



马缨杜鹃根系微生物群落结构及其变化

方敏, 徐小蓉, 唐明, 唐婧*

贵州师范大学生命科学学院, 国家林业局西南喀斯特山地生物多样性保护重点实验室, 贵州 贵阳 550001

摘要:【目的】为了解野生马缨杜鹃根系微生物的群落结构特征, 比较百里杜鹃内马缨杜鹃根际土壤、根表及根内 3 个生态位微生物群落组成差异, 探究杜鹃根系生态位之间、变化菌属间的相互关系, 以期为今后杜鹃根系微生物研究提供具有参考价值的数据。【方法】对百里杜鹃内野生马缨杜鹃根系微生物 16S rRNA V4 区和 ITS1 区进行高通量测序, 比较分析根际土壤、根表及根内微生物群落多样性及组成差异; 并基于共变化网络分析进一步探究差异菌属间的相互关系。【结果】马缨杜鹃根系不同的生态位之间, 微生物群落结构存在差异, 其中以根际土壤与根表、根内差异更为显著, 且细菌群落差异小于真菌群落。且从根际-根表-根内, 马缨杜鹃根系细菌 α -多样性显著下降。马缨杜鹃根系微生物分布于 41 细菌门和 6 个真菌门。优势细菌门为变形菌门(*Proteobacteria*, 39.64%±0.08, 69.47%±0.12, 77.34%±0.07)、酸杆菌门(*Acidobacteria*, 34.10%±0.11, 11.03%±0.04, 9.18%±0.04)以及放线菌门(*Actinobacteria*, 10.19%±0.03, 8.70%±0.02, 7.08%±0.01), 它们占整体细菌群落总丰度的 80% 以上。同时 8 个细菌菌门的相对丰度在根际土壤、根表和根内间显著变化, 且它们的相对丰度占细菌群落总丰度的 75% 以上。真菌主要分布于接合菌门(*Zygomycota*)、担子菌门(*Basidiomycota*)和子囊菌门(*Ascomycota*), 它们占整体菌群的 99% 以上。马缨杜鹃根系存在 589 个属的细菌, 390 个属的真菌, 从根际-根表-根内, 其中 25 个细菌属和 10 个真菌属的相对丰度发生显著变化。马缨杜鹃根系微生物群落共变化网络分析表明: 在马缨杜鹃根系不同生态位间, 除 *Waitea* 外, 包括枝孢菌属(*Cladosporium*)、拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)等在内的 8 个差异真菌菌属均与细菌菌属显著相关, 它们相互作用调控微生物群落结构的变化。*Bryobacter*、*Nocardia*、*Rhizomicrobium* 和 *Telmatobacter* 等核心菌属对马缨杜鹃根系微生物群落共变化网络的变化具有十分重要的调控作用。【结论】百里杜鹃地区马缨杜鹃根际土壤、根表以及根内 3 个生态位间, 微生物群落组成存在差异; 而造成微生物组成存在差异这一结果, 可能与马缨杜鹃根系密切相关。同时, 共变化网络分析揭示出马缨杜鹃根系生态位之间, 细菌和真菌彼此间互作。

关键词: 根系微生物, 马缨杜鹃, 生态位, 差异菌属, 共变化网络

基金项目: 贵州省科技合作项目(黔科合 LH 字[2017]7362 号); 贵州省重点实验室项目(黔科合计 Z 字[2011]4005 号); 国家自然科学基金委员会-贵州省人民政府喀斯特科学研究中心项目(U1812401)

*通信作者。Tel/Fax: +86-851-83227351; E-mail: eva-830827@163.com

收稿日期: 2018-10-08; 修回日期: 2019-01-21; 网络出版日期: 2019-03-14

杜鹃亦或是杜鹃花, 属于杜鹃花科(*Ericaceae*)、杜鹃花属(*Rhododendron*), 作为我国及世界的名花之一, 其更是享有“木本花卉之王”的美誉, 广泛分布于全世界。我国是杜鹃花属植物的分布中心, 约有 6 个亚属 580 种, 且包括 420 个地方特有种。除新疆和宁夏外, 其广泛分布于我国其他省份, 以西南地区最为集中^[1]。百里杜鹃自然保护区位于贵州西北部高原, 所占面积约 130 km²^[2], 是我国乃至全世界连片面积最大的天然杜鹃林区之一, 具有较高的观赏和研究价值。近年来, 国内外对杜鹃花的研究取得了一定的进展, 主要表现为杜鹃种质资源调查、濒危物种的保护、组织培养等方面^[3-4]。然而, 对其根际生态环境的了解, 知之甚少; 尤其是对根际微生物的研究仍为较为薄弱的一环。

土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分。土壤微生物与植物之间密切相关。植物-土壤微生物是陆地生态系统中地上、地下相互联系的重要纽带。土壤微生物在控制植物养分利用率和土壤质量方面起着重要作用。植物的健康与土壤微生物多样性有关^[5]。植物根际是一个复杂的微生态系统, 是大量互作微生物的栖息地^[6]。因此, 根际微生物群落被认为是土壤微生物群落中的一个子系统。根际微生物不仅参与生态系统中物质转化和循环, 且植物与根际不同的微生物相互作用, 进而对植物的健康、生产力以及土壤肥力产生不同的影响^[7]。所以, 研究杜鹃根际微生物群落结构极其重要, 这将有利于了解植物-根际微生物互作机制, 并为杜鹃的病害预防及生长管理提供有用信息。

环境中微生物数量相当庞大, 作用十分复杂。其中, 自然生态系统下, 仅有低于 0.1%–1.0%的

微生物能通过实验技术培养^[8]。然而, 未能培养的微生物占据着地球生物多样性的重要组成部分。1998 年 Handelsman 首次提出宏基因组, 主要指环境样品中细菌和真菌的基因组总和, 它是“独立于培养”思路下的微生物组学。2015 年, Whiteside 提出, 微生物群(Microbiota)利用 16S rRNA 基因针对环境中所有微生物的种类鉴定研究。近年来, 随着新一代高通量测序技术发展的日新月异, 越来越多的研究学者从环境样品内获取的宏基因组中扩增 16S rRNA 基因数据种鉴定研究微生物群信息, 从中挖掘具有科研价值的微生物群落数据信息^[9]。植物根系微生物包括根际、根表、根际微生物^[10]。根际是土壤中受根系分泌物影响的狭窄地带^[11], 是植物与相关微生物进行交流的平台。根表与根际土壤接触^[12]。根内微生物在植物组织中参与了一部分根组织生命周期的活动^[12]。基于此, 本研究提取马缨杜鹃根际土壤、根表及根内微生物的宏基因组, 并以此为模板扩增 16S rRNA V4 区和 ITS1 区序列, 进行高通量测序。挖掘分析该 3 个生态位的微生物群落组成及差异; 全面解析 3 个生态位微生物的群落结构特征; 进一步探究马缨杜鹃根系生态位之间, 变化种群存在的互作关系。

1 材料和方法

1.1 样品采集

采样区位于贵州西北部毕节市中部的百里杜鹃自然保护区。该区属于暖温带湿润季风气候, 全年平均气温 11.8 °C, 年降雨量为 1150.4 mm, 海拔在 1500–1800 m 之间, 杜鹃覆盖面积约 130 km², 其中主要为马缨杜鹃。在采集区内随机选择相邻 3

棵马缨杜鹃根系微生物混合为 1 个样品,同时采集 3 个样品间距离约为 100 m;均位于百里杜鹃嘎木区域。

首先将野生马缨杜鹃根系上方及周围外周土壤全部清开,然后利用无菌刷,刷取收集根际周围(0–2 mm)土壤,将其装入无菌采样袋中。再剪去部分根部样品放入另一个无菌采集袋中。4 °C 左右保存运回实验室。返回实验室后,将根系取出,用无菌水轻微冲洗,然后用无菌手术刀将根系表皮与根内部分分开。样品分别置于–80 °C 下冻存。

1.2 宏基因组的提取

称取根际土壤 0.5 g,参照 PowerSoil DNA Isolation Kit 试剂盒说明,提取样品宏基因组;将马缨杜鹃根表层与内部分开,剪碎,运用差速离心法收集菌群,再按 PowerSoil DNA Isolation Kit 试剂盒提取宏基因组。使用 Bio-Tek 微孔板分光光度计对 DNA 浓度和质量进行检测。再将宏基因组置于–80 °C 低温冰箱中冻存。

1.3 高通量测序及分类注释

以提取的宏基因组为模板,分别扩增细菌 16S rRNA V4 区和真菌 ITS1 区,基于 Illumina 平台进行高通量测序。根据测序下机数据,进行质量控制分析,然后利用 QIIME^[13]软件去除低质量及有嵌合体序列,获得有效序列,并合并。基于 Ucluster 算法,以序列相似度 $\geq 97\%$ 为阈值,聚类合并 OTUs (operational taxonomic units)。用 RDP 算法基于 Greengene 数据库(<http://greengenes.secondgenome.com/>)对 16S rRNA 细菌 OTUs 进行分类注释;用 BLAST 方法基于 Unite 数据库(<https://unite.ut.ee/>),分类注释 ITS1 真菌 OTUs。

1.4 微生物群落结构分析及共变化网络探究

基于 OTUs 分类注释结果,计算马缨杜鹃根际土壤、根表以及根内 3 个生态位微生物群落的 α -多样性(shannon 指数、simpson 指数、物种累计数以及 pielou 均匀度指数),使用 R agricolae 包进行 wilcox 检验 α -多样性差异。利用 R 的 vegan、ggplots 等对微生物群落的 β -多样性(Bray-Curtis 距离)进行分析及作图,基于 Bray-Curtis 距离用限制性主坐标轴分析(CPCoA) 3 个生态位间微生物群落结构的差异^[14]。使用 Wilcoxon 秩和检验统计分析 3 个生态位间微生物群落在门和属分类水平上的菌群组成差异并作图。计算差异种群两两间的 Spearman 秩相关系数,并借助 Cytoscape 软件构建差异种群共变化网络,进一步探究差异种群间的相互关系。

2 结果和分析

2.1 稀释曲线

对测序下机数据进行质控分析以获得有效序列,并以 $\geq 97\%$ 序列相似性为阈值划分 OTUs。OTU 聚类共获得 6381 个细菌 OTUs, 2788 个真菌 OTUs。绘制稀释曲线(图 1),结果表明,在该深度测序下,测序数据量基本合理,能覆盖样品中绝大多数的微生物物种,能较好反映样品中微生物群落的多样性,为顺利进行后续研究奠定良好的基础。

2.2 马缨杜鹃根系微生物群落多样性差异分析

比较马缨杜鹃根际土壤、根表以及根内 3 个生态位微生物群落 α -多样性差异,如表 1 所示,结果发现,马缨杜鹃根际土壤细菌群落的 Shannon

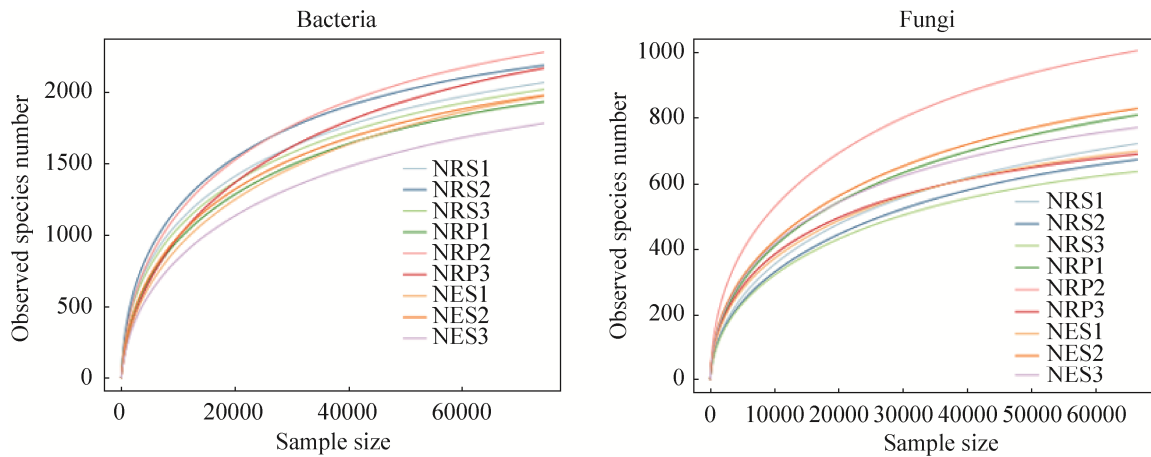


图 1. 细菌和真菌稀释曲线

Figure 1. Rarefaction curve of 16S rRNA V4 and ITS1.

表 1. α-多样性指数

Table 1. The α-diversity index of alpha

Microbe	Sample	Shannon	Simpson	Species accumulation	Pielou
Bacteria	NRS	5.83±0.146**	0.992±0.001*	2094±71	0.763±0.016**
	NRP	4.46±0.484*	0.892±0.041*	2129±145	0.582±0.060*
	NES	3.93±0.200*	0.838±0.028*	1913±91	0.521±0.027*
Fungi	NRS	3.08±0.379	0.795±0.125	677±35	0.430±0.060
	NRP	3.45±0.404	0.846±0.051	835±130	0.503±0.049
	NES	3.21±0.140	0.815±0.025	766±53	0.484±0.016

NRS: Rhizosphere; NRP: Rhizoplane; NES: Endosphere; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

指数、Simpson 指数、Pielou 均匀度指数值均显著高于根表及根内的, 细菌群落的种群数量及均匀度从根际-根表-根内逐步下降; 而根际土壤中真菌群落的 Shannon 指数、Simpson 指数、物种累计数以及 Pielou 均匀度指数与根表和根内间无显著差异。因此, 马缨杜鹃根系不同生态位之间细菌群落丰富性及均匀性存在显著差异, 而真菌群落差异不显著。我们推测马缨杜鹃根表对细菌群落具有调控阀门作用^[15], 致使细菌群落多样性显著下降, 而对真菌群落多样性却无显著影响。

为了进一步探究根际土壤、根表以及根内微生物组成的差异, 本研究以 Bray-Curtis 距离进行

限制性主坐标分析(CPCoA)。结果发现(图 2), 不同生态位对细菌群落差异的解释度达 30.5%, 真菌群落达 24.4%, 不同生态位决定了大部分微生物菌群结构的差异。且根际微生物群落组成与根内及根表间差异为第一主坐标因素(83.13%, 84.01%), 马缨杜鹃根际土壤与根表及根内之间微生物群落组成差异更为明显。

进一步比较马缨杜鹃根系细菌与真菌群落的 Bray-Curtis 距离(图 3), 结果发现, 在马缨杜鹃根系微生物群落根际-根表-根内三者之间, 细菌群落结构差异显著小于真菌群落结构差异, 说明在马缨杜鹃根系不同生态位之间真菌群落结构变化程度大于细菌群落结构。

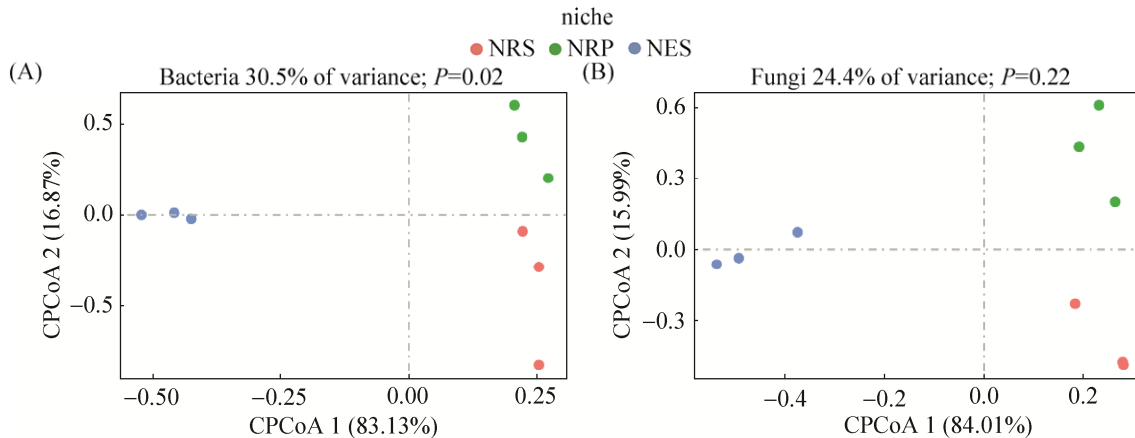


图 2. 限制性主坐标分析马缨杜鹃根际土壤、根表及根内组间细菌(A)和真菌(B)群落差异

Figure 2. The constrained principal co-ordinates analysis of bacteria (A) and fungi (B) between three ecological niches. NRS: Rhizosphere; NRP: Rhizoplane; NES: Endosphere.

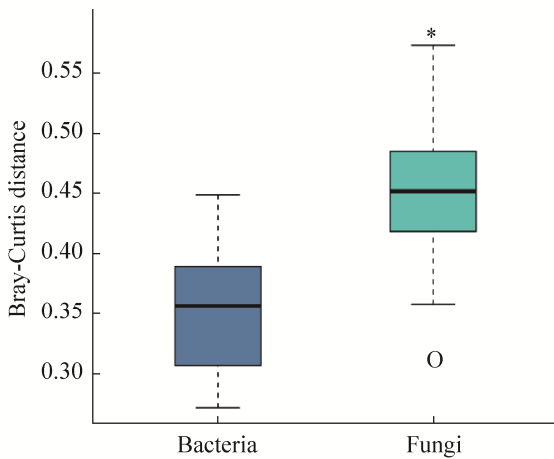


图 3. Bray-Curtis 距离箱线图

Figure 3. The boxplots of Bray-Curtis distance. *: $P < 0.05$.

2.3 比较分析马缨杜鹃根系微生物群落结构

2.3.1 马缨杜鹃根系微生物群落结构:

通过马缨杜鹃根系微生物 16S rRNA V4 区测序结果分析, 马缨杜鹃根系共有 6381 个细菌 OTUs, 其中根系 3 个生态位中共有 3768 个, 且有 523 个 OTUs 只存在于根际土中, 723 个 OTUs 仅存在于根表中, 387 个 OTUs 只在根内(图 4-A)。马缨杜鹃根表单独富集的细菌菌群数量最多。523 个 OTUs 中 24.75% 属于变形菌门; 723 个 OTUs 中 33.69% 属于变形菌门; 387 个 OTUs 中 41.07% 属于变形菌

门。马缨杜鹃从根际-根表-根内过程中, 各生态位独有的细菌菌群中变形菌门所占比例逐渐上升, 且根内独有菌群约一半是变形菌门细菌。马缨杜鹃根系细菌分布于 41 个门 589 个属, 其中 8 个门的相对丰度 $> 1\%$ 。优势菌门为变形菌门 (*Proteobacteria*, $39.64\% \pm 0.08$, $69.47\% \pm 0.12$, $77.34\% \pm 0.07$)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*, $34.10\% \pm 0.11$, $11.03\% \pm 0.04$, $9.18\% \pm 0.04$) 以及放线菌门 (*Actinobacteria*, $10.19\% \pm 0.03$, $8.70\% \pm 0.02$, $7.08\% \pm 0.01$), 它们占整体细菌群落总丰度的 80% 以上。

马缨杜鹃根际土壤与根表及根内细菌群落之间具有显著差异, 8 个细菌菌门相对丰度显著差异图 4-B, 且差异菌门相对丰度占根系细菌群落丰度的 75% 以上。其中相对丰度最高的变形菌门在马缨杜鹃根内和根表中显著富集; 而酸杆菌门的相对丰度却显著下降, 同时 *Armatimonadetes*、消化螺旋菌门 (*Nitrospirae*) 等相对丰度也显著下降。

马缨杜鹃根系真菌群落共聚类 2788 个 OTUs。其中 3 个生态位共有 OTUs 为 1406 个; 265 个 OTUs 只存在于根际土壤中, 其中子囊菌门 (*Ascomycota*) 占 53.21%, 担子菌门 (*Basidiomycota*)

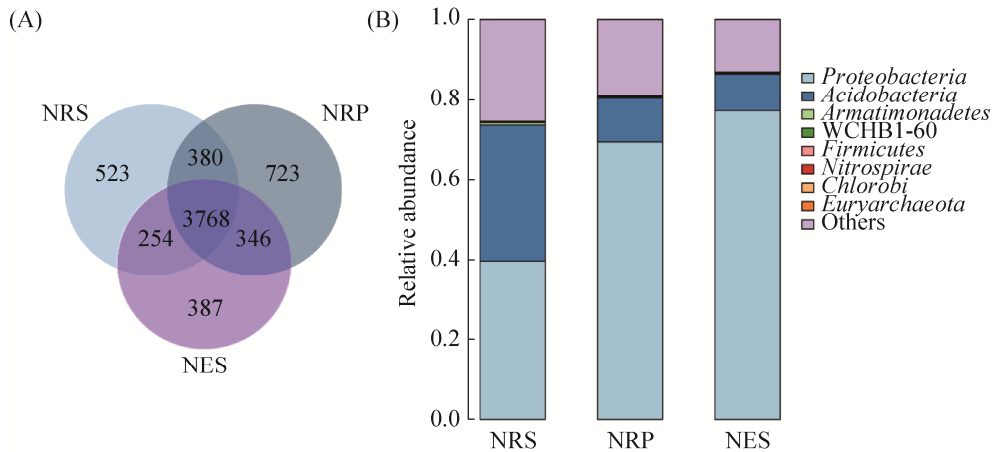


图 4. 细菌群落结构差异分析(A) OTUs 韦恩图(B)相对丰度显著差异的 8 个细菌菌门分布

Figure 4. The difference of bacterial community. A: Venn analysis of OTUs; B: The distribution of 8 differential bacterial phyla in the root of *Rhododendron delavayi*.

占 26.68%; 363 个 OTUs 仅存在于根表中, 其中子囊菌门占 53.84%, 担子菌门占 21.11%; 根内中独有 221 个 OTUs, 其中子囊菌门占 61.29%, 担子菌门占 23.48% (图 5-A)。马缨杜鹃从根际-根表-根内过程中, 各生态位独有的真菌菌群主要都是子囊菌门, 且所占比例变化不大。同时马缨杜鹃根表上所单独富集的真菌菌群数量也最多。

马缨杜鹃根系真菌群落分布于 6 个门 390 个

属 (图 5-B), 其中优势菌门为接合菌门 (*Zygomycota*, $21.58\% \pm 0.10$, $43.67\% \pm 0.25$, $46.76\% \pm 0.29$)、担子菌门 ($46.38\% \pm 0.19$, $31.92\% \pm 0.22$, $30.78\% \pm 0.25$)、子囊菌门 ($31.81\% \pm 0.20$, $23.68\% \pm 0.09$, $21.77\% \pm 0.06$), 它们占整体真菌群落总丰度的 99% 以上。其中接合菌门 (*Zygomycota*) 在马缨杜鹃根内和根表中显著富集。

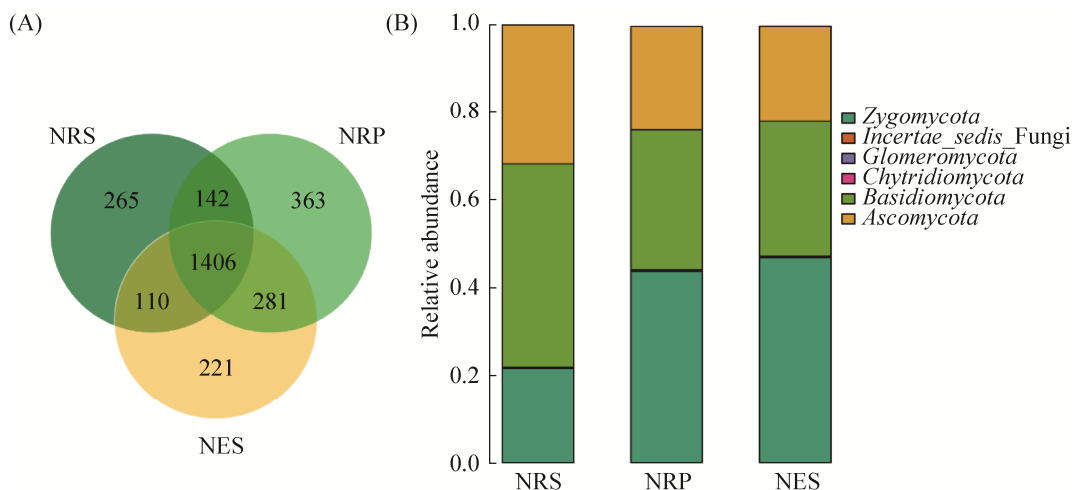


图 5. 真菌群落结构差异分析(A)OTUs 韦恩图(B)真菌菌门分布结构

Figure 5. The difference of fungal community. A: The venn analysis of OTUs; B: The distribution of the phyla of fungal community.

2.3.2 马缨杜鹃根系微生物差异菌属：马缨杜鹃根系微生物群落组成十分丰富，包含 589 个属的细菌和 390 个属的真菌，主要包含伯克氏菌属 (*Burkholderia*, 5.95%±0.02, 25.93%±0.18, 24.71%±0.20)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*, 2.13%±0.02, 18.19%±0.22, 28.01%±0.23)、热酸菌属 (*Acidothermus*, 4.17%±0.01, 2.90%±0.01, 2.47%±0.004)、伞状霉属 (*Umbelopsis*, 1.20%±0.002, 3.95%±0.02, 3.89%±0.03)、毛霉菌属 (*Mucor*, 0.24%±0.002, 2.16%±0.02, 4.08%±0.05)等。

明串珠菌属 (*Leuconostoc*)、黄单胞菌属 (*Xanthomonas*)等 52 个细菌菌属以及 *Harzia*、薄孔菌属 (*Antrodia*)、羊肚菌属 (*Morchella*)等 52 个真菌菌属只富集分布于马缨杜鹃根表；噬几丁质属 (*Chitinophaga*)、索氏菌属 (*Thauera*)等 28 个细菌菌属和刺盘孢属 (*Colletotrichum*)、笋顶孢霉属 (*Acrostalagmus*)等 26 个真菌菌属则只富集分布在马缨杜鹃根内；而气球菌属 (*Aerococcus*)、*Finegoldia* 等 29 个细菌菌属和 *Agaricus*、*Lectera* 等 34 个真菌菌属在马缨杜鹃根部消失隔离(图 6)。

马缨杜鹃根系 3 个生态位之间 25 个细菌菌属和 10 个真菌菌属相对丰度存在显著差异(图 7)。12 个属的细菌从根际通过根表时，相对丰度显著下降；且其中 *Telmatobacter*、蛭弧菌属 (*Bdellovibrio*)、*Bryobacter*、*Candidatus_Amoebophilus* 等 10 个细菌属从根际—根表—根内，其相对丰度逐渐降低。同时酸杆菌门 (*Acidobacteria*) 内的 5 个显著差异菌属均富集于根际，通过根表到根内都显著下降。与此同时，13 个属的细菌却相对富集于马缨杜鹃根表及根内；其中 *Pseudoduganella*、拟杆菌 (*Bacteroides*)、*Cohnella*、类芽孢杆菌 (*Paenibacillus*) 以及诺卡氏菌属 (*Nocardia*) 5 个细菌菌属的相对丰度呈逐渐上升。且厚壁菌门 (*Firmicutes*) 内的 4 个显著差异菌属均富集于根表及根内。真菌菌属中，*Waitea*、腐皮壳属 (*Diaporthe*)、*Fulgensia*、拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis*) 以及 *Laetinaevia* 5 个真菌菌属相对丰度也逐渐上升，且除 *Waitea* 外，它们均来源于子囊菌门 (*Ascomycota*)。马缨杜鹃根际与根表、根内之间微生物菌群及丰度存在显著差异，马缨杜鹃根系对根系微生物群落具有较为明显的影响。

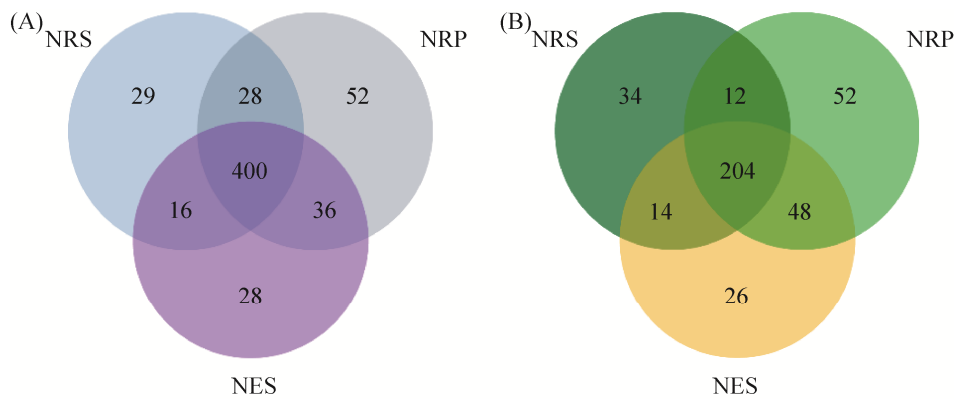


图 6. 马缨杜鹃根系微生物菌属韦恩图

Figure 6. Venn analysis of root-microbiota of *Rhododendron delavayi* based on genus level. A: Bacteria; B: Fungi.

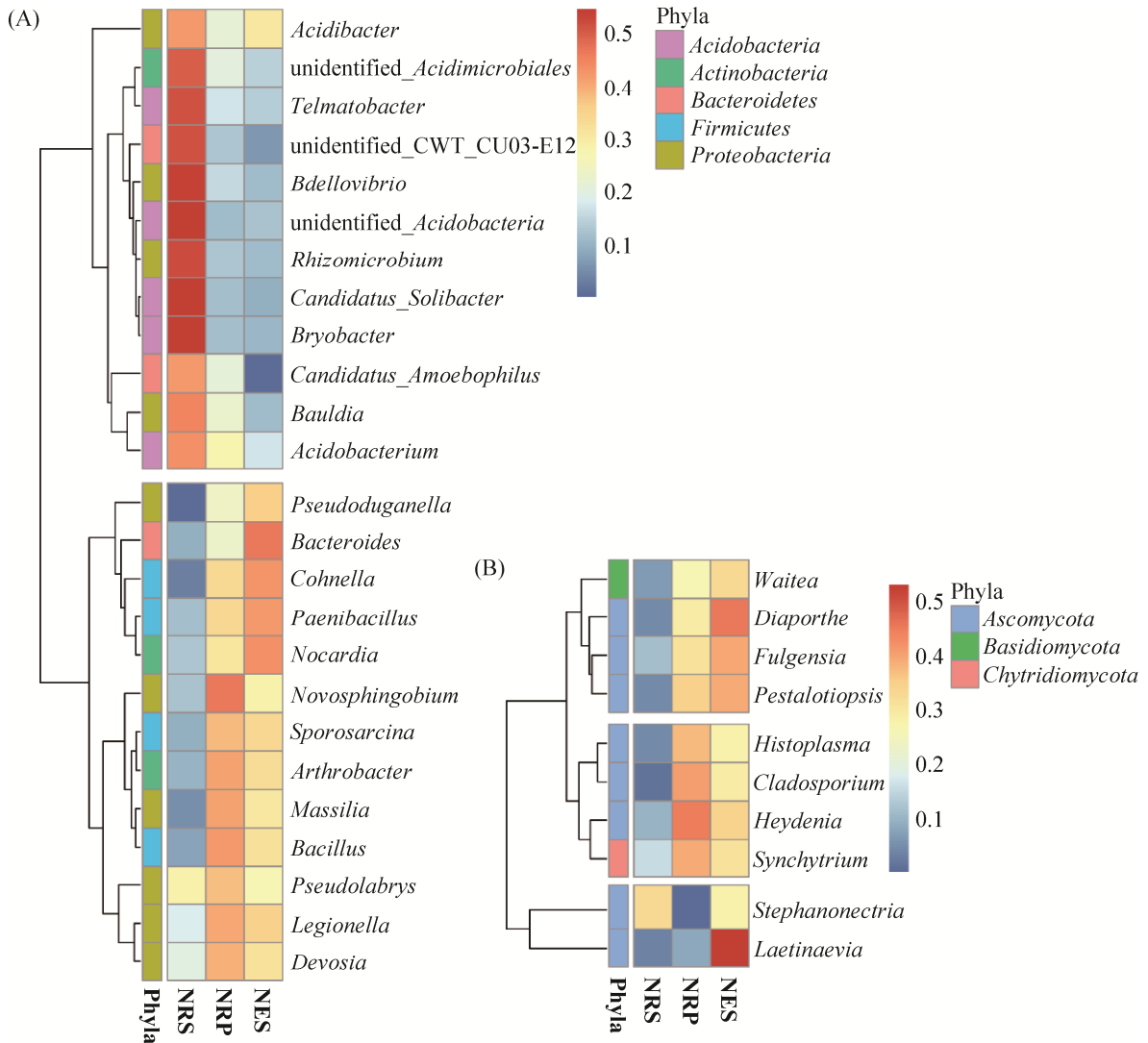


图 7. 马缨杜鹃根系差异微生物菌属

Figure 7. The heatmap of differential root-microbiota of *Rhododendron delavayi*. A: Bacteria; B: Fungi.

2.4 马缨杜鹃根系差异微生物共变化网络分析

网络分析被广泛应用于复杂微生物群落的探究中。以上研究表明：在马缨杜鹃根系的生态位中，微生物菌属分布及丰度差异显著。为进一步探究马缨杜鹃根系微生态环境中微生物间的相互作用，本研究通过对差异菌属两两间相关系数的计算，构建共变化网络(图 8)。细菌和真菌间存在明显互作：在微生物菌属共变化网络中，核心菌属 *Bryobacter* 与三分之一的菌属(11 个)显著

相关，*Candidatus_Solibacter*、诺卡式菌属(*Nocardia*)与 10 个菌属显著相关，*Rhizomicrobium* 与 9 个显著相关，*unidentified_Acidobacteria*、*Telmatobacter* 与 8 个显著相关；该 6 个网络核心菌属共互作影响 8 个细菌菌属和 2 个真菌菌属。我们推测认为在马缨杜鹃根系微生物群落共变化网络中，*Bryobacter*、*Candidatus_Solibacter* 等 6 个核心菌属具有重要调控作用，其对网络内微生物种群影响范围大。*Bryobacter* 互作影响 11 个细菌菌属，

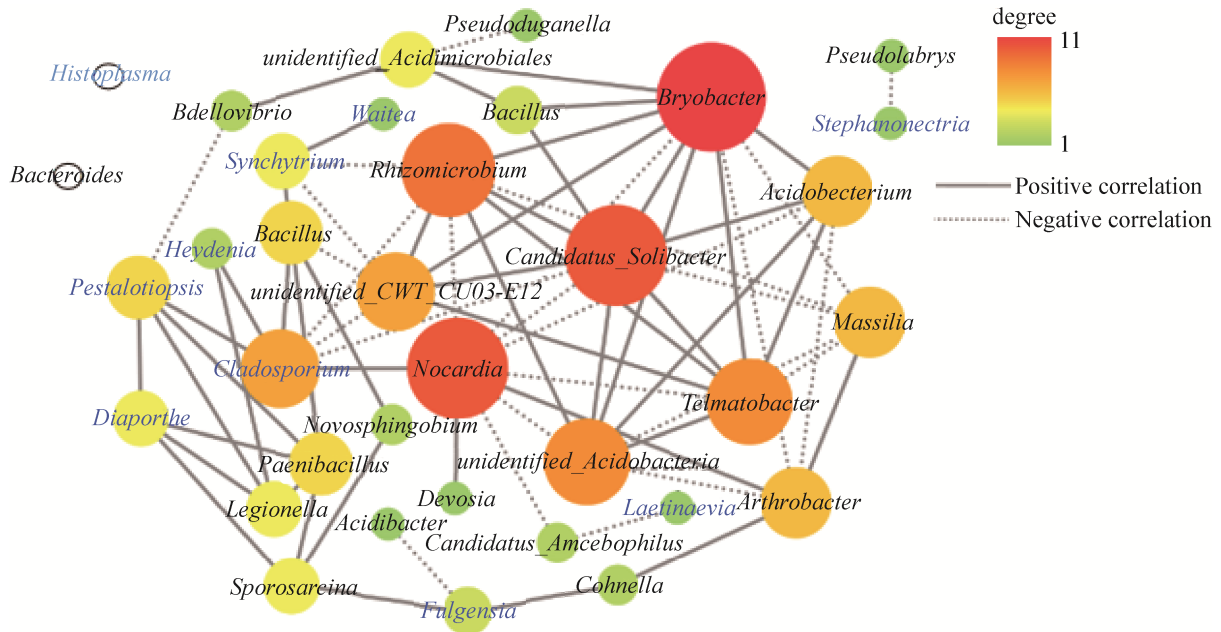


图 8. 马缨杜鹃根系差异微生物共变化网络图

Figure 8. The co-occurrence network of differential root-microbiota of *Rhododendron delavayi*. Degree: the number of microbial genus associated with other genus; Bacteria: black font; Fungi: blue font.

其中与 *Rhizomicrobium*、*Candidatus_Solibacter*、*unidentified_Acidimicrobiales* 等 8 个菌属正相关，与诺卡氏菌属(*Nocardia*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)以及马赛菌属(*Massilia*)负相关。

除 *Waitea* 外的 *Stephanonectria*、*Laetinaevia*、*Heydenia*、*Fulgensia*、集壶菌属(*Synchytrium*)、拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)、腐皮壳属(*Diaporthe*)、枝孢菌属(*Cladosporium*)等 8 个差异真菌菌属与细菌菌属间，均存在显著相关性。表明马缨杜鹃根系细菌、真菌菌属间存在相互协同或竞争作用。*Waitea* 与集壶菌属(*Synchytrium*)显著正相关。真菌菌属枝孢菌属(*Cladosporium*)、拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)、*Heydenia* 和腐皮壳属(*Diaporthe*)之间显著正相关，且与芽孢杆菌(*Bacillus*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、类芽孢杆菌(*Paenibacillus*)等细菌菌属显著正相关，与蛭弧菌属(*Bdellovibrio*)、*unidentified_CWT_CU03-E12* 等细菌菌属显著负

相关。此外，组织胞浆菌属(*Histoplasma*)和拟杆菌属(*Bacteroides*)和其他菌属均不存在显著相关性。

该共变化网络分析表明，在马缨杜鹃根系生态位的变化过程中，细菌和真菌间存在明显互作。

3 讨论

植物根际是植物-微生物互动的重要生境场所。根际微生物群落的集体基因组被称为植物的“第二基因组”，对植物的健康起着至关重要的作用^[11]。在此微生态区域，微生物更易受到植物种类、土壤类型、植物生长阶段等多因素的影响，且该区域的微生物种类繁多，数量巨大，表现出明显的根际效应^[16]。根系分泌物是植物-根际微生物间互动的重要媒介。不同的植物种类分泌不同的根系分泌物，这会对微生物群落的物种特异性转移以及土壤微生物多样性产生影响^[17]。本研究

对马缨杜鹃根系 3 个生态位微生物群落进行研究发现: 马缨杜鹃根系对细菌群落多样性有一定的抑制作用, 根际土壤细菌群落 α -多样性显著高于根表及根内, 而对真菌群落多样性影响不明显。在根际、根表、根内, 不同生态位决定了大部分菌群结构的差异, 同时生态位对真菌和细菌群落的影响是有差异的^[18], 且在马缨杜鹃根系中对真菌组成的影响大于细菌的。

目前研究发现变形菌门和放线菌门在大茴香^[19]、草莓^[20]、锦鸡儿^[21]、葡萄^[22]等植物根际微生物群落中都为优势菌门, 而在马缨杜鹃根系微生物群落中变形菌门、酸杆菌门以及放线菌门为优势菌门; 我们推测马缨杜鹃根际微生物群落中的酸杆菌门占据优势菌群和马缨杜鹃的根系酸性生长环境可能有关, 因此马缨杜鹃根际选择富集了较高丰度的酸杆菌门菌群。研究表明子囊菌门在枸杞^[23]、土豆^[24]根际真菌中均为优势类群; 而马缨杜鹃根际真菌群落中优势类群为担子菌门和子囊菌门, 可能与马缨杜鹃能分离具有的菌根密切相关。同时目前研究也表明不同物种、不同基因型等对植物根系微生物群落均产生不同程度的影响^[25], 且这个差异和植物自身的遗传背景及物质代谢过程等密切相关。在本研究中发现, 马缨杜鹃根系微生物随着生态位的变化, 一些种群表现出显著的差异。其中植物益生菌芽孢杆菌^[26] (*Bacillus*) 和类芽孢杆菌(*Paenibacillus*)^[27]在马缨杜鹃根表及根内显著富集; 具有固氮作用的 *Rhizomicrobium*^[28]在马缨杜鹃的根际内显著富集。并且固氮菌属 *Rhizomicrobium* 是根系微生物共生网络中的核心菌群, 其在根系生态位之间与较多的菌群互作, 积极参与微生物网络的调控作用, 对马缨杜鹃的根系生长发育具有十分重要的地位。

本研究从宏基因组出发, 扩增研究微生物群, 采用高通量测序技术, 以新的视角全面探究马缨杜鹃根系微生物的群落结构。比较分析了马缨杜鹃根系微生物群落多样性变化, 获得了 3 个生态位微生物群落组成差异等信息; 同时, 共变化网络揭示出马缨杜鹃根系生态位之间, 变化微生物间存在显著的相互作用。共变化网络分析使人们对土壤微生物群落物种间的相互作用有了新的认识, 促进了微生物种群生态位空间的进一步理解^[29-30]。本研究不仅对马缨杜鹃根系细菌群落进行了探究, 还对真菌群落结构也作了分析, 较之前的研究更为全面。所得结果为后续杜鹃根系微生物的研究奠定了良好的基础, 但这些变化种群可能具有的功能仍为今后研究中亟待解决的问题。同时本研究主要集中关注与马缨杜鹃根系对微生物群落结构的影响及微生物群落间的相互作用, 缺少土壤因子与根际微生物群落的研究, 所以要更全面、深刻解析马缨杜鹃根系微生物群落的结构变化应进一步加入土壤因子及外周土壤微生物与根系微生物之间的关系。

参 考 文 献

- [1] Sharma A, Poudel RC, Li AR, Xu JC, Guan KY. Genetic diversity of *Rhododendron delavayi* var. *delavayi* (C. B. Clarke) Ridley inferred from nuclear and chloroplast DNA: implications for the conservation of fragmented populations. *Plant Systematics and Evolution*, 2014, 300(8): 1853–1866.
- [2] Ma YP, Chamberlain D, Sun WB, Zhang CQ. A new species of *Rhododendron* (Ericaceae) from Baili *Rhododendron* nature reserve, NW Guizhou, China. *Phytotaxa*, 2015, 195(2): 197–200.
- [3] Mao AA, Vijayan D, Singha RKN, Pradhan S. *In vitro* propagation of *Rhododendron wattii* Cowan—a critically endangered and endemic plant from India. *In Vitro Cellular*

- & *Developmental Biology - Plant*, 2018, 54(1): 45–53.
- [4] Singh KK, Singh M, Chettri A. *In vitro* propagation of *Rhododendron griffithianum* wt.: an endangered *Rhododendron* species of Sikkim Himalaya. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 2016, 4(2): 72–75.
- [5] Yang HW, Li J, Xiao YH, Gu YB, Liu HW, Liang YL, Liu XD, Hu J, Meng DL, Yin HQ. An integrated insight into the relationship between soil microbial community and tobacco bacterial wilt disease. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2179.
- [6] Ulrich K, Ulrich A, Ewald D. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 63(2): 169–180.
- [7] Duineveld BM, Kowalchuk GA, Keijzer A, van Elsas JD, van Veen JA. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(1): 172–178.
- [8] Ravin NV, Mardanov AV, Skryabin KG. Metagenomics as a tool for the investigation of uncultured microorganisms. *Russian Journal of Genetics*, 2015, 51(5): 431–439.
- [9] Qi HY, Sun QL, Ma JC. Big data management and analysis of microbiome. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(6): 932–941. (in Chinese)
 亓合媛, 孙清岚, 马俊才. 微生物组大数据管理与分析. *微生物学报*, 2017, 57(6): 932–941.
- [10] Zhang YZ, Xu J, Riera N, Jin T, Li JY, Wang N. Huanglongbing impairs the rhizosphere-to-rhizoplane enrichment process of the citrus root-associated microbiome. *Microbiome*, 2017, 5: 97.
- [11] Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(8): 478–486.
- [12] Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(10): 463–471.
- [13] Kuczynski J, Stombaugh J, Walters WA, González A, Caporaso JG, Knight R. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2011, 36(1): 10.7.1–10.7.20.
- [14] Zgadzaj R, Garrido-Oter R, Jensen DB, Koprivova A, Schulze-Lefert P, Radutoiu S. Root nodule symbiosis in *Lotus japonicus* drives the establishment of distinctive rhizosphere, root, and nodule bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(49): E7996–E8005.
- [15] Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S, Eisen JA, Sundaresan V. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(8): E911–E922.
- [16] Zhang L, Xu HM, Zhu BL. Association of rhizosphere soil microbiome with the occurrence and development of replant disease—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(8): 1234–1241. (in Chinese)
 张蕾, 徐慧敏, 朱宝利. 根际微生物与植物再植病的发生发展关系. *微生物学报*, 2016, 56(8): 1234–1241.
- [17] Li S, Wu FZ. Diversity and co-occurrence patterns of soil bacterial and fungal communities in seven intercropping systems. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1521.
- [18] Cregger MA, Veach AM, Yang ZK, Crouch MJ, Vilgalys R, Tuskan GA, Schadt CW. The *Populus* holobiont: dissecting the effects of plant niches and genotype on the microbiome. *Microbiome*, 2018, 6: 31.
- [19] Wang XL, Wang ZK, Jiang P, He YL, Mu YD, Lv XH, Zhuang L. Bacterial diversity and community structure in the rhizosphere of four *Ferula* species. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 5345.
- [20] Zhao F, Zhao MZ, Wang Y, Pang FH. Biodiversity of bacteria and fungi in rhizosphere of strawberry with different continuous cropping years. *Microbiology China*, 2017, 44(6): 1377–1386. (in Chinese)
 赵帆, 赵密珍, 王钰, 庞夫花. 不同连作年限草莓根际细菌和真菌多样性变化. *微生物学通报*, 2017, 44(6): 1377–1386.

- [21] Na XF, Xu TT, Li M, Zhou ZN, Ma SL, Wang J, He J, Jiao BZ, Ma F. Variations of bacterial community diversity within the rhizosphere of three phylogenetically related perennial shrub plant species across environmental gradients. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 709.
- [22] Novello G, Gamalero E, Bona E, Boatti L, Mignone F, Massa N, Cesaro P, Lingua G, Berta G. The rhizosphere bacterial microbiota of *Vitis vinifera* cv. pinot noir in an integrated pest management vineyard. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1528.
- [23] Li YK, Sun YF, Lei YH, Zhou X, Yin Y, Qin K. Fungal community diversity in rhizosphere soil of *Lycium barbarum* L. based on high-throughput sequencing. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(7): 1049–1059. (in Chinese)
李越鲲, 孙燕飞, 雷勇辉, 周旋, 尹跃, 秦垦. 枸杞根际土壤真菌群落多样性的高通量测序. *微生物学报*, 2017, 57(7): 1049–1059.
- [24] Zimudzi J, van der Waals JE, Coutinho TA, Cowan DA, Valverde A. Temporal shifts of fungal communities in the rhizosphere and on tubers in potato fields. *Fungal Biology*, 2018, 122(9): 928–934.
- [25] Wen XY, Dubinsky E, Wu Y, Yu R, Chen F. Wheat, maize and sunflower cropping systems selectively influence bacteria community structure and diversity in their and succeeding crop's rhizosphere. *Journal of Integrative Agriculture*, 2016, 15(8): 1892–1902.
- [26] Lin C, Tsai CH, Chen PY, Wu CY, Chang YL, Yang YL, Chen YL. Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0196520.
- [27] Zhang N, Chen Y, Wang LL, Li XY, Wang JN, Zhou T, Qu FJ, Xu YP. Advances in the effect of *Paenibacillus polymyxa* in controlling of plant soil-borne diseases and growth promotion. *Journal of Microbiology*, 2017, 37(5): 91–97. (in Chinese)
张楠, 陈岩, 王丽丽, 李晓宇, 王佳宁, 周通, 曲芳京, 徐永平. 多粘类芽胞杆菌对植物土传病害的防控及促生长作用研究进展. *微生物学杂志*, 2017, 37(5): 91–97.
- [28] Ueki A, Kodama Y, Kaku N, Shiromura T, Satoh A, Watanabe K, Ueki K. *Rhizomicrobium palustre* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, fermentative stalked bacterium in the class *Alphaproteobacteria* isolated from rice plant roots. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2010, 56(3): 193–203.
- [29] Xue L, Ren HD, Li S, Leng XH, Yao XH. Soil bacterial community structure and co-occurrence pattern during vegetation restoration in karst rocky desertification area. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2377.
- [30] Barberán A, Bates ST, Casamayor EO, Fierer N. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *ISME Journal*, 2012, 6(2): 343–351.

Structure and composition variation of the root-microbiota of *Rhododendron delavayi*

Min Fang, Xiaorong Xu, Ming Tang, Jing Tang*

Key Laboratory of State Forestry Administration on Biodiversity Conservation in Karst Mountainous Areas of Southwestern China, College of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, Guizhou Province, China

Abstract: [Objective] The aim of this study was to understand the structure variation and assembly of root-microbiota of wild *Rhododendron delavayi*. The spatial resolution of the study distinguished three niches of *Rhododendron delavayi* root, the endosphere, rhizoplane, and rhizosphere. Here we compared the microbial community structure and composition variation between the three niches. [Methods] A detailed characterization of the root-microbiota of the *Rhododendron delavayi* by deep sequencing, using 16S rRNA V4 and ITS1 regions of microorganisms. The diversity and composition of microbial community from three niches were compared. In addition, we discussed the relationship between differential microbial genera based on co-occurrence network. [Results] In the constrained unconstrained principal coordinate analyses of Bray-Curtis distances between samples, microbial communities vary significantly between three niches. Moreover, the separation of root-microbiota from rhizosphere to rhizoplane is larger. The bacterial α -diversity between three niches is considered as statistically significant difference. 41 bacterial phyla and 6 fungal phyla abundance in the root-microbiota. The dominant bacterial phyla included *Proteobacteria*, *Acidobacteria* and *Actinobacteria*, which occupied more than 80% of the total abundance of bacterial communities. The dominant fungal phyla included *Zygomycota*, *Basidiomycota* and *Ascomycota*, which account for more than 99% of the total abundance of fungal communities. 589 bacterial genera and 390 fungal genera abundance in the root-microbiota. Moreover, the abundance of 25 bacterial and 10 fungal genera varied between three niches. Furthermore, analyzing the co-occurrence network of the differential genera showed the interaction between fungi and bacteria in the root-microbiota. Eight differential fungi was significantly correlated to differential bacteria, except *Waitea*. As the core genera in the co-occurrence network, *Bryobacter*, *Nocardia*, *Rhizomicrobium* and *Telmatobacter* played a very important regulation. [Conclusion] Dynamic changes observed during root-microbiota, as well as compositions of three niches, support a hypothesis for root microbiome assembly correlated with the root. At the same time, co-occurrence network analysis revealed bacteria and fungi interacted with each other among the three niches.

Keywords: root-microbiota, *Rhododendron delavayi*, niches, differential microbial genera, co-occurrence network

(本文责编: 李磊)

Supported by the Joint Fund Project of Guizhou Province (LH[2017]7362), by the Science and Technology Platform Construction Project of Guizhou Province (Z[2011]4005) and by the Joint Fund of the National Natural Science Foundation of China and the Karst Science Research Center of Guizhou Province (U1812401)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-851-83227351; E-mail: eva-830827@163.com

Received: 8 October 2018; Revised: 21 January 2019; Published online: 14 March 2019