



# 云南野生春兰根系内生微生物多样性的分析

陈健鑫<sup>1#</sup>, 唐婕<sup>1#</sup>, 魏玉倩<sup>1</sup>, 马焕成<sup>2</sup>, 伍建榕<sup>1,2\*</sup>

1 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

2 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

陈健鑫, 唐婕, 魏玉倩, 马焕成, 伍建榕. 云南野生春兰根系内生微生物多样性的分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 156-169.  
CHEN Jianxin, TANG Jie, WEI Yuqian, MA Huancheng, WU Jianrong. Diversity of endophytic microbes in roots of wild *Cymbidium goeringii* in Yunnan[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 156-169.

**摘要:** 春兰(*Cymbidium goeringii*)是一种具有较高经济和观赏价值的地生兰。由于栖息地的严重破坏, 大多数地生兰处于濒危状态, 根系与微生物的共生关系伴随着兰科植物从种子萌发到开花结果, 因此根系内生微生物在地生兰生活史中具有重要作用。【目的】分析野生春兰根系内生菌群落组成与潜在功能, 为春兰的人工保育提供理论依据。【方法】采集云南省昆明市、保山市和大理州的野生春兰的根系, 利用宏基因组测序, 并进行物种注释及功能注释。【结果】保山的春兰根内微生物丰度及多样性大于大理及昆明的春兰样品, 春兰根系内生真菌的优势门为担子菌门(*Basidiomycota*)、子囊菌门(*Ascomycota*)和球囊霉门(*Glomeromycota*), 优势科为球囊霉科(*Glomeraceae*)、多孔菌科(*Polyporaceae*)和角担菌科(*Ceratobasidiaceae*), 其中角担菌科是春兰主要的兰科菌根真菌(orchid mycorrhizal fungi, OMF); 内生细菌的优势门为厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*), 优势科为韦荣球菌科(*Erysipelotrichaceae*)、*Cyclobacteriaceae*和醋酸杆菌科(*Acetobacteraceae*); 内生古菌的优势门为广古菌门(*Euryarchaeota*)和奇古菌门(*Thaumarchaeota*), 优势科为钠白菌科(*Natrialbaeae*); 病毒以花椰菜花叶病毒科(*Caulimoviridae*)为主。春兰根系内生菌的功能在KEGG数据库主要被注释到新陈代谢(metabolism)和遗传信息加工(genetic information processing)两大通路, PHI数据库注释提示, 镰孢属(*Fusarium/Gibberella*)、巨座壳属(*Magnaporthe*)和曲霉属(*Aspergillus*)可能成为野生春兰潜在病原

资助项目: 国家自然科学基金(31860208); 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)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31860208), the National Key Research and Development Program of China (2019YFD100200X), and the Yunnan Provincial Innovation Team on Kapok Fiber Industrial Plantation (2018HC014).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

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

Received: 2022-04-10; Accepted: 2022-06-25; Published online: 2022-07-14

菌。【结论】本研究明确了云南省三地区野生春兰根系内生菌的主要类群，首次发现了春兰根系中有球囊霉科真菌定殖，并对内生菌群进行功能注释分析，为野生春兰保育、人工幼苗菌根化及病害防治提供理论依据。

关键词：春兰；根系内生微生物；宏基因组；KEGG 数据库；PHI 数据库

## Diversity of endophytic microbes in roots of wild *Cymbidium goeringii* in Yunnan

CHEN Jianxin<sup>1#</sup>, TANG Jie<sup>1#</sup>, WEI Yuqian<sup>1</sup>, MA Huancheng<sup>2</sup>, WU Jianrong<sup>1,2\*</sup>

1 Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Universities of Yunnan, College of Biodiversity Conservation, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China

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

**Abstract:** The terrestrial *Cymbidium goeringii* is of high ornamental and economic value. With the habitats being destructed, most terrestrial orchids are endangered. The roots of *Orchidaceae* plants maintain a symbiotic relationship with microbes from seed germination to flowering and fruiting. Therefore, the endophytic microbes of the roots play an important part in the life cycle of terrestrial orchids. **[Objective]** In this study, we analyzed the composition and potential functions of endophytic microbes in the roots of wild *C. goeringii*, hoping to provide a reference for artificial conservation of this species. **[Methods]** Metagenomic sequencing of wild *C. goeringii* roots collected from Kunming City, Baoshan City, and Dali City in Yunnan Province was performed, and the species and functions of species were analyzed. **[Results]** The abundance and diversity of microbes in roots of *C. goeringii* collected from Baoshan City were higher than those in samples from Dali City and Kunming City. The dominant phyla of endophytic fungi were *Basidiomycota*, *Ascomycota*, and *Glomeromycota* and the dominant families were *Glomeraceae*, *Polyporaceae*, and *Ceratobasidiaceae*, among which *Ceratobasidiaceae* fungi were the major orchid mycorrhizal fungi (OMF). The endophytic bacteria were dominated by *Firmicutes*, *Proteobacteria*, and *Bacteroidetes*, as well as *Erysipelotrichaceae*, *Cyclobacteriaceae*, and *Acetobacteraceae*. As for the endophytic archaea, the dominant phyla and family were *Euryarchaeota*, *Thaumarchaeota*, and *Natrialbaceae*. Caulimoviridae dominated the endophytic viruses. These microbes were mainly involved in Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathways of metabolism and genetic information processing. The annotation of pathogen-host interactions (PHI) database suggested that endophytic *Fusarium/Gibberella*, *Magnaporthe*, and *Aspergillus* may be the potential pathogens of wild *C. goeringii*. **[Conclusion]** In this study, the main groups of endophytic microbes in the roots of wild *C. goeringii* in three regions of Yunnan Province were identified, and the colonization of *Glomeraceae* was found for the first time in *C. goeringii*. Moreover, the functions of the endophytic microbes were analyzed. The result is expected to lay a theoretical

basis for the conservation of wild *C. goeringii*, mycorrhization of artificial seedlings, and disease control.

**Keywords:** *Cymbidium goeringii*; endophytic microbes of roots; metagenome; KEGG database; pathogen-host interactions database

春兰(*Cymbidium goeringii*)属于兰科(*Orchidaceae*)兰属(*Cymbidium*)的地生兰,在云南省主要分布在大理州、迪庆州、保山市及丽江市等<sup>[1-3]</sup>,因其具有较高的观赏和经济价值,长期吸引了无数国内外园艺爱好者,也导致野生春兰资源被大量盗挖,加之栖息地破坏与生态环境恶化,春兰种质资源迅速枯竭,对种群延续构成了严重的威胁<sup>[4]</sup>。

根系与微生物建立共生关系是大多数陆地植物的共同特征,兰科植物完成完整的生活史并在生态系统中成功地建立种群,也离不开菌根营养及其他密切互作的微生物的作用。野生状态下的地生兰基本都与真菌共生形成菌根<sup>[5]</sup>,依靠菌根提供水分和矿质元素,同时提供部分碳元素、氮元素和磷元素等多种营养物质完成整个生活史<sup>[6-7]</sup>。能与兰科植物根系形成互惠共生关系或兰花单向偏利共生关系的真菌称为兰科菌根真菌(orchid mycorrhizal fungi, OMF)<sup>[5]</sup>,主要包括担子菌门(*Basidiomycota*)和子囊菌门(*Ascomycota*),其中胶膜菌科(*Tulasnellaceae*)、角担菌科(*Ceratobasidiaceae*)和蜡壳耳目(*Sebacinales*)真菌是目前所公认的 OMF 类群<sup>[8-9]</sup>。菌根真菌的菌丝通过富集并吸收土壤中硝酸盐和磷酸盐等营养元素,并传递给寄主植物用于生长和发育,同时,向寄主植物换取菌根真菌自身生长所需的碳水化合物<sup>[10-11]</sup>。除 OMF 外,兰科植物根系中还存在数量更为庞大的内生真菌和内生细菌<sup>[7,12]</sup>。丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)是球囊菌门(*Glomeromycota*)的一类专性活体营养共生菌,能与 80%的高等

植物形成互惠共生体,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、氮素淋溶等许多土壤氮素循环过程,能促进植物生长和加快幼苗成活<sup>[13]</sup>。内生细菌是根系内生微生物中另一类重要的组成部分,因其数量多、种类多而在植物生长发育中发挥着重要的作用<sup>[7,12]</sup>。

随着测序技术的发展,宏基因组学(metagenomics)以环境微生物群体的基因组为研究对象,对无法人工培养的微生物的研究提供了新途径<sup>[14-15]</sup>,有效避免了微生物群落结构多样性数据的丢失。京都基因和基因组数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)将基因组信息和生物功能信息相联系<sup>[16]</sup>,测序后的数据在 KEGG 中注释,可以从分子水平了解微生物的功能信息。病原物-寄主相互作用数据库(Pathogen Host Interactions Database, PHI)收录了已验证的 264 种病原物对 176 种寄主在 8 046 种相互作用的 4 460 个有关基因的相关数据,因此 PHI 数据库注释对发现农林业潜在病原物有着重要的作用<sup>[17]</sup>。

本文作者在进行地生兰与菌根真菌共生关系研究中,曾观察到春兰根系内还定殖着大量的内生真菌及内生细菌<sup>[10,18]</sup>。本研究以采自云南省昆明市、保山市与大理州的野生春兰的菌根为研究对象,通过宏基因组测序技术解析野生春兰菌根内微生物的多样性及其潜在功能,同时分析了菌根内潜在的病原微生物,为后续野生春兰的保育研究和人工大规模组培苗菌根化繁殖提供理论依据。

# 1 材料与方 法

## 1.1 研究区自然状况

哀牢山属云岭山脉的余脉, 位于 23°26′–24°56′N, 100°44′–101°30′E, 呈西北-东南走向, 是云南省地理上一条重要分界线, 也是云南省东、西气候分异的分界线。哀牢山东西两侧的年均降水量和年均太阳总辐射量表现为西侧较大, 而东侧的水热条件较差<sup>[19-20]</sup>。

以哀牢山为分界线, 昆明市地处云贵高原中部, 哀牢山的东侧, 位于 24°23′–26°22′N, 102°10′–103°40′E 之间, 属于低纬度亚热带-高原山地季风气候, 全年温差较小, 日温差较大, 分为干、湿两季, 紫外线强度较高。保山市地处云南省西部, 哀牢山的西部, 位于 24°08′–25°51′N, 98°25′–100°02′E 之间, 属于低纬度山地亚热带季风气候, 由于地形复杂且地处低纬度高原地区, 形成年温差较小、日温差较大、降水充沛和干湿分明的气候特点。大理白族自治州地处云贵高原与横断山脉结合部位, 境内以老君山-点苍山-哀牢山-一线的大断裂为界, 位于 24°41′–26°42′N, 98°52′–101°03′E, 属于低纬度高原季风气候, 四季温差小, 太阳辐射角较大, 分旱、雨两季<sup>[21-23]</sup>。

## 1.2 样品采集

2020 年 8 月, 在云南省昆明市、保山市及大理白族自治州的松-栎混交林中, 采集野生状态下生长势一致的健康春兰根系样品。每个地区分别选取 6 株健康春兰根系, 用 75%乙醇擦拭枝剪及根系组织表面, 将根系剪断后立即用石蜡密封伤口, 分别装入无菌 50 mL 离心管内, 放入 4 °C 冰盒, 低温运输带回实验室进行后续实验。

## 1.3 根系表面消毒与总 DNA 提取

根系进行表面消毒去除表面杂菌的污染。方 法如下: 在装有根系的无菌离心管内加入 25 mL

无菌水及 10 颗无菌小玻璃珠并适当地振荡, 重复洗涤 3 次, 以去除表面附着的土壤颗粒及杂菌; 然后用无菌刀片去除密封伤口的石蜡, 用 70%乙醇浸泡 1 min 后用无菌水洗涤 3 次, 再用 2.5% NaClO 溶液浸泡 2 min 后用无菌水洗涤 3 次; 最后转移至 70%乙醇中浸泡 30 s 后用无菌双蒸水彻底漂洗 3 次。吸取 100 μL 最后一遍漂洗的无菌水涂布于 PDA 和 LB 培养基平板上, 倒置培养 5 d 后观察是否有菌落长出, 以此判断表面消毒是否彻底。

表面消毒后的根系放入无菌研钵中用液氮速冻并研磨至粉末状, 分别称取 0.3 g 转移至无菌离心管内, 利用磁珠法植物基因组 DNA 提取试剂盒(杭州联川生物技术股份有限公司)提取根系总 DNA, 每个样品重复提取 6 份 DNA 样本, 分别将 3 个地区的总 DNA 样品进行混合以减小试验误差, 昆明市、保山市和大理州的根系总 DNA 样品分别编号为 CGRY1、CGRY3 和 CGRY4。春兰根系样品及总 DNA 保存于西南林业大学森林灾害预警与控制实验室-80 °C 冰箱。

## 1.4 文库构建与宏基因组测序

春兰根系总 DNA 提取完成后, 利用 DNA 文库构建试剂盒(杭州联川生物技术股份有限公司)进行文库构建并进行质检。质检合格后委托杭州联川生物技术股份公司通过 HiSeq 4000 仪器进行高通量测序, 测序模式为 PE 150。

## 1.5 宏基因组测序数据处理与分析

样本测序后的原始序列(raw data)通过 FastQC 进行质量控制, 去除测序引入的接头、寄主植物序列污染及低质量的序列。有效序列(clear data)用 metaSPAdes 进行基因组组装, 保留长度≥500 bp 的重叠群(contig), 用 QUAST 对组装的结果进行评估。用 MetaGeneMark 对组装后的重叠群进行编码区(coding region)预测, 保留长度≥100 nt 的序列, 用 CD-HIT 去除冗余

获得非冗余基因。

以 95%的一致性(identity)和 90%的覆盖度(coverage)进行聚类分析,利用 Bowtie 2 获得非重复序列(unigene),利用韦恩图(Venn)统计分析多组样品中共有和独有的非重复序列数目。利用 DIAMOND 将非重复序列与 NR meta 数据库(<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/FASTA/nr.gz>)进行比对(BLASTp,  $E \text{ value} \leq 10^{-5}$ ),选取  $E \text{ value} \leq \text{min-evalue}^{10}$  的比对结果进行物种分类,绘制热图以聚类树的形式反映各样品在各分类水平上的相似性及差异性。

用 DIAMOND 将非重复序列与 KEGG 数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>)和 PHI 数据库(<http://www.phi-base.org/>)的序列进行比对,得到 KEGG 各个层级的信息与 PHI 数据库内病原物的相关信息。

## 2 结果与分析

### 2.1 数据质控及序列组装

高通量测序后 3 个样品平均得到 56 398 700 条原始序列,通过序列质控后获得约 55 879 752 条有效序列,有效序列占比(clean)平均为 99%,质量分数  $Q_{20}$  平均为 98%,质量分数  $Q_{30}$  平均为 94%,GC 含量平均为 37.5%,数据质控结果表明有效数据质量较高,数据可信度较高(表 1)。

样本有效数据组装后平均获得 108 178 个重叠群,样本重叠群的 N50 平均值为 659。其中采自大理州的样本(CGRY4)和采自保山市的

样本(CGRY3)组装效果相对优于采自昆明市的样本(CGRY1)。对组装后 $\geq 500$  bp 的重叠群进行预测,样本的开放阅读框(open reading frame, ORFs)的数目为 150 836,完整基因数目为 68 713 个,占比为 45.55%,非重复序列中基因总长为 46.35 Mb,平均长度为 307.26 bp,样本 GC 含量为 49.94%。由此可见,3 个地区样本的有效序列组装的完整性整体较高,能得到较多完整的基因序列,可用于后续的试验分析。

### 2.2 春兰根系内生微生物注释结果分析

各样本的非重复序列在 NR meta 数据库中进行物种注释。结果表明 3 个样本中约有 94%的物种属于未知(unclassified)种类,4%–5%的物种属于细菌(bacteria),1%的物种属于真核生物(eukaryota),0.1%–0.2%的物种属于病毒(viruses),0.01%的物种属于古菌(archaea)(图 1A)。

对丰度最高的 20 个类群进行物种分类,其余物种设为其他(others)。结果表明,根系中的优势门为厚壁菌门(*Firmicutes*, 1.83%–2.27%),变形菌门(*Proteobacteria*, 0.96%–1.54%),拟杆菌门(*Bacteroidetes*, 0.77%–1.02%),担子菌门(*Basidiomycota*, 0.40%–0.43%)和子囊菌门(*Ascomycota*, 0.31%–0.37%)(图 1B)。根系中的优势科为韦荣球菌科(*Erysipelotrichaceae*, 1.03%–1.15%),*Cyclobacteriaceae* (0.73%–0.98%),醋酸杆菌科(*Acetobacteraceae*, 0.47%–0.54%),芽孢杆菌科(*Bacillaceae*, 0.29%–0.40%)和乳酸杆菌科(*Lactobacillaceae*, 0.30%–0.37%)(图 1C)。

表 1 春兰根系内生微生物宏基因组测序数据

Table 1 Data of endophytic microbes of *Cymbidium goeringii* roots by metagenomic sequencing

Sample	Raw data		Clean data		Clean (%)	$Q_{20}$ (%)	$Q_{30}$ (%)	GC (%)
	Read	Base (Gb)	Read	Base (Gb)				
CGRY1	60 901 956	9.14	60 187 184	8.72	98.83	98.23	94.18	36.93
CGRY3	57 719 326	8.66	57 277 600	8.37	99.23	98.33	94.40	38.90
CGRY4	50 574 820	7.59	50 174 472	7.31	99.21	98.39	94.59	36.69

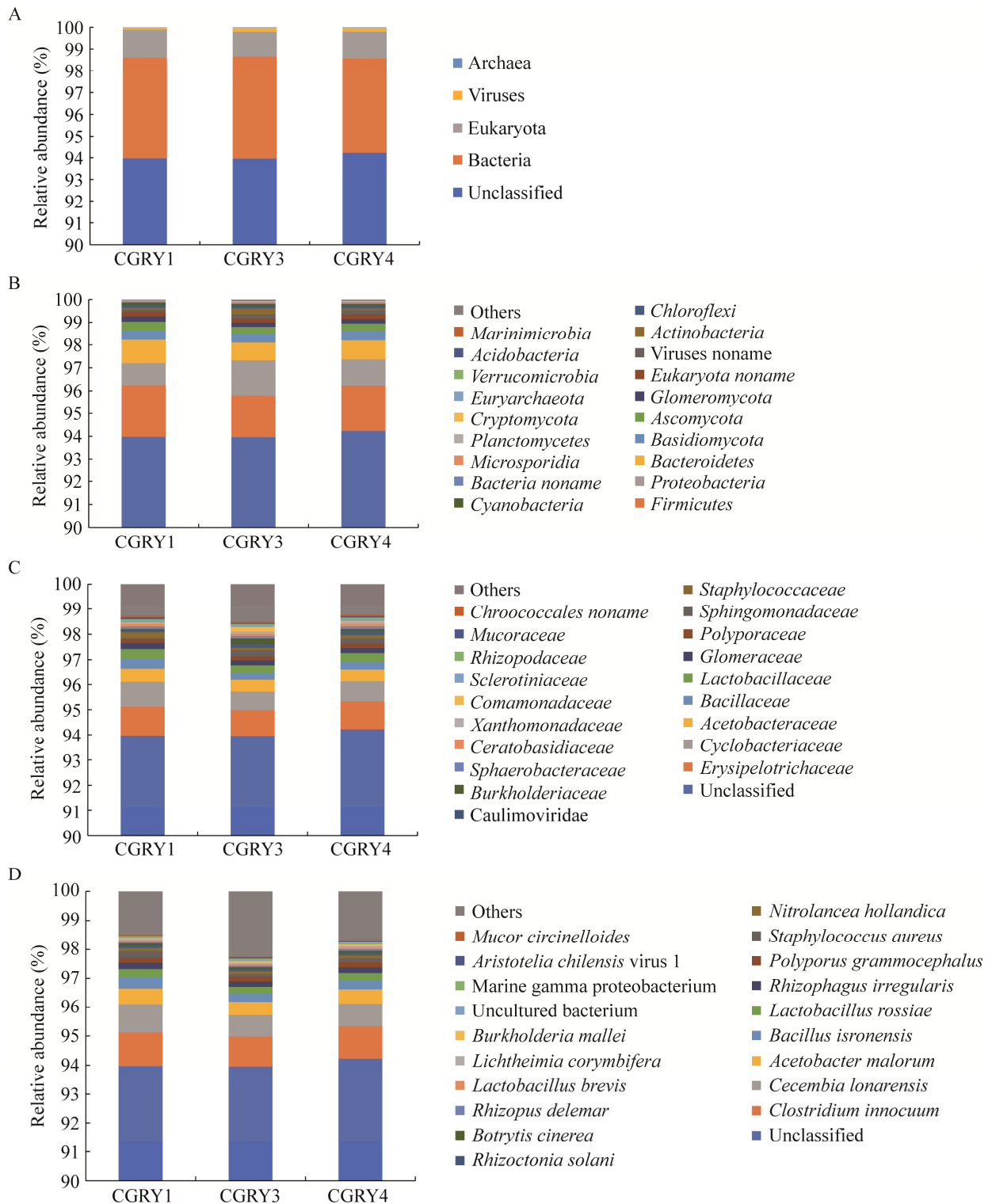


图 1 春兰样本内生微生物群落的相对丰度(前 20)

Figure 1 Relative abundances of endophytic microorganisms of *Cymbidium goeringii* mycorrhiza (top 20). A: Kingdom. B: Phylum. C: Family. D: Species. CGRY1: *C. goeringii* from Kunming City; CGRY3: *C. goeringii* from Baoshan City; CGRY4: *C. goeringii* from Dali City.

根系中的优势种为无害梭菌 (*Clostridium innocuum*, 1.03%–1.15%), *Cecembia lonarensis*, (0.73%–0.98%), 苹果酸醋杆菌 (*Acetobacter malorum*, 0.47%–0.54%), 伊斯隆恩芽孢杆菌 (*Bacillus isronensis*, 0.29%–0.39%)和罗西亚乳杆菌 (*Lactobacillus rossiae*, 0.23%–0.28%) (图 1D)。

整体水平上的物种注释结果表明, 3 个地区野生春兰根系内生微生物物种组成相似, 即同一物种内生微生物群落组成相关性较高, 但在不同采集地样品中各类群所占比例存在差异。野生春兰根系内生微生物的优势类群为细菌, 优势类群为厚壁菌门和变形菌门。内生真菌占比稍低, 优势类群为子囊菌门和担子菌门。

先前已被广泛认可的兰科菌根真菌整体水平占比较少, 仅有角担菌科真菌处于相对丰度的前 20 位。整体水平的物种注释结果揭示了细菌是春兰根系内生微生物中主要的类群, 与兰科菌根真菌共同调控春兰的生长发育。

结合 Krona 对物种注释的结果进行进一步可视化分析, 结果表明, 根系内生真菌的相对丰度为 1.14%–1.27%, 其中, 优势科为球囊霉科 (*Glomeraceae*, 16%–18%)、多孔菌科 (*Polyporaceae*, 13%–15%)、角担菌科 (*Ceratobasidiaceae*, 7%–8%)、核盘菌科 (*Sclerotiniaceae*, 5%–6%) 和毛霉科 (*Mucoraceae*, 4%–6%) (图 2A)。3 个春兰根系样本中各真菌物种的相对丰度相似, 角担菌科真菌是野生春兰 OMF 的主要类群。值得注意的是, 采集自 3 个地区的春兰根系中均有球囊霉科的定殖, 且 CGRY1 中球囊霉科的丰度高于其余 2 份样品。

根系内生细菌在微生物组的相对丰度为 4%–5%, 其中, 优势科为韦荣球菌科 (*Erysipelotrichaceae*, 22%–25%)、*Cyclobacteriaceae* (16%–21%)、醋酸杆菌科 (*Acetobacteraceae*, 11%–12%)、芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*, 6%–9%)

和乳酸杆菌科 (*Lactobacillaceae*, 6%–8%) (图 2B)。其中 *Cyclobacteriaceae* 在 CGRY1 中丰度较高, 鞘脂单胞菌科 (*Sphingomonadaceae*) 在 CGRY3 和 CGRY4 中的丰度显著高于 CGRY1 中的丰度, *Comamonadaceae* 在 CGRY3 中的丰度显著高于其他 2 个样本中丰度, 其余细菌种类在 3 份春兰根系样本中相对丰度相似。

根系内生古菌 (0.01%) 和病毒 (0.1%–0.2%) 在微生物组的占比较小。在内生古菌中, 除未命名及未分类的种类外, 优势科为钠白菌科 (*Natrialbaceae*, 41%–60%) (图 2C), 钠白菌科在 CGRY3 和 CGRY4 中的丰度较高, 而奇古菌门 (*Thaumarchaeota*) 在 CGRY1 中的相对丰度较高。在病毒类群中, 花椰菜病毒科 (*Caulimoviridae*, 72%–88%) 为优势科 (图 1C)。

### 2.3 春兰根系内生微生物物种相似性和差异性分析

通过 Venn 分析, 结果显示了 3 个样本共有 113 121 个非重复序列, CGRY1 特有数量为 2 250, CGRY3 特有数量为 18 618, CGRY4 特有数量为 3 074, 即采自保山市的春兰根系内生微生物丰富度和特有的微生物数量较采自大理和昆明地区的春兰样品具有更高的水平。

选取春兰根系内生微生物组中丰度最高的前 20 个物种在门水平和种水平进行聚类热图分析, Heatmap 纵向聚类表示不同内生微生物在 3 个春兰样本中丰度的聚类情况, 横向聚类表示某一物种在不同样本中丰度的聚类情况, 在 2 个分类阶元的水平上, CGRY3 与 CGRY4 的丰度相似度更高, 即保山和大理地区春兰根系内微生物的组成较为相似。

在门水平上, 春兰根系内生微生物共聚为 4 大簇 (clade), 丰度从高到低依次为 clade II > clade I > clade III > clade IV; 在 clade I 中, 放线菌门 (*Actinobacteria*) 在 CGRY3 中丰度较高, 在

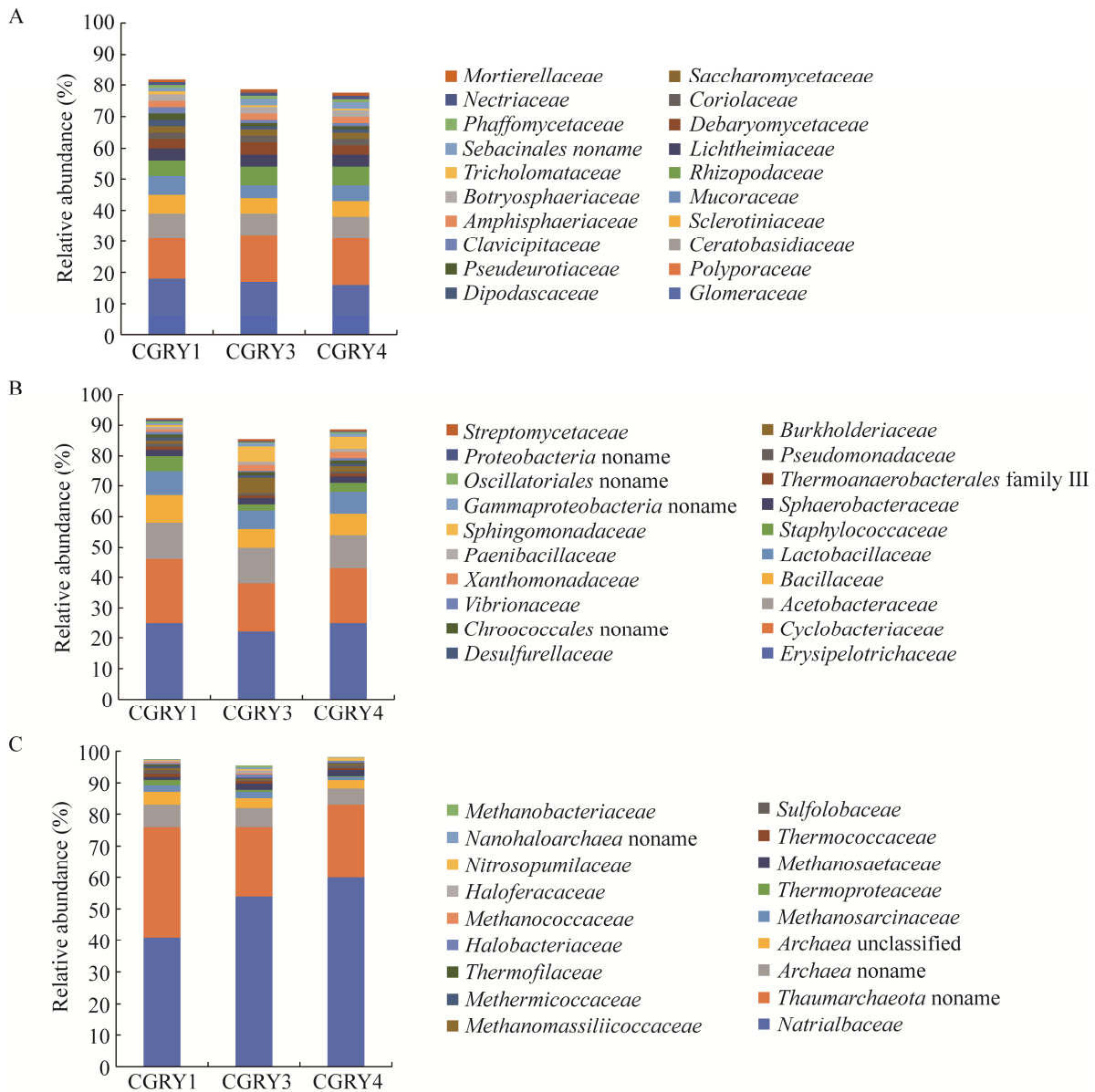


图 2 春兰样本内生菌在科水平的相对丰度(前 20)

Figure 2 Relative abundances of endophyte of *Cymbidium goeringii* samples at the family level (top 20). A: Fungi. B: Bacteria. C: Archaea. CGRY1: *C. goeringii* from Kunming City; CGRY3: *C. goeringii* from Baoshan City; CGRY4: *C. goeringii* from Dali City.

clade II 中, 变形菌门(*Proteobacteria*)在 CGRY3 中丰度较高, 拟杆菌门(*Bacteroidetes*)在 CGRY1 中丰度较高, 其余微生物群落在 3 个样本中相似性较高(图 3A)。

在种水平, 春兰根系内生微生物共聚为 3 大簇, 丰度从高到低依次为 clade III>clade II>clade I,

其中 *Burkholderia mallei* 在 CGRY3 与 CGRY4 中丰度较高, *Mucor circinelloides* 在 CGRY1 与 CGRY4 中丰度较高, 其他(others)在 CGRY3 中的相对丰度大于其余 2 个样本的相对丰度, 表明保山地区的春兰根系内生微生物类群更为丰富, 其余物种在不同样本间相似度较高(图 3B)。



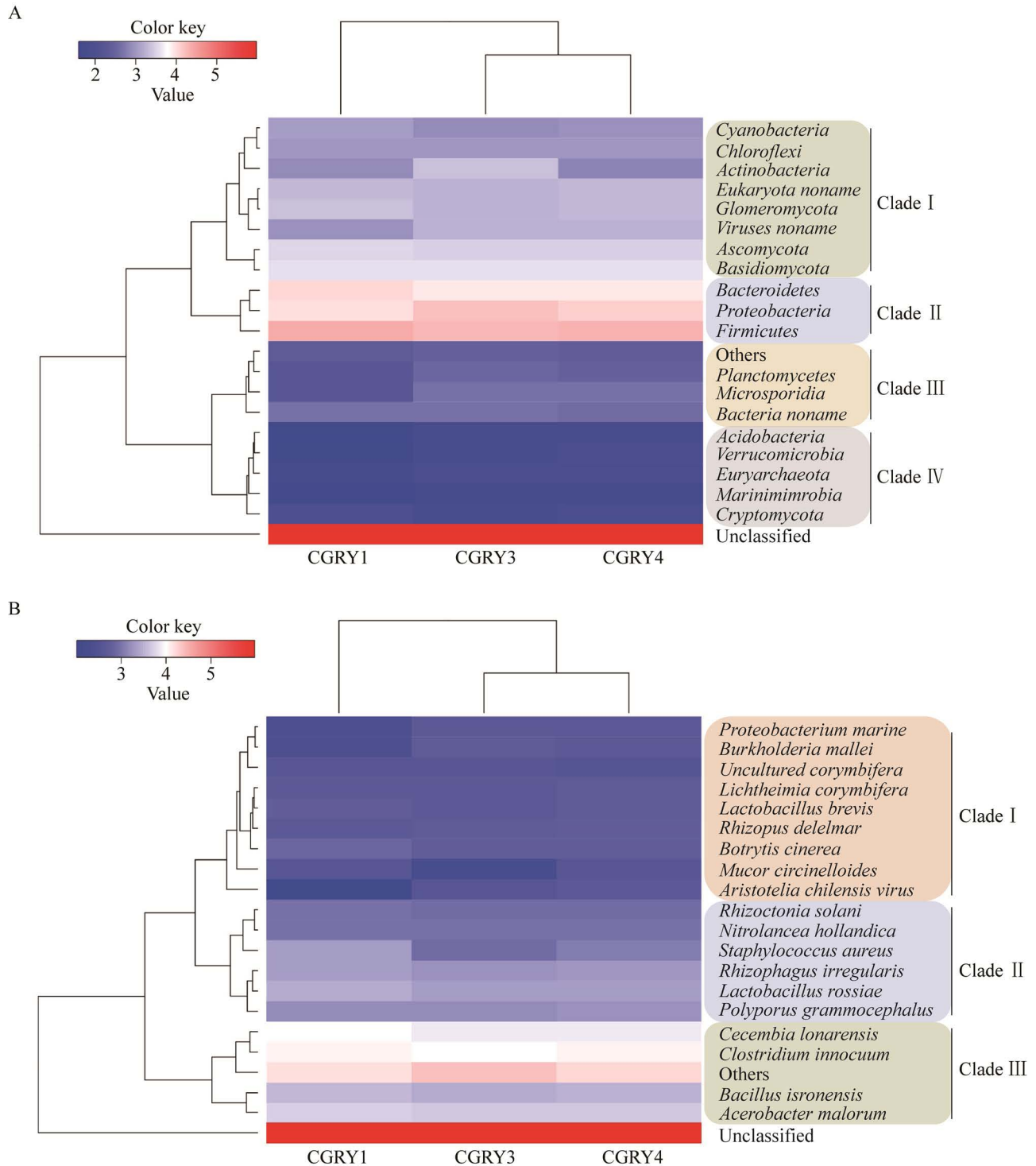


图 3 春兰样本内生微生物相对丰度热图(前 20)

Figure 3 Heatmap of endophytic microbial relative abundances of *Cymbidium goeringii* samples (top 20). A: Phylum level; B: Species level. CGRY1: *C. goeringii* from Kunming City; CGRY3: *C. goeringii* from Baoshan City; CGRY4: *C. goeringii* from Dali City.

### 2.4 春兰根系内生微生物 KEGG 注释结果分析

将非重复序列在 KEGG 数据库中进行注释, 3 个样品共有 42 687 个非重复序列注释到 KEGG 的 42 条代谢通路中(图 4)。在第一层次的通路中, 注释到新陈代谢(metabolism)通路的数量最多, 共有 26 466 条; 其次是遗传信息加工(genetic information processing), 共 5 994 条; 环境信息加工(environmental information processing),

共 4 921 条; 细胞过程(cellular processes), 共 1 966 条。在新陈代谢通路中的第二层水平中, 除 4 960 条非重复序列被注释到 overview 外, 氨基酸代谢(amino acid metabolism), 碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)和能量代谢(energy metabolism)是被注释最多的途径。KEGG 数据库注释结果揭示了根系内生微生物主要通过调控春兰氨基酸和碳水化合物代谢过程来促进春兰的生长发育。

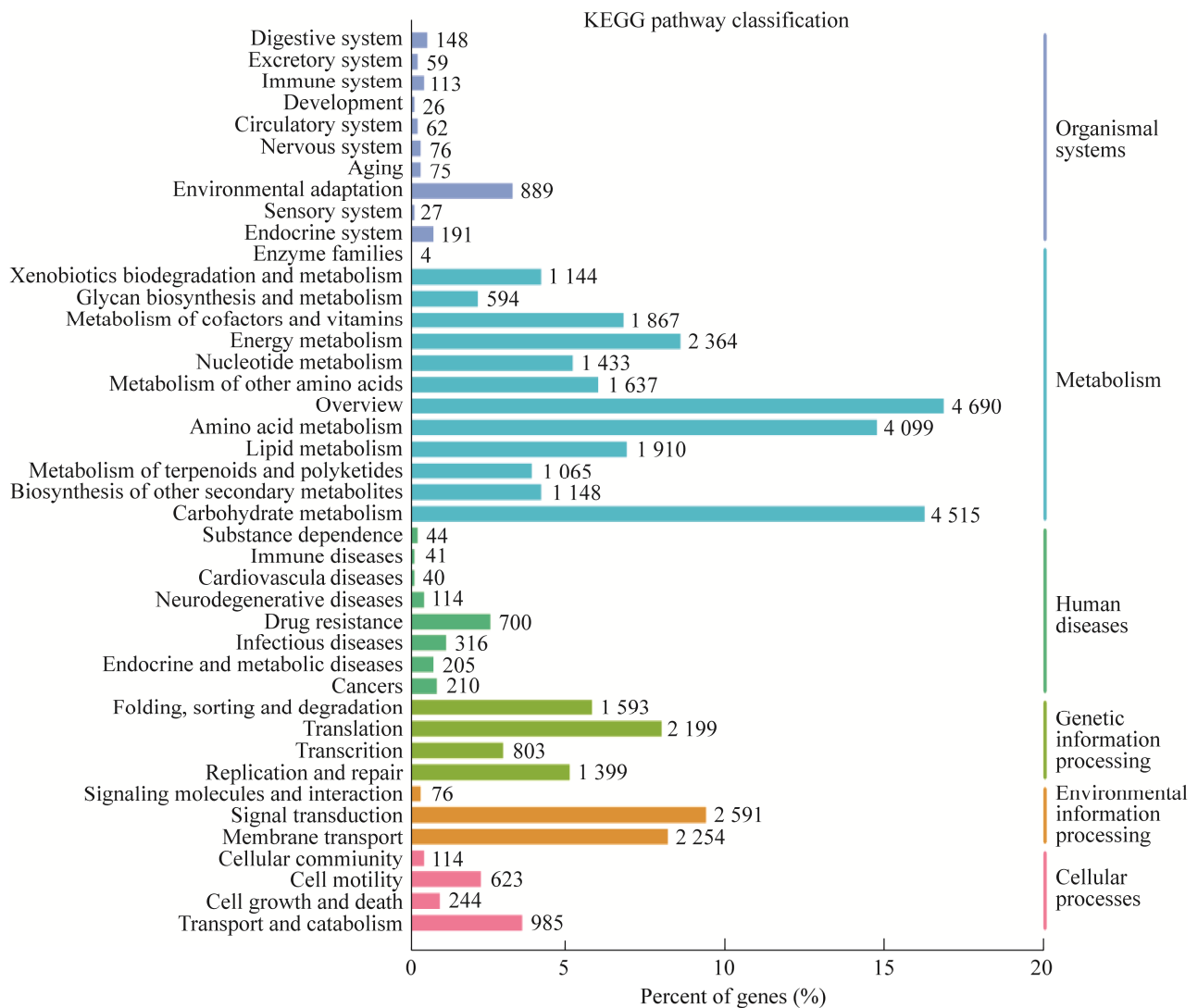


图 4 内生微生物的 KEGG 注释统计图

Figure 4 KEGG annotated statistical chart of endophytic microbes.

## 2.5 春兰根系内微生物 PHI 注释结果分析

将非重复序列在 PHI 数据库中进行注释, 共有 199 个非重复序列被注释到 PHI 病原物信息中, 注释结果一致性 $\geq 50\%$ 的非重复序列数量为 51 个, 其中包含了 36 个与植物相关的病原物信息(图 5)。统计结果表明, 禾谷镰孢菌 [*Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*)], 稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)和烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*)是被注释最多类群, 提示我们在野生春兰保育及人工扩繁时, 应关注并预防春兰内生菌向病原菌的转变, 导致根部腐烂造成的病害发生。

## 3 讨论与结论

本研究结果表明野生春兰根系内存在大量的微生物, 且多数属于未知微生物。研究发现角担菌科真菌是 OMF 的主要类群, 这与伍建榕

等之前用分离培养的方法获得的春兰菌根真菌一致<sup>[24]</sup>, 此外, 还有大量内生细菌和内生真菌的定殖。整体的物种注释结果表明, 春兰根系内生微生物物种组成高度一致, 但内生微生物群落不同地区春兰样品中所占比例存在差异, 表明不同的自然地理环境影响着寄主微生物种类组成, 也体现了同一寄主植物募集内生菌种类存在一定的特异性。KEGG 数据库注释结果表明春兰根系内生微生物通过参与春兰的新陈代谢中的氨基酸代谢、碳水化合物代谢及能量代谢通路, 调控春兰的生长发育过程, PHI 数据库注释揭示了自然环境中镰孢属/赤霉菌属、巨座壳属和曲霉属的真菌可能会引发春兰根部病害的发生。

值得注意的是, 除已被研究证实属于 OMF 的物种外, 3 份春兰样本中还包含了丰富的内生真菌和内生细菌。本研究首次发现野生春兰根系

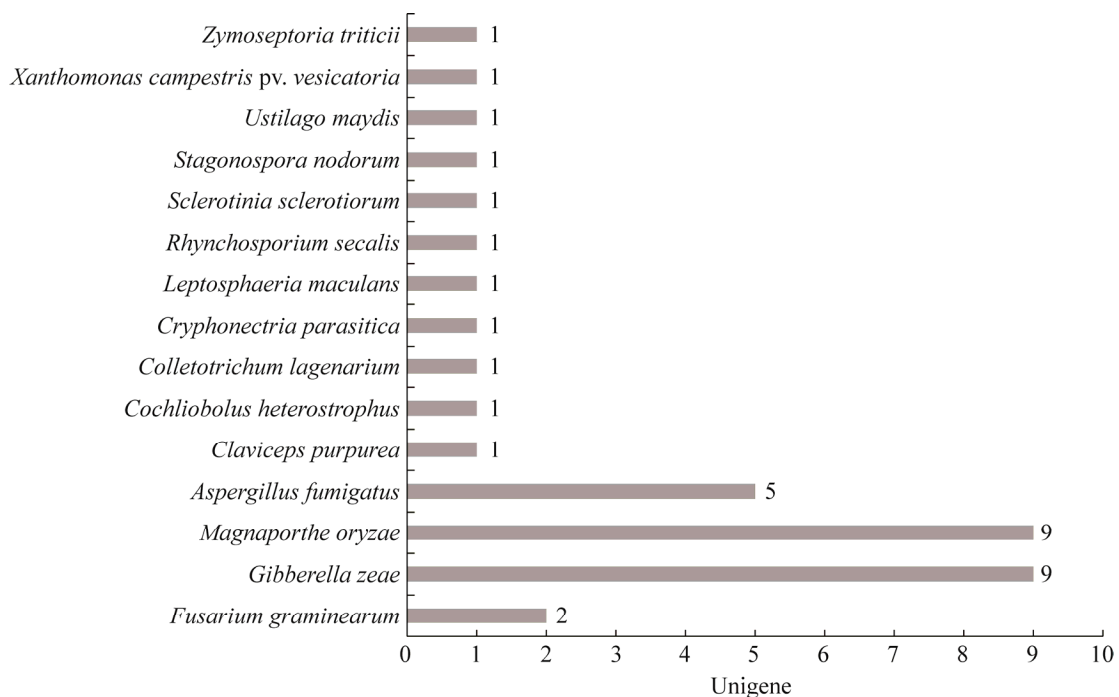


图 5 内生微生物的 PHI 注释统计图

Figure 5 PHI annotated statistical chart of endophytic microbes.

除了有 OMF 定殖外, 还有 AMF 的定殖, 其中主要以球囊霉科(*Glomeraceae*)真菌为 AMF 的主要类群。此外, 采自昆明地区春兰根系中球囊霉门的相对丰度高于其他两地样品的相对丰度, 表明生长于昆明地区的春兰通过募集土壤中 AMF 的定殖以适应昆明的干旱季节。大理和保山地区植被覆盖率高, 土壤松软富含腐殖质, 更适于地生兰的生长<sup>[18-19]</sup>, 因此在保山市和大理州的松-栎混交林下的春兰长势较好, 根系内 AMF 的相对丰度水平低于昆明地区春兰样品的丰度。

本研究发现春兰根系中内生细菌的优势类群为韦荣球菌科、*Cyclobacteriaceae*、醋酸杆菌科、芽孢杆菌科和乳酸杆菌科, 这与先前的研究报道存在相似的结果。Tsavkelova 等揭示了地生兰根系内生细菌主要包括节杆菌属(*Arthrobacter*), 芽孢杆菌属(*Bacillus*), 分枝杆菌属(*Mycobacterium*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)<sup>[7]</sup>, Wilkinson 等报道了假单胞菌属, 黄单胞菌属(*Xanthomonas*), 芽孢杆菌属和节杆菌属为澳大利亚地生兰根系内生细菌的优势类群<sup>[12]</sup>。本研究中注释到的内生真菌的优势类群主要是子囊菌门和担子菌门真菌, 陈娟等报道了石斛属非菌根内生真菌约 80%属于子囊菌门, 其中炭角菌属(*Xylaria*), 镰孢属(*Fusarium*), 交链孢属(*Alternaria*)、刺盘孢属(*Colletotrichum*)和柱孢属(*Cylindrocarpon*)等是内生真菌的优势类群<sup>[25]</sup>, 蒋玉玲对辽宁省 9 种兰科植物根系真菌进行多样性研究, 结果证实了除珊瑚兰外的所有兰科植物菌根真菌的丰度远远低于非菌根真菌的丰度, 且子囊菌门的丰度高于担子菌门的丰度<sup>[26]</sup>, 罗阳兰结合传统培养法与高通量测序法对蕙兰内生真菌多样性进行研究分析, 结果发现蕙兰内生真菌以担子菌门为优势类群, 检测出已证实的菌根真菌丰度 <0.1%, 在内生真菌群落中占比较低<sup>[27]</sup>。

本研究通过物种注释发现, 内生细菌是春兰根系中占比较大的类群, 随着组学的发展, 内生细菌的物种组成及潜在的功能越来越得到重视。研究指出根系内生细菌主要通过促进种子萌发、生物固氮作用、产生植物激素、促进营养物质吸收、抗病性与促进菌根真菌的生长等方式促进植物的生长<sup>[27-31]</sup>。兰花内生真菌、内生细菌与 OMF 共同构成了根系内独特的微生物群落, 三者相互协调, 相互作用, 共同调控春兰的生长发育过程。本研究中, 春兰根系内微生物的非重复序列在 KEGG 数据库中大多被注释到了新陈代谢的通路中, 由此推断根系内生微生物可能通过调节春兰的新陈代谢, 促进营养物质的吸收来促进春兰的生长与繁殖, 该结果与先前基于传统分离培养后进行功能验证的结果具有一致性<sup>[24,31]</sup>。在今后的深入研究中, 将碳元素循环、氮元素循环和磷元素循环在 KEGG 中第三、四层水平进行关键基因分析, 并结合传统分离法筛选有效的菌株, 将内生真菌与内生细菌进行单一接种与混合接种, 对研究内生真菌与内生细菌的功能、二者间相互关系及春兰根系的共生系统是必要的。

另一方面通过 PHI 数据库注释, 结果注释到镰孢属(*Fusarium*)非重复序列数量最多, 揭示了由镰孢菌引起的根腐病应该是春兰保育及人工栽培中值得关注的一类重要的根部病害。魏勤等和唐婕等学者研究发现镰孢属能导致兰科植物根腐病发生<sup>[18,32]</sup>, 范黎等学者分离得到镰孢菌, 经验证发现两株镰孢可以促进种子的萌发<sup>[33]</sup>, 因此作为一类土壤常见的真菌, 镰孢菌与兰科植物的生长存在着密切的联系, 在环境因子的影响下, 内生菌和病原菌之间维持着动态稳定, 当环境条件和寄主生长势发生变化时, 内生菌转化为病原菌, 将导致病害的发生<sup>[34]</sup>。

## 参考文献

- [1] ARDITTI J. An history of orchid hybridization, seed germination and tissue culture[J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 1984, 89(4): 359-381.
- [2] BI Y, SUO M, TANG M, YE G, WANG H. Characteristics of native *Cymbidium tortisepalum* populations in Yunnan province of China[J]. *Acta Horticulturae*, 2017(1185): 221-230.
- [3] HUANG F, ZHANG C. Diversity, host- and habitat-preferences on the fungi communities from the roots of *Cymbidium* spp. at two sites in China[J]. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 2015, 25: 270-277.
- [4] WILLIAMS SJ, GALE SW, HINSLEY A, GAO JY, ST JOHN FAV. Using consumer preferences to characterize the trade of wild-collected ornamental orchids in China[J]. *Conservation Letters*, 2018, 11(5): e12569.
- [5] BRUNDRETT MC, SCADE A, BATTY AL, DIXON KW, SIVASITHAMPARAM K. Development of *in situ* and *ex situ* seed baiting techniques to detect mycorrhizal fungi from terrestrial orchid habitats[J]. *Mycological Research*, 2003, 107(10): 1210-1220.
- [6] ABUALGHAITH A. Carbon and nitrogen metabolism in orchid-mycorrhiza associations[D]. Sheffield: Doctoral Dissertation of University of Sheffield, 2012.
- [7] TSAVKELOVA EA, CHERDYNTSEVA TA, LOBAKOVA ES, KOLOMEITSEVA GL, NETRUSOV AI. Microbiota of the orchid rhizoplane[J]. *Microbiology*, 2001, 70(4): 492-497.
- [8] CURRAH R. A key and notes for the genera of fungi mycorrhizal with orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*[J]. *Reports of the Tottori Mycological Institute (Japan)*, 1992, 30: 43-59.
- [9] 范黎, 郭顺星. 兰科植物菌根真菌的研究进展[J]. *微生物学通报*, 1998, 25(4): 227-230.  
FAN L, GUO SX. Research progress of mycorrhizal fungi of *Orchidaceae*[J]. *Microbiology*, 1998, 25(4): 227-230 (in Chinese).
- [10] 伍建榕. 云南濒危野生兰花与菌根真菌的相互关系[D]. 南京: 南京林业大学博士学位论文, 2005.  
WU JR. Studies on endangered wild orchids and its relationship with mycorrhizal fungi in Yunnan Province[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Forestry University, 2005 (in Chinese).
- [11] 王美娜, 胡玥, 李鹤娟, 李健, 陈建兵, 兰思仁. 兰科植物菌根真菌研究新见解[J]. *广西植物*, 2021, 41(4): 487-502.  
WANG MN, HU Y, LI HJ, LI J, CHEN JB, LAN SR. New insights into orchid mycorrhizal fungi research[J]. *Guihaia*, 2021, 41(4): 487-502 (in Chinese).
- [12] WILKINSON KG, DIXON KW, SIVASITHAMPARAM K, GHISALBERTI EL. Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria[J]. *Plant and Soil*, 1994, 159(2): 291-295.
- [13] CORNEJO P, RUBIO R, BORIE F. Effect of nitrogen source on some rhizospheric properties and persistence of mycorrhizal fungal propagules in an andisol[J]. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 2008, 68(2): 119-127.
- [14] 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[J]. *Chemistry & Biology*, 1998, 5(10): R245-R249.
- [15] KATO S, YAMAGISHI A, DAIMON S, KAWASAKI K, TAMAKI H, KITAGAWA W, ABE A, TANAKA M, SONE T, ASANO K, KAMAGATA Y. Isolation of previously uncultured slow-growing bacteria by using a simple modification in the preparation of agar media[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(19): e00807-e00818.
- [16] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 27-30.
- [17] URBAN M, CUZICK A, RUTHERFORD K, IRVINE A, PEDRO H, PANT R, SADANADAN V, KHAMARI L, BILLAL S, MOHANTY S, HAMMOND-KOSACK KE. PHI-base: a new interface and further additions for the multi-species pathogen-host interactions database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D604-D610.
- [18] 唐婕, 陈健鑫, 尼玛此姆, 魏玉倩, 落追, 韩雨庭, 吕则佳, 马焕成, 伍建榕. 栽培墨兰根腐病原鉴定与生防菌筛选[J]. *中国农学通报*, 2021, 37(19): 128-133.  
TANG J, CHEN JX, NI M, WEI YQ, LUO Z, HAN YT, LV ZJ, MA HC, WU JR. Pathogen identification and biocontrol screening of root rot of *Cymbidium sinense*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2021, 37(19): 128-133 (in Chinese).
- [19] 郝成元, 朱宗泽, 吴绍洪. 哀牢山东、西两侧植被 NDVI 指数和植被类型与主要环境因子的相关性分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2009, 18(2): 68-72.  
HAO CY, ZHU ZZ, WU SH. Correlation analysis of vegetation NDVI and type of vegetation with main

- environmental factors on eastern and western sides of Ailao Mountain[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2009, 18(2): 68-72 (in Chinese).
- [20] 郎政伟, 巩合德. 气候因子对哀牢山常绿阔叶林的限制作用研究[J]. *绿色科技*, 2013(4): 3-5.  
LANG ZW, GONG HD. Study on the restriction of climate factors to evergreen broad-leaved forest in ailao mountain[J]. *Journal of Green Science and Technology*, 2013(4): 3-5 (in Chinese).
- [21] 吴亮, 董草, 庞磊, 曾双贝. 近65年昆明气候变化及其海绵城市技术探析[J]. *施工技术*, 2017, 46(S1): 1243-1247.  
WU L, DONG C, PANG L, ZENG SB. Effect of climate changing on landscape environment in Kunming in recent 65 years and sponge city technical analysis[J]. *Construction Technology*, 2017, 46(S1): 1243-1247 (in Chinese).
- [22] 陈凤娇, 薛东剑. 大理白族自治州核桃种植气候适宜性区划[J]. *西华师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 40(4): 407-412.  
CHEN FJ, XUE DJ. Climate suitability zoning of walnut planting in Dali Bai nationality autonomous prefecture[J]. *Journal of China West Normal University: Natural Sciences*, 2019, 40(4): 407-412 (in Chinese).
- [23] 孟静娇, 杨宜艳, 杨纪明. 2019年保山市气候条件对玉米种植生长的影响及对策分析[J]. *中国种业*, 2019(11): 25-27.  
MENG JJ, YANG YY, YANG JM. Influence of climatic conditions on the growth of corn and the countermeasures in Baoshan city in 2019[J]. *China Seed Industry*, 2019(11): 25-27 (in Chinese).
- [24] WU JR, MA HC, LÜ M, HAN SF, ZHU YY, JIN H, LIANG JF, LIU L, XU JP. *Rhizoctonia* fungi enhance the growth of the endangered orchid *Cymbidium goeringii*[J]. *Botany*, 2010, 88(1): 20-29.
- [25] 陈娟, 谭小明, 邢咏梅, 郭顺星. 石斛属植物内生真菌及菌根真菌物种多样性研究进展[J]. *中国药学杂志*, 2013, 48(19): 1649-1653.  
CHEN J, TAN XM, XING YM, GUO SX. Advances in research on diversity of endophytic and mycorrhizal fungi of *Dendrobium* (*Orchidaceae*)[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2013, 48(19): 1649-1653 (in Chinese).
- [26] 蒋玉玲. 辽宁省内九种兰科植物菌根真菌多样性研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2018.  
JIANG YL. Mycorrhizal fungi diversity of nine orchids in Liaoning Province[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [27] 罗阳兰. 蕙兰内生真菌多样性及其促生能力的研究[D]. 汉中: 陕西理工大学硕士学位论文, 2019.  
LUO YL. Diversity and growth-promoting ability of endophytic fungi in *Cymbidium faberi*[D]. Hanzhong: Master's Thesis of Shaanxi University of Technology, 2019 (in Chinese).
- [28] 侯天文. 四川黄龙沟优势兰科植物菌根真菌多样性研究[D]. 北京: 北京林业大学硕士学位论文, 2010.  
HOU TW. Mycorrhizal fungi diversity of the dominant orchids in the Huanglong valley, Sichuan[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Forestry University, 2010 (in Chinese).
- [29] TIEN TM, GASKINS MH, HUBBELL DH. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.)[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1979, 37(5): 1016-1024.
- [30] HILL DS, STEIN JI, TORKEWITZ NR, MORSE AM, HOWELL CR, PACHLATKO JP, BECKER JO, LIGON JM. Cloning of genes involved in the synthesis of pyrrolnitrin from *Pseudomonas fluorescens* and role of pyrrolnitrin synthesis in biological control of plant disease[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(1): 78-85.
- [31] SPAEPEN S, VANDERLEYDEN J, REMANS R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2007, 31(4): 425-448.
- [32] 魏勤, 张丽梅, 赫晓蕾, 张灼, 许继宏. 云南几种热带兰根际真菌调查[J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 1999, 21(3): 222-225.  
WEI Q, ZHANG LM, HE XL, ZHANG Z, XU JH. The study on the flora of rhizosphere fungi of tropical orchid[J]. *Journal of Yunnan University: Natural Sciences Edition*, 1999, 21(3): 222-225 (in Chinese).
- [33] 范黎, 郭顺星, 徐锦堂. 我国部分兰科植物菌根的内生真菌种类研究[J]. *山西大学学报(自然科学版)*, 1998, 21(2): 169-177.  
FAN L, GUO SX, XU JT. Fungi endophyte from orchid mycorrhizae in China[J]. *Journal of Shanxi University: Natural Science Edition*, 1998, 21(2): 169-177 (in Chinese).
- [34] FREEMAN S, RODRIGUEZ RJ. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist[J]. *Science*, 1993, 260(5104): 75-78.