± 0.63 ab | 99.3% |
| ZK4 | 218.59 ± 40.24 b | 4.45 ± 0.77 b | 99.2% | CZ4 | 192.50 ± 26.06 b | 4.74 ± 0.42 b | 99.1% |

注: 测定值为均值 ± 标准差, 同列中不同字母表示显著差异 ($P < 0.05$)

Note: Values were mean ± standard deviation, values within the same column followed by different letters indicated significant differences ($P < 0.05$).

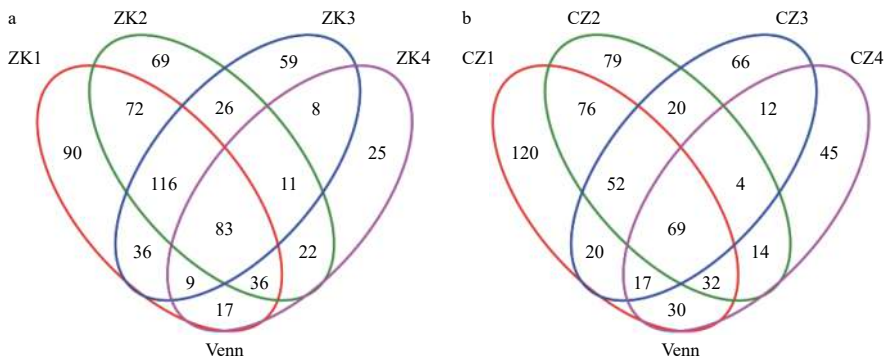


注: ZK1、CZ1: 全株无病斑赤松的针叶; ZK2、CZ2: 染病赤松上的无病斑针叶; ZK3、CZ3: 染病较轻针叶 (病斑长度为针叶长度二分之一以下); ZK4、CZ4: 染病较重针叶 (病斑长度为针叶长度二分之一以上)。ZK1 组包括样本 A1、C1、E1; ZK2 组包括样本 A2、C2、E2; ZK3 组包括样本 A3、C3、E3; ZK4 组包括样本 A4、C4、E4。CZ1 组包括样本 B1、D1、F1; CZ2 组包括样本 B2、D2、F2; CZ3 组包括样本 B3、D3、F3; CZ4 组包括样本 B4、D4、F4。

Note: ZK1 and CZ1: the needles of asymptomatic *P. densiflora*; ZK2 and CZ2: the asymptomatic needles of infected *P. densiflora*; ZK3 and CZ3: the lightly infected needles of *P. densiflora* (the length of the lesion is less than half of the length of the needle); ZK4 and CZ4: the severely infected needles of *P. densiflora* (the length of the lesion is more than half of the length of the needle). Samples of ZK1 concludes A1, C1, and E1; Samples of ZK2 concludes A2, C2, and E2; Samples of ZK3 concludes A3, C3, and E3; Samples of ZK4 concludes A4, C4, and E4. Samples of CZ1 concludes B1, D1, and F1; Samples of CZ2 concludes B2, D2, and F2; Samples of CZ3 concludes B3, D3, and F3; Samples of CZ4 concludes B4, D4, and F4.

图 1 针叶内部细菌 OTU 稀释曲线图 (a: 针阔混交林; b: 针叶混交林)

Fig. 1 OTU-based rarefaction curves of bacteria in needles of *P. densiflora* (a: coniferous and broad-leaved mixed forest; b: coniferous mixed forest)



注: ZK1、CZ1: 全株无病斑赤松的针叶; ZK2、CZ2: 染病赤松上的无病斑针叶; ZK3、CZ3: 染病较轻针叶 (病斑长度为针叶长度二分之一以下); ZK4、CZ4: 染病较重针叶 (病斑长度为针叶长度二分之一以上)。

Note: ZK1 and CZ1: the needles of asymptomatic *P. densiflora*; ZK2 and CZ2: the asymptomatic needles of infected *P. densiflora*; ZK3 and CZ3: the lightly infected needles of *P. densiflora* (the length of the lesion is less than half of the length of the needle); ZK4 and CZ4: the severely infected needles of *P. densiflora* (the length of the lesion is more than half of the length of the needle).

图 2 不同染病情况下赤松针叶内细菌操作单元 (OTU) 分类 Venn 图 (a: 针阔混交林; b: 针叶混交林)

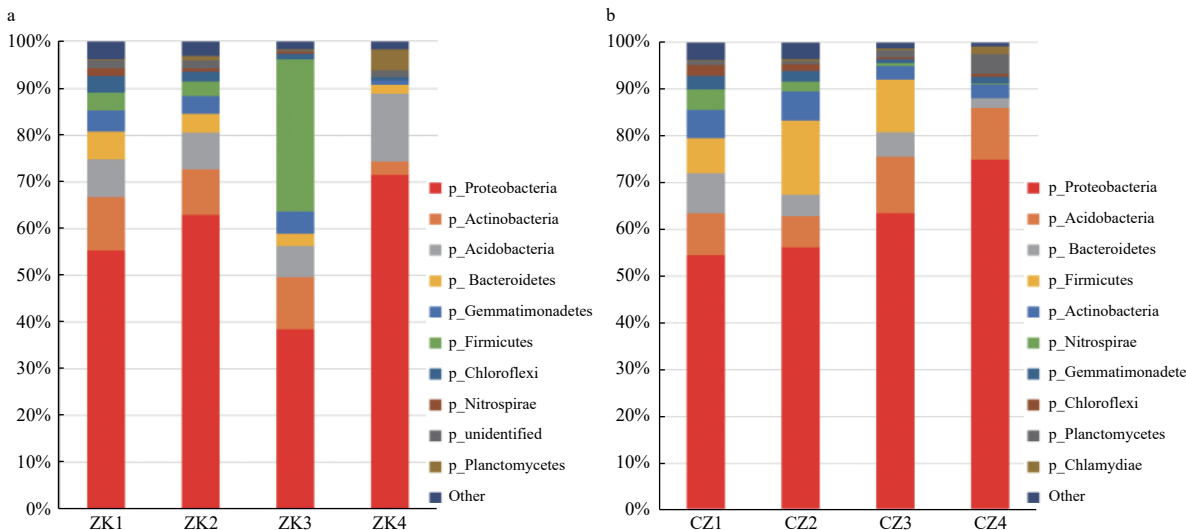
Fig. 2 Venn diagram of OTU distribution of endosphere bacteria in different level of disease in the needles of *P. densiflora* (a: coniferous and broad-leaved mixed forest; b: coniferous mixed forest)

高, 即测得 OTU 数与种类数均最高, 其次分别为染病赤松上的无病斑针叶、病斑长度为针叶长度二分之一以下的赤松针叶、病斑长度为针叶长度二分之一以上的赤松针叶, 随着病菌侵染的加重, 内生细菌丰富度及多样性呈现出下降的趋势。

2.2 细菌门水平的优势类群组成分析

在针阔混交林中, 对 679 个 OTU 进行门、纲和

属水平上的归类, 分属 28 个门、69 个纲、205 个属。在门水平上 (图 3a), 变形菌门 (Proteobacteria) 占比最高, 分别在 4 类样品中占比 55.39%、62.89%、38.53%、71.42%, 变形菌门为针叶内生细菌中的优势菌群, 且在样本中的相对丰度存在差异。ZK1 中相对丰度较高的门还有放线菌门 (Actinobacteria) (11.42%)、酸杆菌门 (Acidobacteria) (8.09%)、

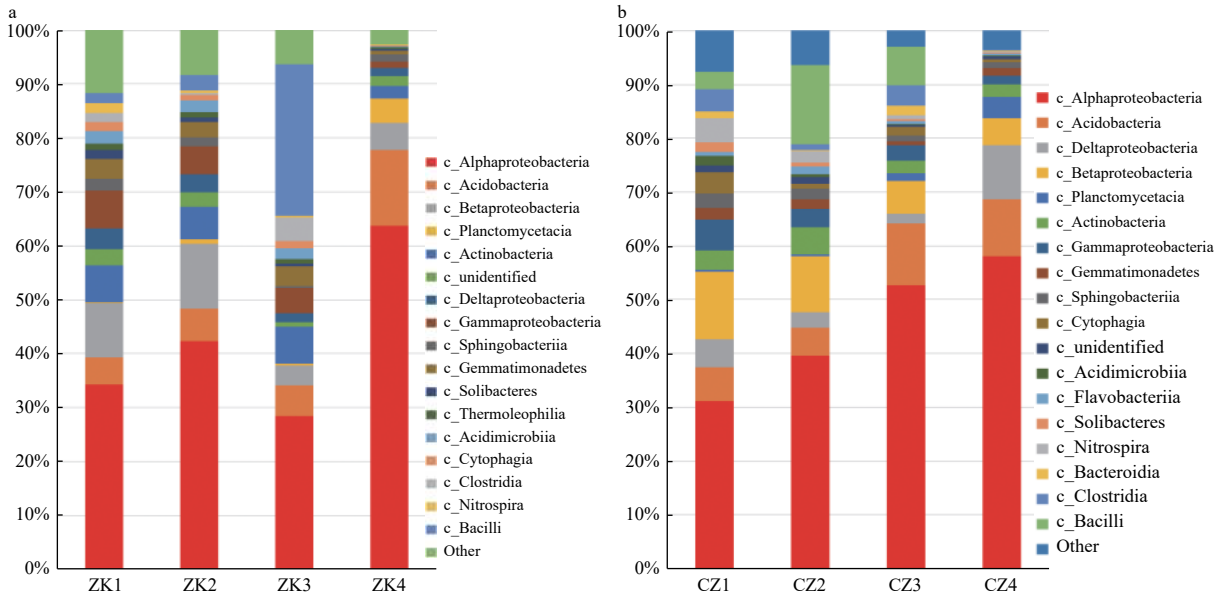


注: ZK1、CZ1: 全株无病斑赤松的针叶; ZK2、CZ2: 染病赤松上的无病斑针叶; ZK3、CZ3: 染病较轻针叶 (病斑长度为针叶长度二分之一以下); ZK4、CZ4: 染病较重针叶 (病斑长度为针叶长度二分之一以上)。

Note: ZK1 and CZ1: the needles of asymptomatic *P. densiflora*; ZK2 and CZ2: the asymptomatic needles of infected *P. densiflora*; ZK3 and CZ3: the lightly infected needles of *P. densiflora* (the length of the lesion is less than half of the length of the needle); ZK4 and CZ4: the severely infected needles of *P. densiflora* (the length of the lesion is more than half of the length of the needle).

图 3 不同病害侵染状态下赤松针叶内部细菌门水平组成 (a: 针阔混交林; b: 针叶混交林)

Fig. 3 Bacterial phyla from endosphere bacteria of different level of disease in the needles of *P. densiflora* (a: coniferous and broad-leaved mixed forest; b: coniferous mixed forest)

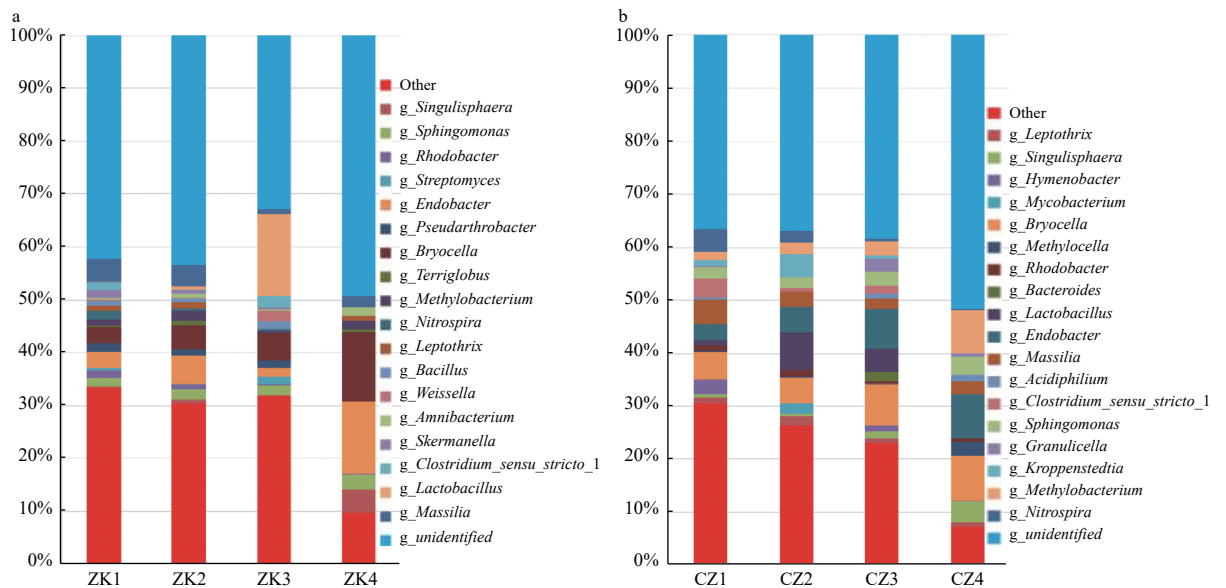


注: ZK1、CZ1: 全株无病斑赤松的针叶; ZK2、CZ2: 染病赤松上的无病斑针叶; ZK3、CZ3: 染病较轻针叶 (病斑长度为针叶长度二分之一以下); ZK4、CZ4: 染病较重针叶 (病斑长度为针叶长度二分之一以上)。

Note: ZK1 and CZ1: the needles of asymptomatic *P. densiflora*; ZK2 and CZ2: the asymptomatic needles of infected *P. densiflora*; ZK3 and CZ3: the lightly infected needles of *P. densiflora* (the length of the lesion is less than half of the length of the needle); ZK4 and CZ4: the severely infected needles of *P. densiflora* (the length of the lesion is more than half of the length of the needle).

图 4 不同病害感染状态下赤松针叶内部细菌纲水平组成 (a: 针阔混交林; b: 针叶混交林)

Fig. 4 Bacterial classes from endosphere bacteria of different level of disease in needles of *P. densiflora* (a: coniferous and broad-leaved mixed forest; b: coniferous mixed forest)



注: ZK1、CZ1: 全株无病斑赤松的针叶; ZK2、CZ2: 染病赤松上的无病斑针叶; ZK3、CZ3: 染病较轻针叶 (病斑长度为针叶长度二分之一以下); ZK4、CZ4: 染病较重针叶 (病斑长度为针叶长度二分之一以上)。

Note: ZK1 and CZ1: the needles of asymptomatic *P. densiflora*; ZK2 and CZ2: the asymptomatic needles of infected *P. densiflora*; ZK3 and CZ3: the lightly infected needles of *P. densiflora* (the length of the lesion is less than half of the length of the needle); ZK4 and CZ4: the severely infected needles of *P. densiflora* (the length of the lesion is more than half of the length of the needle).

图 5 不同病害感染状态下赤松针叶内部细菌属水平组成 (a: 针阔混交林; b: 针叶混交林)

Fig. 5 Bacterial genera from endosphere bacteria of different level of disease in needles of *P. densiflora* (a: coniferous and broad-leaved mixed forest; b: coniferous mixed forest)

拟杆菌门 (Bacteroidetes) (5.78%)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) (4.61%)。ZK2 中相对丰度较高的门同 ZK1 一致, 占比略有差异, 放线菌门 (9.85%)、酸杆菌门 (7.84%)、拟杆菌门 (4.07%)、芽单胞菌门 (3.68%)。ZK3 中相对丰度较高的门还有厚壁菌门 (Firmicutes) (32.60%)、酸杆菌门 (6.72%)、放线菌门 (10.98%)。ZK4 中相对丰度较高的门还有酸杆菌门 (14.61%)、浮霉状菌门 (Planctomycetes) (4.41%)、放线菌门 (2.89%)。

在针叶混交林中, 对 656 个 OTU 进行门、纲和属水平上的归类, 分属 29 个门、65 个纲、190 个属。在门水平上 (图 3b), 变形菌门相对丰度最高, 分别为 54.45%、56.24%、63.48%、74.83%。CZ1 中的相对丰度较高的门还有酸杆菌门 (9.03%)、拟杆菌门 (8.63%)、厚壁菌门 (7.43%)、放线菌门 (6.11%)。CZ2 中种类构成与 CZ1 相近, 其中厚壁菌门 (15.69%) 相对丰度上升, 酸杆菌门 (6.51%) 与拟杆菌门 (4.58%) 相对丰度降低, 放线菌门 (6.31%) 相对稳定。CZ3 中的相对丰度较高的门还有厚壁菌门 (11.09%)、酸杆菌门 (12.08%)、放线菌门 (1.46%)。CZ4 中相对丰度较高的门还有酸杆菌门 (11.09%)、浮霉状菌门 (4.18%)、放线菌门 (2.86%)。

两种混交林中, 无病斑针叶的内生细菌门水平结构一致, 变形菌门均为优势门, 且其他相对丰度较高的菌门近似, 包括放线菌门、酸杆菌门、拟杆菌门和芽单胞菌门。随着枯梢病的发生, 在病斑较短的针叶中, 均发生显著的变化, 两种林分在该状态下的内生细菌差异最大, 主要差异由于针阔混交林中厚壁菌门相对丰度的升高。在病斑较长的针叶内生细菌优势菌门一致, 均由变形菌门、酸杆菌门、浮霉状菌门和放线菌门构成, 相对丰度无显著差异。

2.3 细菌纲水平的优势类群组成分析

在针阔混交林中, 内生细菌纲水平构成见图 4a, 无病斑及染病针叶内生细菌均以 α -变形菌 (Alphaproteobacteria) 为优势菌种, 分别为 34.26%、42.30%、28.53% 和 63.68%。在 ZK1 中, β -变形菌纲 (Betaproteobacteria) 和 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria) 的占比分别为 10.05% 和 7.06%, ZK2 中 β -变形菌纲和 γ -变形菌纲的占比分别为 12.06% 和 5.20%。ZK3 中特有芽孢杆菌纲 Bacilli, 占比为 28.18%。ZK4 中, α -变形菌占比增

高, 且酸杆菌纲 (Acidobacteria) (14.07%) 和浮霉菌纲 (Planctomycetacia) (4.41%) 占比高于其他样品 (均低于 1%)。

针叶混交林中, 在内生细菌纲水平上 (图 4b), 4 类样品中 α -变形菌相对丰度均为最高, 相对丰度分别为 31.21%、39.51%、52.66% 和 58.10%, 呈现逐渐增高的趋势。 β -变形菌纲相对丰度分别为 12.55%、10.36%、6.11% 和 4.98%, γ -变形菌纲相对丰度分别为 5.64%、3.39%、2.92% 和 1.73%, 两个纲的相对丰度均逐渐下降。芽孢杆菌纲 (Bacilli) 在 CZ1、CZ2 和 CZ3 中占比较高, 3.32%、14.81%、7.10%, 而 CZ4 中低于 1%。CZ4 中的 δ -变形菌纲 (Deltaproteobacteria) (10.03%)、酸杆菌纲 (10.56%) 和浮霉菌纲 (4.12%) 占比较高。

两种林分中, 无病斑针叶内生细菌的优势纲为 α -变形菌纲。在染病初期, 内生细菌的丰度差异主要来自于芽孢杆菌纲的丰度变化。在针阔混交林中, 芽孢杆菌纲在病斑较短的针叶中占比显著高于其他样本。在病斑较长的针叶中, α -变形菌纲、酸杆菌纲和浮霉菌纲在两种林分中组成优势菌群。

2.4 细菌属水平的优势类群组成分析

在针阔混交林中, 属水平上 (图 5a), unidentifed 的属占了较高的比例 (42.40%、43.43%、32.89%、49.26%), 在 ZK1 中, *Massilia*、*Endobacter*、*Bryocella* 与 *Sphingomonas* 的相对丰度均较高, 4 个属的占比分别达到了 4.51%、3.20%、3.20%、1.68%。ZK2 中, *Massilia*、*Endobacter*、*Bryocella* 与 *Sphingomonas* 同样占据了较高的比例 (4.46%、5.73%、5.04%、2.28%), 与 ZK1 的优势菌属一致。ZK3 中, 乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、*Kroppenstedtia*、*Bryocella*、魏斯氏菌 (*Weissella*) 相对丰度较高 (16.5%、8.09%、5.47%、2.36%), 其中乳杆菌属占比最高, *Massilia*、*Endobacter* 和 *Sphingomonas* 相对丰度降低。在 ZK4 中 *Bryocella*、*Endobacter*、*Singulisphaera* 和 *Sphingomonas* 相对丰度较高 (13.82%、13.13%、4.39%、2.76%)。

针叶混交林中 (图 5b), unidentifed 的属同样占了较高的比例 (36.59%、36.92%、38.38%、51.66%)。CZ1 中 *Bryocella* (5.11%)、*Massilia* (4.52%)、硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*) (4.32%)、*Clostridium_sensu_stricto_1* (3.59%)、*Endobacter* (2.99%)、薄层菌属 (*Hymenobacter*) (2.86%) 和 *Sphingomonas* (2.39%) 占比较高, CZ2 中乳杆菌属 (6.97%)、*Endobacter* (4.91%)、*Bryocella*

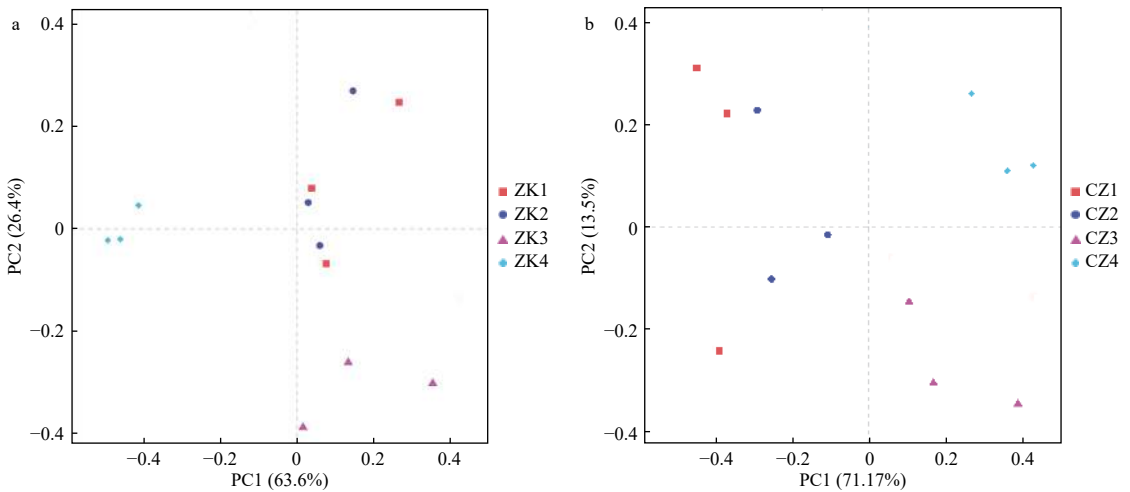
(4.78%) 和 *Kroppenstedtia* (4.12%) 占比较高, 与 CZ1 的优势菌存在差异。CZ3 中, *Bryocella* (7.84%)、*Endobacter* (7.44%)、乳杆菌属 (4.52%)、*Sphingomonas* (2.72%)、甲基杆菌属 (*Methylobacterium*) (2.66%) 和 *Granulicella* (2.19%) 占比较高, 其中 *Granulicella* 明显高于其他样品。CZ4 中, 相对丰度较高的菌有 *Bryocella* (8.50%)、*Endobacter* (8.37%)、甲基杆菌属 (8.10%)、*Singulisphaera* (3.98%)、*Sphingomonas* (3.45%) 和 *Methylocella* (2.72%), 其中甲基杆菌属与 *Singulisphaera* 在其他样品中相对丰度低于 1.00%。

两种林分中, 无病斑针叶共有的优势属有 *Massilia*、*Endobacter*、*Bryocella* 与 *Sphingomonas*, 其它优势属硝化螺旋菌属、*Clostridium_sensu_stricto_1* 相对丰度有差异, 但并不显著。枯梢病侵

染后, 在病斑较短的针叶内细菌的属中, *Lactobacillus* 相对丰度的差异最大。在病斑较长的针叶中, *Bryocella*、*Endobacter*、*Singulisphaera*、*Sphingomonas* 在两种林分中均为优势属。

2.5 细菌 Beta 多样性分析

基于细菌纲水平的主成分分析, 分析针阔混交林 ZK 赤松针叶细菌的差异性 (图 6a), 结果表明, 主成分 PC1 与主成分 PC2 的贡献率分别为 63.6% 和 26.4%, 发病较重的针叶内生细菌与其余 3 类相聚较远, 表明在枯梢病侵染较严重的情况下, 内生细菌多样性的变化较大, 而无病斑针叶以及染病程度较轻的距离较近。染病较轻的状态下与无病斑状态相比, 针叶内生细菌的构成差异较小。针叶混交林 CZ 主成分分析 (图 6b), 主成分 PC1 与 PC2 的贡献率分别为 71.17% 和 13.5%, 其聚类规律与针阔混交林 ZK 一致。



注: ZK1、CZ1: 全株无病斑赤松的针叶; ZK2、CZ2: 染病赤松上的无病斑针叶; ZK3、CZ3: 染病较轻针叶 (病斑长度为针叶长度二分之一以下); ZK4、CZ4: 染病较重针叶 (病斑长度为针叶长度二分之一以上)。

Note: ZK1 and CZ1: the needles of asymptomatic *P. densiflora*; ZK2 and CZ2: the asymptomatic needles of infected *P. densiflora*; ZK3 and CZ3: the lightly infected needles of *P. densiflora* (the length of the lesion is less than half of the length of the needle); ZK4 and CZ4: the severely infected needles of *P. densiflora* (the length of the lesion is more than half of the length of the needle).

图 6 赤松针叶内部细菌主成分分析 (a: 针阔混交林; b: 针叶混交林)

Fig. 6 Principal component analysis of endosphere bacteria in needles of *P. densiflora*(a: coniferous and broad-leaved mixed forest; b: coniferous mixed forest)

3 讨论

通过高通量测序技术, 对针阔混交林与针叶混交林的赤松针叶内细菌多样性与群落结构进行分析, 结果表明: 针阔混交林的针叶中细菌有效序列 388 587 条, 共计 679 个 OTU, 分属 28 个门、69 个纲、205 个属; 在针叶混交林针叶中的细菌有效序列 336 600 条, 共计 656 个 OTU, 分属 29 个

门、65 个纲、190 个属。赤松针叶内生细菌多样性丰富, 无病斑针叶与染病针叶的优势细菌为变形菌门, 无病斑针叶中内生细菌菌属为 *Massilia*、*Endobacter*、*Bryocella*、*Sphingomonas*。在其他松属类的内生细菌的研究中, 经分离纯化获得的内生细菌优势菌株与本研究结论一致^[10]。

研究表明, 随着病害侵染的加重, 内生细菌多样性及丰度逐渐降低, 与植原体对寄主根部内

生细菌研究中得出的结论一致^[11], 病原菌的入侵不仅对寄主植物组织造成危害, 还对内生细菌的多样性及群落结构产生影响。申红妙^[12]探明了桉树内生细菌群落变化与桉树对青枯病抗性间的关系, 结果表明桉树根部组织中内生细菌的丰度减低, 但茎、叶中内生细菌的丰度未受影响, 不同组织受病害的影响存在差异, 该结论为不同部位的内生微生物与病害的相关研究中得出的不同结果提供理论支持。植物内生细菌长期生活在植物体内的特殊环境中并与宿主协同进化, 内生细菌在植物体内的定殖是一个主动过程, 可以通过自身的代谢产物或借助于信号传导对植物体产生作用, 而病原菌的入侵对内生细菌的定殖及传播产生影响。

林分对土壤微生物的影响差异显著^[13-14], 在林分与内生细菌的研究中, 两种林分混交林的内生细菌多样性及群落结构的变化趋势相近, 仅在部分优势菌的种类存在差异, 推测的原因是内生细菌多样性更多地受到寄主的影响, 不同于土壤微生物。无病斑针叶与染病针叶多样性、群落结构等方面均存在差异, 而两种林分在枯梢病对针叶内生细菌的影响差异方面呈现一致的趋势。纲水平上, 两种林分中的优势纲均为 α -变形菌, 并随病害的严重程度的加剧呈上升趋势。属水平上, 无病斑针叶中的优势菌群种类及相对丰度差别不大, *Massilia*、*Endobacter*、*Bryocella* 与 *Sphingomonas* 在两种林分中均为优势属。在枯梢病菌侵染后的针叶内优势细菌相对丰度受到影响, 乳杆菌、*Bryocella*、*Endobacter*、甲基杆菌属 *Methylobacterium*、*Singulisphaera* 相对丰度升高, *Massilia* 和 *Sphingomonas* 占比下降。*Massilia* 作为植物体内生菌, 能够以甘油或葡萄糖为前体高效合成聚羟基丁酸酯^[15]。*Endobacter* 常在紫花苜蓿中分离得到^[16], *Bryocella* 作为好氧化异养型细菌^[17-18], 本研究中侵染较重的针叶中, *Bryocella* 相对丰度升高, 也说明了该属菌的生存未受病原菌的抑制。*Sphingomonas* 在植物研究中发现具有一定的固氮作用, 常在根际作为固氮细菌^[19], 受病害影响呈相对丰度降低, 其变化趋势与其他病害对寄主的影响一致^[20]。而染病针叶中 *Bryocella*、*Singulisphaera* 与乳杆菌属相对丰度上升。*Singulisphaera* 常见于土壤等腐殖质中, 而本研究中, 其在病害较重的针叶中出现, 可推测在较重针叶内, 细菌群落结构已被严重破坏, 腐生性细菌入侵^[21]。乳杆菌属的部分种具有促生和提高发酵质量的功效^[22], 也曾从植物组织内分离获得^[23]。

此外, 在针叶混交林中甲基杆菌属上升。随着病害的加重, 甲基杆菌属相对丰度升高, 这与茶白星病侵染时丰度的表现一致^[24], 但有研究表明甲基杆菌属对部分病原微生物具有抑制性^[25], 因此其对枯梢病病原菌是否具有抑制作用仍需进一步研究。

4 结论

在针阔混交林与针叶混交林中, 赤松针叶内生细菌的多样性及丰度随枯梢病侵染的严重程度呈现下降的趋势, 两种林分的内生细菌群落结构受枯梢病菌影响变化趋于一致。针阔混交林和针叶混交林中, 无病斑针叶的相对丰度较高的内生细菌属均为 *Massilia*、*Endobacter*、*Bryocella* 与 *Sphingomonas*。枯梢病菌的侵染影响了内生细菌的群落结构和多样性, 细菌多样性及相对丰度随枯梢病的加重而降低。

参考文献:

- [1] Stanosz G R, Smith D R, Guthmiller M A, et al. Persistence of *Sphaeropsis sapinea* on or in asymptomatic shoots of red and jack pines[J]. *Mycologia*, 1997, 89(4): 525-530.
- [2] 刘 艳, 叶建仁. 松树枯梢病潜伏侵染的研究[J]. *林业科学*, 2003, 39(4): 67-72.
- [3] Podolich O, Ardanov P, Zaets I, et al. Reviving of the endophytic bacterial community as a putative mechanism of plant resistance[J]. *Plant and Soil*, 2015, 388: 367-377.
- [4] Soares M A, Li H Y, Kowalski K P, et al. Functional role of bacteria from invasive *Phragmites australis* in promotion of host growth[J]. *Microbial Ecology*, 2016, 72(2): 407-417.
- [5] Jorjani M, Heydari A, Zamanizadeh H R, et al. Controlling sugar beet mortality disease by application of new bioformulations[J]. *Journal of Plant Protection Research*, 2012, 52(3): 303-307.
- [6] Xia Y, DeBolt S, Dreyer J, et al. Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices[J]. *Frontier of Plant Science*, 2015, 6: 490-499.
- [7] 王凤各, 叶建仁. JK-JS8菌株对松树枯梢病菌的拮抗作用及机理[J]. *辽东学院学报: 自然科学版*, 2016, 23(2): 117-121.
- [8] Bullington L S, Larkin B G. Using direct amplification and next-generation sequencing technology to explore foliar endophyte communities in experimentally inoculated western white pines[J]. *Fungal Ecology*, 2015, 17: 170-178.
- [9] Hess M, Sczyrba A, Egan R, et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen[J]. *Science*, 2011, 331: 463-467.
- [10] 胡振亮, 靳 轩, 庞久帅, 等. 油松内生细菌的分离及拮抗菌的筛选[J]. *中国森林病虫*, 2019, 38(4): 1-6.
- [11] 陈有忠, 邱志伟, 于奥安, 等. 植原体对冬枣根部可培养内生细菌群落的影响[J]. *天津农业科学*, 2019, 25(10): 14-18.
- [12] 申红妙, 李正楠, 杜兴兰, 等. 抗生素对桉树内生细菌群落及青枯病抗性的影响[J]. *植物病理学报*, 2016, 46(4): 543-550.
- [13] 字洪标, 向泽宇, 王根绪, 等. 青海不同林分土壤微生物群落结构

- (PLFA)[J]. 林业科学, 2017, 53 (3): 21-32.
- [14] 刘 宝, 吴文峰, 林思祖, 等. 中亚热带4种林分类型土壤微生物生物量碳氮特征及季节变化[J]. 应用生态学报, 2019, 30 (6): 1901-1910.
- [15] Bassas-Galia M, Nogales B, Arias S, *et al.* Plant original *Massilia* isolates producing polyhydroxybutyrate, including one exhibiting high yields from glycerol[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(3): 443-454.
- [16] Ramirez-Bahena M H, Tejedor C, Martin I, *et al.* *Endobacter medicagenis* gen. nov., sp. nov., isolated from alfalfa nodules in acidic soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(5): 1760-1765.
- [17] Dedysh S N, Kulichevskaya I S, Serkebaeva Y M, *et al.* *Bryocella elongata* gen. nov., sp. nov., a member of subdivision 1 of the acidobacteria isolated from a methanotrophic enrichment culture, and emended description of *Edaphobacter aggregans* Koch *et al.* 2008[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(3): 654-664.
- [18] Eugene R, Edward F D, Stephen L, *et al.* The Prokaryotes[M]. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014, 405-415.
- [19] 刘永红, 郭建伟, 张永光, 等. 2种药用阿魏植物内生细菌及促生属性比较[J]. 微生物学杂志, 2018, 38 (5): 51-59.
- [20] 罗路云, 张 卓, 金德才, 等. 南瓜白粉病不同病情等级下叶际细菌群落结构和多样性[J]. 植物病理学报, 2017, 47 (5): 689-696.
- [21] Song M K, Wang Y J, Jiang L F, *et al.* The complex interactions between novel DEHP-metabolising bacteria and the microbes in agricultural soils[J]. Science of the Total Environment, 2019, 660: 733-740.
- [22] 胡 珊, 黄 皓, 梁卫驱, 等. 荔枝内生乳酸菌的筛选、鉴定及发酵效果分析[J]. 南方农业学报, 2019, 50 (1): 137-143.
- [23] 沙月霞. 不同水稻组织内生细菌的群落多样性[J]. 微生物学报, 2018, 58 (12): 2216-2228.
- [24] 周凌云, 向 芬, 刘红艳, 等. 茶白星病不同病情等级下叶际细菌群落多样性与功能预测[J]. 茶叶通讯, 2019, 46 (1): 24-31.
- [25] Balachandran C, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S. Cytotoxic (A549) and antimicrobial effects of *Methylobacterium* sp. isolate (ERI-135) from Nilgiris forest soil, India[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, 2(9): 712-716.

Endosphere Bacterial Diversity within Mixed Forest of *Pinus densiflora* Infected by Different Incidences of *Sphaeropsis sapinea*

XIE Xian¹, LIANG Jun^{1,2}, ZHU Yan-peng³, SHI Liang², GAO Yan²,
ZHANG Ming¹, CHENG Yuan¹, ZHANG Xing-yao^{1,2}

(1. Key Laboratory of Forest Protection of National Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Kunyushan Forest Ecosystem Research Station, Yantai 264100, Shandong, China; 3. Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China)

Abstract: [Objective] To reveal the endosphere bacterial diversity and community structure of needle leaves of *Pinus densiflora* under different disease levels. [Method] High-throughput sequencing technology was used to sequence the v3-v4 region of the bacterial 16S rRNA gene, to determine the diversity and community structure of endophytic bacteria of *P. densiflora* under different disease levels. [Result] There were 388 587 effective bacterial sequences in needle leaves of coniferous-broadleaved mixed forests, totaling 679 OTUs, belonging to 28 phylum, 69 classes and 205 genera. There were 336 600 effective sequences of bacteria in needle leaves of coniferous mixed forests, totaling 656 OTUs, belonging to 29 phylum, 65 classes and 190 genera. In the coniferous-broadleaved mixed forests and coniferous mixed forests, the endophytic bacterial diversity of the asymptomatic needles of *P. densiflora* was higher than that of the infected needles. The predominant genera of endophytic bacteria in the asymptomatic needles were *Massilia*, *Endobacter*, *Bryocella* and *Sphingomonas*, and the relative abundance of *Lactobacillus*, *Bryocella*, *Endobacter*, *Methylobacterium* and *Singulisphaera* increased in infected needles, while *Massilia* and *Sphingomonas* decreased. The bacteria in coniferous needles with severe infection were distinguished from that in symptomatic coniferous needles and light infected needles. [Conclusion] The infection of *S. sapinea* affects the abundance of endophytic bacteria. The endophytic bacteria of the two type of mixed forests are consistent with the trend of the effects of *S. sapinea*, and the endophytic bacterial diversity in needles of *P. densiflora* is decreased gradually with the level of blight in the mixed forests.

Keywords: *Pinus densiflora* mixed forest; *Sphaeropsis sapinea*; bacterial diversity; community structure