



不同种苏铁珊瑚状根内生微生物多样性及适应性研究

魏玉倩^{1,2#}, 陈健鑫^{1#}, 郑艳玲¹, 竺永金¹, 周媛婷¹, 马焕成¹, 伍建榕^{1,2*}

1 西南林业大学林学院, 西南地区生物多样性保育国家林业局重点实验室, 云南 昆明 650224

2 西南林业大学生物多样性保护学院, 云南省高校森林灾害预警控制重点实验室, 云南 昆明 650224

魏玉倩, 陈健鑫, 郑艳玲, 竺永金, 周媛婷, 马焕成, 伍建榕. 不同种苏铁珊瑚状根内生微生物多样性及适应性研究. 微生物学报, 2022, 62(7): 2835–2849.

Wei Yuqian, Chen Jianxin, Zheng Yanling, Zhu Yongjin, Zhou Aiting, Ma Huancheng, Wu Jianrong. Diversity and adaptability of endophytic microorganisms in coralloid roots of different species of *Cycas*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2835–2849.

摘要:【目的】苏铁(*Cycas* sp.)是珍稀濒危树种,能在干热河谷中长期稳定生存的原因可能与珊瑚状根内生微生物有密切关系。不同种苏铁在同一生境下其珊瑚状根内生微生物种类和群落组成存在怎样的差异性是本研究的科学问题。【方法】采用宏基因组测序技术对四川省攀枝花公园内5种同属不同种苏铁珊瑚状根进行了分子鉴定,分析了苏铁间微生物类型、功能基因和代谢通路的差异性。【结果】公园内不同苏铁的珊瑚状根内生微生物的优势类群在门水平上基本相同,但相对丰度有差异性。在真菌界水平上的优势类群为担子菌门(*Basidiomycota*)、子囊菌门(*Ascomycota*)、球囊菌门(*Glomeromycota*)和隐真菌门(*Cryptomycota*),在细菌界水平上的优势类群为蓝细菌门(*Cyanobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、螺旋体门(*Spirochaetes*)和放线菌门(*Actinobacteria*)。不同种的苏铁在真菌界和细菌界的微生物群落相对丰度存在一定差异。蓝细菌门在篦齿苏铁、攀枝花苏铁、华南苏铁和贵州苏铁中的相对丰度远高于宽叶苏铁,而放线菌门和球囊菌门在宽叶苏铁的相对丰度远高于篦齿苏铁、攀枝花苏铁、华南苏铁和贵州苏铁。通过KEGG数据库比对分析发现不同种苏铁间微生物的差异表达基因功能主要与环境适应和能量代谢

基金项目: 国家自然科学基金(31860208, 31560207); 国家重点研发计划(2019YFD100200X); 西南林业大学木棉纤维人工林产业化培育省级创新团队项目(2018HC014); 云南省教育厅科学研究基金(2021Y274)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31860208, 31560207), by the National Key Research and Development Program of China (2019YFD100200X), by the Yunnan Provincial Innovation Team on Kapok Fiber Industrial Plantation (2018HC014) and by the Scientific Research Fund Project of Yunnan Provincial Department of Education (2021Y274)

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: 1176279044@qq.com

Received: 9 December 2021; Revised: 10 March 2022; Published online: 29 March 2022

通路相关。结果表明碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、氨基酸代谢(amino acid metabolism)、基因结构的折叠、排列和降解(folding、sorting、degradation)及信号转导(signal transduction)的功能基因较为丰富。【结论】种植于同一地点的不同苏铁的珊瑚状根内生微生物的优势类群在门水平上基本相同,但相对丰度有差异性。珊瑚状根内的蓝细菌和放线菌参与的氮素和碳水化合物合成和代谢过程可能是苏铁适应干热河谷贫瘠环境的重要因素之一。

关键词: 苏铁; 珊瑚状根内微生物; 宏基因组; 群落多样性; 聚类分析

Diversity and adaptability of endophytic microorganisms in coralloid roots of different species of *Cycas*

WEI Yuqian^{1,2#}, CHEN Jianxin^{1#}, ZHENG Yanling¹, ZHU Yongjin¹, ZHOU Aiting¹, MA Huancheng¹, WU Jianrong^{1,2*}

1 Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China, State Forestry Administration, Faculty of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China

2 Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, College of Biodiversity Conservation, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China

Abstract: [Objective] *Cycas* sp. is a rare and endangered tree species and can live stably in dry and hot valleys for a long time, which is closely related to the microorganisms in coralloid roots. The paper explored the differences in the species and community composition of endophytic microorganisms in coralloid roots of different species of *Cycas* under the same habitat. **[Methods]** Five *Cycas* coralloid roots of the same genus and different species in the Panzhihua park in Sichuan Province were molecularly identified by metagenomic sequencing technology, and the differences in microbial types, functional genes and metabolic pathways among *Cycas* plants were analyzed. **[Results]** The dominant groups of endophytic microorganisms in the samples were basically the same at the phylum level but with different relative abundance. *Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Glomeromycota* and *Cryptomycota* were the dominant groups in the fungal kingdom, and in the bacterial kingdom *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Spirochaetes* and *Actinobacteria* were dominant. There were some differences in the relative abundance of microbial communities of different species of *Cycas* in the fungal and the bacterial kingdoms. The relative abundance of *Cyanobacteria* in *Cycas pectinate*, *C. panzhihuaensis*, *C. rumphii* and *C. guizhouensis* was much higher than that in *C. balansae*, while the relative abundance of *Actinomycetes* and *Glomeromycota* in *C. balansae* were much higher than that in *C. pectinate*, *C. panzhihuaensis*, *C. rumphii* and *C. guizhouensis*. Through KEGG analysis, it was found that the differentially expressed gene functions of microorganisms among different species of *Cycas* were mainly related to environmental adaptation and energy metabolism pathways. There were abundant functional genes in carbohydrate metabolism, amino acid metabolism, folding, sorting, and degradation and signal transduction. **[Conclusion]** The dominant groups of endophytic microorganisms in the coralloid roots of different species of *Cycas* planted in the same place were basically the same at the phylum level, but the relative abundance were different. *Cyanobacteria* and *Actinomycetes* in the

coralloid roots participated in the synthesis and metabolism of nitrogen and carbohydrates, which may be an important factor for *Cycas* to adapt to the barren environment of dry and hot valleys.

Keywords: *Cycas*; endophytic microorganisms in coralloid roots; metagenomics; community diversity; cluster analysis

苏铁又称铁树, 是一类古老的珍稀濒危树种, 已有 2 亿多年的历史, 现仅存 3 科, 即苏铁科(*Cycadaceae*)、托叶铁科(*Stangeriaceae*)和泽米铁科(*Zamiaceae*), 11 属约 330 种, 我国现仅有苏铁属(*Cycas*), 均被列为国家一级保护植物^[1]。在上亿年的地质和气候变迁中, 同期的恐龙已灭绝, 而苏铁仍能幸存下来, 预示着苏铁具有较强的生存能力和抗逆能力, 演化出特殊的生理生化机制^[2]。根系是植株的地下部分, 主要参与水分及养分的吸收与运输, 对植物的生长发育有着至关重要的作用^[3]。苏铁类植物的根系具有 3 种类型: 正常根、侧根和由侧根特化而成的珊瑚状根。

植物的生长发育与微生物群落之间有着紧密的联系, 而植物的基因型、生长的环境以及植物生长的时期和季节等因素都会影响植物内生微生物的结构和多样性^[4]。因此, 开展不同种苏铁珊瑚状根内生微生物群落多样性和功能研究, 寻找与植物存在良好互作关系的微生物群, 最大限度地发挥微生物的功能, 为苏铁的繁育工作提供理论支持。近年来, 在苏铁植物相关微生物的研究中用到了高通量测序技术, 前人对苏铁珊瑚状根和主根的内生微生物进行了比较分析发现, 苏铁根中存在高度多样的内生微生物群, 且不同生态位具有不同的核心微生物菌群^[5]。研究证实, 蓝细菌主要存在于珊瑚状根内, 且存在较高的多样性, 能稳定地定居于苏铁珊瑚状根形成共生体, 通过共生固氮促进苏铁的生长发育^[6]。但不同种苏铁珊瑚状根内生微生物的群落组成是否存在差异, 尚未

见文献报道。

传统的分离培养仅能获得自然界中 0.1%–1.0% 的微生物, 对于根系内不可培养的微生物无法进行系统的研究, 尤其对微生物群落的功能难以进行分析。1998 年首次提出宏基因组(metagenome)的概念, 以环境中微生物的总 DNA 为研究对象, 研究特定环境中微生物的物种组成、群落结构及功能, 极大拓展了微生物资源的开发利用^[7]。通过 KEGG 数据库对宏基因测序结果进行功能注释及富集分析, 揭示了微生物在群落水平对宿主植物功能的影响^[8]。

本研究选取四川攀枝花公园内 5 种同属不同种的同龄苏铁珊瑚状根为材料, 通过宏基因组测序技术比较不同种间珊瑚状根内微生物多样性特征、群落结构和功能注释, 明确不同种苏铁根内的核心菌群及其功能, 阐明苏铁适应环境所特化形成的优势菌群, 从而为研究古生物、古生态、古地质遗迹种子植物的起源和演化提供重要参考依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

四川省攀枝花市攀枝花公园位于中国四川省西南部(26°05′–27°21′N, 101°18′–102°15′E), 属于干热河谷气候, 年降水量较为集中, 年平均气温高、太阳辐射强^[9]。

1.2 样品采集

2020 年 7 月, 在四川省攀枝花市攀枝花公园采集了 5 种同属不同种的同龄苏铁, 分别为篦齿苏铁(*Cycas pectinata*), 攀枝花苏铁

(*C. panzhihuaensis*), 贵州苏铁(*C. guizhouensis*), 华南苏铁(*C. rumphii*)和宽叶苏铁(*C. balansae*) (表 1)。依据 5 点取样法在公园内选取 5 个样方, 每个样方内按对角线定位 5 种苏铁, 再分别选取 6 株同种苏铁收集珊瑚状根, 每株苏铁按东南西北 4 个方位收集 4 份样品, 用无菌刷去除根表面土壤, 枝剪消毒后剪取无伤珊瑚状根, 切口用石蜡密封后装入无菌采样袋中, 置于液氮罐中保存, 运回实验室。

1.3 总 DNA 提取

将 30 mL 无菌水和 10 颗无菌玻璃珠放入 50 mL 无菌离心管中, 然后放入苏铁珊瑚状根, 摇匀去除表面土壤, 冲洗样品 3 次。首先用 70%乙醇浸泡 2 min, 其次用 6% H₂O₂ 浸泡 15 min 进行表面消毒, 最后用无菌双蒸水彻底冲洗 3 次。吸取 100 μL 最后一遍清洗的无菌水涂布于培养基上, 然后将检测板放在培养箱 (28 °C) 中培养 20 d 以上, 观察检测板是否有杂菌长出。将表面消毒的珊瑚状根放入无菌研钵中, 液氮冷冻后在无菌条件下充分研磨成粉末。采用磁珠法植物基因组 DNA 提取试剂盒

(杭州联川生物技术有限公司)提取攀枝花不同种的苏铁珊瑚状根的总 DNA, 并采用 NanoDrop 分光光度计检测样品总 DNA 的浓度及质量。

1.4 宏基因组测序及文库构建

将纯化后质检合格的样品用干冰送至杭州联川生物技术有限公司进行宏基因组测序, 测序后的原始序列通过 Fastqc 进行质控, 有效序列通过 metaSPAdes 进行基因组组装, 用 QUAST 程序进行组装结果评估, 根据 N50 大小评估组装结果, 高质量的组装序列用于后续实验分析。

1.5 物种注释与功能注释

将 Unigenes 与 NR_mate 库进行比对, 获得物种注释信息; 将 Unigenes 与 GO 和 KEGG 数据库比对, 对功能注释和丰度进行分析; 同时在物种、功能、基因水平进行丰度统计分析 & 差异比较分析。

2 结果与分析

2.1 测序结果分析与组装

5 种苏铁珊瑚状根总 DNA 测序结果见表 2, 共获得 343 729 342 条原始序列, 质量控制后得到 336 367 622 条有效序列, 有效序列数中测序错误率小于 1% (Q₃₀) 的碱基数高于 90%, 采用 contig 数据集进行功能分析, 宏基因组的 GC 含量范围为 37.54%–40.43%。结果表明, 测序数据可靠性较高, 能较完整地体现样品中微生物群落的多样性。

表 1 苏铁样品信息表

Table 1 Information table of *Cycas* samples

Samples name	Number
<i>Cycas pectinata</i>	CYRP1
<i>C. panzhihuaensis</i>	CYRP2
<i>C. guizhouensis</i>	CYRG1
<i>C. rumphii</i>	CYRH1
<i>C. balansae</i>	CYRB1

表 2 不同种的苏铁珊瑚状根内微生物宏基因组测序结果

Table 2 Microbial metagenomic sequencing results of coralloid roots microorganisms in different *Cycas*

Samples	Raw read	Clean read	Q ₃₀ /%	Contigs	GC/%
CYRP1	82 179 874	80 358 720	93.93	27 742	38.43
CYRP2	58 639 146	57 858 874	93.37	24 199	38.15
CYRG1	81 871 030	80 753 106	94.73	73 133	38.71
CYRH1	58 919 316	55 918 934	95.22	23 941	37.54
CYRB1	62 119 976	61 477 988	95.07	82 426	40.43

通过 Venn 图(图 1)分析 5 个样本中共有和特有的 unigene 数量。结果显示, 共有基因数目为 68 505 个, 说明不同种的苏铁珊瑚状根内微生物具有一定相似性, 珊瑚状根内存在着固有微生物类群; 特有基因数目中宽叶苏铁最多, 包括 17 233 个, 表明宽叶苏铁对珊瑚状根内微生物的组成具有较大的影响。

2.2 苏铁珊瑚状根内微生物组成及多样性分析

2.2.1 整体水平上的物种组成分析

苏铁珊瑚状根中微生物约有 71%–77% 注释到未知种类(Unclassified), 12%–20% 注释到细菌总界(Bacteria), 8%–11% 注释到真核生物总界(Eukaryota), 0.08%–0.30% 注释到病毒总界(Viruses), 0.02%–0.05% 注释到古菌总界(Archaea)

(图 2A)。

在门水平上, 珊瑚状根共有的优势菌群为 unclassified 相对丰度为 71%–77%、蓝藻门(Cyanobacteria)相对丰度为 12%、变形菌门(Proteobacteria)相对丰度为 4%–5%、担子菌门(Basidiomycota)相对丰度为 4%–5%、厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度为 3%、子囊菌门(Ascomycota)相对丰度为 2%–3%、球囊菌门(Glomeromycota)相对丰度为 1%–2%, 以及放线菌门(Actinobacteria)相对丰度为 1% (图 2B)。

在科水平上, 优势菌群为 unclassified 相对丰度为 71%–77%、念珠藻科(Nostocaceae)相对丰度为 3%–8%、韦荣球菌科(Erysipelotrichaceae)相对丰度为 2%、微毛藻科(Microchaetaceae)相对丰度为 0.9%–2.0%、球囊霉科(Glomeraceae)

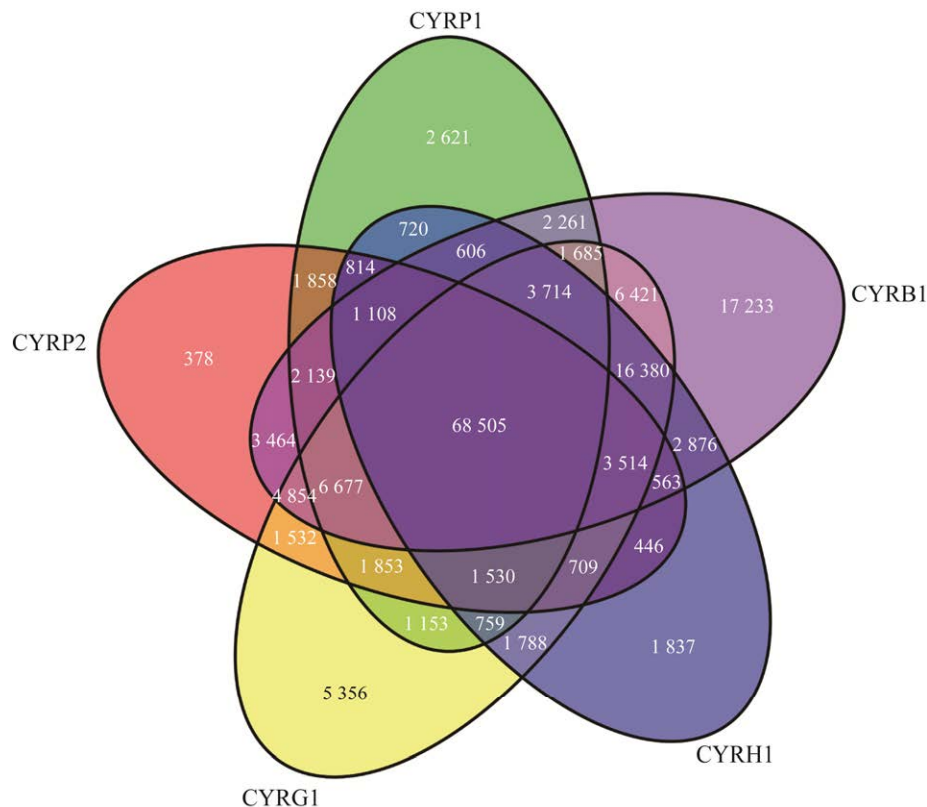


图 1 不同种苏铁珊瑚状根内微生物韦恩图分析

Figure 1 Venn diagram of coralloid roots microorganisms in different *Cycas*.

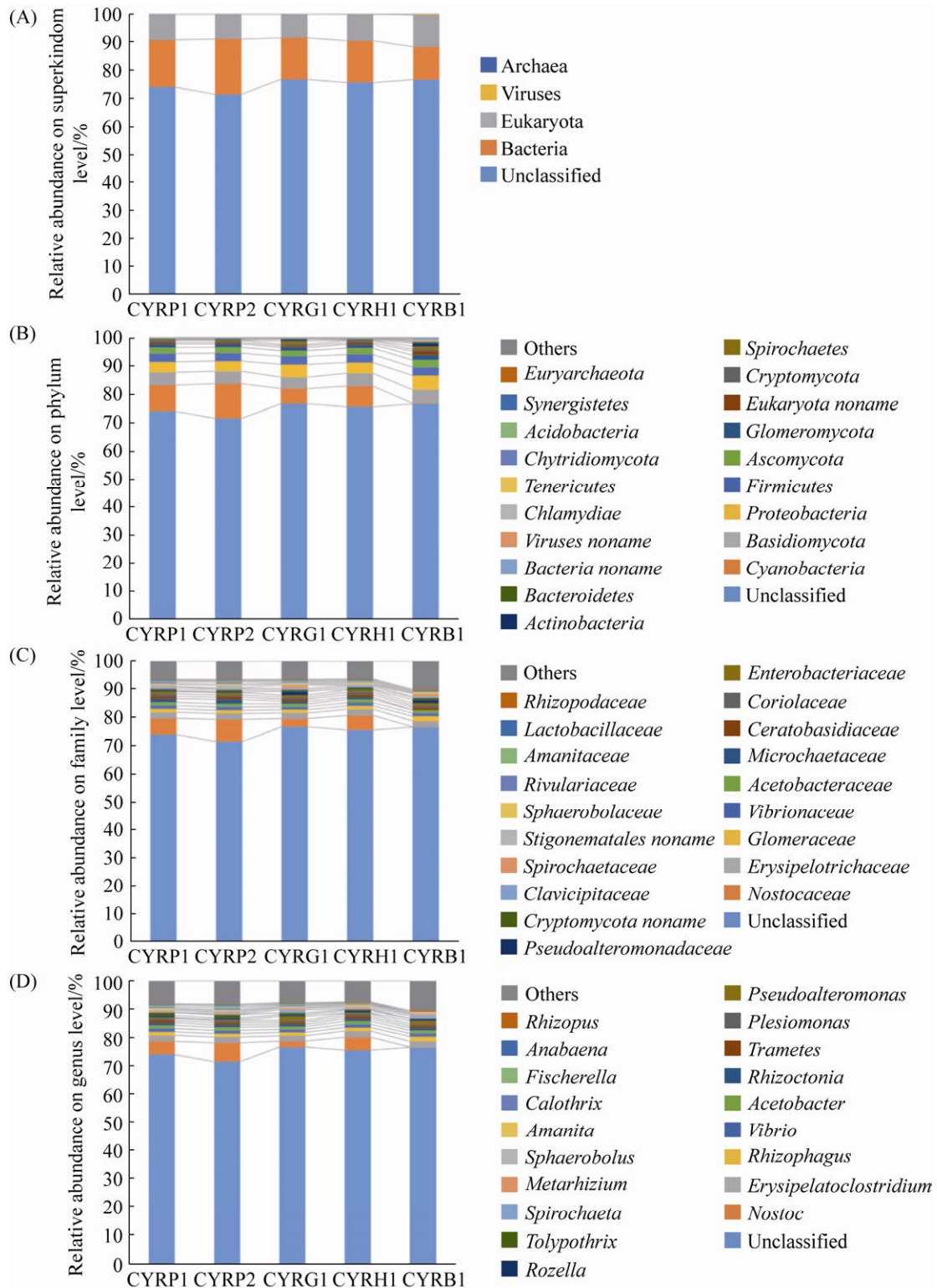


图 2 不同种的苏铁珊瑚状根内微生物在界(A)、门(B)、科(C)和属(D)水平的相对丰度

Figure 2 Relative abundance of coralloid roots microorganisms in different *Cycas* on superkingdom (A), phylum (B), family (C) and genus (D) levels.

相对丰度为 1%–2%、假交替单胞菌科 (*Pseudoalteromonadaceae*) 相对丰度为 1%、弧菌科 (*Vibrionaceae*) 相对丰度为 1%, 以及醋杆菌科 (*Acetobacteraceae*) 相对丰度为 1% (图 2C)。

结果表明, 苏铁珊瑚状根内微生物多样性比较丰富, 不同种间内生微生物有一定相似性, 即珊瑚状根内存在着一些固有微生物类群, 有较高的保守性。内生细菌在珊瑚状根占有更高的比例, 以蓝细菌为主要代表。子囊菌、担子菌和球囊霉菌则是内生真菌的主要类群, 与内生细菌协同调控苏铁的生长发育过程。

2.2.2 细菌总界的物种组成分析

不同种苏铁在细菌总界的物种组成分析

结果见图 3。在门水平上, 蓝藻门和放线菌门为主要的类群, 但不同种间苏铁珊瑚状根内所占比例存在差异。蓝藻门 (*Cyanobacteria*) 在不同种的苏铁中所占比例大小次序依次为攀枝花苏铁(62%)>篦齿苏铁(55%)>华南苏铁(49%)>贵州苏铁(36%)>宽叶苏铁(2%); 放线菌门 (*Actinobacteria*) 在宽叶苏铁(9%)和贵州苏铁(4%)中的占比显著高于华南苏铁(1%)、篦齿苏铁(1%)和攀枝花苏铁(1%), 其余类群在各样本中相对丰度相似(图 3A)。在科水平上, 念珠藻科 (*Nostocaceae*) 在不同种的苏铁中所占比例大小次序依次为攀枝花苏铁(40%)>华南苏铁(35%)>篦齿苏铁(34%)>和贵州苏铁(20%)>宽叶苏铁(1%);

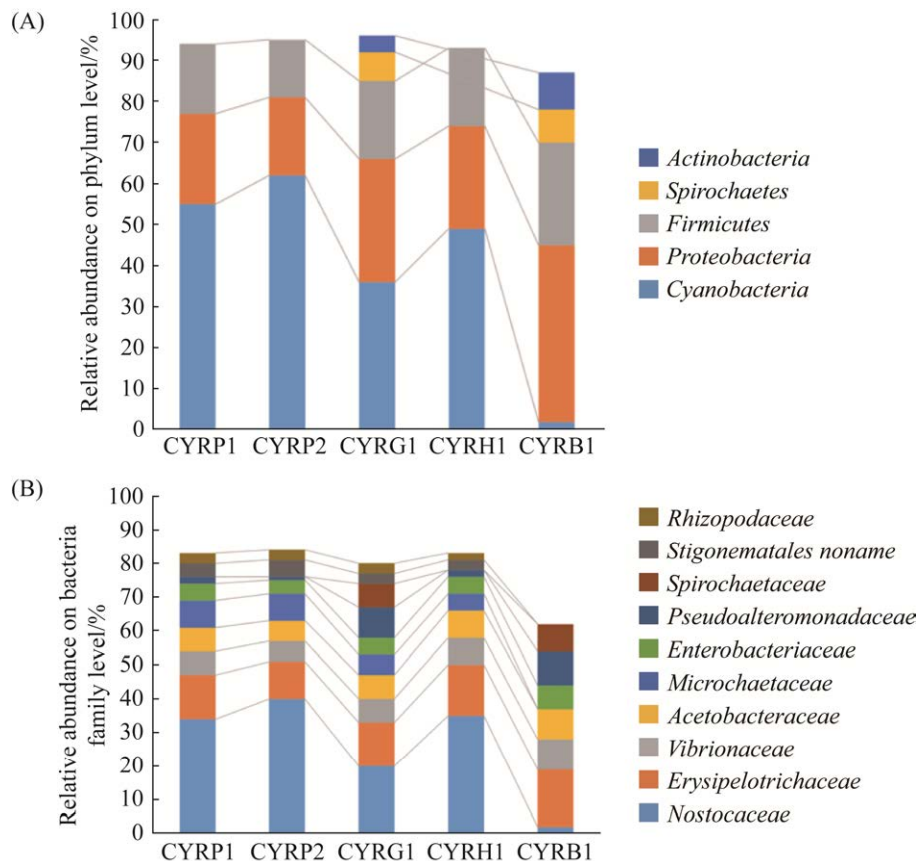


图 3 不同种的苏铁珊瑚状根内微生物在细菌门(A)、科(B)水平的相对丰度

Figure 3 Relative abundance of coralloid roots microorganisms in different *Cycas* on bacteria phylum (A) and family (B) levels.

假交替单胞菌科(*Pseudoalteromonadaceae*)在宽叶苏铁(10%)和贵州苏铁(9%)的占比远大于篦齿苏铁(2%)、华南苏铁(2%)和攀枝花苏铁(1%) (图 3B)。

不同种苏铁珊瑚状根中放线菌类群差异结果见图 4。在科水平上, 假诺卡氏菌科(*Pseudonocardiaceae*) (37%–44%)是所有种苏铁共有的优势类群, 而双歧杆菌科(*Bifidobacteriaceae*) 在篦齿苏铁(34%)、攀枝花苏铁(25%)和海南苏铁(34%)中相对丰度高于宽叶苏铁(5%)和贵州苏铁(9%), 但是链霉菌科(*Streptomycetaceae*)在宽叶苏铁(14%)的相对丰度是明显高于其他种的苏铁(6%–12%), 以及小单孢菌科(*Micromonosporaceae*) 在宽叶苏铁(10%)的相对丰度明显高于其他种的苏铁(1%–3%) (图 4A); 在属水平上, 拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*) (15%–70%)和假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*) (2%–31%)是所有种苏铁共有的优势类群, 而双歧杆菌属(*Bifidobacterium*) 在篦齿苏铁(34%)、攀枝花苏铁(25%)和海南苏铁(33%)相对丰度高于宽叶苏铁(5%)和贵州苏铁(9%), 但是链霉菌属(*Streptomyces*)在宽叶苏铁(13%)的相对丰度明显高于其他种的苏铁(5%–11%) (图 4B)。

上述结果表明, 不同种间苏铁对珊瑚状根内微生物群落具有选择性富集作用, 内生细菌的丰度分布上具有明显变化。当苏铁生长过程中缺少蓝细菌作为共生群落进行固氮作用时, 会选择富集放线菌类微生物参与共生固氮过程以维持正常的生长过程。

2.2.3 真菌总界的物种组成分析

不同种苏铁在真菌总界的物种组成分析结果见图 5。在门水平上, 担子菌门和球囊菌门是优势类群。担子菌门(*Basidiomycota*)在不同种的苏铁中所占比例大小次序依次为篦齿苏铁

(50%)>攀枝花苏铁(49%)/华南苏铁(49%)>贵州苏铁(48%)>宽叶苏铁(41%); 球囊菌门(*Glomeromycota*)的次序为宽叶苏铁(15%)>贵州苏铁(14%)>篦齿苏铁(13%)/攀枝花苏铁(13%)/华南苏铁(13%) (图 5A)。在科水平上, 球囊霉科(*Glomeraceae*)在不同种的苏铁中所占比例大小次序依次为宽叶苏铁(15%)>贵州苏铁(14%)>篦齿苏铁(13%)/攀枝花苏铁(13%)/华南苏铁(13%) (图 5B)。

上述研究结果表明, 不同种苏铁珊瑚状根内生真菌类群物种组成相似度较高, 其中球囊霉科在不同种间存在一定的差异, 在宽叶苏铁中的相对丰度最高。结合宽叶苏铁缺乏蓝藻门类群的结果, 推测在磷元素缺乏的地区, 宽叶苏铁难以与蓝细菌建立共生关系, 但可以通过与AMF共生以提高植物对磷元素的吸收, 而募集放线菌参与共生固氮作用。

2.3 苏铁珊瑚状根的微生物群落功能注释分析

KEGG 功能注释结果见图 6, 在 7 大功能分类中, 新陈代谢、基因信息进程和环境信息进程是被注释到基因数量最多的功能, 其中碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、氨基酸代谢(amino acid metabolism)、基因结构的折叠、排列和降解(folding、sorting、degradation)及信号转导(signal transduction)的功能基因较为丰富。碳水化合物代谢途径包括氨基糖和核苷酸糖代谢(thj00520)、抗坏血酸和醛酸代谢(thj00053)、半乳糖代谢(thj00052)以及戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化(thj00040)。表明苏铁内生菌主要通过调控苏铁的糖类物质及氨基酸物质的代谢转换, 参与调控苏铁的生长发育, 提高苏铁的抗逆性, 以保证苏铁在干热河谷的恶劣生境中稳定生存并建立种群(图 7)。

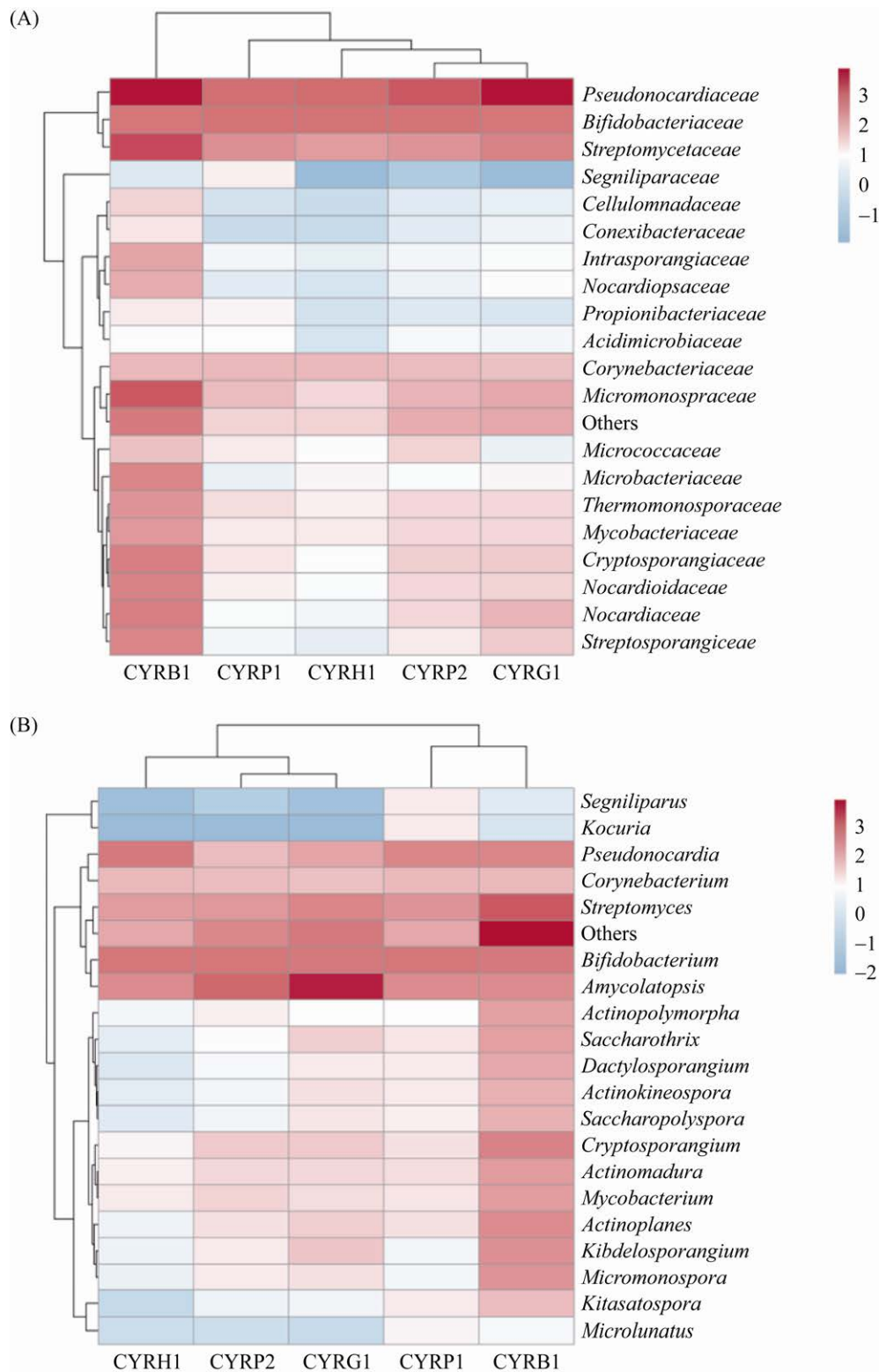


图 4 不同种的苏铁珊瑚状根内微生物在放线菌科(A)和属(B)水平上的物种丰度聚类图

Figure 4 Cluster map of the abundance of coralloid roots microorganisms in different *Cycas* on *Actinomycetaceae* (A) and *Actinomyces* (B) levels.

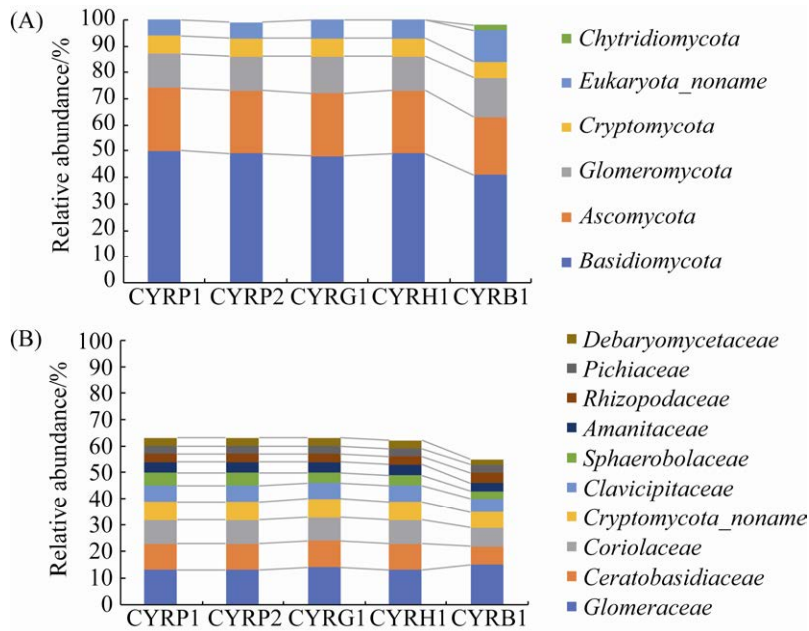


图 5 不同种的苏铁珊瑚状根内微生物在真菌门(A)和科(B)水平上的相对丰度

Figure 5 Relative abundance of coralloid roots microorganisms in different *Cycas* on eukaryota phylum (A) and family (B) levels.

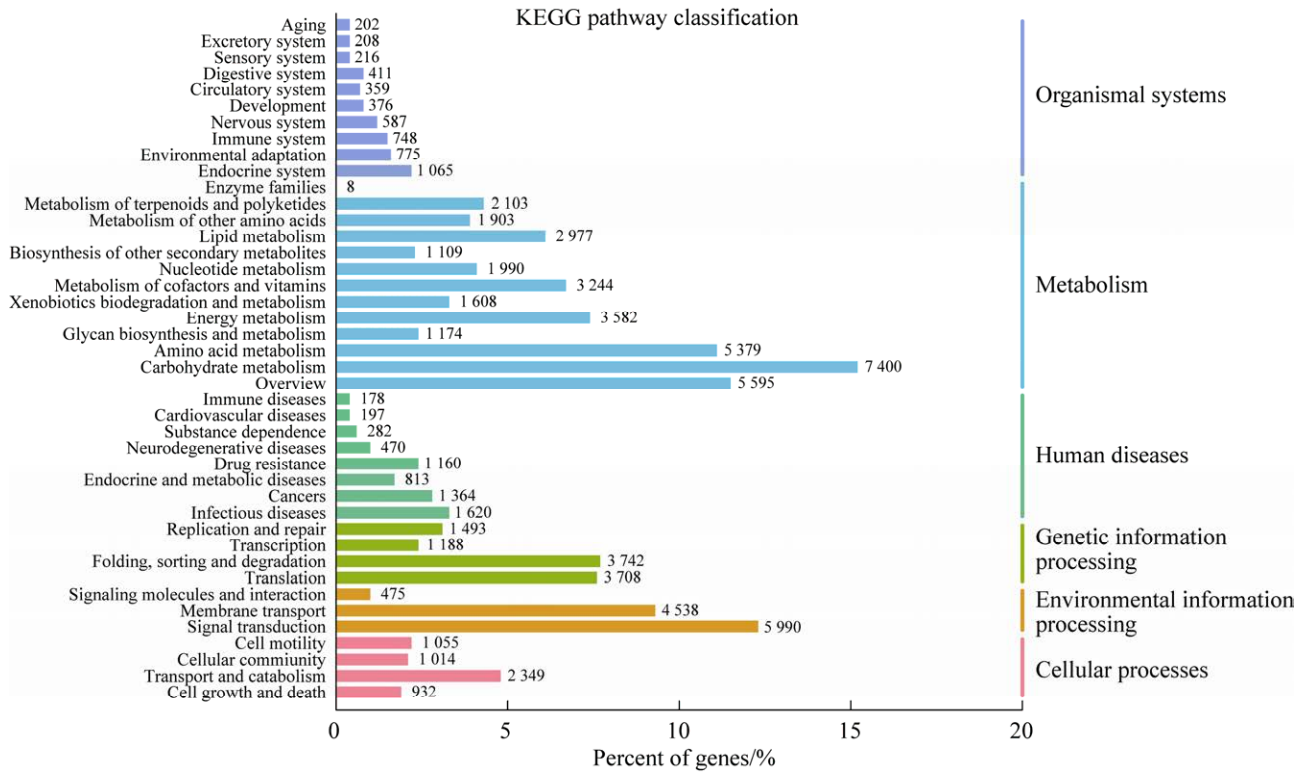


图 6 样本的功能基因在 KEGG 第二层的注释结果

Figure 6 Annotation results of functional genes in the second layer of KEGG.

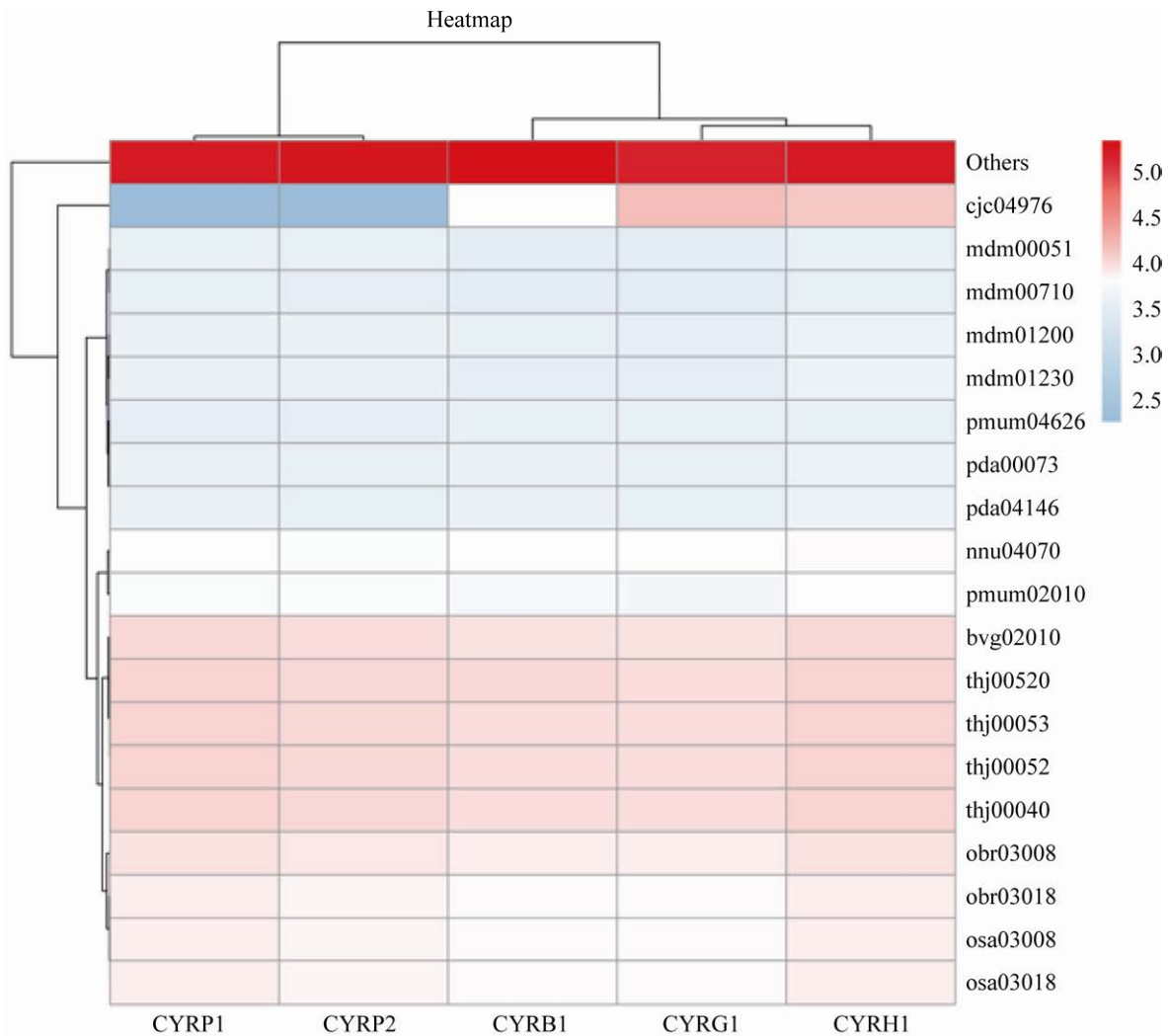


图 7 样本的功能基因在 KEGG 第三层的注释结果

Figure 7 Annotation results of functional genes in the third layer of KEGG.

3 讨论

研究证实植物组织中普遍存在内生菌, 内生菌的高度多样性有利于提高植物在不同环境条件下的生态功能恢复力, 主要包括 3 个细菌门类, 分别是变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)^[10]。本研究结果表明, 细菌类的蓝藻门(*Cyanobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和放线菌门(*Actinobacteria*), 以及真菌类的担子菌

门(*Basidiomycota*)、子囊菌门(*Ascomycota*)和球囊菌门(*Glomeromycota*)是苏铁珊瑚状根中的优势菌门, 优势细菌门均在苏铁的珊瑚状根中占有很大的比例, 说明植物内生菌在不同的植物类群间存在一定的保守性, 这些保守的内生菌类群可能与植物内部环境及自身的物质成分有关, 是进化过程中长期选择与适应的结果, 内生菌的稳定定殖和相关功能可以维持植物健康和保持较高生产力^[11]。从植物百部块根中分离出 18 株内生放线菌, 经 16S rRNA 基因序列分析将其分为链霉

菌属(*Streptomyces*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)和甲基杆菌属(*Methylobacterium*)^[12]。同时在多种植物中分离到的内生放线菌中链霉菌属均属于优势菌属^[13]，本研究中也得到了相同的结论，此外还获得了稀有放线菌拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)，这与苏铁是珍稀的古老树种有着很大的关系。前人通过克隆文库证实了攀枝花苏铁内生放线菌的种类有 5 个目 7 个科 10 个属，克隆得到的内生放线菌优势菌为短小杆菌属(*Curtobacterium*)，其次为拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)和链霉菌属(*Streptomyces*)^[14]。而本研究攀枝花苏铁珊瑚状根中优势菌属为拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)和链霉菌属(*Streptomyces*)，原因可能是，不同地区的同种植株内生放线菌在数量与种类上分布有差异的规律^[15]。此外蓝藻门、放线菌门和球囊菌门是珊瑚状根中的特有优势种群，并且不同种的苏铁珊瑚状根对蓝细菌、放线菌和丛枝菌根真菌群落选择有一定的偏好性，即微生物的差异主要与宿主植物招募能力有关。本研究中蓝细菌门在苏铁珊瑚状根内生微生物中占据很大的比例，早在 1872 年就报道了蓝细菌与苏铁的共生现象，且发现苏铁是唯一能与蓝细菌共生的裸子植物^[16]。蓝藻将空气中的氮气(N₂)转化成无机氮，为苏铁的生长提供氮源，光能和化能自养蓝细菌具有产生吡啶乙酸促进植物的生长发育的能力^[17]，而在缺乏蓝细菌的宽叶苏铁珊瑚状根中，放线菌是根内相对丰度较高的微生物类群，推测放线菌可促使苏铁形成珊瑚状根并且供给苏铁碳水化合物代谢和氨基酸代谢所必需的物质。

放线菌是一类能与多数植物形成共生体的有益微生物，具有促进植物生长并增强其抵御

环境胁迫的能力，根内放线菌能够释放活性物质，如生长素、细胞分裂素等，直接促进植物的细胞分裂、根系伸长等^[18]。在缺乏蓝细菌的宽叶苏铁珊瑚状根中丛枝菌根真菌也是一类特有的微生物类群。研究表明，在缺磷地区丛枝菌根可以提高磷吸收，植物中较高的磷浓度有益于细菌共生体和它的固氮活性，从而促进固氮，反过来也促进根系和菌根的发展^[19]。AMF 能显著影响氮素的生物吸收和同化、有机氮的矿化、生物固氮、硝化反硝化和氮素淋溶等许多土壤氮素循环过程^[20]。推测 AMF 的固氮作用和降解蛋白质的重要功能是缺乏蓝细菌的宽叶苏铁珊瑚状根中丰度较高的原因，从而使宽叶苏铁在高温少雨地区适应极端环境。

不同植物种类和同种植物不同基因型是影响根系微生物组的重要因素，不同种的微生物群落组成可以反映出特异的生态功能，从而适应环境的变化。经功能注释发现，5 种不同的苏铁的珊瑚状根中功能注释主要集中在碳水化合物代谢、氨基酸代谢、基因结构的折叠、排列和降解及信号转导途径中。碳水化合物作为生物体的主要能源物质，经过复杂的降解过程以释放能量供给生命体的活动需要，碳水化合物及其降解的中间产物，是生物体合成蛋白质和脂肪的主要碳架。苏铁珊瑚状根中碳水化合物代谢途径中相关基因的差异表达，包括：戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化、半乳糖代谢、抗坏血酸和醛酸代谢以及氨基糖和核苷酸糖代谢途径等。

戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化所形成的细胞壁是植物的天然屏障，在植物抵御生物及非生物胁迫的过程中起到非常重要的作用^[21]；半乳糖代谢中半乳糖脂可以维持细胞膜结构的稳定性，前人研究发现在盐胁迫的条件下，烟草

叶片中半乳糖脂的含量会有所上升,从而提高烟草的耐受环境能力^[22]。推测增强小分子渗透调节物质糖和糖醇类物质代谢是苏铁根系缓解干旱胁迫的重要策略;抗坏血酸代谢在植物自身的抗氧化作用、影响碳氮代谢、调节生长发育以及提高抗逆性等方面具有非常重要的生理功能^[23];氨基酸糖和核苷酸糖在植物细胞生物学过程中扮演着非常重要的角色,是植物初生细胞壁和次生细胞壁的重要成分^[24-25]。氨基酸糖和核苷酸糖代谢通路的另一个重要代谢产物尿嘧啶二磷酸葡萄糖是植物胍胍质合成过程的重要组成成分,当植物面对病原菌入侵时,通过在被感染部位聚集大量的胍胍质可以对病原菌感染导致的细胞壁破损进行及时修复^[26]。根部细胞分裂和生长都很旺盛,需要代谢大量的可溶性糖用于合成细胞壁相关组分,而且可溶性糖是植物长期忍受干旱环境的重要渗透调节物质,是植物细胞中浓度较高的一大类物质,在细胞渗透调节中是主要贡献者。这种渗透调节功能是植物适应环境能力的重要生理基础,碳水化合物的代谢功能随着水分胁迫的发展,使储存的糖类和新陈代谢的关系复杂化,水分胁迫可使淀粉向可溶性糖转化。苏铁生长在干旱地区,可溶性糖的调节作用是苏铁适应恶劣环境的必要条件。以上的代谢通路主要影响苏铁的新陈代谢,促进生长发育,从而增强了苏铁的抗病性。这是一个动态变化系统,苏铁珊瑚状根内生微生物的种群组成和群落结构会随着宿主生存环境的不同而变化,不同种类的菌群之间可形成动态平衡,也可组成互相制约的关系。

综上所述,同一地点种植的不同苏铁的珊瑚状根内生微生物的优势类群在门水平上基本相同,但相对丰度有差异。珊瑚状根内的蓝细

菌和放线菌参与氮素和碳水化合物的合成和代谢过程,这可能是苏铁适应干热河谷贫瘠环境的重要因素之一。

4 结论

不同种苏铁珊瑚状根内生微生物群落组成差异明显,并且注释到不同的生态功能。5种苏铁珊瑚根内优势菌群为蓝藻门、放线菌门和球囊菌门,不同种苏铁珊瑚根内种群丰富度存在显著差异。蓝细菌门在篦齿苏铁、攀枝花苏铁、华南苏铁和贵州苏铁中的相对丰度远高于宽叶苏铁,而放线菌门和球囊菌门在宽叶苏铁的相对丰度远高于篦齿苏铁、攀枝花苏铁、华南苏铁和贵州苏铁。通过KEGG数据库比对分析发现不同种中微生物的差异表达基因功能主要与环境适应和能量代谢通路相关。结果表明碳水化合物代谢、氨基酸代谢、基因结构的折叠、排列和降解及信号转导途径的功能基因较为丰富。其中碳水化合物代谢途径主要集中在氨基糖和核苷酸糖代谢(thj00520)、抗坏血酸和醛酸代谢(thj00053)、半乳糖代谢(thj00052)以及戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化(thj00040)。不同种苏铁珊瑚状根内生微生物群落结构存在差异,根内的蓝细菌和放线菌能够合成苏铁适应干热河谷气候所必需的碳水化合物。首次对不同种的苏铁珊瑚状根内生微生物进行分析,探究苏铁珊瑚状根内生微生物类群及功能,为开展古植物研究提供重要的理论依据。

参考文献

- [1] Osborne R, Calonje MA, Hill KD, Stanberg L, Stevenson DW. The World list of cycads proceedings of Cycad 2008: the 8th International Conference on Cycad Biology. *The New York Botanical Garden Press*, 2012, 106: 480-510.

- [2] 傅瑞树. 苏铁(*Cycas revoluta*)研究的现状及展望. 武夷科学, 2000, 16(0): 187–190.
Fu RS. Current research status and outlook of *Cycas revoluta*. *Wuyi Science Journal*, 2000, 16(0): 187–190. (in Chinese)
- [3] Bailey PHJ, Currey JD, Fitter AH. The role of root system architecture and root hairs in promoting anchorage against uprooting forces in *Allium cepa* and root mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(367): 333–340.
- [4] Jin T, Wang YY, Huang YY, Xu J, Zhang PF, Wang N, Liu X, Chu HY, Liu G, Jiang HG, Li YZ, Xu J, Kristiansen K, Xiao L, Zhang YZ, Zhang GY, Du GH, Zhang HB, Zou HF, Zhang HF, Jie ZY, Liang SS, Jia HJ, Wan JW, Lin DC, Li JY, Fan GY, Yang HM, Wang J, Bai Y, Xu X. Erratum to: taxonomic structure and functional association of foxtail millet root microbiome. *GigaScience*, 2018, 7(11): giy099.
- [5] Zheng Y, Chiang TY, Huang CL, Gong X. Highly diverse endophytes in roots of *Cycas bifida* (*Cycadaceae*), an ancient but endangered gymnosperm. *Journal of Microbiology: Seoul, Korea*, 2018, 56(5): 337–345.
- [6] Baulina OI, Lobakova ES. Atypical cell forms overproducing extracellular substances in population of cycad cyanobionts. *Mikrobiologiya*, 2003, 72(6): 792–805.
- [7] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 1998, 5(10): R245–R249.
- [8] 张冰, 崔岱宗, 赵敏, 张冰. 宏基因组学技术及其在微生物学研究中的应用. 黑龙江医药, 2014, 27(2): 267–271.
Zhang B, Cui DZ, Zhao M, Zhang B. Application of metagenomics for understanding of environmental microbiology. *Heilongjiang Medicine Journal*, 2014, 27(2): 267–271. (in Chinese)
- [9] 谢翠苹, 张海燕, 马书云, 李棠, 梁丽, 李娟. 攀枝花市园林植物蚧壳虫初步调查及防治对策. 四川林业科技, 2020, 41(2): 140–143.
Xie CP, Zhang HY, Ma SY, Li T, Liang L, Li J. Preliminary investigation and control countermeasures of scale insects on garden plants in Panzhihua City. *Journal of Sichuan Forestry Science and Technology*, 2020, 41(2): 140–143. (in Chinese)
- [10] Gaiero JR, McCall CA, Thompson KA, Day NJ, Best AS, Dunfield KE. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*, 2013, 100(9): 1738–1750.
- [11] Chappelle E, Mendes R, Bakker PAH, Raaijmakers JM. Fungal invasion of the rhizosphere microbiome. *The ISME Journal*, 2016, 10(1): 265–268.
- [12] 罗红丽, 林显钊, 张利敏, 刘宁, 黄英. 百部内生放线菌的分离、分类及次级代谢潜力. 微生物学报, 2012, 52(3): 389–395.
Luo HL, Lin XZ, Zhang LM, Liu N, Huang Y. Isolation, classification and biosynthetic potential of endophytic actinomycetes from *Stemona*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(3): 389–395. (in Chinese)
- [13] 郑立昊, 王兰梦, 郎多勇, 崔高畅, 张新慧. 植物内生放线菌的多样性及其应用价值研究进展. 时珍国医国药, 2021, 32(1): 166–169.
Zheng LH, Wang LM, Lang DY, Cui GC, Zhang XH. Research progress on diversity and application value of plant endophytic actinomycetes. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2021, 32(1): 166–169. (in Chinese)
- [14] 王国娟, 曹妍, 王芳, 马焕成, 郑艳玲, 伍建裕. 应用 16S rDNA 克隆文库解析苏铁珊瑚状根内生放线菌种群多样性. 中南林业科技大学学报, 2016, 36(8): 115–120.
Wang GJ, Cao Y, Wang F, Ma HC, Zheng YL, Wu JR. Application of 16S rDNA clone library analysis for *Cycas* spp. coralloid roots endophytic actinomycetes population diversity. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2016, 36(8): 115–120. (in Chinese)
- [15] 杨颖, 陈华红, 徐丽华. 植物内生放线菌多样性研究. 云南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(S1): 403–405, 438.
Yang Y, Chen HH, Xu LH. A study on diversity of endophytic actinomycetes. *Journal of Yunnan University: Natural Sciences Edition*, 2008, 30(S1): 403–405, 438. (in Chinese)
- [16] Bergman B, Matveyev A, Rasmussen U. Chemical signalling in cyanobacterial-plant symbioses. *Trends in Plant Science*, 1996, 1(6): 191–197.
- [17] 陈彬, 郑斯平, 郑伟文. 苏铁与蓝细菌的共生. 武夷科学, 2007, 23: 202–209.
Chen B, Zheng SP, Zheng WW. Cyanobacteria-cycads symbioses. *Wuyi Science Journal*, 2007, 23: 202–209. (in Chinese)
- [18] 刘雨晴. 水稻内生放线菌 OsiSh-10 对植物生长的影响及机理的初探. 湖南大学硕士学位论文, 2017.

- [19] Fitter AH, Garbaye J. Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. *Plant and Soil*, 1994, 159(1): 123–132.
- [20] Cornejo P, Rubio R, Borie F. Effect of nitrogen source on some rhizospheric properties and persistence of mycorrhizal fungal propagules in an andisol. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 2008, 68(2): 119–127.
- [21] Jamet E, Albenne C, Boudart G, Irshad M, Canut H, Pont-Lezica R. Recent advances in plant cell wall proteomics. *Proteomics*, 2008, 8(4): 893–908.
- [22] Yu ZM, He CM, Teixeira Da Silva JA, Zhang GH, Dong W, Luo JP, Duan J. Molecular cloning and functional analysis of DoUGE related to water-soluble polysaccharides from *Dendrobium officinale* with enhanced abiotic stress tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: PCTOC*, 2017, 131(3): 579–599.
- [23] 石永春, 杨永银, 薛瑞丽, 刘巧真. 植物中抗坏血酸的生物学功能研究进展. *植物生理学报*, 2015, 51(1): 1–8.
Shi YC, Yang YY, Xue RL, Liu QZ. Research advance of biological function of ascorbic acid in plants. *Plant Physiology Journal*, 2015, 51(1): 1–8. (in Chinese)
- [24] Burton RA, Gidley MJ, Fincher GB. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6(10): 724–732.
- [25] Feng W, Lindner H, Robbins NE, Dinneny JR. Growing out of stress: the role of cell- and organ-scale growth control in plant water-stress responses. *The Plant Cell*, 2016, 28(8): 1769–1782.
- [26] Klarzynski O, Plesse B, Joubert JM, Yvin JC, Kopp M, Kloareg B, Fritig B. Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology*, 2000, 124(3): 1027–1038.

(本文责编 李磊)