



胡杨叶片及韧皮部内生细菌多样性及生物学功能分析

杨多², 岳海涛^{1,2*}, 伍杰毅², 赵鲁玉², 邢祥祥², 郭飞², 杨洁²

1 新疆大学未来技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046

2 新疆大学生命科学与技术学院, 合成生物学实验室, 新疆 乌鲁木齐 830046

杨多, 岳海涛, 伍杰毅, 赵鲁玉, 邢祥祥, 郭飞, 杨洁. 胡杨叶片及韧皮部内生细菌多样性及生物学功能分析. 微生物学报, 2022, 62(1): 213–226.

Yang Duo, Yue Haitao, Wu Jieyi, Zhao Luyu, Xing Xiangxiang, Guo Fei, Yang Jie. Diversity and biological function of endophytic bacteria in *Populus euphratica* leaves and phloem. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 213–226.

摘要: 【目的】通过分析胡杨叶片及树干内生细菌群落多样性、结构特征及生物学功能, 探究内生细菌与宿主胡杨的互作机制。【方法】利用 Illumina MiSeq 高通量测序技术, 对采集自新疆喀什地区胡杨林的 3 组胡杨树叶和 3 组树干样本的内生细菌进行 Alpha、Beta 多样性分析、群落组成分析以及通过比对代谢数据库进行群落功能预测, 并对样品中内生细菌进行分离纯化鉴定。

【结果】胡杨树叶优势菌群依次为变形菌门 *Proteobacteria* (40.71%)、放线菌门 *Actinobacteria* (21.76%)、拟杆菌门 *Bacteroidetes* (14.24%) 和厚壁菌门 *Firmicutes* (13.92%); 胡杨树干优势菌群为厚壁菌门 *Firmicutes* (56.91%)、放线菌门 *Actinobacteria* (37.01%)。PCoA 分析结果表明, 胡杨树叶与树干的内生细菌群落结构存在明显差异, 同类型组织样本群落结构相似。功能预测发现, 内生细菌丰度较高的代谢通路及酶大多与细胞壁和细胞膜、外排泵、氧化应激、相容性溶质、能量代谢等相关。并分离到可培养内生细菌 44 株, 分属 5 个属, 其中芽孢杆菌属占比最多。【结论】胡杨叶片中内生细菌的多样性及丰富度均高于树干组织, 不同胡杨组织由于生物学功能不同, 也影响着内生细菌群落的组成。内生细菌群落的功能与宿主组织有对应关系, 胡杨所处生境也影响着其内生细菌群落的功能表达。胡杨可培养内生细菌群落具有耐盐碱等特性, 是具有应用潜力的菌种资源。

关键词: 胡杨; 内生细菌; 多样性分析; 功能预测

基金项目: 国家自然科学基金(U2003305); 新疆天山创新团队项目(2020D14022); 新疆维吾尔自治区重点研发专项(2018B1006-1)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (U2003305), by the Tianshan Innovation Team Project of Xinjiang (2020D14022) and by the Key Research and Development Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2018B1006-1)

*Corresponding author. E-mail: yuehaitao@tsinghua.org.cn

Received: 22 March 2021; Revised: 21 April 2021; Published online: 18 June 2021

Diversity and biological function of endophytic bacteria in *Populus euphratica* leaves and phloem

YANG Duo², YUE Haitao^{1,2*}, WU Jieyi², ZHAO Luyu², XING Xiangxiang², GUO Fei², YANG Jie²

¹ School of Future Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, Xinjiang, China

² School of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, Xinjiang, China

Abstract: [Objective] To investigate the interaction mechanism between endophytic bacteria and host poplar, the diversity, structural characteristics and biological functions of the endophytic bacterial community in the leaves and trunk of *Populus euphratica* were analyzed. [Methods] By using Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology, we performed Alpha and Beta diversity analysis, community composition analysis, and functional prediction compared with metabolic database of the endophytic bacteria on three groups of *Populus euphratica* leaves and three groups of trunk samples collected from poplar forests in Kashgar, Xinjiang, China. And endophytic bacteria from the samples were isolated and purified. [Results] The dominant groups of *Populus euphratica* leaves were *Proteobacteria* (40.71%), *Actinobacteria* (21.76%), *Bacteroidetes* (14.24%), and *Firmicutes* (13.92%), and the dominant groups of *Populus euphratica* trunk samples were *Firmicutes* (56.91%), *Actinobacteria* (37.01%). The results of PCoA analysis showed that there were significant differences in the endophytic bacterial community structure between *Populus euphratica* leaves and trunks, and the community structure of the same type of tissue samples was similar. Functional prediction revealed that the metabolic pathways and enzymes with higher abundance of endophytes were mostly related to cell wall and cell membrane, efflux pumps, oxidative stress, compatible solutes, energy metabolism, etc. A total of 44 cultivable endophytic bacteria belonging to five genera were isolated, among which *Bacillus* accounted for the largest proportion. [Conclusion] The diversity and abundance of endophytic bacteria in *Populus euphratica* leaves were higher than in trunk tissues, and different *Populus euphratica* tissues also influenced the composition of the endophytic bacterial community due to their different biological functions. The functions of the endophytic bacterial community corresponded to the host tissues, and the habitat in which *Populus euphratica* was located also influenced the functional expression of its endophytic bacterial community. The cultivable endophytic bacterial community of *Populus euphratica* has salt-tolerant and other characteristics, which are potential strain resources.

Keywords: *Populus euphratica*; endophytic bacteria; diversity analysis; functional prediction

土地盐碱化是限制土地资源利用和影响生态环境健康的重要因素^[1]。新疆地处欧亚大陆腹地，典型的干旱半干旱气候条件使土壤受盐碱化影响最大^[2]。据统计，新疆盐碱土总面积约为 2.18×10^7 hm²，其盐碱土面积大、分布广、

种类多，被誉为世界盐碱土博物馆^[3]。

胡杨 (*Populus euphratica* Oliv) 是杨属 (*Populus*) 中最古老原始的树种之一，具有耐旱、耐盐碱、耐热、抗风沙和瘠薄等特性，是特有的荒漠林地树种，主要分布于我国西北干旱区

及北非、中东地区^[4]。据统计,新疆胡杨林面积近 $3.0 \times 10^5 \text{ hm}^2$, 占我国胡杨林总面积的 90%, 占世界胡杨林总面积的 55%以上, 在维持荒漠地区生态平衡方面发挥着重要作用, 也是宝贵的生物学研究资源^[5]。

由于胡杨优秀的耐干旱和盐碱能力, 其已经成为抗逆研究的重要木本模式生物, 目前多集中在胡杨生理及分子生物学研究上^[6]。有研究表明在干旱和盐碱胁迫下, 胡杨叶片基因存在差异表达的分子功能主要是催化、结合、转运蛋白及分子转导等活性^[7]。Zhuang 等发现成熟的胡杨叶表皮和角质层增厚, 叶绿体含量更高^[8]。还有报道发现与水分敏感树种 *Populus × canescens* 相比, 耐旱的胡杨在干旱处理下木质部内 IAA 复合物含量增加, 而且游离 IAA 的含量下降远远小于敏感树种^[9]。Zeng 等对胡杨的耐盐性机理的研究表明, 胡杨可以有效地从树干汁液中排除 Na^+ 和 Cl^- ^[10]。

植物内生细菌普遍存在于木本、草本植物中, 在非生物胁迫因素的环境下, 植物更依赖能够增强其抗逆能力的微生物^[11]。Khan 等研究表明一些从杨树中分离出的内生细菌能够促进植物生长^[12], Kang 等发现了部分内生细菌能够减轻有机污染物对其寄主的危害^[13]。此外, 还有研究表明, 接种内生菌对提高植物生产力和增强抗旱性具有多种积极作用^[14-15]。然而, 目前对于胡杨内生细菌研究较少, 大多数的研究集中于胡杨可培养内生细菌的分离鉴定^[16], 可培养群落结构多样性的分析^[17], 而对胡杨整体内生菌群落结构及生物学功能仍然缺乏了解。

基于胡杨独特的抗逆能力, 本研究采用高通量测序技术对盐碱生境下的胡杨树干以及树叶的内生细菌群落结构、生物多样性进行分析, 并对其生物学功能进行预测, 为了解胡杨内生细菌与宿主之间的互作关系提供信息。

1 材料与方法

1.1 样品采集

采样地点位于新疆喀什地区泽普县金湖杨国家森林公园(E 76°57.935', N 38°01.848'), 树叶采集自同一区域内 3 株健康胡杨树(leaf 1、leaf 2、leaf 3), 每株取叶 8-10 片; 在保证胡杨受到最小的伤害下, 在树洞内刮削下活体组织 10-15 g (stem 1、stem 2、stem 3); 并收集了区域内 5 cm 深度的土壤样品。样品采集后以无菌密封袋封装, 干冰运输至实验室, 提取 DNA 前, 样本存储于 -80°C 。

1.2 样品处理及菌株筛选

利用 75% 的乙醇对胡杨叶片进行表面清洗和消毒, 已消毒的叶片和韧皮组织分别称取 3 g 剪碎, 分别放入 30 mL 无菌水中, 150 r/min 振荡 30 min 后, 取 100 μL 涂布于 LB 培养基(胰蛋白胨 10 g/L、酵母浸粉 5 g/L、氯化钠 10 g/L、pH 7.5), 37°C 培养 24 h, 挑取不同形态、颜色及大小的菌落, 划线纯化及保存。

1.3 DNA 提取、PCR 扩增及 Illumina MiSeq 测序

使用 E.Z.N.A.[®] DNA 试剂盒(Omega Bio-tek, Norcross, Ga, USA)从所有样品中提取微生物 DNA。随后, 用 NanoDrop 2000 紫外-可见分光光度计(美国威尔明顿赛默科学公司)测定 DNA 浓度和纯度。用 338F (5'-ACTCCTACGGGAGG CAGAG-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTW TCTAAT-3')引物扩增细菌 16S rRNA V3-V4 区。委托上海美吉生物医药科技有限公司进行 PCR 产物扩增及纯化, 并基于 Illumina MiSeq 平台(Illumina, San Diego, USA)进行高通量测序。

1.4 土样理化性质测定

将土壤样品干燥处理后压碎, 过孔径为 2 mm 的筛子, 并将土水以 1:5 (W/V)比例混合

进行土壤盐分测定。使用电导率仪(DDSJ-318, Lei-Ci, 中国)测定电导率; 使用 pH 计(FE20, Mettler-Toledo Instruments, 中国)测定土壤 pH 值; 火焰光度法测定 K^+ , Na^+ ; EDTA 滴定法测定 Ca^{2+} , Mg^{2+} ; 双指示剂中和滴定法测定 CO_3^{2-} 和 HCO_3^- ; 硝酸银滴定法测定 Cl^- ; EDTA 间接络合滴定法测 SO_4^{2-} 。

1.5 数据分析

使用 Uparse (v.7.1)在 97%相似度下进行分类操作单元(operational taxonomic units, OTU)聚类。使用 Mothur (v.1.30.2)进行 Alpha 多样性分析反映样本内的物种丰富度和多样性。使用 Qiime (v.1.9.1)进行 Beta 多样性分析对所测样本的群落构成进行比较。将 16S rDNA 序列结果进行 BLAST 比对,用 MEGA (v.4.0)采用邻接法(NJ)聚类分析,并构建系统进化树。使用 PICRUST 软件通过比对 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 数据库以及 MetaCyc (metabolic pathways from all domains of life)代谢通路数据库对扩增子测序结果样本中微生物群落的功能组成进行预测。

2 结果与分析

2.1 胡杨生境土壤理化性质

所采集的泽普县胡杨林土壤样品的理化测试结果如表 1 所示, 土壤的 pH 值为 8.81, 电导率为 18.95 dS/m。土壤中的主要阴离子是 Cl^-

和 SO_4^{2-} , 阳离子主要是 Na^+ 、 Mg^{2+} , 土壤总盐含量达到 27.764 g/kg, 依据土壤盐渍化类型划分指标^[18], 泽普胡杨林土壤样品的 pH>8.0, 属于碱性土壤, 且含盐量>15 g/kg, 属于重度盐渍化土壤, 表明采样胡杨林的土壤环境属于盐碱土壤环境。

2.2 胡杨内生细菌群落的 Alpha 多样性

对胡杨树叶以及其树干样本进行 Alpha 多样性分析, 了解样本内生细菌群落的多样性和丰富度。由表 2 可知, 各样品的覆盖度均大于 99%, 表明测序数据完整性较高。胡杨树叶样本 Shannon 指数为 4.194 5–4.740 9, 而树干样本 Shannon 指数为 1.378 0–2.444 8, 低于树叶样本, 说明胡杨树叶内生细菌群落多样性高于树干样本。另外, 胡杨树叶样本 ACE 指数为

表 1 胡杨树下土壤理化性质结果

Table 1 Soil physicochemical properties

Soil physicochemical properties	Soil
$c(CO_3^{2-})/(g/kg)$	0.061
$c(HCO_3^-)/(g/kg)$	0.366
$c(Cl^-)/(g/kg)$	9.208
$c(Ca^{2+})/(g/kg)$	0.600
$c(Mg^{2+})/(g/kg)$	5.835
$c(SO_4^{2-})/(g/kg)$	7.685
$c(K^+)/(g/kg)$	0.523
$c(Na^+)/(g/kg)$	3.486
pH	8.810
EC/(dS/m)	18.950

表 2 胡杨样本内生细菌 Alpha 多样性指数

Table 2 Alpha diversity index of endophytic bacteria in *Populus euphratica* samples

Sample	OTU	Shannon	Simpson	ACE	Chao	Coverage
Leaf_1	487	4.194 5	0.054 3	525.407 2	529.600 0	0.996 0
Leaf_2	567	4.740 9	0.017 5	710.213 3	726.507 0	0.991 5
Leaf_3	528	4.304 9	0.040 0	657.430 5	708.185 2	0.992 2
Stem_1	89	1.378 3	0.367 6	159.186 8	133.000 0	0.998 2
Stem_2	215	2.444 8	0.172 5	410.949 5	316.527 8	0.995 2
Stem_3	103	1.531 2	0.286 4	192.114 8	153.647 1	0.997 6

525.407 2–710.213 3, 高于树干样本 ACE 指数值, 表明胡杨树叶内生细菌群落丰富度高于树干样本, 与 Chao 指数结果一致。

2.3 胡杨内生细菌群落组成

使用 Uparse (v.7.1)在 97%相似度下进行 OTU 聚类, 所采集的胡杨树叶与树干样本内生细菌共聚类到 1 342 个 OTU, 鉴定为 27 门 61 纲 141 目 286 科 548 属。图 1 显示了各样本在门水平下的群落结构, 丰度不足 1%的合并为“others”。其中丰度超过 1%的门分别是厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、异常球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*)、浮霉菌门(*Planctomycetes*)、蓝细菌(*Cyanobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)。其中厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)在胡杨所有样本中丰度都较高,

在每个样本中占总丰度的范围分别在 9.50%–64.59%和 4.34%–47.25%。另外, 相较于树干样本, 变形菌门(*Proteobacteria*)是另一优势菌门, 在树叶样本中丰度远高于树干样本, 丰度范围为 35.26%–45.85%。图 2 是使用饼图对两组不同的样本群落组成进行对比。可以发现, 在树叶组中, 变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)是优势菌群, 分别占树叶内生细菌总丰度的 40.71%、21.76%、14.24%、13.92%。而在胡杨树干样本组中, 厚壁菌门(*Firmicutes*)与放线菌门(*Actinobacteria*)是优势菌群, 分别占总丰度的 56.91%和 37.01%, 二者占比之和达到 93.92%。

为进一步了解胡杨树叶与树干样本组间群落组成的差异性, 基于属水平丰度下的 Bray-Curtis 距离算法对 6 个样本进行了层级聚类分析以及 PCoA 分析。结果表明, 样本内生

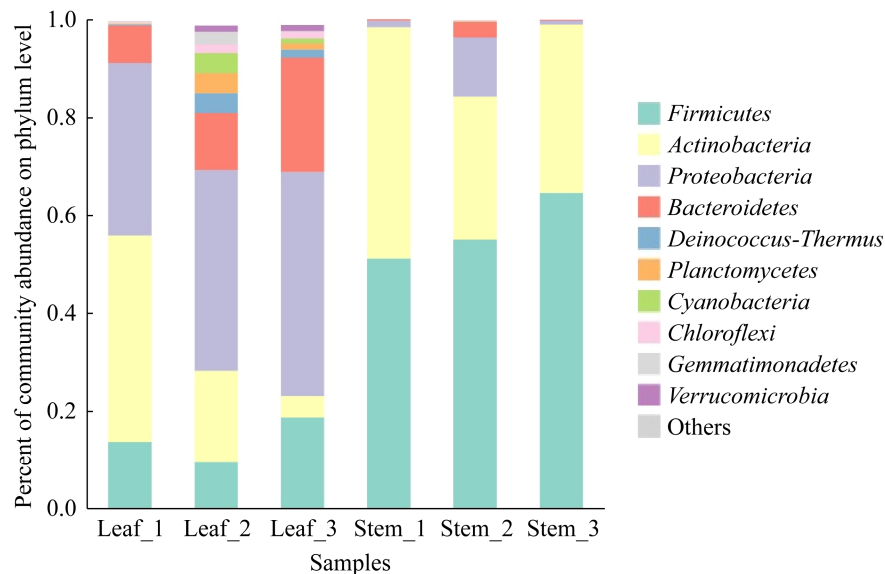


图 1 胡杨样本门水平内生细菌群落结构

Figure 1 Community structure of endophytic bacteria in *Populus euphratica* samples at phylum level. The abscissa is the sample name, the ordinate is the proportion of the species in that sample, columns of different colors represent different species, and the length of the column represents the size of the proportion that is accounted for by that species.

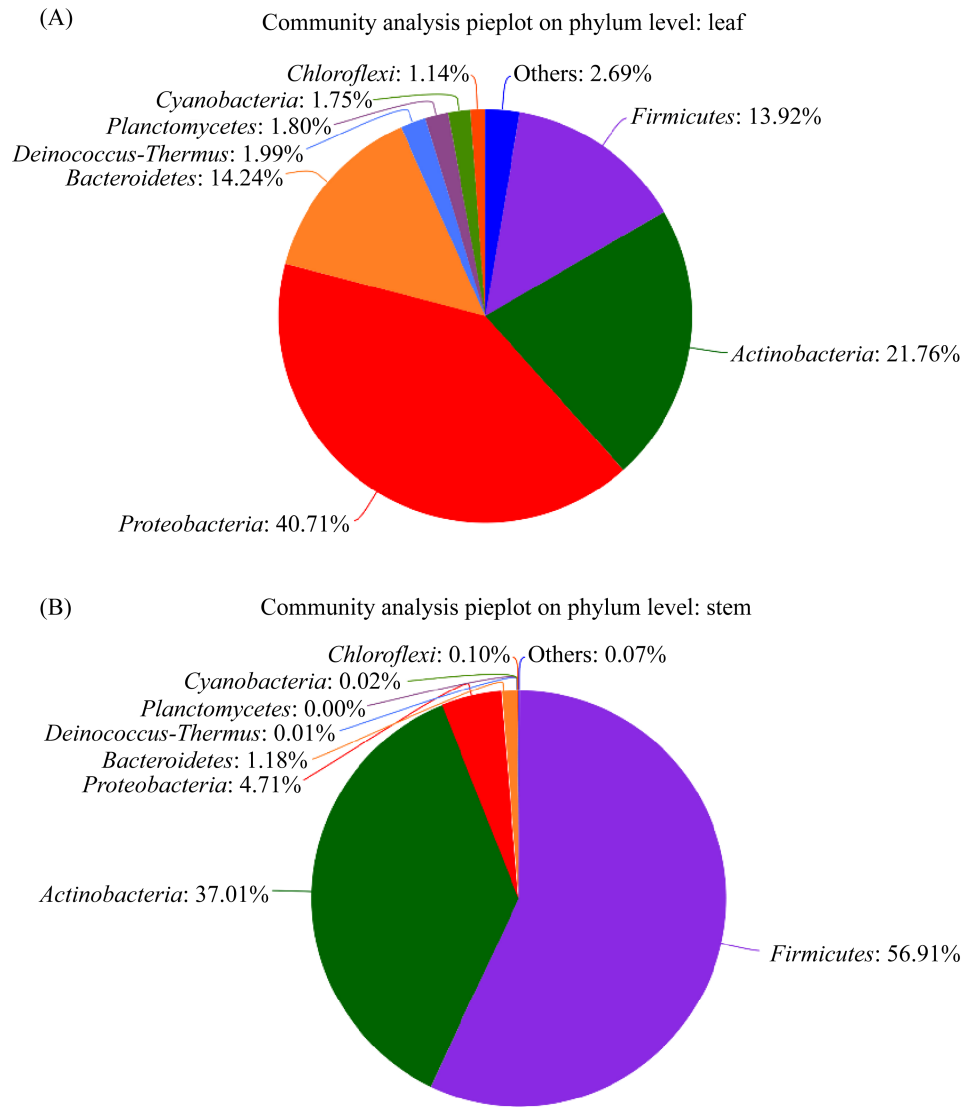


图 2 胡杨树叶与树干两组样本门水平内生细菌群落结构

Figure 2 Structure of endophytic bacterial community in *Populus euphratica* leaves and stem. A: leaf samples; B: stem samples. Different colors indicate different species, and the area of the pie indicates the percentage of that species.

群落结构与样本类型一致，同类型样本之间聚类在一起，群落结构相似(图 3)。在 PCoA 结果中，树叶与树干样本的间距离较远，表明了两类样本群落结构组成，存在明显差异(图 4)。

为进一步探究胡杨树叶及树干样本中的内生细菌群落组成及物种丰度信息，利用热力图表征了胡杨各样本丰度在前 50 的属(图 5)。结

果表明，树叶样本组中 Leaf_1 的特征菌属是考克氏菌属(*Kocuria*)，Leaf_2 和 Leaf_3 的特征菌属均为红细菌属(*Rhodobacteraceae*)，另外发现虽然 Leaf_1 与 Leaf_2、Leaf_3 之间的群落组成在门水平相似，但其放线菌门(*Actinobacteria*)丰度高于 Leaf_2、Leaf_3，因此在属水平的显示出与二者存在差异，这可能是由于树叶样本

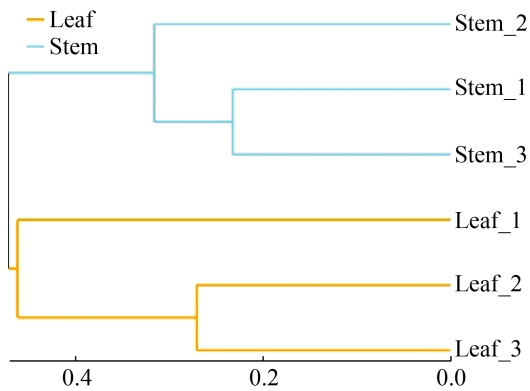


图 3 胡杨样本层级聚类分析
 Figure 3 Hierarchical clustering analysis of *Populus euphratica* samples. The length of the dendrites represents the distance between samples, and different groups can be displayed in different colors.

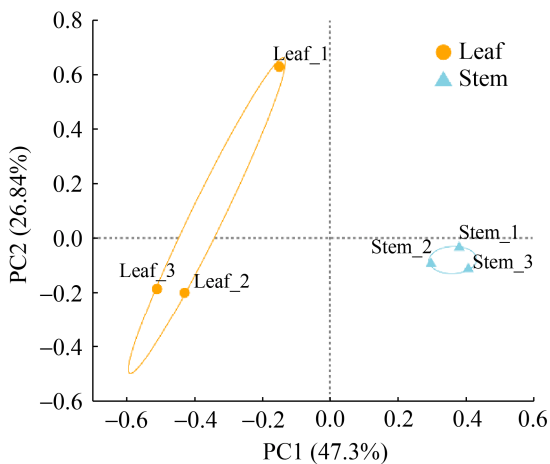


图 4 胡杨样本内生群落 PCoA 分析
 Figure 4 PCoA analysis of endophytic community in *Populus euphratica* samples. Points of different shapes represent samples of different groups. The closer the two sample points are, the more similar the species composition of the two samples.

采集自不同胡杨树个体而造成的差异。对于胡杨树干样本组, 嗜碱菌属(*Alkalibacterium*)、栖盐芽孢杆菌属(*Salsuginibacillus*)、涅斯捷连科氏菌属(*Nesterenkonia*)分别是 stem_1、stem_2、stem_3 的特征菌属。同时热力图显示丰度前 50 的属仅有 5 个属是 6 个样本所共有的, 分别是

假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、海生乳杆菌(*Marinilactibacillus*)、涅斯捷连科氏菌属 (*Nesterenkonia*)、嗜碱菌属 (*Alkalibacterium*), 这也一定程度上反映了胡杨树叶与树干的内生细菌群落差异明显。

2.4 胡杨内生细菌的分离鉴定

为获得易培养、不需要特殊生长因子、具抗逆性、有底盘化改造价值的菌株, 本研究选用常规胰蛋白胨培养基(Luria-Bertani Medium, 下文简称 LB 培养基)对胡杨各组织样本的内生细菌进行分离筛选, 通过菌落特征及细胞形态观察, 分离得到了 44 株细菌。然后以这些细菌的 16S rDNA 序列为模板进行 PCR 扩增并测序, 共获取了 44 个菌株的 16S rDNA 序列信息, 使用 MEGA 软件并采用邻接法(NJ)聚类分析构建系统进化树(图 6)。结果显示, 分离得到的 44 个菌株隶属于 5 个属, 分别是涅斯捷连科氏菌属 (*Nesterenkonia*)、厄氏菌属 (*Oerskovia*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、动性球菌属(*Planococcus*)。其中筛选到的芽孢杆菌属(*Bacillus*)细菌最多, 有 29 株, 占总数的 65.9%; 动性球菌属(*Planococcus*)的细菌有 6 株, 占总菌数的 13.6%; 盐单胞菌属 (*Halomonas*)与涅斯捷连科氏菌属 (*Nesterenkonia*)均分离到 4 株, 占比都为 9.1%; 厄氏菌属(*Oerskovia*)细菌分离到 1 株, 占比为 2.3%。筛选可培内生细菌的胡杨组织分为 4 种类型, 其中胡杨树叶共计分离到 17 株细菌, 分属于上述 5 个属, 而韧皮部仅筛选到 6 株细菌, 分属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、涅斯捷连科氏菌属(*Nesterenkonia*)和动性球菌属(*Planococcus*)。以上结果也印证了包含芽孢杆菌属(*Bacillus*)的厚壁菌门(*Firmicutes*)是胡杨内生细菌的优势菌群, 且胡杨树叶的内生细菌群多样性高于韧皮部。

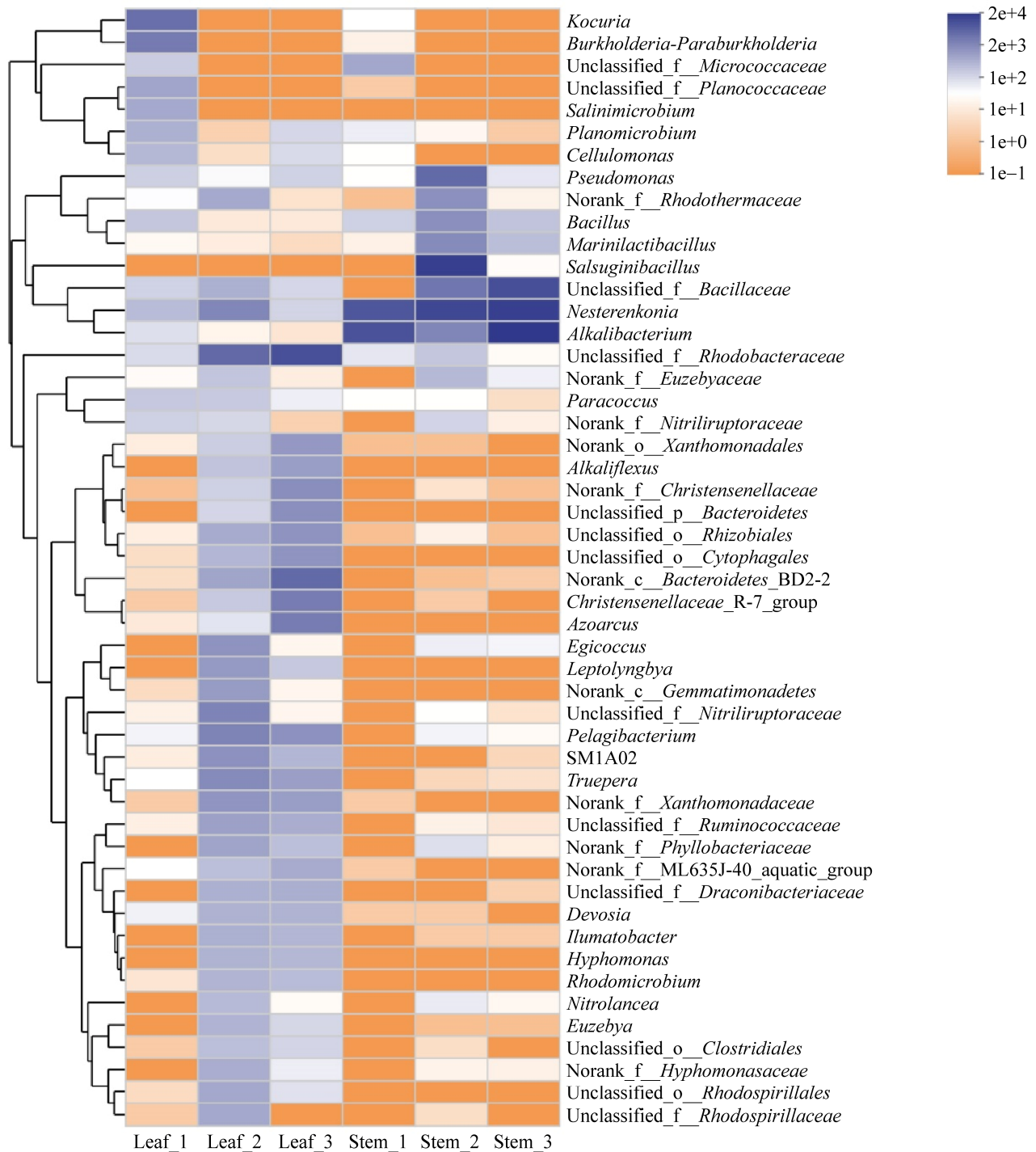


图 5 胡杨样本内生细菌群落属水平热图

Figure 5 A heatmap diagram of the dominant 50 genera under six in *Populus euphratica* samples. The abscissa is the sample name, and the ordinate is the species name. The abundance of different species in the sample is displayed by the color gradient of the color block. The value represented by the color gradient is on the right side of the figure.

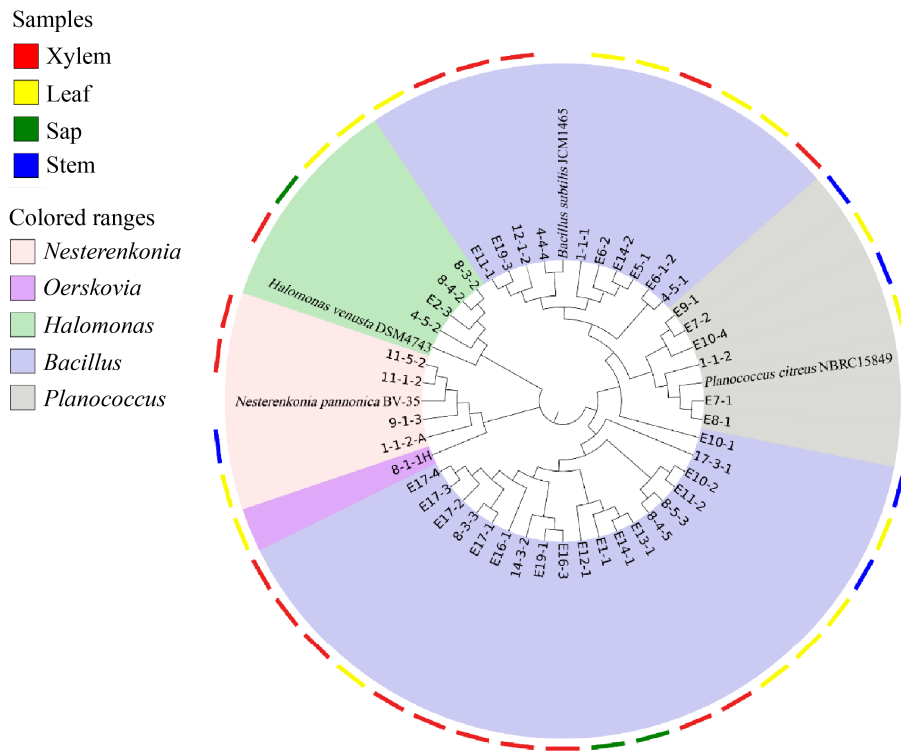


图 6 胡杨样本可培内生细菌的 16S rDNA 的系统进化分析

Figure 6 Phylogenetic relationships among bacterial isolates from *Populus euphratica* stands based on the 16S rDNA sequences. Bacteria of different genera correspond to different colors, and each short line in the outermost circle represents the sample isolated from the bacteria, and each sample corresponds to a color.

然后以加入了 5% NaCl 以及 pH 10.0 的高盐碱 LB 培养基作为选择性培养基对 44 株细菌进一步筛选, 得到了 1 株具有较强的耐盐碱能力的芽孢杆菌, 其最大耐受 pH 值达到了 11.5。将该菌株进行全基因组测序, 基因序列结果已上传至 GenBank (PRJNA648288) 并命名为 *Bacillus haynesii* P19, 基因组大小约为 4 235 749 bp, GC 含量为 45.96%, 编码基因共计 4 128 个。芽孢杆菌在工业酶和功能营养品的生产方面具有广泛应用, 通过代谢工程改造已开发出不同类型的底盘细胞^[19], 而 *Bacillus haynesii* P19 较强的耐盐碱性使其成为一种具有改造潜力的工业发酵底盘菌株。

2.5 胡杨内生细菌群落功能预测分析

研究表明胡杨树叶以及树干自身存在的

生理机制能够抗盐碱胁迫, 考虑到内生细菌与宿主之间可能存在的共生联系, 基于本研究所测得的细菌多样性数据, 比对 KEGG 数据库以及 MetaCyc 代谢通路数据库进行丰度分析, 对胡杨叶片及树干内生菌群进行初步的功能预测。

基于 KEGG 数据库、MetaCyc 代谢通路数据库, 在胡杨树叶与树干样本内生细菌群落中, 丰度占总丰度 2% 以上的蛋白及代谢通路中大多与细胞的组成结构、能量代谢与调控、氨基酸合成途径相关。表 3 结果显示了具体的表达丰度较高的胡杨内生细菌群落代谢途径, 其中与细胞组成相关的代谢途径有肽聚糖合成通路 (peptidoglycan biosynthesis I、peptidoglycan maturation)、磷脂合成途径 (superpathway of

表 3 胡杨内生细菌群落部分代谢通路丰度表

Table 3 Abundance of some metabolic pathways in *Populus euphratica* endophytic bacterial community

Pathways	Description	Leaf abundance	Stem abundance
PHOSLIPSYN-PWY	Puperpathway of phospholipid biosynthesis I (bacteria)	102 771.782 3	132 172.035 8
PEPTIDOLYCANSYN-PWY	Peptidoglycan biosynthesis I (meso-diaminopimelate containing)	92 148.321 1	117 444.830 4
PWY-6385	Peptidoglycan biosynthesis III (mycobacteria)	88 456.280 6	116 971.508 0
PWY0-1586	Peptidoglycan maturation (meso-diaminopimelate containing)	55 808.777 3	147 946.935 4
POLYAMSYN-PWY	Superpathway of polyamine biosynthesis I	22 608.500 1	10 093.758 5
PWY-3781	Aerobic respiration I (cytochrome c)	262 073.297 0	212 883.826 7
NONOXIPENT-PWY	Pentose phosphate pathway (non-oxidative branch)	113 000.367 2	130 825.914 9
TCA	TCA cycle I (prokaryotic)	111 346.845 9	111 275.561 3
GLUCONEO-PWY	Gluconeogenesis I	91 771.422 5	92 507.749 9
GLYCOLYSIS	Glycolysis I (from glucose 6-phosphate)	91 087.624 7	107236.582 2
PWY-5101	L-isoleucine biosynthesis II	169 360.439 5	112 528.279 6
VALSYN-PWY	L-valine biosynthesis	166 647.904 0	105 379.515 4
PWY-2942	L-lysine biosynthesis III	107 611.072 5	121 829.840 0
TRPSYN-PWY	L-tryptophan biosynthesis	95 436.956 9	82 615.091 7
PWY-7208	Superpathway of pyrimidine nucleobases salvage	113 672.139 6	141 785.443 6
PWY-7199	Pyrimidine deoxyribonucleosides salvage	63 780.872 3	99 491.778 8
PWY-6609	Adenine and adenosine salvage III	80 706.544 2	159 575.603 5
PWY-7200	Superpathway of pyrimidine deoxyribonucleoside salvage	72 164.296 3	98 804.923 5
PWY-6165	Chorismate biosynthesis I	95 753.190 5	112 033.708 7
SO4ASSIM-PWY	Sulfate reduction I (assimilatory)	71 234.295 3	58 149.407 3
PWY-7664	Oleate biosynthesis IV (anaerobic)	84 956.010 0	28 284.577 4
PWY-3661	Glycine betaine degradation I	36 775.170 9	58 779.267 9
P101-PWY	Ectoine biosynthesis	22 634.942 9	72 854.229 2

phospholipid biosynthesis I)以及多胺生物合成途径(superpathway of polyamine biosynthesis I);与能量调控相关的代谢途径有糖酵解途径(glycolysis I)、磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway)、氨基酸合成途径(L-valine biosynthesis、L-tryptophan biosynthesis等)以及相容性溶质四氢嘧啶的合成(ectoine biosynthesis)途径。

表 4 显示了胡杨内生细菌群落表达丰度较高的功能酶,其中有参与能量调控的相关脱

氢酶表达,如 NADH 脱氢酶(NADH dehydrogenase, EC1.6.99.3)、乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, EC1.2.1.3);有参与胁迫机制的离子转运蛋白表达如铁螯合转运 ATP 酶(iron-chelate-transporting ATPase, EC3.6.3.34)、Cu²⁺ 运输蛋白(Cu²⁺-exporting ATPase, EC3.6.3.4);以及氧化应激相关蛋白如过氧化物酶(peroxiredoxin, EC1.11.1.15)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, EC1.15.1.1)、过氧化氢酶(catalase, EC1.11.1.6)。

表 4 胡杨内生细菌群落部分功能酶丰度表

Table 4 Abundance of some functional enzymes in *Populus euphratica* endophytic bacterial community

Descriptions	Leaf abundance	Stem abundance
Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) (EC1.2.4.1)	233 344.48	385 564.46
Alcohol dehydrogenase (EC1.1.1.1)	188 699.03	309 120.83
Cytochrome-c oxidase (EC1.9.3.1)	365 640.90	296 313.24
Succinate dehydrogenase (quinone) (EC1.3.5.1)	180 073.27	185 671.58
NADH dehydrogenase (EC1.6.99.3)	109 042.68	113 229.68
Aldehyde dehydrogenase (NAD ⁺) (EC1.2.1.3)	183 853.82	218 496.94
Glucokinase (EC2.7.1.2)	114 221.89	103 458.11
Chorismate synthase (EC4.2.3.5)	89 640.87	104 106.52
Glycerol kinase (EC2.7.1.30)	77 964.70	166 146.08
H ⁺ -transporting two-sector ATPase (EC3.6.3.14)	246 508.13	253 489.75
Iron-chelate-transporting ATPase (EC3.6.3.34)	206 019.46	291 207.77
Monosaccharide-transporting ATPase (EC3.6.3.17)	273 241.18	214 383.64
Polar-amino-acid-transporting ATPase (EC3.6.3.21)	158 854.86	221 389.26
Ferredoxin-NADP ⁺ reductase (EC1.18.1.2)	77 242.88	93 325.97
Ferrochelatase (EC4.99.1.1)	76 129.20	72 375.54
Cu ²⁺ -exporting ATPase (EC3.6.3.4)	66 672.23	74 380.89
Zinc-exporting ATPase (EC3.6.3.5)	53 924.85	236 001.54
Cu ⁺ exporting ATPase (EC3.6.3.54)	101 169.01	166 976.79
Peroxiredoxin (EC1.11.1.15)	181 427.12	172 387.45
Superoxide dismutase (EC1.15.1.1)	137 562.02	174 271.10
Catalase (EC1.11.1.6)	52 817.62	134 541.70
Betaine-aldehyde dehydrogenase (EC1.2.1.8)	64 046.79	99 720.42
Indole-3-glycerol-phosphate synthase (EC4.1.1.48)	83 561.37	72 795.89

3 讨论

胡杨作为一种独特的适应干旱盐碱环境的植物物种, 其内生细菌群落与宿主之间的相互作用关系还需深入了解。本研究采用高通量测序技术分析胡杨树叶及树干组织内生细菌群落结构及生物多样性, 并对内生细菌群落进行了初步功能预测。结果显示, 胡杨叶片的多样性及丰富度均高于树干组织, 优势菌门是变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*), 而树干样本中的优势菌群为厚壁菌门

(*Firmicutes*)和放线菌门(*Actinobacteria*), 二者占到总丰度的 93.92%。已有研究表明, 放线菌(*Actinobacteria*)定殖在植物的内部组织中, 并在其宿主的病原体防御和生长调节中发挥作用^[20]。厚壁菌门(*Firmicutes*)具有较厚的细胞壁, 且多数能够产生芽孢, 可以抵抗干旱和极端环境^[21]。胡杨两类样本中厚壁菌门(*Firmicutes*)均为优势菌群, 说明了宿主生长环境对其内生细菌存在影响, 在干旱和盐碱环境下, 能够抵抗胁迫的厚壁菌门(*Firmicutes*)可以更好地生存。

利用样本聚类分析以及 PCoA 分析显示同一类型的胡杨组织样本最相关, 而胡杨叶片和

树干两类样本存在不同的微生物群落组成。胡杨叶片发生光合和呼吸作用, 并进行能量转换和物质生产, 而树干主要功能是水分和养分的运输, 连通树叶及树根, 这表明了胡杨组织功能不同, 也影响着内生细菌环境群落组成的不同。同时由于胡杨生长于盐碱土壤, 其树干茎秆液具有较高的 Na^+ 和 Cl^- , 是一种较严苛的环境, 可能导致了树干内生细菌多为抗逆性较强的厚壁菌门。

本研究共分离筛选出 44 株胡杨内生菌株, 隶属于 5 个属, 其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)分离到 29 株内生细菌, 是分离到最多细菌的属。这一结果与多样性分析中发现的厚壁菌门(*Firmicutes*)是胡杨内生细菌的优势菌属一致, 能够产生芽孢抵抗极端环境的芽孢杆菌属(*Bacillus*)内生细菌也更易于进行可培分离。

研究表明, 胁迫条件下微生物的适应行为复杂, 与细胞的组成结构、生理性质、代谢途径密切相关^[22]。本文通过比对 KEGG 数据库以及 MetaCyc 代谢通路数据库进行胡杨内生群落初步的功能预测, 发现丰度较高的代谢通路及酶大多与细胞壁和细胞膜、外排泵、氧化应激、相容性溶质、能量代谢等相关。细胞壁是微生物与外界环境分隔的重要生物学屏障, 肽聚糖是原核生物细胞壁的主要成分^[23]。在胡杨样本组织内生细菌中关于肽聚糖合成的多条通路表达丰度均较高。在受到胁迫时, 机体细胞内氧化还原状态的平衡会被打破, 生物体内抗氧化防御的主要系统为抗氧化酶系统^[24]。而胡杨树叶及树干样本内生细菌群落中过氧化物酶(peroxidase)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)、过氧化氢酶(catalase)的表达均较活跃。外排泵是一类通过质子动力将有毒分子排到胞外的膜转运蛋白^[25]。胡杨生长环境多为盐碱土, 离子浓度较高, 而在测得的胡杨内生群

落功能酶中发现多种转运蛋白表达活跃, 说明可能存在帮助宿主吸收离子, 维持细胞稳定的作用。同时还发现内生群落中关于合成植物生长素的相关酶(indole-3-glycerol-phosphate synthase)表达活跃^[26]。以上发现均说明了内生群落与宿主存在关联, 胡杨所处生境影响着其内生群落功能的表达, 同时细菌也会通过其代谢产物参与宿主植物的生长。另外由于多样性数据进行细菌群落功能预测仅是较初步的分析, 后续本研究还会基于宏基因组学进一步探究内生群落与宿主及环境之间的联系。

本研究初步分析了胡杨这一耐盐碱胁迫植物的树叶及树干中内生群落组成, 结果表明不同胡杨组织部位的微生物群落结构存在差异, 内生细菌功能活跃度与胡杨生长环境相关。为了解内生细菌群落与胡杨的互作关系提供了线索, 在后续的研究中, 可以通过建立胡杨内生群落样本集, 分析群落结构差异来推断胡杨的生理状态, 进而从侧面为胡杨林的生态恢复提供帮助。基于本工作所分离筛选的胡杨内生细菌, 发现了耐盐碱等抗逆性较强的微生物菌株, 可运用合成生物学方法开发下一代工业生物技术(next generation industrial biotechnology, NGIB)底盘菌株, 实现建立开放、无灭菌的连续发酵生产体系, 从而进行低成本生物加工^[27], 这些结果也初步表明胡杨的内生细菌资源是具有应用潜力的菌种资源。

参考文献

- [1] Peng J, Biswas A, Jiang QS, Zhao RY, Hu J, Hu BF, Shi Z. Estimating soil salinity from remote sensing and terrain data in southern Xinjiang Province, China. *Geoderma*, 2019, 337: 1309–1319.
- [2] Yao JQ, Hu WF, Chen YN, Huo W, Zhao Y, Mao WY, Yang Q. Hydro-climatic changes and their impacts on vegetation in Xinjiang, Central Asia. *Science of the Total Environment*, 2019, 660: 724–732.

- [3] Hua DW, Li J, Li JB. Study on the change characteristics of soil salinity in heavy salinized area of Xinjiang. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2019, 384: 012197.
- [4] Nekoa HT, Shirvany A, Assareh MH, Naghavi, MR, Pessaraklie M, Pourmeidani A. Effects of NaCl on growth, yield and ion concentration of various *Populus euphratica* Oliv. ecotypes in Iran. *Desert*. 2018(2): 189–198.
- [5] Chen YN, Wang Q, Ruan X, Li WH, Chen YP. Physiological response of *Populus euphratica* to artificial water-recharge of the lower reaches of Tarim River. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(12): 1393–1401.
- [6] Silva P, Façanha AR, Tavares RM, Gerós H. Role of tonoplast proton pumps and Na⁺/H⁺ antiport system in salt tolerance of *Populus euphratica* Oliv. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2010, 29(1): 23–34.
- [7] 秦少伟, 李才林, 郭忠忠, 包亮红, 姜仁军, 张娜, 刘占文, 赵利峰. 参与胡杨异形叶发生的发育相关基因表达模式及作用. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(11): 4785–4792.
- Qin SW, Li CL, Guo ZZ, Bao LH, Jiang RJ, Zhang N, Liu ZW, Zhao LF. Expression patterns and functions of genes related to the development of *Populus euphratica* Oliv. Heteromorphic leaves morphogenesis. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(11): 4785–4792. (in Chinese)
- [8] Zhuang L, Chen YN, Li WH, Wang ZK. Anatomical and morphological characteristics of *Populus euphratica* in the lower reaches of Tarim River under extreme drought environment. *Journal of Arid Land*, 2011, 3(4): 261–267.
- [9] Junghans U, Polle A, Düchting P, Weiler E, Kuhlman B, Gruber F, Teichmann T. Adaptation to high salinity in poplar involves changes in xylem anatomy and auxin physiology. *Plant, Cell & Environment*, 2006, 29(8): 1519–1531.
- [10] Zeng FJ, Yan HL, Arndt SK. Leaf and whole tree adaptations to mild salinity in field grown *Populus euphratica*. *Tree Physiology*, 2009, 29(10): 1237–1246.
- [11] Timmusk S, Abd El-Daim IA, Copolovici L, Tanilas T, Kännaste A, Behers L, Nevo E, Seisenbaeva G, Stenström E, Niinemets Ü. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. *PLoS ONE*, 2014, 9(5): e96086. DOI: 10.1371/journal.pone.0096086.
- [12] Khan Z, Guelich G, Phan H, Redman R, Doty S. Bacterial and yeast endophytes from poplar and willow promote growth in crop plants and grasses. *ISRN Agronomy*, 2012, 2012: 1–11.
- [13] Kang JW, Khan Z, Doty SL. Biodegradation of trichloroethylene by an endophyte of hybrid poplar. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(9): 3504–3507.
- [14] Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Del Carmen Orozco-Mosqueda M, Glick BR. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 2016, 183: 92–99.
- [15] Kandel S, Joubert P, Doty S. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms*, 2017, 5(4): 77.
- [16] Ju X, Ouyang L, Zhang L. Endophytes community of *Populus euphratica* Oliv and the strains improving the salt tolerance of plant. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2014, 8: 43–52.
- [17] Anwar N, Rozahon M, Zayadan B, Mamtimin H, Abdurahman M, Kurban M, Abdurusul M, Mamtimin T, Abdikerim M, Rahman E. *Pseudomonas tarimensis* sp. nov., an endophytic bacteria isolated from *Populus euphratica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(11): 4372–4378.
- [18] 中国科学院新疆生态与地理研究所. 新疆灌区土壤盐渍化及改良治理模式. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 2008: 76.
- [19] 林璐, 吕雪芹, 刘延峰, 堵国成, 陈坚, 刘龙. 枯草芽孢杆菌底盘细胞的设计、构建与应用. *合成生物学*, 2020, 1(2): 247–265.
- Lin L, Lv XQ, Liu YF, Du GC, Chen J, Liu L. Advances in design, construction and applications of *Bacillus subtilis* chassis cells. *Synthetic Biology Journal*, 2020, 1(2): 247–265. (in Chinese)
- [20] Coombs JT, Franco CMM. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5603–5608.
- [21] Galperin MY. Genome diversity of spore-forming firmicutes. *Microbiology Spectrum*, 2013, 1(2). DOI: 10.1128/microbiolspectrum.tbs-0015-2012.
- [22] 常瀚文, 郑鑫铃, 骆健美, 王敏, 申雁冰. 抗逆元件及其在高效微生物细胞工厂构建中的应用进展. *生*

- 物技术通报, 2020, 36(6): 13–34.
- Chang HW, Zheng XL, Luo JM, Wang M, Shen YB. Tolerance elements and their application progress on the construction of highly-efficient microbial cell factory. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(6): 13–34. (in Chinese)
- [23] Yuan YB, Bi CH, Nicolaou SA, Zingaro KA, Ralston M, Papoutsakis ET. Overexpression of the *Lactobacillus plantarum* peptidoglycan biosynthesis *MurA2* gene increases the tolerance of *Escherichia coli* to alcohols and enhances ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(19): 8399–8411.
- [24] Kim D, Hahn JS. Roles of the Yap1 transcription factor and antioxidants in *Saccharomyces cerevisiae*'s tolerance to furfural and 5-hydroxymethylfurfural, which function as thiol-reactive electrophiles generating oxidative stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(16): 5069–5077.
- [25] Dunlop MJ, Dossani ZY, Szmids HL, Chu HC, Lee TS, Keasling JD, Hadi MZ, Mukhopadhyay A. Engineering microbial biofuel tolerance and export using efflux pumps. *Molecular Systems Biology*, 2011, 7: 487.
- [26] 杨扬, 高克祥, 吴岩, 刘晓光. 吡啶乙酸跨界信号调节植物与细菌互作. *生物技术通报*, 2016, 32(8): 14–21.
- Yang Y, Gao KX, Wu Y, Liu XG. Indole-3-acetic acid-mediated cross-kingdom signalling involved in plant-bacteria interactions. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(8): 14–21. (in Chinese)
- [27] 陈江楠, 陈潇宁, 刘心怡, 万薇, 章义鑫, 张自豪, 郑逸飞, 郑陶然, 王宣, 王子瑜, 闫煦, 张旭, 吴赴清, 陈国强. 基于工程化盐单胞菌的下一代工业生物技术. *合成生物学*, 2020, 1(5): 516–527.
- Chen JN, Chen XN, Liu XY, Wan W, Zhang YX, Zhang ZH, Zheng YF, Zheng TR, Wang X, Wang ZY, Yan X, Zhang X, Wu FQ, Chen GQ. Engineering *Halomonas* spp. for next generation industrial biotechnology (NGIB). *Synthetic Biology Journal*, 2020, 1(5): 516–527. (in Chinese)

(本文责编 张晓丽)